



**EGE ÜNİVERSİTESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**1,3-PROPANDİOL'ÜN ÜRETİMİNDE  
FARKLI İMMOBİLİZE KÜLTÜR SİSTEMLERİNİN  
KARŞILAŞTIRMALI İNCELENMESİ**

**Mine GÜNGÖRMÜŞLER**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nuri AZBAR**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu : 621.01.00**

**Sunuş Tarihi : 31.03.2014**

**E. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Bornova-İZMİR**

**2014**



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(DOKTORA TEZİ)**

**1,3-PROPANDİOL'ÜN ÜRETİMİNDE  
FARKLI İMMOBİLİZE KÜLTÜR SİSTEMLERİNİN  
KARŞILAŞTIRMALI İNCELENMESİ**

**Mine GÜNGÖRMÜŞLER**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nuri AZBAR**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu : 621.01.00**

**Sunuş Tarihi : 31.03.2014**

**Bornova-İZMİR  
2014**



Mine GÜNGÖRMÜŞLER tarafından DOKTORA tezi olarak sunulan “1,3-PROPANDİOL’ÜN ÜRETİMİNDE FARKLI İMMOBİLİZE KÜLTÜR SİSTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI İNCELENMESİ” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 31.03.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**Jüri Başkanı** : Prof. Dr. Nuri AZBAR

**Raportör Üye** : Prof. Dr. Murat ELİBOL

**Üye** : Prof. Dr. Delya SPONZA

**Üye** : Prof. Dr. İlgi KARAPINAR KAPDAN

**Üye** : Doç. Dr. Gaye ÖNGEN

**İmza**

.....  
.....  
.....  
.....  
.....



## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “1,3-PROPANDİOL’ÜN ÜRETİMİNDE FARKLI İMMOBİLİZE KÜLTÜR SİSTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI İNCELENMESİ” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğumu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

31 / 03 / 2014

Mine GÜNGÖRMÜŞLER





**ÖZET****1,3-PROPANDİOL'ÜN ÜRETİMİNDE FARKLI İMMOBİLİZE  
KÜLTÜR SİSTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI İNCELENMESİ**

GÜNGÖRMÜŞLER, Mine

Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nuri AZBAR

Mart 2014, 170 sayfa

Hücre immobilizasyonu endüstriyel ürünlerin eldesinde sıkça kullanılan biyoteknolojik bir tekniktir. Son yıllarda bu teknik 1,3-Propandiol (1,3-PDO) gibi katma değeri yüksek ürünlerin eldesinde de kullanılmaya başlanmıştır. 1,3-PDO üretiminde mikroorganizmaların gliserolden anaerobik fermantasyonunun kullanılması, şu an mevcut olan ısıl kimyasal 1,3-PDO üretim tekniklerine çok iyi bir alternatiftir. Bunun sebepleri; yüksek hacimsel verimlere ulaşılabilmesi, daha az enerji kullanılması ve düşük miktarda çevreye zararlı atıklar açığa çıkmasıdır. Bunlara ek olarak, biyodizel üretimi sırasında yağların transesterifikasyonundan elde edilen ana yan ürün olan gliserol gibi yenilenebilir kaynakların kullanımına da olanak sağlanmaktadır. Literatürde kesikli, kesikli beslemeli, sürekli beslemeli ve iki aşamalı sürekli beslemeli sistemler ile bu üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bahsedilen denemelerden farklı olarak bu tez çalışmasında, hücre immobilizasyon yöntemlerinin 1,3-PDO üretimini önemli miktarda arttırabildiği ve daha küçük biyoreaktörlerde dayanıklı ve sürekli üretimlerin gerçekleştirilebileceği başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Hapsetme ve tutundurmayı içeren iki farklı immobilizasyon yöntemi *Klebsiella pneumoniae* (GenBank No: 27F HM063413) kullanılarak sürekli kültürlerde yukarı akışlı dolgu kolon biyoreaktörlerde denenmiştir. İki yöntem de yüksek üretim verimliliklerine ulaşmış olmasına rağmen tutundurma yönteminin daha başarılı olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışması *Clostridium butyricum* 5521'in proteomu incelenerek daha çok detaylandırılmış, böylece düşük ve yüksek giriş gliserol konsantrasyonu içeren fermantasyon ortamlarında farklı büyüme fazlarında gerçekleşen metabolik düzenlemeler ile ilgili bilgi sahibi olunması amaçlanmıştır. 1D, 2D ve MRM'i içeren LC-MS-MS bazlı nicel proteomik analizler farklı ifade edilen proteinleri inceleyebilmek için kullanılmıştır. Sonuçlar yüksek gliserol konsantrasyonunun

büyümeyi yavaşlattığını ve çeşitli yan ürünlerin oluşmasını sağlayan metabolik yollardaki önemli proteinlerin ifadelerini de azalttığını göstermiştir. Bu tez çalışması gliserolden 1,3-PDO'ya giden metabolik yollarda görevli kilit enzimler hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Elde edilen bu veriler genetik manipülasyonlar ve suş geliştirme yöntemleri ile birleştirilerek daha verimli 1,3-PDO üretimleri için özgün stratejiler geliştirilmesinde kaynak olarak kullanılabilir.

**Anahtar sözcükler:** 1,3-propandiol, immobilizasyon, proteomiks, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium butyricum*

**ABSTRACT****COMPARATIVE EVALUATION OF VARIOUS MICROBIAL  
IMMOBILIZATION SYSTEMS FOR THE PRODUCTION OF 1,3-  
PROPANEDIOL**

GÜNGÖRMÜŞLER, Mine

PhD In Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Nuri AZBAR

March 2014, 170 pages

Cell immobilization is a biotechnological technique often used for industrial production of high-value products. In recent years, immobilization techniques have been applied to production of value-added chemicals such as 1,3-Propanediol (1,3-PDO). Biotechnological fermentation of anaerobic bacteria using glycerol is an attractive alternative to current 1,3-PDO production methods, which are primarily thermochemical processes, because it generates high volumetric yields of 1,3-PDO, is a much less energy intensive process, and generates lower amounts of environmental organic pollutants. In addition, renewable resources, such as glycerol being the main by-product of trans esterification of fats in the biodiesel production can be used as a substrate during this production. Although several approaches including batch, fed-batch, continuous-feed, and two-step continuous-feed were tested in suspended systems in literature, in this thesis, it has been well demonstrated that cell immobilization techniques can significantly enhance 1,3-PDO production and allow robust continuous production in smaller bioreactors. Two different immobilization approaches including attachment and entrapment, were tested by continuous cultures of *Klebsiella pneumoniae* (GenBank No: 27F HM063413) in up flow packed bed column bioreactors. Although both methods lead to higher productivities than suspended culture, attachment of cells were reported to be more successful.

This thesis was furthermore detailed by the investigation of the proteome of *Clostridium butyricum* 5521 in order to gain insight into the metabolic regulations during two growth phases of 1,3-PDO synthesis in medium containing low and high initial glycerol concentrations. Three different quantitative LC-MS-MS proteomic analyses including 1D, 2D and MRM, were conducted to identify differentially expressed proteins. The results showed that high glycerol

concentration slowed down growth and lowered the expressions of some key proteins that are important in the metabolic pathways leading to various end-products. This thesis provides insight into the key enzymes and metabolic pathways involved in the synthesis of 1,3-PDO from glycerol, and these data may be used to facilitate the development of novel strategies for a more efficient synthesis of 1,3-PDO by the utilization of genetic manipulations or strain improvement.

**Keywords:** 1,3-propanediol, immobilization, proteomics, *Clostridium butyricum*

## TEŞEKKÜR

Bilim dünyasına ilk adım attığım andan itibaren tüm çalışmalarım boyunca beni yönlendiren, yardımını ve deneyimlerini esirgemeyen ve beni teşvik ederek çalışmalarımı hep daha iyiye götürmemi sağlayan değerli danışmanım ve hocam sayın Prof. Dr. Nuri AZBAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Değerli hocalarım Prof. Dr. Delya SPONZA'ya ve Prof. Dr. Murat ELİBOL'a tez izleme aşamalarımda, farklı disiplinlerden özgün bilimsel bakış açıları katarak tezime sağladıkları özgünlükten dolayı çok teşekkür ederim.

Yurtdışı çalışmalarım boyunca bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. David B. LEVIN'e, Doç. Dr. Richard SPARLING'e, Prof. Dr. Nazım ÇİÇEK'e, Doç. Dr. Lorenzo BERTIN'e ve Prof. Dr. Fabio FAVA'ya yapıcı ve yönlendirici katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım ve diğer bir çok konuda bana destek olan çalışma arkadaşım Çağdaş GÖNEN'e, çalışmalarım boyunca bana her açıdan destek olan sevgili arkadaşlarım Tuğba KESKİN GÜNDOĞDU'ya, Fatma Gizem AVCI'ya, Silvia CASALI'ye, Selene GRILLI'ye, Marcel TAILLEFER'e, proteomiks çalışmalarım yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Marine GRIGORYAN'a, Dmitry SHAMSHURIN'e, Victor SPICER'a ve Graham ALVAREZ'e çok teşekkür ederim.

Tüm çalışmalarım ve doktora sürecim boyunca manevi desteğini benden esirgemeyen ve hep yanımda olannışanım Burak YILMAZ'a, bu günlere gelmemi sağlayan ve tüm bu süreçte benden maddi manevi desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen sevgili kardeşim Alper GÜNGÖRMÜŞLER'e, annem Rana GÜNGÖRMÜŞLER'e ve babam Şükrü GÜNGÖRMÜŞLER'eminnet duyarak sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması 109Y150 no'lu TÜBİTAK-ÇAYDAG projesi, TÜBİTAK-BİDEB 2214 doktora öğrencileri için yurtdışı araştırma bursu desteği, 2008/BİL/032 ve 2009/MÜH/007 no'lu Ege Üniversitesi BAP projelerinin destekleri ile sağlanmış ve aynı olarak Ege Biyoteknoloji A.Ş. tarafından da finansal olarak desteklenmiştir.



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxxii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Biyoekonomi ve Biyomalzeme Sektörü .....	4
2.2 1,3-Propandiol Üretimi .....	9
2.2.1 Kimyasal yollar ile 1,3-PDO üretimi.....	10
2.2.2 Biyoteknolojik yollar ile 1,3-PDO üretimi .....	10
2.3 Biyoproses Mühendisliği Kullanılarak Gerçek Ölçekte 1,3-Propandiol Üretim Çalışmaları .....	17
2.4 Hücre İmmobilizasyon Yöntemleri ve 1,3-Propandiol Üretimi .....	19
2.4.1 Hücrelerin tutundurulması .....	22
2.4.2 Hücrelerin hapsedilmesi .....	23
2.4.3 Kapsama (Bir bariyer arkasına alma) .....	24
2.4.4 Agregasyon (Hücre kümeleşmesi).....	26
2.4.5 Hücre immobilizasyonunun avantaj ve dezavantajları .....	28
2.5 Proteomik Analizler ve 1,3-Propandiol Üretimi.....	29

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	31
3.1 İmmobilize Sistemlerde Kullanılan Mikroorganizma ve Özellikleri.....	31
3.2 Büyüme ve Fermantasyon Ortamı .....	31
3.3 Askıda Kùltürler ile Gerçekleştirilen Deneme Düzenekleri .....	32
3.3.1 Kesikli denemeler .....	32
3.3.2 Sürekli denemeler .....	32
3.4 İmmobilize Kùltürler ile Gerçekleştirilen Deneme Düzenekleri .....	34
3.4.1 Tutundurma ile immobilizasyon denemeleri .....	34
3.4.2 Hapsetme (Lentikat®) ile immobilizasyon denemeleri .....	36
3.5 Proteomik Analizler ve Gerçekleştirilen Ön Hazırlıklar.....	40
3.5.1 Besin ortamlarının anaerobikleştirilmesi .....	40
3.5.2 Ön denemeler ve büyüme eğrileri.....	41
3.5.3 Proteomik analiz basamakları .....	41
3.6 Ölçüm Yöntemleri.....	44
3.6.1 Mikroorganizma sayımı .....	44
3.6.2 Askıda katı madde (AKM) tayini.....	44
3.6.3 1,3-Propandiol, gliserol ve uçucu yağ asitleri tayini.....	45
3.6.4 H <sub>2</sub> ve CO <sub>2</sub> ve pH tayini .....	45
3.6.5 Taramalı Elektron Mikroskop ('Scanning Electron Microscopy' SEM) Görüntü Analizleri.....	46
4. DENEY BULGULARI.....	47
4.1 Askıda Kùltürler ile Gerçekleştirilen Deneme Sonuçları .....	47



**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
4.1.1 Kesikli üretim denemesi sonuçları.....	47
4.1.2 Sürekli üretim denemeleri sonuçları (değişken HAS koşulları altında sürekli 1,3-PDO üretim deneme sonuçları).....	52
4.1.3 Sürekli üretim denemesi sonuçları (değişken giriş gliserol konsantrasyonları altında sürekli 1,3-PDO üretim deneme sonuçları).....	55
4.2 İmmobilize Kültürler ile Gerçekleştirilen Deneme Sonuçları .....	59
4.2.1 Dolgu malzemesiz kolon biyoreaktör denemesi sonuçları .....	59
4.2.2 Seramik top dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları .....	65
4.2.3 Poliüretan köpük (PUF) dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları.....	72
4.2.4 Cam boncuk dolgulu biyoreaktör denemesi sonuçları .....	78
4.2.5 Pomza taşı dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları .....	84
4.2.6 Vukopor ® (VUK) dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları .....	90
4.2.7 Cam Rashing halkaları dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları .....	95
4.2.8 Çelik tel dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları .....	101
4.2.9 Seramik halka dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları.....	106
4.2.10 Giriş gliserol konsantrasyonu artırılarak gerçekleştirilen cam boncuk dolgulu biyoreaktör denemesi sonuçları .....	111
4.2.11 Lentikat® dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları .....	115
4.3 Proteomik Analizlerin (Proteomiks) ve Gerçekleştirilen Ön Denemelerin Sonuçları .....	118
4.3.1 Gerçekleştirilen ön denemelerin sonuçları ve büyüme eğrileri .....	118
4.3.2 Proteomik analizlerin sonuçları .....	127

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
5. TARTIŞMA .....	134
6. SON DEĞERLENDİRME.....	147
7. ÖNERİLER.....	150
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	151
ÖZGEÇMİŞ .....	165
EKLER.....	

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 1,3-PDO kullanım alanlarının şematik gösterimi.....	9
2.2 Kimyasal yollar ile 1,3-PDO sentezine ait yolların gösterimi.....	10
2.3 <i>Clostridium</i> sp. için gliserolden 1,3-PDO üretim yolağı ve oluşan yan ürünler (Chatzifragkou et al., 2011).....	14
2.4 Enterobacterler için gliserolden 1,3-PDO üretim yolağı ve oluşan yan ürünler (Chen et al., 2011a).....	15
2.5 Hücre immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi. ....	20
2.6 Hücrelerin tutundurulması ile immobilizasyon yönteminin şekil üzerinde gösterilmesi. ....	22
2.7 Hücrelerin hapsedilmesi ile immobilizasyon yönteminin şekil üzerinde gösterilmesi. ....	23
2.8 Bir bariyer arkasına alınarak immobilizasyon yönteminin şekil üzerinde gösterilmesi. ....	24
2.9 Agregasyon ile immobilizasyon yönteminin şekil üzerinde gösterilmesi....	26
3.1 <i>K. pneumoniae</i> ile farklı gliserol konsantrasyonlarında gerçekleştirilen kesikli denemeler için kullanılan kültür ortamı içeren Schott şişeler. ....	32

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.2 <i>K. pneumoniae</i> ile gerçekleştirilen sürekli fermentör denemesinde gliserol ve nutrient beslemesi ile ürün çıkışı gösterimi. ....	33
3.3 Sürekli denemelerde kullanılan peristaltik pompalar ve özellikleri. ....	33
3.4 Soldan sağa sırası ile farklı immobilizasyon malzemeleri ile doldurulmuş cam kolon reaktörler;çelik tel,cam Rashing halkaları, poliüretan köpük (PUF), cam boncuk,pomza taşı,Vukopor® (VUK), seramik halka ve seramik top. Seramik top reaktör üzerinde ısı ceketini gösterilmiştir. ....	35
3.5 a) Hapsetme denemelerinde kullanılan Lentikat® Printer b) içerisinde <i>K. pneumoniae</i> hapsedilmiş Lentikat® boncuklar. ....	39
3.6 Anaerobikleştirme aparatı.....	40
3.7 IMG web sitesinden bir görünüm. ....	43
3.8 Örnek bir gösterim olarak gliserol dehidrataz enziminin genomu ve komşu genomları. ....	43
4.1 Artan atık gliserol konsantrasyonuna karşı 1,3-PDO konsantrasyonları (daire), OD (elmas) ve pH değişimleri (kare), kesikli deneme. ....	47
4.2 Artan atık gliserol konsantrasyonlarındaki OD değişimleri, kesikli deneme.....	48
4.3 Artan saf gliserol konsantrasyonlarındaki OD değişimleri, kesikli deneme.....	48
4.4 <i>K. pneumoniae</i> ile 5 g/L giriş atık gliserol konsantrasyonunda oluşan yan ürünler ve pH değişimleri, kesikli deneme. ....	49

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5 <i>K. pneumoniae</i> ile 15 g/L giriş atık gliserol konsantrasyonunda oluşan yan ürünler ve pH değişimleri, kesikli deneme.....	49
4.6 <i>K. pneumoniae</i> ile 30 g/L giriş atık gliserol konsantrasyonunda oluşan yan ürünler ve pH değişimleri, kesikli deneme.....	50
4.7 <i>K. pneumoniae</i> ile 60 g/L giriş atık gliserol konsantrasyonunda oluşan yan ürünler ve pH değişimleri, kesikli deneme.....	50
4.8 <i>K. pneumoniae</i> ile 90 g/L giriş atık gliserol konsantrasyonunda oluşan yan ürünler ve pH değişimleri, kesikli deneme.....	51
4.9 <i>K. pneumoniae</i> ile 120 g/L giriş atık gliserol konsantrasyonunda oluşan yan ürünler ve pH değişimleri, kesikli deneme. ....	52
4.10 <i>K. pneumoniae</i> ile atık gliserol kullanılarak farklı HAS değerlerinde elde edilmiş 1,3-PDO verimlilikleri (g/L.sa). ....	53
4.11 <i>K. pneumoniae</i> ile atık gliserol kullanılarak farklı HAS değerlerinde elde edilmiş 1,3-PDO konsantrasyonları (g/L). ....	53
4.12 <i>K. pneumoniae</i> ile atık gliserol kullanılarak farklı HAS değerlerinde elde edilmiş ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının karşılaştırılması. ....	54
4.13 <i>K. pneumoniae</i> ile atık gliserol kullanılarak farklı HAS değerlerinde elde edilen AKM (g/L) ve OD sonuçlarının karşılaştırılması. ....	55
4.14 <i>K. pneumoniae</i> ile farklı giriş atık gliserol konsantrasyonlarında elde edilen 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması, HAS=8 sa. ....	56
4.15 <i>K. pneumoniae</i> ile farklı giriş atık gliserol konsantrasyonlarında elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının karşılaştırılması, HAS=8 sa. ....	56

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.16 <i>K. pneumoniae</i> ile farklı giriş atık gliserol konsantrasyonlarında elde edilen ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının karşılaştırılması, HAS=8 sa.....	57
4.17 <i>K. pneumoniae</i> ile farklı giriş atık gliserol konsantrasyonlarında elde edilen AKM (g/L) ve OD değerlerinin karşılaştırılması HAS=8 sa.....	58
4.18 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi. ....	59
4.19 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması. ....	61
4.20 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonlarının karşılaştırılması. ....	61
4.21 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi. ....	62
4.22 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması.....	63
4.23 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ortalama OD ve AKM değerlerinin karşılaştırılması. ....	64
4.24 Dolgu malzemesiz kolonbiyoreaktörde kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı. ....	65
4.25 Sürekli üretim sonunda dolgu malzemesiz biyoreaktörün görünümü. ....	65
4.26 <i>K. pneumoniae</i> ile seramik top dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi, HAS=8 sa, sürekli deneme. ....	66

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.27 <i>K. pneumoniae</i> ile seramik top dolgulu biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması, sürekli deneme. ....	67
4.28 <i>K. pneumoniae</i> ile seramik top dolgulu biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonları, sürekli deneme. ....	68
4.29 <i>K. pneumoniae</i> ile seramik top dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi, sürekli deneme. ....	69
4.30 <i>K. pneumoniae</i> ile seramik top dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması. ....	69
4.31 <i>K. pneumoniae</i> ile seramik top dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması. ....	70
4.32 <i>K. pneumoniae</i> ile seramik top dolgulu biyoreaktördeki malzemelerin SEM görüntüleri; A) boş ve B) mikroorganizma bulunan. ....	71
4.33 <i>K. pneumoniae</i> ile seramik top kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı. ....	71
4.34 <i>K. pneumoniae</i> ile sürekli üretim sonunda seramik top dolgulu biyoreaktörün görünümü; kolon reaktör (A) ve malzeme (B). ....	72
4.35 Poliüretan köpük dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi. ....	72
4.36 Poliüretan köpük dolgulu biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması. ....	74

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.37 Poliüretan köpük dolgulu biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonları. ....	74
4.38 Poliüretan köpük dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi. ....	75
4.39 Poliüretan köpük dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması.....	75
4.40 Poliüretan köpük dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması. ....	76
4.41 Poliüretan köpük dolgulu biyoreaktördeki malzemelerin SEM görüntüleri; boş (A) ve mikroorganizma bulunan (B).....	77
4.42 PUF kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.....	77
4.43 Sürekli üretim sonunda poliüretan köpük dolgulu biyoreaktörün görünümü; kolon reaktör (A) ve malzeme (B). ....	78
4.44 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi. ....	78
4.45 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması. ....	80
4.46 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonları.....	80
4.47 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi. ....	81



**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.48 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması. ....	81
4.49 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması.....	82
4.50 Cam boncuk dolgulu biyoreaktördeki malzemelerin SEM görüntüleri; boş (A) ve mikroorganizma bulunan (B). ....	82
4.51 Cam boncuk kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı. ....	83
4.52 Sürekli üretim sonunda cam boncuk dolgulu biyoreaktörün görünümü; kolon reaktör (A) ve malzeme (B). ....	83
4.53 Pomza taşı dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi. ....	84
4.54 Pomza taşı dolgulu biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması. ....	85
4.55 Pomza taşı dolgulu biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonları. ....	86
4.56 Pomza taşı dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi. ....	86
4.57 Pomza taşı dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması. ....	87
4.58 Pomza taşı dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması.....	88

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.59 Pomza taşı dolgulu biyoreaktördeki malzemelerin SEM görüntüleri; boş (A) ve mikroorganizma bulunan (B).....	88
4.60 Pomza taşı kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.....	89
4.61 Sürekli üretim sonunda pomza taşı dolgulu biyoreaktörün görünümü.....	89
4.62 VUK dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi.....	90
4.63 VUK dolgulu biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması. ....	91
4.64 VUK dolgulu biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonları.....	92
4.65 VUK dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi. ....	93
4.66 VUK dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonları ortalamalarının karşılaştırılması. ....	93
4.67 VUK dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması. ....	94
4.68 VUK kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.....	95
4.69 Sürekli üretim sonunda VUK dolgulu biyoreaktörün görünümü; kolon reaktör (A) ve malzeme (B).....	95
4.70 Cam Rashing halkaları dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi.....	96

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.71 Cam Rashing halkaları dolgulu biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması.....	97
4.72 Cam Rashing halkaları dolgulu biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonlarının karşılaştırılması.....	98
4.73 Cam Rashing halkaları dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi. ....	98
4.74 Cam Rashing halkaları dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması. ....	99
4.75 Cam Rashing halkaları dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması. ....	99
4.76 Cam Rashing halkaları kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı. ....	100
4.77 Sürekli üretim sonunda cam Rashing halkaları dolgulu biyoreaktörün görünümü; kolon reaktör (A) ve malzeme (B).....	100
4.78 Çelik tel dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi. ....	101
4.79 Çelik tel dolgulu biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması. ....	102
4.80 Çelik tel dolgulu biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonlarının karşılaştırılması.....	103
4.81 Çelik tel dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi. ....	103

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.82 Çelik tel dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması.....	104
4.83 Çelik tel dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması. ....	104
4.84 Çelik tel kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı. ....	105
4.85 Sürekli üretim sonunda çelik tel dolgulu biyoreaktörün görünümü; kolon reaktör (A) ve malzeme (B).....	105
4.86 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi. ....	106
4.87 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması. ....	107
4.88 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonlarının karşılaştırılması. ....	108
4.89 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi. ....	108
4.90 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması.....	109
4.91 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması. ....	109
4.92 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde malzemelerin SEM görüntüleri; boş (A) ve mikroorganizma bulunan (B).....	110

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.93 Seramik halka kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.....	110
4.94 Sürekli üretim sonunda seramik halka dolgulu biyoreaktörün görünümü; kolon reaktör (A) ve malzeme (B). ....	111
4.95 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde farklı giriş gliserol konsantrasyonlarında 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması. ....	112
4.96 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde farklı giriş gliserol konsantrasyonlarında 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonlarının karşılaştırılması.....	112
4.97 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde farklı giriş gliserol konsantrasyonlarında pH değişimi.....	113
4.98 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde farklı giriş gliserol konsantrasyonlarında ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması. ....	114
4.99 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde farklı giriş gliserol konsantrasyonlarında OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması.....	114
4.100 Cam boncuk dolgulu kolon kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.....	115
4.101 Sürekli üretim sonunda cam boncuk dolgulu biyoreaktörün görünümü.....	115
4.102 <i>K. pneumoniae</i> 'nin Lentikat® jellere hapsedilerek gerçekleştirilen denemelerde farklı HAS'da gliserol ve 1,3-PDO konsantrasyonlarının karşılaştırılması. ....	116

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.103 <i>K. pneumoniae</i> 'nin Lentikat® jellere hapsedilerek gerçekleştirilen denemelerde farklı HAS'da 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması. ....	116
4.104 <i>K. pneumoniae</i> 'nin Lentikat® jellere hapsedilerek gerçekleştirildiği denemelerde elde edilen yan ürün profilleri.....	117
4.105 Lentikat® kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde boncuklardan alınan kesitlerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri; A) boş ve B) <i>K. pneumoniae</i> tutundurulmuş. ....	117
4.106 <i>C. butyricum</i> ile gerçekleştirilen 170 mM başlangıç atık gliserol konsantrasyonu denemesi için OD ve pH değerlerinin zamana karşı gösterimi.....	118
4.107 <i>C. butyricum</i> ile gerçekleştirilen 170 mM başlangıç atık gliserol konsantrasyonu denemesi için yan ürün profilleri. ....	118
4.108 <i>C. butyricum</i> ile gerçekleştirilen 170 mM başlangıç atık gliserol konsantrasyonu denemesi için CO <sub>2</sub> ve H <sub>2</sub> üretim değerleri. ....	119
4.109 <i>C. butyricum</i> ile farklı aşı yüzdeleri kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde elde edilen büyüme eğrileri.....	119
4.110 <i>C. butyricum</i> ile farklı aşı yüzdeleri kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde elde edilen yan ürün profilleri.....	120
4.111 <i>C. butyricum</i> ile farklı aşı yüzdeleri kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde elde edilen CO <sub>2</sub> ve H <sub>2</sub> üretim değerleri. ....	120
4.112 <i>C. butyricum</i> ile farklı başlangıç gliserol konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde elde edilen büyüme eğrileri. ....	121

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.113 <i>C. butyricum</i> ile farklı başlangıç gliserol konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde elde edilen yan ürün profilleri. ....	121
4.114 <i>C. butyricum</i> ile farklı başlangıç gliserol konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde elde edilen CO <sub>2</sub> ve H <sub>2</sub> üretim değerleri.....	122
4.115 <i>C. butyricum</i> ile 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonlarından elde edilen büyüme eğrileri ve pH profilleri. ....	123
4.116 <i>C. butyricum</i> ile 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonlarından elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonları ve gliserol tüketimleri.....	124
4.117 <i>C. butyricum</i> ile 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonlarından elde edilen yan ürün profilleri.....	124
4.118 <i>C. butyricum</i> ile 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonlarından elde edilen CO <sub>2</sub> ve H <sub>2</sub> üretim değerleri. ....	125
4.119 <i>C. butyricum</i> kullanılarak farklı konsantrasyonlarda eklenen etanol ile elde edilen büyüme eğrileri.....	125
4.120 <i>C. butyricum</i> kullanılarak farklı konsantrasyonlarda eklenen etanol ile elde edilen yan ürün profilleri. ....	126
4.121 <i>C. butyricum</i> kullanılarak farklı konsantrasyonlarda eklenen etanol ile elde edilen CO <sub>2</sub> ve H <sub>2</sub> üretim değerleri.....	126
4.122 Proteomik analizler sonucunda <i>C. butyricum</i> için önerilen gliserol parçalanması ve 1,3-PDO üretimi yol izleri. ....	129

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

- 4.123 Ana proteinler açısından 1D LC/MS proteomik analizlerinde elde edilen Z-değerleri için iç (aynı faz için örneklemeler) tekrarların arasındaki ilişkiler; a) 170 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar (Z0/Z1), b) 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar (Z2/Z3), c) 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için durağan fazlar arasındaki farklar (Z4/Z5), d) 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için log fazları arasındaki farklar (Z6/Z7). .....130
- 4.124 Ana proteinler açısından MRM proteomik analizlerinde elde edilen Z-değerleri için iç (aynı faz için örneklemeler) tekrarların arasındaki ilişkiler; a) 170 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar (W0/W1), b) 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar (W2/W3), c) 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için durağan fazlar arasındaki farklar (W4/W5), d) 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için log fazları arasındaki farklar (W6/W7). .....130
- 4.125 Ana proteinler açısından 1D LC/MS ve MRM proteomik analizlerinde elde edilen Z-değerleri arasındaki ilişkiler; a) 170 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar, b) 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar, c) 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için durağan fazlar arasındaki farklar, d) 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için log fazları arasındaki farklar. ....131
- 5.1 Tutundurularak immobilize edilmiş *K. pneumoniae*'nin farklı dolgu malzemeleri içeren reaktörleri ve dolgu malzemesi içermeyen kolon reaktörün fermentörde askıda kültürlerde gerçekleşen denemelerinin değişen HAS'a karşılık 1,3-PDO verimlilikleri açısından karşılaştırılması. Reaktör numaraları için açıklamalar sırası ile 1;



## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- CSTR, 2; dolgu malzemesiz, 3; seramik top dolgulu;4; PUF dolgulu;5; cam boncuk dolgulu;6; pomza dolgulu;7; VUK dolgulu;8; cam Rashing dolgulu;9; çelik tel dolgulu;10; seramik halka dolgulu. Sürekli gerçekleştirilen denemelerde  $G_0=40$  g/L,  $N=10$ , her HAS için  $n \geq 6$ 'dır..... 136
- 5.2 Tutundurularak immobilize edilmiş *K. pneumoniae*'nin farklı giriş atık gliserol konsantrasyonları ile gerçekleştirilen cam boncuk dolgu malzemesi içeren reaktörün 1,3-PDO üretim verimliliklerinin fermentörde askıda kültür ile gerçekleştirilen deneme sonuçları ile karşılaştırılması. Reaktör numaraları için açıklamalar sırası ile 11; cam boncuk dolgulu immobilize reaktör, 12; CSTR. Sürekli gerçekleştirilen denemelerde  $HAS=8$  sa,  $N=2$ , her değişen gliserol konsantrasyonu için  $n \geq 6$ 'dır. .... 136
- 5.3 Tutundurularak immobilize edilmiş *K. pneumoniae*'nin farklı dolgu malzemeleri içeren reaktörleri ve dolgu malzemesi içermeyen kolon reaktörün fermentörde askıda kültürlerde gerçekleşen denemelerinin değişen HAS'a karşılıklı a) asetik asit, b) 2,3-BD, c) laktik asit, d) etanol konsantrasyonları açısından karşılaştırılması. Reaktör numaraları için açıklamalar sırası ile 1; dolgu malzemesiz, 2; PUF, 3; seramik halka dolgulu;4; cam boncuk dolgulu;5; pomza dolgulu;6; pomza dolgulu;7; VUK dolgulu;8; cam Rashing dolgulu;9; çelik tel dolgulu;10; CSTR. Sürekli gerçekleştirilen denemelerde  $G_0=40$  g/L,  $N=10$ , her HAS için  $n \geq 6$ 'dır..... 139



**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Literatürde raporlanmış 1,3-PDO üreten çeşitli mikroorganizmaların üretim değerleri.....	12
4.1 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi. ....	60
4.2 Seramik top dolgulu biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi. ....	67
4.3 PUF dolgulu biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi. ....	73
4.4 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi. ....	79
4.5 Pomza taşı dolgulu biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi. ....	85
4.6 VUK dolgulu biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi. ....	91
4.7 Cam Rashing halkaları dolgulu biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi. ....	97
4.8 Çelik tel dolgulu biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi. ....	102

**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.9 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi.....	107
4.10 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi. ....	111
4.11 Proteomik analizlerde kullanılan örneklemelerin büyüme ve fermantasyon parametreleri. Değerler fermantasyonun 20.saatinde ölçülmüştür. Ürün verimleri (Y) tüketilen gliserol üzerinden hesaplanmıştır.....	123
4.12 Farklı proteomik analiz yöntemleri ile her deneme için analizlenen protein sayısı. ....	128
4.13 Ana proteinler açısından 1D LC/MS ve MRM proteomik analizlerinde elde edilen ortalama Z-değerleri. 170 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar, 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar, 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için durağan fazlar arasındaki farklar ve 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için log fazları arasındaki farklar. <sup>1</sup> Pirüvat format liyaz olarak yanlış tanımlanmış. <sup>2</sup> 3-dehidrokuinat sintaz olarak yanlış tanımlanmış. <sup>3</sup> 3-dehidrokuinat sintaz olarak yanlış tanımlanmış. TD: Tanımlı Değil. ....	132
5.1 <i>K. pneumoniae</i> ile gerçekleştirilen tüm immobilizasyon çalışmalarında elde edilen maksimum 1,3-PDO Konsantrasyonu (g/L), maksimum gliserol tüketimi (%) ve maksimum verimliliklerin (g /L.sa) karşılaştırılması.....	137

## 1. GİRİŞ

Dünya enerji piyasasının biyoyakıtlara karşı artan ilgisine paralel olarak biyodizel üretimi ve atığı olan gliserolde de patlamalar olmuştur. Önümüzdeki yıllarda bu atığın miktarında çok önemli artışlar beklenmektedir. Üretim fazlalığı nedeni ile piyasa değeri son derece düşen gliserolün katma değeri çok yüksek biyopolimer hammaddesi (1,3-Propandiol (1,3-PDO)) üretiminde kullanılması ile hem ekonomik olarak yeniden değerlendirilebilmekte hem de çevreyle dost bir ürün elde edilebilmektedir. 1,3-PDO hammadde olarak pek çok alanda kullanılan, buna ek olarak diol olarak kullanıldığında geleneksel ya da yeni biyopolimerler oluşturabilen önemli bir monomerdir. Örneğin; 1,2-propandiol, bütandiol ve etilen glikollerden elde edilen polimerlere göre, 1,3-PDO bazlı polimerler daha iyi özellikler ve daha yüksek dayanıklılığı sahiptirler (Kurian, 2005). Gün geçtikçe artan kullanım alanları 1,3-PDO'ya olan ilgiyi arttırmaktadır. 1,3-PDO, Dünya çapında pek çok firma tarafından üretilmektedir. Kimyasal yollarla üretim yapan Shell, ilk önce 3200 ton/yıl kapasiteli bir tesis kurmuş, daha sonra Geismar, Louisiana'da 1999 yılı sonunda açılan 75000 ton/yıl kapasitesi olan tesisi kurmuştur. Bu da yaklaşık 300000 ton PTT üretimi için yeterlidir. Bunlara ek olarak Degussa ve DuPont firmaları biyoteknolojik olarak 1,3-PDO'yu üretmeyi başarmışlar ve 2007 yılında yaklaşık 120000 ton üretim yapmışlardır (Saxena et al., 2009).

Sınırlı kaynakların ulaşılabilirliği ile bağlantılı olarak ortaya çıkan sürdürülebilirlik sorunları ve fosil yakıtların yüksek miktarlarda tüketilmesi ile ortaya çıkan çevre problemleri tüm Dünya'da gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Bu kapsamda, yenilenebilir kaynakların hammadde olarak kullanımı oldukça artmış, ekonomik ve çevresel sürdürülebilirliğin kazanılabilmesi çok daha önem kazanmıştır. Bu durum araştırmacıların biyobozunur ve yenilenebilir alternatiflere yönelmesi ile sonuçlanmıştır. Biyodizel üretimi yan ürünü olan ham gliserol 1,3-PDO üretiminde substrat olarak kullanılabilir. Bu üretim atık gliserol probleminin çözmede özellikle de yenilenebilir bir hammadde kullandığından çevre dostu bir yaklaşım oluşturmaktadır. Tereftalik asit (TPA) 1,3-PDO ile birlikte politrimetilen tereftalat (PTT) üretiminde kullanılmaktadır. PTT, üstün esneklik özelliği ile yüksek performanslı bir polimerdir ve tekstil, döşeme, halı, özel reçine yapımı gibi alanlarda yumuşaklık, esnekliğini geri kazanabilme, boyanabilme, kolay bakım gibi özelliklerinden dolayı çok tercih edilmektedir.

Hücre immobilizasyonu endüstriyel ürünlerin eldesinde sıkça kullanılan biyoteknolojik bir tekniktir. Son yıllarda bu teknik 1,3-Propaniol (1,3-PDO) gibi katma değeri yüksek ürünlerin eldesinde de kullanılmaya başlanmıştır. 1,3-PDO üretiminde mikroorganizmaların gliserolden anaerobik fermantasyonunun kullanılması, şu an mevcut olan ısıl kimyasal 1,3-PDO üretim tekniklerine çok iyi bir alternatiftir. Bunun sebepleri; yüksek hacimsel verimlere ulaşılabilmesi, daha az enerji kullanılması ve düşük miktarda çevreye zararlı atıklar açığa çıkmasıdır.

Biyoteknolojik üretimler sırasında mikroorganizmaların belirli substratlardan üretebilecekleri yan ürünler sahip oldukları enzimleri kullandıkları metabolik yollar ile anlaşılabilir. Bu yolların anlaşılabilmesi için de gen veya protein düzeyine inilerek çeşitli araştırmalar yapılabilmektedir. Özellikle değişen çevresel koşullara mikroorganizmaların nasıl cevap verdiklerinin anlaşılabilmesi maksimum üretim verimliliklerinin elde edilebilmesinde çok önemlidir. Bu metabolik düzenlemeler ile ilgili bilgi sahibi olunması için kullanılan önemli moleküler yöntemlerden biri proteomiktir. Proteomiks bellşartlar altında belli bir mikroorganizmada genom tarafından sentezlenen tüm proteinlerin analiz edilmesi, yani proteomun tanımlanması işlemidir (Kurban ve Mehmetoğlu, 2010). Bu analizler, mikroorganizmaların belirli ürünleri ürettikleri metabolik yollarındaki enzim sistemlerini ve bununla ilgili olarak üretimi artırıcı ya da kısıtlayıcı muhtemel faktörleri belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında *K. pneumoniae* kullanılarak immobilizasyon denemeleri gerçekleştirilmiş ve bu prosesin etkinliği kanıtlanmıştır. Literatür incelendiğinde 1,3-PDO üretiminin sıklıkla askıda kültürler ile gerçekleştirildiği görülmektedir. Bu tez çalışmasında tercih edilen immobilize kültür sistemleri bu üretime özgün bir alternatiftir. Buna ek olarak *K. pneumoniae* ile daha önce denenmemiş immobilizasyon yöntemleri ve materyallerinin de denenmiş olması tez çalışmasına ayrı bir nitelik katmaktadır. İmmobilize sistemlerin avantajlarından faydalanılarak literatürdeki en yüksek verimlilik değerlerine yakın değerler elde edilerek bu sistemin uygulanabilirliği kanıtlanmıştır. Ayrıca çeşitli tutundurma malzemelerinin denenmesi de ileri çalışmalar için değerli veriler ortaya koymuştur. Çalışmanın ikinci aşamasında yine aynı mikroorganizma kullanılarak Manitoba Üniversitesi'nde proteomik analizler gerçekleştirilmek istenmiştir, ancak mikroorganizmanın fırsatçı patojen özelliği sebebi ile gümrükte takılmış olması çalışmaların gerçekleştirilememesine sebep olmuştur. Bunun üzerine literatürde 1,3-PDO üretiminde sıklıkla kullanılan ve yüksek verimlere

sahip diğer bir mikroorganizma *Clostridium butyricum* model mikroorganizma olarak seşilmiş ve analizler geręekleřtirilmiřtir. Proteomiks ęalıřmaları başlı başına bir doktora tez konusu oluşturabilecek kadar kapsamlı ęalıřmalardır. Bu model mikroorganizma ile geręekleřtirilen denemeler yöntemlerin anlaşılabilmesi ve 1,3-PDO üretimine uygulanabilmesi açısından bir n ęalıřma niteliğindedir. *C. butyricum*'dan 1,3-PDO retimi sırasında proteomiks düzeyinde ęalıřmalar literatürde çok az sayıda bulunmaktadır. Bu tez ęalıřmasında kullanılan proteomik analiz yöntemleri ile ise hiç bir ęalıřma bulunmamaktadır. Yüksek substrat konsantrasyonlarındaki inhibisyonun engelenerek üretim verimlerini arttırabilmesi için protein düzeyinde araştırmaları kapsayan bu veriler literatüre değerli sonuçlar aktarmaktadır. Bu tez ęalıřması *K. pneumoniae*'yi de içeren gliserolden 1,3-PDO üretebilen mikroorganizmalar ile gelecekte geręekleřtirilebilecek olası proteomik ęalıřmalar için bir kaynak/giriş niteliğindedir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Biyoekonomi ve Biyomalzeme Sektörü

Üretim aşamalarında çevresel yenilenebilirlik kavramını ilke edinmiş yeşil kimya prosesleri, Dünya çapında geleneksel yöntemlerin yerini alabilmesi için kullanılmaya çalışılmaktadır. 2012 yılında yapılan bir araştırmaya göre Dünya çapındaki polimer tüketimi 259 milyon ton olarak öngörülmüştür. Gernegross ve Slater (2000) bu miktarda plastiğin tüketiminin her yıl 270 milyon ton fosil yakıt kullanılarak üretilebildiğini raporlamıştır, bunun 120 milyon tonu da hammadde olarak, 150 milyon tonu ise enerji üretimi için kullanılmıştır. Polistiren ve polietilen gibi iki geleneksel plastiğin biyobozunur olmamaları, bu plastiklerin artan atık miktarlarının çevreye ciddi problem yarattığını ve tehlikeli boyuta geldiği sinyallerini vermiştir. Bu sebeple, biyolojik olarak üretilebilen ya da biyolojik hammadde ile üretilebilen biyoplastikler oldukça önem kazanmaya başlamışlardır. Plastiklerin doğada çok uzun yıllarda bozunuyor olması uzun süredir var olan bir problemdir. Örneğin; lateks ve selüloz 1800'lü yıllardan beri lastik ve plastik yapımında kullanılmaktadır. Polilaktik asit (PLA) ve polihidroksialkanoat (PHA) gibi biyolojik kökenli polimerler ve biyomonomer olarak 1,3-propandiol (1,3-PDO) üretileli ise kısa bir süre olmuştur. Biyolojik kökenli polimerler olan biyopolimerler, farklı tipteki biyoplastiklerin de yapıtaşlarıdır. Paketleme, tarım, elektronik ve otomotiv gibi pek çok konuda biyopolimerler kullanım alanı bulabilmektedirler. Aynı zamanda biyopolimerler, kısa kullanım süreleri olan kaplama, gıda maddeleri, paketleme ve çöp poşetleri gibi materyallerin yapımında da oldukça kullanılmaktadırlar. Yine de, teknolojinin gelişimi ile klavye ya da bilgisayar parçaları gibi uzun süreleri kullanım hedeflenen materyaller daha dayanıklı plastiklerden yapılmaya devam etmektedir (FNR, 2006; Demirbaş, 2007).

Biyopolimer olarak nitelendirilen materyaller biyolojik kökenli ya da biyobozunur olabilirken her iki özelliği de üzerlerinde taşıyabilmektedirler. Biyolojik kökenli materyaller doğrudan ya da dolaylı olarak biyokütle üzerinden üretilebilmektedirler. Doğrudan üretimlere bitkinin büyürken depoladığı nişasta ve selüloz gibi maddeler girerken, dolaylı yoldan üretilenleremısır şurubu fermantasyonu ile laktik asit (PLA) üretimi örnek verilebilir. Geleneksel polimerler ile karşılaştırıldığında biyopolimerlerin en önemli iki avantajı biyobozunur olmaları ve fosil yakıtları kullanmayarak sera gazlarının üretimlerini



azaltmalarınıdır. Bir maddenin biyobozunur olması doğada mevcut mikroorganizmalar ile bu maddelerin su, CO<sub>2</sub> ve kompost (yapay eklentilere ihtiyaç olmadan) gibi doğal kaynaklara bozunmaları anlamına gelmektedir. Bunlar göz önünde bulundurularak, biyopolimerlerin plastiklerin evrimleşmesini sağladığı da söylenebilir. Biyoplastiklerin büyük bir avantajı da biyobozunur olan doğal yapılarıdır. Bu özellik fosil yakıtlara sürdürülebilir bir alternatif yaratabilmektedir. Ancak, bir biyopolimer kimyasal yapısı nedeniyle biyolojik içeriklidir ve biyobozunur olabilir ya da olmayabilir, biyobozunur bir polimerin ise hammaddesi fosil yakıtlar olabilir ve biyobozunurdur. Bu sebeple, bir biyopolimer kimyasal yapısı ya da üretim yolu ile sınıflandırılır ve biyobozunur olması olumlu bir etmendir, buna karşın biyobozunur bir polimer sadece biyobozunurluğu ile sınıflandırılır. PLA, poliamit (naylon) ve polikaprolakton (PCL) büyük ölçek üretimleri yapılan önemli biyoplastikler arasında yer almaktadırlar. PLA, en yaygın üretilen biyoplastiklerden biridir. DuPont, Caruthers'un 1930'lı yıllardaki ilk denemelerinden pek çok araştırmacı özellikle tıp alanında kullanılmak üzere PLA ve türevlerinin üretimini keşfetmişlerdir. 1980'lerin sonunda ise biyobozunur bir polimer olarak PLA'nın piyasaya sürülüşü gerçekleştirilmiştir. DuPont'ta gerçekleştirilen denemeler ardından 1990 yılında Adell, Wisconsin'da bir laktik asit fabrikası kurulmuştur (DuPont™, 2013). Buna ek olarak da aynı dönemlerde Cargill, Nestle ve Mitsui Chemicals gibi firmalar PLA konusunda üretimler yapmaya başlamışlardır. Daha verimli üretim ve saflaştırma işlemlerinin geliştirilmesi ile 1997 yılında Cargill Dow Polymers kurulmuş ve PLA ticarileştirilmiştir. PLA üretimi bakterilerin fermantasyon sonucu laktik asit üretimi ile gerçekleşirken, PHA üretimi bazı bakterilerin büyümeleri sırasında depo maddesi olarak oluşmaktadır. PHA'nın biyoplastik üretiminde kullanımı ilk olarak W.R. Grace Company tarafından 1950 yıllarında gerçekleştirilmiştir (Asrar and Gruys, 2002). PHA'nın kopolimeri olan 3hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat (PHBV, ticari ismi 'Biopol'), British Imperial Chemical Industry (ICI) ve Zeneca firmaları tarafından fermantasyon yöntemi ile üretilmiştir. 1980'li yıllarda PHA üretimi için bakteriye özgü genlerin klonlanması ardından model bir bitki olan *Arabidopsis thaliana* metabolizma mühendisliği kullanılarak bitkinin PHB üretmesi sağlanmıştır (Poirier, et al., 1995; Slater, et al., 1998). İleri çalışmalar kopolimer PHBV'nin hem *Arabidopsis thaliana* da hem de *Brassica napus* bitkilerinde üretimini gerçekleştirmiştir (Slater et al., 1999).

Biyopolimerler uzun süredir bilinen bir kavramdır. Nitekim, insan üretimi polimerler yenilenebilir hammadde kullanılarak üretilmişlerdir. Ancak, fosil

yakıtlar kullanılarak gerçekleştirilen proseslerin teknoloji geliştikçe ucuzlaması ile bunların önemi gittikçe azalmıştır. 1970'lerde, fosil yakıtların kullanımını azaltarak hava kirliliğini önlemeye yönelik olarak bir AR-GE çalışması başlatılmış ve paketlemede kullanılmak üzere biyopolimer sınıfları araştırılmıştır. Pek çok Dünya'ca ünlü kimyasal firması (ICI, P&G, Dow, Bayer, BASF vb.) yatırımlarını biyopolimerler üzerine yapmaya başlamışlardır. Sonrasında, pek çoğu bu yatırımları durdurmuş ya da biyokimya alanında uzmanlaşmış firmalara satmışlardır. Son yıllarda ise, bu firmaların çoğu sektöre tekrar giriş yapmaya çalışmaktadırlar. Özellikle de kimyasal polimerlerin sentezinde kullanılacak etilen, akrilik ve poliyollar gibi biyomonomerlerin üretilmesi konularına yönelmektedirler. Bütün bu gelişmelere rağmen, günümüzde, biyopolimer sektörü, sadece paketleme ve tarım sektörleri ile sınırlandırılmış dar bir piyasayı oluşturmaktadır. Oysaki plastik piyasasının %0.3-%0.4'ü (yaklaşık 350 000 ton) olacak şekilde gelişmesi sağlanabilirdi.

Geçtiğimiz yılda, biyopolimer üretim hatlarında önemli gelişmeler gerçekleşmiştir. Eskiden AR-GE araştırmalarının kökenini oluşturan geleneksel faktörlerin artık yeterli olmadıkları fark edilmiştir. Endüstriyel açıdan bakıldığında biyopolimerlerin sektörde iyi bir geleceğe sahip olabilmelerini sağlayabilmek için kullanım alanlarını dayanıklı maddelere ya da yapı uygulamalarına (ulaşım, elektronik vb.) genişletmek gerekmektedir. Başlıca Japon firmaları olmak üzere pek çok firma endüstriyel ve yapısal uygulamaları göz önünde bulundurarak yatırımlarını gerçekleştirmektedirler. Örneğin; Toyota 2020 yılına kadar fosil yakıtlardan elde edilen polimer içerikli ürünlerinin %20'sini biyopolimerlerden karşılamayı hedeflemiştir. Mazda ise yüksek ısıya dayanıklı, PLA içerikli bir araba çamurluğu prototipi geliştirmiştir. Bu gelişmeleri göz önüne alarak çok önemli bazı araştırma alanları geliştirilmiştir. Bunlar, belirli uygulamalar için kullanılacak biyopolimerlerin yapılandırılabilmesi için formulasyon geliştirilmesi, petrokimyasal polimerlerin sektör eğilimleri de göz önünde bulundurularak polimer içeriklerinin araştırılması ve biyobozunur ya da doğal maddelere öncelik verilmesi olarak sıralandırılabilir. Geleneksel polimerlerin üretiminde biyomonomerler kullanılırken ise uzun süreli kullanılabilir olabilmeleri için biyobozunur olmamalarına dikkat edilmektedir. Bunlar oldukça zor gerçekleştirilecek hedefler gibi görülse de Utrecht Üniversitesi ve Fraunhofer Institute for the European Commission'ın hazırladığı rapora göre gerçekleştirmeleri oldukça muhtemel. Toplam polimer üretiminin (AB'de yaklaşık 13.4 milyon ton) %33'ünün biyopolimerlerden oluşması öngörülmektedir. Avrupa Biyoplastik Topluluğu'na göre günümüzde bu yüzdenin biyoplastikler için %5-

10'larda olduğu ve gelecekte çok daha fazlasına ulaşabilme potansiyeli olduğu raporlanmıştır.

Fiyatların düşüşüne ve müşteri talebinin artışına bağılı olarak, biyopolimer piyasası pek çok işletmecinin ilgisini çekmeye başlamıştır. Bu artış özellikle çevresel problemlere karşı duyarlılığın artması ile gerçekleşmiştir. Bu durum PHA ve soya bazlı polimerler gibi piyasası az gelişmiş olan polimerlerin üretiminde artışa yol açmıştır. Piyasası oldukça gelişmiş olan nişasta bazlı polimerler ve PLA'da bile talepten dolayı üretimlerde artış yaşanmış ve üretim teknolojilerine yenilikler getirilmiştir. Global biyopolimer endüstrisinin 2008'den 2015 yılına kadar %27.18'lik yıllık bileşik büyüme oranı göstermesi bekleniyor. Biyopolimerlerin en çok kullanım alanı bulduğu paketleme endüstrisi 2008 yılında en yüksek payı sağlamıştır ve %53'lük bir kar oranı elde etmiştir. Ancak, otomotiv, tıp ve elektronik uygulamaları gibi diğere endüstrilerin daha yüksek hızla büyümeleri yüzünden biyopolimerlerin paketleme endüstrisindeki oranının 2015 yılına kadar düşüşe geçmesi beklenmektedir.

En yüksek ticari üretimin yapıldığı Kuzey Amerika bölgesi biyopolimer sektörünün en gelişmiş olduğu yerdir. Oldukça yeni sayılan soya bazlı polimerler bile bu bölgede oldukça gelişmiştir ve sektörde yerini almıştır. Ancak, öngörüler bu bölgenin diğere bölgeler ile karşılaştırıldığında büyüme açısından bir duraklama dönemine gireceği Global Markets Direct'in '*Global Biopolymers Market Analysis Forecasts to 2015*' isimli raporunda yayınlamıştır.

Yukarıda bahsedilen biyopolimerlerin yapımında kullanılan değerli bir biyomonomer olan 1,3-Propanediol (1,3-PDO)'ün endüstrisi şu an için yalnızca bir büyük firma tarafından ele geçirilmiş gibi görünse de yeni büyük ve küçük boyutlu firmalar her geçen gün kurulmaya devam etmektedir. Günümüzde DuPont bu ürünü büyük ölçekte üreten tek firmadır. Çin menşeli 2012 yılında açılan Huamei Biomaterial ise bu üretimi doğal suşlarla gerçekleştiren ilk firmadır. Bunlara ek olarak küçük çapta üretim yapan pek çok firma vardır ve bu firmalar üretim kapasitelerini 2019 yılına kadar arttırmayı planlamaktadırlar. Endüstri eğilimlerine bakıldığında biyobazlı ürünlere talebin arttığı görülmektedir. Biyobazlı hammadde ile üretilebilen 1,3-PDO bu kapsamda piyasada oldukça ümit vaat eden fırsatlar sunmaktadır. 1,3-PDO ilk önce petrokimyasal hammadde ile üretilmeye başlanmış olsa da günümüzde biyoteknolojik yöntemler ile mısır nişastası ya da biyodizel atığı gliserol gibi yenilenebilir hammaddeler kullanılarak üretilebilmektedir. Biyobazlı 1,3-PDO hem iyi sektör fırsatları

sağlamakta hem de düşük maliyetli bir üretim metodu sunmaktadır. Yeni yayınlanan bir piyasa araştırma raporuna göre (*'1,3-PDO Market By Applications'*), 1,3-PDO piyasasının 2012'den 2019'a kadar yıllık %19.9'luk artış ile 157 milyon dolardan 560 milyon dolara ulaşması öngörülmektedir.

1,3-PDO'nun tekstil, halı üretimi, kozmetik, buz çözücü kimyasal ve kişisel bakım ürünleri endüstrilerini içeren pek çok kullanım alanı bulunmaktadır (Şekil 2.1). Glikol, 1,4-butanediol (BDO), bütülen glikol ve naylonun yerini alabilecek özelliklere sahiptir. 1,3-PDO kullanım alanlarında en yüksek yüzdeye sahip üretim PTT'dir. DuPont tarafından gerçekleştirilen 1,3-PDO üretiminin asıl kullanım amacı PTT üretimidir. PTT polyesterinin üretimi ve kullanım avantajları 70 yılı aşkın süredir biliniyor olmasına rağmen, geçtiğimiz yıllarda 1,3-PDO'nun biyoteknolojik yollar ile üretilmeye başlaması ile ticarileştirilmesi hızlanmıştır. 1,3-PDO AR-GE araştırmaları sırasında Genencor ve DuPont'taki girişimler ardından üç farklı mikroorganizmadan alınan belirli genleri içeren DNA bir mikroorganizmada birleştirilerek üretim verimlerinde yaklaşık 500 kat artış sağlanabilmiştir. DuPont'un ürettiği PTT öncelikli olarak ABD'deki halı endüstrisini hedeflemektedir. 1,3-PDO piyasasına yeni giren firmalarda üretimlerini PTT üretimleri ile entegre edebilmeyi hedeflemektedirler. PTT, 1941 yılında Shell Chemicals tarafından keşfedilmiş ve o tarihten itibaren TPA ve 1,3-PDO'nun kondensasyonu ile üretilmeye başlanmıştır. Bu polimer ekstrüzyon ve enjeksiyonda kullanılmak üzere PET (TPA+etilen glikol) ve PBT (TPA+BDO)'ye ucuz bir alternatif olarak piyasaya sürülmüştür. Şu an bu polimerin üretimini yapan firmalar Shell Chemical (CORTERRA® Polymers) ve DuPont (Sorona® 3GT)'tur. PTT çoğunlukla tekstil endüstrisinde kullanıyor olsa da, bu endüstri dışında da pek çok kullanım alanı bulabilmektedir. PTT'nin mekanik özellikleri PET ve PBT arasında kalırken, işleme kolaylığı PET'ten daha fazladır. PTT'ye %30 oranında cam eklenmesi ile ise PBT'ye eşit ya da daha üstün özelliklere sahip olunabilmektedir. Buna ek olarak hali hazırda PBT'den %50 fazla oranda pigment tutma özelliğine sahiptir. Genel olarak PTT'nin tüm kullanım alanlarına bakıldığında PBT ve naylon gibi geleneksel polimerlerin yerine geçebilecek uygulamalarda başarılı olduğu görülmüştür.



Şekil 2.1 1,3-PDO kullanım alanlarının şematik gösterimi.

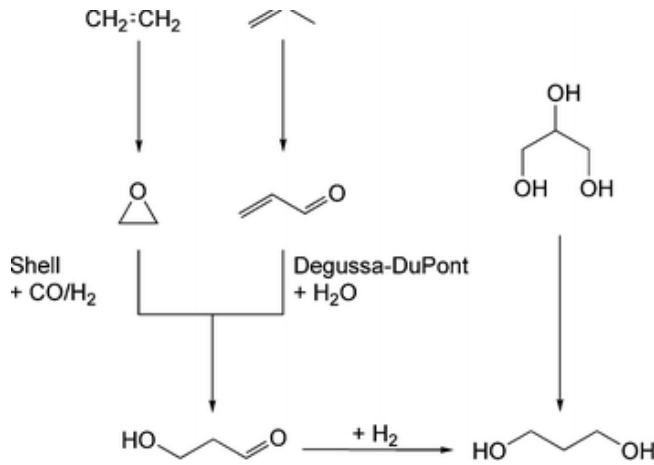
Biyobazlı kimyasallara talebin artması ile büyüyen uygulama alanları ve artan nüfus oranları global 1,3-PDO üretimlerinin artışını sağlayan en önemli etkenlerden bazılarıdır. Buna ek olarak, bu üretimin çevre dostu olması da 1,3-PDO piyasasının genişlemesine yardımcı olmaktadır. En büyük kozmetik ve kişisel/ev bakım piyasalarına sahip Avrupa bu büyümenin en iyi görülebildiği yerlerden biridir. 1,3-PDO’da bu büyümeden payını almaktadır ve biyobazlı ürünlere talep arttıkça bunun artarak büyüyeceği düşünülmektedir.

## 2.2 1,3-Propandiol Üretimi

1,3-PDO toksik olmayan polihidrik 3 karbon, 2 oksijen ve 1 hidrojen atomu içeren 214°C kaynama noktasına sahip bir moleküldür. 1,3-PDO polikondensasyon reaksiyonlarında kullanılabilecek pek çok istenen özelliğe sahiptir. Bu reaksiyonlar ardından en çok PTT üretiminde kullanılmaktadır (DuPont™(SORONA®) ve Shell (CORTERRA®) tarafından). PTT’nin tekstil endüstrisindeki yeri ve önemi ile 1,3-PDO’nun hammadde olarak kullanım alanları yukarıda anlatılmıştır (Bkz. Bölüm 2.1) 1,3-PDO üretimi hem kimyasal yollar ile hem de biyoteknolojik yollar ile gerçekleştirilebilmektedir.

## 2.2.1 Kimyasal yollar ile 1,3-PDO üretimi

1,3-PDO'nun kimyasal yollar ile üretimi için Degussa (DuPont) ve Shell prosesleri kullanılmaktadır (Şekil 2.2). Ancak bunlar pahalı yöntemlerdir. Degussa prosesi iki aşama içerir; öncelikle akrolein 3-hidroksipropionaldehit (3-HPA)'i oluşturmak üzere hidratlandırılır, ardından 3-HPA 1,3-PDO'ya hidrojenlenir. Shell prosesinde ise 3-hidroksiproponal-ethileneoksit ekstraksiyon ile 3-HPA'yı oluşturur o da sonrasında 1,3-PDO'ya dönüştürülür. Bu prosesler başlangıcında akrolein ( $C_3H_4O$ ) elde edilebilmesi için  $O_2$  katalizörlüğünde ve  $300-400^\circ C$  sıcaklıkta propen ( $C_3H_6$ ) ile muamele gerçekleşir. Elde edilen ve kimyasal yollar ile 1,3-PDO üretiminin en önemli kimyasallarından biri olan akrolein oldukça yüksek derecede patlayıcı ve toksiktir. 3-HPA oluşumu gerçekleştikten sonra ise yine yüksek sıcaklıkta ( $110-150^\circ C$ )  $H_2$  katalizörlüğünde 1,3-PDO sentezi gerçekleştirilmiş olur. Bu proseslerin aksine biyoteknolojik yollar ile 1,3-PDO üretimi hem daha kolay hem de daha ucuz proseslerdir.



Şekil 2.2 Kimyasal yollar ile 1,3-PDO sentezine ait yolların gösterimi.

## 2.2.2 Biyoteknolojik yollar ile 1,3-PDO üretimi

1930'lu yılların başlarından beri (Mickelson and Werkman, 1940; Werkman and Gillen, 1932) gliserolün mikroorganizmalar ile parçalanarak 1,3-PDO, asetat, etanol, bütirat gibi yan ürünler ürettiği bilinmektedir. Hem teknik hem de biyodizel atığı gliserolün 1,3-PDO'nun mikrobiyal üretimi için kullanılabilir (Almeida et al., 2012; Dobson et al., 2012; Jensen et al., 2012; Metsoviti et al., 2013; Ringel et al., 2012; Venkataramanan et al., 2012; Wilkens et al., 2012; Wong et al., 2011). Biyodizel üretim metoduna bağlı olarak atık gliserol belli miktarlarda metanol, sabun, NaOH/KOH ve NaCl içerebilmektedir. Yapılan pek

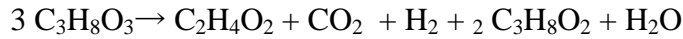
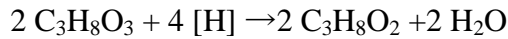
çok çalışma biyodizel atığı gliseroldeki bu safsızlıkların bakteriler üzerindeki inhibe edici özellikleri üzerine yapılmıştır. Bu safsızlıkların büyüme üzerine olumsuz etkileri literatürde raporlanmış olsa da ürün verim ve verimlilikleri arasında çok az bir fark olduğu gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, atık gliserol ile elde edilen değerlerin bir miktar daha iyi olduğu raporlanmıştır. Bu veriler atık gliserolden mikrobiyal 1,3-PDO üretiminin etkili bir biçimde gerçekleştirilebileceğini kanıtlamıştır (Moon et al.,2010).

Gliserol mikroaerobik veya zorunlu anaerobik koşullar altında, doğada varolan pek çok suş kullanılarak 1,3-PDO'ya dönüştürülebilir (Çizelge 2.1). Bunlar şu şekilde sıralandırılabilirler; Enterobacteriaceae'dan; *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* (Homann et al., 1990; Pflugmacher ve Gottschalk, 1994), *Citrobacter werkmanii* (Maervoet et al., 2012), *Escherichia blattae* (Ripoll et al., 2012), *Enterobacter aerogenes* ve *Enterobacter (Pantoea) agglomerans* (Barbirato et al., 1995; Ito et al.,2005) Clostridium'dan; *Clostridium beijerinckii* (Güngörmüşler et al., 2011a), *Clostridium butyricum*, *Clostridium diolis* (Kaur et al., 2012b) ve *Clostridium pasteurianum* (Biebl, 1991; Biebl et al., 1992; Gonzalez-Pajuelo et al., 2005) ve Lactobacillus'tan; *Lactobacillus diolivorans* (Pflugl et al., 2012). Bu türler ya zorunlu ya da fakültatif anaeroblar içerisinde sınıflandırılmaktadırlar. Bu türlere ek olarak, henüz karakterize edilmemiş bir su bakterisinin de atık gliserolden oldukça yüksek miktarlarda 1,3-PDO üretebildiği raporlanmıştır (Abad and Turon, 2012). Bahsedilen bütün türler arasında, Lactobacilli'ye ait bakteriler en az miktarda 1,3-PDO üretirken, en yüksek miktarda 1,3-PDO üretimi gerçekleştiren türler *K. pneumoniae* ve *C. butyricum*'dur. Bu sebeple de, hem en çok çalışılan bakterilerdir hem de en yüksek verimlilikler ve substrat toleransları bu bakteriler ile raporlanmıştır (Kaur et al.,2012a; Wilkens et al., 2012).

Gliserol, yapısındaki karbon atomlarının yüksek indirgenmiş özellikleri sayesinde substrat olarak 1,3-PDO üretiminde oldukça büyük avantajlar sağlamaktadır. Bu fermantasyon, harici elektron alıcıları olmadan indirgenmiş bir substratı metabolize edebilecek mikroorganizmaları gerektirmektedir. Her karbon başına düşen kullanıma açık elektron sayısının sonucu olarak gliserolden biyokütle üretimi sırasında açığa indirgeyici eşdeğerlikler çıkmaktadır. Redoks potansiyelinin korunabilmesi için gliserol kendisinden daha indirgen bir ürüne (1,3-PDO) çevrilmektedir ve bu esnada da biyokütle oluşumu sırasında açığa çıkmış olan fazla indirgeyici eşdeğerlikler kullanılmaktadır (Clomburg and Gonzalez, 2013).

Çizelge 2.1 Literatürde raporlanmış 1,3-PDO üreten çeşitli mikroorganizmaların üretim değerleri.

