LOKAL İZOLATLARIN 2,3-BÜTANDİOL ÜRETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet Akif ÖMEROĞLU

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

2023

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

LOKAL İZOLATLARIN 2,3-BÜTANDİOL ÜRETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Investigation of 2,3-Butanediol Production Potentials of Local Isolates)

DOKTORA TEZİ

Mehmet Akif ÖMEROĞLU

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum

Kasım, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Mehmet Akif ÖMEROĞLU tarafından hazırlanan "Lokal İzolatların 2,3-Bütandiol Üretme Potansiyellerinin Araştırılması" başlıklı çalışması 09/11/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Mesut TAŞKIN *Atatürk Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL *Atatürk Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Özlem BARIŞ *Atatürk Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Kenan KARAGÖZ *Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Burak ALAYLAR *Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi*	Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü
Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında sunulan "Lokal İzolatların 2,3-Bütandiol Üretme Potansiyellerinin Araştırılması" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	**Tezin Benzerlik Oranı (%)**	**Maksimum Oran (%)**
Giriş	*21*	**30**
Kuramsal Temeller	*15*	**30**
Materyal ve Yöntem	*32*	**35**
Araştırma Bulguları	*4*	**20**
Tartışma, Sonuç ve Öneriler	*2*	**20**
Tezin Geneli	*11*	**25**

Not: *Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının* ***%5'den*** *büyük olmaması gerekir.*

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	**Tez Danışmanı**
Mehmet Akif ÖMEROĞLU	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
9.11.2023	**9.11.2023**
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

***** Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve ……. sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve ……. sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans ve Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, çalışmalarımda her türlü yardım ve desteği sağlayan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e ve deneysel çalışmalarımda ve tez yazımında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mesut TAŞKIN hocama teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve doktora eğitimimde laboratuvar çalışmaları sırasında ve tez çalışmasının hazırlanması aşamasında desteklerinden ötürü Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özkan BALTACI'ya teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi her konuda bana yardımcı olan, sabır gösteren ve hiçbir zaman destek ve ilgilerini esirgemeyen aileme en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Mehmet Akif ÖMEROĞLU

ÖZET

DOKTORA TEZİ

LOKAL İZOLATLARIN 2,3-BÜTANDİOL ÜRETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet Akif ÖMEROĞLU

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Amaç: Bu tez çalışmasında, çeşitli toprak ve sıcak su örneklerinden izole edilen bakterilerin melas bazlı fermentasyon ortamında 2,3-Bütandiol (2,3-BD) üretme potansiyelleri araştırıldı. En yüksek üretim verimine sahip olan izolatın moleküler düzeyde identifikasyonu yapıldıktan sonra, üretim verimini artırmak için hücre immobilizasyon teknolojisi kullanıldı ve kültür koşullarının optimizasyonu yapıldı.

Yöntem: Tez çalışması kapsamında, farklı toprak ve sıcak su örnekleri hedeflenen bakteriler için izolasyon kaynağı olarak kullanıldı. İzolasyon çalışmaları aerobik koşullarda melas bazlı agar besiyerleri kullanılarak gerçekleştirildi. En yüksek 2,3-BD üretme potansiyeli olan izolatın moleküler identifikasyonu 16S rRNA dizi analizine göre yapıldı. Ardından, sodyum aljinat matrisi kullanılarak, identifikasyonu yapılan izolatın hücreleri immobilize edildi. İmmobilize hücrelerle steril olmayan koşullarda gerçekleştirilen 2,3-BD üretimini artırmak için sıcaklık (40, 45, 50, 55, 60 ve 65 ºC), pH (4-9), melas konsantrasyonu (25, 50, 75, 100, 125 ve 150 ml/l), yatak miktarı (5, 10, 15 ve 20 g), yatak hacmi (3, 5 ve 7 mm) ve inkübasyon süresi (12, 24, 36, 48 ve 60 saat) parametleri test edildi. Optimize edilmiş kültür koşullarında gerçekleştirilen proses sonucunda, kültür ortamındaki 2,3-BD konsantrasyonu Gaz kromatografisi/Kütle spektroskopisi (GC-MS) ile analiz edildi.