Mikroorganizma	1,3-PDO (g/L)	Verim (mol/mol)	Proses	Kaynak
<i>K. pneumoniae</i>	9.4	0.41	Kesikli	(Rossiet al., 2012)
<i>C. butyricum</i>	11.5	0.68	Kesikli	(Chatzifragkou et al., 2011a)
<i>C. beijerinckii</i>	8.9	0.54	Kesikli	(Güngörmüşler et al., 2010)
<i>K. pneumoniae</i> ME-308	70	0.70	Kesikli-beslemeli	(Ji et al., 2009)
<i>C. butyricum</i> AKR102a	93.7	0.63	Kesikli-beslemeli	(Wilkins et al., 2012)
<i>K. pneumoniae</i> (immobilize)	71	0.67	Kesikli-beslemeli	(Jun et al., 2010).
<i>K. pneumoniae</i>	48.5	0.61	Sürekli	(Menzel et al., 1997)
<i>C. butyricum</i>	34.6	0.69	Sürekli	(Papanikolaou et al., 2000)
<i>C. butyricum</i> (immobilize)	22	0.60	Sürekli	(Schlieker and Vorlop, 2006)
<i>K. pneumoniae</i> (immobilize)	13.7	0.42	Sürekli	(Güngörmüşler, et al. 2011b)
<i>C. freundii</i> (immobilize)	16	0.57	Sürekli	(Pflugmacher and Gottschalk, 1994)

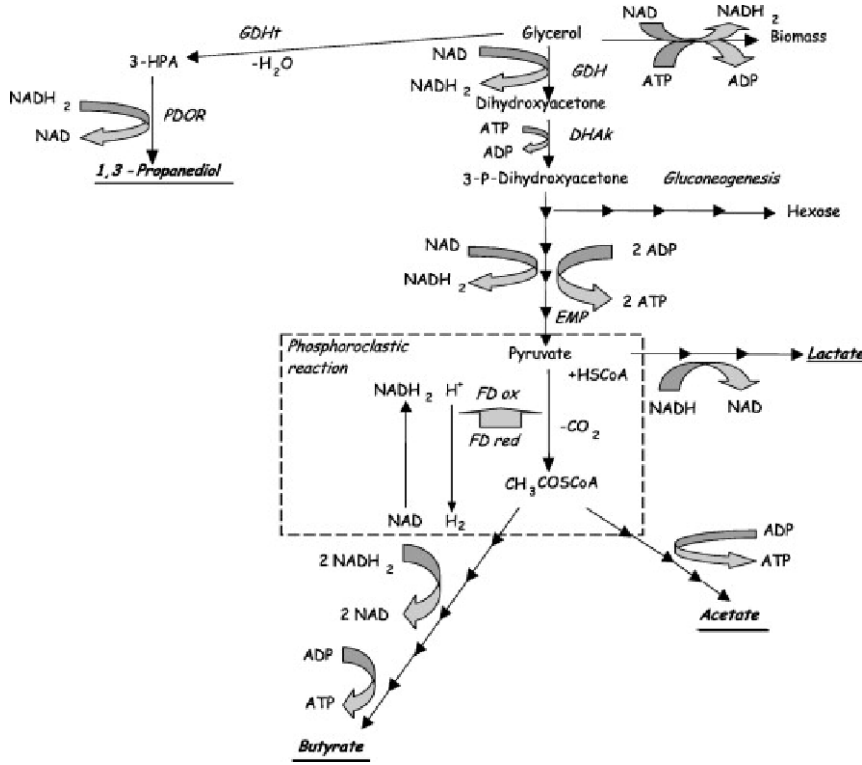


Yukarıdaki denklemde sırasıyla  $C_3H_8O_3$ ,  $C_2H_4O_2$ ,  $C_2H_4O_2$ ; gliserol, asetik asit ve 1,3-PDO'nun molekül formüllerini göstermektedir. Bu moleküler arası gerçekleşen reaksiyonlar sonucu 0.72 mol/mol verim elde edilebilmektedir. Biyokütle oluşumu da düşünülüp formüle eklenirse bu oran 0.64'e düşmektedir. (Zeng and Biebl, 2002). Bu denklemde oluşan asetik asit hücrenin devamlılığını sağlayabilmesi için gerekli ATP üretimini de sağladığından gliserolden 1,3-PDO'ya parçalanma sırasında en az yan ürünle oluşabilecek tek denklem bu şekilde oluşmaktadır. Yani maksimum teorik verim 0.67 mol 1,3-PDO/mol gliserol'dür. Farklı yan ürünler oluştuğunda bu verimler daha da düşmektedir.

Gliserolün 1,3-PDO'ya mikrobiyal dönüşümü iki ana metabolik yol içermektedir. Bunlar yükseltgen ve indirgen basamaklardır. Yükseltgen basamakta ATP formunda enerji ve nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) formunda indirgeyici eşdeğerlikler üretilmektedir. İndirgen basamakta ise, 1,3-PDO NADH'ın  $NAD^+$ 'ya rejenerasyonu ile oluşturulmaktadır (Kaur et al., 2012a). Şekil 2.3 ve 2.4'te de görüldüğü gibi farklı mikroorganizmaların gliserol

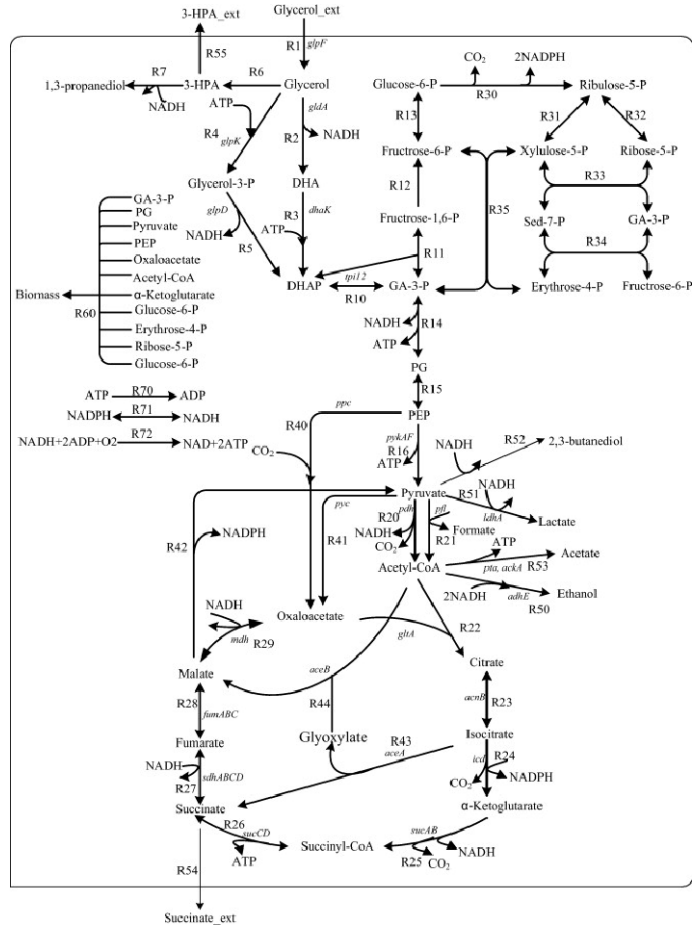


metabolizması sonucunda farklı yan ürünler elde edilmektedir. Mikroorganizmalar arasındaki diğer farklılık da aynı yan ürün oluşumuna sebep olsa da yollarda kullanılan enzimler ya da koenzimlerdir. Burada değişik yan ürün üretimlerine örnek verilecek olursa; *Clostridium* türleri bütirat ve bütanolü üretebilirken *K. pneumoniae* gibi Enterobacterler bu yan ürünleri üretememektedir. Bununla birlikte *Clostridium* türleri *K. pneumoniae*'nin üretebildiği 2,3-BD'yi üretebilecek enzim sistemine sahip değildirler. Metabolik yollar ya gliserolün 3-HPA'ya vitamin B12-bağımlı gliserol dehidrataz (GDHt) kullanılarak dehidrate olması ile gerçekleşir ya da dihidroksiasetonun (DHA) dehidrojenasyonu ile gerçekleşir. Vitamin B12-bağımlı olmayan bir GDHt *C. butyricum*'da tanımlanmıştır ve 1,3-PDO üretimi için vitamin B12'siz daha ekonomik bir çözüm önerilmiştir (Raynaud et al., 2003). Ardından, indirgen basamakta 3-HPA, 1,3-PDO oksidoredüktaz (PDOR) ve NADH kullanılarak 1,3-PDO'ya indirgenmektedir. Yukarıda da bahsedildiği gibi, NADH, yükseltgen basamakta DHAP'nin ve asetil KoA'nın yükseltgenmesi ile oluşan bir indirgeyici eşdeğerliktir. NADH'in ortamda ulaşılabilirliği 1,3-PDO üretimini doğrudan etkilemektedir. Metabolik yollarda bulunan çeşitli enzimler indirgeyici eşdeğerlik olan NADH'i kolaylıkla H<sub>2</sub> ve 1,3-PDO'ya transfer edebilmektedirler (Zeng et al., 1993). Yükseltgen basamakta DHA, ATP bağımlı bir dihidroksiaseton kinaz (DHAK) kullanılarak DHAP'ye dönüştürülmektedir. ATP'ye bağımlı olmayan bir DHAK (DHAK II) *K. pneumoniae*'de tanımlanmıştır (Kaur et al., 2012a). Yükseltgen basamakta gliserol ilk aşamada pirüvata kadar parçalanarak glikoliz reaksiyonlarına girmektedir. Yükseltgen basamaktaki pek çok farklı yolak sonucunda laktat, bütanol, bütirat, asetat, etanol, 2,3-butanediol (2,3-BD), CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> üretilmektedir. Enzim sistemlerine bağlı olarak farklı mikroorganizmalar farklı yan ürünler üretmektedirler. *Clostridium* türlerinde bütirat, asetat, CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> ana yan ürünler iken, Enterobacteriaceae ise bütirat üretemez ancak *Clostridium*'dan farklı olarak 2,3-BD ve süksinat üretirler (Zeng and Biebl, 2002) (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4). Her iki cinste de etanol üretimi kaydedilmiş olmak ile birlikte, bu üretimde NADH kullanılması gerektiğinden 1,3-PDO üretimini negatif etkilemektedir (Ito et al., 2005).



Şekil 2.3 *Clostridium* sp. için gliserolden 1,3-PDO üretim yolağı ve oluşan yan ürünler (Chatzifragkou et al., 2011).

*K. pneumoniae* ortamda gliserolün sınırlı ya da fazla miktarlarda bulunmasına bağlı olarak H<sub>2</sub> ve 1,3-PDO üretimleri için farklı eğilimler göstermektedir. Ortamda sınırlı miktarda gliserol bulunduğunda H<sub>2</sub>, normalde pirüvatın asetil KoA'ya dönüştürülmesiyle ortaya çıkacak miktardan bile fazla miktarda üretilmiştir, 1,3-PDO ise daha az miktarda üretilmiştir. Buna zıt olarak, ortamda gliserolün fazla bulunması düşük H<sub>2</sub> ve yüksek 1,3-PDO üretimlerine yol açmıştır, bu da fazladan NADH üretilmiş olabileceğini göstermektedir (Zeng et al., 1993).



Şekil 2.4 Enterobacterler için gliserolden 1,3-PDO üretim yolu ve oluşan yan ürünler (Chen et al., 2011a).

Asetat üretiminde ise NADH'e gerek yoktur ve böylece bu yolak dolaylı olarak daha yüksek 1,3-PDO üretimine yol açmaktadır (Zeng and Biebl, 2002). *Clostridium* türleri için ise asetata ek olarak bütirat diğer ana yan üründür. Laktat her iki türe ait olan mikroorganizmalar için de genellikle düşük miktarlarda üretilmektedir. Chatzifragkou et al. (2011b)'un yaptığı bir çalışmada *C. butyricum* VPI 1718 üzerinde anaerobik ortam ve reaktör geometrisinin etkisi incelenerek metabolik yolğun laktat üretimine kaymasının sebepleri araştırılmıştır. Bunun için üç farklı reaktör büyüklüğü ve artan yükseklikler kullanılmıştır ve sürekli anaerobik ortamın oluşturulabilmesi için  $N_2$  gazı reaktöre verilmiş ya da bu gazlamayı kesikli yaparak kendi kendine anaerobikleşme oluşturulmaya çalışılmıştır. Buna göre ortamda gliserol fazla, kendi kendine anaerobikleşme ve reaktörde düşük yükseklik/çap oranı olduğu takdirde NADH-ferredoksin redüktaz aktivitesinde bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu durum ortamdaki NADH miktarını ve beraberinde pirüvattan laktat üretimini arttırmıştır. Laktat miktarının (>10 g/L) artması ile 1,3-PDO miktarı (30 g/L) azalmıştır. Buna karşın, kesikli beslemeli

üretimlerde ortama sürekli N<sub>2</sub> gazı verilmesi ile *C. butyricum* VPI1718 çok yüksek bir 1,3-PDO üretimi gerçekleştirmiştir.

Gliserol ile gerçekleştirilen direk fermantasyona ek olarak, glikozdan gliserol üretilebildiği göz önünde bulundurularak (Wang et al., 2001), glikoz, iki aşamalı bir fermantasyonda glikoz ve gliserol ya da ko-fermantasyon şeklinde glikoz ve gliserol kullanılarak 1,3-PDO üretimi gerçekleştirilebilir (Tjahjajari et al., 2011). Glikoz ile kesikli beslemeli bir ko-fermantasyonda *L. diolivorans*, kesikli sistemler ile karşılaştırıldığında (41.1 g/L 1,3-PDO) 1,3-PDO konsantrasyonunu %76 oranında arttırabilmiştir (73.7 g/L 1,3-PDO) (Pflugl et al., 2012). Bir ko-fermantasyon gerçekleştiğinde gliserol tüketimi glikoz varlığında inhibe olmaktadır. Bunun başlıca sebebi gliserolden 1,3-PDO üretimini gerçekleştiren ana enzimlerin glikoz varlığında, özellikle başlangıç fermantasyon basamağında, bastırılıyor olmasıdır. Bu aşamada genelde glikoz tüketilmektedir. Mikroorganizmalar tercihen glikozu kullanarak enerji ve NADH üretmektedirler, gliserol ise 1,3-PDO üretimi için kullanılmaktadır (Yang et al., 2007). Buna karşın, pek çok mikroorganizmada karbon tüketimi karbon tüketimi baskılanması ('*Carbon Catabolite Repression*'; CCR) mekanizması devreye girmektedir, bu da en kolay erişilebilen substratın önce tüketilmesine yol açmaktadır. Buna göre, ortamda glikozun bulunması CCR sebebiyle gliserolden 1,3-PDO üretimini azaltmaktadır. Bu fenomeni ortadan kaldırabilmek için *crr* geni silinmiş mutant bir *K. pneumoniae* oluşturulmuştur, böylece CCR mekanizmasının inaktifleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu mutant kullanılarak yüksek oranda 1,3-PDO üretimi gerçekleştirilebilmiştir (77.8 g/L ve 81.2 g/L; ortamda sırası ile glikoz ve ön işlem görmemiş mısır şurubu bulunduğunda) ve sadece ortamda gliserol bulunan üretimlerden daha yüksek üretim gerçekleştirildiği raporlanmıştır (50.9 g/L 1,3-PDO üretimi) (Oh et al., 2013). Ko-substrat kullanılan başka bir yöntem ise hemiselülozik hidrolizatlar ile gerçekleştirilmiş ve 1,3-PDO üretimi için daha yüksek biyokütle ve NADH gözlemlenmiştir. *K. pneumoniae* ilk aşama parçalanma ürünleri (xylose, glikoz, mannoz, arabinoz ve galaktoz) ve ana inhibitörler (furfural, asetat ve format) ile test edilmiştir (Jinet al., 2011). Kesikli beslemeli üretimlerde substrat konsantrasyonu 5-8 g/L arasında iken yüksek oranda gliserolün 1,3-PDO'ya dönüşümü (0.65 mol/mol) raporlanmıştır. Düşük miktarlarda (>1.5 g/L) kullanıldığı takdirde ise, 1,3-PDO üretiminin bir yan ürünü olan ve aynı zamanda da ana inhibitörlerden biri olan asetatın 1,3-PDO üretimini arttırıcı rolü olduğu gösterilmiştir. Gliserol ve glikoz gibi hammaddelerin yenilenebilir ve çevre dostu olmaları bu prosesleri daha verimli ve uygulanabilir kılmaktadır.

### 2.3 Biyoproses Mühendisliği Kullanılarak Gerçek Ölçekte 1,3-Propandiol Üretim Çalışmaları

Mikrobiyal üretimi oldukça uzun yıllardır biliniyor olmasına rağmen, 1,3-PDO'ya olan talebin artması ile bu üretimin biyoteknolojik önemi 1990 yılından sonra anlaşılmıştır (Tjahjajari et al., 2011). 2012'de, 1,3-PDO 200 000 tonu geçen bir yıllık üretime ulaşmıştır. Çin'de 2008–2009 yılları arasında gliserolden 1,3-PDO'nun biyoyetimi endüstrideki biyobazlı üretilen materyallerin ulusal yüksek teknoloji projeleri arasında gösterilmiştir (Fujian Shengda Biotechnology Co., Ltd, 2011). CCM International Ltd. (Ekim, 2011)'nin raporlarına göre atık gliserolün (%80) fiyatı 110\$/ton (CCM International Ltd., 2013) olmuştur. Atık gliserolün fiyatındaki düşüş mikrobiyal 1,3-PDO üretimini de ekonomik olarak uygulanabilir hale getirmektedir. Shengda Biotechnology firmasının kurduğu iki adet tesisten birincisi 2 000 ton/yıl (1.faz) ikincisi 13 000 ton/yıl (2.faz) üretim kapasitesi ile çalışmaktadır. Firmanın öngörülen karı 402 milyon \$/yıdır (Fujian Shengda Biotechnology Co., Ltd, 2011). Bu firma anaerobik mikroorganizmaların gliserol fermantasyonu ile büyük ölçekte 1,3-PDO üretimi yapan ilk firmadır (10000 ton/yıl). Buna karşın, Shell Oil Company (72600 ton/yıl), DuPont Tate and Lyle BioProducts Co., Ltd. (61000 ton/yıl) ve Evonik Degussa Co., Ltd. (50 000 ton/yıl) 1,3-PDO üretimi için Dünya'nın öncü gelen firmalarıdır, bunların arasında sadece DuPont 1,3-PDO'yu biyobazlı üretmektedir. Shengda Biotechnology firmasının aksine, DuPont firması bu üretimi rekombinant bir *E. coli* suşu kullanarak glikozdan (mısır) gerçekleştirmektedir (DuPont, 2010). Ayrıca literatürde pek çok çalışmada pilot ölçekte başarılı 1,3-PDO üretimleri raporlanmıştır (Cheng et al., 2007; Zheng et al., 2009). Rekombinant suşlar kullanılarak da 1,3-PDO üretimi için çeşitli yaklaşımlar denenmiştir (Celinska et al., 2010; Huang et al., 2012; Zheng et al., 2006). Bu suşlar ile çoğunlukla yüksek verimler elde edilse de büyük ölçekte gerçekleştirilen üretimlerde her zaman kararlı yapılarını koruyamamaktadırlar.

1,3-PDO üretimi H<sub>2</sub> üretimi ile aynı anda gerçekleştirilebilmektedir. Yukarıda da bahsedildiği gibi, gliserolden üretimler sırasında gaz fazında üretilen yan ürünler H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>'dir (Şekil 2.3). H<sub>2</sub> üretimi asetil KoA üretimini arttırmaktadır bu da bütirat, etanol, asetat, 2,3-BD gibi yan ürünlerin üretimini arttırmaktadır (Liu et al., 2013). Bu yan ürünlerin üretimi arttıkça, 1,3-PDO üretimleri azalmaktadır. Buna karşın, her mol 1,3-PDO üretimi için 1 mol H<sub>2</sub> gereklidir, bu da 1,3-PDO üretimi arttıkça H<sub>2</sub> üretiminin azalmasını beraberinde getirmektedir (Konsoula and Liakopoulou-Kyriakides, 2006). Liu et al., (2013)

hidrolik alıkonma süreleri (HAS) ve gaz tutma noktaları ('*Gas Collection Points*' (GCI)) açısından 1,3-PDO üretimi süresinde reaktörün üst kısmında gaz birikimini incelemiştir. Buna göre, kısa HAS'da H<sub>2</sub> verimleri yükselirken 1,3-PDO verimleri düşmüştür. En yüksek 1,3-PDO verimi (0.65 mol/mol<sub>gliserol tüketilen</sub>) en uzun HAS'da ölçülmüştür, buna karşın en yüksek H<sub>2</sub> verimi (0.75 mol/mol<sub>gliserol tüketilen</sub>) en kısa HAS'da ölçülmüştür (2.5 sa). Başka bir çalışmada ise 1,3-PDO ve H<sub>2</sub>'nin birlikte üretimleri için buğday çamurundan elde edilen karışık kültürler hem atık hem de saf gliserol ile denenmiştir. Denemeler sonucunda yüksek 1,3-PDO (0.69 mol/mol gliserol) ve düşük H<sub>2</sub> (0.28 mol/mol gliserol) verimleri raporlanmıştır (Selembo et al., 2009). Sürekli kültürlerde 0.2 mol 1,3-PDO/mol gliserol, 0.63 mol H<sub>2</sub>/mol gliserol ve 0.85 mol etanol/mol gliserol verimleri elde edilmiştir. 1,3-PDO verimleri düşük olsa da, bu sonuçlar biyodizel üretim atığı gliserolden pek çok katma değeri yüksek ürünün (1,3-PDO, etanol, H<sub>2</sub> vb.) üretilebileceğini göstermeye ilişkin önemli bir kanıttır. Bu sonuçlar H<sub>2</sub> ve 1,3-PDO'nun aynı anda üretilip yüksek verimler elde edilebilmek için optimize edilebileceğini önermektedir. H<sub>2</sub> üretimi, enerji verimleri (hidrokarbon kökenli yakıtlardan 2.75 kat daha fazla) ve kullanım ardından toksik emisyonların üretilmediği göz önünde bulundurularak, oldukça ümit vaat edicidir (Kapdan and Kargı, 2006).

1,3-PDO üretimi için pek çok biyoproses mühendisliği yaklaşımı denenmiştir. Bunlar; askıda kültürler ile; kesikli (Chatzifragkou et al., 2011a), kesikli-beslemeli (Wilkens et al., 2012), sürekli (Menzel et al., 1997), iki basamaklı sürekli (Papanikolaou et al., 2008) ya da immobilize hücreler ile; sürekli (Casali et al., 2012; Güngörmüşler et al., 2011a; Güngörmüşler et al., 2011b; Pflugmacher and Gottschalk, 1994; Wong et al., 2011) ve kesikli beslemeli üretimlerdir (Jun et al., 2010).

Proses tasarımlarının optimizasyonu ile bu üretim için özel olarak dizayn edilmiş farklı yaklaşımlar literatürde raporlanmıştır (Rossi et al., 2013). Bunlar içerisinde önemli yere sahip olanlardan bir tanesi 1,3-PDO üretim verimlerini arttırabilmek için reaktör işletme stratejilerinin matematiksel olarak modellenmesidir (Srivastava et al., 2012b). Plackett-Burman, Fractional Factorial Design (Kaur et al., 2012b), Box-Behnken Response Surface Methodology ve Taguchi Design (Güngörmüşler et al., 2010; Sattayasamitsathit et. al., 2011) gibi istatistiksel deneysel tasarımlar sıcaklık, pH ve başlangıç gliserol konsantrasyonu gibi işletme parametrelerinin yanısıra fermantasyon ortamı bileşiklerinin optimizasyonu için de kullanılmıştır (optimum başlangıç gliserol konsantrasyonu 32.5 g/L ve 65 g/L arasında olacak şekilde raporlanmıştır). Deneysel tasarımlar

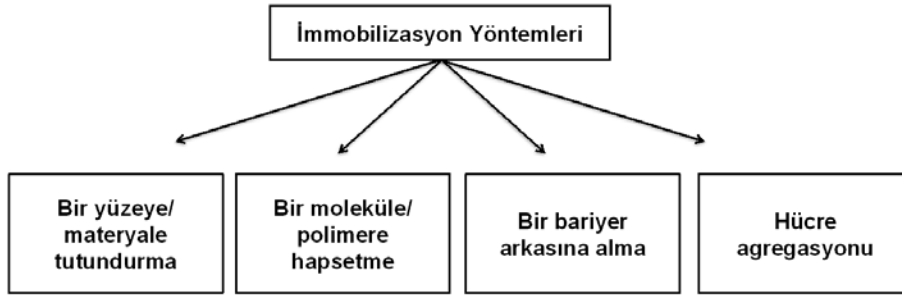
kesikli kültürler (23.8 g/L 1,3-PDO üretimi) ile gerçekleştirilmiş olsa da ileri onaylama testleri kesikli beslemeli kültürlerde yapılmış ve daha yüksek 1,3-PDO verimleri elde edilmiştir (36.86 g/L 1,3-PDO üretimi) (Rossi et al., 2013), elde edilen bu yüksek konsantrasyon kesikli beslemeli kültürlerin daha verimli üretimlere yol açtığı teorisini de desteklemektedir.

1,3-PDO üzerine yapılan pek çok çalışma steril koşullarda saf kültürler ile gerçekleştirilmiştir. Uygun sterilizasyon yönteminin kullanılması bakım ücretlerini oldukça önemli miktarda düşürüyor olsa da, sterilizasyon tüm üretim prosesinin %25'ini kapsamaktadır (Berovic, 2011). Bu yüzden, steril olmayan prosesler endüstriyel boyutta 1,3-PDO üretimleri için önem arz etmektedir. Sterilizasyonun etkilerini karşılaştırabilmek için Metsoviti et al. (2013) bir *C. freundii* izolatını farklı oranlarda gliserol içeren atık gliseroller ile kesikli ve sürekli beslemeli denemelerde kullanmıştır. Steril (68.1 g/L 1,3-PDO) ve steril olmayan koşullarda (66.3 g/L 1,3-PDO) sürekli beslemeli kültürlerde yalnızca çok az farklılıklar raporlanmıştır. Bu çalışmaya göre, düşük başlangıç gliserol konsantrasyonlarında (>20 g/L) mikroorganizmalar ortama daha iyi adapte olabilmektedirler, buna karşın, yüksek gliserol konsantrasyonları adaptasyon sürecini arttırmakta ve 100 g/L'den fazla gliserol konsantrasyonları inhibisyona neden olmaktadır. *C. butyricum* VPI 1718 ile steril olmayan koşullarda gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise sürekli beslemeli kültürlerde yüksek 1,3-PDO konsantrasyonlarına (67 g/L 1,3-PDO, 0.55 g/g<sub>gliserol tüketilen</sub>) ulaşılmıştır. Bu kültür 15 gün boyunca kontamine olmadan devam edebilmiştir (Chatzifragkou et al., 2011a). Literatürde raporlanan bu çalışmalar, steril olmayan koşullarda da 1,3-PDO üretiminin başarılı olduğunu dolayısıyla tesis yatırımlarında özellikle biyoreaktör fiyatlarında ve işletme ücretlerinde (örn; substrat ön işlemleri ve sterilizasyon gibi) düşümlere yol açarak daha ekonomik ve ilgi çekici endüstriyel girişimlere yol açabileceğini göstermektedir.

#### **2.4 Hücre İmmobilizasyon Yöntemleri ve 1,3-Propandiol Üretimi**

Biyoteknolojide immobilizasyon, fiziksel ya da kimyasal yollar ile hücre, organel, enzim ya da proteinlerin katı bir desteğe ya da matrikse tutundurulularak, ya da membran içinde tutundurulularak daha dayanıklı bir ortam sağlanabilmesi böylece birden fazla ya da sürekli kullanımın gerçekleştirilebilmesi tekniği olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.5). Diğer bir tanımda ise, canlı hücrelerin belirli bir bölgeye konumlandırılarak hidrodinamik özelliklerinin buldukları çevreden

farklı olabilmelerinin sağlanması olarak bildirilmiştir (Shafiee and Topal, 2009; Webb and Dervakos, 1996).



Şekil 2.5 Hücre immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.

Bölüm 2.3'te 1,3-PDO üretimi için biyoproses mühendisliği yöntemlerinden bahsedilmiştir ve tüm yöntemlerin ortak noktası olarak üretim verimlerinin artırılması böylece de ekonomik olabilmeleri vurgulanmıştır. Bu bağlamda, immobilizasyon oldukça gelecek vaat eden bir yaklaşımdır. Bunun en önemli sebebi de yüksek miktarda biyokütle üretilebilmesi ve böylece hacimsel 1,3-PDO üretimlerinde ciddi artışlara yol açılabilmesidir (Casali et al., 2012; Güngörmüşler et al., 2011a; Güngörmüşler et al., 2011b). Buna ek olarak, askıda kültürler yerine immobilize kültürlerin kullanılması pek çok avantaj sağlamaktadır; daha kolay alt akım işlemleri, ortamdaki hücre süpürülmesinin engellenmesi, substrat ve son ürün inhibisyonlarına karşı daha yüksek dayanıklılık göstermeleridir.

Khanna et al. (2013) farklı atık gliserol konsantrasyonları (5 g/L'den 150 g/L'ye kadar değişen) kullanarak *C. pasteurianum* hücrelerini hidrofilik bir materyal olan Amberlite (iyon değiştirici bir reçine) üzerine tutundurmuştur. Buna göre, en yüksek gliserol konsantrasyonunda immobilize hücreler askıda hücrelerden daha yüksek verimlere ulaşmışlardır (0.07 g/g<sub>gliserol</sub>) (Khanna et al., 2013). Hücrelerin Lentikat® jellere hapsedilmesi (Schlieker and Vorlop, 2006), hücrelerin bir kapsüle alınması (Yang et al., 2007), ve hücrelerin birbirlerine çapraz bağlanması (Amberlite'a ya da hidrofobik poliüretan ortama) (Jun et al., 2010; Khanna et al., 2013) yöntemleri de 1,3-PDO üretimi için hücre immobilizasyonu için denenmiş ve literatürde raporlanmış yöntemlerdir. Bütün bu girişimler arasında en yüksek verimliliklere hücrelerin hapsedilmesi ile ulaşılmıştır (30 g/L.sa), buna bağlı en yüksek 1,3-PDO konsantrasyonu da 22 g/L olarak belirtilmiştir (Schlieker and Vorlop, 2006). Buna karşın, tutundurma ile gerçekleştirilen immobilizasyon denemelerinde de ümit vaat eden sonuçlar raporlanmıştır, örneğin; pomza taşına tutundurma ile gerçekleştirilen

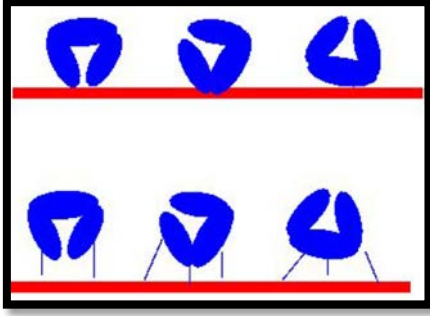


denemelerde, sürekli üretimlerde, 31 g/L 1,3-PDO üretimi (12 g/L.sa verimlilik değeri ile) gerçekleştirilmiştir (Güngörmüşler et al., 2011a). Ayrıca, literatürdeki en yüksek 1,3-PDO üretim değerlerinden bir tanesi *K. pneumoniae*'nin hidrofobik, poliüretan bir madde üzerinde immobilize edilerek kesikli beslemeli üretimlerde kullanıldığında raporlanmıştır (70 g/L 1,3-PDO, 1.5 g/L.sa verimlilik değeri ile) (Jun et al., 2010). Ito et al. (2005), iki farklı yöntem ile *E. aerogenes*'i immobilize ederek H<sub>2</sub> ve etanol verimlerini karşılaştırmıştır. Bu sonuçlar hücrelerin inert bir materyale (Nagao Porcell) tutunmasının kendi kendine immobilize olmalarından daha iyi bir yöntem olduğunu önermiştir.

Bakteri immobilizasyonu için pek çok yöntem bulunmaktadır. Bunlar gerçekleşen fiziksel işleme göre sıralanabilmektedirler; tutundurma, hapsedme, bariyer arkasına alma ve agregasyon (Zhang et al., 2007). Başka bir deyişle biyokütlenin immobilizasyonu; granül oluşturarak (kendi kendine immobilizasyon), biyofilm oluşturarak, inert bir materyale tutundurularak, porlu materyallere hapsedilerek ya da biyomalzemeler veya membranlar gibi bariyerlerin arkasına alınarak gerçekleştirilebilmektedir. Biyorektör konfigürasyonları ise, sürekli karıştırmalı tank reaktörler ('*continuous stirred tank reactors*' (CSTR)), sabit ya da dolgulu yatak reaktörler ('*fixed- or packed-bed reactors*'), akışkan yatak biyoreaktörler ('*fluidized bed reactors*'), yukarı akışlı çamur reaktörler ('*up-flow sludge blanket reactors*' (USB)), gaz kaldırmalı reaktörler ('*gas lift reactors*' (GLR)) ve damlatmalı filtre reaktörler ('*trickling biofilter reactors*') olarak kullanılabilirler.

İmmobilize hücre sistemleri nasıl immobilize olduklarına göre 4 gruba ayrılmaktadırlar. Çoğu hücre immobilizasyonun sağladığı destek ile doğal yollar ile immobilize olabilmektedir. İmmobilizasyon materyali seçilirken nerede ve nasıl kullanılacağı dikkate alınmalıdır. Bu ve bunun gibi dikkat edilmesi gereken noktalar aşağıda ayrıntıları ile açıklanmıştır (Bkz. Bölüm 2.4.1, 2.4.2, 2.4.3 ve 2.4.4).

### 2.4.1 Hücrelerin tutundurulması

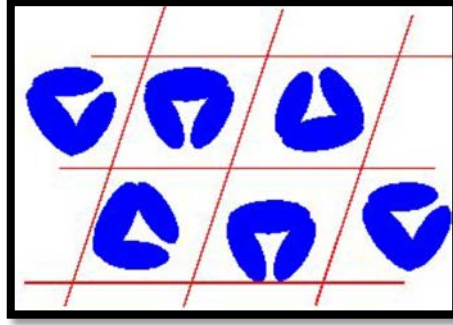


Şekil 2. 6 Hücrelerin tutundurulması ile immobilizasyon yönteminin şekil üzerinde gösterilmesi.

Katı bir yüzeye bağlanmış her türlü immobilizasyon tutundurma ya da biyofilm oluşumu olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.6). Hücrelerin yüzeye adsorbsiyonu, yapısal özelliklerine bağlı olarak, doğal yollar ile oluşan fizyokimyasal bağlar sayesinde materyale kendilerini sabitlemeleri ile oluşmaktadır (Schlieker and Vorlop, 2006). Hücrelerin organik ya da inorganik destek materyallerine adsorbsiyonu Van der Waals bağları ya da iyonik etkileşimler ile gerçekleşmektedir. Immobilizasyon doğal yollar ile ya da yapay bağlanma ajanları ile sağlanabilmektedir. Glüturaldehit ya da amminosilan gibi kovalent bağlama ajanları ya da metal oksitler yapay bağlanma ajanları olarak kullanılabilirler. Adsorbsiyon, mikroorganizma immobilizasyonu için oldukça kolay ve ucuz bir yöntemdir. Poliüretan köpük (Pflugmacher and Gottschalk, 1994), seramik (Casali et al., 2012; Güngörmüşler et al., 2011b), pomza taşı (Wong et al., 2011) ya da cam (Shriver-Lake et al., 2002) gibi katı halde ve inert materyaller hücrelerin tutundurulması için en çok tercih edilen materyallerdendir. Bu materyaller polikasyon, kitosan ya da diğer kimyasallar ile muamele edilerek adsorbsiyon yetenekleri artırılabilir (Huang et al., 2007). Destek materyalleri yüksek dayanıklılık ve elastiklik gibi iyi mekanik özelliklere sahip, yüksek adsorbsiyon yüzeyi sağlayan porlu yapıda ve ekonomik olmalıdırlar (Schlieker and Vorlop, 2006).

Hücrelerin özelliklerine de bağlı olarak, biyofilm oluşumunda, önce gevşek bir bağ oluşmaktadır ardından da yan bağlanmalar ve çoklu bağlanmalar ile oluşum tamamlanmaktadır. Bu süreçte, mikroorganizmalar adsorbsiyon ve desorbsiyon seviyelerinden geçmektedirler. İmmobilize biyofilm oluşurken (adsorbsiyon) sürekli ve aynı anda hücre kaybı (desorbsiyon) oluşmaktadır bu da immobilize olan ve olmayan hücreleri dengelemektedir (Schlieker and Vorlop, 2006).

### 2.4.2 Hücrelerin hapsedilmesi



Şekil 2. 7 Hücrelerin hapsedilmesi ile immobilizasyon yönteminin şekil üzerinde gösterilmesi.

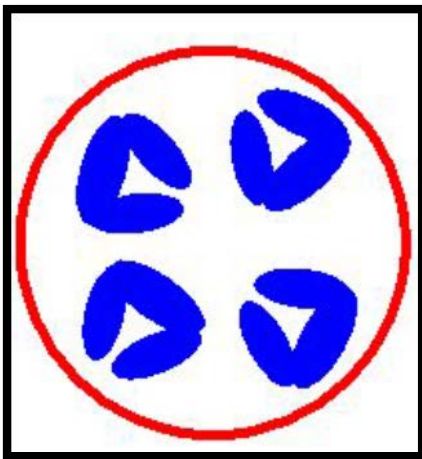
Hücreler, makro veya mikro materyaller içerisine (seramik, aktif karbon vb.), doğal (kollajen, agar, agaroz, selüloz, aljinat vb.) veya sentetik (akrilamid, polivinil vb.) polimerlere hapsedilerek immobilizasyon gerçekleştirilebilir (Schlieker and Vorlop, 2006) (Şekil 2.7). Immobilizasyonun etkisi hücre tipi ve destek materyaline göre değişiklik göstermektedir. Yüzeye tutunarak gerçekleşen biyofilmlerin aksine, hapsedilmiş hücreler partiküller etrafındaki gerilimden etkilenmezken, aynı tutundurmada olduğu gibi partikülün kendisi ile de sınırlandırılmamışlardır. Bu tekniğin en önemli avantajı immobilize biyokütlenin ve miktarının kontrol edilebilmesidir, bu da, partikül sınırları dışında üreyen hücrelerin partikül etrafında oluşan akım ya da partiküller arası temas ile ortamdan uzaklaştırılması ile gerçekleştirilmektedir (Webb and Dervakos, 1996).

Diğer çok kullanılan hapsedme yöntemi ise porlu yüzeylere, hidrojeller içerisine hapsedme ile, hücrelerin immobilize edilmesidir. Hücre peletleri genellikle hücrelerin canlılığını bozmayacak fiziksel koşullarda jelleşebilen bir kimyasal ile karıştırılır (Kierstan and Coughan, 1985). Bu şekilde gerçekleştirilen ve fermantasyon için kullanılan hapsedme yöntemlerinde çoğunlukla polisakkarit jeller kullanılmaktadır. K-carrageenan, agar, aljinat, hiyaluronik asit, jelatin ve LentiKat® kullanılarak oluşturulan hidrojel partiküller içerisine hapsedme en çok kullanılan metotlar arasındadır. Jel ile immobilize edilmiş hücrelerin performansları düşük olmasının sebebi düşük kütle transferi olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak, hücre içeren jellerin kararlılıkları ve dayanıklılıkları da performans düşüşlerine yol açabilmektedir. Jel içerisinde hücre büyümesi sürekli devam etmektedir, ancak hücre konsantrasyonu %30 (v/v)'u geçtiği takdirde jelin bütünlüğü bozulmaya başlamaktadır (Ishikawa et al., 2006). Kalsiyum aljinat jeller ortamda fosfat gibi kalsiyum ile bağ yapan ajanlar ya da bazı gaz molekülleri olduğu takdirde bozunabilmektedirler. Benzer olarak,

immobilizasyon matrisi çoğunlukla biyobozunurdur. Bunlara karşılık, doğal polimerler ile ilgili bahsedilen dezavantajları ortadan kaldırabilmek için polivinil alkol (PVA) bazlı matrisler de tercih edilebilmektedir (Jekel et al., 1998). PVA geleneksel dondurma ve çözme metodu ile hidrojel oluşturmak üzere kullanılan sentetik bir polimerdir ve oluşturduğu partiküller çok iyi mekanik özelliklere sahip olmaktadır. Biyopolimerlerin aksine, PVA hidrojelleri çok az oranda biyobozunurdurlar ve çok iyi mekanik dayanıklılıkları vardır. Uzun süren fermantasyonlarda bile kayda değer bir bozunma göstermemişlerdir (Schlieker and Vorlop, 2006). PVA içerikli, oda sıcaklığında oval şekilli hidrojeller oluşturan bir materyal geliştirilmiştir (Jekel et al., 1998). Bu materyal LentiKat® olarak isimlendirilmektedir. Bu proses hem küçük hem de büyük partiküllerin avantajlarını beraberinde getirmektedir. Difüzyon sınırlanması en aza indirgenirken, büyük partikül yapısı sayesinde jeller biyoreaktör içerisinde kolayca tutulabilmektedir.

Biyorektörlerde uzun işletme sürelerinde partiküllerin dayanıklılığı çok önemli bir parametredir. Polimethyl metakrilat (PMMA), polietilen-okten-elastomer (POE) ve sodyum aljinat jellerine hapsedilmiş mikroorganizmalar ile yapılmış olan mekanik dayanıklılık ve hidrojen üretim kapasiteleri denemelerinde POE'ye hapsedilmiş hücrelerin en yüksek verim ve konsantrasyonu verdikleri ve uzun bir süreçte %90 oranında bu üretim kapasitesini koruyabildikleri raporlanmıştır (Chang et al., 2002).

### 2.4.3 Kapsama (Bir bariyer arkasına alma)



Şekil 2.8 Bir bariyer arkasına alınarak immobilizasyon yönteminin şekil üzerinde gösterilmesi.

Fermantasyon çıkış suyundan, hücrelerin, yüksek molekül ağırlıklı bir madde ya da özel bir ürünün ayrıştırılması söz konusu ise bir bariyer arkasına alarak immobilizasyon sistemleri çok kullanışlıdır (Şekil 2.8). Hücreler önceden hazırlanmış (hollow fiber ya da düz tabaka membran reaktörler) ya da hücreler ile aynı anda hazırlanmış (mikrokapsüller ve iki aşamalı hapsetme) bariyerlerin arkasına alınarak immobilize edilebilirler. Bu bariyerler hücre süspansiyonlarının aerosol halde ortama verilmesi ile homojen olarak karışmayan iki sıvı arasında olabilirken, mikrofiltrasyon ya da ultrafiltrasyon için kullanılan yarı geçirgen membranlardan da oluşabilir (Rupp, 1985). Sentetik membranlar genellikle polimerik mikro ya da ultrafiltrasyon membranlarıdır, ancak, seramik, silikon lastik ve iyon değiştirici gibi değişik membran tipleri de immobilizasyon için kullanılabilir. Membran por büyüklüğü ve yapısı ile membranın yükü ve hidrofobik/hidrofilik yapısı kütle transferini kontrol eden önemli faktörlerdir. Bu transfer difüzyon ile ya da membran içerisinde basınç farkı oluşturulması ile sağlanabilmektedir.

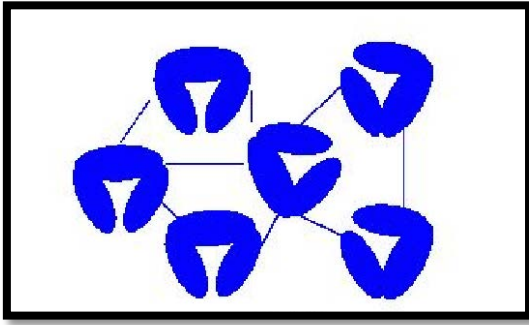
Hiçbir kimyasal ajan eklenmediğinden ve ağır şartlar gerektirmediğinden önceden hazırlanmış membranlar ile hapsetme yöntemi oldukça hassas bir immobilizasyon yöntemidir. Bazı durumlarda aşı reaktöründe üretilen hücre süspansiyonları filtrasyon yöntemi ile immobilize edilebilirler. Substrat ve ürünlerin birbirlerinden ayrı olduğu durumlarda iki aşamalı sistemler de uygulanabilmektedir. Bu sistemlerde hücrenin geri dönüşümü de mümkün olmaktadır (Chang et al., 1994).

İmmobilize sistemlerin verimlilikleri artırılmak istendiğinde kütle transferindeki sınırlamalardan kaynaklanan besin maddesi transferi problemleri çözümlenmeye çalışılmaktadır. Patenti alınmış bir bariyer ardına alma tekniğinde arasında 0.2 mm'den az mesafe olan iki hollow fiber membran kullanılmıştır (Robinson, 1991). Besin maddeleri bu iki fiber membrandan difüzyon yolu ile geçmektedir. Substrat beslemesini kontrol edebilmek için aradaki mesafe en önemli etkidir. Alternatif bir yöntem olarak ısı yolu ile besin maddelerinin taşınımı kütle transferi sınırlamalarını azaltarak başarılı olabilmektedir (Efythymiou ve Shuler, 1987). Hücrenin reaktöre geri beslenmesi ile de biyokütle konsantrasyonu artırılarak kütle transferi artırılabilir (Chang et al., 1994; Shi et al., 1997).

Mikro-enkapsülasyon diğer bir kapsama ile immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntemde küre şeklinde bir jelin içerisine polimerik bir membran

yerleştirilmektedir. Kapsül çapı 20  $\mu\text{m}$ 'den 2 mm'ye kadar değişebilmektedir. Mikro-enkapsülasyon, kapsülün içinde yüksek molekül ağırlıklı ürünlerin oluşumu ile sonuçlanan, hücre ve ürün ayrımının aynı anda gerçekleşmesini sağlayabilmektedir. İmmobilize hücreler tamamen fermantasyon ortamından ayrıştırılabilmektedir, böylece daha ucuz ve kolay alt akım işlemleri gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntem, jel matrisinden hücre kaçıışı olduğu gözlemlendiğinden, geleneksel jel immobilizasyon yöntemlerinde kullanılamamaktadır (Kanekanian, 2009).

#### 2.4.4 Agregasyon (Hücre kümeleşmesi)



Şekil 2.9 Agregasyon ile immobilizasyon yönteminin şekil üzerinde gösterilmesi.

Hücreler arası tutunma olarak da adlandırılan bu yöntem genellikle hücre yoğunluğunu arttırabilmek için kullanılmaktadır (Şekil 2.9). Hızlı bir çökeltme işlemi ile ortamda kolayca ayrıştırılabilen ve hücrelerin floklaşması ile meydana gelmiş büyük agregatlar bu yöntem ile immobilize olmuş hücrelere örneklerdir. Bu şekilde flok oluşturmaya meyilli bazı hücreler destek materyaline gerek kalmadan doğal yollar ile floklar oluşturarak immobilize olabilmektedirler (Zhao and Bai, 2010), bununla birlikte bu hücre agregatlarını oluşturabilmek için kimyasal ajanlar da kullanılabilir. Hücrelerin kendi kendilerine oluşturdukları bu agregatlar hapsolme ve tutundurma yöntemleri ile karşılaştırıldıklarında bazı avantajlar sağlayabilmektedirler. Bu yöntemde immobilizasyon materyaline ihtiyaç yoktur, ucuzdur ve çok daha kolay şekilde büyük ölçek üretimlere uygulanabilmektedir. Hücre floklarının oluşturduğu granüller uzun süreli üretimlerde de oldukça dayanıklıdır. Bu granül sistemlerinin tek dezavantajı çok uzun sürede oluşuyor olmalarıdır. Aynı zamanda her bakteri hücre flokları oluşturamamaktadır. Ancak özgün genetik mühendisliği yöntemleri ile flok oluşturan bakteriler geliştirilebilir (Li et al., 2012).

Anaerobik arıtma sırasında en çok kullanılan hücre immobilizasyon yöntemlerinden biri de anaerobik granül çamur oluşumudur. Bir UASB reaktörde, çamurun granülleşmesi ile biyokütle konsantrasyonu artmakta ve ortamdan bakterilerin süpürülerek atılması azalmaktadır. UASB reaktördeki bu granüller reaktörün normal besleme hızları ile karşılaştırıldığında çok daha yüksek organik substrat besleme hızlarına dayanabilmesini sağlamaktadır. Granüller, diğer sistemler ile karşılaştırıldığında, UASB reaktörün daha verimli çalışmasını sağlayacak pek çok avantaja sahiptirler. Öncelikle, granüller daha hızlı çökme hızına sahiptirler bu da düşük süpürülme oranlarını açıklamaktadır. İkinci olarak, çevresel aşırı koşullar oluştuğu takdirde bile mikroorganizmaların bu koşullara karşı dayanıklı kalmasını ve korunmasını sağlamaktadırlar (Hu and Chen, 2007). Üçüncü olarak, bir anaerobik arıtma sistemi için granüller, porlu yapılarından dolayı hem besin maddeleri açısından kütle transferi için hem de üretilen biyogazın dışarı salınabilmesi için çok ideal bir ortam yaratmaktadırlar (Fang et al., 2002).

Granülasyon sürecinin anlaşılabilmesi reaktör dizayn ve performanslarının nasıl iyileştirilebileceğini açıklayabileceği için çok önemlidir. Ortamda hücrelerin tutunabileceği bir madde olmadığından, granülasyon, mikroorganizmaların birbirlerine tutunmaları ya da birleşmeleri ile oluşmaktadır (Tay et al., 2006). Bu sebeple, bu proses hücrelerin birbirleri ile ve yüzey ile fizikokimyasal etkileşimleri ile doğrudan bağlantılıdır. Termodinamik açıdan bakıldığında, mikrobiyal çamur kararlılığı, elektrostatik, hidratlama, yapısal güçler ve çekici güçleri (Van der Walls vb.) içeren bir güç dengesi ile oluşmaktadır (Liu et al., 2003). Bazı fizikokimyasal modeller bu oluşumu açıklayabilmek için tanımlanmıştır. Örneğin; ikincil minimum adhezyon modeli (Lee et al., 2004; Liu et al., 2005), ekstraselüler polimerlerin (ECP) bağlanma modeli (Hulshoff et al., 2004), inert çekirdek modeli (Lettinga et al., 1980), ve iyon bağlanma modeli (Tay et al., 2006). Fizikokimyasal güçlere ek olarak biyolojik, mikrobiyolojik ve hidrodinamik etkenlerin rol aldığı bakterilerin granülasyon prosesi oldukça karmaşıktır. Örneğin; yapısal modeller, proton yer değiştirmesi ve hücre-hücre iletişimleri gibi pek çok farklı model ve hipotezler yukarıda bahsedilen anaerobik granülleşme faktörleri için önerilmiştir (Fang et al., 2002; Liu et al., 2003; Tay et al., 2006). UASB reaktörlerde tipik anaerobik granülleşmenin oluşumu ve mekanizması literatürde raporlanmıştır (Hulshoff et al., 2004; Lee et al., 2004; Liu et al., 2005). Buna göre, biyofilm oluşturan mikroorganizmalara göre granüllerin daha avantajlı olduğunu gösterilmiştir.

### 2.4.5 Hücre immobilizasyonunun avantaj ve dezavantajları

İmmobilizasyon proseslerinin yukarıda da değinilmiş olan pek çok avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Genel anlamda avantajları; biyokatalizörün tekrar kullanılabilirliği, daha kolay alt akım işlemleri, yüksek biyokütle miktarı ile sürekli ve yüksek hızda üretimlerin gerçekleştirilebilmesi, yüksek verimlilikler ve yüksek proses kararlılığı şeklinde sıralanabilir (Kaur et al., 2012). Hücrelerin tekrar kullanılabilmesi ve fermantasyon ortamından kolay ayrıştırılabilmeleri endüstriyel üretimler açısından bir avantaj sağlamaktadır (Saxena et al., 2009). Tüm bunların ışığında hücre immobilizasyonunun en çok beklenen avantajı biyoproses maliyetlerini düşürmesi sonucuna ulaşılabilir. Bunun en büyük sebebi de hücrelerin tekrar kullanılabilmesi ve alt akım işlem maliyetlerinin düşürülmesidir. Buna ek olarak, immobilizasyon yüksek konsantrasyonda substrat kullanımına olanak sağlamakta (örn; gliserol) böylece yüksek biyokütle konsantrasyonlarına da ulaşabilmektedir. Diğer bir avantajı ise özellikle bitkiler gibi hassas hücrelerde kayma gerilimine karşı dayanıklı hücreler oluşturulabilmesidir. Dezavantajları ise; kütle transferi sınırlamaları, immobilizasyon sırasında deaktivasyon, immobilizasyon matriksinin ortamdaki uzaklaşma durumu ve bazı durumlarda immobilizasyonun ekstra bir maliyet oluşturması şeklindedir (Schlieker and Vorlop, 2006). Bunlara ek olarak hapsetme yönteminde kullanılacak sentetik polimerler hücreye toksik etki yaratabileceğinden çok iyi seçilmesi gerekmektedir. Bir bariyer içerisine hapsetme yönteminde kullanılacak membran porlarının boyutunun hücre boyutu ile uyumlu olması gerektiğinden bu da özel membran sistemleri üretilecekse ekstra maliyet oluşturabilir.

İmmobilizasyon yukarıda da bahsedildiği gibi askıda kültürler ile karşılaştırıldığında, mikroorganizmaların kararlılığını arttırması, yüksek hücre yoğunluğu dolayısıyla fermantasyon verimini arttırması, sürekli üretime uygun olması gibi avantajları sebebiyle fermantasyon çalışmalarında büyük öneme sahiptir. Pek çok biyoteknolojik üretimde immobilize hücre sistemlerinin fermantasyon performansında önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir (Yiğitoğlu ve ark., 2012).



## 2.5 Proteomik Analizler ve 1,3-Propandiol Üretimi

Genom, DNA'nın taşıdığı genetik bilgiyi ifade eder. Bu bilginin ortaya çıkarılması ile ilgili çalışmalar ise genomik olarak adlandırılmaktadır. Gen ürünlerinin sentez sonrası değişimleri, hücrede buldukları yerler ve göreceli miktarlarının anlaşılması için genomik sonrası bilgilere ihtiyaç vardır. Proteom, genom tarafından kodlanan proteinleri tanımlar. Sabit bir yapı olan ve bir organizma için çok iyi tanımlanabilen genomun aksine, proteom, hücreden hücreye farklılık gösterir, iç ve dış uyaranlara yanıt olarak biyokimyasal etkileşimler aracılığı ile sürekli bir değişim halindedir. Proteomik ise belli şartlar altında belli bir mikroorganizmada genom tarafından sentezlenen tüm proteinlerin analiz edilmesi, yani proteomun tanımlanması işlemidir (Kurban ve Mehmetoğlu, 2010). Farklı proteinler hem genler tarafından kodlanan polipeptid yapıları, hem de sentez sonrası (allosterik) modifikasyonları içermektedir. Bu analizler sonucunda hızlı bir yöntem ile bakterilerin kullandığı metabolik yollar tanımlanabilmektedir (Levin, 2010). Örneğin, *C. butyricum*'un gliserol üzerinde büyümesi sırasında 1,3-PDO eksponansiyel fazda daha fazla üretilirken durağan fazda bütirat üretimi daha çok gözlemlenmektedir (Wilkens et al., 2012). Bunun gibi yan ürün ve istenilen ana ürün konsantrasyonlarının hangi büyüme fazında daha çok üretildiği ya da birbirlerine olan konsantrasyon oranlarının sebeplerinin anlaşılabilmesi maksimum verimde 1,3-PDO üretimleri için oldukça önemlidir.

Proteomik, dinamik bir terim olup farklı koşullarda hücre, doku veya vücut sıvılarındaki proteinlerin kantitatif analiz teknolojisi olarak tanımlanır. Bu çalışmada gerçekleştirildiği gibi kıyaslamalı proteomik ise iki farklı durum arasındaki (düşük ve yüksek substrat konsantrasyonu, iki farklı büyüme fazı vb.) ifadenin karşılaştırılmasına dayanır (Başaran ve ark., 2010). Bu çalışmanın pek çok amacı vardır, bunlar şu şekilde sıralanabilir; mRNA seviyeleri, protein seviyeleri ve protein aktivitesi ile iyi bağdaştıramadığından gereklidir. Yine mRNA düzeyinde proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları ile ilgili bilgi sağlanamaz. Buna ek olarak genom ile proteom birlikte daha kapsamlı veri sağlayabilir. Proteomik teknolojisi, önce örnekteki proteinlerin ayırımı ve sonra bu proteinlerin tanımlanması prensibine dayanmaktadır. İlk aşamada örnekte bulunan proteinler peptitlerine ayrıştırılırlar. Ardından elde edilen veriler gerekli yazılımlar ve veri tabanları kullanılarak değerlendirilir ve proteinler belirlenir. Sonaşamada ise çeşitli kütle spektrometresi (MS) yöntemleri ile bu proteinlerin kütleleri saptanır ve kesin vedoğru olarak proteinlerin tek tek tanımlanması sağlanır (Kurban ve Mehmetoğlu, 2010). En çok kullanılan protein ayırma

yöntemleri iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE), iki boyutlu ayırıcı jel elektroforezi (2D-DIGE) ve tek ve iki boyutlu sıvı kromatografisi (1D-LC ve 2D-LC) olarak sıralandırılabilir.

Nicel kromatografik yöntemler (HPLC, GC gibi) ile eş zamanlı olarak da sıklıkla kullanılan proteomik analizler metabolik yollardaki hız belirleyici basamakları belirlemede kullanılacak çok güçlü analizlerdir. Literatürde proteomiks pek çok biyobazlı ürün üretimlerinin verimli hale getirilmesinde kullanılmış olmakla beraber (Weckwerth, 2011; Ndimba et al., 2013) 1,3-PDO üretimlerinin optimizasyonu için henüz yeni kullanılmaya başlanmıştır (Wang et al, 2003; Jin and Lee, 2008; Gonzalez et al., 2013). Gonzalez et al. 2013 yılında yaptığı çalışmada 2 boyutlu jel elektroforez ile kütle spektrometrisini birleştirerek 1,3-PDO üretimi sırasında *Clostridium* sp. (IBUN158B)'nin büyüme fazları arasında protein düzeyindeki değişiklikleri gözlemlemiştir. Buna göre, 1,3-PDO üretime yol açan indirgen basamaktaki enzimlerin ve bunlara ek olarak oksidatif basamaktaki bütirat yolağındaki enzimlerin oldukça yüksek miktarlarda ifade edildiğini belirtmiştir. Bu çalışma Clostridia'ya ait türlerin gliserolden 1,3-PDO üretimi sırasında metabolik yolları protein düzeyinde ve biyokimyasal açıdan değerlendiren ve literatürde bulunan ilk ve bilginiz dahilinde tek çalışmadır. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda bu tez çalışmada kullanılan *C. butyricum*'a ait veriler literatüre önemli katkılarda bulunabilecektir. Buna ek olarak literatürde, *K. pneumoniae* (Wang et al., 2003) ve rekombinant *E. coli* (Jin and Lee, 2008) kullanılarak da proteomik analizler gerçekleştirilmiştir. Wang et al. (2003) çalışmalarını enzim aktivitesi ölçümleri ile de birleştirerek gen ifadesinin yüksek olmasının bir enzimin yüksek miktarda çalışıp yüksek konsantrasyonda ürün üretmesine karşılık gelip gelmediğini araştırmıştır. Buna göre, çoğu enzimin bu yönde çalıştığını raporlamış olmasına rağmen büyüme fazları arasında gen ekspresyonlarında fazla bir değişiklik olmasa da bazı ürünlerin üretilebildiğini de göstermiştir (Wang et al., 2003). Ayrıca, alkil hidroperoksit redüktaz gibi yüksek oranda ifade edilmiş enzimlerin kendi aktiviteleri dışında 1,3-PDO üretimini de katalizliyor olabileceği fikrini ortaya atmıştır. Bu çalışmalarda da görüldüğü gibi, elde edilen proteomik analiz sonuçları bir protein ifadesinin yüksek ya da düşük olması o ürünün fazla ya da az üretildiğini göstermemek ile birlikte farklı proteinlerin farklı görevleri olabileceklerini de göstermiştir. Bu ve bunun gibi çalışma sonuçları daha verimli 1,3-PDO üretimleri için özgün çözümler üretilmesinde ya da rekombinant mikroorganizmalar geliştirilmesinde rehber olabilmektedirler.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 İmmobilize Sistemlerde Kullanılan Mikroorganizma ve Özellikleri

İmmobilizasyon çalışmaları süresince, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden temin edilen *Klebsiella pneumoniae* (GenBank No: 27F HM063413) kullanılmıştır. Fakültatif anaerob, gram (-) bir bakteridir.

#### 3.2 Büyüme ve Fermantasyon Ortamı

Büyüme ortamı olarak NB (Nutrient Broth, Merck) kullanılmıştır. Fermantasyon ortamı optimize edilmiştir ve 1L için içeriği şu şekildedir; 5.72 g  $K_2HPO_4$ , 1.5 g  $KH_2PO_4$ , 2 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.24 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1.0 g maya özütü, 0.5 mL  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  çözeltisi ve 1 mL iz element çözeltisi. 1 L saf su için iz element çözeltisi içeriği şu şekildedir; 70 mg  $ZnCl_2$ , 100mg  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 60 mg  $H_3BO_3$ , 200 mg  $CoCl_2 \cdot 2H_2O$ , 20 mg  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ , 25 mg  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ , 35 mg  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , ve 0.9 mL HCl (37%). Buna ek olarak fermantasyon ortamı deney düzeneğine bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda atık gliserol içermektedir. Farklı hidrolik alıkonma sürelerinin (HAS) çalışıldığı sürekli ve kesikli askıda üretimlerde ve immobilize üretimlerde 40 g/L, farklı gliserol giriş konsantrasyonlarının denendiği sürekli askıda üretimlerde 10 – 110 g/L arası konsantrasyonlarda atık gliserol kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan biyodizel atığı gliserol, İzmir Torbalı'da Biyodizel üretimi yapan DB Tarımsal Enerji San. ve Tic. A.Ş.'den alınıp +4°C'de saklanmıştır. Biyodizel atığının içerisinde %54.35 (w/v) gliserol, %34.81 su, %6.52 sabun, %3.53 NaOH, %0.64 NaCl ve iz miktarda metanol bulunmaktadır.

Steril gerçekleştirilen çalışmalar laminar akışlı CLASS 2 biyolojik kabinde gerçekleştirilmiştir. Ortam ve kullanılan ekipmanların sterilizasyonu için etanol (%70 v/v) ve UV ile yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

### 3.3 Askıda Kùltürler ile Gerçekleştirilen Deneme DüzeneKleri

#### 3.3.1 Kesikli denemeler

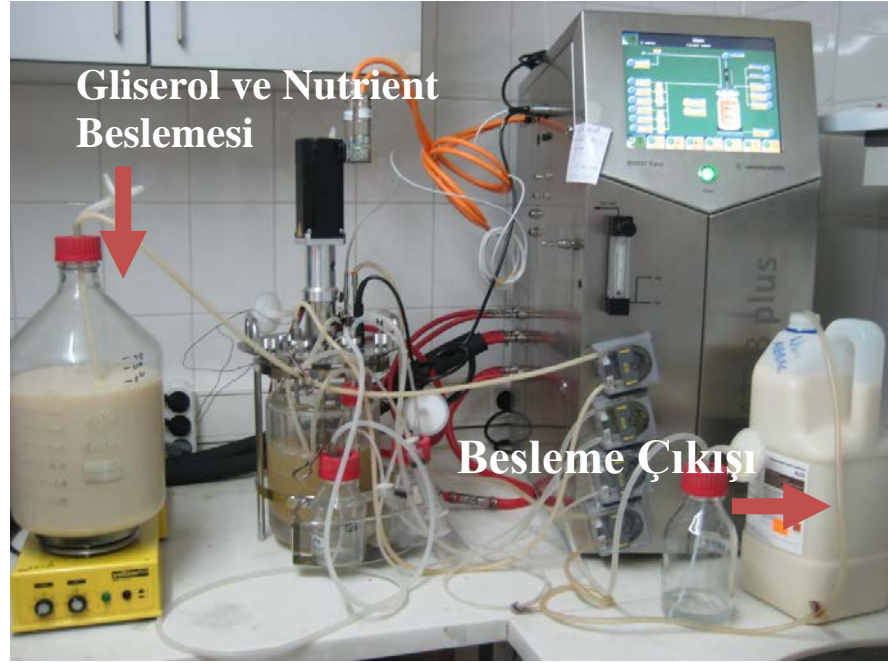
Askıda kùltürler ile gerçekteştirilen kesiklidenemeler Schott şişelerde gerçekteştirilmiştir (şekil 3.1). Örnekleme her saat başı yapılarak yan ürün, Askıda Katı Madde (AKM) ve (Optik Dansite) OD analizleri yapılmıştır. Başlangıç atık gliserol konsantrasyonu 5, 15, 30, 60, 90 ve 120 g/L olarak ayarlanmıştır ve çalışma 10 saat süresince devam ettirilmiştir. Ortamların pH'ları otoklavlanmadan önce 7.0'ye ayarlanmıştır. Ardından üretim boyunca herhangi bir pH ayarlaması yapılmamıştır.



şekil 3.1 *K. pneumoniae* ile farklı gliserol konsantrasyonlarında gerçekteştirilen kesikli denemeler için kullanılan kùltür ortamı içeren Schott şişeler.

#### 3.3.2 Sùrekli denemeler

Askıda kùltürler ile gerçekteştirilen sùrekli denemeler bir fermentör (biyoreaktör) kullanılarak gerçekteştirilmiştir. Denemelerde 2 L toplam hacime sahip Sartorius marka B+ fermentör kullanılmıştır (şekil 3.2 ve şekil 3.3). Sùrekli denemeler aseptik şartlar altında, steril örnekleme ile numune alımı yapılarak, 1 L çalışma hacmi ile gerçekteştirilmiştir. Karıştırma hızı 150 rpm'de sabitlenmiştir. pH kontrolü için 2M NaOH kullanılmıştır. Gerçekteřtirilen ilk fermentör denemesinde askıda kùltürlerin 0.5 ve 16 sa arası değişen farklı HAS süreleri için verdikleri tepkiler gözlemlenmiştir. Bu denemenin ardından ikinci fermentör denemesi farklı giriş atık gliserol konsantrasyonları için gerçekteştirilmiştir. Bu deneme önceki denemede gözlenen gliserol tüketim değerleri göz önünde bulundurularak HAS = 8 sa'de sùrekli olarak gerçekteştirilmiştir. Her HAS ya da her gliserol konsantrasyonu için en az 6 (6x8=48 sa) dōngü çalışılmıştır.



Şekil 3.2 *K. pneumoniae* ile gerçekleştirilen sürekli fermentör denemesinde gliserol ve nutrient beslemesi ile ürün çıkışı gösterimi.

Şekil 3.3'te sürekli üretim süresinde kullanılan ve fermentöre entegre pompalar görülmektedir. Buna göre, asit pompası kalibre edilmiş değerlere göre belli verimlerde çalıştırılarak HAS değerleri ayarlanmıştır. seviye pompası da sürekli çalıştırılarak hacmin sabit tutulması sağlanmıştır. Köpük giderme pompası sadece üretim başlangıcında aşılama için kullanılırken baz pompası otomatik olarak pH değerini 7'de sabit tutabilmek için kullanılmıştır.



Şekil 3.3 Sürekli denemelerde kullanılan peristaltik pompalar.

### 3.4 İmmobilize Kùltürler ile Gerçekleştirilen Deneme Düzenekleri

İmmobilize kùltürler ile gerçekleştirilen tüm denemeler sürekli beslemeli sistemlerde gerçekleştirilmiştir. Denemelerde tutundurma ve hapsetme olmak üzere iki farklı immobilizasyon yöntemi kullanılmıştır.

#### 3.4.1 Tutundurma ile immobilizasyon denemeleri

Tutundurma denemeleri için kullanılan cam kolon reaktörlerin iç çapı 4.5 cm, yüksekliği 30 cm'dir. Dolgu malzemelerinin bulunduğu yatak yüksekliği yaklaşık 23 cm'dir. Boşken toplam sıvı hacmi 280 mL'dir. Dolgu malzemesiz işletilen cam reaktöre ek olarak, seramik top, poliüretan köpük (PUF), cam boncuk, pomza taşı, Vukopor® (VUK), cam Rashing halkaları, çelik tel, seramik halka ve seramik top olmak üzere toplam 9 farklı malzeme ile immobilizasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

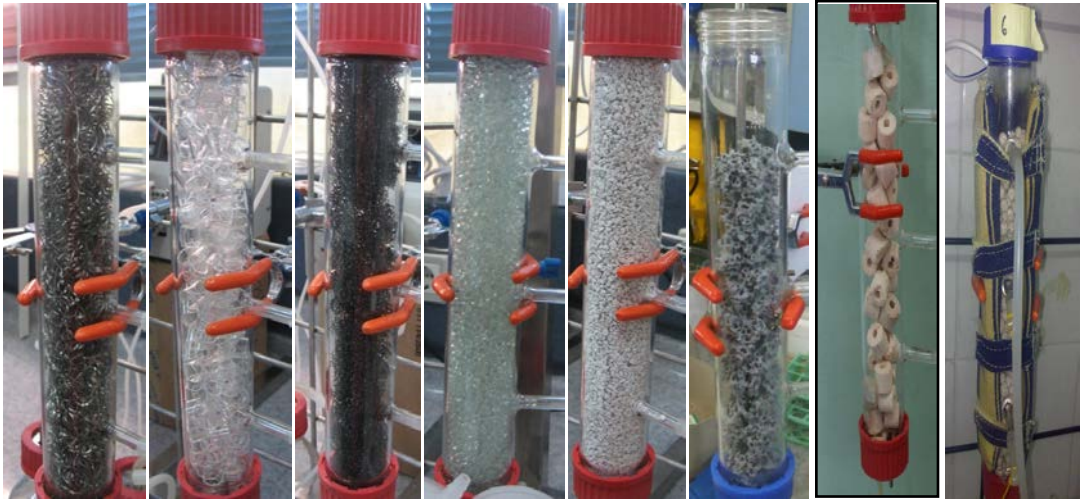
İmmobilize reaktörde fermentasyon işlemi sürekli proses ile 37°C de üretim başlangıcında ortama N<sub>2</sub> verilmesi ile sağlanan anaerobik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Dolgu malzemeleri ile doldurulmuş kolon reaktörler Şekil 3.4'te gösterildiği gibidir, sıcaklık kontrolü kolon reaktör etrafına sarılan elektrikli battaniye ile kontrol edilerek 37°C±1°C de sabit tutulmuştur. Kullanılan peristaltik pompalar ile yukarıya doğru akış gerçekleştirilmiştir. pH ölçümleri çıkış suyundan alınan örnek ile pH kağıtları kullanılarak yapılmıştır.

İmmobilize reaktörlerin tüm borulama işlemleri tamamlandıktan sonra 121°C de 30 dakika süreyle sterilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra %1 (v/v) aşılama yapılmış steril büyüme ortamı NB ile doldurulmuştur. Aşılama için kullanılan *K. pneumoniae*, üretimden bir gün önce %1 (v/v) oranında pasajlama olacak şekilde 250 mL'lik schott şişesinde 200 mL NB ortamında, 37°C'de, ekspanansiyel fazın sonuna kadar (7 sa) statik bir ortamda, anaerobik koşullarda büyütülmüştür.

Fermentasyona başlamadan önce mikroorganizmaları tutundurma işleminin gerçekleşmesi için reaktöre takılı olan 400'er mL'lik steril NB büyüme ortamına %1 (v/v) oranında aşılama yapılarak reaktör içerisine peristaltik pompa yardımı ile yukarı yönlü akışla sirkülasyonu sağlanmıştır. Besleme şişesine reaktörün çıkışı alınarak tekrar reaktöre beslenmesi sağlanmıştır ('*recycle*'). HAS 6 (debi=0.16 mL/dk) sa olarak belirlenmiştir ve 1 hafta süreyle sirkülasyon devam

ettirilmiştir. Gün aşırı kolon reaktöre taze NB ortamı beslenmiştir ve örnek alımları gerçekleştirilmiştir. Tutundurma çalışması boyunca reaktörden alınan örnekler dökme plaka yöntemiyle canlı sayım, AKM, OD ve pH analizleri yapılmıştır.

Tutundurma çalışmasının ardından pompa ters yönde çalıştırılarak reaktör içerisindeki büyüme ortamı boşaltılmış ve peristaltik pompa tekrar eski yönünde döndürülerek yerine steril fermantasyon ortamı pompalanmıştır. Fermantasyon süresince besleme (atık gliserol ve nutrientler) peristaltik pompa yardımıyla reaktörlere iletilirken, çıkış suyu ayrı bir şişede toplanarak belirli saatlerde örnekleme yapılmıştır ve gliserol, yan ürün, AKM, OD ve pH analizleri yapılmıştır. Her farklı HAS başlangıcında dökme plaka yöntemiyle canlı sayımı gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon 22 gün sürmüştür. Farklı HAS süreleri (16; 12; 8; 6; 4; 2; 1 ve 0.5 sa) denenmiştir. Buna ek olarak cam boncuk dolgululu kolon reaktörde artan giriş gliserol konsantrasyonlarındaki (10 – 110 g/L) üretim değerleri izlenmiştir. Tüm denemeler yukarı akışlı olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4 Soldan sağa sırası ile farklı immobilizasyon malzemeleri ile doldurulmuş cam kolon reaktörler; çelik tel, cam Rashing halkaları, poliüretan köpük (PUF), cam boncuk, pomza taşı, Vukopor® (VUK), seramik halka ve seramik top. Seramik top reaktör üzerinde ısı ceketini gösterilmiştir.

### 3.4.2 Hapsetme (Lentikat®) ile immobilizasyon denemeleri

Hapsetme ('*entrapment*') ile immobilizasyon yönteminde ticari bir jel olan PVA (yaklaşık %30 oranında) içerikli Lentikat® boncukları Lentikat® Printer (Şekil 3.5a) olarak adlandırılan bir aparat ile hazırlanmıştır. Bu aparatın borucukları polimer solüsyonuna batırılarak aşağı yukarı hareket ettirilir ve uç kısmına az miktarda solüsyondan alınır. Alınmış olunan Lentikat solüsyonunun (Lentikat® Liquid) miktarı (borucuk ucundaki damlacık boyutu) iki faktöre bağlıdır: a) borucuğun solüsyonun ne kadar derinine batırıldığına, b) borucuğun sıvıdan ne kadar hızla çekildiğine. Borucuk ne kadar yavaş çekilirse damlacık boyutu da o kadar küçük olacaktır. Eğer 400[100] 'den fazla borucuk aynı anda kullanılırsa, 400[100]'den fazla damlacık aynı anda ve her biri aynı boyut ve şekilde üretilmiş olur. Şırınga ve kanül kullanılarak yapılan yöntemde göre bu yöntemde partikül ve jel polimerin tıkanması gerçekleşmez. Lentikat® Liquid solüsyonunu doldurabilmek için geniş bir petrinin alt kısmı kullanılmalıdır. Petrinin üst kısmı Lentikat®'i yazmak (damgalamak) için kullanılır. Mikroorganizmalar bu solüsyon ile karıştırılırken 1:5 oranı kullanılmıştır (biyokütle (mL): solüsyon (g)). Tüm işlemler tutuklanacak mikroorganizmanın (*K. pneumoniae*) optimum yaşam koşullarında gerçekleştirilerek homojen bir karıştırma sağlanabilmesine çalışılmıştır. Ardından jellerin %75 oranında suyunu kaybetmesi için oda sıcaklığında kurutma sağlanmıştır. Son aşamada boncukları sağlamlaştırmak için toz 'Lentikat® Stabilizer' distile su ile hazırlanarak en az 3 saat karıştırılmıştır. Dayanıklaştırma aşaması bittikten sonra boncuklar besin ortamına aktarılmıştır. *K. pneumoniae* hücrelerinin Lentikat®'e tutundurulabilmesi için gerçekleştirilen bu basamakların ayrıntıları aşağıda anlatılmıştır.

Düzgün bir Lentikat® Printer kurulumu için seviye ve seviye ayarlaması için vidalar kullanılır. Düzgünce yerleştirilmemiş bir Lentikat® Liquid yüzeyi düzgün olmayan bir kurulumla sebep olacağından aynı şekle sahip Lentikat® üretebilmek için düzgün kurulumu gerçekleştirebilmek çok önemlidir. Kalite ayarı üste kadar vidalanır. Alüminyum disk adaptör çıkartıldıktan sonra yükseklik ayarı ile siyah plastik başlık öyle bir konuma getirilmelidir ki yazıcı başlığını aşağı çekmek için yazıcı tutucuyu çekerken borucuklar petrinin yüzeyine değecek şekilde olmalıdır (Şekil 3.5a).

Diğer bir dikkat edilmesi gereken nokta da boş ve dolu petrileri tartmak için 0.01 g'lık bir hassasiyet gerektiğidir. Lentikat®'lerin jelleşmesini arttırabilmek



için bir vantilatör kullanılabilir. Yaklaşık 0.5-1 m uzağa düzgün bir yüzeye yerleştirilmelidir. Oluşturulan hava akımının tüm Lentikat®'lere aynı oranda ulaşabilmesi için dikey olmalıdır.

Printer'in temel işlevini anlatan jelleşme prosesinin detayları aşağıda verilmiştir.

1. Alüminyum disk adaptör çıkartılır.
2. Lentikat Liquid ile doldurulmuş bir petrinin alt kısmı petri tutucuya yerleştirilir.
3. Yazıcı tutucu çekilerek yazıcı başlığı borucuklar birkaç mm sıvıya değene kadar aşağı çekilir.
4. Belirli miktarda sıvı alındıktan sonra borucukları sıvıdan ayırmak için tutucu serbest bırakılır. Borucuklar ne kadar aşağı indirilirse borucuklar o kadar sıvı alır ve damlacıklar o kadar büyük olur.
5. Üst kısmında alüminyum disk adaptör yerleştirilmiş olan petri, petrinin alt kısmı üzerine yerleştirilir. Eğriliği olmayan düzgün bir petri kullanmaya dikkat edilmelidir.
6. Tutucu, borucuklar petriye dokunana kadar çekilir. Polimer petri üzerine çıkana kadar birkaç saniye beklenir, ardından yavaşça tutucu kaldırılır.
7. Aynı özellikte 400 [100] damlacık içeren petri çıkarılır.
8. Tekrar aynı işlemler gerçekleştirilir.

Borucukların sıvıya ne kadar derine indiğini ayarlamak için kalite ayar vidası kullanılabilir. 2-3 mm kadar biz derinliğe ayarlama gerçekleştirilebilir. Vidadı her bir çevirme 1mm'lik bir değişim anlamına gelmektedir. Jelleşmemiş haldeki Lentikat®'lerin bir petrideki ağırlığının bilinmesi ve sıvının yoğunluğunun 1 g/mL olarak alınmasıyla her yazma basamağında yükseklik doğrulaması yapılabilir. Lentikat®'lerin ağırlığını 15 (g)'e bölerek düzeltme değeri elde edilebilir (sola doğru vidanın ne kadar çevrileceği). Örn; Eğer 5 g (2.5 g) polimer solüsyonu yazdırılmışsa vida tam bir döngünün 1/3 (1/6)'ü kadar sola doğru döndürülmelidir ki polimerin içine borucukların daldırılmasında aynı derinlik elde edilsin.

Lentikat Liquid® kullanıma hazır, steril bir şekilde yollanmaktadır. Bir şişe, özel olarak hazırlanmış 80 g (200 g) PVA-solüsyonu içermektedir. Yoğunluğu yaklaşık 1 g/mL'dir. Kompozisyonu 20 mL (50 mL) biyokatalizörü tutuklamak (*entrapment*) için uygundur – 100 mL (250 mL) Lentikat®. Daha az malzeme

tutuklanmak istenirse, örn; 4 mL biyokatalizör süspansiyonu için 16 g Lentikat® Liquid kullanılmalıdır.

Lentikat® Stabilizer distile su ile hazırlanır ve daha sonra kullanılmak üzere saklanır. Kullanılacak Stabilizer miktarı, kullanılacak Lentikats miktarına göre değişir.

90-95°C'deki bir su banyosuna Lentikat® Liquid konularak eritilir. Düzgün karıştırma için manyetik karıştırıcı kullanılır. Şişenin tüm içeriğinin homojen bir sıvı olmasına dikkat edilmelidir. Steril koşulların devamı ve sıvı kaybının olmaması için eritme prosesi sırasında şişenin kapağı açılmamalıdır.

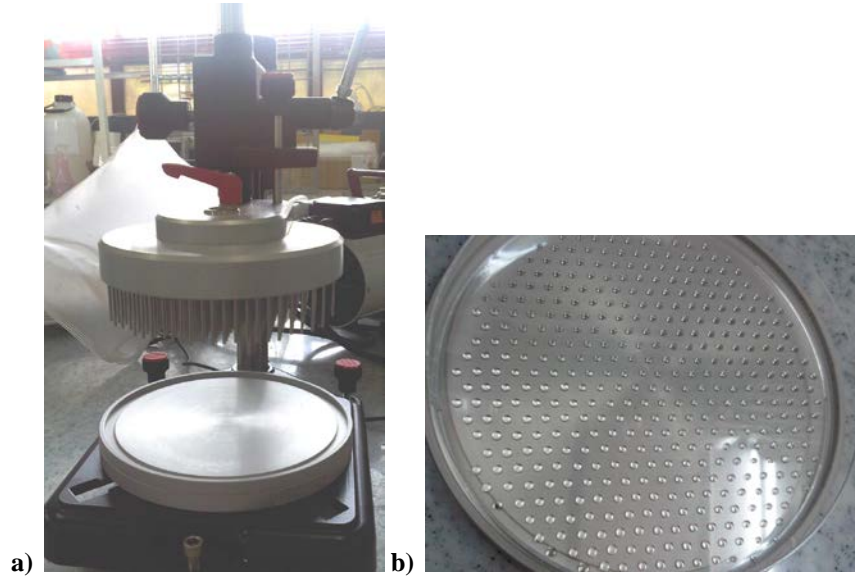
Biyokatalizörün yaşam şartlarına uygun bir sıcaklığa kadar Lentikat® Liquid soğutulabilir. Düşük sıcaklıklarda istenmeyensekilde jelleşmenin gerçekleşeceği unutulmamalıdır. Yine de 25-30°C sıcaklıkta Lentikat Liquid birkaç saatliğine kullanılabilir. Soğuduktan sonra biyokatalizör solüsyonu eklenerek manyetik karıştırıcı kullanılarak homojen bir şekilde dağılımı sağlanmalıdır. Eğer sıvı biyokütle tutuklanmak isteniyorsa (örn; santrifüjlenerek ayrılmış hücreler) bu hücreler %50 oranına kadar seyreltilmelidir. Gerekli hacmi anlatılan şekilde eklemeye dikkat edilmelidir.

Kullanılacak her petri ayrı ayrı işaretlenmelidir, boş ağırlığı ayrı ayrı ölçülerek not edilmelidir. Lentikat® Liquid'i petriye yazdıktan sonra hemen petri tartılmalıdır ve içerisindeki sıvı miktarı belirlenmelidir. Petri tartıldıktan sonra jelleşme için damlacıklar kurutulmalıdır. Kurutma petriyi hava ile temasa bırakarak gerçekleştirilebilir. Suyun uzaklaştırılmasını hızlandırmak için üstten bir fan ya da vantilatör kullanılabilir. Jelleşme aşaması sırasında tutuklanacak biyokatalizör özelliklerine de bağlı olarak maksimum 35°C'yi geçmemelidir.

Eğer petriye damlatılmış olan Lentikat® Liquid'in %75'inin suyu buharlaştırılmışsa jelleşme tamamlanmıştır. Bu yüzden jelleşme aşaması sırasında petrinin sürekli tartılıp ağırlık kontrolü yapılması önerilir. Jelleşme süresi uygulanan işlemin etkinliği ile yakından ilgilidir. %65-70 oranında suyu buharlaştırılmış hidrojellerin biyokatalizörün kararlılığı için uygunluğunun kontrol edilmesiyle farklı nemlilikteki jellerle çalışılabilmektedir. Daha az nem uzaklaştırılması biyokatalizöre daha az stres ortamı oluşturacağından bu kontrol önem teşkil etmektedir.

Jelleşme tamamlandığında Lentikats® Stabilizer Lentikat®'lerin üzerine dökülür ve jel partikülleri çamurlaştırılarak tekrar şişmeleri sağlanır. Böylece Lentikat®'ler orijinal boyutlarına kadar tekrar şişerler. 3-5 dk Lentikat®'lerin Stabilizer solusyonu ile teması ardından, Lentikat®'ler kolayca yüzeyden sıyrılabılır. Ardından hepsi 10 kat fazla Lentikat® Stabilizer içeren bir şişeye aktarılmalı ve düzgünce karıştırılmalıdır. Lentikat®,daha sonraki uygulamalarda mekanik kararlılığın sağlanabilmesi için en az 2 saat boyunca Stabilizer solüsyonu ile karıştırılmalıdır. Kararlılaştırma aşaması bittikten sonra süpernatantın uzaklaştırılması ve yerine biyokatalizörün kullanılmak istendiği ortam kompozisyonu ya da solüsyon konulmalıdır. Köpüklenme oluşursa bir süre karıştırdıktan sonra yine süpernatantın uzaklaştırılması gerekir. Bu etki Lentikat® ve kullanılacak ortam kompozisyonu arasındaki etkileşime bağlıdır.

Kesikli modda 18 gün boyunca mikroorganizmaların ortama adaptasyonu sağlanmıştır. Ardından 24 gün sürekli modda üretim sürdürülmüştür. Farklı HAS süreleri (8; 6; 4; 2; ve 1 sa) denenmiştir. Her HAS için en az 6 (6x8=48 sa) döngü çalışılmıştır.



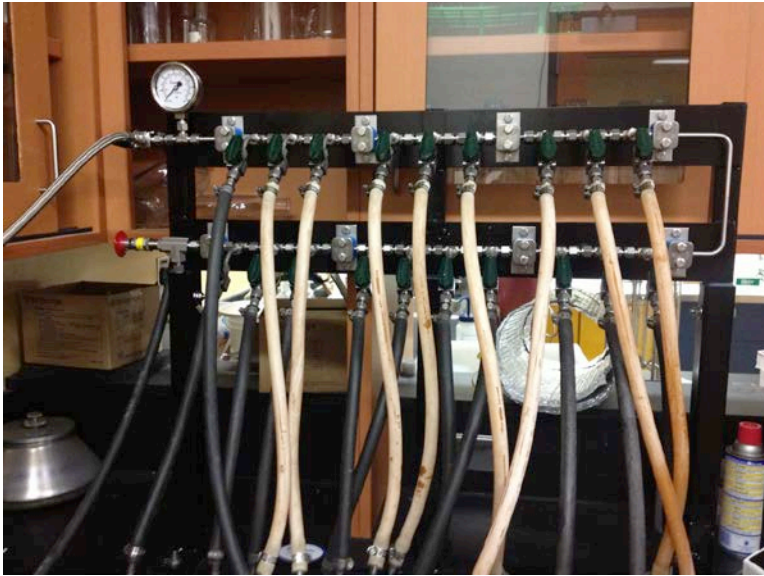
Şekil 3.5 a) Hapsetme denemelerinde kullanılan Lentikat® Printer b) içerisinde *K. pneumoniae* hapsedilmiş Lentikat® boncuklar.

### 3.5 Proteomik Analizler ve Gerçekleştirilen Ön Hazırlıklar

Zorunlu anaerob, gram (+) bir bakteri olan *Clostridium butyricum* 5521 (DSM 10702) kullanılarak gerçekleştirilen proteomiks denemeleri ve buna bağlı ön denemeler TÜBİTAK-BİDEB 2214 desteği ile Manitoba Üniversitesi, Winnipeg, MB, Kanada'da gerçekleştirilmiştir. Tüm denemelerde Bölüm 3.2'de belirtilmiş olan besin ortamı kullanılmıştır. Substrat olarak saf (%99 saflıkta teknik) ve biyodizel atığı gliserol kullanılmıştır. Atık gliserolün içeriğinde %78-86 (w/v) gliserol, %0.02 (w/v) metanol, %7 (w/v) karbonat, %1 (w/v) yağ asitleri ve %6-13 (w/v) su bulunmaktadır.

#### 3.5.1 Besin ortamlarının anaerobikleştirilmesi

*K. pneumoniae*'nin aksine zorunlu anaerob olan *C. butyricum* ile denemeler sırasında ortam tamamen anaerobik tutulmuştur. Besin ortamları hazırlanıp lastik ve metal kapaklar ile kapatıldıktan sonra Şekil 3.6'da görülen aparat kullanılarak anaerobikleştirilmişlerdir. Toplamda her şişe için 4 döngü gerçekleştirilmiştir. Her döngüde 1 dakika N<sub>2</sub> gazı ile gazlama 4 dakika boyunca vakumlama gerçekleştirilmiştir. Ardından şişeler otoklavlanmıştır.



Şekil 3.6 Anaerobikleştirme aparatı.

### 3.5.2 Ön denemeler ve büyüme eğrileri

*C. butyricum* için çeşitli parametrelerin değerlendirilebilmesi ve ön bilgiler edinebilmesi için büyüme eğrileri çıkartılmıştır. Atık ve saf gliserol karşılaştırmaları için 170 mM (15 g/L) giriş gliserol konsantrasyonu kullanılmıştır. Denemeler süresince 30 saat boyunca her 5 saatte bir örnekler alınıp analizler gerçekleştirilmiştir. Deneme sonuçlarından atık ve saf gliserol arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildiğinden daha sonraki büyüme eğrileri saf gliserol kullanılarak çıkartılmıştır (Şekil 4.106-4.108; 4.116-4.118). 4 farklı aşı yüzdesi (% 0.5, 1, 2.5 ve 5) ile çalışmalar yapılmıştır (Şekil 4.107-4.109). Farklı giriş gliserol konsantrasyonlarının (50, 170, 300, 620, 820 ve 930 mM gliserol (5, 15, 30, 60, 75 ve 85 g/L gliserole tekabül etmektedir)) 1,3-PDO üretiminin gözlemlenebilmesi için mikroorganizmalar durağan faza ulaşana kadar her saat başı OD değerleri ölçülmüştür ve deneme sonlandırılırken ürün analizleri yapılmıştır (Şekil 4.112-4.114). Elde edilen sonuçlara göre 170 ve 620 mM (15 ve 60 g/L) giriş gliserol konsantrasyonlarının proteomik analizler için kullanılmasına karar verilmiştir. 620 mM giriş gliserol konsantrasyonu ile gerçekleştirilen büyüme eğrisi de 170 mM giriş gliserol konsantrasyonunda olduğu gibi 30 saat boyunca her 5 saatte bir örnekler alınıp analizler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.115-4.118). Son olarak etanol üretiminin büyümeye etkisinin incelenebilmesi için 170 mM giriş gliserol konsantrasyonunda 3 farklı etanol eklemesi (10, 25 ve 50 mM) ile denemeler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.119-4.121). Tüm denemeler anaerobik ortamda, 37°C'de, çalkalamalı su banyosunda 3 biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.5.3 Proteomik analiz basamakları

#### 3.5.3.1 Protein izolasyonu ve peptidlere ayırma

*C. butyricum* hücrelerinin triptik sindirimi için filtre yardımcılı örnek hazırlama protokolü (Filter Aided Sample Preparation-FASP) kullanılmıştır (Wisniewski et al., 2009). Protein miktarları mikro-BCA (Bicinchoninic Acid Assay, Pierce, Rockford, IL) yöntemi ile analizlenmiştir. Triptik sindirim ürünleri trifluoroasetik asit ile asitleştirilerek ardından RP (reverse phase)-HPLC ile saflaştırılmıştır. TripleTOF 5600 ve QTRAP 5500 (ABSciex) Eksigent nano LC-2D Ultra sistemi ile kullanılmıştır. İki sistemde de aynı özellikte kolonlar kullanılmıştır. Kolon özellikleri şu şekildedir; 300µm×5mm PepMap100 ön kolon (Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL)) ve 5µm Luna C18(2) (Phenomenex,

Torrance, CA) içeren 100µm×200mm analitik kolon. A (su) ve B (asetonitril) mobil fazları iyon düzenleyici olarak %0.1 formik asit içermektedir. Information-dependent acquisition (IDA) denemeleri için triptik parçalanma ürünlerinin ayrımı (TripleTOF 5600) dakikada lineer %0.346 gradient (107 dk da %0.4-37.4% asetonitril), ardından 5 dakikalık yıkama (%90) ve 8 dakika %0.4 asetinitril ile dengeleme ile gerçekleştirilmiştir. Multiple Reaction Monitoring (MRM) denemeleri için triptik parçalanma ürünlerinin ayrımı (QTRAP 5500) dakikada lineer 0.87 gradient (42.5 dk da %0.4-37.4 asetonitril), ardından yıkama ve dengeleme basamakları ile gerçekleştirilmiştir.

Her biri 25 fM/uL özel peptitleri ve ~1 ug/uL parçalanma ürünlerini içeren stok solüsyonları enjeksiyondan önce 10 kez seyreltilerek örnek hazırlanmasında kullanılmıştır. 10 uL (IDA) ve 20 uL (MRM)'lik örnekler sırasıyla IDA ve MRM denemeleri için ~1 ug parçalanma ürünü (25 fM standart peptit) ve ~2 ug parçalanma ürünü (50 fM standart peptit) içermişlerdir.

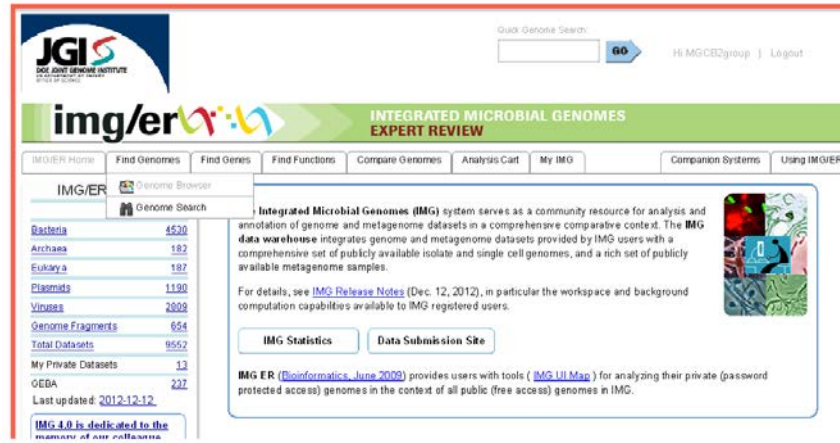
Nano-Spray III (3000 V, 150°C) arayüzü içeren TripleTOF5600 kütle spektrometrisi (MS) (Applied Biosystems, Foster City, CA) standart MS/MS üzerinden alınan data analiz modu için kullanılmıştır. 250 ms ölçümlü MS spektrum (m/z 400-1600) dataları kaydedilmiş ve ardından en yüksek yoğunlukta ana iyonların bulunduğu 20 MS/MS ölçümü (300 sayım/sn sınır değerler, MS/MS için +2 - +4 yük, m/z 400-1250 kütle aralığı, her biri için 100 ms) yapılmıştır. Daha önceden hedeflenmiş ana iyonlar (100 ppm kütle toleransı) 15 sn için tekrarlı MS/MS ölçümlerinden çıkartılmıştır. Analizlenmemiş spektrum dosyaları Mascot Generic File format (MGF) formatına dönüştürülerek peptit/protein tanımlaması için X!tandem tarafından kullanılmıştır. Sırası ile 20 ppm ve 0.1 Da kütle toleransı ana ve parça iyonlar için; Cys için iyodoasetamit ile düzenli modifikasyonlar; değişken modifikasyonlarına izin verilmemesi; beklenen kesim noktası olarak  $\text{Log}(e) < -1$  kullanılması arama parametreleri için kullanılmıştır.

1D ve 2D IDA MS-MS denemelerine ek olarak MRM denemeleri QTRAP 5500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) hibrit üçlü dört kutuplu/iyon tutundurmalı, nano-Spray III iyon kaynağı (2900 V spreyleme voltu ve 150°C iç sıcaklık) içeren MS ile gerçekleştirilmiştir. 60 dakikalık MRM metotları, her geçiş için sabit 10 msn bekleme süresi ve Q1 ve Q3 dört kutuplu sistemler için "birim" çözümlenmesi yapılmıştır. Standart QTRAP 5500 ayarlarına göre her geçiş için çarpışma enerjisi hesaplanmıştır. MRM metodu tasarlanırken Skyline bilgisayar programı kullanılmıştır (MacLean et al., 2010). Buna göre; 33 protein için 280

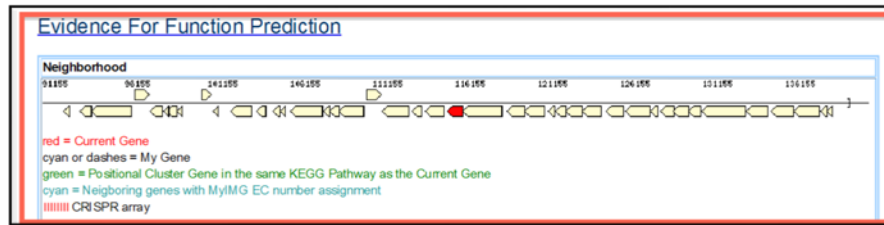
geçiş içeren bir metot kullanılmıştır (Her protein için 2-3 peptit, her peptit için 3-4 geçiş). Yine Skyline kullanılarak peptitlerin alıkonma süreli belirlenmiştir.

### 3.5.3.2 Proteomik analizler sırasında yararlanılan kaynaklar

Integrated Microbial Genomes and Metagenomes (IMG) web sitesi (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8) bir çok mikroorganizmanın olduğu gibi *C. butyricum*'un da genlerinin genom sekansını içerdiğinden metabolik yolaktaki genlerin incelenmesi sırasında kullanılmıştır.



Şekil 3.7 IMG web sitesinden bir görünüm.



Şekil 3.8 Örnek bir gösterim olarak gliserol dehidrataz enziminin genomu ve komşu genomları.

*C. butyricum*'un çeşitli substratlardan çeşitli ürünlere giden tüm metabolik yollarını incelemek için Manitoba Üniversitesi Biyoinformatik Bölümü tarafından geliştirilen metabolik yolak araçları kullanılmıştır (<http://flamingo.cs.umanitoba.ca:1555/>). Buna ek olarak proteinlerin görece miktar tayini için Manitoba Üniversitesi Fizik Bölümü tarafından geliştirilen 'lobe' bilgisayar dili kullanılmıştır.

### 3.6 Ölçüm Yöntemleri

#### 3.6.1 Mikroorganizma sayımı

Hücre kütlelerinin tayini için iki adet yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntem hücre süspansiyonunun bulanıklığını ölçmedir (türbidite). Süspansiyonun optik yoğunluğu 600 ve 620 nm dalga boylarında ölçülmüştür. 1-2 mL örnek ayrılıp spektrofotometre ile distile suya karşı okumaları yapılmıştır.

İkinci yöntem ise dökme plaka yöntemi ile canlı sayımıdır. Mikroorganizmaların bir zaman aralığındaki canlılığının sayımı için dökme plaka yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde öncelikle sıvı kültürdeki mikroorganizmalar otomatik pipet yardımıyla aseptik koşullarda 1 mL alınarak 9 mL steril distile suya eklenmiştir. Örnek yoğunluğuna bağlı olarak  $10^{-1}$  ile  $10^{-10}$  arasında seyreltmeler yapılarak, son 3 seyreltmeden 1'er mL örnek petri kaplarına aktarılmıştır. Petri kaplarına  $40 - 45^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulmuş 15 mL sıvı agar eklenerek karıştırılmıştır. Agar ve kültür karışımı donduktan sonra  $37^{\circ}\text{C}$ 'de etüve kaldırılmış ve inkübasyon için 24 - 48 saat beklenilmiştir. İnkübasyon sonrası koloniler sayılmıştır. 30 - 300 koloni arasındaki değerler kabul edilmiştir. Bu değerden az ya da çok koloni içeren petri kapları değerlendirmeye alınmamıştır. Bununla birlikte bu değerden çok olan petri kapları sayılamayacak kadar çok (SKÇ) olarak adlandırılmıştır. Sayım yapılırken koloni birimi olarak KOB (koloni oluşturan birim-colony forming unit) kullanılmıştır.

#### 3.6.2 Askıda katı madde (AKM) tayini

AKM, filtre edilemeyen katı maddeler olarak ifade edilir. Protokoldeki yol takip edilerek askıda katı madde konsantrasyonu aşağıda verilen formüle göre mg/L cinsinden hesaplanmıştır. Membran filtreler ( $0.45-0.22\ \mu\text{m}$ )  $105^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat boyunca kurutulmuştur. Filtre kağıtları sıcaklık sabitlenerek desikatörde soğutulmuştur. Filtre kağıtları tartılmıştır. Nuche erlenine pompa bağlanmıştır. Filtre kağıdı filtrasyon aparatına yerleştirilerek cam düzenek kurulmuş ve filtre kağıdı saf su ile yıkanmıştır. Numune filtre edilmiştir. Filtre kağıdı  $105^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat kurutulmuştur. Filtre kağıtları sıcaklık sabitlenerek desikatörde soğutulmuştur. Filtre kağıtları tartılarak AKM hesabı aşağıdaki formül ile yapılmıştır.



Hesaplama:

Askıda katı madde (AKM) (mg/L) = (A-B) x 1000 /örnek hacmi (mL)

A: filtre ağırlığı (mg) + bakiye ağırlığı (mg), B: Filtre ağırlığı (mg).

**3.6.3 1,3-Propandiol, gliserol ve uçucu yağ asitleri tayini**

Fermantasyon ortamında üretimde kullanılacak olan mikroorganizma türüne göre beklediğimiz 8 adet farklı molekül bulunmaktadır. Mikroorganizmaların üretmesini planladığımız ürün 1,3-PDO, yan ürünler olan asetik asit (asetat), laktik asit (laktat), süksinik asit (süksinat), bütirik asit (bütirat), etanol, bütanol ve 2,3-bütanediol (2,3-BD) ve substrat olarak kullanılan gliserol moleküllerinin konsantrasyonları Refraktif İndeks Dedektörlü (RID) bir Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi cihazı (HPLC) ile analiz edilmiştir.

Analiz için HPLC’de kullanılan kolon Phenomenex marka Rezex RHM Monosaccaride (H+) 300 x 7.8 mm iyon değiştirici türde bir kolondur, yürütücü solvent 5 mM’lık H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi, akış hızı 0.8 mL/dk, kolon sıcaklığı 65°C, detektör sıcaklığı 45°C ve enjeksiyon hacmi 15 µL’dir. Literatürdeki analizler için verilen metotlara göre kolonda yeterli ayırımın sağlanabilmesi için analiz öncesinde örnekler ultra saf su ile 1/100 oranında seyreltilmiştir. Örnekler 10000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Ardından süpernatant şırıngayla çekilerek 0.22 µm’lik filtreden süzölmüş ependorflara aktararak seyreltilmişlerdir. Ependorfta arta kalan örnekler +4°C’de saklanmıştır. Ekte HPLC ölçümlerine ait standart kalibrasyon eğrileri ve pikleri verilmektedir.

**3.6.4 H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> ve pH tayini**

*C. butyricum* kullanılarak gerçekleştirilen denemeler sırasında açığa çıkan gaz fazındaki yan ürünler olan H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>’in tayini gaz kromatografisi (GC) (Agilent 6890 Series, ABD) cihazı, dolgulu kolon (Hayesep D 80/100 dolgulu kolon ya da 60/80 Carboxen-1000, Supelco, PA) ve ısı geçirgen detektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz 20 mL/dk akışta argon, basınç 22 psi, fırın sıcaklığı 35°C, enjeksiyon sıcaklığı 120°C, detektör sıcaklığı(TCD) 40°C, filament Sıcaklığı 40°C, Caralılık 0.05, attenuation 1 olacak şekildedir. Referans gaz olarak %40 CH<sub>4</sub>, %30 CO<sub>2</sub>, %30 H<sub>2</sub> kullanılmıştır. Her reaktörün toplam basıncı önce gaz ölçer ile ölçülerek ardından gas-tight şırınga ile

reaktörden 25 µL gaz alınarak cihaza enjekte edilmiştir. Toplam gaz basıncı, reaktörlerdeki basınç, pH ve gaz çözünürlüğü göz önünde bulundurulmuştur (Sander, 1999). CO<sub>2</sub> miktarının belirlenebilmesi için bikarbonat denkliği kullanılmıştır (Darret and Grisham, 1995). *K. pneumoanielle* gerçekleştirilen ilk denemeler sırasında H<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> gazlarının tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ileriki denemelerde ölçümlerin gerekli olmadığına karar verilmiş ve gaz ürünleri analizlenmemiştir. Tüm denemelerde pH ölçümleri dijital bir pH metre (Sartorius) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekte GC ölçümlerine ait standart kalibrasyon eğrileri ve pikleri verilmektedir.

### **3.6.5 Taramalı Elektron Mikroskop ('Scanning Electron Microscopy' SEM) Görüntü Analizleri**

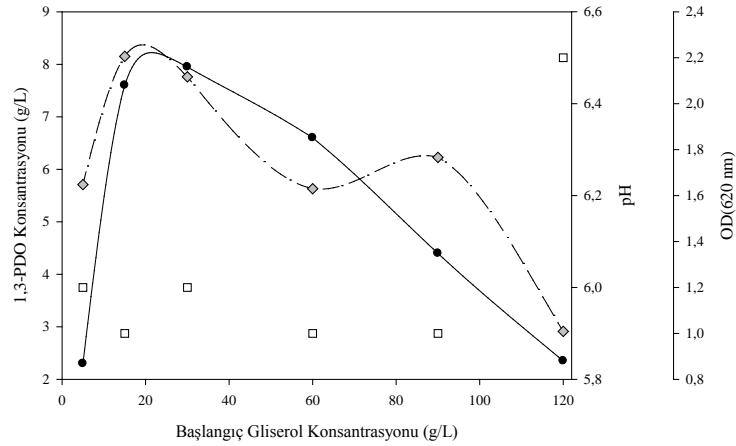
İmmobilizasyonun başarılı olup olmadığını görebilmek için elektron mikroskopu analizleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen denemeler sonucunda malzeme örnekleri toplanarak mikroskoptan görüntüleri alınmıştır. SEM analizleri İYTE (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü) TÜBİTAK-MAM laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme için Philips marka XL-30S FEG model SEM cihazı kullanılmıştır.

## 4. DENEY BULGULARI

### 4.1 Askıda Kùltürler ile Gerçekleştirilen Deneme Sonuçları

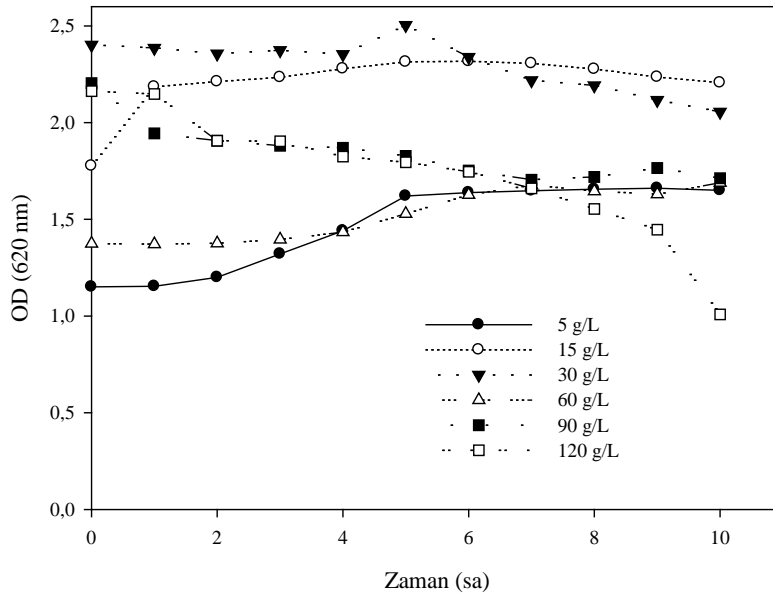
#### 4.1.1 Kesikli üretim denemesi sonuçları

*K. pneumoniae* kullanılarak askıda kùltürlerde gerçekleştirilen denemede 5 - 120 g/L arasında değişen gliserol konsantrasyonları denenerek mikroorganizmanın ürün üretim değerleri gözlemlenmiştir. Askıda kùltürler ile gerçekleştirilen kesikli denemeler Schott şişelerde, başlangıç atık gliserol konsantrasyonu 5, 15, 30, 60, 90 ve 120 g/L olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda mikroorganizmanın farklı konsantrasyonlar için büyüme eğrileri de elde edilmiştir. şekil 4.1 ve 4.7 arasında denemelerden elde edilen sonuçlar görölmektedir.



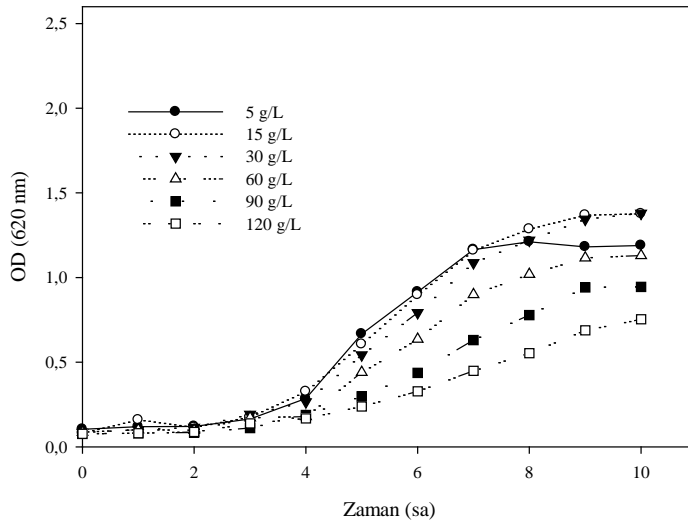
şekil 4.1 Artan atık gliserol konsantrasyonuna karşılı 1,3-PDO konsantrasyonları (•), OD (♦) ve pH değişimleri (□), kesikli deneme.

şekil 4.1'de göröldüğü gibi giriş gliserol konsantrasyonu arttıkça büyüme değerlerinde oldukça fazla düşüş olmuştur. Maksimum 1,3-PDO konsantrasyonuna 15 g/L'de ulaşılmıştır. Ardından kademeli olarak giriş gliserol konsantrasyonu arttıkça 1,3-PDO konsantrasyonu azalmıştır. pH değerleri tüm üretimler süresince 5.8 ve 6.0 arasında değişirken, en yüksek giriş gliserol konsantrasyonunda 6.5 civarındadır bu da mikroorganizmanın az miktarda ürettiği organik asitlerden kaynaklanmaktadır.

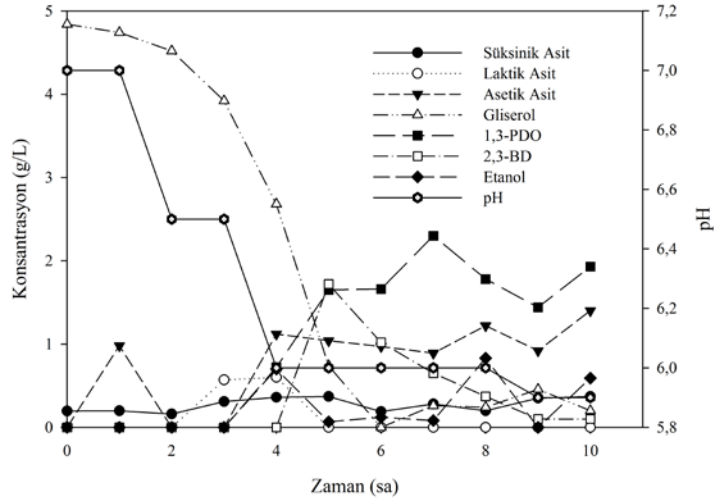


Şekil 4.2 Artan atık gliserol konsantrasyonlarındaki OD değişimleri, kesikli deneme.

Denemeler atık gliserol ile gerçekleştirildiğinden 0.saat OD değerleri yaklaşık 1.0 olarak ölçülmüştür. Ancak atık gliserolün heterojen yapısı düzgün eğriler elde edilememesine sebep olmuştur. Şekil 4.3'te ise saf gliserol ile gerçekleştirilen denemenin büyüme sonuçlarına baktığımızda düzgün ve anlamlı büyüme eğrileri elde edildiği görülebilmektedir. Bulanıklık göz önünde bulundurulduğunda en fazla büyümenin 15 g/L ( $\mu=0.50$ ), en az büyümenin de 120 g/L'de ( $\mu=0.22$ ) olduğu görülmektedir.



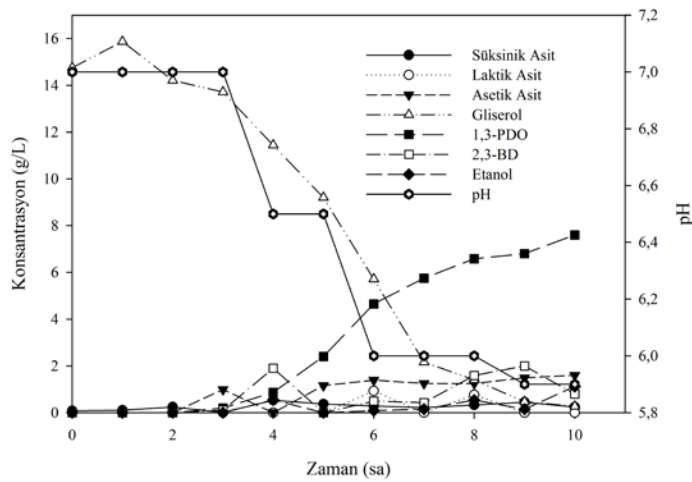
Şekil 4.3 Artan saf gliserol konsantrasyonlarındaki OD değişimleri, kesikli deneme.



Şekil 4.4 *K. pneumoniae* ile 5 g/L giriş atık gliserol konsantrasyonunda oluşan yan ürünler ve pH değişimleri, kesikli deneme.

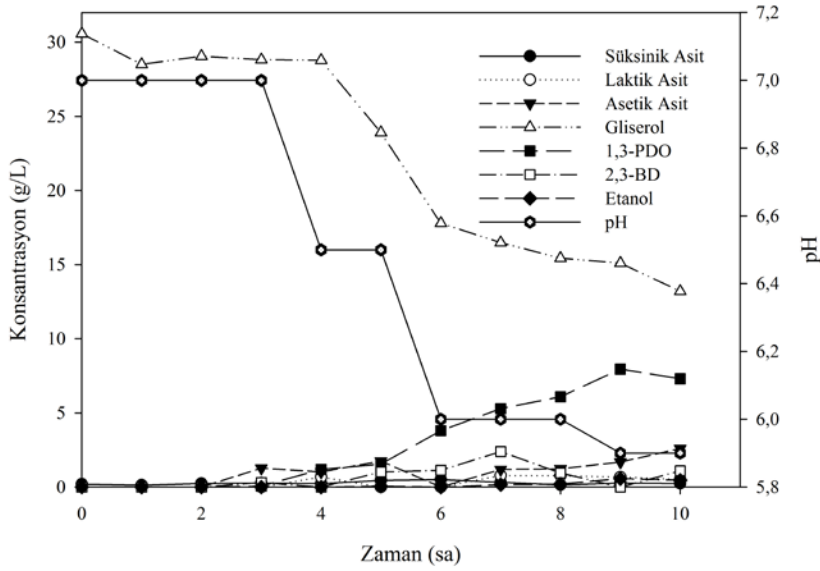
Şekil 4.4'te görüldüğü gibi üretim süresince tüm gliserol tüketilmiştir. En yüksek 1,3-PDO konsantrasyonu 7. saatte 2.3 g/L olarak gözlemlenmiştir. Gliserol tamamen tüketildiğinden verim değeri 0.56 mol/mol'dür. Tüm yan ürünler farklı miktarlarda üretilirken en çok asetik asit üretilmiştir (1.4 g/L).

Şekil 4.5'te 15 g/L gliserol konsantrasyonu sonuçlarında görüldüğü gibi üretim süresince tüm gliserol tüketilmiştir. En yüksek 1,3-PDO konsantrasyonu 10. saatte 7.6 g/L olarak gözlemlenmiştir. Burada da gliserol tamamen tüketildiğinden verim değeri 0.61 mol/mol'dür. Tüm yan ürünler farklı miktarlarda üretilirken en çok 2,3-BD üretilmiştir (2 g/L).

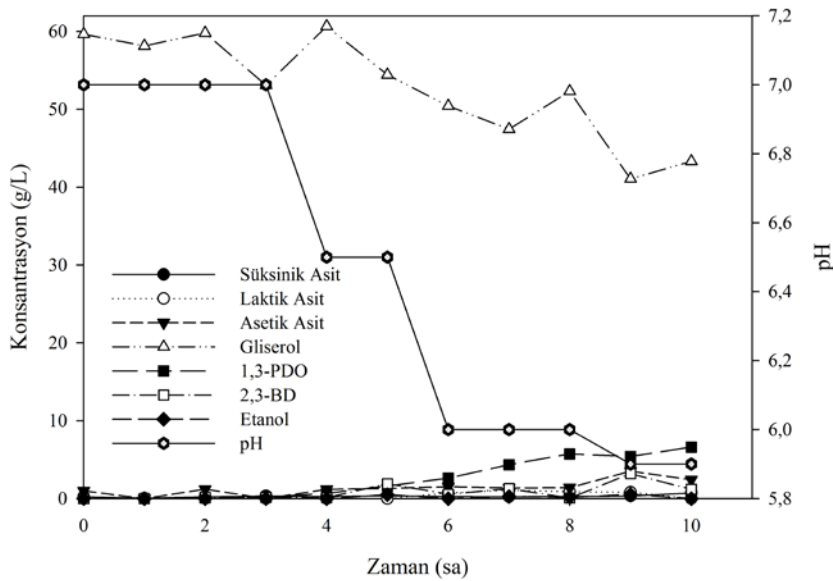


Şekil 4.5 *K. pneumoniae* ile 15 g/L giriş atık gliserol konsantrasyonunda oluşan yan ürünler ve pH değişimleri, kesikli deneme.

Şekil 4.6'da 30 g/L gliserol konsantrasyonu sonuçlarında görüldüğü gibi üretim süresince 17 g/L gliserol tüketilmiştir. En yüksek 1,3-PDO konsantrasyonu 9. saatte 7.9 g/L olarak gözlemlenmiştir. Tüketilen gliserol üzerinden verim 0.57 mol/mol iken giriş gliserol konsantrasyonu üzerinden verim 0.32 mol/mol'dür. Tüm yan ürünler farklı miktarlarda üretilirken en çok asetik asit üretilmiştir (2.6 g/L).

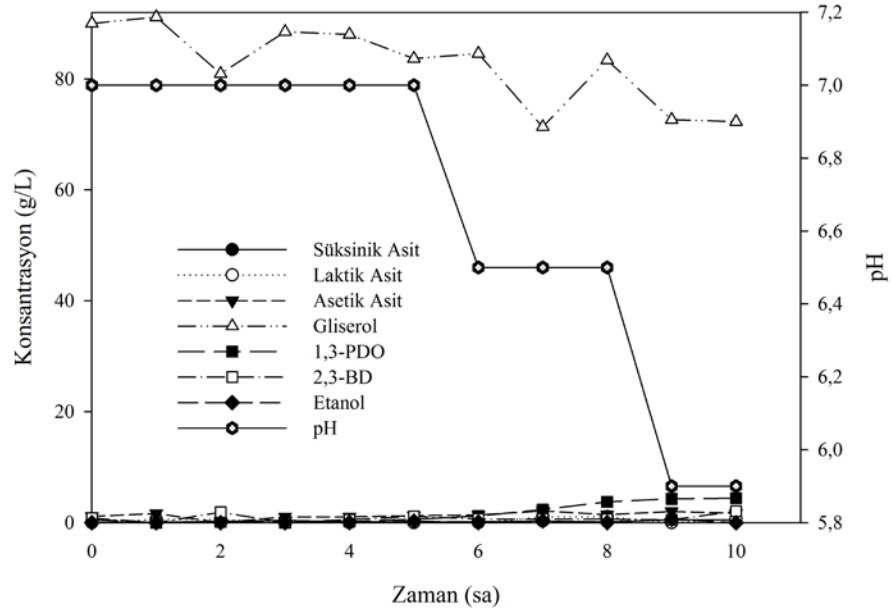


Şekil 4.6 *K. pneumoniae* ile 30 g/L giriş atık gliserol konsantrasyonunda oluşan yan ürünler ve pH değişimleri, kesikli deneme.



Şekil 4.7 *K. pneumoniae* ile 60 g/L giriş atık gliserol konsantrasyonunda oluşan yan ürünler ve pH değişimleri, kesikli deneme.

Şekil 4.7’de 60 g/L gliserol konsantrasyonu sonuçlarında görüldüğü gibi üretim süresince 20 g/L gliserol tüketilmiştir. En yüksek 1,3-PDO konsantrasyonu 10.saatte 6.6 g/L olarak gözlemlenmiştir. Tüketilen gliserol üzerinden verim 0.40 mol/mol iken giriş gliserol konsantrasyonu üzerinden verim 0.13 mol/mol’dür. En fazla miktarda üretilen yan ürün asetik asit olmuştur (3.5 g/L).



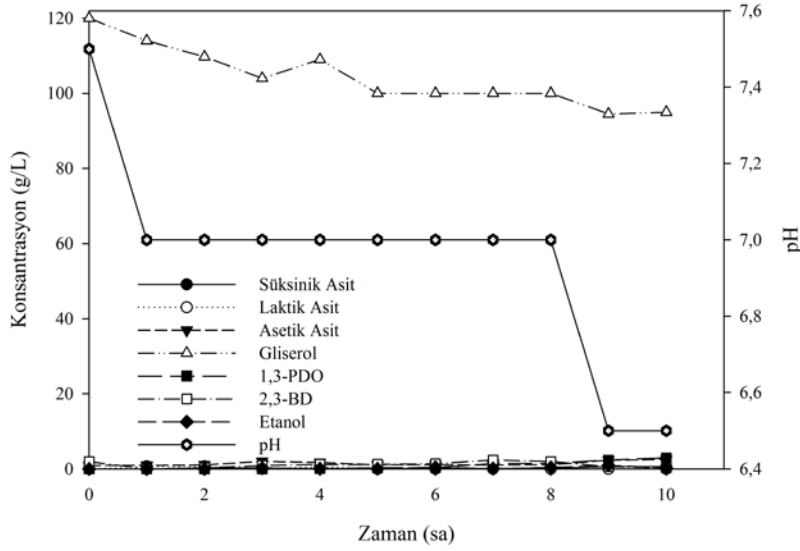
Şekil 4.8 *K. pneumoniae* ile 90 g/L giriş atık gliserol konsantrasyonunda oluşan yan ürünler ve pH değişimleri, kesikli deneme.

Şekil 4.8’de 90 g/L gliserol konsantrasyonu sonuçlarında görüldüğü gibi üretim süresince 20 g/L gliserol tüketilmiştir. En yüksek 1,3-PDO konsantrasyonu 10.saatte 4.4 g/L olarak gözlemlenmiştir. Tüketilen gliserol üzerinden verim 0.06 mol/mol iken giriş gliserol konsantrasyonu üzerinden verim 0.27 mol/mol’dür. Bu üretimde de en yüksek miktarda asetik asit üretilmiştir (2.1 g/L).

Şekil 4.9’da 120 g/L gliserol konsantrasyonu sonuçlarında görüldüğü gibi üretim süresince 25 g/L gliserol tüketilmiştir. En yüksek 1,3-PDO konsantrasyonu 90 g/L’de de olduğu gibi 10.saatte 6.6 g/L olarak gözlemlenmiştir. Tüketilen gliserol üzerinden verim 0.11 mol/mol iken giriş gliserol konsantrasyonu üzerinden verim oldukça düşük bir değer 0.02 mol/mol’dür. Neredeyse hiç ürün üretilmemiştir. İlginç olarak 2.5 g/L asetik asit üretilmiştir.

Tüm denemelerde görülmüştür ki giriş gliserol konsantrasyonu arttıkça hem gliserol tüketimleri azalmıştır hem de daha uzun sürede gliserol tüketilerek diğer

ürünlere dönüştürülmüştür. Aynı zamanda 1,3-PDO konsantrasyonlarında düşüş yaşanırken yan ürün konsantrasyonlarında artış gözlemlenmiştir.

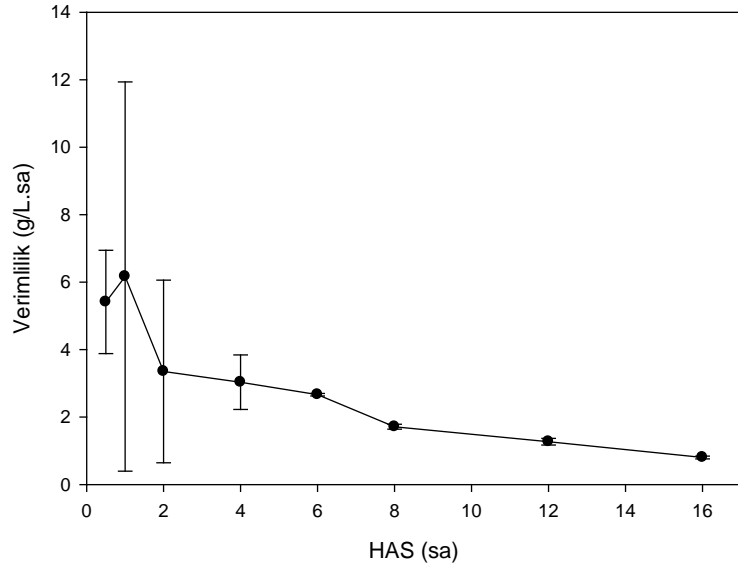


Şekil 4.9 *K. pneumoniae* ile 120 g/L giriş atık gliserol konsantrasyonunda oluşan yan ürünler ve pH değişimleri, kesikli deneme.

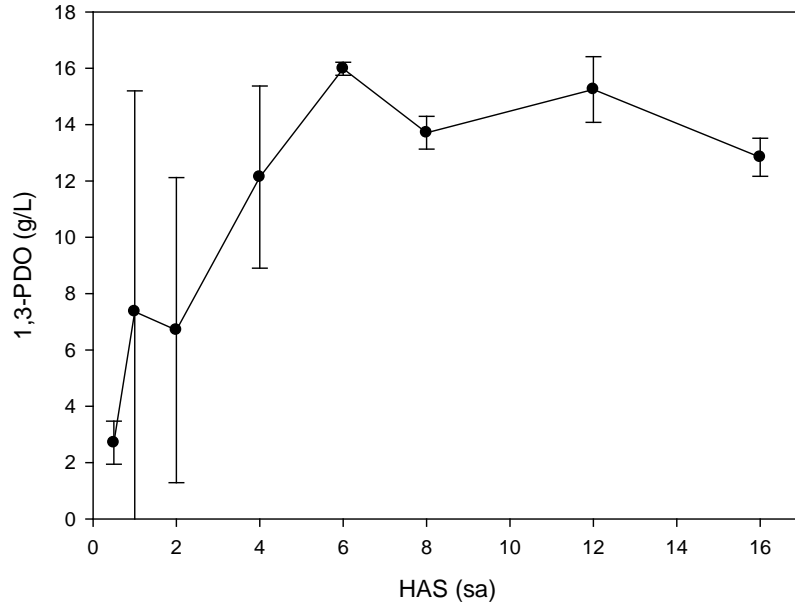
#### 4.1.2 Sürekli üretim denemeleri sonuçları (değişken HAS koşulları altında sürekli 1,3-PDO üretim deneme sonuçları)

*K. pneumoniae* kullanılarak kısalan HAS ile gerçekleştirilen fermentör denemesinde ilk HAS olarak 16 sa denenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçların grafikleri aşağıdaki gibidir. Şekil 4.10'da farklı HAS'larda 1,3-PDO verimlilik değişimleri görülmektedir. Çalışmada sırasıyla 16, 12, 8, 6, 4, 2, 1 ve 0.5 saat olmak üzere HAS değerleri düşürülerek deneme gerçekleştirilmiştir. En yüksek verimlilik değerine 1 saatlik alıkonma süresinde ortalama 7.4 g/L.sa 1,3-PDO konsantrasyonu ile ulaşılmıştır. 16 saatlik en uzun alıkonma süresinden elde edilen verimlilik değeri diğer hidrolik alıkonma sürelerine göre en düşük değerde (0.8 g/L.sa) olduğu görülmektedir.





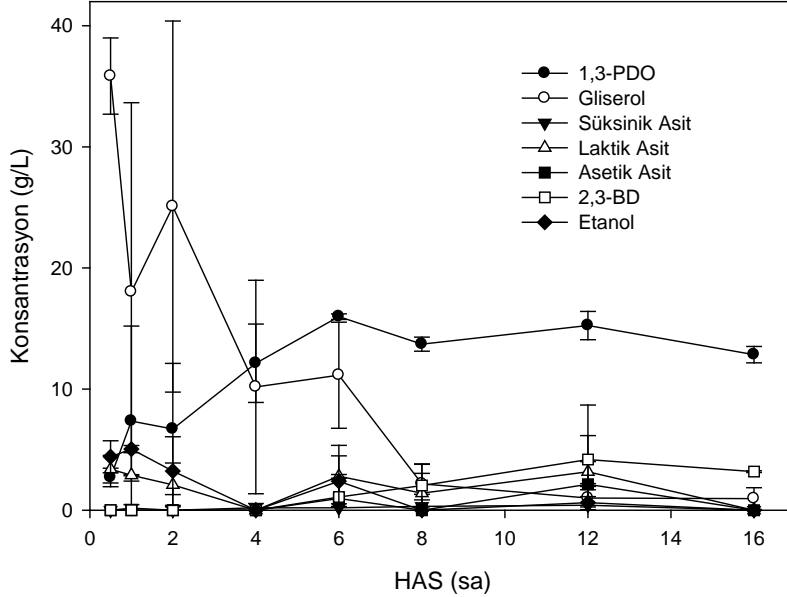
Şekil 4.10 *K. pneumoniae* ile atık gliserol kullanılarak farklı HAS değerlerinde elde edilmiş 1,3-PDO verimlilikleri (g/L.sa).



Şekil 4.11 *K. pneumoniae* ile atık gliserol kullanılarak farklı HAS değerlerinde elde edilmiş 1,3-PDO konsantrasyonları (g/L).

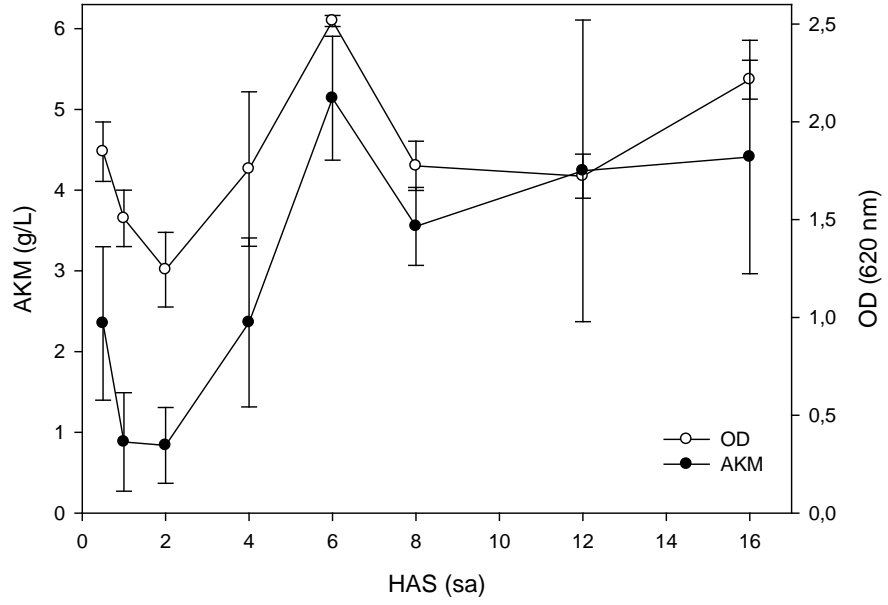
Şekil 4.11'deki grafikte farklı HAS ile yapılan denemelerde elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının ortalaması görülmektedir. En yüksek değere 6 saatlik alıkonma süresinde ortalama 16 g/L 1,3-PDO konsantrasyonu ile ulaşmıştır.

Alıkonma sürelerindeki değişim ile 1,3-PDO konsantrasyonlarında HAS=6 saate kadar bir azalma olmamıştır, HAS 4 saatten itibaren ise belirgin bir düşüş görülmektedir. En düşük konsantrasyona da 4.5 g/L 1,3-PDO ile en düşük HAS'ta ulaşılmıştır.



Şekil 4.12 *K. pneumoniae* ile atık gliserol kullanılarak farklı HAS değerlerinde elde edilmiş ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

Şekil 4.12'deki grafikten yaklaşık 40g/L olan gliserol giriş konsantrasyonunda en çok ortalama 35 g/L ye kadar tüketilemeyen gliserol konsantrasyonu olduğu 0.5 saatlik alıkonma süresinde görülmüştür. 8 saat ile 16 saatlik HAS arasındaki dönemde gliserolün %88-98 oranında tüketildiği görülmektedir. Ortamdaki gliserolün üretim boyunca tamamen tüketilememiştir. Bu durumun, öngörülen yan ürünlerin üretilmesi ardından kısalan alıkonma sürelerinde yeniden tüketilmesi ile karbon kaynağı olan gliserolün tamamının 1,3-PDO üretimi ve mikroorganizma büyümesi için kullanıldığından gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir. Kısalan alıkonma süreleriyle oluşmuş olan yan ürünlerin bir miktar tüketildikleri görülmektedir. Süksinik asit en çok 0.18 g/L (HAS=1 sa), laktik asit en çok 2.97 g/L (HAS=16 sa), asetik asit en çok 1.11 g/L (HAS=6 sa) ve 2,3-BD en çok 3.15 g/L (HAS=0.5 sa) miktarlarında üretilmişlerdir.



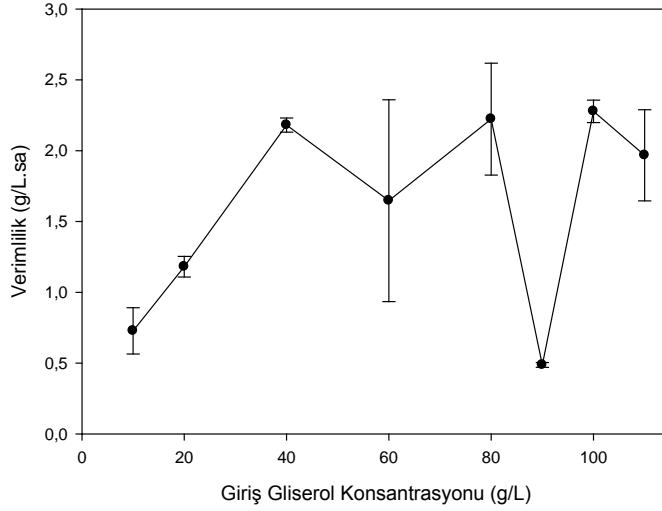
Şekil 4.13 *K. pneumoniae* ile atık gliserol kullanılarak farklı HAS değerlerinde elde edilen AKM (g/L) ve OD sonuçlarının karşılaştırılması.

Şekil 4.13'teki grafikte üretimle birlikte OD değerlerinin ve AKM değerlerini paralel olduğu görülmektedir. Optimum mikroorganizma büyümesi HAS 6 saatte görülmektedir. HAS 12 ve 16 saatlerde stabil büyüme değerleri gözlenmektedir. En yüksek ve en düşük HAS süreleri (fermantasyon başlangıç ve bitişi) arasındaki düşüş fermentasyon sonunda mikroorganizmaların ortamdan yıkandığını ('washout') göstermektedir.

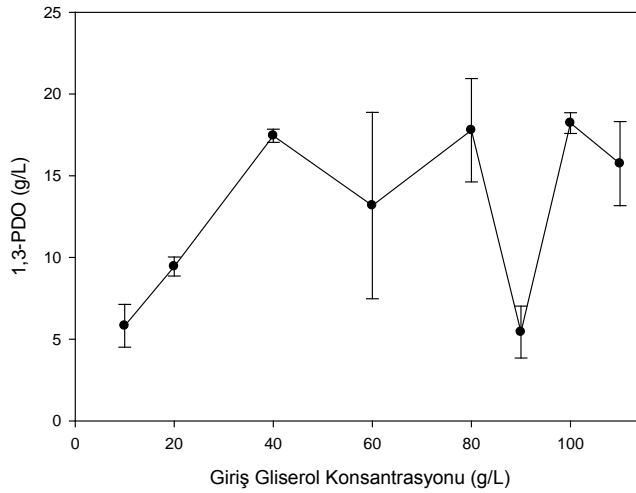
#### 4.1.3 Sürekli üretim denemesi sonuçları (değişken giriş gliserol konsantrasyonları altında sürekli 1,3-PDO üretim deneme sonuçları)

*K. pneumoniae* kullanılarak farklı giriş gliserol konsantrasyonları ile gerçekleştirilen denemelerde sırası ile 10, 20, 40, 60, 80, 90, 100 ve 110 g/L giriş atık gliserol konsantrasyonları kullanılmıştır. İlk olarak 10 g/L denemiş ve ardından kademeli olarak konsantrasyon artırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçların grafikleri aşağıdaki gibidir. Şekil4.14'te farklı gliserol konsantrasyonlarında elde edilen 1,3-PDO verimlilik değişimleri görülmektedir. En yüksek verimlilik değerine 100 g/L giriş gliserol konsantrasyonunda ortalama 2.2 g/L.sa değeri ile ulaşılmıştır. 10 g/L olan en düşük giriş gliserol

konsantrasyonunda elde edilen verimlilik değerinin diğer konsantrasyonlara göre en düşük değerde (0.7 g/L.sa) olduğu görülmektedir.