Bulgular: Farklı toprak ve sıcak su örneklerinden toplam 52 adet bakteri izolatı elde edildi. Voges–Proskauer (VP) testi ve GC-MS analizleri sonucunda, BD43 kodlu izolatın en yüksek 2,3-BD üretme potansiyeline sahip olduğu tespit edildi. 16S rRNA dizi analizine göre BD43 kodlu izolatın *Bacillus licheniformis*'e %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. *B. licheniformis* BD43'ün immobilize hücreleriyle steril olmayan fermentasyon koşullarında 2,3-BD üretimi için optimum parametreler, 55°C, pH 7, 100 ml/l melas konsantrasyonu, 15 g yatak miktarı, 5 mm yatak hacmi ve 24 saatlik inkübasyon süresi olarak tespit edildi. Optimize edilmiş kültür koşullarında üretim prosesi sonucunda 31,6 g/l 2,3-BD elde edildi.

Sonuçlar: Mevcut tez çalışmasında, lokal olarak izole edilen termofilik *B. licheniformis* BD43 suşunun aerobik koşullarda melası karbon kaynağı olarak kullanarak 2,3-BD üretimini gerçekleştirebileceği belirlendi. İzolatın termofilik özellikleri sayesinde üretim proseslerinin steril olmayan koşullar altında yüksek verimle gerçekleşebileceği ortaya konuldu. Hücre immobilizasyon teknolojisinin kullanılması ve kültür koşullarının optimize edilmesi ile izolatın 2,3-BD üretim potansiyelinin artırılabileceği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: 2,3-Bütandiol, *Bacillus lichenformis*, fermentasyon, hücre immobilizasyonu

Kasım 2023, 83 pages

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

INVESTIGATION OF 2,3-BUTANDIOL PRODUCTION POTENTIALS OF LOCAL ISOLATES

Mehmet Akif ÖMEROĞLU

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Purpose: In this thesis study, 2,3-Butanediol (2,3-BD) production potentials of bacteria isolated from various soil and hot water samples in molasses-based fermentation medium were investigated. After the isolate having the highest production yield was identified at the molecular level, cell immobilization technology was used and culture conditions were optimised in order to increase the production yield.

Method: Within the scope of the thesis study, different soil and hot water samples were used as an isolation source for the targeted bacteria. Isolation studies were carried out under aerobic conditions using molasses-based agar media. Molecular identification of the isolate having the highest potential to produce 2,3-BD was performed according to 16S rRNA sequence analysis. Afterwards, the cells of the identified isolate were immobilized using sodium alginate matrix. In order to enhance the production of 2,3-BD by immobilized cells performed under non-sterile conditions, parameters of temperature (40, 45, 50, 55, 60 and 65 ºC), pH (4-9), molasses concentration (25, 50, 75, 100, 125 and 150 ml/l), bead amount (5, 10, 15 and 20 g), bead size (3, 5 and 7 mm) and incubation time (12, 24, 36, 48 and 60 hours) were tested. As a result of the process executed under optimized culture conditions, the concentration of 2,3-BD in the culture medium was analyzed by Gas chromatography/Mass spectroscopy (GC-MS).

Findings: A total of 52 bacterial isolates were obtained from different soil and hot water samples. As a consequence of Voges–Proskauer (VP) test and GC-MS analysis, it was detected that the isolate coded with BD43 had the highest potential to produce 2,3-BD. According to 16S rRNA sequence analysis, it was determined that BD43 showed similarity to *Bacillus licheniformis* with the rate of 99%. Optimum parameters for the production of 2,3-BD by immobilized cells of *B. licheniformis* BD43 under non-sterile fermentation conditions were detected to be 55°C, pH 7, 100 ml/l molasses concentration, 15 g bead amount, 5 mm bead size and 24 hour of incubation time. As a result of the production process under optimized culture conditions, 31.6 g/l 2,3-BD was obtained.

Conclusion: In the current thesis study, it was designated that the locally isolated thermophilic *B. licheniformis* BD43 strain could produce 2,3-BD by using molasses as a carbon source under aerobic conditions. Thanks to the thermophilic features of the isolate, it was revealed that the production processes can be carried out under non-sterile conditions with high yield. It was demonstrated that potential of isolate to produce 2,3-BD can be increased by using cell immobilization technology and optimizing the culture conditions.