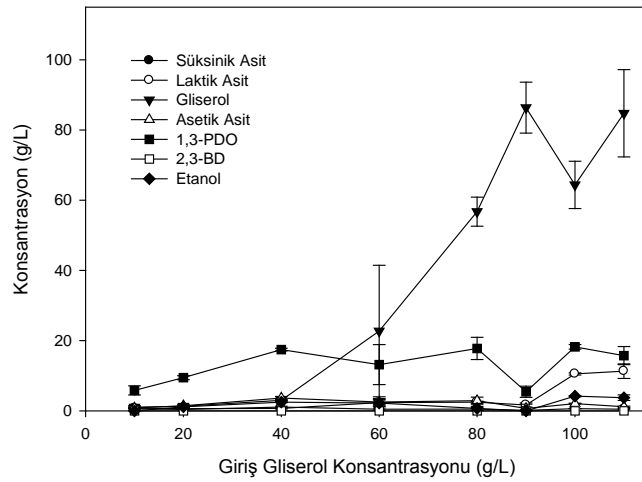
Şekil 4.14 *K. pneumoniae* ile farklı giriş atık gliserol konsantrasyonlarında elde edilen 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması, HAS=8 sa.



Şekil 4.15 *K. pneumoniae* ile farklı giriş atık gliserol konsantrasyonlarında elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının karşılaştırılması, HAS=8 sa.

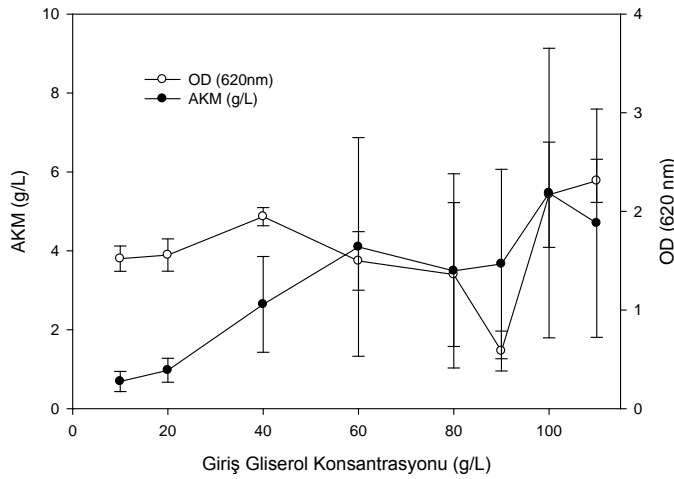
Şekil 4.15'teki grafikte farklı giriş gliserol konsantrasyonları ile yapılan demelerde elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının ortalaması görülmektedir. Mikroorganizma en yüksek 1,3-PDO konsantrasyonuna 100 g/L giriş gliserol konsantrasyonunda ortalama 18.2 g/L'ye ulaşmıştır. Giriş gliserol

konsantrasyonundaki artış ile 40 g/L'ye kadar 1,3-PDO konsantrasyonlarında bir azalma olmamıştır, 60 g/L'den itibaren eğilimlerde değişiklik gözlemlenirken 90 g/L'de belirgin bir düşüş görülmektedir. Bu durum bir deney hatasından kaynaklanmış olabilirken, bu konsantrasyondan sonra mikroorganizmalar ortama tekrar adapte olup en yüksek konsantrasyonda ürün üretebildikleri görülmektedir. Ardından üretimlerde tekrar bir düşüş gözlemlenmiştir.



Şekil 4.16 *K. pneumoniae* ile farklı giriş atık gliserol konsantrasyonlarında elde edilen ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının karşılaştırılması, HAS=8 sa.

Şekil 4.16'daki grafikte tüketilmeden kalan gliserol konsantrasyonları görülmektedir. 40 g/L konsantrasyonda dahil olmak üzere gliserolün tamamına yakını tüketilmiştir. Ancak ardından tüketimin önce %62'de olduğu hemen ardından ise %8'e kadar düştüğü görülmektedir. Yan ürünlere bakıldığında 2,3-BD'ün hiç üretilmediği laktik asitin ise artan giriş gliserol konsantrasyonları ile 11.3 g/L'ye kadar üretildiği görülmektedir. Asetik asit en çok 3.7 g/L üretilirken etanol değerleri 4.2 g/L'ye kadar çıkmıştır. Yan ürün üretimleri giriş gliserol konsantrasyonu arttırıldıkça yükselmiştir.



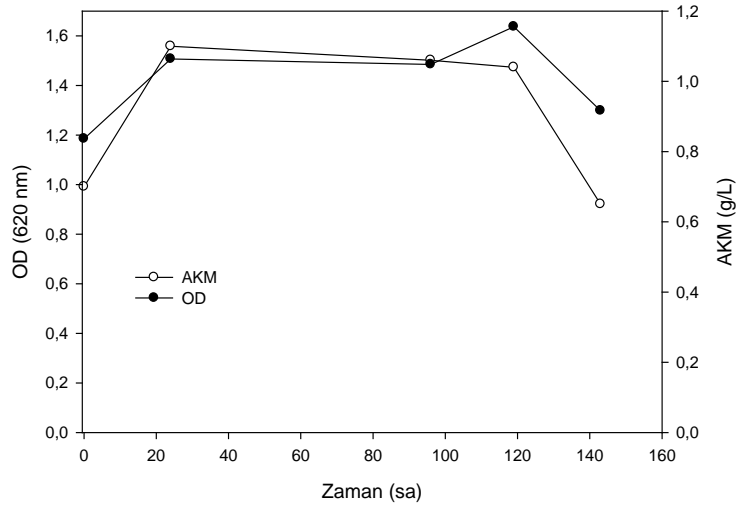
Şekil 4.17 *K. pneumoniae* ile farklı giriş atık gliserol konsantrasyonlarında elde edilen AKM (g/L) ve OD değerlerinin karşılaştırılması HAS=8 sa.

Şekil 4.17'deki grafikte üretimle birlikte OD AKM değerlerinin hemen hemen paralel olduğu görülmektedir. Atık gliserolün heterojen yapısı, özellikle yüksek giriş konsantrasyonlarındaki ölçümlerde oldukça yüksek standart sapmalara sebep olmuştur. Ayrıca bu ölçümler AKM'nin direkt biyokütle miktarını belirlemesine de engel olmaktadır. En yüksek AKM değerine 100 g/L gliserol konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Ancak giriş gliserol konsantrasyonunun artışıyla içeriğindeki safsızlıkların da artacağı bilindiğinden bu değer biyokütle miktarı olarak değerlendirilememektedir. Hemen öncesindeki 90 g/L konsantrasyonda ise ürün üretim değerlerine de paralel olarak muhtemelen mikroorganizma büyümesinde hızlı bir düşüş önerilmektedir. Bu beklenmedik ve inişli çıkışlı değerler mikroorganizmanın ortama adapte olduğunu ancak yine de yüksek karbon yüklemelerine yeterince dayanıklı olmadığını göstermektedir.

## 4.2 İmmobilize Kültürler ile Gerçekleştirilen Deneme Sonuçları

### 4.2.1 Dolgu malzemesiz kolon biyoreaktör denemesi sonuçları

Şekil 4.18’de dolgu malzemesiz biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve çıkış AKM değişimleri gösterilmektedir.



Şekil 4.18 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi.

Tutundurma çalışmasının ilk 24 saati içerisinde büyümeye bağlı olarak hem OD hem de AKM buna bağlı olarak biyokütle değerlerinde bir artış olduğu görülmektedir. İki değer de çalışma süresince birbirine paralel gitmektedir, ancak 60. saatten sonra AKM düşüşe geçerken OD değerlerinde bir artış gözlenmektedir. 95. saat sonunda ise hem OD hem de AKM değerlerinde ciddi bir düşüş olduğu gözlemlenmektedir. Tutundurma çalışması sonucunda değerlerin düşüşüne bağlı olarak reaktörün askıda çalıştığı anlaşılmaktadır. Mikroorganizma miktarındaki düşüş askıda kalanlar dışında reaktör camlarına da yapışmış bir miktar mikroorganizma bulunduğunu göstermektedir. Bunun dışında, canlı sayım değerlerine bakıldığında ise tutundurma çalışmasının ilk aşamasında mikroorganizmaların ortama adaptasyon sağladığını, ardından mikroorganizma sayısında bir artış olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1). Bu değerlerdeki artış mikroorganizmaların ortama adapte olarak sayılarını yaklaşık 10 kat kadar arttırdığını ve fermantasyon ortamına geçiş için yeterli süre geçtiğini

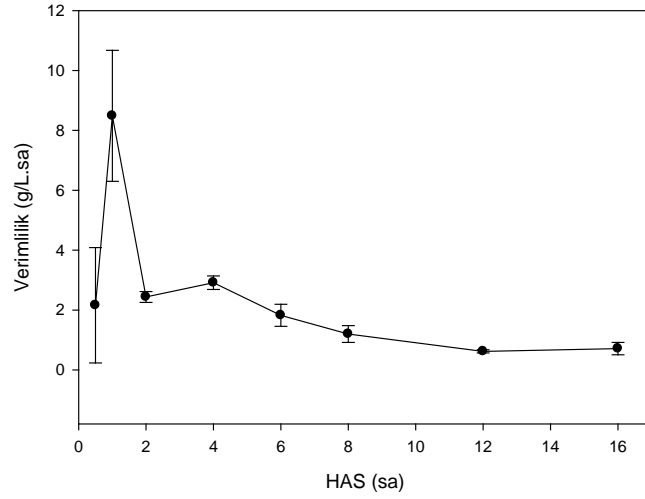
göstermektedir. Her HAS süresi değiştirildiğinde yapılan sayım sonuçlarına bakıldığında da HAS 8, 6, 4 ve 2 saatlerde değerlerin artışta olduğunu geri kalan HAS değerlerinde ise bir düşüş olduğu gözlenmektedir. Fermantasyona başlangıç ve bitiş değerleri karşılaştırıldığında ise (HAS=16 sa ve 0.5 sa) seyreltme hızının artışına bağlı olarak mikroorganizma miktarında azalış olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi.

<b>kob/mL örnek</b>	<b>Sürec/HAS (sa)</b>
$6.3 \times 10^7$	Aşı
$3.3 \times 10^8$	Tutundurma Çalışması HAS = 6
$2.3 \times 10^9$	
$1.5 \times 10^9$	
$2.7 \times 10^9$	
$2.7 \times 10^9$	
$9.5 \times 10^8$	
$3.5 \times 10^7$	16
$3.1 \times 10^9$	12
$3.1 \times 10^9$	8
$2.1 \times 10^9$	6
$4.2 \times 10^9$	4
$1.8 \times 10^9$	2
$1.4 \times 10^9$	1
$1.3 \times 10^8$	0.5

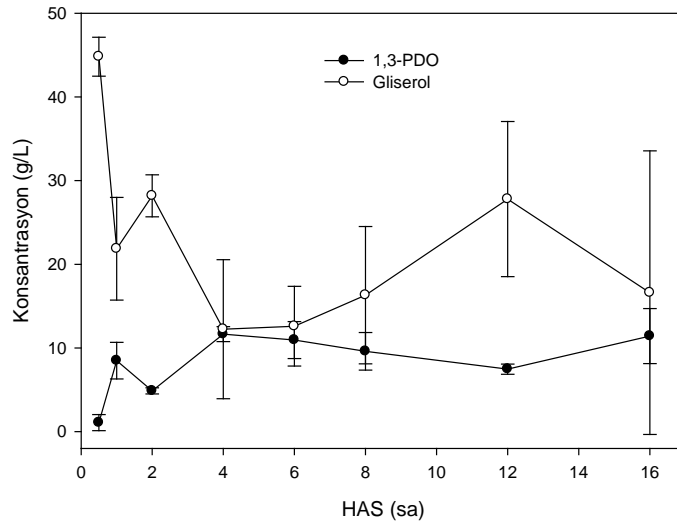
Şekil 4.19'deki grafik incelendiğinde HAS 12 ve 16 saat alıkonma sürelerinde birbirlerine yakın değerlerde en düşük üretim verimlilikleri sırası ile 0.6 ve 0.7 g/L.sa ortalamalarında olduğu görülmektedir. HAS sürelerinin kısalması ile üretim verimliliklerinin arttığı ve 0.6 g/L.sa'ten 8.5 g/L.sa ortalamasına kadar çıktığı görülmektedir. Şekil 4.19'deki grafikten görüldüğü gibi, 0.5, 2 ve 4 saatlik alıkonma sürelerinin verimliliklerinin birbirine yakın değerlerde seyretmektedir, 8 saatlik alıkonma süresinde bu değerlerin yarısı kadar, 6 saatlik alıkonma süresinde ise verimlilik bahsedilen değerlerden düşüktür. Bu değerlerden yüksek değerlere bakılacak olursa 1 saatlik alıkonma süresinde bu değerlerin 14 katına kadar ulaşıldığı görülmektedir.





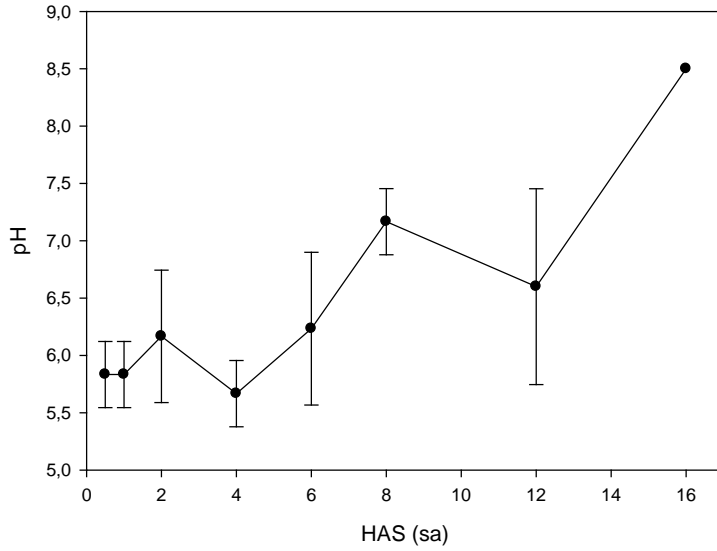
Şekil 4.19 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.20'de farklı HAS süreleri ile yapılan denemelerde elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının ortalaması görülmektedir. En yüksek değere 11.6 g/L ile 4 saatlik alıkonma süresinde ulaşmıştır. En düşük konsantrasyon değeri 1.1 g/L 1,3-PDO ile en kısa süre olan 0.5 saatlik alıkonma süresinde görülmüştür. Şekil 4.19'daki grafikten en yüksek üretim verimliliğinin en kısa alıkonma sürelerinden olan 1 saatlik sürede elde edildiği görülmektedir.



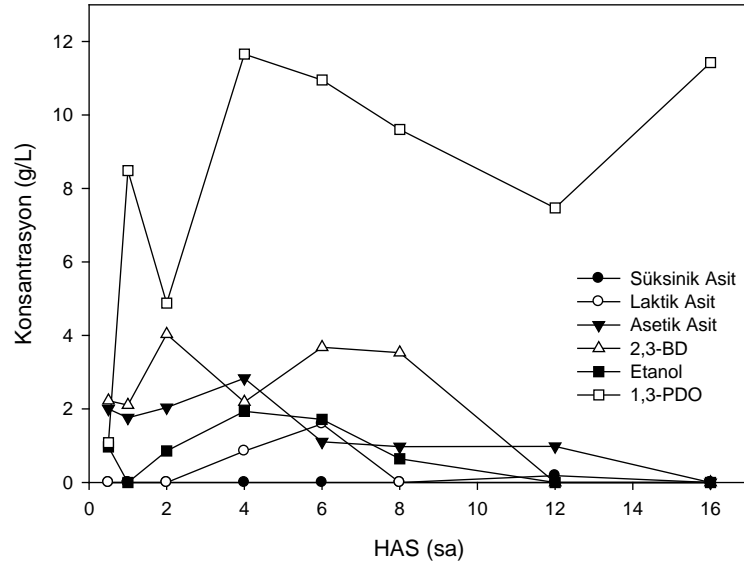
Şekil 4.20 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

Yaklaşık 40 g/L olan gliserol giriş konsantrasyonunda en düşük alıkonma süresinde gliserolün neredeyse hiç tüketilemediği görülmektedir. 4 ve 6 saatlik kısa alıkonma sürelerinde gliserolün büyük kısmı tüketilmiştir. Şekil 4.20'deki grafikten ortamda gliserolün tüketimi ve Şekil 4.21'deki grafikten beklenen yan ürünlerin eser miktarda üretilmesiyle karbon kaynağı olan gliserolün 1,3-PDO üretimi ve mikroorganizma büyümesi için kullanıldığı söylenebilir. HAS 8 ve 16 saatler ile HAS 2 ve 12 saatlerde gerçekleştirilen denemelerin gliserol tüketim değerleri birbirlerine yakın çıkmıştır. HAS değerlerinin yükselmesiyle doğru orantılı bir eğilim görünmemek ile birlikte genel tabloya bakıldığında düşük HAS'da mikroorganizma adaptasyonunun da mümkün olmaması ile gliserol tüketiminin çok azaldığı gözlenmektedir.



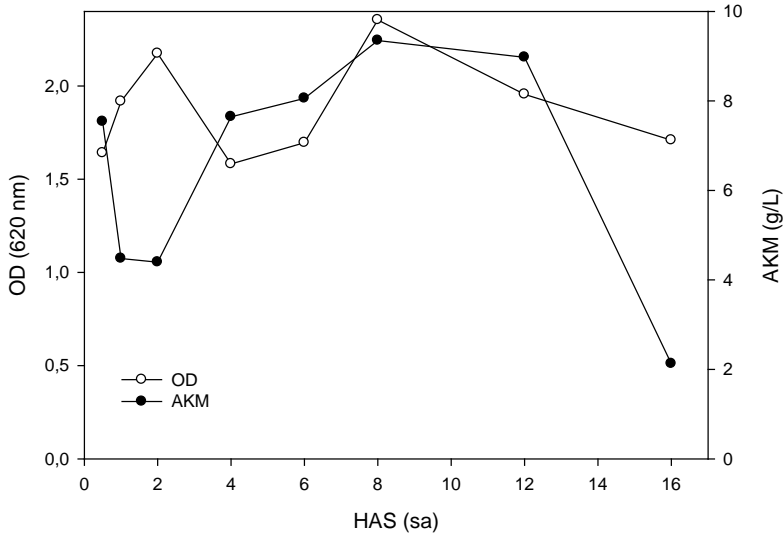
Şekil 4.21 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi.

Üretim süresince pH değerinin 5.5-8.5 arasında değiştiği Şekil 4.22'deki grafikten görülmektedir. Askıda üretimlerde 1,3-PDO üretimi gerçekleştikçe pH değerinin düşme eğiliminde olduğu ve pH 5.5 seviyelerinden sonra 1,3-PDO üretim değerlerinin düştüğü bilinmektedir. Biyodizel atığı gliserol kullanılarak hazırlanan besleme sıvısının pH değeri 8 ila 9 arasında değişmektedir. Besleme sıvısındaki yüksek pH değeri üretim süresince düşme eğiliminde olan pH değerini dengeleyebilmekte ve üretim için ideal olan pH 6 – 7 değerinin sağlanmasına yardımcı olmaktadır. Yetersiz kaldığı durumlarda besleme sıvısı içerisine 2 M'lık KOH farklı hacimlerde eklenerek pH'ın 6 ila 7 seviyelerinde kalması sağlanmaya çalışılmıştır.



Şekil 4.22 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması.

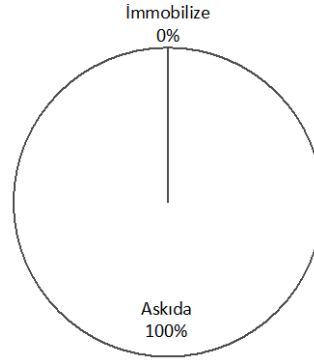
Şekil 4.22’te beklenen ana ürün 1,3-PDO ile birlikte üretilen diğer yan ürünlerin ortalama konsantrasyonları görülmektedir. En yüksek HAS (16 sa) hariç tüm denemelerde asetik asit 0.5-2 g/L arasında üretilmiştir. Bununla birlikte organik asit üretimi ile pH değerlerinin de düşüşü gözlenmektedir. HAS kısaltıkça 2,3-BD üretiminde bir artış olduğu görülmektedir. Süksinik asit en çok 0.11 g/L (HAS=4 sa), laktik asit en çok 2.19 g/L (HAS=4 sa), asetik asit en çok 3.15 g/L (HAS=6 sa) ve 2,3-BD en çok 3.77 g/L (HAS=6 sa) miktarlarında üretilmişlerdir.



Şekil 4.23 Dolgu malzemesiz biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ortalama OD ve AKM değerlerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.23'teki grafikte, en düşük HAS'da besleme hızının oldukça yüksek olmasına bağlı olarak yüksek bir AKM değeri görülmektedir. Ardından HAS 1 saatte hızlı bir düşüş gerçekleşmiş ve HAS 4-12 saatleri arasında benzer değerlerde stabil kalmıştır. En uzun hidrolik alıkonma süresinde ise depo materyalinin muhtemel yıkımına bağlı olarak çıkış AKM değeri oldukça düşmüştür. OD değerleri ise HAS 2 ve 4 saatler haricinde AKM değerlerindeki değişime paralel bir eğilim göstermektedir. Bu değerlerdeki ters yönelim mikroorganizmanın muhtemel büyümesine bağlı olarak türbiditesini arttırmasından kaynaklanıyor olabilir.

Üretim sonunda yapılan askıda katı madde analizleri sonucunda askıda mikroorganizma oranının % 100 olduğu belirlenmiştir. Reaktör çeperine mikroorganizma tutunması gerçekleşmediği ve üretimin tamamen askıda olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 Dolgu malzemesiz kolonbiyoreaktörde kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.

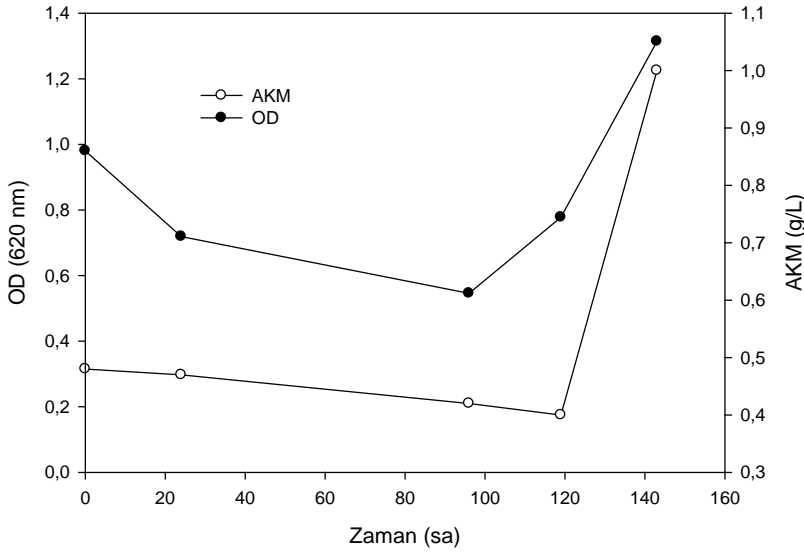


Şekil 4.25 Sürekli üretim sonunda dolgu malzemesiz biyoreaktörün görünümü.

Şekil 4.25'te dolgu malzemesiz kolon reaktörün üretim sonrasındaki görüntüsü görülmektedir. Reaktörden örnekleme en üstte görülen çıkış borusundan yapılmıştır. Şekilde de görüldüğü gibi reaktör camına yapışan atık gliserol ve muhtemel mikroorganizma kolonilerinin parçacıkları bulunmaktadır.

#### 4.2.2 Seramik top dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları

1,3-PDO üretimi seramik top dolgulu kolon reaktör kullanılarak çalışılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçların grafikleri aşağıdaki gibidir. Şekil 4.26'da seramik top dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi gösterilmektedir. Çalışma süresinde tıkanma gibi immobilizasyon çalışmalarında görülebilen bir işletme problemi ile karşılaşılmamıştır.



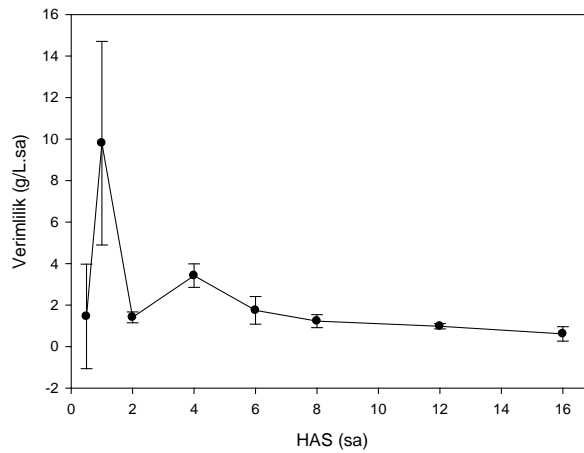
Şekil 4.26 *K. pneumoniae* ile seramik top dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi, HAS=8 sa, sürekli deneme.

Tutundurma çalışmasının ilk 48 saati içerisinde hem OD hem de AKM değerlerinde bir düşüş olduğu görülmektedir. Bunun ardından 72.saate kadar geçen sürede OD ve AKM değerleri birbirine ters orantılı gitmektedir. Ardından tutundurma çalışması sonuna kadar iki değer de birbirine paralel gitmektedir. 72.saatin sonuna kadar alınan değerler tutunmanın yeterli olduğunu göstermektedir, 95.saat sonunda ise hem OD hem de AKM değerlerinde ciddi bir artış olduğu gözlemlenmektedir. Bunun sebebinin mikroorganizmaların hem askıda olarak hem de tutunmuş olarak yeterince büyümüş olduklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun dışında, canlı sayım değerlerine bakıldığında ise yukarıdaki grafiktekine paralel değerler görülmektedir, fermantasyona başlamadan önce isemikroorganizma sayısında bir artış olduğu görülmektedir (Çizelge 4.2). Her HAS süresi değiştirildiğinde yapılan sayım sonuçlarına bakıldığında da HAS 12, 8 ve 4 saatlerde değerlerin artışta olduğunu geri kalan HAS değerlerinde ise bir düşüş olduğu gözlenmektedir. Fermantasyona başlangıç ve bitiş değerleri karşılaştırıldığında ise (HAS=16 sa ve 0.5 sa) mikroorganizmaların birbirine yakın bir değerde olduğu ve stabil kaldıkları gözlenmektedir. Bu denemeler süresince AKM değerleri biyokütle miktarını yansıtmaktadır.

Çizelge 4.2 Seramik top dolgulı biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi.

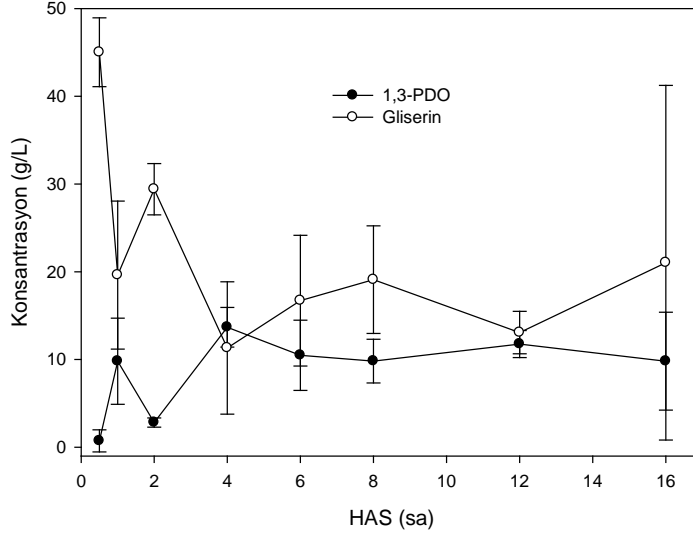
<b>kob/mL örnek</b>	<b>Süreç/HAS (sa)</b>
$6.3 \times 10^7$	Aşı
$2.9 \times 10^8$	Tutundurma Çalışması HAS = 6
$4.7 \times 10^8$	
$3.9 \times 10^8$	
$6.6 \times 10^8$	
$1.6 \times 10^9$	
$1.9 \times 10^8$	
$7.2 \times 10^8$	12
$9.3 \times 10^8$	8
$1.6 \times 10^8$	6
$9.3 \times 10^8$	4
$2.3 \times 10^8$	2
$3.8 \times 10^8$	1
$2.4 \times 10^8$	0.5

Şekil 4.27'deki grafik incelendiğinde HAS 12 ve 16 saat alıkonma sürelerinde birbirilerine yakın değerlerde en düşük üretim verimlilikleri sırası ile 0.9 ve 0.6 g/L.sa ortalamalarında olduğu görülmektedir. HAS sürelerinin kısalması ile üretim verimliliklerinin arttığı ve 0.6 g/L.sa'ten 9,8 g/L.sa ortalamasına kadar çıktığı görülmektedir. 0.5, 2 ve 8 saatlik alıkonma sürelerinin verimliliklerinin birbirine yakın değerlerde seyretmektedir, 6 saatlik alıkonma süresinde ise verimlilik bahsedilen değerlerden yüksek, 4 saatlik alıkonma süresinde bu değerlerin iki katı kadardır.



Şekil 4.27 *K. pneumoniae* ile seramik top dolgulı biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması, sürekli deneme.

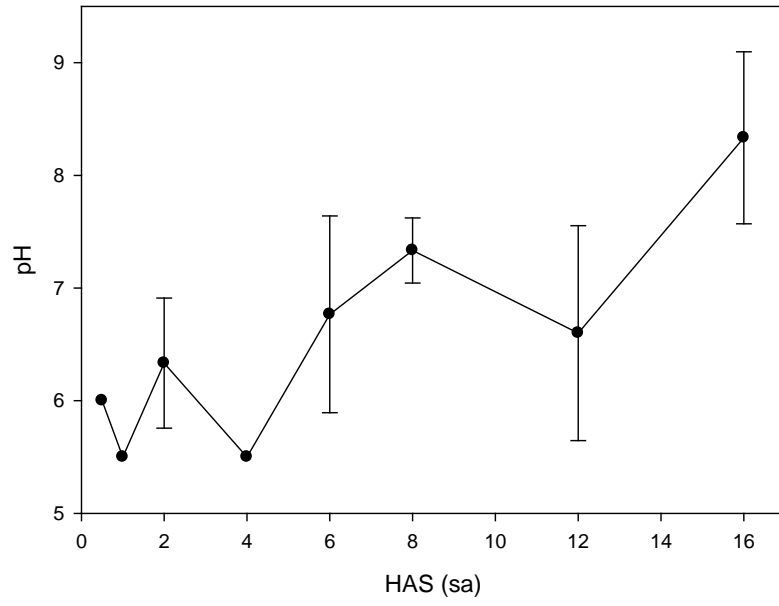
Şekil 4.28’de farklı HAS süreleri ile yapılan denemelerde elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının ortalaması görülmektedir. En yüksek değere 13.7 g/L ile 4 saatlik alıkonma süresinde ulaşmıştır. En düşük konsantrasyon değeri 0.7 g/L 1,3-PDO ile en kısa süre olan 0.5 saatlik alıkonma süresinde görülmüştür. Şekil 4.27’deki grafikten en yüksek üretim verimliliğinin en kısa alıkonma sürelerinden olan 1 saatlik sürede elde edildiği görülmektedir.



Şekil 4.28 *K. pneumoniae* ile seramik top dolgulu biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonları, sürekli deneme.

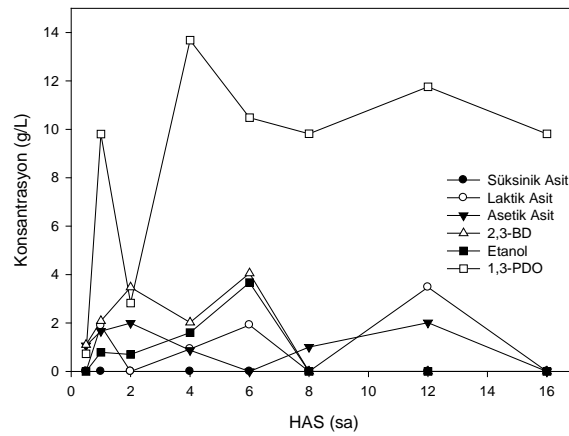
En düşük alıkonma süresinde gliserolün neredeyse hiç tüketilemediği görülmektedir. 4 ve 12 saatlik alıkonma sürelerinde gliserolün büyük kısmı tüketilmiştir (Şekil 4.27). HAS 6 ve 8 saatler ile HAS 1 ve 16 saatlerde gerçekleştirilen denemelerin gliserol tüketim değerleri birbirlerine yakın çıkmıştır. HAS değerlerinin yükselmesiyle doğru orantılı bir eğilim görülmemek ile birlikte genel tabloya bakıldığında en düşük HAS’da gliserol tüketiminin çok azaldığı gözlenmektedir.





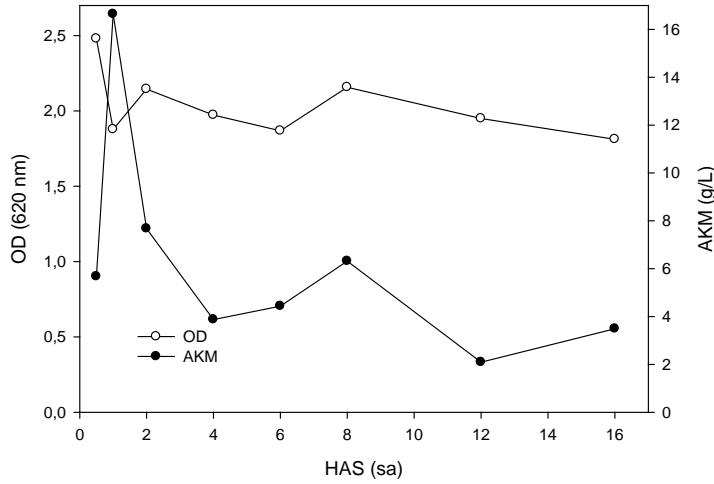
Şekil 4.29 *K. pneumoniae* ile seramik top dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi, sürekli deneme.

Üretim süresince pH değerinin 6.0-8.5 arasında değiştiği Şekil 4.29'daki grafikten görülmektedir. En yüksek HAS değerinde 1,3-PDO üretimlerinin ve yan ürün üretimlerinin de düşük olmasına bağlı olarak ortam pH'sının büyüme için gerekli değerden yüksek olduğu kanısına varılmıştır.



Şekil 4.30 *K. pneumoniae* ile seramik top dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması.

Şekil 4.30'da beklenen ana ürün 1,3-PDO ile birlikte üretilen diğer yan ürünlerin ortalama konsantrasyonları da görülmektedir. En yüksek HAS 6 ve 16 saat hariç tüm denemelerde asetik asit 0.8-2 g/L arasında üretilmiştir. Laktik asit sadece HAS 1, 4 ve 6 saatlik denemelerde 0.9-1.9 g/L üretilmiştir. Bununla birlikte organik asit üretimi ile pH değerlerinin de düşüşü gözlenmektedir. Etanol pH değerleri asidik değerlerde olduğu sürece üretilebilen bir yan ürün olduğundan sadece kısa alıkonma sürelerinde üretilebilmiştir. Diğer grafiklerde de görüldüğü gibi bu denemelerde pH değerleri oldukça düşmektedir. HAS kısaldıkça 2,3-BD üretiminde bir artış olduğu görülmektedir, HAS=4 sa'te en 4.15 g/L konsantrasyona ulaşmıştır.

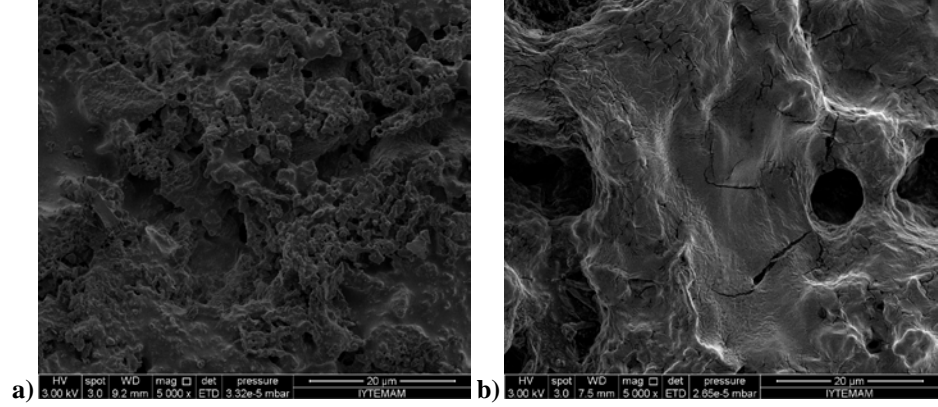


Şekil 4.31 *K. pneumoniae* ile seramik top dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.31'deki grafikte, en düşük HAS'da düşük bir AKM değeri görülmektedir. Ardından HAS 1 saatte hızlı bir artış gerçekleşmiş ve HAS 2-16 saatleri arasında hızlı bir düşüş ile fermantasyon başlangıç değerinden düşük bir değer ile fermantasyonu tamamlamıştır. OD değerleri ise en düşük HAS'da muhtemelen seyreltme hızının oldukça yüksek olmasına paralel olarak oldukça yüksek bir değerdedir, bunun ardından değerler düşüşe geçerek tüm deneme boyunca az bir düşüş ile stabil kalmıştır. Bu değerlerdeki stabilite mikroorganizmanın muhtemelen fermantasyon süresince aynı büyüme fazı içerisinde olduğunu göstermektedir.

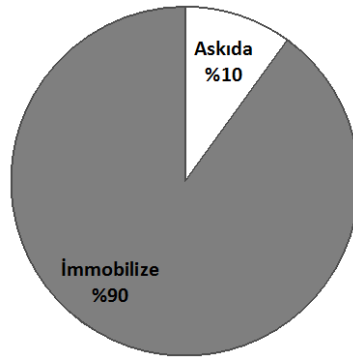
Şekil 4.32 A ve B'de seramik top dolgu malzemesinin SEM görüntüsünden elde edilen fotoğrafları görülmektedir. B'de malzeme üzerine tutunmuş olan *K. pneumoniae*; basil şeklinde mikroorganizmalar görülebilmektedir. İmmobilizasyon

işleminin başarıyla gerçekleştiği buradan söylenilebilir. Görüntülerin çok net görülememesinin sebebi altın kaplama yapılmış olmasına rağmen gliserolün bir tabaka şeklinde mikroorganizmaların üzerinde kalmış olmasıdır.

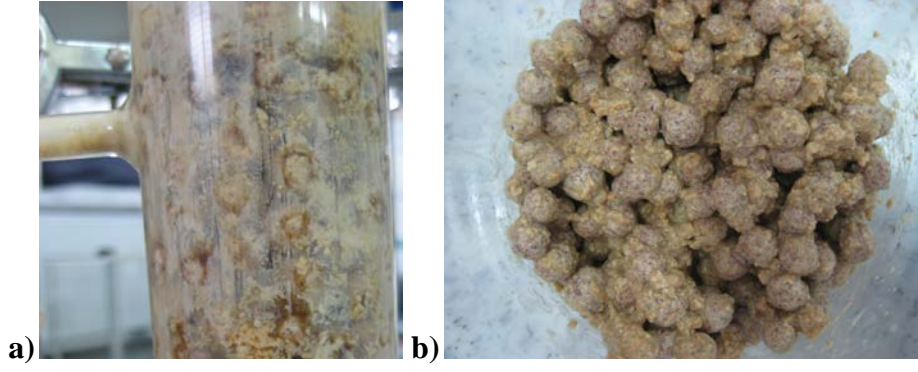


Şekil 4.32 *K. pneumoniae* ile seramik top dolgulu biyoreaktördeki malzemelerin SEM görüntüleri; a) boş ve b) mikroorganizma bulunan.

Üretim sonunda yapılan kuru madde analizleriyle seramik top malzeme üzerine ve reaktör çeperine tutunan ve askıda haldeki mikroorganizmaların oranı Şekil 4.33'teki pasta diyagramında görülmektedir. Malzeme üzerine tutunan mikroorganizma oranı % 90 iken geri kalan %10'luk kısım askıda haldeki mikroorganizmayı oluşturmaktadır.



Şekil 4.33 *K. pneumoniae* ile seramik top kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.

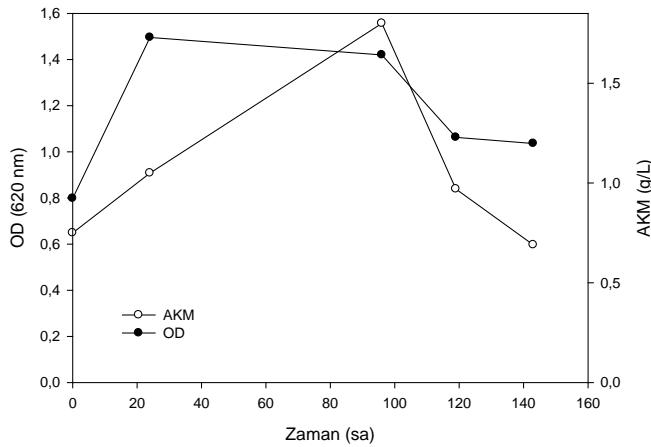


Şekil 4.34 *K. pneumoniae* ile sürekli üretim sonunda seramik top dolgulu biyoreaktörün görünümü; kolon reaktör (a) ve malzeme (b).

Şekil 4.34 a ve b’de seramik top dolgulu kolon reaktörün üretim sonrasındaki görüntüleri görülmektedir. Şekil 4.34 B’de reaktörün içerisindeki malzemelerin yıkamadan önceki sıvısız hali görülmektedir. Atık gliserol içerisindeki tüm safsızlıklar malzeme üzerine yapışarak AKM değerlerinin yüksek çıkmasına sebep olmaktadır. Bu atık kullanımı ile karşılaşılan bir problemdir.

#### 4.2.3 Poliüretan köpük (PUF) dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları

Şekil 4.35’te poliüretan köpük dolgulu (PUF) biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi gösterilmektedir.



Şekil 4.35 Poliüretan köpük dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi.

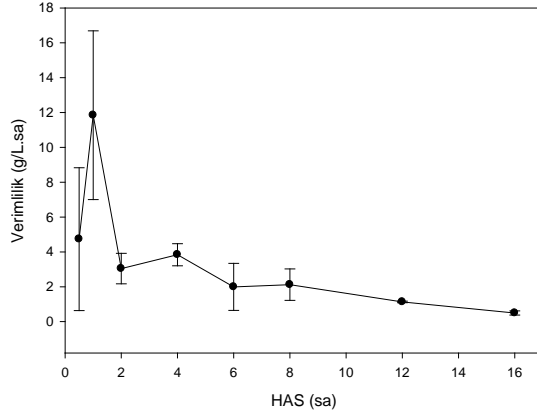
Tutundurma çalışmasının ilk 48 saati içerisinde büyümeye bağlı olarak hem OD hem de AKM değerlerinde bir artış olduğu görülmektedir. İki değer de çalışma süresince birbirine paralel gitmektedir, ancak 48. saatten sonra çalışmanın sonuna kadar bu değerlerde bir düşüş gözlenmektedir. Tutundurma çalışması sonucunda değerlerin düşüşüne bağlı olarak reaktörün mikroorganizmaların tutunmuş olduğu aşıkardır. Mikroorganizma miktarındaki düşüş tutundurma çalışmasının başarılı olduğunu göstermektedir. Bunun dışında, canlı sayım değerlerine bakıldığında ise tutundurma çalışmasının ilk aşamasında mikroorganizmaların ortama adaptasyon sağladığını, ardından 24 saat sonunda mikroorganizma sayısında sürekli bir düşüş olduğu görülmektedir (Çizelge 4.3). Bu durumda fermantasyon ortamına geçiş için yeterli süre geçtiğini anlaşılmaktadır. Her HAS süresi değiştirildiğinde yapılan sayım sonuçlarına bakıldığında da en yüksek HAS değerinde yüksek bir mikroorganizma oranı görülürken 4 saatlik HAS değerine gelene kadar tekrar bir azalma görülmektedir. Bu değerde artan canlı sayısı fermantasyon sonuna kadar tekrar bir azalma göstererek son 3 denemede birbirine yakın değerler vererek stabil kaldığını göstermektedir. Fermantasyona başlangıç ve bitiş değerleri karşılaştırıldığında ise (HAS=16 sa ve 0.5 sa) seyreltme hızının artışına bağlı olarak mikroorganizma miktarında yaklaşık 10 kat azalış olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3 PUF dolgulı biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi.

<b>kob/mL örnek</b>	<b>Sürec/HAS (sa)</b>
$6.3 \times 10^7$	Aşı
$8.8 \times 10^7$	Tutundurma Çalışması HAS = 6
$1.3 \times 10^9$	
$6.8 \times 10^8$	
$6.0 \times 10^8$	
$6.0 \times 10^8$	
$1.1 \times 10^9$	16
$6.3 \times 10^8$	12
$3.8 \times 10^8$	8
$1.9 \times 10^8$	6
$7.8 \times 10^8$	4
$1.7 \times 10^8$	2
$1.6 \times 10^9$	1
$1.5 \times 10^8$	0.5

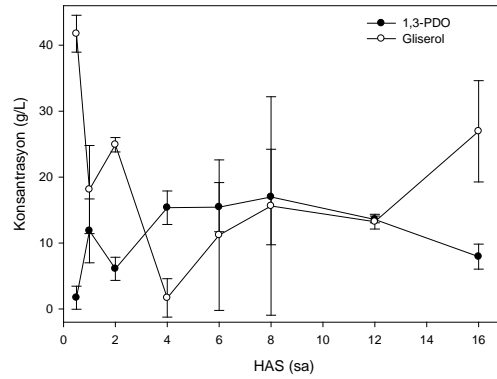
Şekil 4.36'daki grafik incelendiğinde HAS 12 ve 16 saat alıkonma sürelerinde birbirlerine yakın değerlerde en düşük üretim verimlilikleri sırası ile 0.5 ve 1.1 g/L.sa ortalamalarında olduğu görülmektedir. HAS sürelerinin kısılması ile üretim verimliliklerinin arttığı ve 0.6 g/L.sa'ten 11.8 g/L.sa

ortalamasına kadar çıktığı görülmektedir. 6 ve 8 saatlik ve 2 ve 4 saatlik alıkonma sürelerinin verimlilikleri birbirine yakın değerlerde seyretmektedir, 0.5 saatlik alıkonma süresinde ise en düşük değerin yaklaşık 8 katı kadar yüksek bir değere ulaşılmıştır. En yüksek değere bakıldığında 1 saatlik alıkonma süresinde 23 kat daha yüksek bir verimliliğe ulaşıldığı görülmektedir.



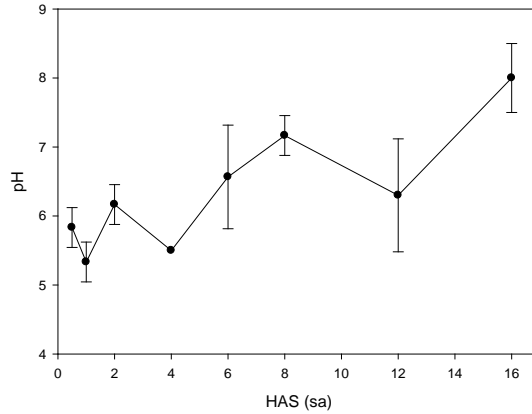
Şekil 4.36 Poliüretan köpük dolgulı biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.37'de farklı HAS süreleri ile yapılan denemelerde elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının ortalaması görülmektedir. En yüksek değere 16.9 g/L ile 8 saatlik alıkonma süresinde ulaşmıştır. Buna benzer bir değer 6 saatlik HAS süresinde 15.4 g/L olarak ölçülmüştür. En düşük konsantrasyon değeri 1.7 g/L 1,3-PDO ile en kısa süre olan 0.5 saatlik alıkonma süresinde görülmüştür. Şekil 4.36'daki grafikten en yüksek üretim verimliliğinin en kısa alıkonma sürelerinden olan 1 saatlik sürede elde edildiği görülmektedir.



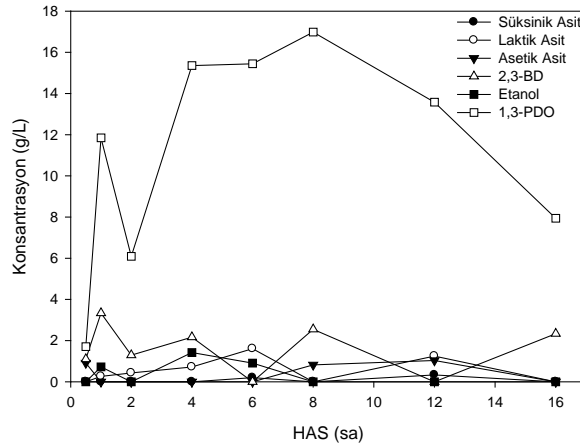
Şekil 4.37 Poliüretan köpük dolgulı biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonları.

HAS=4 sa'te gliserolün büyük kısmı tüketilmiştir (Şekil 4.37). Düşük alıkonma sürelerinde gliserol tüketimi oldukça azken, her ne kadar HAS 4 saatlikteki kadar yüksek bir oranda gliserol tüketimi olmasa da, yüksek alıkonma sürelerinde gliserol tüketimi artmaktadır. En yüksek alıkonma süresinde ise mikroorganizmanın gliserolü az miktarda tükettiğini ve az miktarda 1,3-PDO ürettiğini görülmektedir.



Şekil 4.38 Poliüretan köpük dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi.

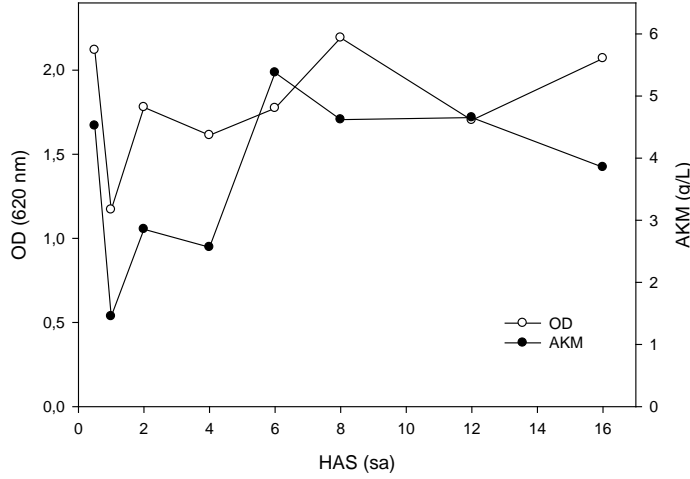
Üretim süresince pH değerinin ortalama 5.75-8.0 arasında değiştiği Şekil 4.38'deki grafikten görülmektedir.



Şekil 4.39 Poliüretan köpük dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması.

Şekil 4.39'da beklenen ana ürün 1,3-PDO ile birlikte üretilen diğer yan ürünlerin ortalama konsantrasyonları da görülmektedir. En yüksek HAS 2, 4 ve 6

saat hariç tüm denemelerde asetik asit 0.8-1.3 g/L arasında üretilmiştir. Diğer yan ürünler eser miktarda üretilirken, HAS kısaltıkça (HAS 6 ve 12 saat hariç) 2,3-BD üretiminde bir artış olduğu görülmektedir. Süksinik asit en çok 0.20 g/L (HAS=1 sa) ve laktik asit en çok 1.76 g/L (HAS=4 sa) miktarlarında üretilmişlerdir.

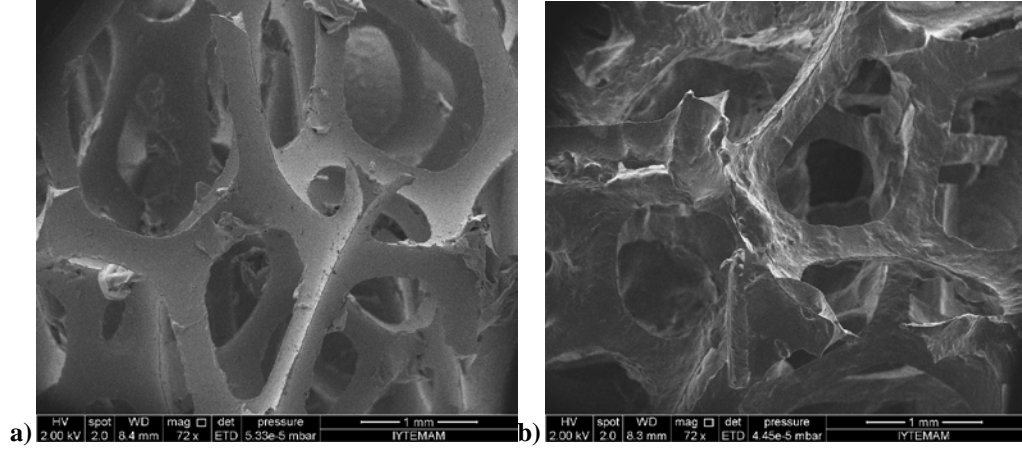


Şekil 4.40 Poliüretan köpük dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.40'taki grafikte, en düşük HAS'de besleme hızının oldukça yüksek olmasına bağlı olarak yüksek bir AKM değeri görülmektedir. Ardından HAS 1 saatte hızlı bir düşüş gerçekleşmiş ve HAS 2-12 saatleri arasında benzer değerlerde az bir artış göstererek stabil kalmıştır. En uzun hidrolik alıkonma süresinde ise AKM değeri oldukça düşmüştür. OD değerleri ise HAS 16 saat haricinde AKM değerlerindeki değişime paralel bir eğilim göstermektedir. \

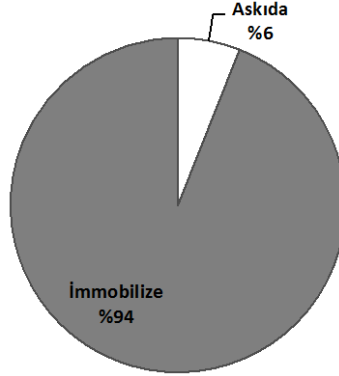
Şekil 4.41 a ve b'de PUF dolgu malzemesinin SEM görüntüsünden elde edilen fotoğrafları görülmektedir. B'de malzeme üzerine tutunmuş olan *K. pneumoniae*; basil şeklinde mikroorganizmalar görülebilmektedir İmmobilizasyon işleminin başarıyla gerçekleştiği buradan söylenilebilir.





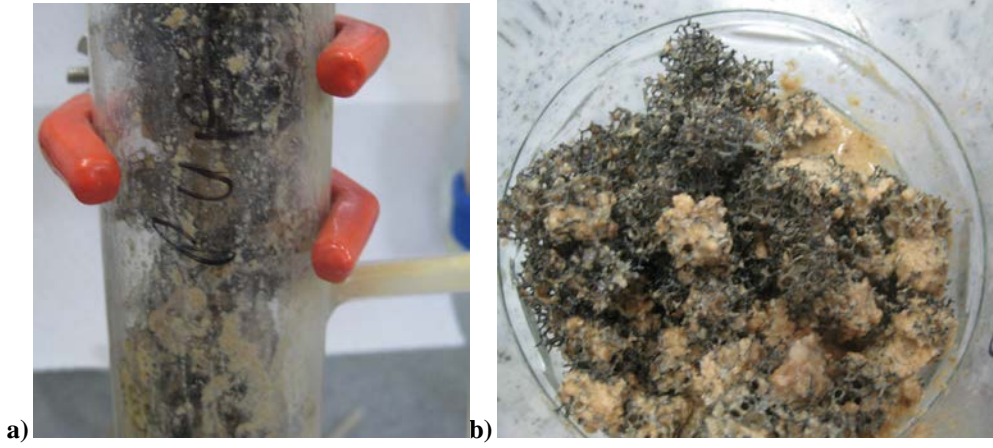
Şekil 4.41 Poliüretan köpük dolgulı biyoreaktördeki malzemelerin SEM görüntüleri; boş (a) ve mikroorganizma bulunan (b).

Üretim sonunda yapılan kuru madde analizleriyle seramik silindir malzeme üzerine ve reaktör çerçesine tutunan ve askıda mikroorganizmaların oranı Şekil 4.42'deki pasta diyagramında görülmektedir. Malzeme üzerine tutunan mikroorganizma oranı % 94 iken geri kalan %6'lık kısım askıda mikroorganizmayı oluşturmaktadır.



Şekil 4.42 PUF kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.

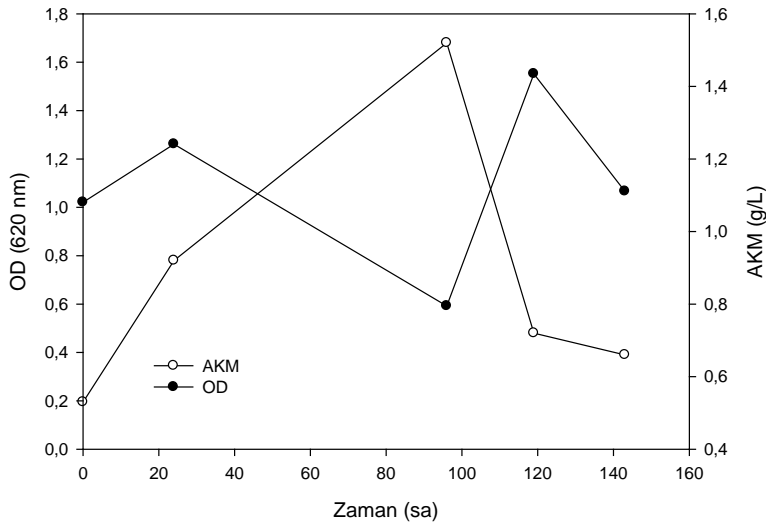
Şekil 4.43 a ve b'de PUF dolgulı kolon reaktörün üretim sonrasındaki görüntüleri görülmektedir.



Şekil 4.43 Sürekli üretim sonunda poliüretan köpük dolgulu biyoreaktörün görünümü; kolon reaktör (a) ve malzeme (b).

#### 4.2.4 Cam boncuk dolgulu biyoreaktör denemesi sonuçları

Cam boncuk dolgulu kolon reaktör kullanılarak yapılan denemede 1,3-PDO üretimi çalışılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçların grafikleri aşağıdaki gibidir. Şekil 4.44'te cam boncuk dolgulu kolon biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi gösterilmektedir.



Şekil 4.44 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi.

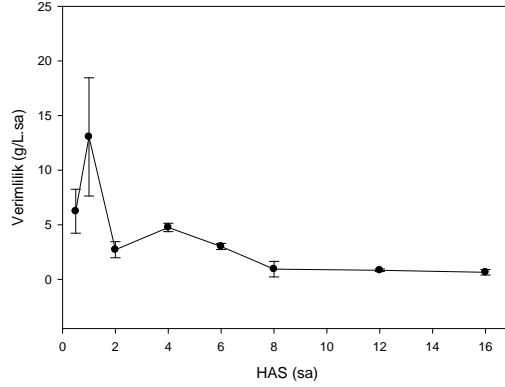
Tutundurma çalışmasının ilk 48 saati içerisinde büyümeye bağlı olarak AKM değerlerinde bir artış olduğu görülmektedir. Hemen ardından ise tutunmaya bağlı olarak AKM değerlerinde düşüş gerçekleşmiştir. OD değerlerinde ise 24-48 saatlik süreç arasın haricinde sürekli bir yükselme görülmektedir. Bunun dışında, canlı sayım değerlerine bakıldığında ise tutundurma çalışmasının ilk aşamasında mikroorganizmaların ortama adaptasyon sağladığını, ardından mikroorganizma sayısında bir artış olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4). Bu değerlerdeki artış mikroorganizmaların ortama adapte olarak sayılarını yaklaşık 10 kat kadar arttırdığını ve fermantasyon ortamına geçiş için yeterli süre geçtiğini göstermektedir. Her HAS süresi değiştirildiğinde yapılan sayım sonuçlarına bakıldığında da HAS 6 olduğunda örnekleme de bir problem olmuştur ve değerler 0 olarak görülmektedir. Bu örneklemeye kadar geçen sürede sürekli bir düşüş gözlenmiştir. Ardından ise organizma sayısı artmış daha sonra tekrar düşüşe geçmiştir. Fermantasyona başlangıç ve bitiş değerleri karşılaştırıldığında ise (HAS=16 sa ve 0.5 sa) seyreltme hızının artışına bağlı olarak mikroorganizma miktarında azalış olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.4 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi.

<b>kob/mL örnek</b>	<b>Sürec/HAS (sa)</b>
$6.3 \times 10^7$	Aşı
$2.0 \times 10^8$	Tutundurma Çalışması HAS = 6
$1.0 \times 10^9$	
$1.1 \times 10^9$	
$2.7 \times 10^9$	
$1.4 \times 10^9$	
$1.4 \times 10^9$	
$1.3 \times 10^8$	12
$3.3 \times 10^7$	8
0	6
$1.4 \times 10^9$	4
$3.0 \times 10^8$	2
$4.5 \times 10^8$	1
$7.3 \times 10^8$	0.5

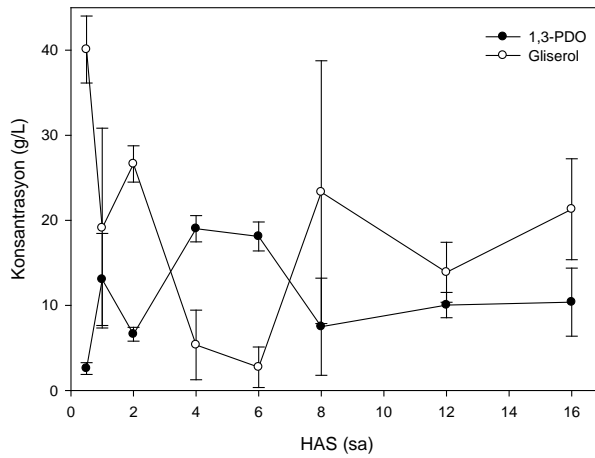
Şekil 4.45'teki grafik incelendiğinde en düşük üretim verimliliği 0.5 saatlik HAS'ta 0.6 g/L olarak belirlenmiştir. HAS 12 ve 8 saat alıkonma sürelerinde birbirlerine yakın değerlerde en düşük üretim verimlilikleri sırası ile 0.8 ve 0.9 g/L.sa ortalamalarında olduğu görülmektedir. HAS sürelerinin kısalması ile üretim verimliliklerinin arttığı ve 0.6 g/L.sa'ten 13.1 g/L.sa ortalamasına kadar çıktığı görülmektedir. 2 ve 6 saatlik alıkonma sürelerinin verimliliklerinin birbirine yakın değerlerde seyretmektedir, 0.5 saatlik alıkonma süresinde bu

değerlerin 3 katı kadar değere yükselmiştir. Bu değerlerden yüksek değerlere bakılacak olursa 1 saatlik alıkonma süresinde bu değerlerin 21 katına kadar ulaşıldığı görülmektedir.



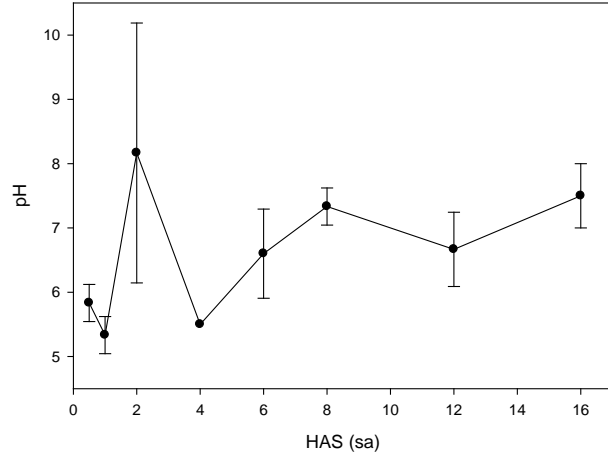
Şekil 4.45 Cam boncuk dolgulı biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.46'da farklı HAS süreleri ile yapılan denemelerde elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının ortalaması görülmektedir. En yüksek değere 19.1 g/L ile 4 saatlik alıkonma süresinde ulaşmıştır. En düşük konsantrasyon değeri 2.6 g/L 1,3-PDO ile en kısa süre olan 0.5 saatlik alıkonma süresinde görülmüştür. En yüksek üretim verimliliğinin en kısa alıkonma sürelerinden olan 1 saatlik sürede elde edildiği görülmektedir. Bu alıkonma süresindeki 1,3-PDO konsantrasyonu 13 g/L'dir.



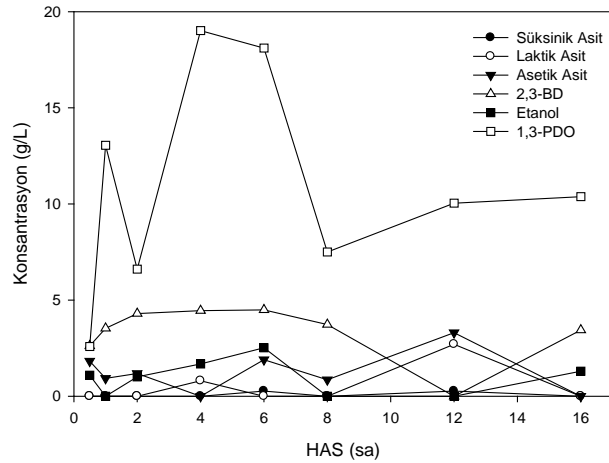
Şekil 4.46 Cam boncuk dolgulı biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonları.

4 ve 6 saatlik kısa alıkonma sürelerinde gliserolün büyük kısmı tüketilmiştir (Şekil 4.46). HAS 16, 8 ve 1 saatlerinde gerçekleştirilen denemelerin gliserol tüketim değerleri birbirlerine yakın çıkmıştır.



Şekil 4.47 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi.

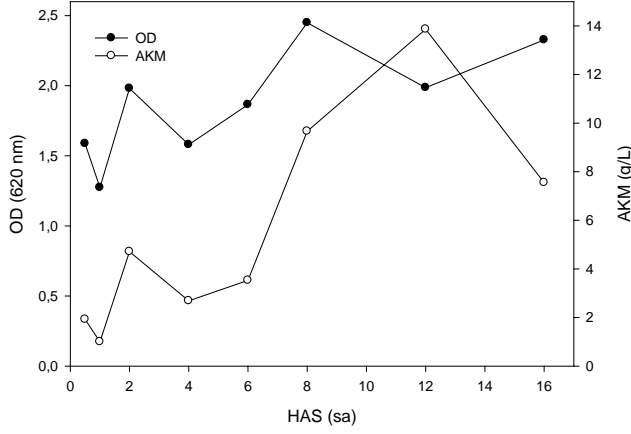
Üretim süresince pH değerinin 5.75-8.25 arasında değiştiği Şekil 4.47'deki grafikten görülmektedir.



Şekil 4.48 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması.

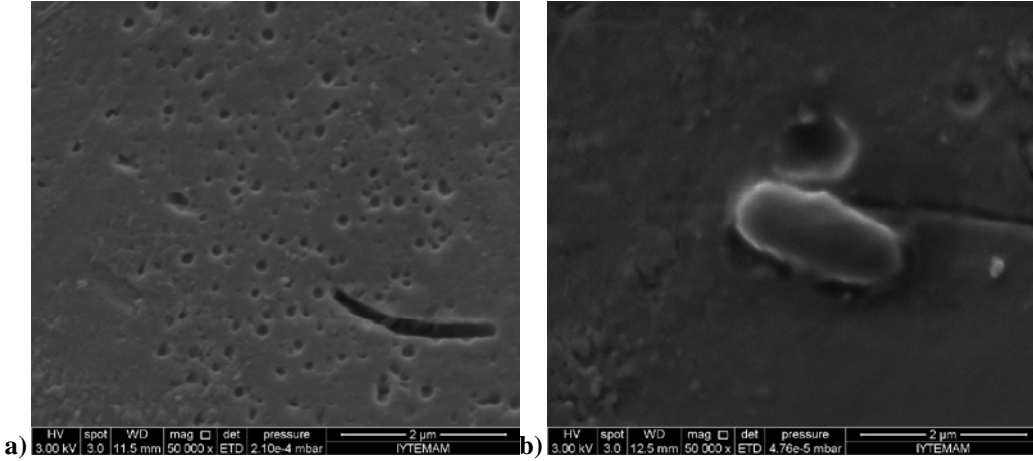
Şekil 4.48'te beklenen ana ürün 1,3-PDO ile birlikte üretilen diğer yan ürünlerin ortalama konsantrasyonları da görülmektedir. En yüksek HAS 4 ve 16 saat hariç tüm denemelerde asetik asit 0.9-2.9 g/L arasında üretilmiştir. Laktik asit

sadece HAS 4 ve 12 saatlik denemelerde 1.0-2.6 g/L üretilmiştir. HAS 2 ve 6 saatler arasında 2,3-BD konsantrasyonu stabil olarak kalmaktadır. Süksinik asit maksimum HAS=4 sa'te 0.2 g/L üretilmiştir.