Keywords: 2,3-Butanediol, *Bacillus lichenformis*, fermentation, cell immobilization

November 2023, 83 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ xi
GİRİŞ 1
1. Nesil Biyoyakıtlar 2
2. Nesil Biyoyakıtlar 2
3. Nesil Biyoyakıtlar 3
2,3-Bütandiol 3
2,3-Bütandiol Üretimi 4
Mikrobiyal 2,3-Bütandiol Üretimi 4
2,3-BD Üreten Mikroorganizmalar 6
2,3-BD Üretimine Etki Eden Faktörler 8
Karbon Kaynağı 8
Azot Kaynağı 10
Oksijen Kaynağı 10
pH 11
Sıcaklık 11
İnokülüm Hacmi 11
Hücre immobilizasyonu 12
2,3-Bütandiolün Kullanım Alanları 13
KURAMSAL TEMELLER 16
MATERYAL ve YÖNTEM 25
Materyal 25
Kullanılan çözeltiler 26
Örnek toplanması 28
Çalışmada kullanılan melasın kimyasal içeriğinin belirlenmesi 28
2,3-Bütandiol üreten mikroorganizmaların izolasyonu 28

İzolatların Voges–Proskauer testi 29
Pozitif izolatların 2,3-Bütandiol fermentasyonu ve GC-MS analizleri 29
En yüksek 2,3-Bütandiol verimine sahip olan izolatın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin araştırılması 29
Fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi 30
Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi 31
İzolatın moleküler identifikasyonu 31
16S rRNA gen bölgesinin klonlanması 31
Kompetent hücrenin hazırlanması 32
Koloni seçme ve sıvı kültüre alma 33
Koloni PCR için Hazırlık ve PCR reaksiyonu 33
Plazmit izolasyonu, kontrolü ve konsantrasyonlarının ölçümü 33
DNA dizi analiz sonuçlarının işlenmesi ve değerlendirilmesi 33
İmmobilize bakteri hücrelerinin hazırlanması 34
İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminin optimizasyonu 35
İmmobilize edilmiş hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum sıcaklığın belirlenmesi 35
İmmobilize edilmiş hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum pH'ın belirlenmesi 35
İmmobilize edilmiş hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum melas konsantrasyonunun belirlenmesi 35
İmmobilize edilmiş hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum yatak miktarının belirlenmesi 35
İmmobilize edilmiş hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum yatak hacminin belirlenmesi 36
İmmobilize edilmiş hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi 36
Serbest hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi 36
İmmobilize edilmiş hücrelerin tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması 36
Kültür ortamındaki kontaminasyon tespiti 36
2,3-BD miktarının belirlenmesi 37
ARAŞTIRMA BULGULARI 38
Melasın Kimyasal İçeriğinin Belirlenmesi 38
2,3-BD Üretme Potansiyeli Olan Bakterilerin İzolasyonu 38
En yüksek 2,3-BD Verimine Sahip Olan İzolatın Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 40
BD43 Kodlu İzolatın Moleküler İdentifikasyonu 41

16S rRNA bölgesinin aplifiye edilmesi 41
Amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması 42
Koloni PCR ve plazmit izolasyonu 43
Sekans Analizi Sonuçları 43
İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminin Optimize Edilmesi 44
İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde sıcaklığın etkisi 44
İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde pH'ın etkisi 45
İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde melas konsantrasyonunun etkisi 46
İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde yatak miktarının etkisi 47
İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde yatak hacminin etkisi 48
İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde inkübasyon süresinin etkisi 49
Serbest hücrelerle 2,3-BD üretiminde inkübasyon süresinin etkisi 51
2,3-BD Üretiminde İmmobilize Edilmiş Hücrelerin Tekrar Kullanılabilirliğinin Araştırılması 52
TARTIŞMA ve SONUÇ 54
KAYNAKÇA 63
ÖZGEÇMİŞ 72