Şekil 4.49 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.49'daki grafikte HAS 1 saatten itibaren bir artış gerçekleşmiştir ancak HAS 12'den 16'ya geçiş sırasında hızlı bir düşüş görülmektedir. OD değerleri ise HAS 0.5 ve 12 saat değerleri haricinde sürekli bir artış göstermiştir.



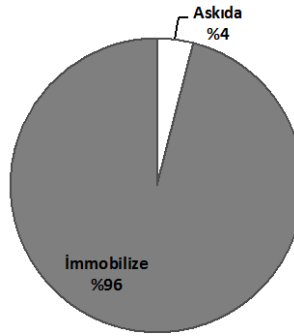
Şekil 4.50 Cam boncuk dolgulu biyoreaktördeki malzemelerin SEM görüntüleri; boş (a) ve mikroorganizma bulunan (b).

Şekil 4.50 a ve b'des eramik top dolgu malzemesinin SEM görüntüsünden elde edilen fotoğrafları görülmektedir. B'de malzeme üzerine tutunmuş olan *K. pneumoniae*; basil şeklinde mikroorganizmalar görülebilmektedir. Bu

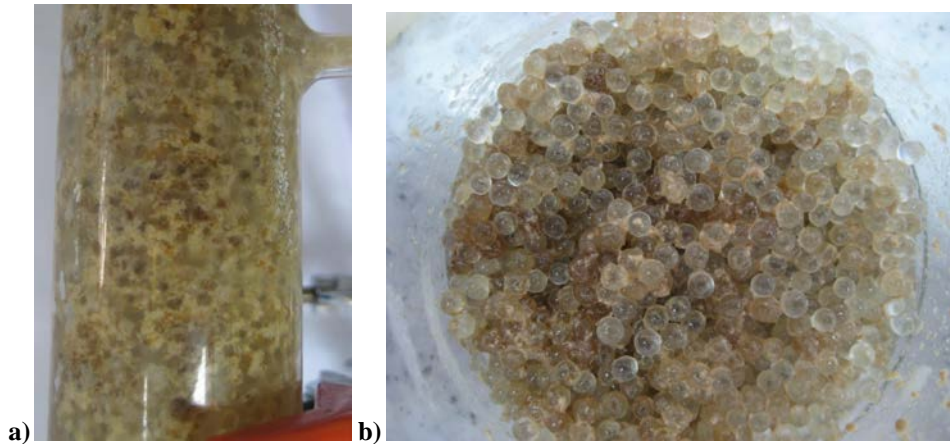
malzemede en yakın yakınlaştırma ile (2  $\mu$ m) oldukça düzgün bir mikroorganizma görünümü elde edilmiştir. İmmobilizasyon işleminin başarıyla gerçekleştiği diğer dolgu malzemelerin de olduğu gibi bu görüntülerden kesinleştirilebilir.

Üretim sonunda yapılan kuru madde analizleriyle seramik silindir malzeme üzerine ve reaktör çeperine tutunan ve askıda haldeki mikroorganizmaların oranı Şekil 4.51'deki pasta diyagramında görülmektedir. Malzeme üzerine tutunan mikroorganizma oranı % 96 iken geri kalan kısım askıda mikroorganizmayı oluşturmaktadır.

Şekil 4.52 a ve b'de seramik top dolgulu kolon reaktörün üretim sonrasındaki görüntüleri görülmektedir. Reaktörden örnekleme en üstte görülen çıkış borusundan yapılmıştır. Şekilde (Şekil 4.52 a) de görüldüğü gibi reaktör camına yapışan atık gliserol parçacıkları bulunmaktadır.



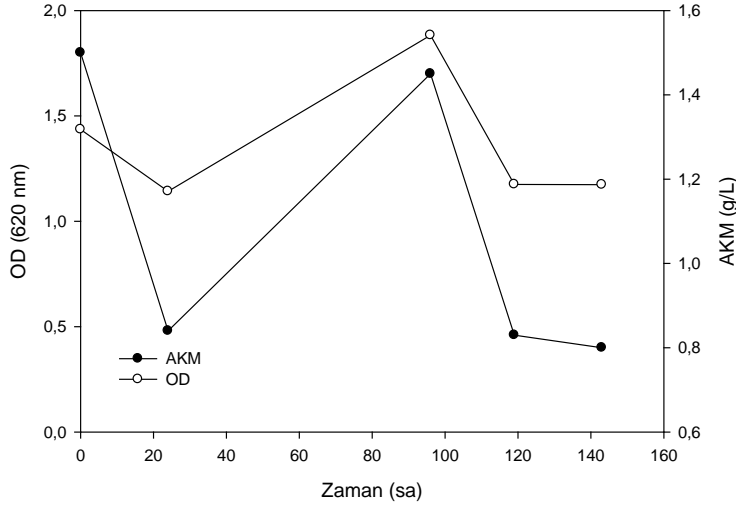
Şekil 4.51 Cam boncuk kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.



Şekil 4.52 Sürekli üretim sonunda cam boncuk dolgulu biyoreaktörün görünümü; kolon reaktör (a) ve malzeme (b).

#### 4.2.5 Pomza taşı dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları

Şekil 4.53'te pomza taşı dolgulu kolon biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi gösterilmektedir.



Şekil 4.53 Pomza taşı dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi.

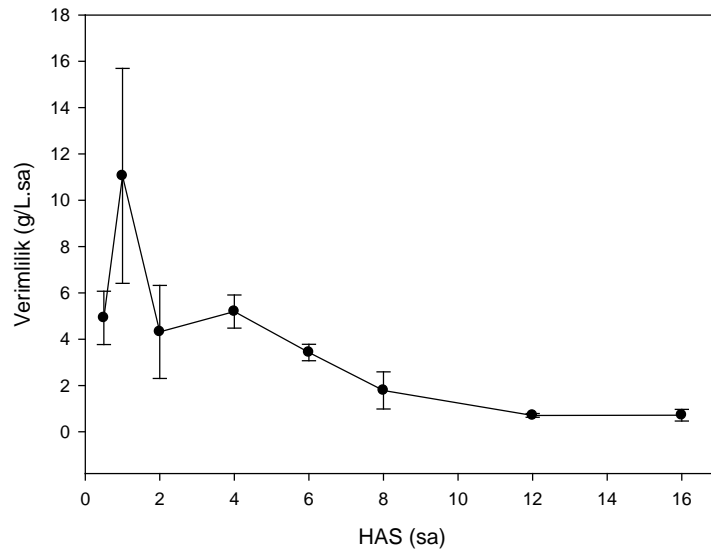
Tutundurma çalışmasının ilk 24 saati içerisinde hem OD hem de AKM değerlerinde bir düşüş olduğu görülmektedir. Ardından değerlerde sürekli bir artış ve düşüş şeklinde dalgalanma görülmektedir. Ancak genel eğilime bakıldığında giriş değerleri çıkış değerlerinden yüksek olduğundan immobilizasyonun gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunun dışında, canlı sayım değerlerine bakıldığında ise tutundurma çalışmasının ilk aşamasında mikroorganizmaların ortama adaptasyon sağladığını, ardından da AKM ve OD değerlerinde olduğu gibi bir dalgalanma burada da görülmektedir (Çizelge 4.5). Burada da giriş değerinin çıkış değerinden yüksek olduğu görülmektedir. Her HAS süresi değiştirildiğinde yapılan sayım sonuçlarına bakıldığında da HAS 4 ve 8 saatlerde değerlerin düşüşte olduğunu geri kalan HAS değerlerinde ise bir artış olduğu gözlenmektedir. Fermantasyona başlangıç ve bitiş değerleri karşılaştırıldığında ise (HAS=16 sa ve 0.5 sa) seyreltme hızının artışına bağlı olarak mikroorganizma miktarında yaklaşık 3 katlık bir azalma olduğu görülmektedir.



Çizelge 4.5 Pomza taşı dolgulu biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi.

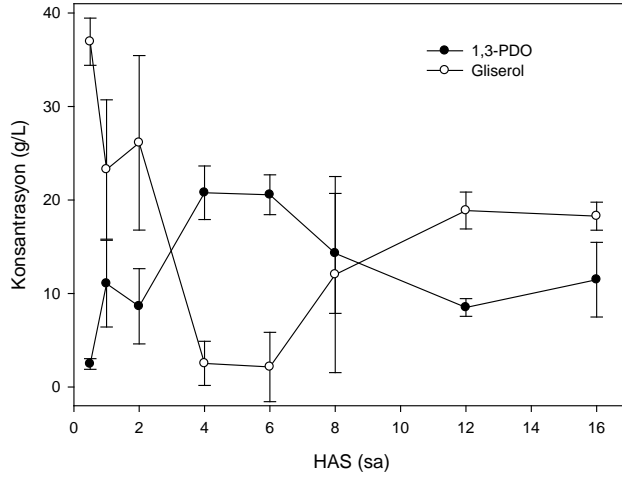
<b>kob/mL örnek</b>	<b>Süreç/HAS (sa)</b>
$6.3 \times 10^7$	Aşı
$5.0 \times 10^8$	Tutundurma Çalışması HAS = 6
$8.6 \times 10^8$	
$1.0 \times 10^9$	
$3.8 \times 10^8$	
$6.1 \times 10^8$	
$7.4 \times 10^8$	
$1.3 \times 10^8$	12
$3.0 \times 10^7$	8
$7.9 \times 10^8$	6
$9.3 \times 10^7$	4
$3.3 \times 10^8$	2
$8.6 \times 10^8$	1
$1.9 \times 10^8$	0.5

Şekil 4.54'teki grafik incelendiğinde HAS 12 ve 16 saat alıkonma sürelerinde birbirlerine yakın değerlerde en düşük üretim verimlilikleri yaklaşık 0.7 g/L.sa ortalamalarında olduğu görülmektedir. HAS sürelerinin kısalması ile üretim verimliliklerinin arttığı ve 0.7 g/L.sa'ten 11.0 g/L.sa ortalamasına kadar çıktığı görülmektedir. HAS=4 sa'e kadar, uzun HAS değerlerinden itibaren bir artış görülmektedir. Ardından, 0.5 ve 2 saatlik HAS değerlerinde birbirine yakın verimlilikler gözlenmiştir. En yüksek değer ise 1 saatlik alıkonma süresinde 16 kat daha yüksektir.



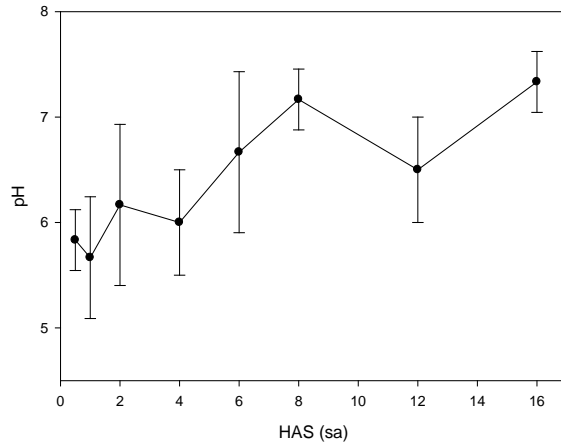
Şekil 4.54 Pomza taşı dolgulu biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.55'te farklı HAS süreleri ile yapılan denemelerde elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının ortalaması görülmektedir. En yüksek değere 20.7 g/L ile 4 saatlik alıkonma süresinde ulaşmıştır. En düşük konsantrasyon değeri 2.4 g/L 1,3-PDO ile en kısa süre olan 0.5 saatlik alıkonma süresinde görülmüştür. En yüksek üretim verimliliğinin en kısa alıkonma sürelerinden olan 1 saatlik sürede elde edilmiştir.



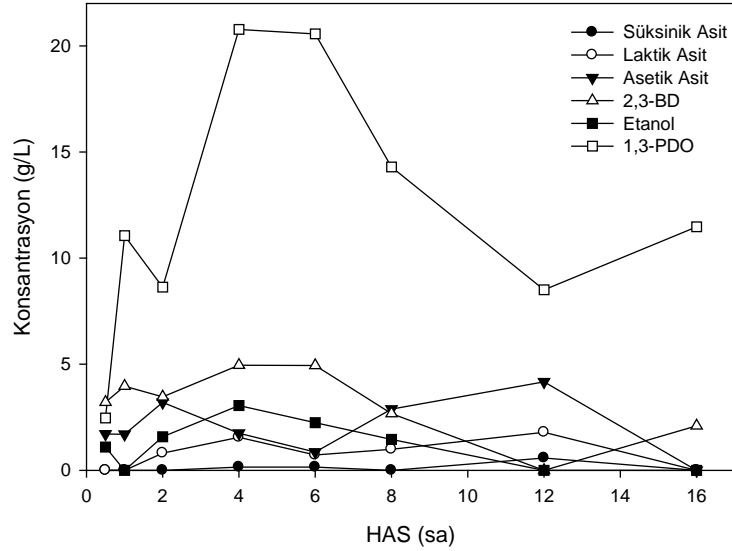
Şekil 4.55 Pomza taşı dolgulı biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonları.

En düşük alıkonma süresinde gliserolün neredeyse hiç tüketilemediği görülmektedir. 4 ve 6 saatlik kısa alıkonma sürelerinde gliserolün büyük kısmı tüketilmiştir. HAS 16 ve 12 saatlerde gerçekleştirilen denemelerin gliserol tüketim değerleri birbirlerine yakın çıkmıştır.



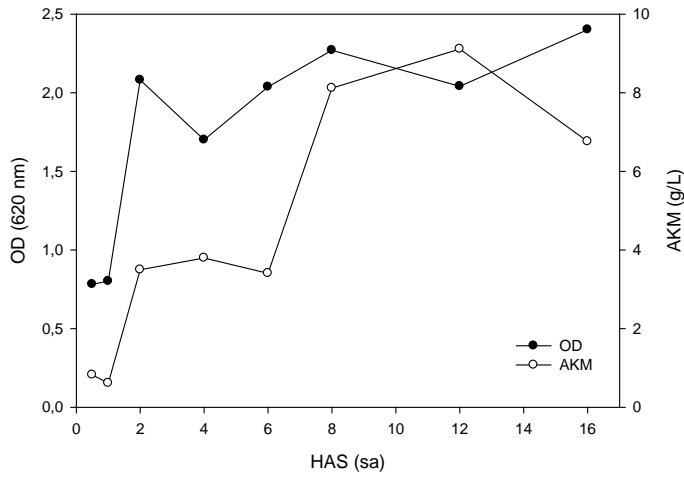
Şekil 4.56 Pomza taşı dolgulı biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi.

Üretim süresince pH değerinin 5.85-7.5 arasında değiştiği Şekil 4.56'daki grafikten görülmektedir.



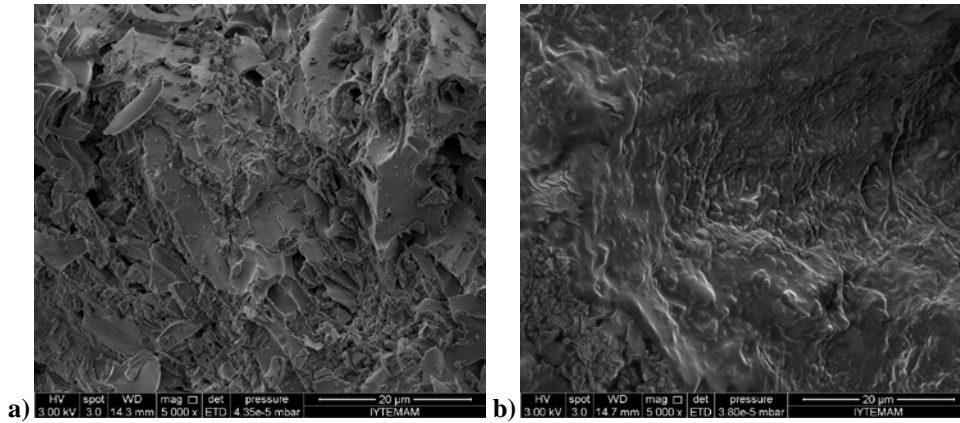
Şekil 4.57 Pomza taşı dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması.

Şekil 4.57'de beklenen ana ürün 1,3-PDO ile birlikte üretilen diğer yan ürünlerin ortalama konsantrasyonları da görülmektedir. En yüksek HAS hariç tüm denemelerde asetik asit 0.7-4.2 g/L arasında üretilmiştir. Bu denemede en yüksek miktarda asetik asit üretimi olduğu görülmektedir. pH değerlerine bakıldığında da değerlerin diğer denemelerden düşük olduğu görülmektedir. Laktik asit sadece HAS 0.5, 1 ve 16 saatlik denemelerde 0.4-1.5 g/L üretilmiştir. Bununla birlikte organik asit üretimi ile pH değerlerinin de düşüşü gözlenmektedir. 2,3-BD üretimi diğer reaktörlerdeki gibi aynı eğilimdedir ve HAS küçüldükçe üretim miktarı artmıştır.



Şekil 4.58 Pomza taşı dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması.

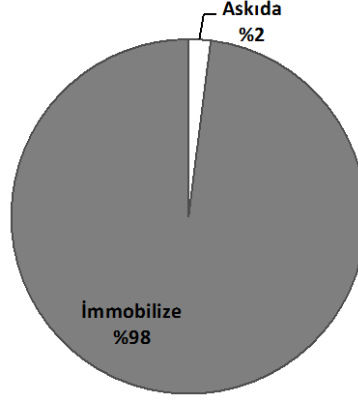
Şekil 4.58'deki grafikte, AKM ve OD değerlerinde sürekli bir artış olduğu görülmektedir. Sadece en uzun HAS'da AKM değerleri düşmüştür, bunun sebebi de mikroorganizmaların ortama adaptasyonundan kaynaklanıyor olabilir. Bu denemede OD ve AKM değerleri birbirine yakın bir eğilim göstermektedir.



Şekil 4.59 Pomza taşı dolgulu biyoreaktördeki malzemelerin SEM görüntüleri; boş (a) ve mikroorganizma bulunan (b).

Şekil 4.59 a ve b'de seramik top dolgu malzemesinin SEM görüntüsünden elde edilen fotoğrafları görülmektedir. B'de malzeme üzerine tutunmuş olan *K. pneumoniae*; basil şeklinde mikroorganizmalar görülebilmektedir Başarılı bir immobilizasyon gerçekleşmiştir. Mikroorganizmalar oldukça yoğun görülmektedirler. Pomza taşının porozlu yapısı mikroorganizma tutunması için oldukça uygundur.

Üretim sonunda yapılan kuru madde analizleriyle seramik silindir malzeme üzerine ve reaktör çeperine tutunan ve askıda haldeki mikroorganizmaların oranı şekil 4.60'daki pasta diyagramında görülmektedir. Malzeme üzerine tutunan mikroorganizma oranı %98'dir.



Şekil 4.60 Pomza taşı kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.

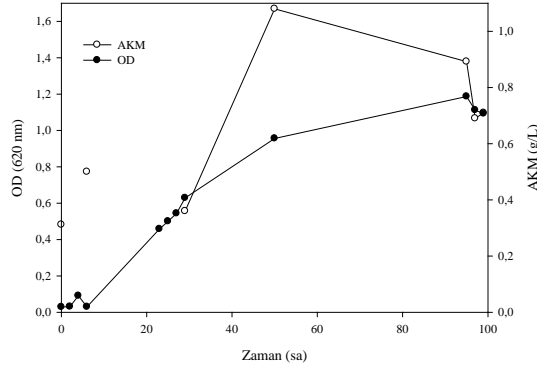


Şekil 4.61 Sürekli üretim sonunda pomza taşı dolgulı biyoreaktörün görünümü.

Şekil 4.61'de pomza taşı dolgulı kolon reaktörün üretim sonrasındaki görüntüsü görülmektedir.

#### 4.2.6 Vukopor ® (VUK) dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları

Şekil 4.62’de VUK dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi gösterilmektedir. Çalışma süresinde tıkanma gibi immobilizasyon çalışmalarında görülebilen bir işletme problemi ile karşılaşılmamıştır.



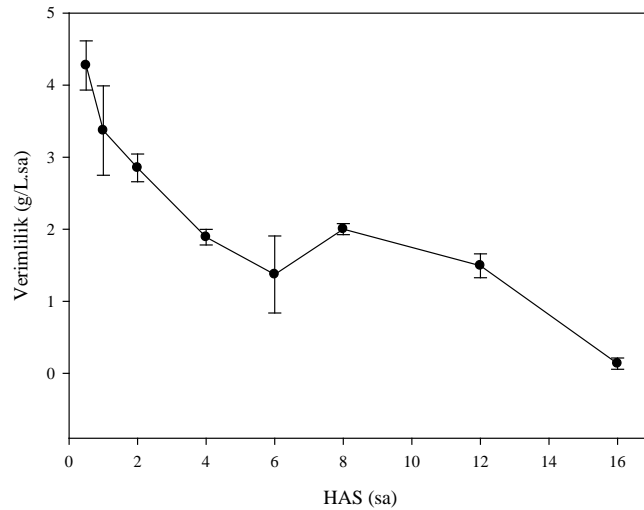
Şekil 4.62 VUK dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi.

Tutundurma çalışmasının ilk 48 saati içerisinde hem OD hem de AKM değerlerinde bir artış olduğu görülmektedir. Bunun ardından 72.saate kadar geçen sürede OD ve AKM değerleri birbirine ters orantılı gitmektedir. Ardından tutundurma çalışması sonuna kadar iki değer de yaklaşık olarak birbirine paralel gitmektedir. 72.saatin sonuna kadar alınan değerler tutunmanın yeterli olduğunu göstermektedir, 95.saate sonuna kadar alınan değerler tutunmanın yeterli olduğunu göstermektedir, 95.saate sonunda ise hem OD hem de AKM değerlerinde bir düşüş olduğu gözlemlenmektedir. Tutunmanın gerçekleşmiş olduğu buradan görülmektedir. Bunun dışında, canlı sayım değerlerine bakıldığında ise yukarıdaki grafikte paralel değerler görülmektedir, fermantasyona başlamadan önce mikroorganizma sayısının düşük olduğu görülmektedir (Çizelge 4.6). Her HAS süresi değiştirildiğinde yapılan sayım sonuçlarına bakıldığında da HAS 12, 8 ve 4 saatlerde değerlerin artışı olduğunu geri kalan HAS değerlerinde ise bir düşüş olduğu gözlenmektedir. Tutundurmaya başlangıç ve bitiş değerleri karşılaştırıldığında ise (HAS=16 sa ve 0.5 sa) mikroorganizmaların AKM miktarında oldukça fazla ( $2.8 \cdot 10^5$  kat) artış olduğu gözlenmektedir.

Çizelge 4.6 VUK dolgulu biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi.

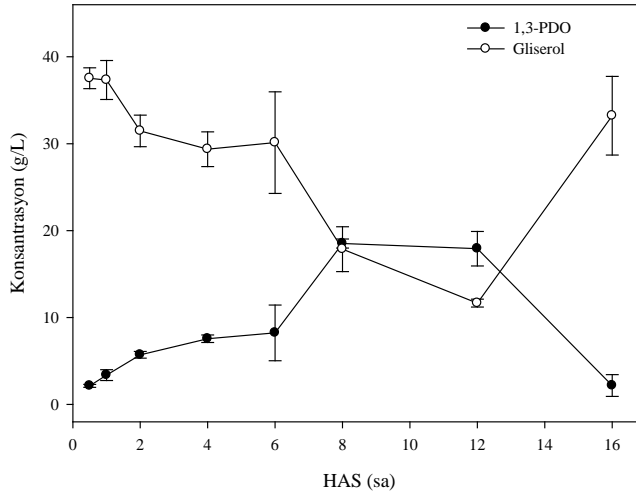
<b>kob/mL örnek</b>	<b>Süreç/HAS (sa)</b>
$1.0 \times 10^3$	Aşı
$8.6 \times 10^8$	6 (Tutundurma Çalışması)
$3.5 \times 10^7$	16
$4.0 \times 10^7$	12
$5.4 \times 10^7$	8
$3.6 \times 10^7$	6
$6.1 \times 10^7$	4
$1.7 \times 10^8$	2
$3.2 \times 10^8$	1
$2.8 \times 10^8$	0.5

Şekil 4.63'teki grafik incelendiğinde HAS 16 saat alıkonma süresinde en düşük üretim verimliliğinin  $0.7 \text{ g/L.sa}$  ortalamasında olduğu görülmektedir. HAS sürelerinin kısalması ile üretim verimliliklerinin arttığı ve  $0.7 \text{ g/L.sa}$ 'ten  $4.6 \text{ g/L.sa}$  ortalamasına kadar çıktığı görülmektedir. 4 ve 8 saatlik alıkonma sürelerinin verimliliklerinin birbirine yakın değerlerde seyretmektedir, 6 ve 12 saatlik alıkonma sürelerinde ise verimlilik bahsedilen değerlerden düşük, 2 saatlik alıkonma süresinden itibaren bu değerlerden daha yüksek değerlere ulaşılmıştır. En yüksek değere bakıldığında, 0.5 saatlik alıkonma süresinde verimliliğin en düşük alıkonma süresindeki değerin 6.5 katına kadar ulaşıldığı görülmektedir.



Şekil 4.63 VUK dolgulu biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması.

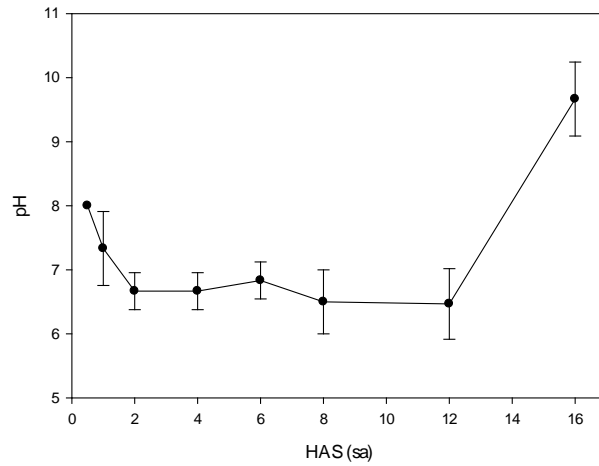
Şekil 4.64'te farklı HAS süreleri ile yapılan denemelerde elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının ortalaması görülmektedir. En yüksek değere 19.8 g/L ile 12 saatlik alıkonma süresinde ulaşmıştır. En düşük konsantrasyon değeri 1.5 g/L 1,3-PDO ile en kısa süre olan 0.5 saatlik alıkonma süresinde görülmüştür. En kısa alıkonma süresi olan 0.5 saatlik sürede elde edilmiştir.



Şekil 4.64 VUK dolgulı biyoreaktörde HAS değışimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonları.

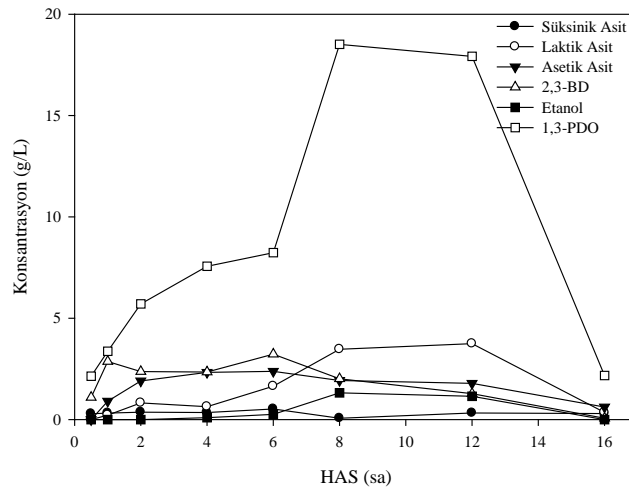
Diğer reaktörlerde de olduğu gibi en düşük alıkonma sürelerinde gliserolün neredeyse hiç tüketilemediği görülmektedir. 8 ve 12 saatlik alıkonma sürelerinde gliserolün büyük kısmı tüketilmiştir. HAS 2 ile 8 saatler ve HAS 16 saatlerde gerçekleştirilen denemelerin gliserol tüketim değerleri birbirlerine yakın çıkmıştır. HAS değerlerinin yükselmesiyle doğru orantılı bir eğilim görülmemek ile birlikte genel tabloya bakıldığında en düşük HAS'da mikroorganizma adaptasyonunun da mümkün olmaması ile gliserol tüketiminin çok azaldığı gözlenmektedir.





Şekil 4.65 VUK dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi.

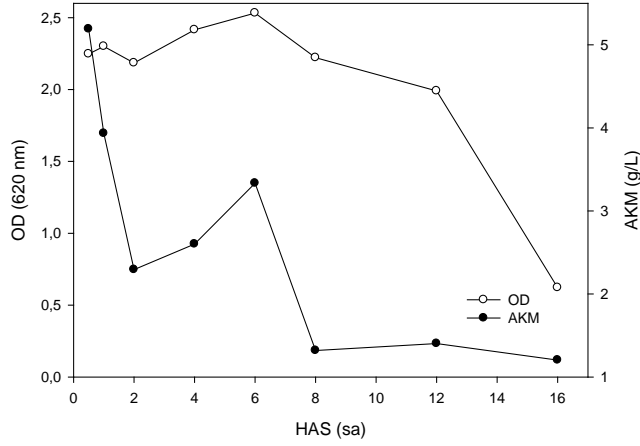
Üretim süresince pH değerinin 6.5-10.0 arasında değiştiği Şekil 4.65'teki grafikten görülmektedir. pH değerinin düşüşü ardından elle gerçekleştirilen baz eklemesi pH'nın 10'a çıkışına sebep olmuştur. Buna rağmen mikroorganizma büyümeye ve üretime devam etmiştir.



Şekil 4.66 VUK dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonları ortalamalarının karşılaştırılması.

Şekil 4.66'da beklenen ana ürün 1,3-PDO ile birlikte üretilen diğer yan ürünlerin ortalama konsantrasyonları da görülmektedir. En yüksek HAS 0.5 saat hariç tüm denemelerde asetik asit 0.8-2.8 g/L arasında üretilmiştir. Laktik asit de aynı şekilde HAS 0.5 saatlik denemede üretilmemiştir, diğer üretimlerde 0.6-4.3 g/L arasında üretilmiştir. Süksinik asit ise eser miktarda da olsa (0.1-0.5 g/L

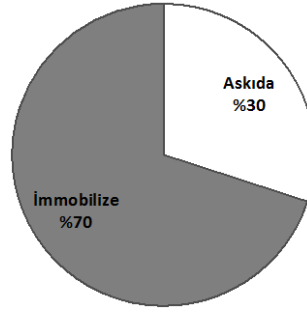
arasında) tüm üretimlerde üretilmiştir. Etanol sadece kısa alıkonma sürelerinde üretilebilmiştir. Diğer grafiklerde de görüldüğü gibi bu denemelerde pH değerleri daha düşüktür. Diğer yan ürünler eser miktarda üretilirken, HAS uzadıkça 2,3-BD üretiminde bir artış olduğu görülmektedir, maksimum 3.22 g/L (HAS=6 sa) üretilmiştir.



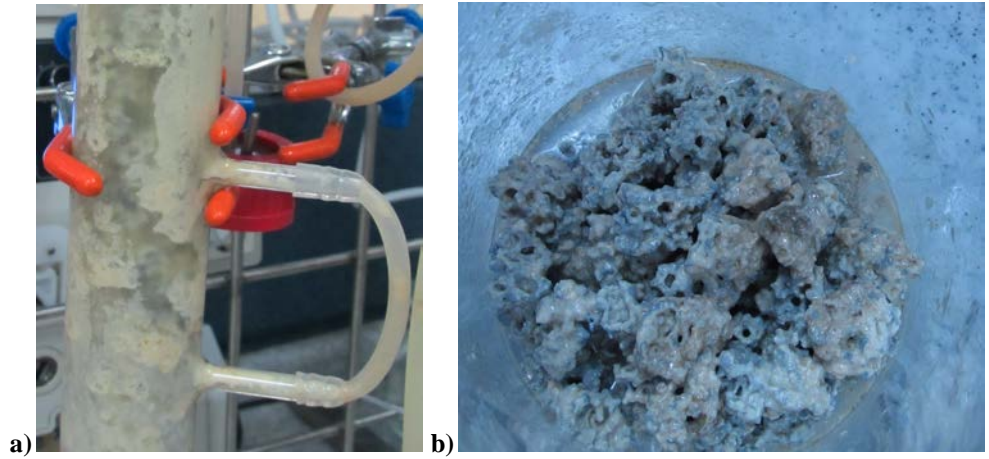
Şekil 4.67 VUK dolgulı biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.67'deki grafikte, en düşük HAS'da yüksek bir AKM değeri görülmektedir. Ardından HAS 6 saatte hızlı bir artış gerçekleşmiş ve HAS 8-16 saatleri arasında hızlı bir düşüş ile fermantasyon başlangıç değerinden düşük bir değer ile fermantasyonu tamamlamıştır. OD değerlerindeki düşüş mikroorganizmanın canlı sayım değerleri ile de paralellik göstermektedir.

Üretim sonunda yapılan kuru madde analizleriyle VUK malzeme üzerine ve reaktör çeperine tutunan ve askıda haldeki mikroorganizmaların oranı şekil 4.68'teki pasta diyagramında görülmektedir. Malzeme üzerine tutunan mikroorganizma oranı %70 iken geri kalan %30'luk kısım askıda haldeki mikroorganizmayı oluşturmaktadır.



Şekil 4.68 VUK kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.

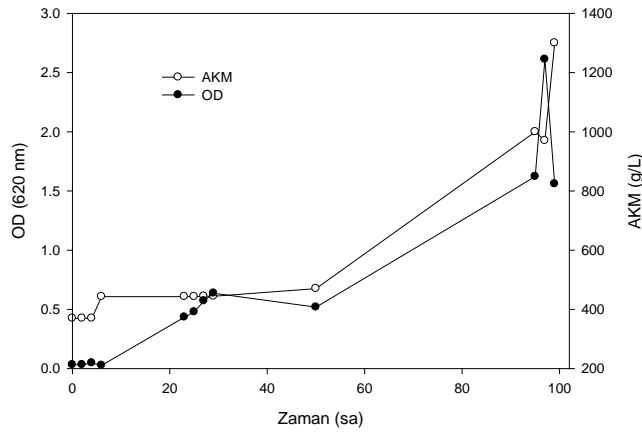


Şekil 4.69 Sürekli üretim sonunda VUK dolgu biyoreaktörün görünümü; kolon reaktör (a) ve malzeme (b).

Şekil 4.69 a ve b'de VUK dolgu kolon reaktörün üretim sonrasındaki görüntüleri görülmektedir.

#### 4.2.7 Cam Rashing halkaları dolgu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları

Şekil 4.70'te cam Rashing halkaları dolgu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi gösterilmektedir. Çalışma süresinde tıkanma gibi immobilizasyon çalışmalarında görülebilen bir işletme problemi ile karşılaşılmamıştır.



Şekil 4.70 Cam Rashingshalkaları dolgulı biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değışimi.

Tutundurma çalışmasının ilk 24 saati içerisinde hem OD hem de AKM değerlerinde bir artış olduğu görülmektedir. Bunun ardından 48.saate kadar geçen sürede OD ve AKM değeri birbirine paralel gitmektedir. Ardından yine tutundurma çalışması sonuna kadar iki değeri de birbirine paralel gitmektedir. 95.saat sonunda ise hem OD hem de AKM değeri ciddi bir artış olduğu gözlemlenmektedir. Ardından hemen OD ve AKM değeri paralel olarak bir düşüş yapmıştır ve bu da tutunmanın tamamlandığını göstermektedir. Bunun dışında, canlı sayım değerlerine bakıldığında ise yukarıdaki grafikteki paralel değeri görülmektedir, fermentasyona başlamadan önce isemikroorganizma sayısının çok az olduğu görülmektedir (Çizelge 4.7). Her HAS süresi değıştirildiğinde yapılan sayım sonuçlarına bakıldığında da HAS 6'da mikroorganizma sayısında 10 kat artış olmuş daha sonra değeri tekrar azalmış ve yine sabit kalmışlardır.Fermentasyona başlangıç ve bitiş değeri karşılaştırıldığında ise (HAS=16 sa ve 0.5 sa) mikroorganizma sayısının hemen hemen aynı kaldığı görülmektedir.

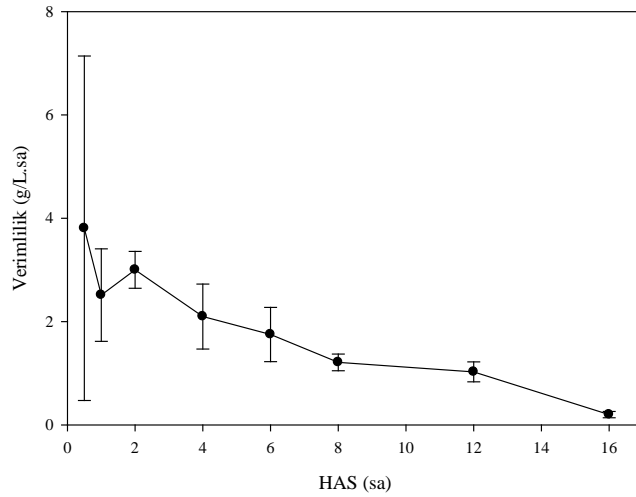
Şekil 4.71'deki grafik incelendiğinde HAS 16 saat alıkonma sürelerinde birbirlerine yakın değeri en düşük üretim verimliliği sırası ile 0.3 g/L.sa ortalamasında olduğu görülmektedir. HAS sürelerinin kısalması ile üretim verimliliklerinin arttığı ve 0.3 g/L.sa'ten 7.6 g/L.sa ortalamasına kadar çıktığı görülmektedir. 8 ve 12 saatlik alıkonma sürelerinin verimlilikleri birbirine yakın değeri seyretilmektedir, 6 saatlik alıkonma süresine doğru ise verimlilik bahsedilen değeri yükselmektedir, 1 saatlik alıkonma süresinde bu değeri hafif bir düşüş gözlenmekte ve HAS 0.5 saatte en yüksek değeri çıkmıştır. Böylece, en yüksek değeri bakıldığında, 0.5 saatlik alıkonma süresinde

verimliliğin en yüksek alıkonma süresindeki değerin 25 katına kadar ulaşıldığı görülmektedir.

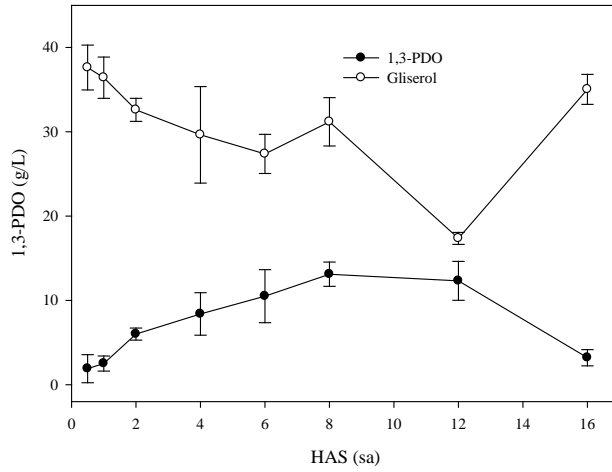
Çizelge 4.7 Cam Rashingalkaları dolgulu biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi.

<b>kob/mL örnek</b>	<b>Süreç/HAS (sa)</b>
$1.0 \times 10^3$	Aşı
$8.2 \times 10^8$	6 (Tutundurma Çalışması)
$6.8 \times 10^7$	16
$5.0 \times 10^7$	12
$2.2 \times 10^7$	8
$1.5 \times 10^8$	6
$4.5 \times 10^7$	4
$1.3 \times 10^7$	2
$2.3 \times 10^7$	1
$1.4 \times 10^8$	0.5

Şekil 4.72’de farklı HAS süreleri ile yapılan denemelerde elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının ortalaması görülmektedir. En yüksek değere 14.9 g/L ile 12 saatlik alıkonma süresinde ulaşmıştır. En düşük konsantrasyon değeri 0.8 g/L 1,3-PDO ile en kısa süre olan 0.5 saatlik alıkonma süresinde görülmüştür. En yüksek üretim verimliliğinin en kısa alıkonma süresi olan 0.5 saatte elde edilmiştir.

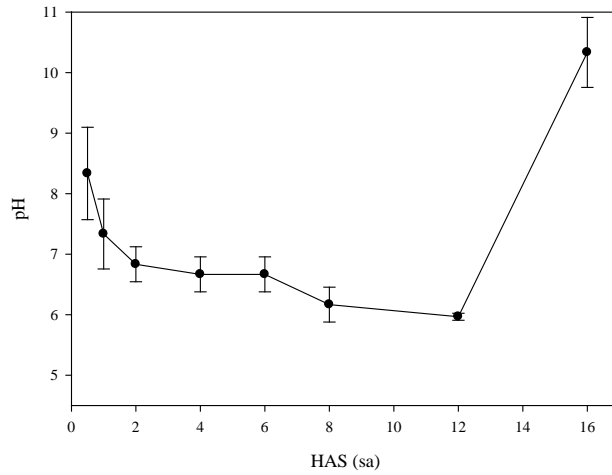


Şekil 4.71 Cam Rashingalkaları dolgulu biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması.



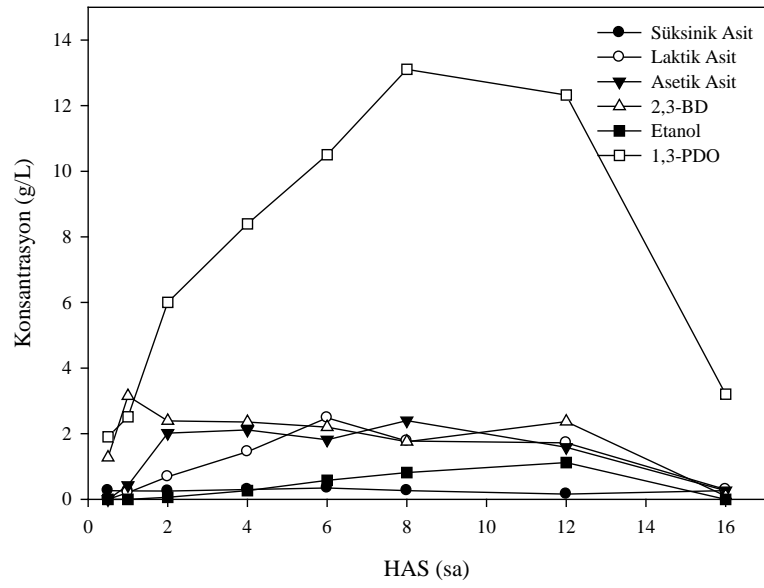
Şekil 4.72 Cam Rashing halkaları dolgulu biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

12 saatlik alıkonma süresinde gliserolün büyük kısmı tüketilmiştir. HAS 0.5 ve 16 saatlerde gerçekleştirilen denemelerin gliserol tüketim değerleri birbirlerine yakın çıkmıştır.



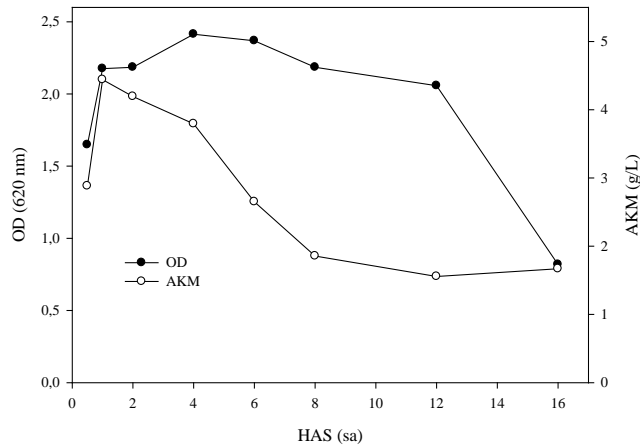
Şekil 4.73 Cam Rashing halkaları dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi.

Üretim süresince pH değerinin 5.9-9.0 arasında değiştiği Şekil 4.73'teki grafikten görülmektedir. En yüksek HAS değerinde 1,3-PDO üretimlerinin ve yan ürün üretimlerinin de düşük olmasına bağlı olarak ortam pH'sının yüksek değerlerde kalmıştır bununla birlikte pH değeri HAS 16'da 9'a kadar çıkmıştır çünkü pH ayarlaması için baz eklemesi gerçekleştirilmiştir.



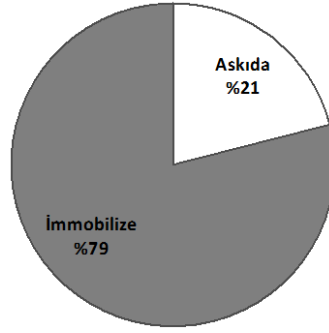
Şekil 4.74 Cam Rashing halkaları dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması.

Şekil 4.74'te 1,3-PDO ile birlikte üretilen diğer yan ürünlerin ortalama konsantrasyonları görülmektedir. Süksinik asit tüm HAS'ta eser miktarlarda üretilmiştir (0.1-0.6 g/L arasında). En yüksek ve en düşük HAS (0.5 ve 16 saat) hariç tüm denemelerde asetik asit 0.8 – 2.5 g/L ve laktik asit 0.7 – 3.2 g/L arasında üretilmiştir. 2,3-BD ve etanol de en fazla 3.5 g/L'ye kadar üretilebilmiştir.



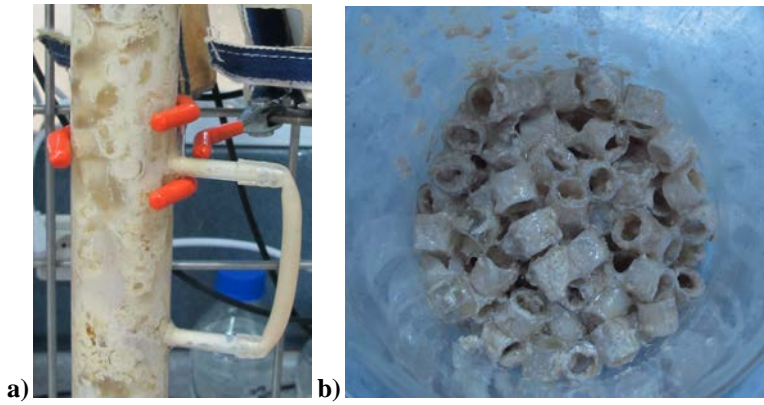
Şekil 4.75 Cam Rashing halkaları dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.75'teki grafikte, en düşük HAS'da düşük bir AKM değeri görülmektedir. Ardından HAS 0.5 saatte hızlı bir artış gerçekleşmiş ve HAS 1-12 saatleri arasında hızlı bir düşüş gözlenmiştir. Ardından hem OD hem de AKM değerleri stabil kalmıştır. AKM ve yoğunluk değerleri üretim süresince birbirlerine paralel gitmektedir. HAS süreleri kısaldıkça mikroorganizma büyümesi gözlenmiştir. Bu durum Çizelge 4.7'de de görülmektedir.



Şekil 4.76 Cam Rashing halkaları kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.

Üretim sonunda yapılan kuru madde analizleriyle cam Rashing halkaları üzerine ve reaktör çeperine tutunan ve askıda haldeki mikroorganizmaların oranı Şekil 4.76'daki pasta diyagramında görülmektedir. Malzeme üzerine tutunan mikroorganizma oranı %79'dur.



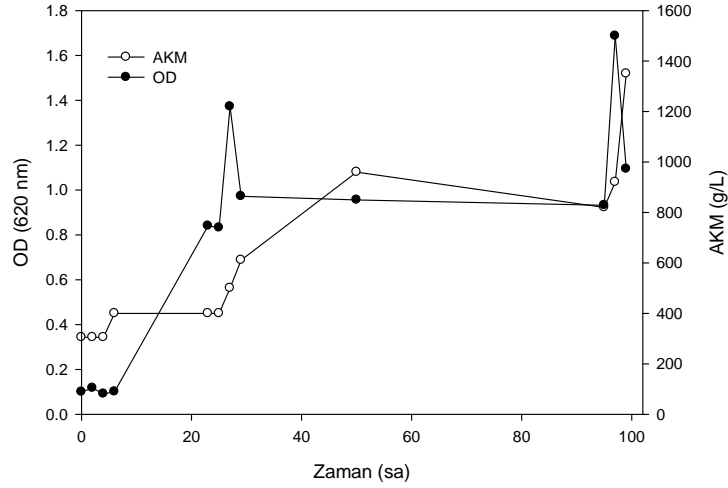
Şekil 4.77 Sürekli üretim sonunda cam Rashing halkaları dolgulu biyoreaktörün görünümü; kolon reaktör (a) ve malzeme (b).

Şekil 4.77 a ve b'de cam Rashing halkaları dolgulu kolon reaktörün üretim sonrasındaki görüntüleri görülmektedir.



#### 4.2.8 Çelik tel dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları

Şekil 4.78’te çelik tel dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi gösterilmektedir. Çalışma süresinde çelik telin yapısından dolayı tıkanma problemi ile sık sık karşılaşmıştır.



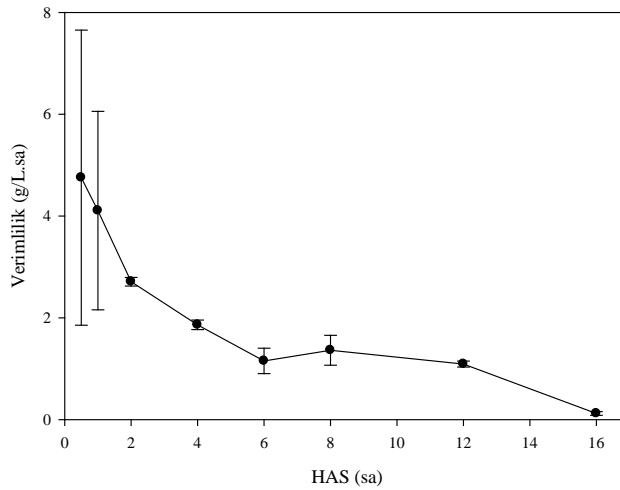
Şekil 4.78 Çelik tel dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi.

Tutundurma çalışmasının ilk 24 saati içerisinde hem OD hem de AKM değerlerinde bir artış olduğu görülmektedir. Bunun ardından 85.saate kadar geçen sürede OD ve AKM değerleri birbirlerine paralel ve stabil gitmektedir. 1 saatte hızlı bir yükselişin ardından değerlerde bir düşüş gözlenmektedir bu da tutundurmanın başarılı olduğunu gösterir. Bunun dışında, canlı sayım değerlerine bakıldığında ise yukarıdaki grafikte paralel değerler görülmektedir, fermantasyona başlamadan önce isemikroorganizma sayısının çok az olduğu görülmektedir (Çizelge 4.8). Her HAS süresi değiştirildiğinde yapılan sayım sonuçlarına bakıldığında da HAS 12 ve 2 saatte bir yükseliş olduğunu geri kalan HAS değerlerinde ise bir düşüş olduğu gözlenmektedir. Fermantasyona başlangıç ve bitiş değerleri karşılaştırıldığında ise (HAS=16 sa ve 0.5 sa) mikroorganizmaların birbirine yakın bir değerde olduğu ve stabil kaldıkları ve çok az bir artış olduğu gözlenmektedir.

Çizelge 4.8 Çelik tel dolgulı biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi.

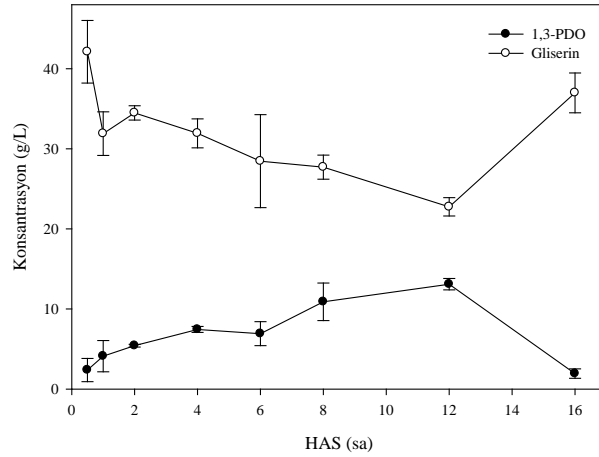
<u>kob/mL örnek</u>	<u>Sürec/HAS (sa)</u>
$1.0 \times 10^3$	Aşı
$6.9 \times 10^8$	6 (Tutundurma Çalışması)
$6.3 \times 10^7$	16
$1.6 \times 10^8$	12
$6.6 \times 10^7$	8
$9.1 \times 10^7$	6
$7.6 \times 10^7$	4
$1.9 \times 10^8$	2
$3.8 \times 10^7$	1
$9.8 \times 10^7$	0.5

Şekil 4.79'daki grafik incelendiğinde HAS 16 saat alıkonma süresinde en düşük üretim verimliliği 0.09 g/L.sa ortalamasında olduğu görülmektedir. HAS sürelerinin kısalması ile üretim verimliliklerinin arttığı ve oldukça düşük bir değer olan 0.09 g/L.sa'ten 8.0 g/L.sa ortalamasına kadar çıktığı görülmektedir. 6, 8 ve 12 saatlik alıkonma sürelerinin verimlilikleri birbirine yakın değerlerde seyretmektedir, diğer HAS'larda ise değerler ters orantılı olarak gittikçe yükselmektedir. En yüksek değere bakıldığında, 0.5 saatlik alıkonma süresinde verimliliğin en düşük alıkonma süresindeki değer 8 katına kadar ulaşıldığı görülmektedir.



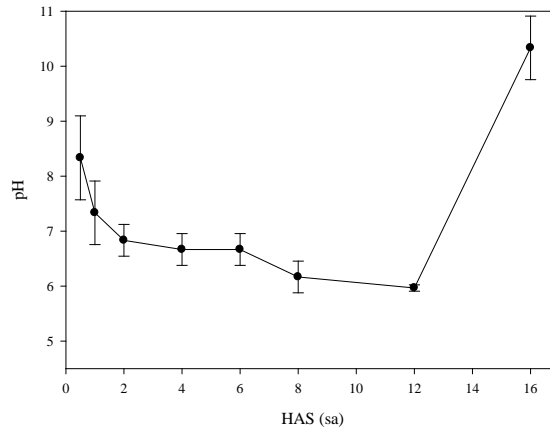
Şekil 4.79 Çelik tel dolgulı biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.80’de farklı HAS süreleri ile yapılan denemelerde elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının ortalaması görülmektedir. En yüksek değere 13.7 g/L ile 12 saatlik alıkonma süresinde ulaşmıştır. En düşük konsantrasyon değeri 1.2 g/L 1,3-PDO ile en kısa süre olan 0.5 saatlik alıkonma süresinde görülmüştür. En yüksek üretim verimliliği en kısa alıkonma süresi olan 0.5 saatte elde edilmiştir.



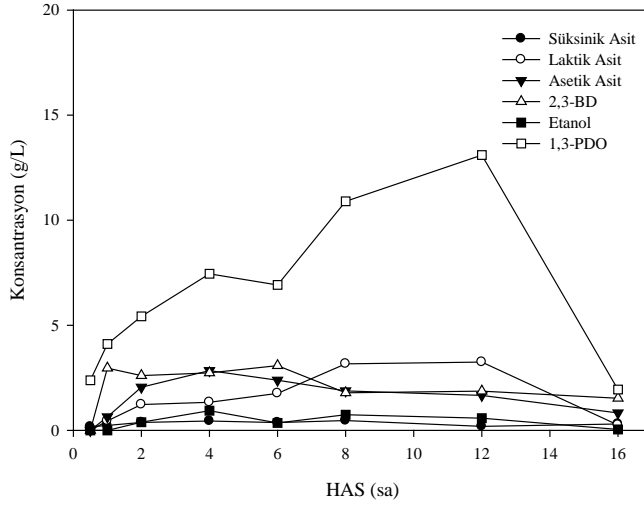
Şekil 4.80 Çelik tel dolgulu biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

Gliserol 8 ve 12 saat HAS’lar dışında çok az tüketilmiştir. Süksinik asit tüm HAS’larda eser miktarlarda üretilmiştir (0.1-0.9 g/L arasında). En yüksek ve en düşük HAS (0.5ve 16 saat) hariç tüm denemelerde asetik asit 0.5 – 2.5 g/L ve laktik asit 0.8 – 3.9 g/L arasında üretilmiştir. 2,3-BD ve etanol de en fazla 4.5 g/L’ye kadar üretilebilmiştir.



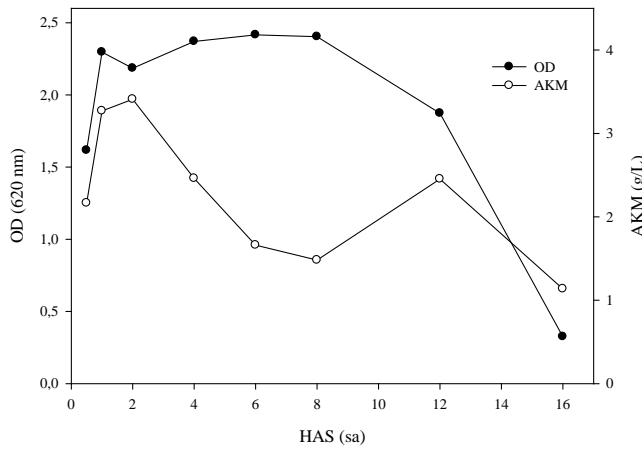
Şekil 4.81Çelik tel dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi.

Üretim süresince pH değerinin 5.9-11.0 arasında değiştiği Şekil 4.81'deki grafikten görülmektedir. Ayrıca pH dengelemesi ardından mikroorganizmaların tekrar ortama adapte olmaları çelik tel malzemesinde oldukça uzun sürmüştür.



Şekil 4.82 Çelik tel dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması.

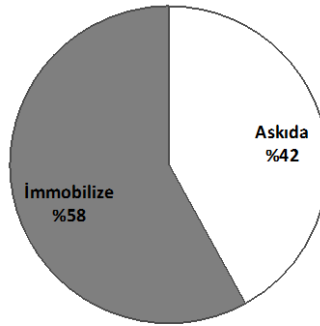
Şekil 4.82'de 1,3-PDO ile birlikte üretilen diğer yan ürünlerin ortalama konsantrasyonları görülmektedir.



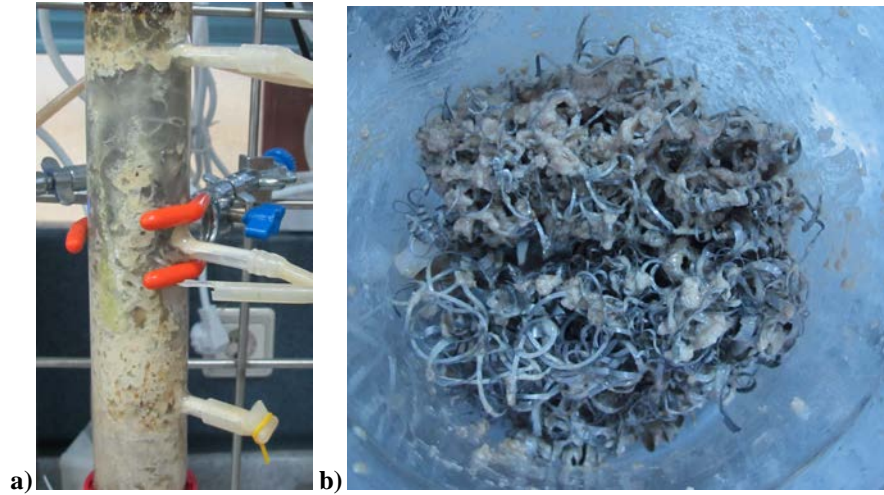
Şekil 4.83 Çelik tel dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.83'teki grafikte, en düşük HAS'da ortalamadan yüksek bir AKM değeri görülmektedir. Fermantasyon çalışmasının sonundan başına kadar AKM değerleri oldukça yükselmiştir.

Üretim sonunda yapılan kuru madde analizleriyle çelik tel malzeme üzerine ve reaktör çeperine tutunan ve askıda haldeki mikroorganizmaların oranı Şekil 4.84'teki pasta diyagramında görülmektedir. Malzeme üzerine tutunan mikroorganizma oranı %58 iken geri kalan %42'lik kısım askıda haldeki mikroorganizmayı oluşturmaktadır.



Şekil 4.84 Çelik tel kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.

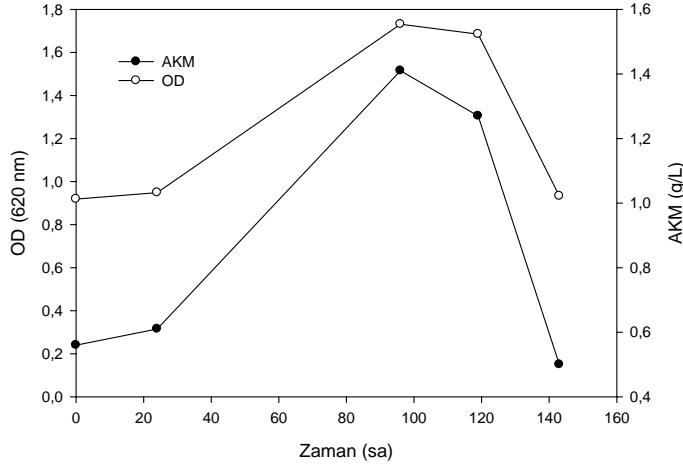


Şekil 4.85 Sürekli üretim sonunda çelik tel dolgu kolon reaktörün görünümü; kolon reaktör (a) ve malzeme (b).

Şekil 4.85 a ve b'de çelik tel dolgu kolon reaktörün üretim sonrasındaki görüntüleri görülmektedir. Atık gliserol içerisindeki tüm safsızlıklar katı halde malzeme üzerine yapışarak ortamdan atılamamakta ve AKM değerlerinin yüksek çıkmasına sebep olmaktadır. Bu atık kullanımı ile karşılaşılan bir problemdir.

#### 4.2.9 Seramik halka dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları

Şekil 4.86'da seramik halka dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi gösterilmektedir.



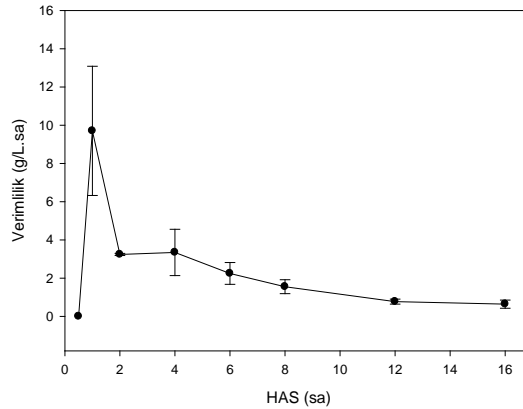
Şekil 4.86 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde mikroorganizma tutundurma çalışmaları süresince zamana karşı OD ve AKM değişimi.

Tutundurma çalışmasının ilk 48 saati içerisinde büyümeye bağlı olarak hem OD hem de AKM değerlerinde bir artış olduğu görülmektedir. İki değer de çalışma süresince birbirine paralel gitmektedir, 48.saatten sonra ise iki değerde de ciddi artış gözlenmektedir. Bu da mikroorganizma tutunmasına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bunun dışında, canlı sayım değerlerine bakıldığında ise tutundurma çalışmasının ilk aşamasında mikroorganizmaların ortama adaptasyon sağladığını, ardından mikroorganizma sayısında bir artış olduğu görülmektedir (Çizelge 4.9). Fermantasyon çalışması öncesinde değerlerde az bir artış gözlemlense de bu sonuçlar AKM ve OD değerler ile örtüşmektedir. Her HAS süresi değiştirildiğinde yapılan sayım sonuçlarına bakıldığında da en yüksek HAS süresinde değerler oldukça düşüktür. HAS 4 ve 6 saatlere kadar bir yükseliş olmuş ardından en yüksek seviyeye ulaşan canlı sayımlarda tekrar bir artış gözlemlenmiştir. Fermantasyona başlangıç ve bitiş değerleri karşılaştırıldığında ise (HAS=16 sa ve 0.5 sa) seyreltme hızında artış olmasına rağmen mikroorganizma miktarında 10 kat bir artış olduğu görülmektedir. Bu biyoreaktör diğerleri ile karşılaştırıldığında mikroorganizma sayısının genel olarak 10 kat daha az olduğu söylenebilir. Diğer reaktörlere nazaran bu reaktörde mikroorganizmalar daha az büyüme göstermişlerdir.

Çizelge 4.9 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde tutundurma çalışması ve fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi.

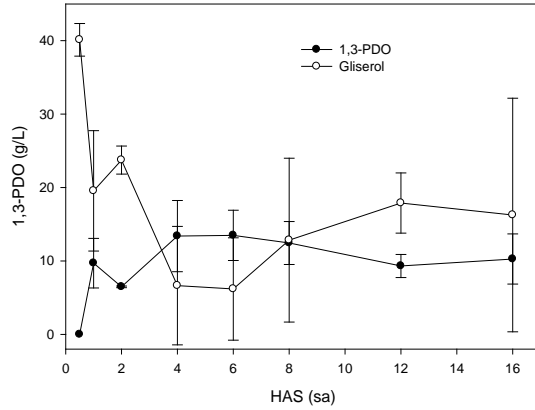
<b>kob/mL örnek</b>	<b>Sürec/HAS (sa)</b>
$6.3 \times 10^7$	Aşı
$1.3 \times 10^8$	Tutundurma Çalışması HAS = 6
$1.3 \times 10^9$	
$1.8 \times 10^9$	
$1.5 \times 10^9$	
$9.3 \times 10^8$	
$6.5 \times 10^7$	
$2.6 \times 10^8$	12
$2.7 \times 10^8$	8
$4.4 \times 10^8$	6
$9.7 \times 10^8$	4
$4.0 \times 10^8$	2
$5.9 \times 10^8$	1
$6.4 \times 10^8$	0.5

Şekil 4.87'deki grafik incelendiğinde HAS 12 ve 16 saat alıkonma sürelerinde birbirlerine yakın değerlerde en düşük üretim verimlilikleri sırası ile 0.7 ve 0.6 g/L.sa ortalamalarında olduğu görülmektedir. HAS sürelerinin kısalması ile üretim verimliliklerinin arttığı ve 0.5 g/L.sa'ten 9.7 g/L.sa ortalamasına kadar çıktığı görülmektedir. En yüksek verimliliğe ulaştıktan sonra değerlerde ters orantılı bir grafik seyretmektedir. HAS süresi uzadıkça verimlilikler azalmaktadır. 2 ve 4 saatlik alıkonma sürelerinin verimliliklerinin birbirine yakın değerlerde seyretmektedir, 6 ve 8 saatlik alıkonma sürelerinde değerler arasında çok az farklılık vardır, en düşük alıkonma süresinde ise verimlilik bahsedilen değerlerden oldukça düşüktür. En yüksek değere bakıldığında 1 saatlik alıkonma süresinde 19 kat daha yüksek bir verimliliğe ulaşıldığı görülmektedir.



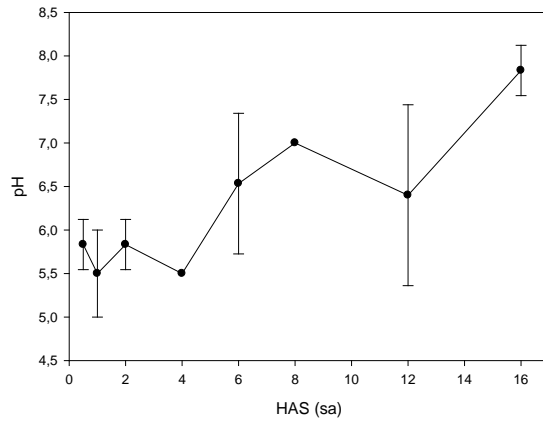
Şekil 4.87 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde farklı HAS sürelerinde 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.88’de farklı HAS süreleri ile yapılan denemelerde elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının ortalaması görülmektedir. En yüksek değere 13.5 g/L ile 6 saatlik alıkonma süresinde ulaşmıştır. En düşük konsantrasyon değeri 0.5 g/L 1,3-PDO ile en kısa süre olan 0.5 saatlik alıkonma süresinde görülmüştür. En yüksek üretim verimliliği en kısa alıkonma sürelerinden olan 1 saate elde edilmiştir.