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. 2,3-BD üretiminde kullanılan bakteri türleri 7
Tablo 2. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar 25
Tablo 3. Tez Çalışmasında Kullanılan Besiyerleri, Kitler ve Kimyasallar 25
Tablo 4. 16S rRNA PCR Protokolü 32
Tablo 5. Koloni PCR protokolü 33
Tablo 6. Melasın Kimyasal İçeriği 38
Tablo 7. İzolasyon Kaynakları ve İzolatların Kodları 39
Tablo 8. BD43 Kodlu İzolatın Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri 41
Tablo 9. İzolatın 16S rRNA Dizi Analiz Sonucu 43
Tablo 10. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde Sıcaklığın Etkisi 44
Tablo 11. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde pH'ın Etkisi 45
Tablo 12. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde Melas Konsantrasyonunun Etkisi 46
Tablo 13. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde Yatak Miktarının Etkisi 47
Tablo 14. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde Yatak Hacminin Etkisi 48
Tablo 15. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi . 49
Tablo 16. Serbest Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi 51
Tablo 17. 2,3-BD Üretiminde İmmobilize Edilmiş Hücrelerin Tekrar Kullanılabilirliği 53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 2,3-BD'nin enantiyomerik formları 4
Şekil 2. 2,3-BD'nin türevleri 5
Şekil 3. 2,3-BD üretiminde metabolik yolak 6
Şekil 4. Aljinat matrisiyle immobilize hücrelerin hazırlanışı 12
Şekil 5. 2,3-BD'nin potansiyel uygulamaları 14
Şekil 6. İmmobilize hücrelerin hazırlanması 34
Şekil 7. Etil asetat ekstraksiyonu sonucu faz oluşumu 37
Şekil 8. Voges-Proskauer testi sonucunda renk oluşumları 39
Şekil 9. En yüksek 2,3-BD üretme potansiyeli olan izolatın GC-MS analizi sonucu 40
Şekil 10. BD43 kodlu izolatın petri görüntüsü 41
Şekil 11. 16S rRNA PCR jel görüntüsü 42
Şekil 12. Transformasyon sonrası mavi-beyaz tarama 42
Şekil 13. BD43 kodlu izolatın Neighbour-Joining yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı 43
Şekil 14. İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde sıcaklığın etkisi 45
Şekil 15. İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde pH'ın etkisi 46
Şekil 16. İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde melas konsantrasyonunun etkisi 47
Şekil 17. İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde yatak miktarının etkisi 48
Şekil 18. İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde yatak hacminin etkisi 49
Şekil 19. İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde inkübasyon süresinin etkisi 50
Şekil 20. Kantitatif GC-MS analizi için 2,3-BD standardı 50
Şekil 21. Optimize edilmiş koşullarda kantitatif GC-MS analiz sonucu 51
Şekil 22. Serbest hücrelerle 2,3-BD üretiminde inkübasyon süresinin etkisi 52
Şekil 23. Fermentasyon öncesi ve sonrasında immobilize hücreler 52
Şekil 24. 2,3-BD üretiminde immobilize edilmiş hücrelerin tekrar kullanılabilirliği 53

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

2,3-BD	: 2,3-Bütandiol
$CaCI_2$	: Kalsiyum Klorür
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
IPTG	: Izopropil β-D-1- Tyogalaktopiranosid
KOH	: Potasyum hidroksid
$MgCI_2$	: Magnezyum Klorür
NaCI	: Sodyum Klorür
Xgal	: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-Galactopyranoside

Simgeler

%	: Yüzde
ºC	: Santigrat derece
bç	: Bazçifti
s	: Saat
dk	: Dakika
sn	: Saniye
g	: Gram
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
l	: Litre
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre

GİRİŞ

Sanayileşme ve kentleşmedeki gelişmeler, sınırlı fosil yakıt rezervlerinin tükenmesinde önemli bir oynamıştır ve insan sağlığı, çevrenin korunması ve enerji talebi için önemli bir tehdit oluşturan çeşitli çevresel sorunlara yol açmıştır. Son yıllarda, kontaminantları ortadan kaldırmak, temiz enerji üretmek ve değerli bileşikleri sentezlemek için çevre dostu, verimli ve uygun maliyetli teknolojilerin kullanılması gerektiği belirtilmektedir (Pfleger and Takors 2023).

Fosil yakıt kaynakları evrensel olarak eşit bir şekilde dağılmamıştır, bu durum bazı ekonomik eşitsizliklere, güvenlik kaygılarına, fiyat istikrarsızlığına ve hatta askeri çatışmalara yol açmıştır. Daha da kötüsü, fosil yakıtların yanması oldukça yüksek miktarda karbondioksit ve diğer sera gazlarını atmosfere bırakarak küresel iklim değişikliğine, buna bağlı olarak doğal ve ekonomik sonuçları da beraberinde getirmiştir (Shi and Moser 2021). Atmosferdeki CO_2 birikim hızını yavaşlatma veya tersine çevirme ihtiyacı, sürdürülebilir bir şekilde üretilebilecek alternatif enerji kaynaklarına yönelmeyi gerekli kılmaktadır. Fosil yakıt rafinasyonu, ucuz enerji kaynakları sağlamanın yanında petrokimya endüstrisi için ham madde sağlamaktadır. Yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı nedeniyle fosil yakıt rafinasyonunda bir kısıtlama durumu ortaya çıkması durumunda, kimya endüstrisine fonksiyonel ham maddeler sağlamanın alternatif yollarının da araştırılması gerektiği belirtilmektedir. Teknik zorluklara ek olarak, uzun vadede topluma fayda sağlayan teknolojilerin ortaya çıkmasına olanak sağlamak için birbiriyle bağlantılı olacak bir şekilde ekonomik, politik ve düzenleyici çıkar çatışmalarından oluşan bir ağın da iyi bir şekilde idare edilmesi ve yönlendirilmesi gerekir (Field et al. 2020).