Şekil 4.88 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde HAS değişimlerinde 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

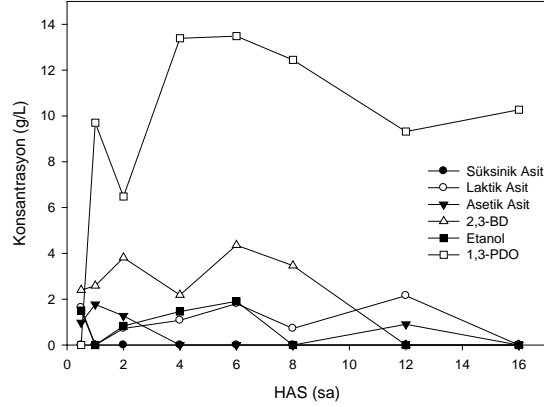
4 ve 6 saatlik kısa alıkonma sürelerinde gliserolün büyük kısmı tüketilmiştir. HAS 12 ve 16 saatlerinde gerçekleştirilen denemelerin gliserol tüketim değerleri birbirlerine yakın çıkmıştır. Optimum tüketim gerçekleşen HAS değerleri dışındaki değerlerde süre kısaltıkça tüketim de oldukça azalmaktadır ancak süre çok uzadıkça da tüketimin oldukça azaldığı gözlemlenmiştir. Daha kısa HAS sürelerinde düşük HAS’da gliserol tüketiminin çok azaldığı gözlenmektedir.



Şekil 4.89 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde tüm HAS değerlerinde pH değişimi.

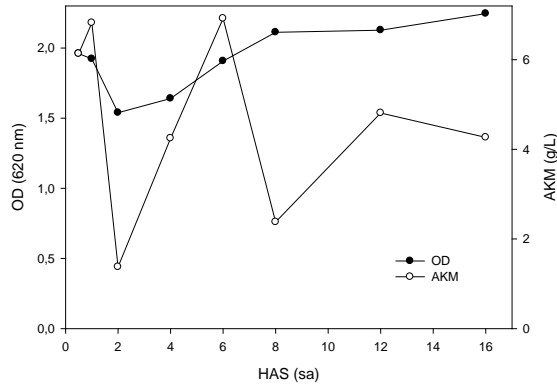


Üretim süresince pH değerinin 5.5-7.75 arasında değiştiği Şekil 4.89'daki grafikten görülmektedir.



Şekil 4.90 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması.

Şekil 4.90'da 1,3-PDO ile birlikte üretilen diğer yan ürünlerin ortalama konsantrasyonları görülmektedir. Sadece HAS 0.5, 1, 2 ve 12 saatteki denemelerde asetik asit 0.9-1.7 g/L arasında üretilmiştir. Laktik asit en yüksek ve en düşük HAS hariç diğer denemelerde 0.7-2.1 g/L arası ortalama konsantrasyonlarda üretilmiştir. Bununla birlikte organik asit üretimi ile pH değerlerinin de düşüşü gözlenmektedir. Etanol sadece kısa alıkonma (HAS=6 ve 1 saatler arası) sürelerinde üretilmiştir. Diğer yan ürünler eser miktarda üretilirken, HAS kısaltıkça 2,3-BD üretiminde bir artış olduğu görülmektedir, maksimum üretim HAS=4 sa'te 4.37 g/L olmuştur.

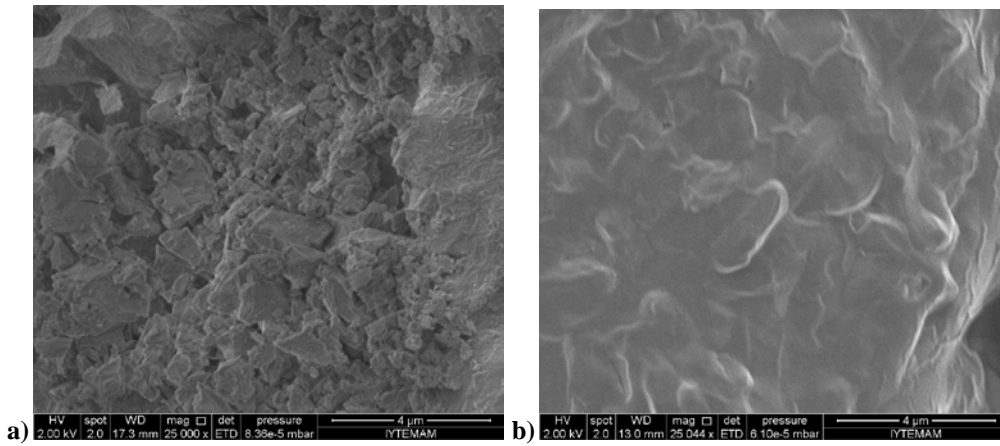


Şekil 4.91 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde farklı HAS değerlerinde OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması.

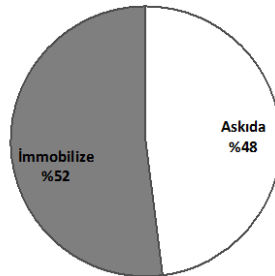
Şekil 4.91'deki grafikte dalgalanan bir AKM değeri görülmektedir. HAS 2 saatteki düşüşün bir ölçüm hatası olduğu göz önünde bulundurulursa genel eğilimin HAS azaldıkça AKM artışı şeklinde olduğu görülmektedir.

Şekil 4.92 a ve b'de seramik halka dolgu malzemesinin SEM görüntüsünden elde edilen fotoğrafları görülmektedir. B'de malzeme üzerine tutunmuş olan *K. pneumoniae* görülebilmektedir.

Üretim sonunda yapılan kuru madde analizleriyle seramik silindirik malzeme üzerine ve reaktör çeperine tutunan ve askıda haldeki mikroorganizmaların oranı Şekil 4.93'teki pasta diyagramında görülmektedir. Malzeme üzerine tutunan mikroorganizma oranı %52 iken geri kalan %48'lik kısım askıda haldeki mikroorganizmayı oluşturmaktadır. En az oranda tutunma bu malzeme de gözlemlenmiştir.

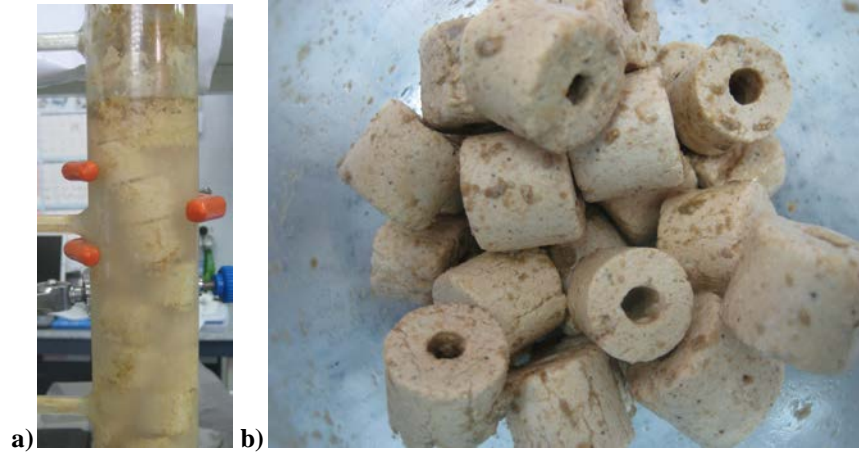


Şekil 4.92 Seramik halka dolgulu biyoreaktörde malzemelerin SEM görüntüleri; boş (a) ve mikroorganizma bulunan (b).



Şekil 4.93 Seramik halka kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.

Şekil 4.94 a ve b’de seramik top dolgulu kolon reaktörün üretim sonrasındaki görüntüleri görülmektedir.



Şekil 4.94 Sürekli üretim sonunda seramik halka dolgulu biyoreaktörün görünümü; kolon reaktör (a) ve malzeme (b).

#### 4.2.10 Giriş gliserol konsantrasyonu artırılarak gerçekleştirilen cam boncuk dolgulu biyoreaktör denemesi sonuçları

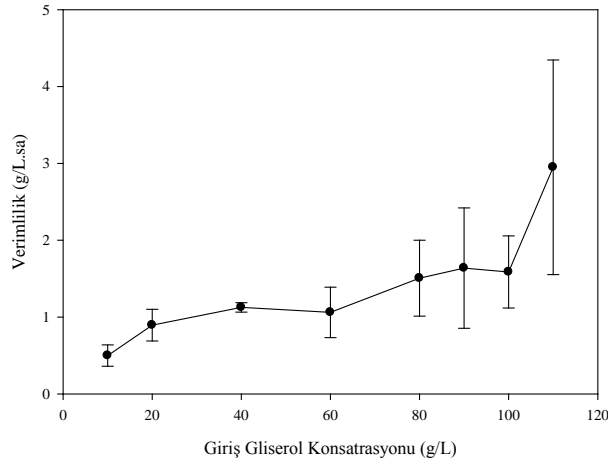
Tutundurma çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre giriş gliserolkonsantrasyonu denemesi mikroorganizmaları tutundurma sürecinin ardından HAS=8 sa olacak şekilde cam boncuk dolgulu kolon reaktörde çalışılmıştır. Sonuçlar aşağıda raporlanmıştır.

Çizelge 4.10 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde fermantasyon çalışması sırasında elde edilen canlı sayımların sonuç çizelgesi.

<u>kob/mL örnek</u>	<u>Giriş Gliserol Konsantrasyonu (g/L)</u>
$8.6 \times 10^6$	10
$1.6 \times 10^6$	20
$6.1 \times 10^5$	40
$3.6 \times 10^5$	60
$5.4 \times 10^5$	80
$3.1 \times 10^5$	90
$5.5 \times 10^5$	100
$3.4 \times 10^5$	110

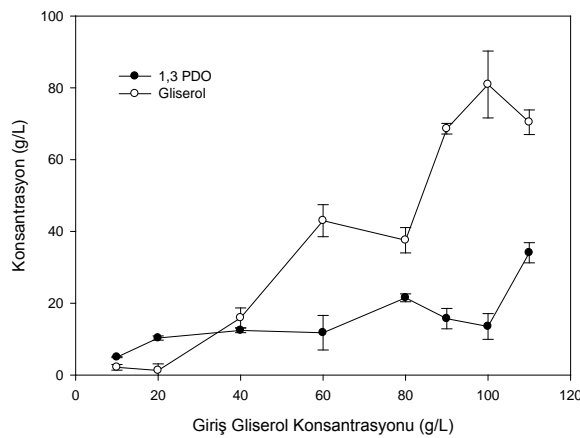
Çizelge 4.10’da görüldüğü gibi giriş gliserol konsantrasyonu 20 g/L’nin üzerine çıktığında askıda mikroorganizma oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu durum mikroorganizmaların malzeme üzerin tutunması ile açıklanabilir. Bunun

sebebinin de aşırı organik yükleme sonucu sadece malzeme üzerine tutunabilen mikroorganizmaların canlı kalması, askıda kalanların ortamdan süpürülmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



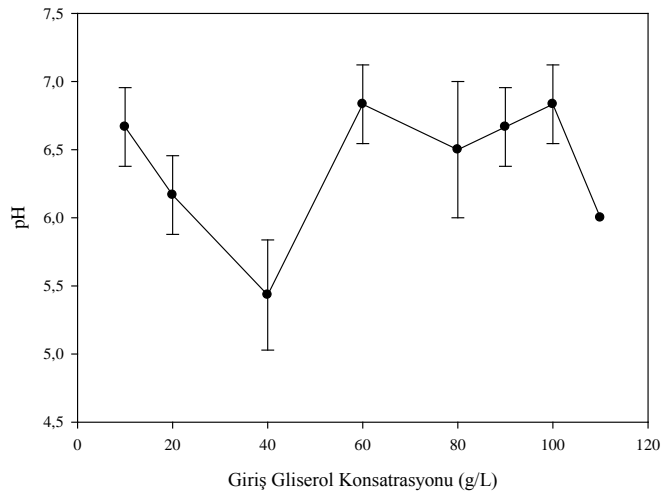
Şekil 4.95 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde farklı giriş gliserol konsantrasyonlarında 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.95'deki grafik incelendiğinde gliserol konsantrasyonu 10 ve 90 g/L iken en düşük üretim verimlilikleri sırası ile 0.9 ve 0.5 g/L.sa ortalamalarında olduğu görülmektedir. En yüksek değere ise 100 g/L giriş konsantrasyonunda ulaşılmıştır (2.3 g/L.sa ortalama değer). 90 g/L giriş substrat konsantrasyonu dahil edilmediği takdirde konsantrasyon artışına bağlı olarak doğrusal ve stabil bir verimlilik artışı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.96 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde farklı giriş gliserol konsantrasyonlarında 1,3-PDO ve artan gliserol konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

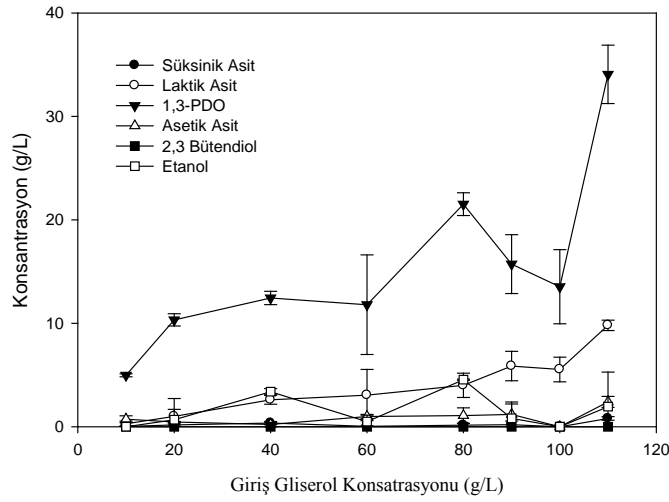
Şekil 4.96'da denemelerde elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonlarının ortalaması görülmektedir. En yüksek değere 36.3 g/L ile 110 g/L gliserol konsantrasyonunda ulaşılmıştır. En düşük konsantrasyon değeri 5.4 g/L 1,3-PDO verimlilikte de düşüşün yukarıdaki grafikte belirtildiği 90 g/L konsantrasyonda görülmüştür. 10 ve 20 g/L giriş gliserol konsantrasyonunda tüm gliserol tüketilirken, giriş konsantrasyonu arttıkça tüketim değerlerinin azaldığı görülmektedir. Bununla birlikte 110 g/L giriş gliserol konsantrasyonunda bir önceki konsantrasyona göre daha fazla bir tüketim gözlemlenmiştir.



Şekil 4.97 Cam boncuk dolgu biyoreaktörde farklı giriş gliserol konsantrasyonlarında pH değişimi.

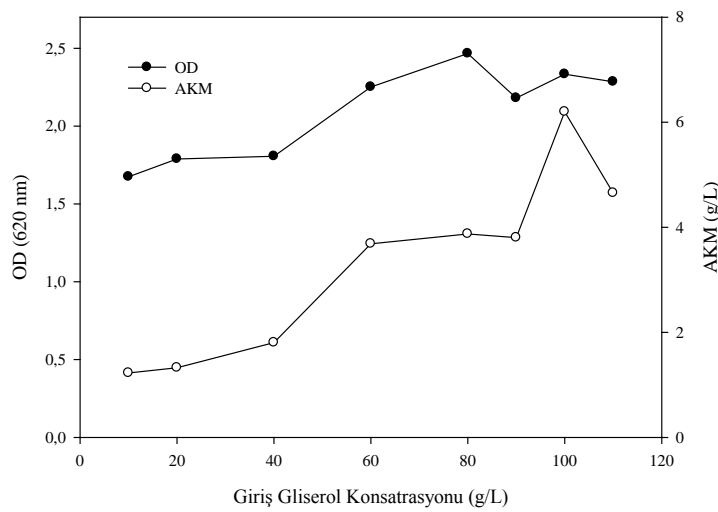
Üretim süresince pH değerinin 5.0-7.2 arasında değiştiği Şekil 4.97'deki grafikten görülmektedir. 40 g/L giriş gliserol konsantrasyonundaki ani düşüş uzun süreli baz eklemesi yapılamamasından kaynaklanmış olduğu düşünülmektedir.

Şekil 4.98'de 1,3-PDO ile birlikte üretilen diğer yan ürünlerin konsantrasyonları görülmektedir. Asetik asit 0.7-3.2 g/L arasında üretilmiştir. Laktik asit üretimi en yüksek giriş konsantrasyonunda 11 g/L'ye kadar ulaşmıştır. 2,3-BD hiç üretilmezken, etanol en yüksek giriş gliserol konsantrasyonunda 3.7 g/L üretilmiştir. Düşük gliserol konsantrasyonlarında verimler 0.7 mol 1,3-PDO/mol'e kadar ulaşırken, substrat konsantrasyonu arttıkça verim değerleri 0.07 mol/mol'e kadar gerilemiştir (90 g/L giriş gliserol konsantrasyonunda).



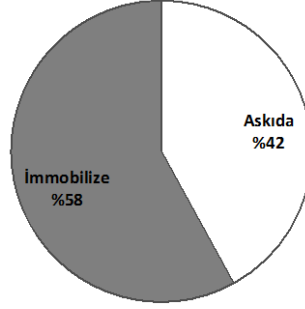
Şekil 4.98 Cam boncuk dolgulu biyoreaktörde farklı giriş gliserol konsantrasyonlarında ana ürün ve yan ürün konsantrasyonlarının ortalamalarının karşılaştırılması.

Şekil 4.99'deki grafikte, OD ve AKM değerlerinin eğiliminin birbirine benzer olduğu görülmektedir. OD değerleri 1.5 – 2.5 arasında değişmiştir ve bu artışın aynı zamanda besin ortamının yoğunlaşmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir. AKM değerlerinde ise 100 g/L giriş gliserol konsantrasyonundaki sonuçlarının ölçüm hatası olduğu düşünülmektedir. Organik yüklemeye de bağlı olarak giriş gliserol konsantrasyonu arttıkça AKM değerleri yükselmiştir.



Şekil 4.99 Camboncuk dolgulu biyoreaktörde farklı giriş gliserol konsantrasyonlarında OD ve AKM ortalama değerlerinin karşılaştırılması.

Üretim sonunda yapılan kuru madde analizleriyle seramik silindir malzeme üzerine ve reaktör çeperine tutunan ve askıda haldeki mikroorganizmaların oranı Şekil 4.100'deki pasta diyagramında görülmektedir. Malzeme üzerine tutunan mikroorganizma oranı % 58 iken geri kalan %42'lik kısım askıda haldeki mikroorganizmayı oluşturmaktadır.



Şekil 4.100 Cam boncuk dolgulu kolon kullanılarak yapılan denemede immobilize ve askıda kuru madde % dağılımı.

Şekil 4.101'de cam boncuk dolgulu kolon reaktörün üretim bitişindeki görüntüsü görülmektedir. Üretim sonunda 110 g/L'ye ulaşan giriş gliserol konsantrasyonu dolayısı ile fermantasyon ortamı oldukça bulanıklaşmıştır.

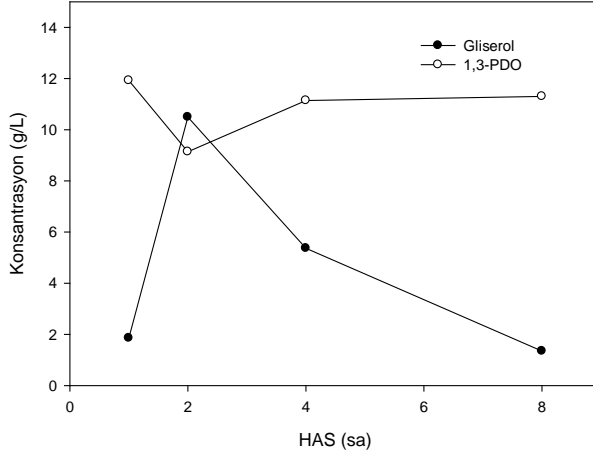


Şekil 4.101 Sürekli üretim sonunda cam boncuk dolgulu biyoreaktörün görünümü.

#### 4.2.11 Lentikat® dolgulu kolon biyoreaktör denemesi sonuçları

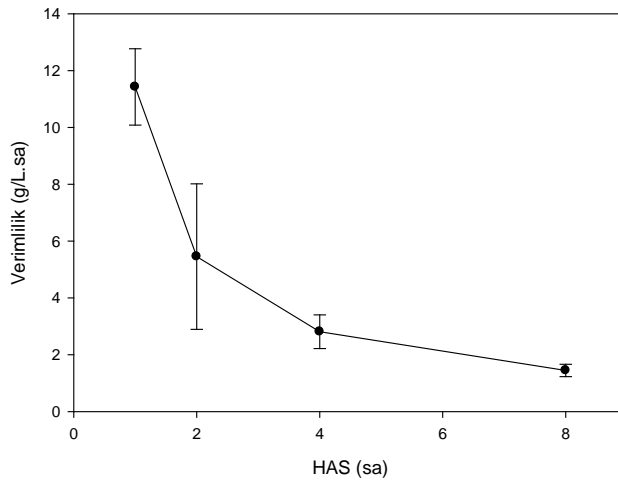
Sürekli proseslerde *K. pneumoniae* Lentikat® jellere hapsedilerek gerçekleştirilen deneme sonuçları aşağıda gösterilmiştir. Tüm deneme boyunca 40 g/L olan giriş gliserol konsantrasyonunda, HAS=2 ve 4 saatlerde en yüksek

yaklaşık 13 g/L 1,3-PDO konsantrasyonuna ulaşılmıştır (Şekil 4.102). Bununla birlikte HAS 2 sa denemeleri hariç gliserol tüketimleri oldukça yüksektir.



Şekil 4.102 *K. pneumoniae*'nin Lentikat® jellere hapsedilerek gerçekleştirilen denemelerde farklı HAS'da gliserol ve 1,3-PDO konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

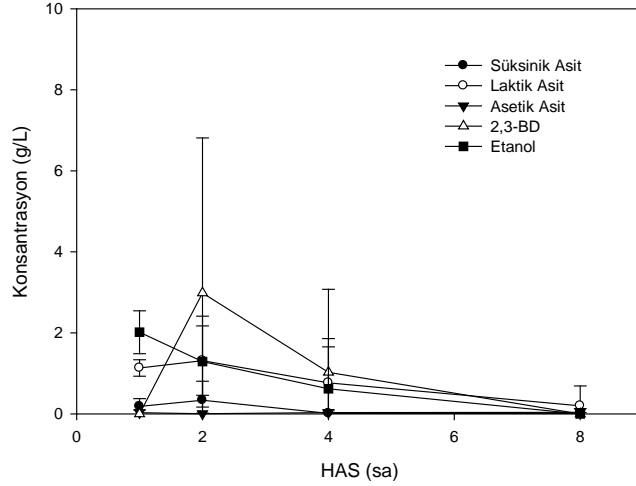
Tutundurma denemeleri ile karşılaştırıldığında daha düşük konsantrasyonda üretimler gözlemlenmiş olsa da verimlilik değerleri en düşük HAS'da (1 sa) yaklaşık 12.56 g/L.sa'e ulaştığından başarılı bir yöntem olma potansiyeli göstermektedir (Şekil 4.103).



Şekil 4.103 *K. pneumoniae*'nin Lentikat® jellere hapsedilerek gerçekleştirilen denemelerde farklı HAS'da 1,3-PDO verimliliklerinin karşılaştırılması.

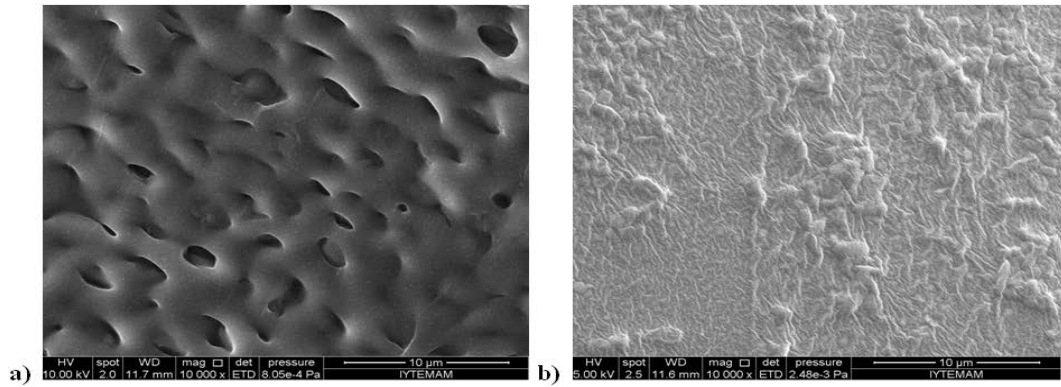


Şekil 4.104'te elde edilen yan ürün profilleri görülmektedir. Tutundurma ile gerçekleştirilen denemelerde de gözlemlendiği gibi üretilen ana yan ürünlerden biri 2,3-BD (ortalama 3.6 g/L) olmuştur. Bunu etanol (1.8 g/L) ve laktik asit (1.4 g/L) takip etmektedir. Süksinik asit ve asetik asit ise eser miktarda üretilmişlerdir.



Şekil 4.104 *K. pneumoniae*'nin Lentikat® jellere hapsedilerek gerçekleştirildiği denemelerde elde edilen yan ürün profilleri.

Gerçekleştirilen denemelerde hücrelerin jel içerisinde büyüdükleri Şekil 4.105 a ve b'de görülmektedir. Lentikat® jellerin SEM görüntüsünden elde edilen fotoğraflarda Şekil 4.105 a'da malzemenin boş hali görünürken Şekil 4.105 b'de malzeme üzerine tutunmuş olan *K. pneumoniae* görülebilmektedir.

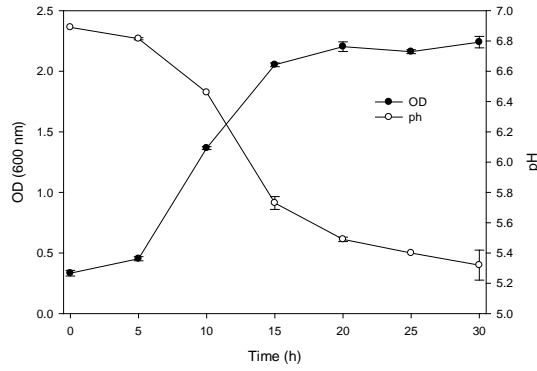


Şekil 4.105 Lentikat® kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde boncuklardan alınan kesitlerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri; a) boş ve b) *K. pneumoniae* tutundurulmuş.

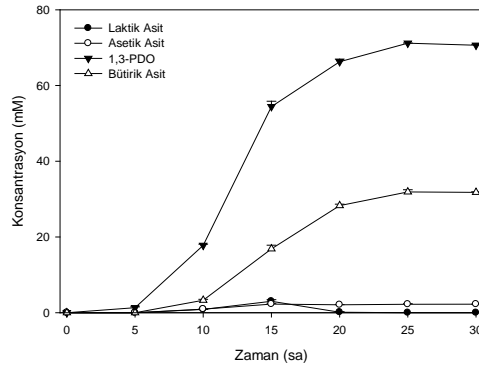
### 4.3 Proteomik Analizlerin (Proteomiks) ve Gerçekleştirilen Ön Denemelerin Sonuçları

#### 4.3.1 Gerçekleştirilen ön denemelerin sonuçları ve büyüme eğrileri

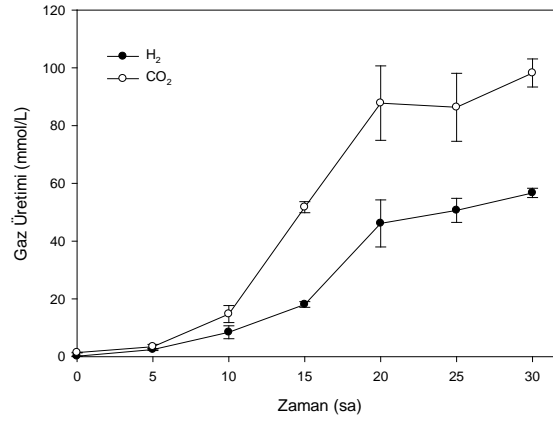
*C. butyricum* ile hangi koşullarda proteomik analizlerin gerçekleştirileceğinin belirlenebilmesi için çeşitli parametreler değerlendirilmiştir. Bu parametrelerin değerlendirilebilmesi için ön denemeler yapılmış ve büyüme eğrileri çıkartılmıştır. Öncelikle atık ve saf gliserol arasında 1,3-PDO üretimi açısından bir farklılık olup olmadığı test edilmiştir (Şekil 4.106-4.108; Şekil 4.116-4.118). Deneme sonuçlarına göre atık ve saf gliserol arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur (ANOVA,  $p > 0.05$ , SigmaPlot 11.0) ve bundan sonraki denemelerin saf gliserol ile devam ettirilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.106 *C. butyricum* ile gerçekleştirilen 170 mM başlangıç atık gliserol konsantrasyonu denemesi için OD ve pH değerlerinin zamana karşı gösterimi.

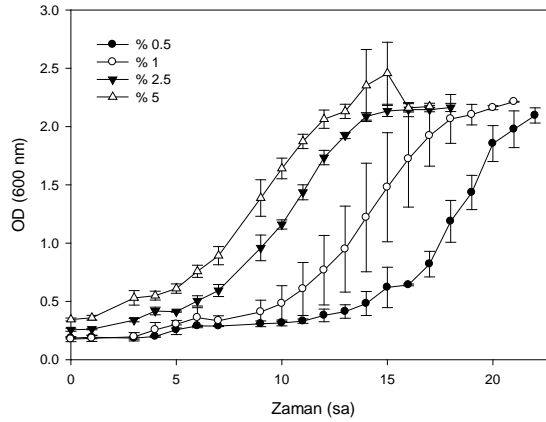


Şekil 4.107 *C. butyricum* ile gerçekleştirilen 170 mM başlangıç atık gliserol konsantrasyonu denemesi için yan ürün profilleri.



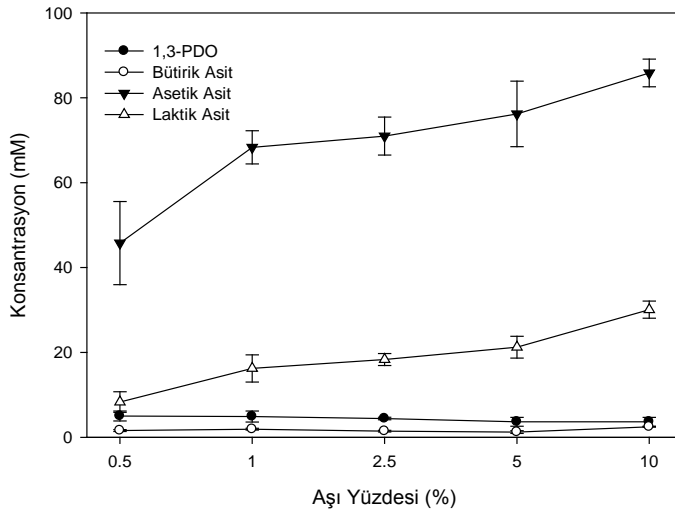
Şekil 4.108 *C. butyricum* ile gerçekleştirilen 170 mM başlangıç atık gliserol konsantrasyonu denemesi için CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> üretim değerleri.

Aşı yüzdesi %10 olarak kullanıldıktan sonra büyüme evrelerine etkinin anlaşılabilmesi için 4 farklı aşı yüzdesi (%0.5, 1, 2.5 ve 5) ile çalışmalar yapılmıştır (Şekil 4.109-4.111).

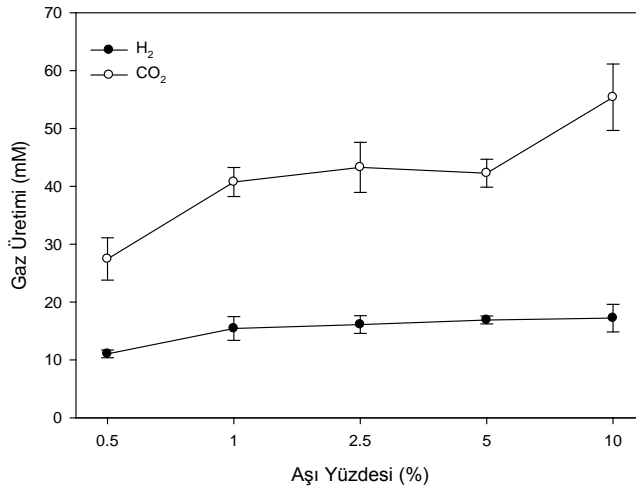


Şekil 4.109 *C. butyricum* ile farklı aşı yüzdeleri kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde elde edilen büyüme eğrileri.

Şekil 4.109'da görüldüğü gibi artan aşı yüzdelerinde daha kısa bir adaptasyon evresi (lag fazı) gözlemlenmiştir, bunun sonucunda da fermantasyon sonucunda daha yüksek bir 1,3-PDO konsantrasyonuna ulaşılmıştır (Şekil 4.110). %0.5 aşı yüzdesi ile diğer aşı yüzdeleri arasında büyüme ve yan ürün profilleri açısından oldukça büyük bir farklılık gözlemlenmiştir. Diğer aşı yüzdeleri arasında çok büyük bir farklılık görülmediğinden ileriki denemelerde %5 ve %10 aşı yüzdeleri kullanılmıştır (Şekil 4.110 ve 4.111).

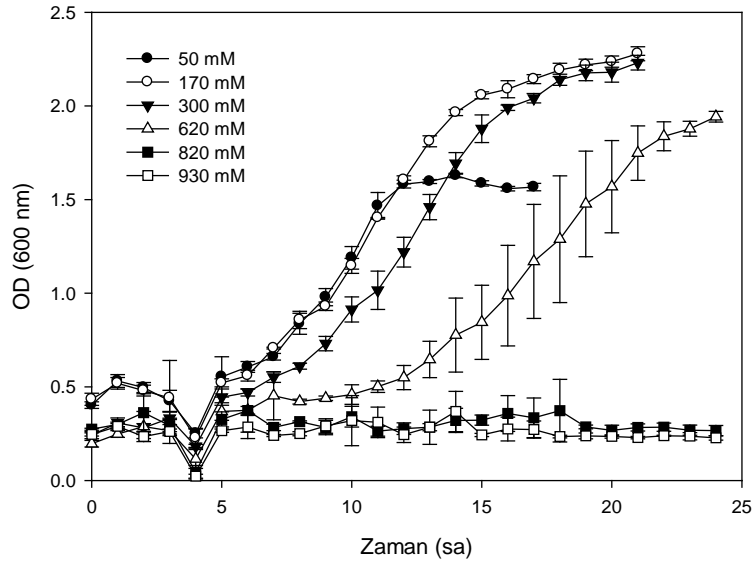


Şekil 4.110 *C. butyricum* ile farklı aşı yüzdeleri kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde elde edilen yan ürün profilleri.

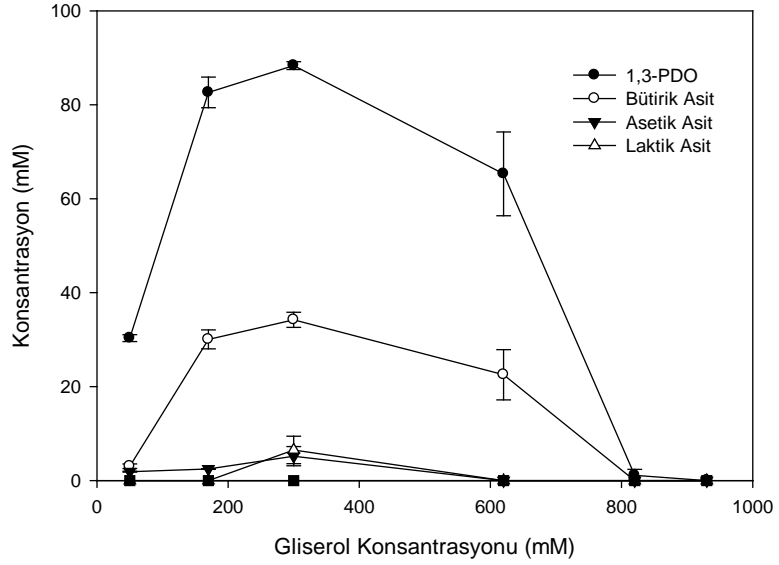


Şekil 4.111 *C. butyricum* ile farklı aşı yüzdeleri kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde elde edilen CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> üretim değerleri.

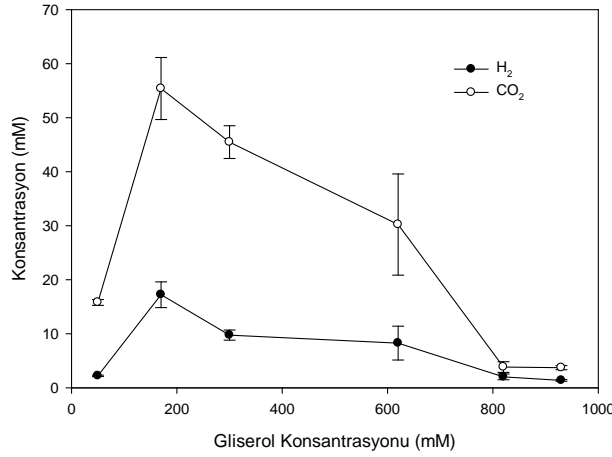
Farklı giriş gliserol konsantrasyonlarının 1,3-PDO üretiminin üzerine etkileri gözlemlenerek substrat toleransının hangi konsantrasyonda kırıldığı belirlenmiştir (Şekil 4.112-4.114). Buna göre 170 ve 620 mM (15 ve 60 g/L) giriş gliserol konsantrasyonlarında en çok yan ürün değişimlerinin gözlemlendiği görülmüş ve bu konsantrasyonların proteomik analizler için kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.115-4.118).



Şekil 4.112 *C. butyricum* ile farklı başlangıç gliserol konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde elde edilen büyüme eğrileri.



Şekil 4.113 *C. butyricum* ile farklı başlangıç gliserol konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde elde edilen yan ürün profilleri.



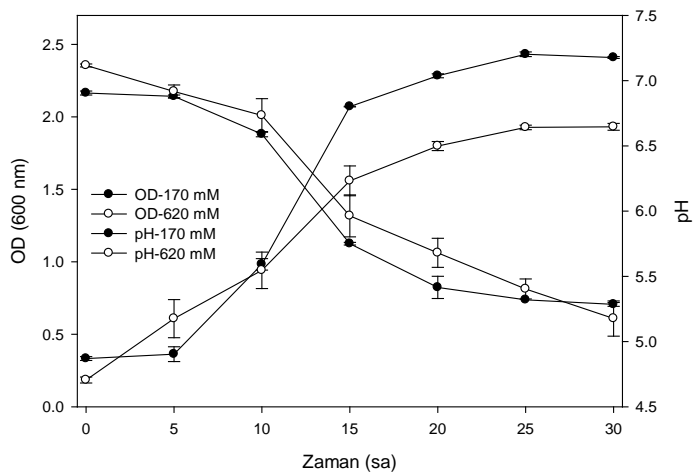
Şekil 4.114 *C. butyricum* ile farklı başlangıç gliserol konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde elde edilen CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> üretim değerleri.

Şekil 4.115 ile 4.118 arasında *C. butyricum*'un iki farklı gliserol konsantrasyonundaki büyüme hareketleri ayrıntılı olarak gösterilmiştir. *C. butyricum*, *K. pneumoniae*'de de olduğu gibi indirgen ve yükseltgen olmak üzere iki yolak kullanarak gliserol parçalanmasını gerçekleştirmektedir (Bkz. Bölüm 2.2.2). Şekil 4.116 ve 4.117'de görüldüğü gibi 1,3-PDO ana ürün iken ikinci olarak bunu bütirat takip etmektedir. Çizelge 4.11'de de görüldüğü gibi yüksek gliserol konsantrasyonu olan kültürlerde 30 saatlik büyüme evresinden sonra bile gliserol her zaman fazlalık durumundadır ve tamamen tüketilememiştir. Bununla birlikte, düşük gliserol konsantrasyonunda 20 saat sonunda mikroorganizmalar substratı tamamen tüketerek karbon sınırlı hale geçmişlerdir ve büyüme durmuştur. Buna rağmen molar verimler birbirlerine oldukça yakın değerler göstermiştir: 0.55 mol 1,3-PDO/mol tüketilen gliserol (yüksek gliserol konsantrasyonu için) ve 0.51 mol 1,3-PDO/mol tüketilen gliserol (düşük gliserol konsantrasyonu için). Buna ek olarak, bütirat molar verimlerinde de birbirlerine benzerlik görülmektedir ve iki gliserol konsantrasyonu içinde yaklaşık 0.22 mol bütirat/mol tüketilen gliserolü olarak ölçülmüştür. 1,3-PDO üretimi sırasında görev alan ana enzimlerin gen ifadelerinde başlangıç gliserol konsantrasyonları açısından anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir (CBY\_0500, CBY\_0501 ve CBY\_0502; Bkz. Bölüm 4.3.2, Çizelge4.13). Ancak, bütirat üretiminde rol alan proteinlerde iki konsantrasyon arasında bir farklılık gözlemlenmemiştir (yüksek gliserol konsantrasyonunda her iki büyüme evresinde de düşük gen ifadesi gözlemlenen açıl KoA dehidrojenaz (CBY\_3258) enzimi dışında).

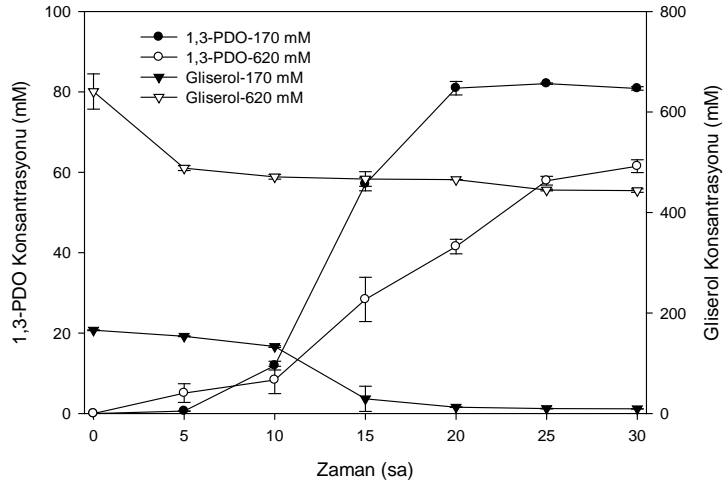
Çizelge 4.11 Proteomik analizlerde kullanılan örneklemelerin büyüme ve fermantasyon parametreleri. Değerler fermantasyonun 20.saatinde ölçülmüştür. Ürün verimleri (Y) tüketilen gliserol üzerinden hesaplanmıştır.

Parametre / Gliserol Konsantrasyonu	170 mM	620 mM
Karbon dengesi	1.05	1.08
Spesifik büyüme hızı (sa <sup>-1</sup> )	$\mu=0.175$	$\mu=0.113$
Substrat tüketimi (%)	92.1	28.3
Y PDO/s (mol /mol)	0.51	0.55
Y Büti/s (mol /mol)	0.18	0.22
Y Aset/s (mol /mol)	0.02	0
Y H <sub>2</sub> /s (mol /mol)	0.13	0.19
Y CO <sub>2</sub> /s (mol /mol)	0.47	0.60

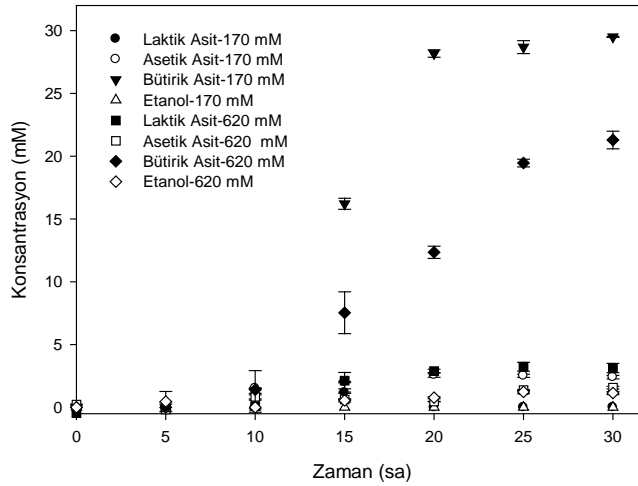
Çizelge 4.11’de gösterildiği gibi ekspanansiyel faz boyunca hücrelerin logaritmik artışın üzerinden hesaplanan spesifik büyüme hızı yüksek gliserol konsantrasyonunda azalmaktadır. Bu durum olası bir büyüme inhibisyonunu göstermektedir. Bu inhibisyon ilerleyen fermantasyon süreleri sebebi ile bitmiş olabilecek potasyum, fosfat gibi nütrientlerden kaynaklanıyor olabilir. Diğer bir olasılık ise CO<sub>2</sub> ve asit üretimlerinden kaynaklanan pH düşüşlerinin hücreye toksik etki yaratmış olabileceğidir. Yüksek gliserol konsantrasyonunun inhibe edici etkisi olmasına rağmen verimler üzerine negatif bir etkisi gözlemlenmemiştir. *C. butyricum* ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada da besin ortamının toplam ozmolaritesinin artışı sebebi ile yüksek substrat ve ürün konsantrasyonlarının büyüme üzerinde olumsuz etkisi raporlanmıştır (Biebl, 1991).



Şekil 4.115 *C. butyricum* ile 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonlarından elde edilen büyüme eğrileri ve pH profilleri.



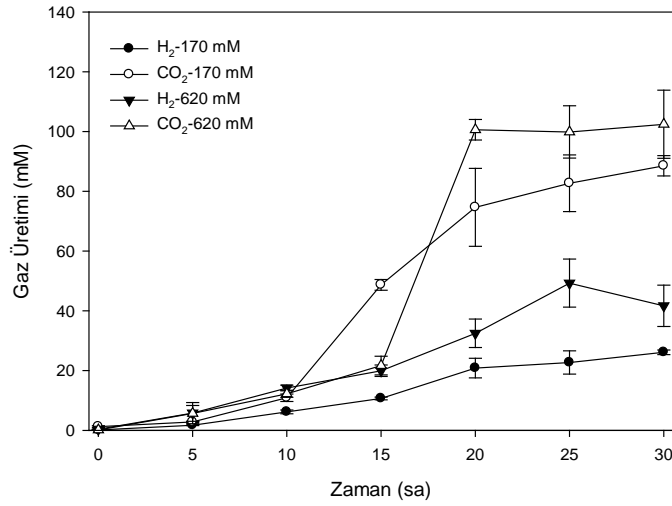
Şekil 4.116 *C. butyricum* ile 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonlarından elde edilen 1,3-PDO konsantrasyonları ve gliserol tüketimleri.



Şekil 4.117 *C. butyricum* ile 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonlarından elde edilen yan ürün profilleri.

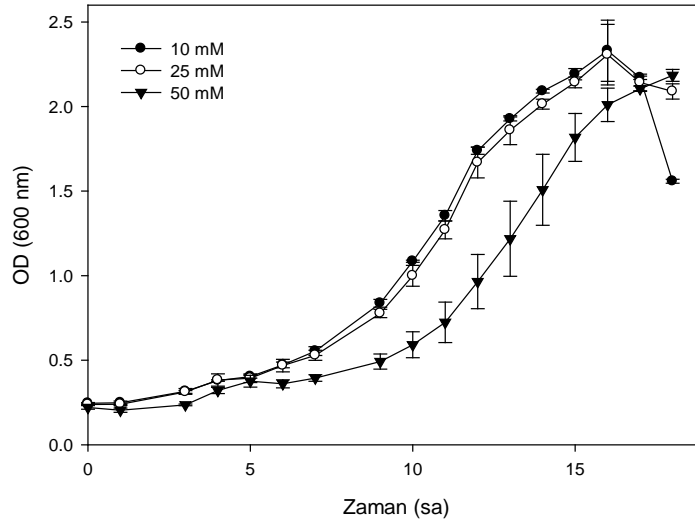
Üretimler süresince düşük gliserol konsantrasyonunda hiç laktik asit üretimi görülmektedir, buna karşın, gliserol konsantrasyonu artırıldığında 2.9 mM konsantrasyona kadar laktik asit gözlemlenmiştir (Şekil 4.117). Bu durum eksponansiyel fazda protein seviyesinde de yüksek miktarda ifade edilen laktat dehidrojenazlar (LDH'ler; CBY\_2757 ve CBY\_2341) ile açıklanabilir. Durağan fazda ise protein ifadelerinde düşüş gözlemlenmiştir (LDH'ler; CBY\_2757, CBY\_0742 ve CBY\_2341, Bkz. Bölüm 4.3.2, Çizelge 4.3 ve Ek 3).



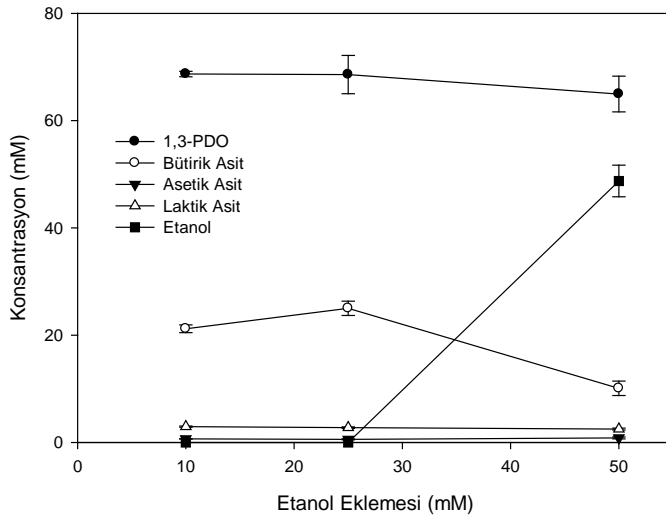


Şekil 4.118 *C. butyricum* ile 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonlarından elde edilen CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> üretim değerleri.

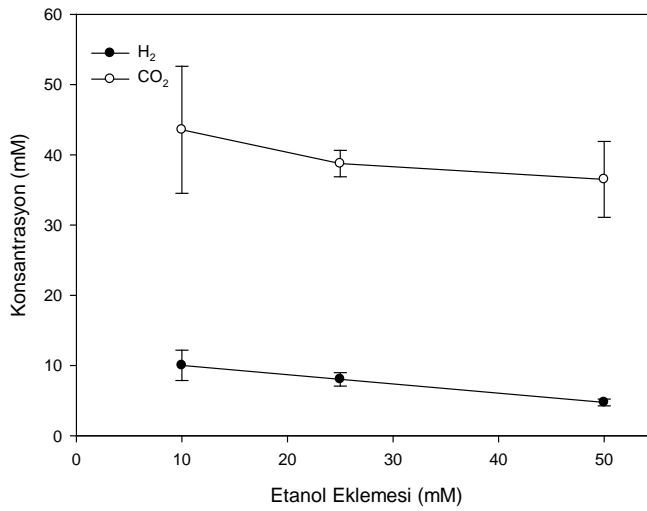
Son olarak bir yan ürün olarak da elde edilen etanolün büyümeye etkisini ve parçalanma olup olmadığının test edilebilmesi için 170 mM giriş gliserol konsantrasyonunda 3 farklı etanol eklemesi (10, 25 ve 50 mM) ile denemeler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.119-4.121).



Şekil 4.119 *C. butyricum* kullanılarak farklı konsantrasyonlarda eklenen etanol ile elde edilen büyüme eğrileri.



Şekil 4.120 *C. butyricum* kullanılarak farklı konsantrasyonlarda eklenen etanol ile elde yan ürün profilleri.



Şekil 4.121 *C. butyricum* kullanılarak farklı konsantrasyonlarda eklenen etanol ile elde edilen CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> üretim değerleri.

Şekil 4.119, 4.120 ve 4.121'de görüldüğü gibi 50 mM'a kadar olan etanol konsantrasyonları *C. butyricum* için toksik olmamıştır. Ancak konsantrasyon arttırıldıkça büyüme olumsuz etkilenmiştir (Şekil 4.119). 25 mM üzeri etanol konsantrasyonu bakteri tarafından tüketilememiştir, buna rağmen düşük etanol konsantrasyonlarındaki üretimler ile karşılaştırılacak miktarda 1,3-PDO üretimi gerçekleşmiştir. *C. butyricum*'un gliserol fermantasyonu süresince etanol üretilmemiş olmasına rağmen (Şekil 4.116) proteomik analizler sonucunda etanol

üretiminden sorumlu yollardaki proteinlerin oldukça yüksek oranda ifade edildikleri görülmüştür (Bkz. Bölüm 4.3.2). Alkol (etanol) dehidrojenaz (AdhE, CBY\_3753) düşük gliserol konsantrasyonlarında durağan fazda daha yüksek ifade de görülürken yüksek gliserol konsantrasyonlarında eksponansiyel fazda daha yüksek seviyelerde ifade edilmiştir. Şekil 4.120’de de görüldüğü gibi bu durum mikroorganizmanın etanolü tüketiyor olduğundan kaynaklanıyor olabileceği gibi, etanol üretimi sırasında NADH kullanıldığından bu yolak 1,3-PDO üretim yolları ile yarışmakta ve etanol üretilmemesi ile sonuçlanabilmektedir.

### 4.3.2 Proteomik analizlerin sonuçları

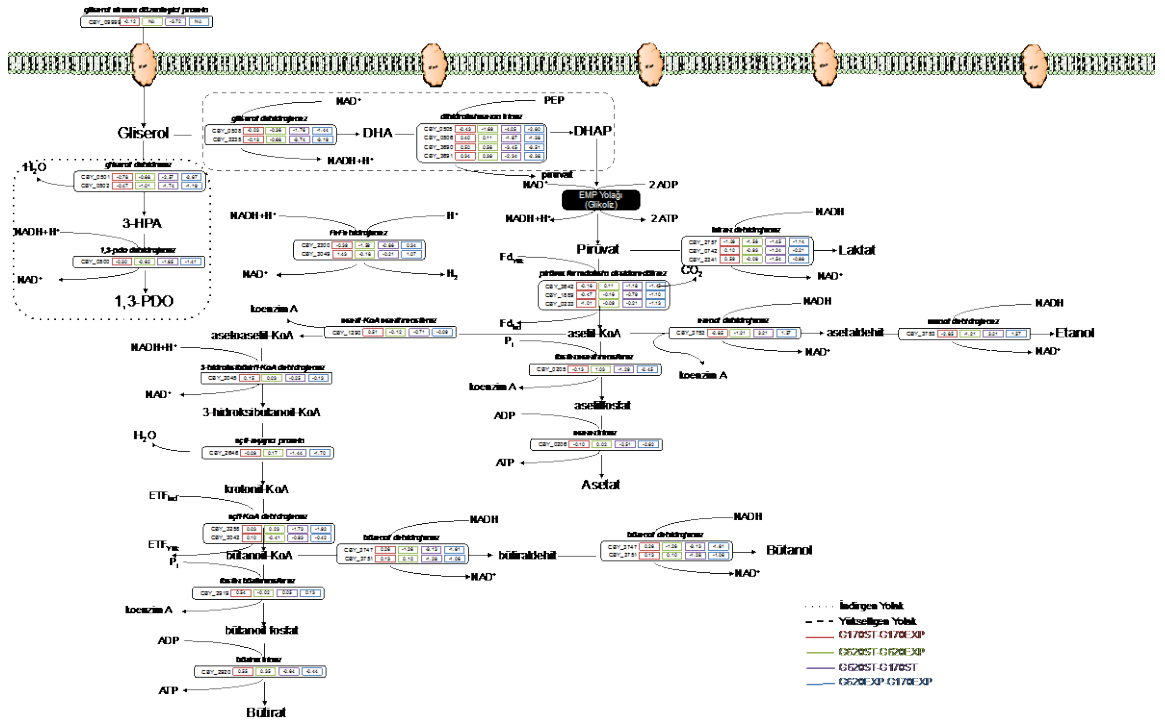
*C. butyricum* iki farklı gliserol konsantrasyonunda kültüre alınarak eksponansiyel ve durağan fazlar arasında proteomlarındaki farklılıklar açısından incelenmiştir. NCBI’da *C. butyricum* genomu içerisinde toplamda 3071 gen açıklanmıştır (erişim no. NZ\_ABDT0000000.1) ve proteomik analizlerden elde edilen datalar bu genom baz alınarak bağdaştırılmıştır. Tüm denemeler için 1 boyutlu (1D) denemeler gerçekleştirilmiş ve sırası ile düşük gliserol konsantrasyonu eksponansiyel faz, düşük gliserol konsantrasyonu durağan faz, yüksek gliserol konsantrasyonu eksponansiyel faz ve yüksek gliserol konsantrasyonu durağan fazlar için; 793, 770, 835 ve 803 protein içerdikleri, toplam iyon sayımlarının da (TIC) ~ 12 ile 27 birim arasında ( $\log_2$ ’de) değiştiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.12). Sadece düşük gliserol konsantrasyonu eksponansiyel fazında gerçekleştirilen 2 boyutlu analizler ise (2D) kütle spektrometresinde 9 kat kadar fazla verim ve fazla sayıda protein vermiştir (Çizelge 4.12). Buna rağmen yüksek güvenilirlik katsayısı olan proteinlerin sayısı (Ev < -10) sadece 2.6 kat artmıştır, bu da genomun oldukça basit olduğunu önermektedir (< 4000 gen). Bu sonuçlar 1D analizlerinin güvenilir bir şekilde kullanılabilmesini ve çok daha maliyetli olan 2D analizlerinin her seferinde yapılmasına gerek olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda proteinler hedeflenerek gerçekleştirilen analiz yöntemlerinden en hassası olan MRM yöntemi (Kitteringham et al., 2009) kullanılarak da 33 protein belirlenmiştir (Çizelge 4.13). Bu denemeler arası grafiklenmiş olan iyi korelasyon Şekil 4.125’te gösterilmiştir. Bu sonuçlar 1D ve MRM sonuçlarının tekrarlanabilir olduklarını göstermektedir. Yapılan istatistiksel testler de bu sonucu desteklemektedir (ANOVA,  $p > 0.05$ ), ve Şekil 4.123, 4.124 ve 4.125’te gösterilen biyolojik tekrarlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ve aralarında çok iyi bir korelasyon olduğu test edilmiştir (Sigma Plot, SYSTAT Software Inc., San Jose, CA).

Çizelge 4.12 Farklı proteomik analiz yöntemleri ile her deneme için analizlenen protein sayısı.

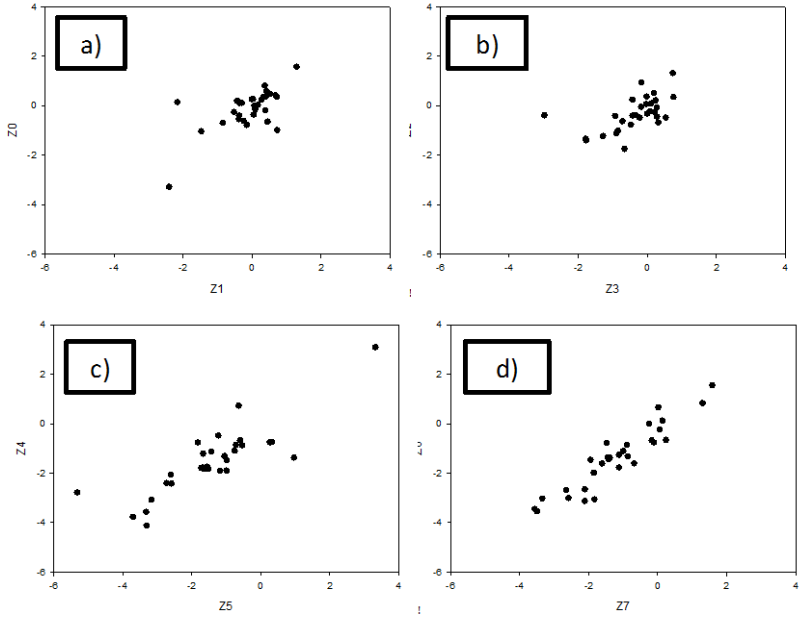
Örnek / Analiz	2D	1D	MRM
EXP 170 mM A	2005	757	30
EXP 170 mM B	-	789	30
ST 170 mM A	-	762	30
ST 170 mM B	-	748	30
EXP 620 mM A	-	805	32
EXP 620 mM B	-	825	32
ST 620 mM A	-	793	32
ST 620 mM B	-	799	32

Metabolik yolda gliserolün 1,3-PDO ve diğer yan ürünlere çevrimini içeren enzimler Manitoba Üniversitesi Biyoinformatik Bölümü tarafından geliştirilen yol izi araçları(<http://flamingo.cs.umanitoba.ca/>)ve NCBI'dan yararlanılarak (erişim numarası NZ\_ABDT00000000.1) elde edilmiştir. Şekil 4.122'de de görüldüğü gibi olası enzimlere bağlı proteinler ve gen içerisindeki yer numaraları şu şekildedir; gliserol dehidratat (CBY\_0501 ve CBY\_0502), 1,3-PDO dehidrojenaz (oksidoredüktaz) (CBY\_0500), gliserol dehidrojenaz (CBY\_3235 ve CBY\_0508), dihidroksiaseton kinaz (dhaK) (CBY\_0505, CBY\_0506, CBY\_3691 ve CBY\_3690), pirüvat-ferredoksin oksidoredüktaz (CBY\_0233, CBY\_1889 ve CBY\_3642), FeFe hidrojenaz (CBY\_2300 ve CBY\_3049), asetil KoA asetiltransferaz (CBY\_1290), 3-hidroksibütiril-KoA dehidrojenaz (CBY\_3045), 3- hidroksibütiril-KoA dehidratat (CBY\_3041), açıl-KoA dehidrojenaz (CBY\_3258 ve CBY\_3042), fosfat bütiriltransferaz (CBY\_2919), bütirat kinaz (CBY\_2920), bütanol dehidrojenaz (CBY\_3747 ve CBY\_3751), fosfat asetiltransferaz (CBY\_0205), asetat kinaz (CBY\_0206), laktatdehidrojenaz (CBY\_0742, CBY\_2341 ve CBY\_2757) ve etanol dehidrojenaz (CBY\_3753) (Çizelge 4.13). Bahsi geçen proteinlerin tümü ölçülebilir değerlerin üzerinde görülmüştür. Gonzalez et al. (2013)'ün gerçekleştirmiş olduğu çalışmada da bu tez çalışmasında olduğu gibi her iki büyüme fazında bütirat üretim yollarının varlığı gösterilmiştir (CBY\_3041, CBY\_3045, CBY\_3258, CBY\_3042, CBY\_2919 ve CBY\_2920). Log fazı ve durağan faz arasında ya da farklı gliserol konsantrasyonları arasında enzimlerin ifadelerinde önemli bir değişiklik olmasa da proteinlerin aşağı ya da yukarı düzenlendiklerini ('*down/up regulation*') öneren aşırı değerler göze çarpmaktadır. Şekil 4.115-4.118 ve Çizelge 4.13'te de görüldüğü gibi elde edilen proteomik data yan ürün değerleri ile ilişkilendirilmiştir. Gliserolün 1,3-PDO'ya indirgenme ve gliserolün yükseltgenme yollarının ilk basamaklarındaki enzimler ile bütirat üretim yolağındaki enzimler yüksek gliserol konsantrasyonunda daha az miktarda gözlemlenmiştir bir başka deyişle aşağı ayarlanmıştır ('*down regulation*'). Bu

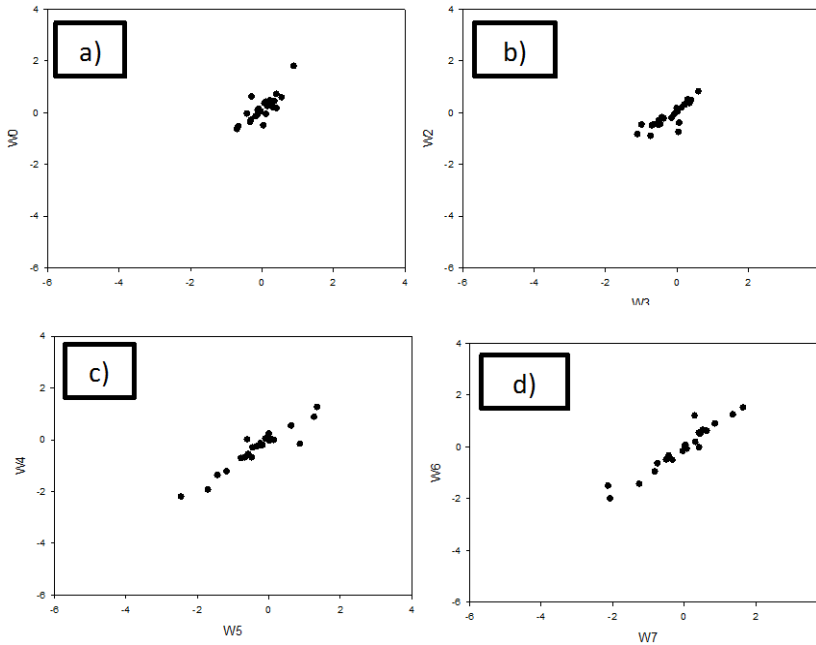
önemli proteinlere ek olarak metabolik yolda bulunmasa da yüksek değerlerde gözlemlenen bazı önemli olabilecek proteinler de proteomda göze çarpmaktadır. Örneğin, elektron taşıyıcı protein olarak adlandırılan (ya da olası bir  $\text{NADP}^+$ :ferredoksin oksidoredüktaz) (genomdaki yer işaretleri CBY\_3749, CBY\_2496 ve CBY\_2471) gen ifadeleri de yüksek gliserol konsantrasyonunda aşağı ayarlanmıştır (Bkz. Ek 3). Proteomda bu genler açısından gözlemlenen yüksek farklılıklar bu proteinlerin 1,3-PDO üretiminde etkin rol oynayan proteinler olabileceğini göstermektedir.



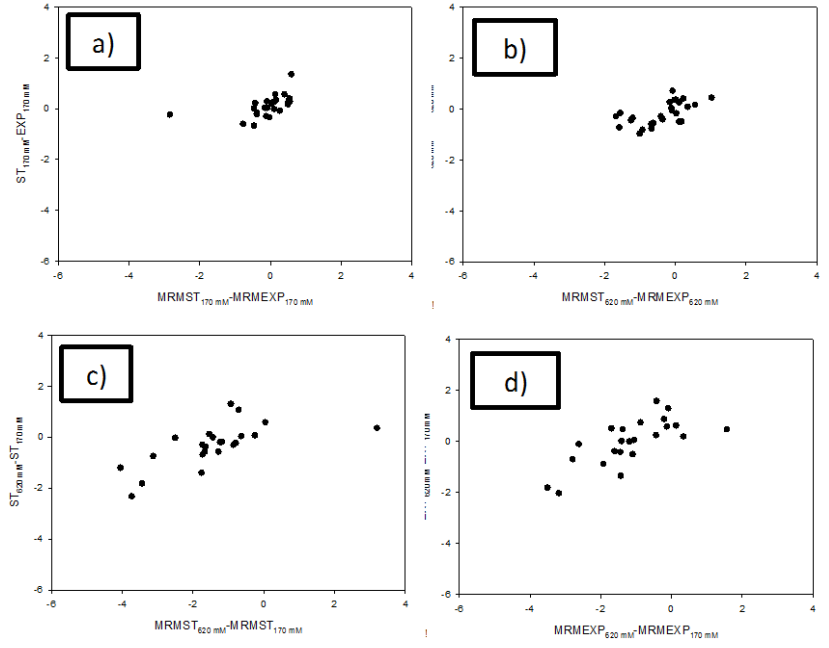
Şekil 4.122 Proteomik analizler sonucunda *C. butyricum* için önerilen gliserol parçalanması ve 1,3-PDO üretimi yol izleri.



Şekil 4.123 Ana proteinler açısından 1D LC/MS proteomik analizlerinde elde edilen Z-değerleri için iç (aynı faz için örneklemeler) tekrarların arasındaki ilişkiler; a) 170 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar ( $Z_0/Z_1$ ), b) 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar ( $Z_2/Z_3$ ), c) 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için durağan fazlar arasındaki farklar ( $Z_4/Z_5$ ), d) 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için log fazları arasındaki farklar ( $Z_6/Z_7$ ).



Şekil 4.124 Ana proteinler açısından MRM proteomik analizlerinde elde edilen Z-değerleri için iç (aynı faz için örneklemeler) tekrarların arasındaki ilişkiler; a) 170 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar ( $W_0/W_1$ ), b) 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar ( $W_2/W_3$ ), c) 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için durağan fazlar arasındaki farklar ( $W_4/W_5$ ), d) 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için log fazları arasındaki farklar ( $W_6/W_7$ ).