Araştırmacılar, yenilenebilir alternatif yakıt kaynaklarına olan ihtiyaca cevap olarak, biyokütle kullanılarak üretilen yakıt ürünleri ve endüstriyel prosesler sırasında oluşan biyolojik olarak parçalanabilen atık ürünler olarak ifade edilebilecek biyoyakıtları tanımlamışlardır (Bialkowska et al. 2015). Biyoyakıtlar ve biyoürünler, fonksiyonel olarak biyolojik bir kaynaktan elde edilen veya biyoteknolojik prosesler ile üretilen moleküller olarak tanımlanabilir. Biyoyakıtlar, öncelikle sıvı ulaşım yakıtları olarak kullanılan yanıcı moleküller olarak bilinmektedir. Biyoürünler, kimya endüstrisinde kullanılan petrokimyasal alternatiflerdir. Bu tip moleküllerin (etanol ve aseton) üretim prosesleri uzun zamandır gerçekleştirilmektedir ve günümüzde biyoteknolojik proseslerdeki gelişmeler sayesinde çok daha geniş metabolit grubunun (alkaloidler, flavonoidler, terpenoidler ve füzel alkoller) sentezi

verimli bir şekilde olmaktadır. Giderek artan ulaşım yakıtı pazarı, özellikle yaygın olarak bulunan ilk biyoyakıtlar olan etanol ve biyodizelin üretimindeki prosesleri teşvik etmektedir. Gelişmiş biyoyakıtlar, geleneksel ulaşım yakıtlarıyla karıştırılabilen veya doğrudan motorlarda yakıt olarak kullanılabilen organik moleküller olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, gelişmiş biyoyakıtlar, etanolün (yüksek higroskopiklik ve düşük enerji yoğunluğu) ve bazı biyodizellerin (yüksek bulutlanma noktası ve tropikal ormansızlaşma) çeşitli dezavantajlarından dolayı teşvik edilmektedir. Bu tip biyoyakıtların üretim prosesleri, mikroorganizmalar tarafından veya biyolojik olarak üretilen ara maddelerin kimyasal olarak yükseltilmesiyle (terpenoidlerin jet yakıtına katalitik olarak yükseltilmesiyle) gerçekleştirilebilir (Pfleger and Takors 2023).

Biyoyakıtlar çevre dostu yakıtlar olup, bu bileşikleri endüstriyel ölçekte üretmek için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Biyoyakıt üretim proseslerinin uygun maliyetli ve insan sağlığı için herhangi bir risk oluşturmadan nasıl maksimize edilebileceğini belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bakteri, maya ve mantarlar gibi çeşitli mikroorganizmaların farklı substratlardan biyoyakıt üretme kabiliyeti oldukları bilinmektedir. Biyoyakıtların mikrobiyal üretimi sürdürülebilir, çevre dostu ve kimyasal sentezden daha uygun maliyetlidir (Javidnia et al. 2016).

Üretilen başlıca biyoyakıtlardan olan biyodizel ve biyoetanol endüstriyel olarak üretilen biyoyakıtların %90'ından fazlasına katkıda bulunmuştur. Biyoyakıtlar biyohidrojen, biyogaz, biyobütanol, biyodizel ve biyoetanol olmak üzere beş gruba ayrılabilir (Barnard et al. 2010). Bununla beraber, üretim yönteminin yanı sıra ham maddeye dayalı olarak, birinci, ikinci ve üçüncü nesil biyoyakıtlar olarak da sınıflandırılmaktadır (Ortiz-Marquez et al. 2012).

1. Nesil Biyoyakıtlar

Özellikle tarıma elverişli alanlarda yoğun talep gören birinci nesil biyoyakıtlar, tahıllar ve şeker kamışı gibi tarım bitkileri ürünlerinden elde edilmektedir. Birinci nesil biyoyakıtların mikrobiyal üretimi, etanol, propanol ve bütanol gibi alkollerin üretilmesi için şekerlerin fermentasyonuna dayanmaktadır. Birinci nesil biyoetanol üretim prosesleri, şeker veya nişastanın substrat olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilirmektedir. Gıda kaynaklarının yakıt olarak kullanılması konusundaki çelişkiyi azaltmak için, biyoyakıt üretim proseslerinde gıda dışı lignoselülozik malzemelerin kullanımı teşvik edilmektedir (Tempels and Van den Belt 2016).

2. Nesil Biyoyakıtlar

İkinci nesil biyoyakıtlar, uygun maliyetli ve bol miktarda bulunan gıda dışı malzemeleri içeren jenerik biyokütleler kullanılarak üretilmektedir. Bu amaçlar için en yaygın olarak

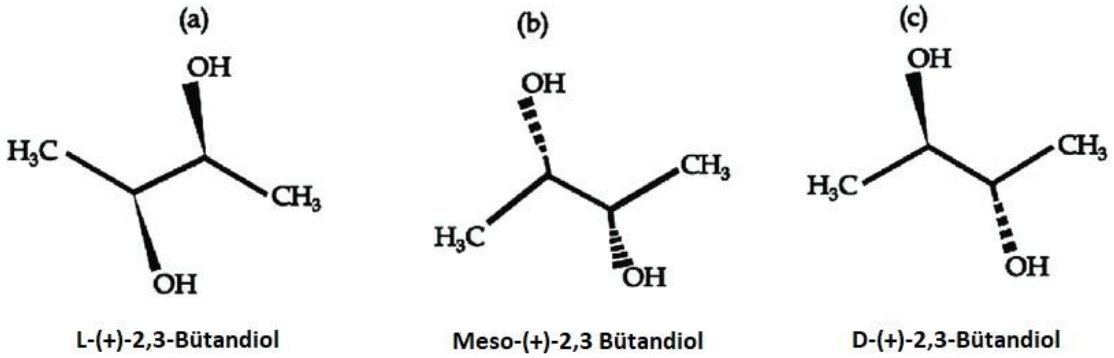
kullanılan biyokütleler, tahıl samanı, şeker kamışı küspesi ve organik kentsel atıklar gibi büyük ölçüde lignoselülozik materyallerden oluşan bitkisel malzemeleridir (Jia et al. 2017). Zamanla, özellikle tarımsal atığın bol olmadığı yerlerde gıda üretimi ile dolaylı rekabete yol açan gıda dışı lignoselülozik malzemelerin üretimi için araziye ihtiyaç duyulması lignoselüloz kullanımının ekonomik açıdan cazip olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, lignoselüloz ön işlemi çözünebilir serbest şekerlere hidroliz için çoklu enzimler gerektiğinden maliyetli bir işlem olarak bilinmektedir (Swain et al. 2017).

3. Nesil Biyoyakıtlar

Üçüncü nesil hammaddeler, deniz yosunu ve mikroalg biyokütlesini içermektedir. Siyanobakterilerin güneş ışığını ve atmosferik CO_2'yi biyoyakıtlara dönüştürebildiği bilinmektedir. Biyoyakıt üretimi için siyanobakteri kullanmanın en güçlü ve avantajlı yönlerinden biri, besin üretimi için tarıma elverişli arazilere gereksinim duymamasıdır (Quintana et al. 2011). Algler potansiyel bir biyoyakıt olarak kabul edilmekte, mikroalgler, karbon dioksit tutulmasını ve atık suların biyoremediasyonu gibi proseslerde önemli rol oynadığı için çevre dostu olarak kabul edilmektedir (Show et al. 2017).

2,3-Bütandiol

2,3-Bütandiol (2,3-BD), farmasötik, kozmetik ve polimer endüstrileri gibi alanlarda birçok potansiyel applikasyona sahip bir platform kimyasalı olarak sınıflandırılan kokusuz, renksiz ve şeffaf bir organik bileşiktir. 2,3-BD, endüstriyel uygulamaları kiralite özelliklerine bağlı olan levo, dekstro ve mezo olmak üzere üç farklı enantiyomerik formda bulunabilir. 2,3-BD, metil etil keton, diasetil, poliüretan ve 1,3 bütadien üretimi için bir ara madde olarak kullanılabilir. Diğer sıvı yakıtlara kıyasla yüksek ısıl değeri ve düşük buhar basıncı nedeniyle yakıtlarda katkı maddesi olarak da kullanılabilir. Bir platform kimyasalı olarak önemi, çok yönlü uygulamalar için farklı özellikler sağlayabilen üç izomerik formda (levo, dextro, meso) bulunabilmesinde yatmaktadır. Her bir stereoizomer, 177 ile 182°C arasında değişen farklı kaynama noktasına sahiptir. Hem levo hem de dekstro izomerleri kiral özelliklere sahip olup, kimyasallar, farmasötikler ve diğer uygulamalar için asimetrik sentezde kullanılabilir. Levo izomerinin donma noktası düşüktür (-60 ºC) bu nedenle, bir donma önleyici madde olarak çeşitli alanlarda kullanılabilir (Białkowska 2016).