Şekil 4.125 Ana proteinler açısından 1D LC/MS ve MRM proteomik analizlerinde elde edilen Z-değerleri arasındaki ilişkiler; a) 170 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar, b) 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar, c) 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için durağan fazlar arasındaki farklar, d) 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için log fazları arasındaki farklar.

Çizelge 4.13 Ana proteinler açısından 1D LC/MS ve MRM proteomik analizlerinde elde edilen ortalama Z-değerleri. 170 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar, 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan ve log fazları arasındaki farklar, 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için durağan fazlar arasındaki farklar ve 170 mM ve 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonları için log fazları arasındaki farklar. <sup>1</sup>Pirüvat format liyaz olarak yanlış tanımlanmış. <sup>2</sup>3-dehidrokuinat sintaz olarak yanlış tanımlanmış. <sup>3</sup>3-dehidrokuinat sintaz olarak yanlış tanımlanmış. TD: Tanımlı Değil.

Genom Yeri	Açıklama	1D LC/MS				MRM			
		ST170 mM- EXP170 mM	ST620 mM- EXP620 mM	ST620 mM- ST170 mM	EXP620 mM- EXP170 mM	ST170 mM- EXP170 mM	ST620 mM- EXP620 mM	ST620 mM- ST170 mM	EXP620 mM- EXP170 mM
CBY_0205	fosfat asetiltransferaz	-0.13	<b>1.03</b>	<b>-1.29</b>	<b>-2.45</b>	TD	0.45	TD	TD
CBY_0206	asetat kinaz	-0.10	0.02	<b>-2.51</b>	<b>-2.62</b>	0.29	0.36	-0.03	-0.10
CBY_0233	pirüvat:ferredoksin oksidoredüktaz	<b>-1.01</b>	-0.09	-0.21	<b>-1.13</b>	TD	TD	TD	TD
CBY_0500	1.3-propanediol dehidrojenaz	-0.39	-0.62	<b>-1.65</b>	<b>-1.41</b>	-0.16	-0.56	-0.38	0.02
CBY_0501	gliserol dehidratat(aktifleştirici)	-0.78	-0.68	<b>-2.57</b>	<b>-2.67</b>	-0.60	-0.77	TD	TD
CBY_0502	gliserol dehidratat <sup>1</sup>	-0.47	<b>-1.01</b>	<b>-1.74</b>	<b>-1.19</b>	-0.67	-0.97	-0.30	0.00
CBY_0505	dihidroksiaseton kinaz (fosfotransfer altbirimi)	-0.43	<b>-1.69</b>	<b>-4.05</b>	<b>-2.80</b>	0.22	-0.30	<b>-1.21</b>	-0.70
CBY_0506	dihidroksiaseton kinaz (L altbirimi)	0.40	0.11	<b>-1.67</b>	<b>-1.38</b>	0.56	-0.50	-0.59	0.48
CBY_0508	gliserol dehidrojenaz <sup>2</sup>	-0.03	-0.36	<b>-1.76</b>	<b>-1.44</b>	-0.35	-0.41	<b>-1.41</b>	<b>-1.35</b>
CBY_0742	L-laktat dehidrojenaz	0.10	-0.93	<b>-1.24</b>	-0.21	0.26	-0.82	-0.20	0.88
CBY_1290	asetil-KoA asetiltransferaz	0.51	-0.12	-0.71	-0.09	0.27	0.04	<b>1.07</b>	<b>1.31</b>
CBY_1889	pirüvat:ferredoksin oksidoredüktaz	-0.47	-0.16	-0.79	<b>-1.10</b>	0.01	0.27	-0.24	-0.50
CBY_2300	FeFe hidrojenaz-1	-0.39	<b>-1.59</b>	-0.86	0.34	-0.23	-0.73	-0.30	0.20
CBY_2341	L-laktat dehidrojenaz	0.59	-0.08	<b>-1.54</b>	-0.88	<b>1.35</b>	0.71	0.12	0.75
CBY_2757	L-laktat dehidrojenaz	<b>-1.26</b>	<b>-1.56</b>	<b>-1.45</b>	<b>-1.14</b>	TD	-0.17	NA	NA



Çizelge 4.13 (devam)

Genom Yeri	Açıklama	ID LC/MS				MRM			
		ST170 mM- EXP170 mM	ST620 mM- EXP620 mM	ST620 mM- ST170 mM	EXP620 mM- EXP170 mM	ST170 mM- EXP170 mM	ST620 mM- EXP620 mM	ST620 mM- ST170 mM	EXP620 mM- EXP170 mM
CBY_2919	fosfat bütiriltransferaz	0.54	-0.02	0.05	0.13	0.40	0.35	0.58	0.63
CBY_2920	bütirat kinaz	0.55	0.35	-0.64	-0.44	0.30	0.08	0.04	0.25
CBY_3041	3-hidroksibütiril-KoA dehidrataz	0.42	0.11	-0.43	0.11	TD	TD	TD	TD
CBY_3042	açıl-KoA dehidrojenaz (kısa-zincire özgü)	0.10	-0.41	-0.93	-0.42	-0.02	-0.30	<b>1.31</b>	<b>1.59</b>
CBY_3045	3-hidroksibütiril-KoA dehidrojenaz	0.15	0.03	-0.25	-0.13	0.35	-0.18	0.07	0.59
CBY_3049	demire bağımlı hidrojenaz	<b>1.43</b>	-0.18	-0.21	<b>1.07</b>	TD	TD	TD	TD
CBY_3235	gliserol dehidrojenaz <sup>3</sup>	-0.13	-0.68	<b>-3.74</b>	<b>-3.19</b>	-0.30	-0.60	<b>-2.33</b>	<b>-2.03</b>
CBY_3258	açıl-KoA dehidrojenaz (kısa-zincire özgü)	0.03	0.23	<b>-1.73</b>	<b>-1.92</b>	0.20	0.41	-0.68	-0.89
CBY_3642	pirtüvat:ferredoksin oksidoredüktaz	-0.16	0.11	<b>-1.18</b>	<b>-1.45</b>	0.03	0.26	-0.19	-0.42
CBY_3690	dihidroksiaseton kinaz.(L altbirimi)	0.50	0.56	<b>-3.45</b>	<b>-3.51</b>	0.17	0.16	<b>-1.82</b>	<b>-1.82</b>
CBY_3691	dihidroksiaseton kinaz (DhaK altbirimi)	0.34	0.38	<b>-2.34</b>	<b>-2.38</b>	TD	TD	TD	TD
CBY_3747	NADPH-bağımlı bütanol dehidrojenaz	0.26	<b>-1.26</b>	<b>-3.13</b>	<b>-1.61</b>	-0.09	-0.45	-0.75	-0.38
CBY_3751	NADPH-bağımlı bütanol dehidrojenaz	0.13	-0.10	<b>-1.28</b>	<b>-1.06</b>	0.57	-0.06	-0.57	0.06
CBY_3753	Etanol dehidrojenaz (aldehit-alkol dehidrojenaz 2)	<b>-2.85</b>	<b>-1.21</b>	<b>3.21</b>	<b>1.57</b>	-0.23	-0.36	0.36	0.48
CBY_9999	gliserol alımına yardımcı protein	-0.12	-0.37	<b>-3.72</b>	<b>-3.52</b>	TD	TD	TD	TD

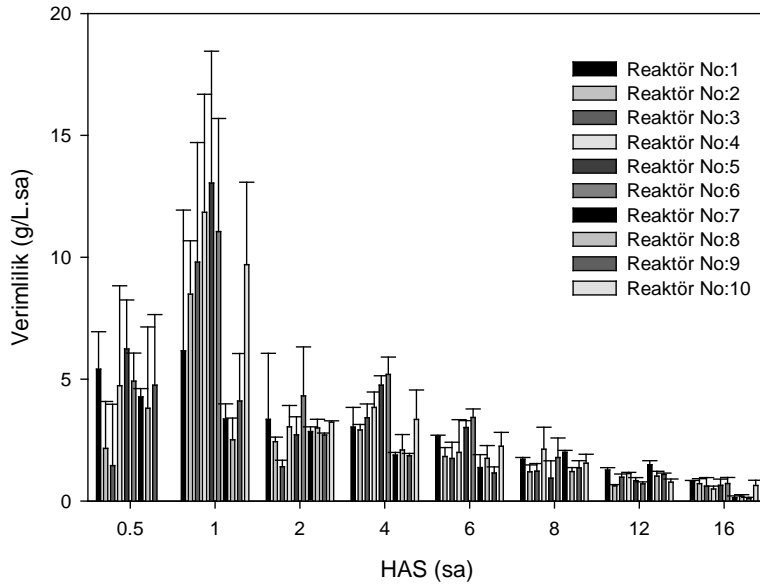
## 5. TARTIŞMA

Biyoteknolojik yollar ile üretilen 1,3-PDO'nun yüksek konsantrasyonda üretimini sağlayan ve şimdiye dek en çok kullanılmış olan mikroorganizmalar *Klebsiella pneumoniae* (Homann et al., 1990) ve *Clostridium butyricum*'dur (Biebl, 1991). Bu tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmalardan biri olan *Klebsiella pneumoniae* izolatında da oldukça yüksek verimlere ulaşılabilmektedir. Buna ek olarak proteomik analizlerde model mikroorganizma olarak kullanılan DSMZ kültür koleksiyonundan temin edilmiş *Clostridium butyricum* 10702 de literatür değerlerinde verimlere ulaşmıştır.

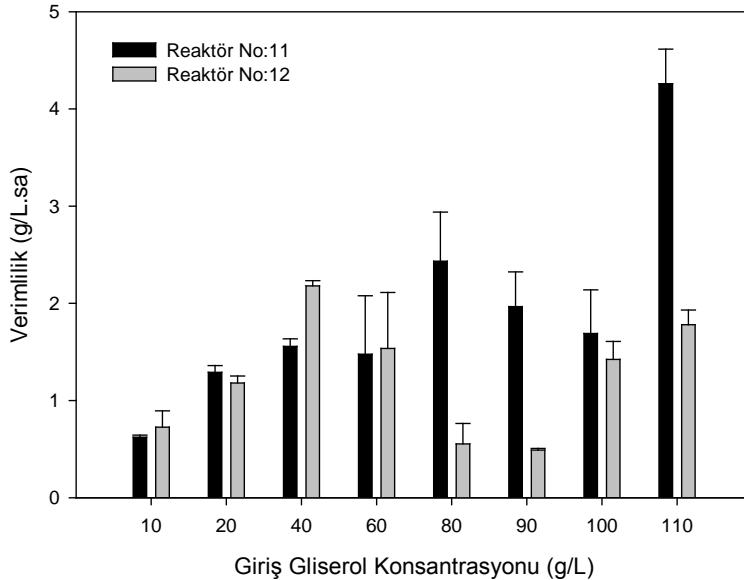
Denemeler öncelikli olarak *K. pneumoniae* kullanılarak askıda kültürler ile gerçekleştirilmiştir (Bkz. Bölüm 4.1). Yapılan kesikli çalışmalarda hem mikroorganizmanın büyüme eğrisi çıkartılmış hem de farklı atık konsantrasyonları altında üretilen ürünler gözlemlenmiştir. 1,3-PDO üretimi büyümeye bağlı bir üretimdir (Papanikalou et al., 2000), bu sav Bölüm 4.1'de sunulmuş veriler ile de desteklenmektedir. Jun et al., (2010)'un yaptığı çalışmada da raporladığı gibi düşük gliserol konsantrasyonlarında (>80 g/L) daha iyi sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu denemede 60 g/L'nin üstünde konsantrasyonlarda oldukça düşük 1,3-PDO üretimleri gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, sürekli üretimlerde yüksek gliserol konsantrasyonuna adaptasyon gözlemlenmiştir. *C. butyricum* göz önünde bulundurulduğunda ise yine 60 g/L'nin üstünde gliserol tüketimindeki düşüşe bağlı olarak büyümenin yavaşladığı gözlemlenmektedir (Bkz. Bölüm 4.3.1). *K. pneumoniae* ile kesikli denemeler ardından gerçekleştirilen sürekli denemelerde HAS kısalmasıyla ürün verimlilik ortalamasının arttığı görülmektedir. Ancak kısalan HAS ile 1,3-PDO ürün konsantrasyonları düşmüştür. Bununla birlikte, üretim süresinin kısalması ile birim zamanda üretilen ürün miktarında artış olmuştur. HAS 12 ve 16 saatlere bakıldığında verimlilik değerleri askıda kültürlerde ve immobilize kültürlerde çok benzer değerlerdedir (Şekil 4.12). 1 saat HAS'ta en yüksek verimliliklere ulaşılmıştır. Hem ürün konsantrasyonları hem de gliserol tüketim değerleri göz önünde bulundurulduğunda atık gliserol denemesi için optimum HAS'ın 8 saat olduğuna karar verilmiş ve bu değer ile çalışılmıştır (Bkz. Bölüm 4.1.2). Atık gliserol kullanılarak gerçekleştirilen sürekli askıda üretimlerde (maksimum 18.2 g/L) ise literatür değerlerinde (Rossi et al., 2012, 9.4 g/L; Chatzifragkou et al., 2011a, 11.5 g/L) ürün elde edilebilmiştir. Bununla birlikte yüksek sıvı çalışma hacimlerinin prosesi oldukça zorlaştırdığı göz önünde bulundurulmalıdır.

DuPont™ tarafından gerçekleştirilen biyolojik kökenli polimer üretimi, yine biyolojik kökenli tonajlı kimyasal üretiminin ticarileştirilmesinin uygulanabilir olduğunu göstermiştir. Bu dönemden beri, bu prosesin geliştirilmesi için biyoteknolojik alanda yeni stratejiler sürekli raporlanmaktadır. Bu stratejilerden biri de bu tez çalışmasında önerilen immobilize sistemlerdir. Çalışma boyunca bu sistemlerin aşırı çevre koşullarına olan dayanıklılıkları ve tutundurma yöntemi ile immobilizasyonun başarılı sonuçlar gösterdiği farklı dolgu malzemeleri ile kullanılan kolon reaktörler ile gerçekleştirilen denemelerde gösterilmiştir (Bkz. Bölüm 4.2). İmmobilizasyon materyalleri seçilirken biyobozunurluk, çözünürlük ve immobilizasyon prosedürü (Gonzalez-Pajuelo et al., 2005) gibi noktalar göz önünde bulundurulmuştur.

Şekil 5.1 ve Şekil 5.2’de *K. pneumoniae* ile gerçekleştirilen immobilizasyon denemeleri ve karşılaştırmalı olarak yürütülen askıda kültür denemelerinin sonuçları görülmektedir. Buna göre toplamda 12 adet sürekli reaktör ile çalışılmıştır. Farklı dolgu malzemeleri kullanılarak hücre tutundurulması ile gerçekleştirilen immobilizasyon denemeleri Şekil 5.1’de dolgu malzemesi içermeyen kolon reaktör ve sürekli karıştırmalı tank reaktör üretim verimlilikleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca dolgu malzemelerinin arasındaki farklılıkları verimlilik açısından değerlendirmek ve hangi grup ortalamalarının birbirinden anlamlı olarak farklı olduğunu bulabilmek için ANOVA ve ardından Post Hoc olarak Tukey Honest testleri gerçekleştirilmiştir (Sigma Plot 11.0). Buna göre cam Rashing dolgu materyali içeren reaktör hariç ( $p > 0.05$ ) HAS süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ( $p < 0.05$ ) ve %95 güven aralığında HAS’ın, verimlilik üzerinde etkili bir parametre olduğu önerilmektedir. Denemeler içerisinde seramik top dolgulu reaktörden elde edilen verimlilik değerine bakıldığında askıda sisteme göre aynı HAS’ta (1 saat) %25’lik bir artış olduğu görülmektedir (Çizelge 5.1). Şekil 5.2’de de atık gliserol konsantrasyonu arttırılarak yapılan askıda çalışmada en fazla sadece 2.2 g/L.sa verimliliğe ulaşabildiği görülmektedir. Bununla birlikte immobilize sistem maksimum 7.4 g/L.sa üretim verimliliğine ulaşabilmiştir (ortalama 4.5 g/L.sa verimlilik değeri ile). 1,3-PDO üretim konsantrasyonları karşılaştırıldığında askıda üretimlerin bazı durumlarda daha yüksek ya da eşit olduğu ancak immobilize sistemin düşük alıkonma sürelerinde (örn; HAS=4 sa’te 13.7 g/L 1,3-PDO üretilmiştir) daha iyi çalıştığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar da göz önünde bulundurulduğunda immobilize sistemlerin daha kısa fermantasyon sürelerinde ve daha küçük reaktör hacimlerinde daha yüksek oranda ürün ürettikleri görülmektedir.



Şekil 5.1 Tutundurularak immobilize edilmiş *K. pneumoniae*'nin farklı dolgu malzemeleri içeren reaktörleri ve dolgu malzemesi içermeyen kolon reaktörün fermentörde askıda kültürlerde gerçekleşen denemelerinin değişen HAS'a karşılık 1,3-PDO verimlilikleri açısından karşılaştırılması. Reaktör numaraları için açıklamalar sırası ile 1; CSTR, 2; dolgu malzemesiz, 3; seramik top dolgulu; 4; PUF dolgulu; 5; cam boncuk dolgulu; 6; pomza dolgulu; 7; VUK dolgulu; 8; cam Rashing dolgulu; 9; çelik tel dolgulu; 10; seramik halka dolgulu. Sürekli gerçekleştirilen denemelerde  $G_0=40$  g/L,  $N=10$ , her HAS için  $n \geq 6$ 'dır.



Şekil 5.2 Tutundurularak immobilize edilmiş *K. pneumoniae*'nin farklı giriş atık gliserol konsantrasyonları ile gerçekleştirilen cam boncuk dolgu malzemesi içeren reaktörün 1,3-PDO üretim verimliliklerinin fermentörde askıda kültür ile gerçekleştirilen deneme sonuçları ile karşılaştırılması. Reaktör numaraları için açıklamalar sırası ile 11; cam boncuk dolgulu immobilize reaktör, 12; CSTR. Sürekli gerçekleştirilen denemelerde HAS=8 sa,  $N=2$ , her değişen gliserol konsantrasyonu için  $n \geq 6$ 'dır.

Zhao et al. (2006) kapsüle alınmış *K. pneumoniae* ile 16.4 g/L.sa 1,3-PDO verimliliklerine ulaşmıştır. Bu değer, bu tez çalışmasında elde edilmiş maksimum değerlere yakın olmakla birlikte daha düşüktür (Çizelge 5.1, sırası ile 20.8, 19, 17,9 ve 17 g/L.sa, pomza taşı, cam boncuk, VUK ve PUF dolgulu reaktörler için), aynı zamanda sadece 4.1 g/L 1,3-PDO konsantrasyonuna ulaşmış olduğu görülmektedir. Tutundurma yöntemi ile immobilizasyonu gerçekleştirmiş olan Pflugmacher ve Gottschalk (1994) ise 8.2 g/L.sa verimlilik değerlerine ulaşmışlardır. Bu tez çalışmasında da PUF dolgulu kolon reaktörler kullanılarak 2.07 kat daha yüksek verimliliklere ulaşılmıştır. Başka bir karşılaştırma çalışmasında Wong et al. (2011) substrat inhibisyonu için *K. pneumoniae*'yi hem askıda hem immobilize kültürlerde karşılaştırılmıştır ve 50 g/L substrat konsantrasyonundan yukarısının inhibe edici olduğunu raporlamıştır. Immobilize kültürlerde elde ettiği verimlilik değerleri de (0.4 g/L.sa) oldukça düşüktür.

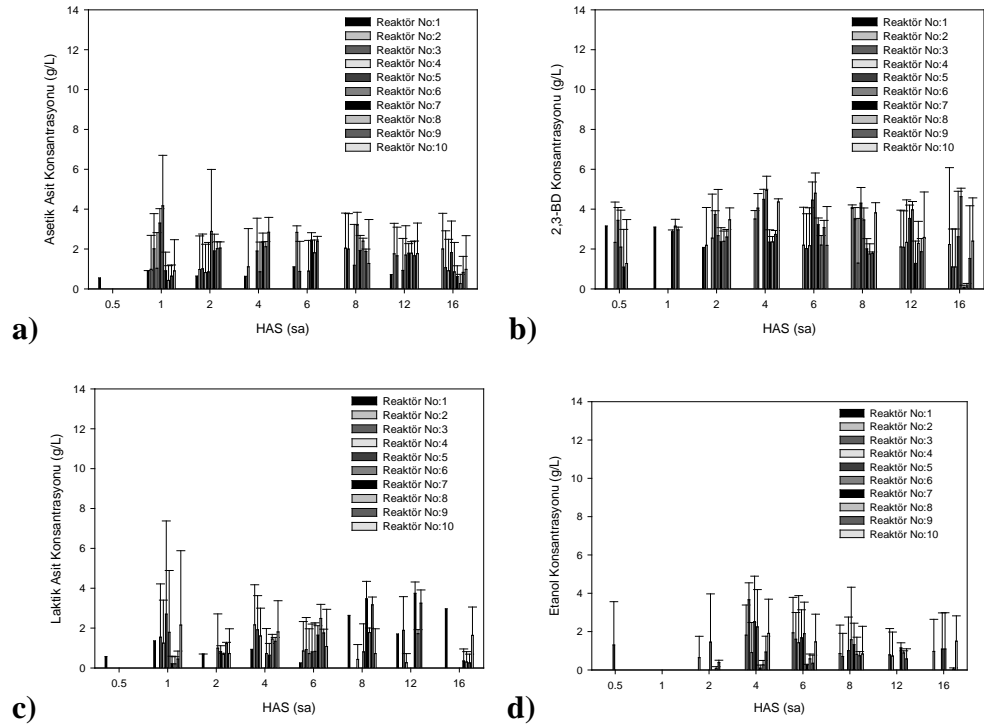
Çizelge 5.1 *K. pneumoniae* ile gerçekleştirilen tüm immobilizasyon çalışmalarında elde edilen maksimum 1,3-PDO Konsantrasyonu (g/L), maksimum gliserol tüketimi (%) ve maksimum verimliliklerin (g /L.sa) karşılaştırılması.

İmmobilizasyon Materyali	Verimlilik (Maks.) (g /L.sa)	1,3-PDO Konsantrasyonu (Maks.) (g/L)	Gliserol Tüketimi (Maks.) (%)
<b>Cam Boncuk</b>	19 (HAS=4 sa)	19.2 (HAS=1 sa)	100 (HAS=6 sa)
<b>Pomza Taşı</b>	20.8 (HAS=4 sa)	16.4 (HAS=1 sa)	100 (HAS=4, 6 ve 8 sa)
<b>PUF</b>	17 (HAS=8 sa)	15.1 (HAS=1 sa)	100 (HAS=8 ve 4 sa)
<b>Seramik Halka</b>	13.5 (HAS=6 sa)	13.5 (HAS=1 sa)	100 (HAS=8 ve 4 sa)
<b>Dolgu Malzemesiz</b>	13.4 (HAS=6 sa)	11 (HAS=1 sa)	95 (HAS=16 sa)
<b>Çelik Tel</b>	13.1 (HAS=12 sa)	8 (HAS=0.5 sa)	45 (HAS=12 sa)
<b>Cam Rashig Halka</b>	13 (HAS=12 sa)	7.6 (HAS=0.5 sa)	58 (HAS=12 sa)
<b>VUK®</b>	17.9 (HAS=12 sa)	4.6 (HAS=0.5 sa)	70 (HAS=12 sa)
<b>Cam Boncuk</b>	4 (Giriş Gliserol =110 g/L)	36.3 (Giriş Gliserol =110 g/L)	99 (Giriş Gliserol =20 g/L)
<b>Lentikat®</b>	12.5 (HAS=1 sa)	13 (HAS=2 sa)	100 (HAS=4 ve 8 sa)
<b>Askıda (Değişken HAS ile)</b>	7.4 (HAS=1 sa)	16 (HAS=6 sa)	98 (HAS=16 sa)
<b>Askıda (Değişken giriş gliserol konsantrasyonları ile)</b>	2.2 (Giriş Gliserol =100 g/L)	18.2 (Giriş Gliserol = 100 g/L)	100 (Giriş Gliserol = 40 g/L)

Tüm dolgu malzemelerinin denenmesinin ardından hangi malzemenin daha iyi 1,3-PDO üretimi ve gliserol tüketimi gösterdiği aynı zamanda da prosese uygulanabilirliği göz önünde bulundurularak HAS=8sa belirlenerek substrat inhibisyon denemeleri cam boncuk dolgulı kolon reaktörlerde gerçekleştirilmiştir (Bkz. Blüm 4.2.10). Buna ek olarak, sistemin stabilitesinin sürekliliği de bu alıkonma süresinin seçiminde etkili olmuştur. Tüm malzemeler arasında cam boncuk materyali hem stabil, çözünmeyen ve biyolojik olarak bozunmazdır hem de alıkonma süresi denemelerinde yüksek sonuçlar (maksimum 19 g/L.sa 1,3-PDO verimliliği) elde edilmiştir. Ayrıca bu materyal birden fazla kez kullanılmaya uygundur. Tüm immobilize reaktör denemeleri süresince en yüksek konsantrasyona (34.3 g/L 1,3-PDO) 110 g/L giriş gliserol konsantrasyonu denemesinde ulaşılmıştır (0.37 mol/mol verim değeri ile). Bu durum hem immobilizasyon denemesinin başarısını hem de kademeli arttırılan substrat konsantrasyonunun mikroorganizmaların aklimitasyonuna yardımcı olduğunu göstermektedir. Çizelge 5.1’de de görüldüğü gibi askıda kültürler ile gerçekleştirilen fermentör denemelerinde en yüksek konsantrasyon 18.2 g/L olarak elde edilmiştir. Gliserol tüketimleri göz önünde bulundurulduğunda ise giriş gliserol konsantrasyonu arttırıldıkça literatürde (Jun et al., 2010, Casali et al., 2011) de karşılaşılan tamamen gliserolün tüketilememesi dezavantajı ile karşılaşılmaktadır. Immobilize kültürlerde bu durum daha çok tolere edilebilirken, askıda kültürlerde tüketim değerleri oldukça düşük kalmaktadır. Özellikle yüksek giriş gliserol konsantrasyonlarında gliserol tüketim değerleri %8’e kadar gerilemiştir. Literatürde atık gliserol ile yapılan çalışmalarda atığın inhibe edici etkisinin olabileceği önerilmiştir (Gonza’lez-Pajuelo et al., 2004). Ancak, gerçekleştirilen çalışmalarda böyle bir inhibe edici etkiye rastlanmamıştır. Atıktan kaynaklanan tek problem heterojen örneklemelere sebep olmuş olmasıdır. Islam et al. (2006)’un biyohidrojen üzerine yaptığı çalışmada da incelediği gibi, değişen başlangıç substrat konsantrasyonlarının farklı son ürün oluşumlarına etkisinin derinlemesine incelenerek anlaşılması, optimum tüketim değerlerine ve buna bağlı olarak optimum hedef ürün üretim değerlerine ulaşabilmesinde için bir yol gösterici olarak kullanılabilir.

Tez çalışması boyunca 1,3-PDO üretimi ile birlikte çeşitli yan ürünler tüm denemelerde belirli miktarlarda üretilmiştir (Şekil 5.3). Chatzifragkouet al. (2011b) ortamda N<sub>2</sub> bulunmasının 1,3-PDO üretimini azaltırken, laktat dehidrojenaz aktivitesini arttırdığından laktik asit üretimini arttırdığını göstermiştir. Bununla birlikte, Biebl et al. (1999) farklı pH değerlerinde farklı yan ürünlerin baskın hale geçtiğini raporlamıştır; asetik asit, 2,3-BD ve etanol, 7.0, 5.8

ve 4.0-6.0 arası pH değerlerinde. Çalışmalar süresince pH otomatik kontrol ile 7.0 civarında sabit tutulmuş olsa da, 60 g/L üzerindeki giriş gliserol konsantrasyonlarında hücreler olumsuz etkilenmiş ve 1,3-PDO üretimleri düşmüştür. Mikroorganizma seçimi (Bkz. Bölüm 2, Şekil 2.3 ve Şekil 2.4) ve işletim parametrelerinin kontrolü ana ürün üretimini etkileyen en önemli etkenlerdir. pH yan ürün oluşumunu azaltabilmek ve daha yüksek 1,3-PDO üretimini sağlayabilmek için el ile kontrol edilerek sabit tutulmaya çalışılmış olsa da özellikle yüksek giriş gliserol konsantrasyonu olan denemelerde yüksek konsantrasyonda laktik asit üretimi engellenememiştir. Bunun ile birlikte 2,3-BD üretimi oldukça azaltılabılmıştır. Mikroorganizmaların büyüme değerleri karşılaştırıldığında farklı dolgu malzemeleri ile gerçekleştirilen denemelerde değerler  $10^7$ - $10^8$  arasında değişirken giriş gliserol konsantrasyonlarının da artmasıyla cam boncuk dolgulu kolonda gerçekleştirilen denemede  $10^5$ 'lere kadar gerilemiştir. Ancak yine de sıfırlanmamıştır.



Şekil 5.3 Tutundurularak immobilize edilmiş *K. pneumoniae*'nin farklı dolgu malzemeleri içeren reaktörleri ve dolgu malzemesi içermeyen reaktörün fermentörde askıda kültürlerde gerçekleşen denemelerinin değişen HAS'a karşılıklı) asetik asit, b) 2,3-BD, c) laktik asit, d) etanol konsantrasyonları açısından karşılaştırılması. Reaktör numaraları için açıklamalar sırası ile 1; dolgu malzemesiz, 2; PUF, 3; seramik halka dolgulu; 4; cam boncuk dolgulu; 5; pomza dolgulu; 6; pomza dolgulu; 7; VUK dolgulu; 8; cam Rashing dolgulu; 9; çelik tel dolgulu; 10; CSTR. Sürekli gerçekleştirilen denemelerde  $G_0=40$  g/L,  $N=10$ , her HAS için  $n \geq 6$ 'dır.

*K. pneumoniae* ile gerçekleştirilen denemeler ardından yüksek 1,3-PDO üretimlerinin başarılı bir şekilde immobilize sistemlerde gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir. Farklı giriş gliserol konsantrasyonları ile yapılan denemelerde de mikroorganizmaların gliserol tüketimlerinin substrat miktarı arttıkça azaldığı gözlemlenmiştir. Buna rağmen, en yüksek 1,3-PDO üretimine en yüksek giriş gliserol konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak mikroorganizmaların neden belirli substrat konsantrasyonlarına tolerans gösterdiğinin bulunabilmesi hedeflenmiştir. Teknik problemler dolayısı ile *K. pneumoniae* ile gerçekleştirilemeyen proteomik analizler yine iyi bir 1,3-PDO üreticisi olan ve model olarak seçilen *C. butyricum* ile gerçekleştirilmiştir (Bkz. Bölüm 4.3). Proteomik analizler öncesinde mikroorganizmanın tolerans değerlerinin belirlenebilmesi için ön denemeler gerçekleştirilmiş ve iki gliserol konsantrasyonunda karar kılınmıştır (Bkz. Bölüm 4.3.1). Karar aşamasında 1,3-PDO üretimleri açısından en farklı iki koşul seçilmek istenmiş ve substrat inhibisyonunun başladığı nokta ile optimum büyüme noktaları iki farklı fazda seçilmiştir.

Proteomik analiz sonuçlarının geneline bakıldığında protein düzeyinde büyüme fazları arasında çok önemli farklılıklar görülme de Çizelge 4.13'te de görüldüğü gibi bazı proteinlerde oldukça yüksek değerlerde farklar görülmektedir. Bunlara ek olarak indirgen ve yükseltgen basamakları muhtemel bir operonun yönettiği görülmektedir. Bu da gliserolün parçalanması devam ettikçe 1,3-PDO üretiminin devam edeceğini doğrulamaktadır. Bu sonuçlar *K. pneumoniae*'nin metabolik yolağı ile karşılaştırıldığında bazı yan ürünler farklılık gösterse de yol gösterici olması açısından çok önemlidir.

Belirli bir substratın parçalanmasından elde edilecek maksimum verimler elde edilecek ATP ve termodinamik verimliliğinin optimum düzeyde tutulması ile birebir bağlantılıdır. Ancak, *C. pasteurianum*'da asetat üretimi sırasındaki ATP sentezinin termodinamik verimliliği (%85) bütirattakinden (%63) daha yüksek olmasına rağmen, bütirat yolakları da her üretimde gözlemlenmiştir. Bu sebeple hücrelerin entropisinin de verimlerde etkin olduğu düşünülmektedir (Thauer et al., 1997). Bununla birlikte, biyokütle oluşumu sırasında indirgen taşıyıcı olan NADH sentezlenmesi de mikroorganizmanın redoks dengesini sabitlemesinde böylece yan ürün üretiminde rol oynamaktadır (Nakamura and Whited, 2003). Glikoz gibi diğer şekerler ile karşılaştırıldığında gliserolün pirüvata parçalanması iki kat daha fazla NADH üretimine yol açmaktadır. Elektron havuzunun ve redoksun dengelenebilmesi için yükseltgenmiş NAD<sup>+</sup>'in tekrar indirgenmesi için de daha



indirgen bir ürün –bu durumda 1,3-PDO- üretilmelidir (Nakamura and Whited, 2003; Clomburg and Gonzalez, 2013). Böylece gliserolün 1,3-PDO'ya indirgenmesi iki basamağın aynı anda yürütülmesi ile gerçekleşmektedir (Şekil 4.122); indirgen ve yükseltgen basamaklar.

*C. butyricum* zorunlu anaerob bir bakteri olduğundan enerji üretimi için substrat düzeyinde fosforilasyon kullanır ve oksijenli solunum yapan mikroorganizmalar ile karşılaştırıldığında daha düşük miktarda net ATP sentezler (Madigan et al., 2009). Bununla birlikte, indirgen ve yükseltgen basamakları kullanırken redoksu da sürekli dengede tutar. İndirgenme yolağında gliserol önce 3-HPA'ya dehidrate olur ve ardından 3-HPA yükseltgenmiş  $NAD^+$ 'in tekrar oluşturulmasıyla 1,3-PDO'ya indirgenir. Bu yüzden bu yolağın devamlılığı için  $NADH$ 'in ortamda bulunması karbon akışını belirleyen en önemli etkenlerden biridir. 3-HPA ortamdaki sürekli 1,3-PDO'ya dönüştürülerek uzaklaştırılması gereken büyümeye engelleyen toksik bir ara üründür (Wang et al., 2003). Bu dönüşümü sağlayan enzim olan 1,3-PDO dehidrojenaz (CBY\_0500), *C. butyricum*'un proteomunda eksponansiyel fazlarda hep yukarı ayarlanmıştır ('*up regulated*') (Çizelge 4.13). Eksponansiyel fazlarda gözlemlenen daha yüksek 1,3-PDO üretimleri de proteomlardan elde edilen sonuçları desteklemektedir (Şekil 4.114). Gonzalez et al. (2013)'da her iki büyüme fazında *Clostridium* sp. proteomunda bu enzimin varlığını göstererek, anaerobik ve ortamda gliserol fazlalığı olduğu durumlarda bu enzimin aktivitesinin arttığını önermiştir. Ancak, bu tez çalışmasında, her ne kadar bu enzimin her iki fazda yüksek protein ifadesine sahip olduğu görülse de yüksek gliserol konsantrasyonunda aşağı ayarlandığı gözlemlenmiştir. Olası gliserol dehidrataz (CBY\_0501 ve CBY\_0502), 1,3-PDO dehidrojenaz (CBY\_0500), gliserol dehidrojenaz (CBY\_3235 ve CBY\_0508), ve dhaK (CBY\_0505, CBY\_0506, CBY\_3691 ve CBY\_3690) indirgen ve yükseltgen yolaklardaki ana enzimlerdir. Aynı zamanda da genom içerisinde aynı bölgede bulunmaktadırlar (CBY\_3691, CBY\_3690 ve CBY\_3235 hariç) ve transkripsiyonel bir operon oluşturabilecekleri muhtemeldir. Bu muhtemel operon hem indirgen hem de yükseltgen basamakları kontrol ederek dengelenmiş bir yolak kullanımını sağlayabilmektedir.

3-HPA'nın hücreler üzerindeki toksisitesi 1,3-PDO üretimini negatif etkileyebileceğinden anında bu çevrimin gerçekleşmesi çok önemlidir. Abbad-Andaloussi et al., (1996) gliserol dehidrataz aktivitesinin 3-HPA'nın hücre içinde birikimini engellediğini göstermiş ve 1,3-PDO verimlerinin artırılabilmesi için bu enzimin aktivitesinin artırılması gerektiğini önermiştir. Çalışmasında ortamda

fazla bulunan NADH ölçülmüş ve gliserol dehidrataz enziminin 1,3-PDO dehidrojenaz enziminin aktivitesini sınırladığı belirtilmiştir, bu sebeple bu basamağın hız belirleyici basamak olduğu önerilmiştir. Bu tez çalışmasında da proteom düzeyinde gliserol dehidrataz seviyesinin (CBY\_0502) 1,3-PDO dehidrojenazdan hep yüksek olduğu gösterilmiştir. *K. pneumoniae* S6'dan izole edilmiş *dha* geni içeren rekombinant bir *Zygosacharomyces rouxii* JL2011'de gliserol dehidratazın kendi fizyolojik substratı olan gliserol ile mekanizma bazlı inaktivasyonunun gerçekleştiğini göstermiştir, ve inaktif enzimin ATP, Mg<sup>2+</sup>, vekoenzim B12 varlığında tekrar aktifleştirilebileceğini belirtmiştir (Ma et al., 2013). *K. pneumoniae*'nin aksine, *C. butyricum* koenzim B12'ye bağımlı olmayan bir gliserol dehidrataz içermektedir.

Daha yüksek konsantrasyonlarda 1,3-PDO üretimi sadece verimler açısından önemli değildir, aynı zamanda diğer yan ürünlerin üretimini azaltacağından alt akım işlemlerinin maliyetini düşürmesi açısından da önemlidir. Zeng et al. (1993) *K. pneumoniae*'den farklı metabolik yollardan elde edilen maksimum ürün verimlerini incelemiştir. Enerji üretimi için sadece asetik asit yolağı kullanıldığında verim değerlerini 0.64 mol 1,3-PDO/mol gliserol ve 0.57 mol ATP/mol gliserol olarak bildirmiştir. Buna karşın, etanol yolağı kullanılarak enerji üretildiğinde yalnızca 0.11 mol 1,3-PDO/mol gliserol verimlerine ulaşılabilmektedir, ancak, ATP verimleri daha yüksek olmuştur (0.79 mol ATP/mol gliserol). Teorik olarak, eğer enerji üretimi için yalnızca etanol yolağı kullanılırsa, bu durumda *K. pneumoniae*'den enerji bakımından en verimli üretim gerçekleştirilmiş olmaktadır. Fakat, yüksek başlangıç gliserol konsantrasyonlarında *K. pneumoniae*'nin büyümesi etanol birikimi ile inhibe olmaktadır ve buna ek olarak asetik asit ve 1,3-PDO üretim hızları artmaktadır. Çalışmada enerjinin yeterli olduğu koşullarda mikroorganizmaların daha az toksik olan ürünlerin üretim yollarını tercih ettiklerini ve enerji ihtiyaçlarının metabolizmayı yönlendirmediği önerilmiştir (Zeng et al., 1993). Wu et al. (2013) da maksimum 1,3-PDO verimleri için rekombinant bir *K. pneumoniae* kullanarak farklı bir yaklaşım denemiştir. Bu çalışmada 2,3-BD yolağı bloklanmıştır ve pirüvatın parçalanması ile yalnızca asetat, format ve laktat oluşmuştur. Bunun sonucunda asit konsantrasyonu artarak büyümeyi etkilemiştir. Ortamdan formatı uzaklaştırmak ve 1,3-PDO verimlerini arttırabilmek için format dehidrojenaz mikroorganizmaya entegre edilmiştir ve böylece 1,3-PDO verimleri%15.9 arttırılmıştır.

İndirgen basamak ile eş zamanlı gerçekleşen yükseltgen basamakta gliserol önce kofaktör olarak  $\text{NAD}^{+}$ 'ı kullanan gliserol dehidrojenazı ile dihidroksiasetona (DHA) (gliseron olarakta bilinmektedir) yükseltgenmektedir. Ardından DHA fosfoenolpirüvata bağlı bir DHA kinaz ile dihidroksiasetonfosfata (DHAP) fosforile olmaktadır. Bazı Clostridia'da gliserol, gliserol kinaz ve gliserol-fosfat-dehidrojenaz kullanarak da parçalanabilmektedir (Gonzalez-Pajuelo et al., 2006). *C. butyricum*'un proteomunda ise olası bir gliserol-fosfat-dehidrojenaz göreceli olarak yüksek miktarda gözlemlenmiştir, ancak gliserol yükseltgenmesi için gliserol kinaz az miktarda gözlemlendiğinden bu yolağın kullanılmadığı görülmektedir. Malaoui et al., (2001) iki farklı *C. butyricum* suşunda (biri genetik modifiye edilmiş diğeri doğal suş),  $\text{Mn}^{2+}$ 'ningliserol dehidrojenaz ve 1,3-PDO dehidrojenaz aktivitelerinde en etkin katyon olduğunu göstermiştir. Wang et al. (2003) iki farklı büyüme fazında kesikli beslemeli bir denemede bir *K. pneumoniae* suşunu 2D jel elektroforezde incelemiştir ve bu suşun da *C. butyricum* gibi PEP bağımlı ancak ATP bağımlı olmayan bir DhaK içerdiğini göstererek diğer suş ve türlere göre (*K. pneumoniae* ve *C. freundii*) farklılık gösterdiğini belirtmiştir. *K. pneumoniae*'de bulunan DhaKI'in aksine *C. butyricum*'da PEP'e bağımlı bir DhaK bulunmaktadır ve DHA'nın DHAP'ye dönüşümünü gerçekleştirmektedir, aynı zamanda da bu dönüşüm sırasında ATP kullanmamaktadır (Zeng et al., 2007).

DHA'nın fosforilasyonundan sonra, DHAP klasik Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (glikoliz) yolağına giriş yaparak 1 mol DHAP için net 2 mol ATP ve 1 mol NADH üretir. EMP yolağı ardından, pirüvat laktata indirgenebilir ya da asetil-KoA ve  $\text{CO}_2$ 'e yükseltgenebilir. Bu yükseltgenme basamağında açığa çıkan elektronlar  $\text{H}_2$  üretiminde kullanılabilirler ve asetil-KoA fosfotransferaz ve asetat kinaz aracılığı ile asetil-KoA'nın asetata dönüşümü sırasında ATP üreterek enerji depolanmasını sağlayabilirler.  $\text{H}_2$  varlığında ortamda fazladan indirgeyici eşdeğerlikler (NADH vb.) bulunur ve bunlar redoks dengesini koruyabilmek için diğer indirgen maddelerin oluşumunda kullanılabilirler. Yolağın başlangıcında pirüvatın pirüvat ferredoksin oksidoredüktaz kullanılarak asetil-KoA'ya dönüşümü  $\text{CO}_2$  ve indirgenmiş bir ferredoksin oluşumu ile sonuçlanır (Şekil 4.122). Bu indirgenmiş ferredoksin açıl-KoA dehidrojenaz aracılığı ile bütanoil-KoA'dan toplamda iki basamak ardından bütirat elde edilmesinde elektron taşıyıcı olarak görev alır. Bunun sonucunda pirüvatın parçalanması ile 1  $\text{CO}_2$ 'e 1/2 bütirat (mol:mol) oranı elde edilir. Bütirat sentezi her pirüvat tüketimi için 0.5 mol ATP üretimi ile sonuçlanırken, asetat sentezi her pirüvat tüketimi için 1 mol ATP ile sonuçlanmaktadır. Bütirat sentezinin aksine asetat sentezi sırasında NADH

tüketilmediği göz önünde bulundurulduğunda, bu yolak 1,3-PDO üretimini arttırabilmektedir. Ancak, deneyler sonucunda bütiratın asetattan önemli miktarda fazla üretildiği görülmektedir (Şekil 4.117).

Üretilen tüm yan ürünler göz önüne alındığında laktat, etanol, bütanol, H<sub>2</sub> ve özellikle bütiratüretimleri süresince NADH kullandıklarından dolayı 1,3-PDO'nun en önemli rakipleridir. Şekil 4.122'de görüldüğü gibi pirüvattan asetil KoA dönüşümü sırasında açığa bir indirgenmiş ve yükseltgenmesi gereken ferredoksin çıkar. H<sub>2</sub> üretimi bu ferredoksini okside etmek için bir yolken, *C. butyricum*'un bu yükseltgenmeyi bütirat yolağını kullanarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (ETF<sub>İnd</sub>'den ETF<sub>Yük</sub>'e). Çünkü, olası bir hidrojenaz proteomda bulunuyor olsa da (CBY\_2676 (Çizelge 4.13)) yalnızca yüksek gliserol konsantrasyonu kullanılan kültürlerde ve oldukça düşük seviyelerde bulunmaktadır. Bu yolağın NADH kullandığı göz önünde bulundurulduğunda yukarıda da bahsedildiği gibi bütiratın NADH kullanımı için en güçlü rakip olduğu söylenebilir. Teorik olarak, asetik asit üretimi fazladan 1 mol NADH oluşumu sağlarken, bütirat ve laktat üretimlerinde dehidrojenazlar tarafından NADH tüketildiğinden açığa fazladan NADH çıkmaz (Kubiak et al., 2012). Eğer etanol ya da bütanol yolları aktifse asetil KoA dönüşümü için NADH bu yollarında da kullanılabilir. Buna bağlı olarak, asetatin bütirata oranı hücrelerin metabolik durumu ile bağlantılandırılabilir. Sonuç olarak, bu orandaki artış (asetat konsantrasyonu/bütirat konsantrasyonu) hızlı bir büyümenin göstergesi olabilir. Elde edilen sonuçlar bu görüşü desteklemektedir. Gliserolün ortamda tüketilmeden kaldığı durumlarda bu oran eksponansiyel fazda daha düşüktür (düşük başlangıç gliserol konsantrasyonu kültürlerinde 1.17 veyüksek başlangıç gliserol konsantrasyonu kültürlerinde 0.25). Buna ek olarak, Çizelge 4.11'de de görüldüğü gibi büyüme hızı düşük gliserol konsantrasyonunda daha yüksektir. Hangi koşulda olursa olsun asetat üretimi tüketilen mol substrat başına daha çok ATP ürettiğinden mikroorganizmalar açısından hayati öneme sahiptir. *C. butyricum* analizlerinde etanol ya da bütanol üretimi görülmemiş olmasına rağmen (Şekil 4.117), mikroorganizma teorik olarak gliserolden bu iki alkolü de üretebilme yeteneğine sahiptir (Saint-Amans et al., 2001, Şekil 2.3). Ancak, ürün analizleri ile bağdaştırılan proteom analizlerinin ortaya çıkardığına göre bir proteinin varlığı, yüksek ya da düşük miktarda ifade edilmesi her durumda olası üretilecek yan ürün ile bağlantılı olmamaktadır. Bunun en büyük sebebi de gerçekleşmesi muhtemel, allosterik regülasyonlar gibi translasyon sonrası düzenlemelerdir (Monod et al., 1963). Pirüvattan laktat üretimi sırasında 1 mol NADH kullanılırken, asetil KoA'dan asetaldehit üretiminde 2 mol NADH tüketilir

ve bir indirgenmiş ferredoksin ile CO<sub>2</sub> üretimi gerçekleşir. Üretilen fermantasyon ürünleri fermantasyon süresinden de etkilenebilmektedir. Öncelikli olarak üretilen bütirat ve asetat ardından pH değerleri düşmektedir. Bu durumda, teorik olarak, mikroorganizma etanol ve bütanol gibi nötral yan ürünleri üretmeyi seçebilir. Ancak, bu tez çalışmasında, *C. butyricum* pH düşüşünde önerildiği gibi etkilenmemiş ve ne etanol ne de bütanol üretimi gözlenmemiştir (Şekil 4.117). Buna karşın *K. pneumoniae* pH düşüşlerinden etkilenecek farklı miktarlarda etanol üretmiştir. *C. butyricum* oldukça yüksek miktarlarda bütirat üretmiştir, ancak eğer bütanol üretimi gerçekleşseydi bu durum gözlenemezdi çünkü bütanoil KoA'nın bütanol üretimi için kullanımı sonrasında ne bütirat ne de ATP üretilmemektedir (Şekil 4.122). *C. butyricum*'da bütanol üretimi olmamasına rağmen, bütanol üretiminden sorumlu muhtemel genler proteomda ifade edilmişlerdir. Çizelge 4.13'te de görüldüğü gibi olası alkol dehidrojenazlar (CBY\_3747 ve CBY\_3751) yüksek başlangıç gliserol konsantrasyon kültürlerinde aşağı ayarlanmışlardır. Bu olası alkol dehidrojenazın yüksek protein değerleri pH'nın düşüşüne bağlı olarak mikroorganizmanın etanol üretimini gerçekleştirecek genleri aktive etmiş olmasını gösteriyor olabilir. Ancak yine de hiç etanol üretimi gözlenmemiştir.

*C. butyricum*'da gliserolün ortamda tüketilmeden kaldığı durumlarda NADP<sup>+</sup>:ferredoksin oksidoredüktaz (CBY\_2471, CBY\_2496 ve CBY\_3749) kullanılarak elektronlar H<sub>2</sub> açığa çıkarılmaktansa ferredoksinde NAD<sup>+</sup> eaktarılabılır ve böylece fazladan 1,3-PDO üretimi gerçekleştirilebilir (Leja et al., 2011). Ancak tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen proteomik analizlerde demire bağımlı bir hidrojenazın göreceli olarak yüksek protein oranlarında varlığı tespit edilmiştir (CBY\_2300, CBY\_3049), bu da *C. butyricum*'da H<sub>2</sub> üretiminin pirüvat ferredoksin oksidoredüktaz ve indirgenmiş bir ferredoksin ile pirüvatın asetil KoA ve CO<sub>2</sub>'e yükseltgenmesi ile gerçekleştirilebileceğini göstermiştir (CBY\_3642, CBY\_1889 ve CBY\_0233). Bu dönüşüm düşük H<sub>2</sub> verimlerini açıklamada ve buna ek olarak yüksek 1,3-PDO verimlerinin düşük H<sub>2</sub> verimleri ile bağlantısını açıklamakta kullanılabilir. Buna bağlı olarak, ortamda tüketilmeden kalan gliserol bulunduğu koşullarda gliserolden 1,3-PDO'ya dönüşümün artırılması indirgen gücün H<sub>2</sub>'den NADH'ye aktarılması ve karbon akışının da bütirat yolağından asetat yolağına aktarılması ile gerçekleştirilebilir (Zeng et al., 1993). Bir hidrojenaz aynı zamanda redoksu dengelemek için bir güvenlik vanası gibi çalışarak ortamda fazla bulunan indirgeyici eşdeğerlikleri okside edebilir bunun sebebi de bu reaksiyonun enerji depolanmayan egzergonik olmasıdır (Madigan et al., 2009).

Yarı geçirgen bir hücre zarı hücrenin içindeki ve dışındaki çözünebilen kimyasalların konsantrasyonunu dengeleyerek hücreyi olası bir ozmotik patlamadan korur böylece hücre dışarısındaki konsantrasyon içerisindekinden daha az olur (Madigan et al., 2009). Bununla bağlantılı olarak, gliserol bir ozmolit olarak görev yaptığından, *C. butyricum* ile çalışılmış olan iki farklı giriş gliserol konsantrasyonunda gözlemlenen değişiklikler ozmotik basınçtaki değişiklikler ile açıklanabilir (Kubiak et al., 2012). Başlangıç giriş gliserol konsantrasyonu arttırıldığında tüm çözünebilen yan ürünlerin üretim yolları (1,3-PDO, laktat, bütanol, bütirat ve asetat dahil etanol haricinde) her iki büyüme evresinde de aşağı ayarlanmıştır (Çizelge 4.13). Ayrıca, yüksek gliserol konsantrasyonunda 1,3-PDO, bütiratve asetat konsantrasyonları daha düşüktür (Şekil 4.117). Her iki durumda da etanol üretilmemesine rağmen olası etanol dehidrojenazın (CBY\_3753, Çizelge 4.13) en yüksek ifade edilen protein olarak analizlenmesi de şaşırtıcıdır. Genel tabloya bakıldığında, yüksek gliserol konsantrasyonunda üretilen solventlerin düşük konsantrasyonu gliserolün yavaş tüketimi ve buna bağlı daha yavaş büyüme hızı ile bağdaştırılabilir (Çizelge 4.11).

Gliserol hücre içerisine, ATP'ye bağımlı olmayan membran proteini, gliserol yöneten protein (GlpF) ile pasif difüzyon ile taşınmaktadır (da Silva et al., 2009; Sun et al., 2008). Pasif difüzyon kullanıldığından hiç bir taşıma işlemi ATP kullanılmamaktadır. Taşıma sistemi daha yavaş olsa da, gliserol taşınması için ATP üretmek zorunda kalmadıkları için hücreler için bu yöntem daha avantajlıdır. Yüksek gliserol konsantrasyonlarında gliserol difüzyon ile hücre içine taşınabilir, bu durumda GlpF proteini yalnızca düşük gliserol konsantrasyonlarında önem kazanmaktadır (örn., 8 mM'dan az) (Sun et al., 2003). Gliserol taşınımına karşı mikroorganizmanın gösterdiği iki yaklaşım düşünüldüğünde, gliserol akışının hücre içerisine fazla olması yüksek gliserol konsantrasyonunda daha yavaş bir gliserol tüketimini önermektedir. Fermantasyon sürecinde nütrientlerin tüketilmesine bağlı olarak, gliserol parçalanmasında uzayan süreç bakteri büyümesi ve dolayısı ile 1,3-PDO üretimi için dezavantajlı olabilmektedir. Özellikle yüksek giriş gliserol konsantrasyonu içeren kesikli kültürlerde bu membrandaki proteinin alabileceği maksimum konsantrasyonda substrat göz önünde bulundurularak prosesler tasarımılandırılmalıdır. Proteomik analizler sonucu bu proteinin her iki gliserol konsantrasyonunda da durağan fazda aşağı ayarlandığı görülmektedir (CBY\_9999, Çizelge 4.13). Daha da önemlisi, gliserol konsantrasyonu arttıkça *C. butyricum* büyümesinin de buna tepki olarak yavaşladığı ve proteinin de buna bağlı olarak aşağı ayarlandığı önerilmektedir.

## 6. SON DEĞERLENDİRME

Son yıllarda enerji sıkıntısından dolayı, Dünya’da ve Türkiye’de alternatif enerji kaynaklarına özellikle biyoyakıtlara olan ilginin önemli miktarda artması ile biyodizel üretiminde de önemli patlamalar olmuştur. Biyodizel üretiminde toplam üretimin kütlece %10’u atık gliserol olarak açığa çıkmaktadır. Biyodizel üreticileri üretim fazlası olan gliserolü, çevreye de zarar vermeden nasıl bertaraf edecekleri konusunda ciddi sıkıntı yaşamaktadırlar ve gliserol için ekolojik ve ekonomik bir çözüm beklemektedirler. Bu yaklaşımda, gliserol atığının ekonomik değeri olan bir kaynak haline dönüştürülmesi ile ciddi bir çevre problemine çözüm getirilerek bu atıktan elde edilen yan gelirle biyodizel üretim maliyetleri aşağı çekilebilecektir.

Hali hazırda ekonomik değeri düşük olan gliserolden katma değeri çok yüksek ve çevreyle dost bir biyopolimer hammaddesi olan 1,3-PDO’nun biyoteknolojik yöntemler ile üretimi gelecek vaad etmektedir. Çok yaygın ve geniş bir kullanım alanına sahip olan 1,3-PDO, hammadde olarak son 25 yılda kimya endüstrisinin en çok ilgi çeken moleküllerinden birisi olmuştur. Mürekkep üretiminden, tekstil endüstrisi için hammadde üretimine, medikal uygulamalara kadar birçok alanda kullanımı mevcuttur. Endüstriyel 1,3-PDO üretimi, yeni bir polyester tipi olan ve tekstil endüstrisinde önemli uygulama alanı bulan PTT’nin sentezinde gerekli önemli monomerlerden biri olmasından dolayı da ayrıca ilgi kazanmıştır (Németh and Sevela, 2008).

1,3-PDO üretiminin en önemli girdisi ve masrafı olan hammadde temininin direk atık maddeden gerçekleştirilmesi, daha çevreci ve ekonomik bir yaklaşımdır. Bununla birlikte gliserol biyodönüşümüne bağlı 1,3-PDO, geleneksel üretime göre enerji maliyetinde %40 ve gaz emisyonlarında %20’lik bir azalışa neden olmaktadır (DuPont, 2010).

Maksimum üretim verimlerine ulaşabilmek için mikroorganizmaya özgü olarak proses optimizasyonu oldukça gereklidir. Ucuz ve verimli yöntemler ile biyoteknolojik 1,3-PDO üretimi arayışında gün geçtikçe daha başarılı olunmaktadır. Ancak, 1,3-PDO yolağındaki engel nasıl aşılır sorusunun cevabı ne kolaydır ne de direk cevap verilebilirdir ve doğru olan birden çok yanıt ortaya çıkabilir. Hala, istenilen verime ulaşabilmek için gerçekleştirilmesi gereken çok araştırma vardır. Literatür incelendiğinde, yalnızca metabolizma ve biyoproses

mühendisliğinin birlikte gerçekleştirildiği çalışmalarda verimli ve ekonomik çözümlere ulaşılabilmektedir (Zhang et al., 2006; Tang et al., 2009).

Tez boyunca gerçekleştirilen biyoprosesler biyokimyasal bir yöntem olan proteomiks ile de birleşerek metabolizmaya daha ayrıntılı bir bakış gerçekleştirilebilmesini sağlamıştır. Böylece katma değeri yüksek bir ürün olan 1,3-PDO üretimindeki en önemli etmenler belirlenmeye çalışılmıştır. *C. butyricum* 1,3-PDO üretimi için literatürde sıklıkla kullanılmış olsa da literatürde proteomik analizler için kullanımı hiç gerçekleştirilmemiştir, buna ek olarak çok az sayıda çalışmada 1,3-PDO üretimini protein düzeyinde anlayabilmek için diğer mikroorganizmalar ile çalışmalar yapılmıştır (Jin ve Lee, 2008, Gonzalez et al., 2013, Wang et al., 2003). Literatürdeki bu çalışmalarda oldukça fazla protein ve pek çok yolaktan bahsedilmiş olsa da (karbonhidrat metabolizması, protein sentezi, gliserol parçalanmasının indirgen ve yükseltgen basamakları vb.), bu tez çalışması 1,3-PDO üretimi sırasında aynı anda kullanılan tüm yollardaki ana proteinlerin *C. butyricum*'da gösterildiği ilk çalışmadır. Ayrıca, bu çalışma sonucunda etanol (CBY\_3753) ve bütirat (CBY\_2919) üretim yolları dışındaki yollardaki protein ifadelerinin yüksek gliserol konsantrasyonunda her iki büyüme fazında da azaldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte varılan bir diğer sonuçta olası hidrojenazların (CBY\_2300 ve CBY\_3049) ve olası bir 3-hidroksibütiril-KoA dehidratazın (CBY\_3041) yüksek gliserol konsantrasyonunda durağan fazda yukarı ayarlandıklarıdır. Ayrıca, yüksek gliserol konsantrasyonunun büyüme hızını yavaşlattığı ve aynı molar 1,3-PDO verimlerine ulaşılmasına rağmen metabolik yollarda yer alan proteinlerin ifadelerini azalttığı raporlanmıştır. Elde edilen bu veriler genetik mühendisliği kullanılarak 1,3-PDO üretimini arttırabilecek çalışmaların temelini oluşturma niteliğindedir. Metabolik yollardaki hız belirleyici basamaklar bulunarak genetik değişiklikleri ile suş gelişimi proteomiksin kullanıldığı en önemli ve başarılı yaklaşımlardan biridir (McConkey, 2011). Örneğin, *C. butyricum* DSM 5431'de gliserol dehidrataz hız belirleyici basamak olarak bulunmuş ve ortamda NADH'in varlığına bağlı olarak bu enzimin aktivitesinin 1,3-PDO dehidrojenaz aktivitesini de sınırlandırdığı böylece üretimlerini düşük olduğu belirlenmiştir (Abbad-Andaloussi et al., 1996). Bu çalışmada da yüksek gliserol konsantrasyonunda olası bir gliserol dehidrataz (CBY\_0502) *C. butyricum*'un proteomunda daha düşük seviyede ifade edilirken olası bir 1,3-PDO dehidrojenaz (CBY\_0500) da aşağı ayarlanmıştır. Dolayısıyla, bu gen (CBY\_0502) 1,3-PDO üretimlerini arttırabilmek için genetik manipülasyonlarda kullanılabilir. Hatta, bu genetik değişikliklerin sonuçları da proteomik analizler ile takip edilerek kontrol



edilebilir. –omiks teknolojilerinin (genomiks, proteomiks, transkriptomiks, metabolomiks) hepsini birlikte kullanarak metabolik yollardan ve redoks dengelerinden ayrıntılı bilgiler elde edilebilir. Böylece, üretimler istenilen yöne kaydırılabilir ve yüksek 1,3-PDO üretilirken düşük yan ürünler üretilebilir. Ancak bu noktada üretimin geneline bakmak çok önemlidir, çünkü, bazı yolların kapatılması hücrenin enerji üretimlerini de kısıtlayabileceğinden hücre ölümlerine ya da kararlılık problemlerine yol açabilir. Örneğin, mikrobiyal büyüme bütirat yolağının bloklanması ile etkilenmeyebilirken, üretilen ATP miktarı düşünüldüğünde asetat yolağının kapatılması ile çok yüksek olasılıkla büyüme etkilenecektir. Bu yüzden, genetik mühendisliği çalışmalarında bu sonuçlar kullanılırken hücrelerin protein seviyeleri ve bunlara karşı verdikleri fizyolojik tepkiler birlikte değerlendirilmelidir.

Ekonomik ve çevresel sebepler düşünüldüğünde substrat seçimi biyoteknolojik proseslerde en önemli problemlerden biridir ve çoğunlukla atık hammadde kullanılması gündeme gelmektedir. Buna ek olarak, ürün saflaştırılmasının yüksek maliyeti sebebi ile yüksek konsantrasyonda son ürün üretilmesi önem arz etmektedir. Bunu başarabilmek için 1,3-PDO üretimi sırasında *C. butyricum* için bütirat, laktat ve asetat; *K. pneumoniae* için ise asetat, laktat ve etanol üretimleri minimuma indirilmelidir. Bu sebeple, elde edilen proteomik analiz sonuçları farklı gliserol konsantrasyonlarında hücrelerin hangi fazlarda nasıl tepkiler verdiğini göstermekte ve buna bağlı olarak proses optimizasyonuna yardımcı olabilmektedir. Sonraki çalışmalarda hücrelerin immobilize olduklarında protein düzeyindeki farklılıkları değerlendirilerek hali hazırda yüksek konsantrasyonda ürün elde eldesi sağlanmış bir proses yöntemi ile çok daha iyi sonuçlar alınmasına katkıda bulunabilecektir. Sonuç olarak proteomiksin biyoproseslere entegre edilmesi ile hedeflenen düşük maliyetli alt akım işlemlerine ulaşılacaktır ve 1,3-PDO üretimi yüksek verimlilikte ve düşük hacimde reaktörlerde en iyi şekilde gerçekleştirilebilecektir.

## 7. ÖNERİLER

Tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucu 1,3-PDO üretim verimlerinin immobilize sistemler ile arttırılabileceği gösterilmiştir. Bunun yanısıra, metabolik yollara protein düzeyinde açıklamalar getirilerek bu üretimin moleküler boyutuna da inilmiştir. Böylece protein analizleri ile 1,3-PDO üreticilerinin metabolik geçmişlerinin çok iyi anlaşılmasının daha ileri mühendislik ve optimizasyon çalışmaları için ön şart olduğu belirtilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda elde edilen bu veriler göz önünde bulundurularak substrat toleransı göstermeyecek rekombinant türler elde edilebilir. Mikroorganizmaların artan substrat konsantrasyonlarını daha iyi tolere ederek ortama adapte olduğu göz önünde bulundurularak kesikli-beslemeli sistemlerde bu üretim gerçekleştirilebilir. Giriş gliserol konsantrasyonu arttıkça tüketilen gliserol yüzdesi azaldığından bu durumu minimize edebilmek için iki kademeli biyoreaktör sistemleri kullanılabilir. Böylece ikinci sistemde ilk sistemde kullanılmadan kalan gliserol tüketilmek üzere sunulmuş olacaktır. Artan substrat tüketiminin doğurabileceği yüksek yan ürün konsantrasyonları da genetik mühendisliği araçları kullanılarak düşürülebilir, örneğin istenmeyen yan ürünlere giden metabolik yollar bloklanabilir. Olası rekombinant mikroorganizmalardaki yüksek substrat tüketimine bağlı yüksek 1,3-PDO üretimi ve düşük yan ürün üretimleri ile ayırma-saflaştırma işlemleri dolayısıyla toplam üretim maliyetleri de azaltılabilir. İleri çalışmalarda ayrıca bu tez çalışması kapsamında immobilize sistemlerde kullanılmış olan ve en iyi 1,3-PDO üreticilerinden biri olan *K. pneumoniae* mikroorganizması da protoemik analizler kullanılarak incelenebilir. Buna ek olarak hücrelerin gösterdiği fizyolojik değişimlerin protein seviyeleri ile bağdaştırılabilmesi için enzim aktivite tayinleri gerçekleştirilerek hem immobilize hem de askıda sistemler karşılaştırılabilir ve yüksek ürün verimlerinin moleküler düzeyde açıklaması getirilebilir. Böylece küçük reaktör hacimleri gibi immobilize sistemlerin getirdiği avantajlardan daha fazla yararlanılabilir.