Şekil 1. 2,3-BD'nin enantiyomerik formları (Hakizimana et al. 2020)

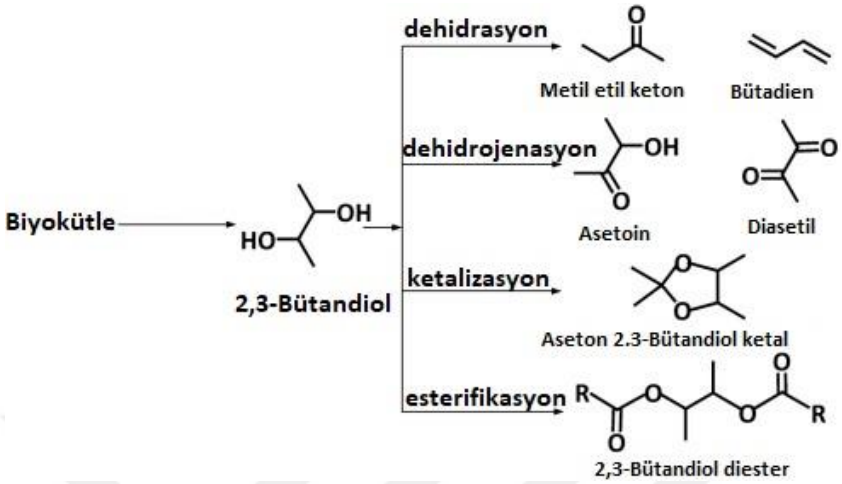
2,3-Bütandiol Üretimi

2,3-BD'nin üretimi, çeşitli uygulamalarından dolayı büyük ilgi görmektedir. 2,3-BD, doğal kaynakların biyodönüşüm prosesleri sonucunda elde edilebilir. 2,3-BD'nin kimyasal sentezi, hidrokarbon fraksiyonunun (C4) bağlarının kırılmasına dayanmaktadır. Bu fraksiyon %77'ye kadar büten içerirken, kalan %23'lük kısım bütan ve izobüten karışımına karşılık gelmektedir. Kimyasal sentez, yüksek basınç ve sıcaklık, pahalı katalizörler, toksik ara maddelerin salınımı ve yenilenemeyen malzemelere bağımlılık gerektiren bir proses olarak bilinmekte, bu da karmaşık süreç ve düşük verimle sonuçlanmaktadır. Kimyasal sentezle karşılaştırıldığında, 2,3-BD üretimi için mikroorganizmaların kullanıldığı biyoteknolojik prosesler çok daha verimli ve avantajlıdır. Yenilenebilir hammaddelerin kullanımıyla sürdürülebilir üretim proseslerinin ekolojik avantajları nedeniyle, mikrobiyal sentez, ticari 2,3-BD üretimi için umut verici yöntem olarak belirtilmektedir (Zeng and Sabra 2011).