Tüm üretimlerde saf gliserol yerine biyodizel atığı gliserolün de kullanılabilirliği bu üretimi biyodizel üreticilerinin lehine çevirebilir. Bu hammaddenin geri dönüşümünün sağlanabilmesi için entegre bir tesis kurularak üretim maliyetleri minimuma indirilebilir. Bir yandan biyodizel üretimi bir yandan da özellikle tekstil sektöründe çok önemli yeri olan değerli biyomonomer 1,3-PDO üretimi gerçekleştirilerek üreticiye oldukça karlı bir geri dönüş söz konusu olabilir.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Abad, S. and Turon X.**, 2012, Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids, *Biotechnology Advances*, 30:733-741pp.
- Abbad-Andaloussi, S., Guedon, E., Spiesser, E. and Petitdemange, H.**, 1996, Glycerol dehydratase activity: the limiting step for 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum* DSM 5431, *Letters in Applied Microbiology*, 22(31):311-314pp.
- Almeida, J.R., Favaro L.C. and Quirino B.F.**, 2012, Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste, *Biotechnology for Biofuels*, 5(48):6834–6835pp.
- Asrar, J. and Gruys K.J.**, 2002, Biodegradable Polymer (Biopol®) Biopolymers, Polyesters III Applications and Commercial Products. Weinheim: Wiley VCH., 53-89pp.
- Barbirato, F., Camarasa-Claret C., Grivet J.P. and Bories A.**, 1995, Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43:786–793pp.
- Başaran, E., Aras, S., Cansaran-Duman, D.**, 2010, Genomik, proteomik, metabolomik kavramlarının genel bakış ve uygulama alanları, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67(2):85-96pp.
- Berovič, M.**, 2011, Sterilization in Biotechnology, *Comprehensive Biotechnology* Burlington: Academic Press, 135–150pp.
- Biebl, H.**, 1991, Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35: 701-705pp.
- Biebl, H., Marten S., Hippe H. and Deckwer W.**, 1992, Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36:592–597pp.
- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A.P., and Deckwer, W.D.**, 1999, Microbial production of 1, 3-propanediol, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52:289–97pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Casali, S., Güngörmüşler M., Bertin L., Fava F. and Azbar N.,** 2012, Development of a biofilm technology for the production of 1,3-propanediol (1,3-PDO) from crude glycerol, *Biochemical Engineering Journal*, 64:84-90pp.
- CCM International Ltd.** 2013. *Biomaterials China News*.  
<http://www.cnchemicals.com> (Erişim Tarihi: 25 Aralık 2013)
- Celinska, E.,** 2010, Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering, *Biotechnology Advances*, 28:519-530pp.
- Chang, H.N., Yoo, I.K. and Kim, B.S.,**1994, High density cell culture by membrane-based cell recycle, *Biotechnology Advances*, 12:467–487pp.
- Chang, J.S., Lee, K.S. and Lin, P.J.,**2002, Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12):1167-1174pp.
- Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Dietz, D., Doulgeraki, A.I., Nychas, G.J. and Zeng, A.P.,** 2011a, Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process, *Applied Microbiology and Technology*, 91:101-112pp.
- Chatzifragkou, A., Aggelis, G., Komaitis, M., Zeng, A.P. and Papanikolaou, S.,** 2011b, Impact of anaerobiosis strategy and bioreactor geometry on the biochemical response of *Clostridium butyricum* VPI 1718 during 1,3-propanediol fermentation, *Bioresource Technology*, 102:10625–10632pp.
- Chen, Z., Liu, H. and Liu, D.,** 2011, Metabolic pathway analysis of 1,3-propanediol production with a genetically modified *Klebsiella pneumoniae* by overexpressing an endogenous NADPH-dependent alcohol dehydrogenase, *Biochemical Engineering Journal*, 54 (3): 151-157pp.
- Cheng, K.K., Zhang, J.A., Liu, D.H., Sun, Y., Liu, H.J., Yang, M.D. and Xu, J.M.,**2007, Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*, *Process Biochemistry*, 42:740–744pp.
- Clomburg, J.M. and Gonzalez R.,** 2013, Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals, *Trends in Biotechnology*, 31:20–28pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- da Silva, G.P., Mack, M. and Contiero, J.,** 2009, Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology, *Biotechnology Advances*, 27:30-39pp.
- Darrett, R.H. and Grisham, C.M.,** 1995, Biochemistry. New York, NY: Saunders College Publishing, 326p.
- Demirbaş, A.,** 2007, Biodegradable Plastics from Renewable Resources, *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 29:419-424pp.
- Dobson, R., Gray, V. and Rumbold, K.,** 2012, Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39:217–226pp.
- DuPont.** 2013. *DuPont™, The miracles of science™.* [http://www2.dupont.com/Cerenol\\_Polyols/en\\_US/index.html](http://www2.dupont.com/Cerenol_Polyols/en_US/index.html) (Erişim Tarihi: 3 Aralık 2013)
- Efthymiou, G.S. and Shuler, M.L.,** 1987, Elimination of diffusional limitation in a membrane entrapped cell reactor by pressure cycling, *Biotechnology Progress*, 3:259–264pp.
- Fang, H.H.P., Liu, H. and Zhang, T.,** 2002, Characterization of a hydrogen producing granular sludge, *Biotechnology and Bioengineering*, 78:44–52pp.
- FNR,** 2006, Bioplastics, *Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe*, Gülzow, 45p.
- Fujian Shengda Biotechnology Co., Ltd.** 2011. *Fujian Shengda Biotechnology Co., Ltd.* [http://www.tjskl.org.cn/suppliers/czaec326/f-fujian\\_shengda\\_biotechnology\\_co\\_ltd.html](http://www.tjskl.org.cn/suppliers/czaec326/f-fujian_shengda_biotechnology_co_ltd.html) (Erişim Tarihi: 3 Aralık 2013)
- Gerngross, T.U. and Slater, S.C.,** 2000, How green are green plastics? *Scientific American* 12:37–41pp.
- Gonzalez-Pajuelo, M., Meynial-Salles, I., Mendes, F., Andrade, J.C., Vasconcelos, I. and Soucaille, P.** 2005, Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol, *Metabolic Engineering*, 7:329-336pp.
- Gonzalez, N.C., Vallejo, A.F., Sanchez-Gomez M. and Montoya, D.,** 2013, Protein identification in two phases of 1,3-propanediol production by proteomic analysis, *Journal of Proteomics*, 89:255-264pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Güngörmüşler, M., Gönen, Ç. and Azbar, N.,** 2011a, Continuous production of 1,3-propanediol using raw glycerol with immobilized *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 in comparison to suspended culture, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34:727 – 733 pp.
- Güngörmüşler, M., Gönen, Ç. and Azbar, N.,** 2011b, Use of ceramic-based cell immobilization to produce 1,3-propanediol from biodiesel-derived waste glycerol with *Klebsiella pneumoniae*, *Journal of Applied Microbiology*, 111:1138–1147 pp.
- Güngörmüşler, M., Gönen, Ç., Özdemir, G. and Azbar, N.,** 2010, 1,3-Propanediol production potential of *Clostridium saccharobutylicum* NRRL B-643, *New Biotechnology*, 27:782–788pp.
- Güngörmüşler, M., Gonen, C., Ozdemir, G. and Azbar, N.,** 2010, Fermentation medium optimization for 1,3-propanediol production using Taguchi and Box-Behnken experimental designs, *Fresenius Environmental Bulletin*, 19:2840–2847pp.
- Homann, T., Tag, C., Biebl, H., Deckwer, W. and Schink, B.,**1990, Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains, 33:121-126pp.
- Hu, B. and Chen, S.,** 2007, Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(15):3266-3273pp.
- Huang, J., Yamaji, H. and Fukud, H.,** 2007, Immobilization of *Escherichia coli* cells using porous support particles coated with cationic polymers, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(2):98–103pp.
- Huang, Y., Li, Z., Shimizu, K. and Ye, Q.,** 2012, Simultaneous production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol by a recombinant strain of *Klebsiella pneumoniae*, *Bioresource Technology*, 103:351–359pp.
- Hulshoff, L.W., de Castro Lopes, S.I., Lettinga, G. and Lens, P.N.L.,**2004, Anaerobic sludge granulation, *Water Resources*, 38(6):1376-1389pp.
- Ishikawa, M., Shohei, Y., Yuzuru, T., Sode, K., Tamiya, E. and Tomiyama, M.,** 2006, Development of a compact high-density microbial hydrogen reactor for portable bio-fuel cell system, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11):1484-1489pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Islam, R., Cicek, N., Sparling, R. and Levin, D.,** 2006, Effect of substrate loading on hydrogen production during anaerobic fermentation by *Clostridium thermocellum* 27405, *Applied and Microbial Cell Physiology*, 72:576–583 pp.
- Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T. and Nishio, N.,** 2005, Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100:260-265 pp.
- Jekel, M., Buhr, A., Wilke, T. and Vorlop, K.-D.,** 1998, Immobilization of biocatalysts in LentiKats®, *Chemical Engineering and Technology*, 21(3):275–278pp.
- Jensen, T.O., Kvist, T., Mikkelsen, M.J. and Westermann, P.,** 2012, Production of 1,3-PDO and butanol by a mutant strain of *Clostridium pasteurianum* with increased tolerance towards crude glycerol, *Applied and Microbial Biotechnology Express*, 2(44):(published online)
- Ji, X. J., Huang, H., Zhu, J. G., Hu, N. and Li, S.,** 2009, Efficient 1,3-propanediol production by fed-batch culture of *Klebsiella pneumoniae*: the role of pH fluctuation, *Applied and Microbiol Technology*, 159:605–613pp.
- Jin, L.H. and Lee, J.H.,** 2008, Change in proteomic profiles of genetically modified 1,3-propanediol-producing recombinant *E. coli*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18:1439-1444pp.
- Jin, P., Li, S., Lu, S.G., Zhu,J.G. and Huang H.,** 2011, Improved 1,3-propanediol production with hemicellulosic hydrolysates (corn straw) as cosubstrate: Impact of degradation products on *Klebsiella pneumoniae* growth and 1,3-propanediol fermentation, *Bioresource Technology*, 102:1815-1821pp.
- Jun, S.A., Moon, C., Kang, C.H., Kong, S.W., Sang, B.I. and Um, Y.,** 2010, Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*, *Applied Microbiology and Technology*, 161:491-501pp.
- Kanekanian, A.,** 2009, Fermentation, *Microbiology and Biotechnology*, *International Journal of Dairy Technology*, 62(2):284–285pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Kapdan, I. K. and Kargi, F.,** 2006, Bio-hydrogen production from waste materials, *Enzyme and Microbial Technology*, 38:569-582pp.
- Kaur, G., Srivastava, A.K. and Chand, S.,** 2012a, Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol, *Biochemical Engineering Journal*, 64:106-118pp.
- Kaur, G., Srivastava, A.K. and Chand, S.,** 2012b, Mathematical modelling approach for concentration and productivity enhancement of 1,3-propanediol using *Clostridium diolis*, *Biochemical Engineering Journal*, 68:34-41pp.
- Khanna, S., Goyal, A. and Moholkar, V.S.,** 2013, Production of n-butanol from biodiesel derived crude glycerol using *Clostridium pasteurianum* immobilized on Amberlite, *Fuel*, 112:557-561pp.
- Kierstan, M.P.J. and Coughan, M.P.,** 1985, Immobilization of cells and enzymes by entrapment. Immobilized cells and enzymes- A Practical Approach. Oxford: IRL Press, UK, 449p.
- Kitteringham, N.R., Jenkins, R.E., Lane, C.S., Elliot, V.L. and Kevin Park, B.,** 2009, Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics, *Journal of Chromatography B*, 877:1229-1239pp.
- Konsoula, Z. and Liakopoulou-Kyriakides, M.** 2006, Thermostable  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules, *Enzyme and Microbial Technology*, 39:690-696pp.
- Kubiak, P., Leja K., Myszka, K., Celinska, E., Spychala, M., Szymanowska-Powalowska, D., Czaczyk, K. and Grajek, W.,** 2012, Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthesize 1,3-propanediol from glycerol, *Process Biochemistry*, 47:1308–1319pp.
- Kurban, S. ve Mehmehtöglü, İ.,** 2010, Proteomiks, *Yeni Tıp Dergisi*, 27:70-75 ss.
- Kurian, J.V.A.,** 2005, New polymer platform for the future—Sorona® from corn derived 1, 3-propanediol, *Journal of Polymers and the Environment*, 13:159–67pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Lee, K.S., Wo, J.F., Lo, Y.S., Lo, Y.C., Lin, PiJ. and Chang, J.S.,** 2004, Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor, *Bioetchnology and Bioengineering*, 87:648-657pp.
- Leja, K., Czaczyk, K. and Myszka, K.,** 2011, Biotechnological synthesis of 1,3-propanediol using *Clostridium* ssp., *African Journal of Biotechnology*, 10:11093-11101pp.
- Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., de Zeeuw, W. and Klapwijk, A.,** 1980, Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological waste water treatment especially for anaerobic treatment, *Biotechnology and Bioengineering*, 22:699–734pp.
- Levin, D.B.,** 2010, Advanced Cellulosic Biofuels. Paper presented at the ABIC meeting, Saskatoon, Canada.
- Li, Q., Zhao, X.G., Chang, A.K., Zhang, Q.M. and Bai, F.W.,** 2012, Ethanol-induced yeast flocculation directed by the promoter of TPS1 encoding trehalose-6-phosphate synthase for efficient ethanol production, *Metabolic Engineering*, 14:1–8pp.
- Liu, L.L., Wang, Z.P., Yao, J., Sun, X.J. and Cai, W.M.,** 2005, Investigation on the formation and kinetics of glucose-fed aerobic granular sludge, *Enzyme and Microbial Technology*, 36:712-716pp.
- Liu, Y., Xu, H.-L., Yang, S.-F. and Tay, J.-H.,** 2003, Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor, *Water Resources*, 37(3):661-673pp.
- Liu, B., Christiansen, K., Parnas, R., Xu, Z. and Li, B.,** 2013, Optimizing the production of hydrogen and 1,3-propanediol in anaerobic fermentation of biodiesel glycerol, *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(8):3196–3205pp.
- Ma, Z., Bian, Y., Shentu, X. and Yu, X.,** 2013, Development of a novel recombinant strain *Zygosacharomyces rouxii* JL 2011 for 1,3-propanediol production from glucose, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97:4055-4064 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G.L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D.L., Liebler, D.C. and MacCoss, M.J.,** 2010, Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments, *Bioinformatics*, 26(7):966-968pp.
- Madigan, M., Martinko, J, Dunlap, P.V. and Clark, D.P.,** 2009, Brock Biology of Microorganisms (12th ed.). Pearson Education. ISBN 0-321-53615-0, 1061p.
- Maervoet, V.E.T., Beauprez, J., De Maeseneire, S.L., Soetaert, W.K. and De Mey, M.,** 2012, *Citrobacter werkmanii*, a new candidate for the production of 1,3-propanediol: strain selection and carbon source optimization, *Green Chemistry*, 14:2168–2178pp.
- McConkey, B.J.,** 2011. Theory and Applications of Proteomics, Editor-in-Chief: Murray Moo-Young (Ed.), Comprehensive Biotechnology (Second Edition). Academic Press, Burlington, 461p.
- Menzel, K., Zeng, A.P. and Deckwer, W.,** 1997, High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*, *Enzyme and Microbial Technology*, 20:82-86pp.
- Metsoviti, M., Zeng, A.P., Koutinas, A.A. and Papanikolaou, S.,** 2013, Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses, *Journal of Biotechnology*, 163:408-418pp.
- Mickelson, M.N. and Werkman, C.H.,** 1940, The dissimilation of glycerol by *Coli-Aerogenes intermediates*, *Journal of Bacteriology*, 39:709–715pp.
- Monod, J., Changeux, J.P., and Jacob, F.,** 1963, Allosteric proteins and cellular control systems, *Journal of Molecular Biology*, 6:306-329pp.
- Moon, C., Ahn, J. H., Kim, S.W., Sang, B.I. and Um, Y.,** 2010, Effect of biodiesel-derived raw glycerol on 1,3-propanediol production by different microorganisms, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161:502–510pp.
- Nakamura, C.E. and Whited, G.M.,** 2003, Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol, *Current Opinion in Biotechnology*, 14:454-459pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Ndimba, B.K., Ndimba, R.J., Johnson, T.S., Waditee-Sirisattha, R., Baba, M., Sirisattha, S., Shiraiwa, Y., Agrawal, G.K. and Rakwal, R.,** 2013, Biofuels as a sustainable energy source: An update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae, *Journal of Proteomics*, 93(20):234-244pp.
- Németh, Á. and Sevela, B.,** 2008, Development of a New Bioprocess for Production of 1,3-propanediol I: Modeling of Glycerol Bioconversion to 1,3-propanediol with *Klebsiella pneumoniae* Enzymes, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 144(1):47-58pp.
- Oh, B., Hong, W., Heo, S., Luo, L.H., Kondo, A., Seo, J. and Kim, C.H.,** 2013, The production of 1,3-propanediol from mixtures of glycerol and glucose by a *Klebsiella pneumoniae* mutant deficient in carbon catabolite repression, *Bioresource Technology*, 130:719-724pp.
- Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Marc, I. and Aggelis, G.,** 2008, Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil, *Biomass and Bioenergy*, 32:60-71pp.
- Papanikolaou, S., Ruiz-Sanchez, P., Pariset, B., Blanchard, F. and Fick, M.,** 2000, High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain, *Journal of Biotechnology*, 77:191-208pp.
- Pflugl, S., Marx, H., Mattanovich, D. and Sauer, M.,** 2012, 1,3-Propanediol production from glycerol with *Lactobacillus diolivorans*, *Bioresource Technology*, 119:133-140pp.
- Pflugmacher, U. and Gottschalk, G.,** 1994, Development of an immobilized cell reactor for the production of 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5:786-793pp.
- Poirier, Y., Nawrath, C. and Somerville, C.,** 1995, Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants, *Biotechnology*, 13:142-150pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Raynaud, C., Sarçabal, P., Meynial-Salles, I., Croux, C. and Soucaille, P.,** 2003, Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 100:5010-5015pp.
- Ringel, A.K., Wilkens, E., Hortig, D., Willke, T. and Vorlop, K.D.,** 2012, An improved screening method for microorganisms able to convert crude glycerol to 1,3-propanediol and to tolerate high product concentrations, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93:1049-1056pp.
- Ripoll, V., Belkhdja, S., Santos, V.E. and García-Ochoa, F.,** 2012, Enhanced 1,3-propanediol production by glycerol fermentation pathway by *Escherichia blattae* using different pH strategies, *New Biotechnology* 29 (Supplement):52-53pp.
- Robinson, J.R.,** 1991, Dual hollow fiber bioreactor for cell culture, Patent No: US5015585.
- Rossi, D.M., da Costa, J.B., de Souza, E.A., Peralba, M.d.C.R. and Ayub, M.A.Z.,** 2012, Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia, *Renewable Energy*, 39:223-227pp.
- Rossi, D.M., de Souza, E.A., Flôres, S.H. and Ayub, M.A.Z.,** 2013, Conversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*, *Renewable Energy*, 55:404-409pp.
- Rupp, R.G.,** 1985, Use of cellular microencapsulation of yeasts for use in the tower fermentor, *Biotechnology Letters*, 4:621-626pp.
- Saint-Amans, S., Girbal, L., Andrade, J., Ahrens, K. and Soucaille, P.,** 2001, Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures, *Journal of Bacteriology*, 183:1748-1754pp.
- Sander, R.,** 1999, Compilation of Henry's law constants for inorganic and organic species of potential importance in environmental chemistry (Version 3). Mainz, Germany: Air chemistry department, Max-Planck Institute of Chemistry; 107p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Sattayasamitsathit, S., Prasertsan, P. and Methacanon, P.**, 2011, Statistical optimization for simultaneous production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol using crude glycerol by newly bacterial isolate, *Process Biochemistry*, 46:608–614pp.
- Schlieker, M. and Vorlop, K.**, 2006, A Novel Immobilization Method for Entrapment: LentiKats® *Immobilization of Enzymes and Cells* Humana Press., 333p.
- Selembo, P.A., Perez, J.M., Lloyd, W.A. and Logan, B.E.**, 2009, Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures, *Biotechnology Bioengineering*, 104:1098-1106pp.
- Shafiee, S. and Topal, E.**, 2009, When will fossil fuel reserves be diminished? *Energy Policy*, 37:181–189pp.
- Shi, Y.F., Jin, F.X. and Wu, Y.Y.**, 1997, Microfiltration membrane bioreactor in stirred back flush operation for biotransformation using intact cells, *Process Biochemistry*, 32:387–390pp.
- Shriver-Lake, L.C., Gammeter, W.B., Bang, S.S. and Pazirandeh, M.**, 2002, Covalent binding of genetically engineered microorganisms to porous glass beads, *Analytical Chimica Acta*, 470:71–78pp.
- Slater, S., Houmiel, K.L., Tran, M., Mitsky, T.A., Taylor, N.B., Padgett, S.R. and Gruys, K.J.**, 1998, Multiple beta-ketothiolases mediate poly (beta-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*, *Journal of Bacteriology*, 180:1979-1987pp.
- Slater, S., Mitsky, T.A., Houmiel, K.L., Hao, M., Reiser, S.E., Taylor, N.B., Tran, M., Valentin, H.E., Rodriguez, D.J., Stone, D.A., Padgett, S.R., Kishore, G. and Gruys, K.J.**, 1999, Metabolic engineering of Arabidopsis and Brassica for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production, *Nature Biotechnology*, 17:1011–1016pp.
- Sun, J., van den Heuvel, J., Soucaille, P., Qu, Y. and Zeng, A.P.**, 2003, Comparative genomic analysis of dha regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria, *Biotechnology Progress*, 19(2):263-72pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Sun, Y.Q., Qi, W.T., Teng, H., Xiu, Z.L. and Zeng, A.P.**, 2008, Mathematical modeling of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Concerning enzyme-catalytic reductive pathway and transport of glycerol and 1,3-propanediol across cell membrane, *Biochemical Engineering Journal*, 38(1):22-32pp.
- Tang, X., Tan, Y., Zhu, H., Zhao, K. and Shen, W.**, 2009, Microbial conversion of glycerol to 1, 3-propanediol by an engineered strain of *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 75:1628–1634pp.
- Tay, J.H., Tay, T.-L., Yu, L., Yeow, S.K. and Ivanov, V.**, 2006, Biogranulation Technologies for Wastewater Treatment, *Waste Management Series 6*, 115-134pp.
- Thauer, R.K., Jungermann, K. and Decker, K.**, 1977, Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria, *Bacteriology Reviews*, 41:100-180pp.
- Tjahjasari, D., Kaeding, T. and Zeng, A.P.**, 2011, 1,3-Propanediol and Polytrimethyleneterephthalate, *Comprehensive Biotechnology* Burlington: Academic Press., 229 - 242pp.
- Venkataramanan, K.P., Boatman, J.J., Kurniawan, Y., Taconi, K.A., Bothun, G.D. and Scholz, C.**, 2012, Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93:1325-1335pp.
- Wang, W., Sun, J., Hartlep, M., Deckwer, W.D. and Zeng, A.P.**, 2003, Combined use of proteomic analysis and enzyme activity assays for metabolic pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*, *Biotechnology and Bioengineering*, 83:525-536pp.
- Wang, Z., Zhuge, J., Fang, H. and Prior, B.A.**, 2001, Glycerol production by microbial fermentation: A review, *Biotechnology Advances*, 19:201-223 pp.
- Webb, C. and Dervakos, G.A.**, 1996, Studies in viable cell immobilization. Academic Press Inc., USA, 198p.
- Weckwerth, W.**, 2011, Green systems biology—From single genomes, proteomes and metabolomes to ecosystems research and biotechnology, *Journal of Proteomics*, 75(1):284-305pp.
- Werkman, C.H. and Gillen, G.F.**, 1932, Bacteria producing trimethylene glycol, *Journal of Bacteriology*, 23:167-182pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wilkins, E., Ringel, A.K., Hortig, D., Willke, T. and Vorlop, K.D.,** 2012, High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93:1057-1063pp.
- Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N. and Mann, M.,** 2009, Universal sample preparation method for proteome analysis, *Nature Methods*, 6:359-362pp.
- Wong, C., Huang, C., Chen, W. and Chang, J.,** 2011. Converting crude glycerol to 1,3-propanediol using resting and immobilized *Klebsiella* sp. HE-2 cells, *Biochemical Engineering Journal*, 58-59:177-183pp.
- Yang, G., Tian, J. and Li, J.,** 2007, Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73:1017–1024pp.
- Yiğitoğlu, M., İnal M. ve Gökgöz, M.,** 2012, Alternatif Bir Enerji Kaynağı Olarak Biyoetanol (Bioethanol as an Alternative Energy Source), *Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi*, 1:11-21pp.
- Zeng, A.P. and Biebl H.,** 2002, Bulk Chemicals from Biotechnology: The Case of 1,3-Propanediol production and the new trends, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 74:239-259pp.
- Zeng, A.P., Biebl, H., Schlieker, H. and Deckwer, W.,** 1993, Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent balance and product formation, *Enzyme and Microbial Technology*, 15:770–779pp.
- Zhang, Z.-P., Show, K.-Y., Tay, J.-H., Liang, D.T. and Lee, D.J.,** 2008, Enhanced continuous biohydrogen production by immobilized anaerobic microflora, *Energy and Fuel*, 22:87–92pp.
- Zhang, X., Li, Y., Zhuge, B., Tang, X., Shen, W., Rao, Z., Fang, H. and Zhuge, J.,** 2006, Construction of a novel recombinant *Escherichia coli* strain capable of producing 1, 3-propanediol and optimization of fermentation parameters by statistical design, *World Journal of Microbiol Biotechnology*, 22:945–952pp.
- Zhao, X.Q. and Bai, F.W.,** 2010, Self-immobilized cells and their potentials in the production of bulk products, *Journal of Biotechnology*, 150:87-87pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Zhao, Y.N., Chen,G. and Yao, S.J.**, 2006, Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*, *Biochemical Engineering Journal*, 32:93-99pp.
- Zheng, P., Wereath, K., Sun, J., van den Heuvel, J. and Zeng, A.P.**, 2006, Overexpression of genes of the dha regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*, *Process Biochemistry*, 41:2160-2169pp.
- Zheng, Z.M., Guo, N.N., Jian, H., Cheng, K.K., Sun, Y. and Liu, D. H.**, 2009, Scale-up of micro-aerobic 1,3-propanediol production with *Klebsiella pneumoniae* CGMCC 1.6366, *Process Biochemistry*, 44:944–948pp.



## ÖZGEÇMİŞ

Mine GÜNGÖRMÜŞLER, 18 Nisan 1985'te İzmir'de doğdu. İlkokulu sırasıyla Beykent Koleji, Yahya Kaptan İlköğretim Okulu ve son olarak Mustafa Reşit Paşa İlköğretim okulunda olmak üzere 1996 yılında tamamladı. Aynı yıl Milli Piyango Anadolu Lisesi'ni kazandı ve 2003 yılında mezun oldu ve aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2007 yılında üniversiteden mezun olarak aynı yıl Doç. Dr. Nuri AZBAR danışmanlığında katma değeri yüksek bir yan ürünün biyoteknolojik üretimleri üzerine yüksek lisans çalışmalarını Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda 2010 yılında tamamladı. Ardından 2010 yılı Şubat ayında Prof. Dr. Nuri AZBAR danışmanlığında doktora çalışmalarına Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda başladı. Doktora çalışmaları sırasında 2012 Şubat ayında ERASMUS değişim programı ile Bolonya, İtalya'da bulunan Bolonya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İnşaat, Çevre ve Materyal Mühendisliği Bölümü'ne gitmeye hak kazandı. 1 aylık İtalyanca eğitimi ardından Doç. Dr. Lorenzo BERTIN'in yardımcı danışmanlığında 3 ay boyunca immobilizasyon üzerine tez çalışmalarını sürdürdü. Ardından 2013 Ekim ayında kazandığı TUBITAK-BİDEB 2214 araştırma bursu ile 12 aylığına Winnipeg, Kanada'da bulunan Manitoba Üniversitesi, Biyosistem Mühendisliği Bölümü'nde Doç.Dr. David B. LEVIN'in yardımcı danışmanlığında proteomik analizler üzerine araştırmalarını tamamladı.

### SCI Yayınları:

1. Güngörmüşler Mine, Azbar Nuri (2013, basımda) Biopolymers: Novel Bioprocess Configuration For 1,3-propanediol (1,3-pdo) Production. Biotechnology Vol. 12: Bioprocess/Biochemical Engineering. Studium Press LLC. Houston, TX. (Kitap Bölümü).
2. Güngörmüşler Mine, Azbar Nuri. (2014, basımda) Comparison of two natural 1,3-propanediol producers in regards to the effect of glucose usage as a co-substrate. Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects DOI:10.1080/15567036.2011.643344.
3. Güngörmüşler Mine, Gönen Çağdaş, Azbar Nuri (2013). Effect of Cell Immobilization on the Production of 1,3-Propanediol New Biotechnology Vol. 30 (6) 623-628.

4. Gönen Çağdaş, Güngörmüşler Mine, Azbar Nuri (2013). Continuous Production of 1,3-Propanediol Using Waste Glycerol with *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 Immobilized on Glass Beads and Glass Rushing Rings. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* Vol. 27 (2) 227–234.
5. Gönen Çağdaş, Güngörmüşler Mine, Azbar Nuri (2012). Comparative Evaluation of Pumice Stone as an Alternative Immobilization Material for 1,3-Propanediol Production from Waste Glycerol by Immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology* Vol.168, No.8;2136-2147.
6. Casali Silvia, Güngörmüşler Mine, Bertin Lorenzo, Fava Fabio, Azbar Nuri (2012). Development of a biofilm technology for the production of 1,3-propanediol (1,3-PDO) from crude glycerol. *Biochemical Engineering Journal* Vol.64, 84-89.
7. Güngörmüşler Mine, Gönen Çağdaş, Azbar Nuri (2011). Use of Ceramic Based Cell Immobilization to Produce 1,3-Propanediol from Biodiesel Derived Waste Glycerol with *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology* Vol.111, No.5;1138-1147.
8. Güngörmüşler Mine, Gönen Çağdaş, Azbar Nuri (2011). 1,3-Propanediol production potential by a locally isolated strain of *Klebsiella pneumoniae* in comparison to *Clostridium beijerinckii* NRRL B593 from waste glycerol. *Journal of Polymers and the Environment* Vol.19; 812–817.
9. Güngörmüşler Mine, Gönen Çağdaş, Azbar Nuri (2011). Continuous production of 1,3-Propanediol using raw glycerol with immobilized *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 in comparison to suspended culture. *Bioprocess and Biosystems Engineering* Vol.34; 727-733.
10. Güngörmüşler Mine, Gönen Çağdaş, Özdemir Güven, Azbar Nuri (2010). Fermentation Medium Optimization for 1,3 Propanediol Production Using Taguchi and Box-Behnken Experimental Designs. *Fresenius Environmental Bulletin* Vol.19; No. 12; 2840-2847.

11. Güngörmüşler Mine, Gönen Çağdaş, Özdemir Güven, Azbar Nuri (2010). 1,3 Propanediol production potential of *Clostridium saccharobutylicum* NRRL B-643. *New Biotechnology* Vol 27; No.6; 782-788.

#### **Sözlü Sunuları ve Posterleri:**

1. Mine Güngörmüşler, David B. Levin (2013). (Sözlü). Understanding the effects of cell immobilization using alginate beads with *Clostridium* strain URNW for biohydrogen production. *Biyohidrojen Konferansı*, 5-7 Ağustos 2013. Montreal, QC, Kanada.
2. Çağdaş Gönen, Mine Güngörmüşler, Nuri Azbar (2013). (Sözlü) Enhancement of the biological process with an immobilized cell bioreactor for the valorization of crude glycerol out of biodiesel production. *3W: Istanbul Uluslararası Katılımlı Atık, Su ve Atık Su Kongresi*, 22-24 Mayıs 2013. İstanbul, Türkiye.
3. Mine Güngörmüşler, Çağdaş Gönen, Nuri Azbar (2012). (Poster) Effect of Cell Immobilization on the Production of 1,3-Propanediol. *EMB 2012: Çevre Mikrobiyolojisi ve Biyoteknolojisi Kongresi*, 10-12 Nisan 2012. Bolonya, İtalya.
4. Silvia Casali, Mine Güngörmüşler, Lorenzo Bertin, Fabio Fava, Nuri Azbar (2012). (Poster) Development of a biofilm technology for the production of 1,3-propanediol (1,3-PDO) from crude glycerol. *EMB 2012: Çevre Mikrobiyolojisi ve Biyoteknolojisi Kongresi*, 10-12 Nisan 2012. Bolonya, İtalya.
5. Çağdaş Gönen, Mine Güngörmüşler, Nuri Azbar (2011). (Sözlü) Biyodizel Üretim Atığı Gliserinin Biyoteknolojik Yöntemlerle Çevre Dostu Biyoplastik Hammaddesine Dönüşümü ile Değerlendirilmesi. *9. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi*, 5-8 Ekim 2011. Samsun, Türkiye.
6. Mine Güngörmüşler, Nuri Azbar (2011). (Sözlü) Comparison Of *Clostridium beijerinckii* NRRL B593 And Locally Isolated *Klebsiella pneumoniae* In Regards To Their Impact Of Glucose As A Co-Substrate On 1,3-Propanediol Fermentation From Glycerol. *SET 2011*: 10.

Uluslararası Sürdürülebilir Enerji Teknolojileri Konferansı, 4-7 Eylül 2011. İstanbul, Türkiye.

7. Nuri Azbar, Mine Güngörmüşler, Çağdaş Gönen (2011). (Sözlü) Continuous Production Of 1,3-Propanediol Using Waste Glycerol With *Clostridium Beijerinckii* NRRL B-593 Immobilized On Glass Beads And Glass Rushing Rings. Kimya Endüstrisinde Yenilenebilir Hammadde olarak Yağlar Üzerine 4. Çalıştay, 20-22 Mart 2011. Karlsruhe, Almanya.
8. Mine Güngörmüşler, Çağdaş Gönen, Nuri Azbar (2011). (Poster) Continuous production of 1,3-Propanediol using raw glycerol with immobilized *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 in comparison to suspended culture. Kimya Endüstrisinde Yenilenebilir Hammadde olarak Yağlar Üzerine 4. Çalıştay, 20-22 Mart 2011. Karlsruhe, Almanya.
9. Çağdaş Gönen, Mine Güngörmüşler, Güven Özdemir, Nuri Azbar (2010). (Poster) Recovery Of A Value Added Product From Biodiesel Production Waste As A Renewable Raw Material For Biopolymer Sector With Biotechnologic Routes. EFIB 2010: EuropaBio's, Endüstriyel Biyoteknoloji için Avrupa Forumu, 19-21 Ekim 2010. Edinburgh, İskoçya, Britanya.
10. Mine Güngörmüşler, Çağdaş Gönen, Nuri Azbar (2010). (Poster) Comparative Evaluation of *Clostridium beijerinckii* (NRRL B-593) and *Klebsiella pneumoniae* for 1,3 Propanediol Production. IBS 2010: 14. Uluslararası Biyoteknoloji Sempozyumu & Sergisi, 14-18 Eylül 2010. Rimini, İtalya, Journal of Biotechnology, Volume 150 (S1) sf 210-211.
11. Nuri Azbar, Mine Güngörmüşler, Çağdaş Gönen (2010). (Sözlü) Effect of Feed Concentration on Microbial 1,3 Propanediol Production via *Klebsiella pneumoniae*. IBS 2010: 14. Uluslararası Biyoteknoloji Sempozyumu & Sergisi, 14-18 Eylül 2010. Rimini, İtalya, Journal of Biotechnology, Volume 150 (S1) sf 36-37.
12. Mine Güngörmüşler, Çağdaş Gönen, Güven Özdemir, Nuri Azbar (2010). (Sözlü) Atık Gliserinden Biyoteknolojik Yollarla Çevre Dostu Biyoplastik Hammaddesi Üretimi. EKK 2010: İTÜ. XII Endüstriyel Kirlenme Kontrolü Sempozyumu, 16-18 Haziran 2010. İstanbul, Türkiye.

13. Mine Güngörmüşler, Çağdaş Gönen, Güven Özdemir, Nuri Azbar (2010). (Sözlü) Fermentation Medium Optimization for 1,3 Propanediol Production Using Taguchi and Box-Behnken Experimental Designs. BEC 2010: V. Uluslararası Biyomühendislik Kongresi, 16-19 Haziran 2010. İzmir, Türkiye.
14. Çağdaş Gönen, Mine Güngörmüşler, Güven Özdemir, Nuri Azbar (2010). (Sözlü) Recovery of A Value Added Product From Biodiesel Production Waste As A Renewable Raw Material For Biopolymer Sector. IAMAW 2010: Uluslararası Akdeniz Agro-Endüstriyel Atıklar Derneği, 17-19 Haziran 2010. İzmir, Türkiye.

### **Projeleri:**

1. TUBITAK-BİDEB 2214, 2012-2013. Manitoba Üniversitesi, Biyosistem Mühendisliği Bölümü, “Proteomik Analizler ve Metabolik Profiller Aracılığı İle 1,3-Propanediol Üretiminin Optimizasyonu”, Winnipeg, MB, Kanada, 12 ay.
2. ERASMUS Değişim Programı. Alma Mater Studiorum Bolonya Üniversitesi, İnşaat, Çevre ve Materyal Mühendisliği Bölümü, “Farklı İmmobilizasyon Yöntemleri İle 1,3 Propanediol Üretimi” Bolonya, İtalya, 3 ay.
3. BAP, 10MUH059, Prof. Dr. Nuri AZBAR, Mine GÜNGÖRMÜŞLER, Çağdaş GÖNEN, “Biyoteknolojik Yollarla Biyopolimer Hammaddesi (1,3 PDO) Üretiminde “Hydrogel Entrapment” İmmobilizasyon Yönteminin İncelenmesi”, 8000TL, 14 ay.
4. TÜBİTAK 1001, Doç. Dr. Nuri AZBAR, Prof. Dr. Erdal BEDİR, Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR, Mine GÜNGÖRMÜŞLER, Çağdaş GÖNEN, Seda ERİŞTÜRK ÖZTÜRE, “Biyodizel Üretim Atığı Gliserinin İmmobilize Biyoreaktör Sistemlerinde Çevre Dostu Bir Biyoürüne Dönüştürülmesi”, ÇAYDAG 109Y150, 360000TL, 36 ay.
5. BAP, 09MUH007, Doç. Dr. Nuri AZBAR, Prof. Dr. Fazilet Vardar Sukan, Prof. Dr. Erdal BEDİR, Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR, Mine GÜNGÖRMÜŞLER, Çağdaş GÖNEN, Seda ERİŞTÜRK ÖZTÜRE

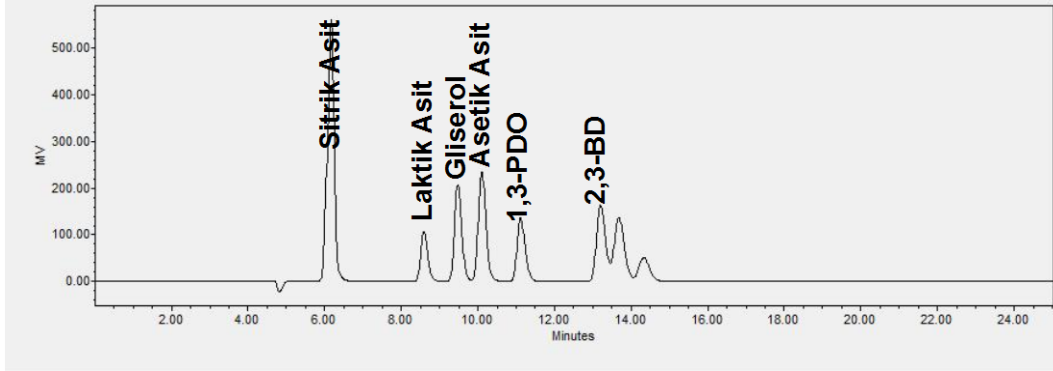
“Biyodizel Üretim Atığı Gliserinden İmmobilize Kültür Sistemlerinde Mikrobiyal Üretimle Biyopolimer Hammaddesi Üretilebilirliğinin İncelenmesi”, 7000TL, 24 ay.

6. EBILTEM, 2008BİL032, Doç. Dr. Nuri AZBAR, Prof. Dr. Erdal BEDİR, Doç. Dr. Güven ÖZDEMİR, Mine GÜNGÖRMÜŞLER, Çağdaş GÖNEN, Seda ERİŞTÜRK ÖZTÜRE, “Biyodizel Üretim Atığı Gliserinden Askıda Kültür Sistemlerinde Mikrobiyal Üretimle Biyopolimer Üretilebilirliğinin İncelenmesi”, 5000TL, 24 ay.

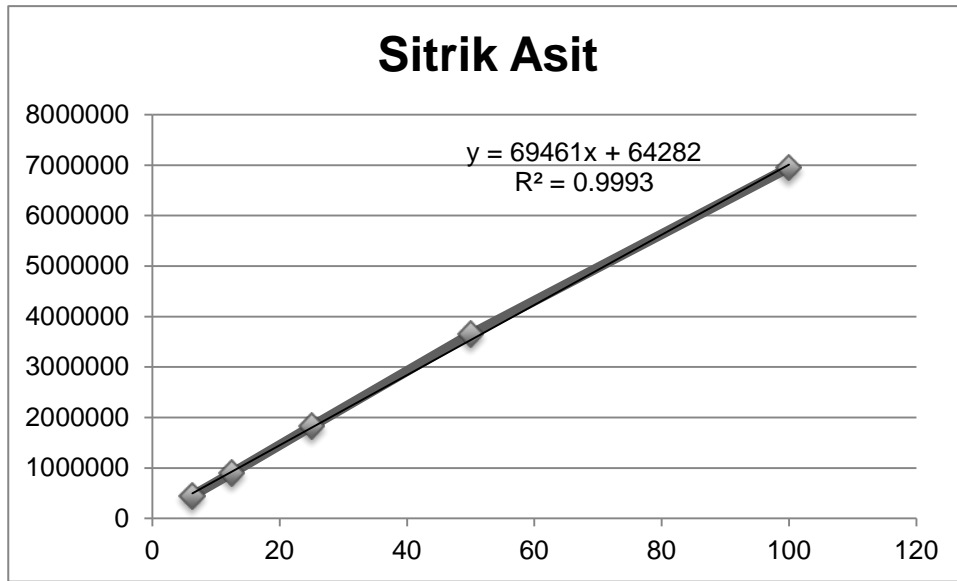
## EKLER

- Ek 1 HPLC İçin Kalibrasyon Grafikleri ve  $R^2$  Değerleri
- 1.1 HPLC kalibrasyonunda elde edilen;her biri 100 mM konsantrasyonda olan sitrik asit, laktik asit, gliserol, asetik asit, 1,3-PDO ve 2,3 BD moleküllerinin ayırım grafiği
  - 1.2 Sitrik asit kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri
  - 1.3 Süksinik asit kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri
  - 1.4 Laktik asit kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri
  - 1.5 Gliserol kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri
  - 1.6 Asetik asit kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri
  - 1.7 1,3-PDO kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri
  - 1.8 2,3-BD kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri
  - 1.9 Bütanol kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri
  - 1.10 Etanol kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri
  - 1.11 Bütirat kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri.
- Ek 2 GC İçin Kalibrasyon Grafikleri ve  $R^2$  Değerleri
- 2.1  $H_2$  kalibrasyon grafiği
  - 2.2  $CO_2$  kalibrasyon grafiği
  - 2.3 % gaz içeriği kalibrasyon pikleri.
- Ek 3 Proteomik Analizlerde Gözlemlenen Önemli Proteinlerin Toplam İyon Sayıları
- 3.1 Tez yazımı süresince ele alınan önemli proteinlerin 1D LC/MS proteomik analizlerinde elde edilen toplam iyon sayıları (Total Ion Count; TIC)

## Ek 1 HPLC İçin Kalibrasyon Grafikleri ve R<sup>2</sup> Değerleri

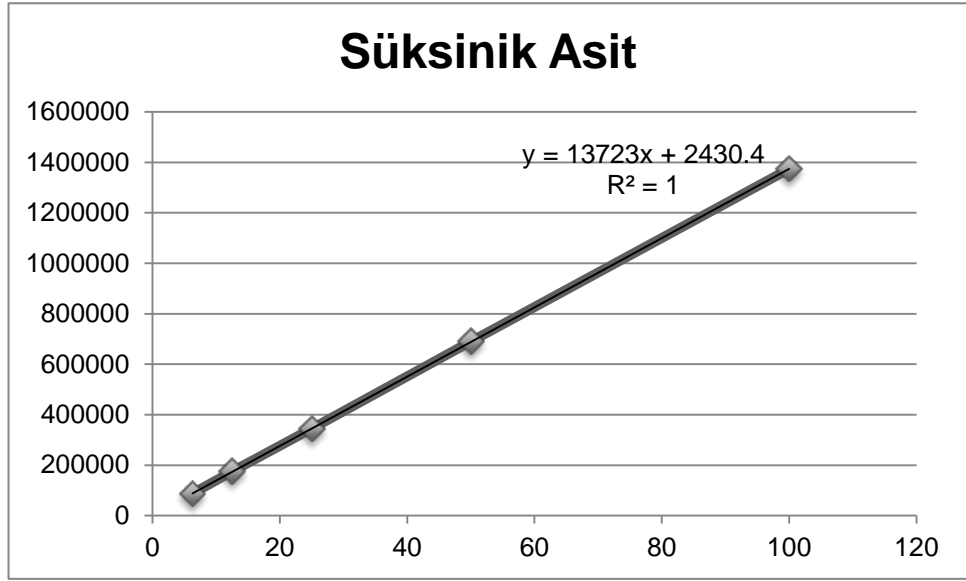


Şekil Ek 1.1 HPLC kalibrasyonunda elde edilen;her biri 100 mM konsantrasyonda olan sitrik asit, laktik asit, gliserol, asetik asit, 1,3-PDO ve 2,3 BD moleküllerinin ayırım grafiği.

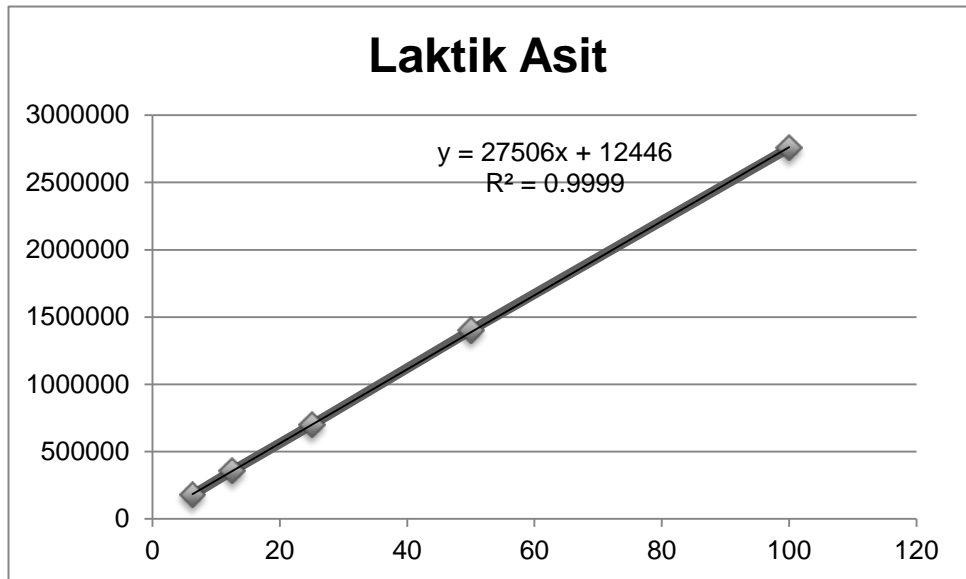


Şekil Ek 1.2 Sitrik asit kalibrasyon grafiği ve R<sup>2</sup> değerleri.

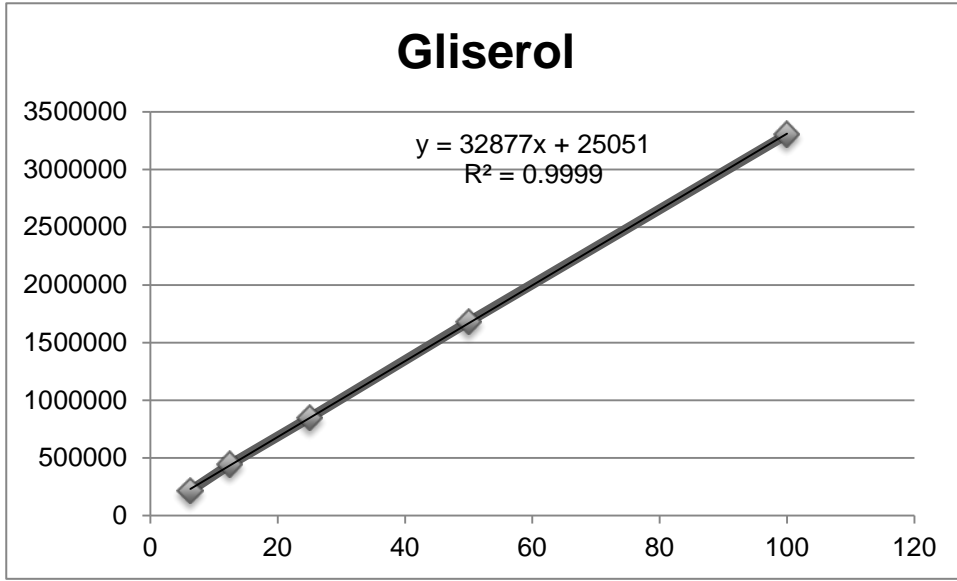




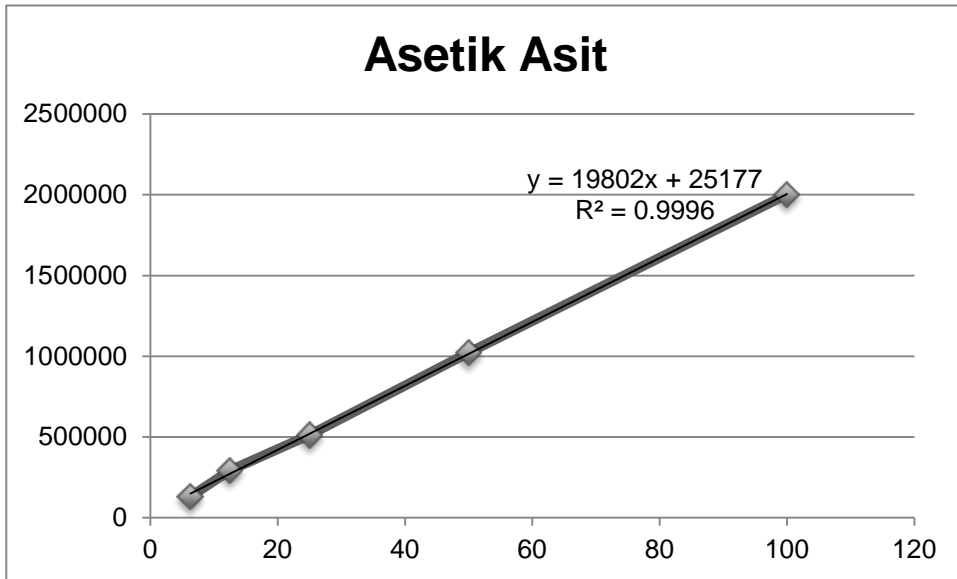
Şekil Ek 1.3 Süksinik asit kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri.



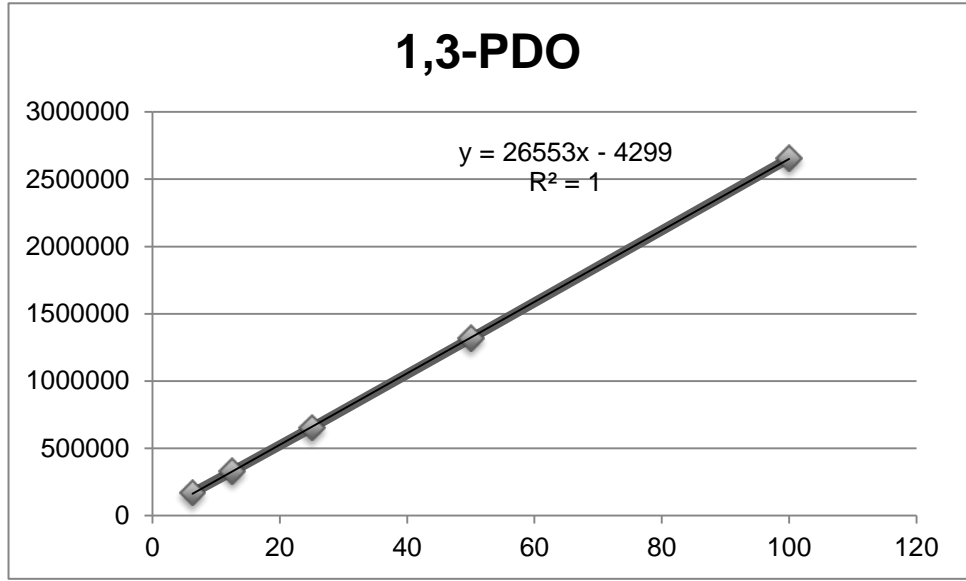
Şekil Ek 1.4 Laktik asit kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri.



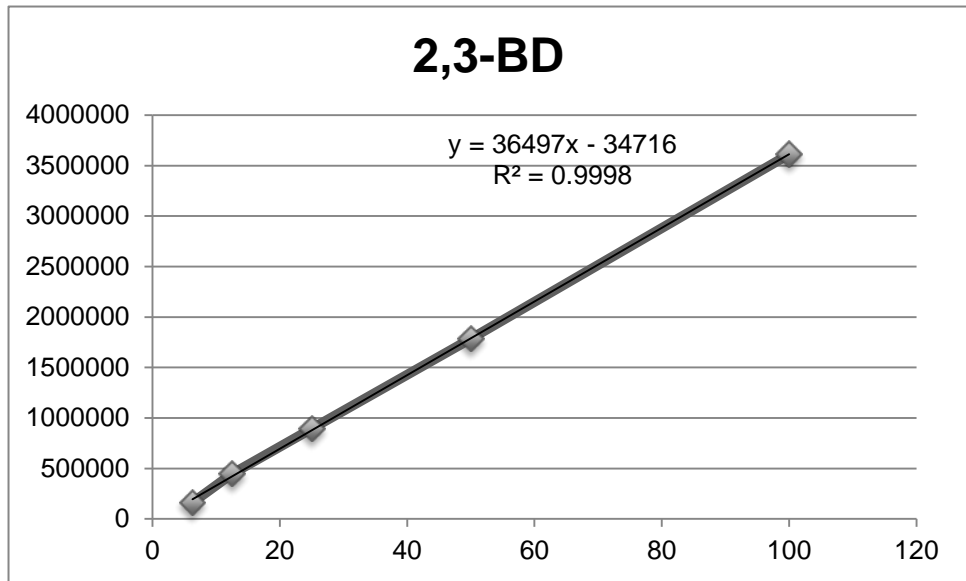
Şekil Ek 1.5 Gliserol kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri.



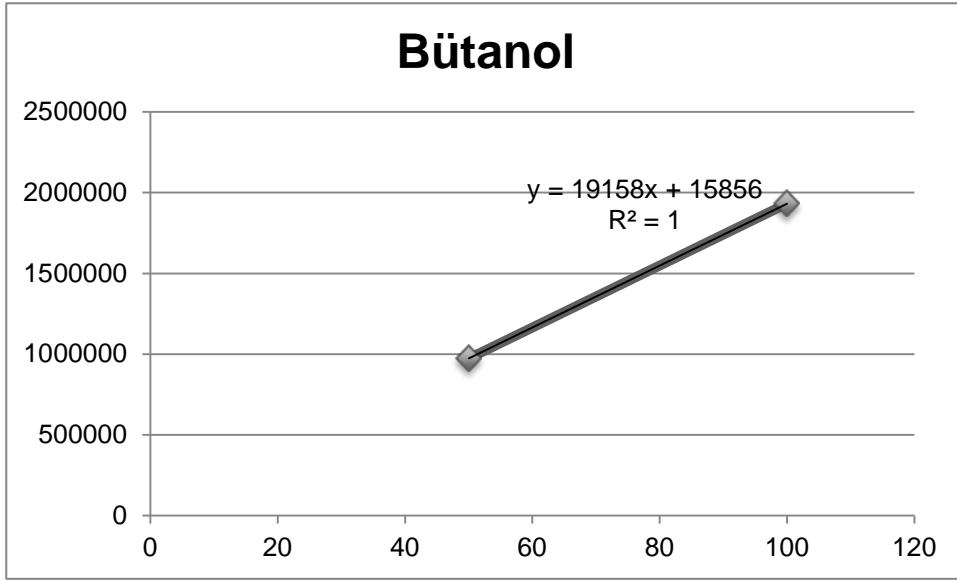
Şekil Ek 1.6 Asetik asit kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri.



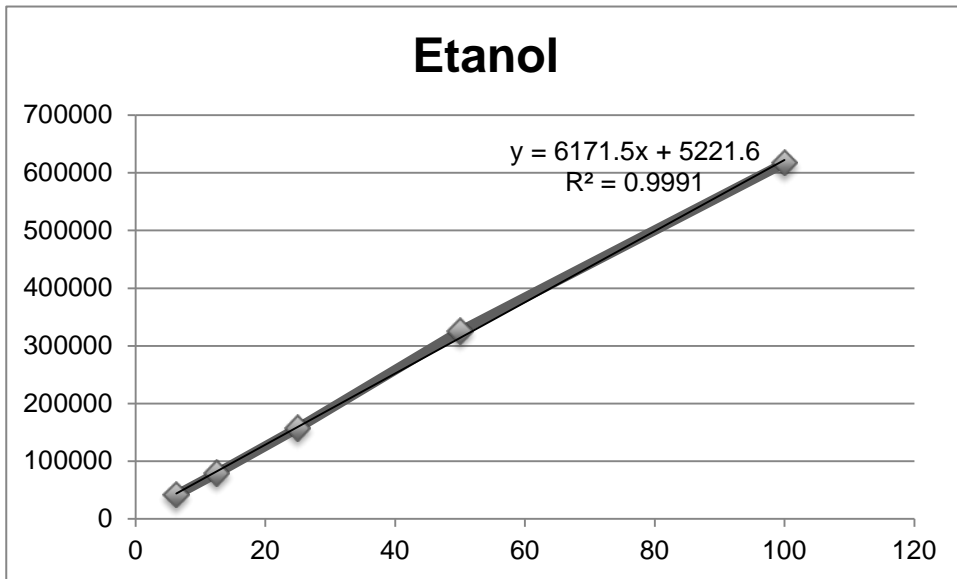
Şekil Ek 1.7 1,3-PDO kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri.



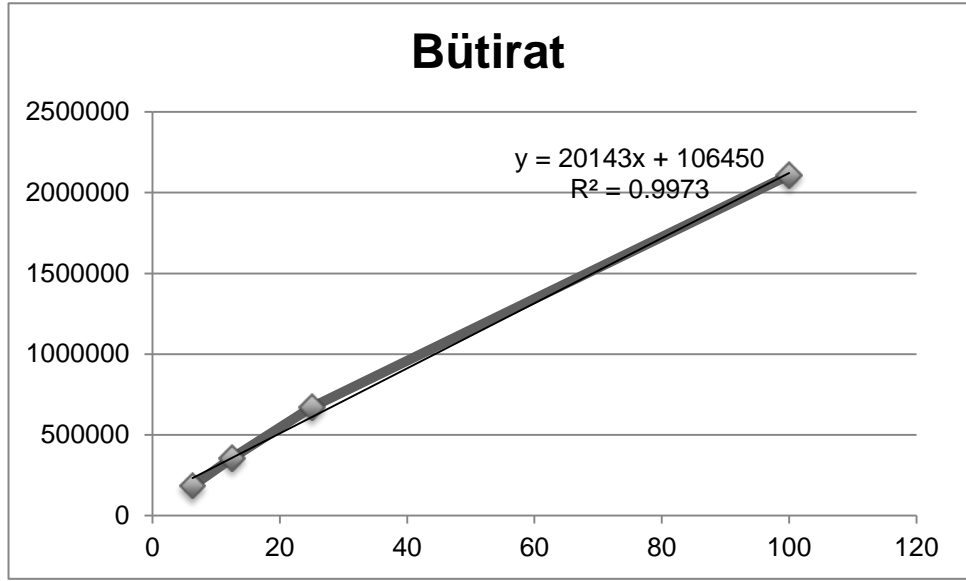
Şekil Ek 1.8 2,3-BD kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri.



Şekil Ek 1.9 Bütanol kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri.

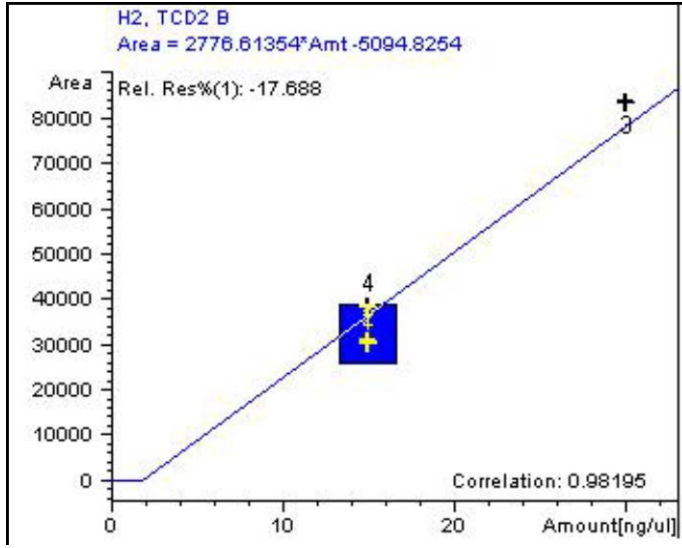


Şekil Ek 1.10 Etanol kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri.

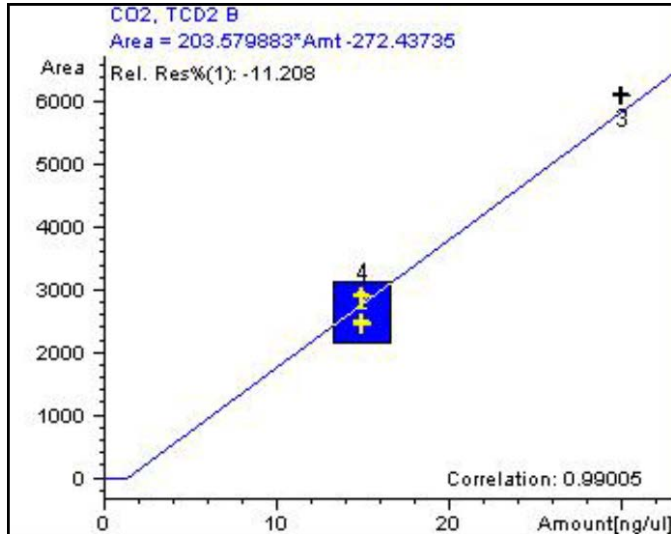


Şekil Ek 1.11 Bütirat kalibrasyon grafiği ve  $R^2$  değerleri.

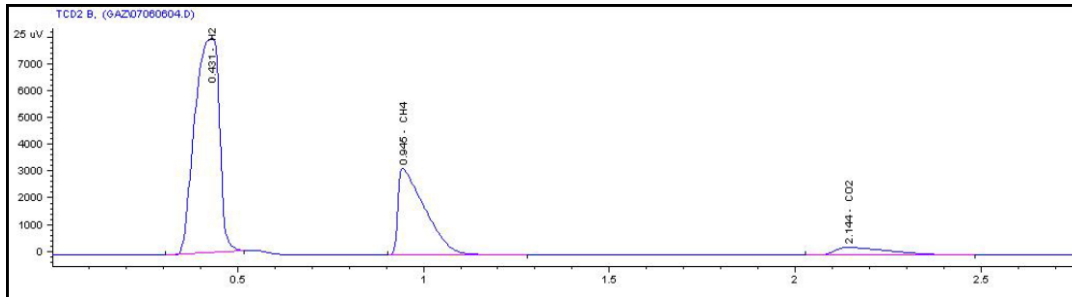
## Ek 2 GC İçin Kalibrasyon Grafikleri ve R<sup>2</sup> Değerleri



Şekil Ek 2.1 H<sub>2</sub> kalibrasyon grafiği.



Şekil Ek 2.2 CO<sub>2</sub> kalibrasyon grafiği.



Şekil Ek 2 3% gaz içeriği kalibrasyon pikleri.

### Ek 3 Proteomik Analizlerde Gözlemlenen Önemli Proteinlerin Toplam İyon Sayıları

Çizelge Ek 3. 1 Tez yazımı süresince ele alınan önemli proteinlerin 1D LC/MS proteomik analizlerinde elde edilen toplam iyon sayıları (Total Ion Count; TIC).

Genom Yeri	Açıklama	170 mM	170 mM	170 mM	170 mM	620 mM	620 mM	620 mM	620 mM
		EXP1	EXP2	ST1	ST2	EXP1	EXP1	ST1	ST2
CBY_0205	fosfat asetiltransferaz	17.58	17.82	18.31	16.83	15.75	14.76	16.49	16.07
CBY_0206	asetat kinaz	19.7	20.04	20.15	19.39	17.59	16.91	17.56	16.97
CBY_0233	pirüvat:ferredoksin oksidoredüktaz	21.14	20.74	18.98	20.88	19.66	19.96	19.94	19.51
CBY_0500	1.3-propanediol dehidrojenaz	25.31	25.26	24.94	24.86	23.86	23.89	23.39	23.12
CBY_0501	gliserol dehidratat(aktifleştirici)	22.56	22.36	21.71	21.66	19.91	19.68	18.98	19.26
CBY_0502	gliserol dehidratat <sup>1</sup>	26.24	26.41	25.86	25.86	25.12	25.15	24.22	24.03
CBY_0505	dihidroksiaseton kinaz (fosfotransfer altbirimi)	22.34	22.36	22.1	21.74	19.76	19.35	16.78	18.96
CBY_0506	dihidroksiaseton kinaz (L altbirimi)	23.74	23.56	24.15	23.94	22.35	22.19	22.63	22.12
CBY_0508	gliserol dehidrojenaz <sup>2</sup>	26.12	26.21	26.21	26.06	24.7	24.76	24.48	24.27
CBY_0742	L-laktat dehidrojenaz	18.79	19.55	19.17	19.36	19.03	18.89	18.18	17.88
CBY_1290	asetil-KoA asetiltransferaz	25.35	25.42	25.77	26.01	25.41	25.18	25.23	25.13
CBY_1889	pirüvat:ferredoksin oksidoredüktaz	20.93	21.56	20.78	20.78	20.06	20.24	20.06	19.92
CBY_2300	FeFe hidrojenaz-1	18.43	17.68	17.91	17.42	18.45	18.34	16.68	16.94
CBY_2341	L-laktat dehidrojenaz	16.76	16.48	16.76	16.48	15.87	15.62	15.95	15.39
CBY_2471	elektron-taşıyıcı protein (Ferredoksin:NADP(+) redüktaz)	19.93	20.61	19.66	19.54	20.22	20.56	20.19	19.3
CBY_2496	elektron-taşıyıcı protein (Ferredoksin:NADP(+) redüktaz)	21.05	21.4	20.83	20.17	19.11	18.62	18.17	18.5
CBY_2676	hidrojenaz altbirimi	TD	TD	13.63	TD	13.82	TD	TD	TD
CBY_2757	L-laktat dehidrojenaz	17.75	18.18	16.28	17.14	17.07	16.58	15.29	15.24
CBY_2919	fosfat bütiriltransferaz	22.17	22.47	22.89	22.82	22.03	22.35	22.25	22.09
CBY_2920	bütirat kinaz	22.14	22.31	22.82	22.73	22.03	21.55	22.22	22.06
CBY_3041	3-hidroksibütiril-KoA dehidratat	23.49	23.46	23.76	24.03	23.49	23.24	23.71	23.23
CBY_3042	açıl-KoA dehidrojenaz (kısa-zincire özgü)	24.93	24.91	25.1	24.94	24.76	24.24	24.34	23.84
CBY_3045	3-hidroksibütiril-KoA dehidrojenaz	24.93	25.02	24.96	25.29	24.68	25.01	25.22	24.53
CBY_3049	demire bağımlı hidrojenaz	16.44	NA	17.73	18.01	17.74	17.95	18.06	17.27
CBY_3235	gliserol dehidrojenaz <sup>3</sup>	22.53	21.97	22.17	22.08	19.19	18.94	18.47	18.31
CBY_3258	açıl-KoA dehidrojenaz (kısa-zincire özgü)	24.24	24.39	24.31	24.38	22.39	22.4	22.63	22.61
CBY_3642	pirüvat:ferredoksin oksidoredüktaz	25.63	26.02	25.68	25.65	24.51	24.25	24.63	24.34
CBY_3690	dihidroksiaseton kinaz (L altbirimi)	19.93	20.38	20.45	20.85	16.37	16.93	17.13	17.28
CBY_3691	dihidroksiaseton kinaz (DhaK altbirimi)	20.62	20.75	20.95	21.09	18.51	18.1	18.34	19.03
CBY_3747	NADPH-bağımlı bütanol dehidrojenaz	23.71	23.35	23.99	23.59	22.1	21.74	20.82	20.51
CBY_3749	elektron-taşıyıcı protein (Ferredoksin:NADP(+) redüktaz)	19.89	20.26	19.42	19.89	14.9	13.39	15.03	14.69
CBY_3751	NADPH-bağımlı bütanol dehidrojenaz	22.11	22.01	22.11	22.27	21.11	20.9	20.68	21.14
CBY_3753	Etanol dehidrojenaz (aldehit-alkol dehidrojenaz 2)	17.01	18.08	14.61	14.79	18.59	19.63	17.93	17.88
CBY_9999	gliserol alımına yardımcı protein	19.08	19.17	18.65	19.36	TD	15.63	15.34	15.24

İki farklı başlangıç gliserol konsantrasyonu için proteomik denemeler farklı zamanlarda gerçekleştirilmiştir. Her deneme iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir. 170 mM EXP 1-2; 170 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için log fazında gözlemlenen değerler, 170 mM ST 1-2; 170 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan fazda gözlemlenen değerler, 620 mM EXP 1-2; 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için log fazında gözlemlenen değerler, 620 mM ST 1-2; 620 mM başlangıç gliserol konsantrasyonu için durağan fazda gözlemlenen değerler. <sup>1</sup>Pirüvat format liyaz olarak yanlış tanımlanmış. <sup>2</sup>3-dehidrokuinat sintaz olarak yanlış tanımlanmış. <sup>3</sup>3-dehidrokuinat sintaz olarak yanlış tanımlanmış. TD: Tanımlı Değil.