Mikrobiyal 2,3-Bütandiol Üretimi

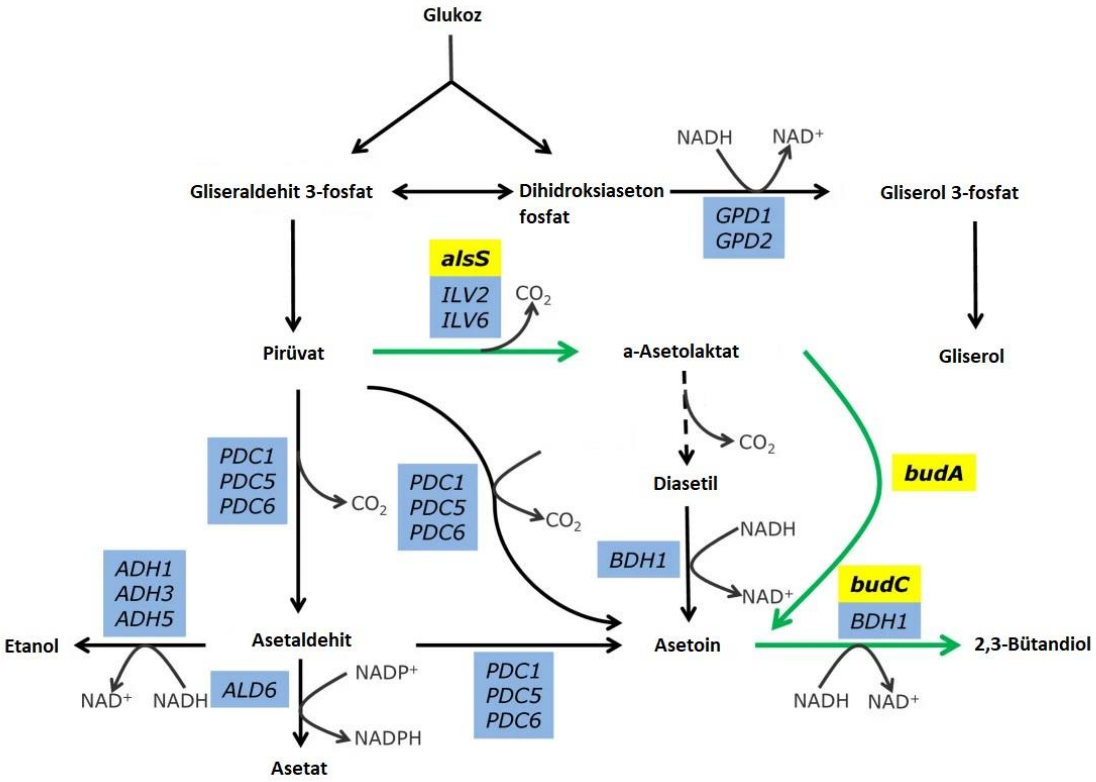
Çeşitli mikroorganizmalar, çeşitli karbon kaynaklarını metabolize ederek 2,3-BD üretimi gerçekleştirebilir. Mikrobiyal 2,3-BD üretimi 100 yılı aşkın bir geçmişe sahip olup, ilk olarak 1906 yılında Harden ve Walpole tarafından ve 1912'de Harden ve Norris tarafından incelenmiştir (Magee and Kosaric 1987). Bu ilk çalışmalarda *Klebsiella pneumoniae* bakterisi kullanılmıştır. *Paenibacillus polymyxa* kültürlerinde ise 2,3-BD birikimi ilk olarak 1926 yılında tespit edilmiştir (Garg and Jain 1995). Bu metabolitin endüstriyel ölçekli üretiminin ilk olarak Fulmer ve arkadaşları tarafından önerildiği bildirilmiştir (Fulmer et al. 1933). II. Dünya Savaşı sırasında stratejik bir bileşik olan 1,3-bütadien kıtlığından dolayı, 2,3-BD fermentasyonu üzerine yapılan çalışmalara olan ilgi artmış ve hem üretimi hem de 1,3-bütadiene dönüştürülmesi için pilot ölçekli proseslerin geliştirilmesi teşvik edilmiştir. Ancak, petrolden kimyasal olarak 1,3-bütadien üretmek için daha az maliyetli yollar mevcut olduğu için çalışmaların sayısı arzu edilen ölçüde olmamıştır. 1970'lerde, petrol fiyatlarındaki artış beklentileri, biyokütleden 2,3-BD üretmeye yönelik fermentasyon proseslerine olan ilgiyi

önemli derecede artırmıştır (Ji et al. 2011). Son zamanlarda, mikrobiyal 2,3-BD üretimi dünya çapında oldukça ilgi görmektedir, çünkü yenilenebilir biyokütle düşük karbonlu bir ekonomi geliştirmek için umut verici ve daha sürdürülebilir bir geleceğe açılan bir yol olarak ifade edilmektedir.



Şekil 2. 2,3-BD'nin türevleri (Ji et al. 2011)

Mikrobiyal metabolizma sırasında, monosakkaritler veya diğer karbon kaynakları, merkezi bir metabolik ara ürün olarak piruvat yoluyla 2,3-BD'ye dönüştürülebilir. Piruvat, Embden-Meyerhof yolağında (EMP yolu veya glikoliz) heksozlardan (glukoz) veya pentoz fosfat ile Embden-Meyerhof yolağının bir kombinasyonunda pentozlardan (ksiloz) oluşmaktadır. Piruvat, katabolik reaksiyonların iki farklı enerji üretim yoluna ayrıldığı dallanma noktası olarak bilinmektedir. Aerobik koşullar altında asetil CoA yoluyla trikarboksilik asit döngüsüne veya anaerobik koşullar altında üç adımda karışık asit-2,3-BD fermentasyonuna yönlendirilir. 2,3-BD'ye giden metabolik yolakda, ilk reaksiyon, a-asetolaktat sentaz enzimi varlığında piruvatın a-asetolaktata dekarboksilasyonudur. Sonrasında, a-asetolaktat, a asetolaktat dekarboksilaz enzimi tarafından asetoine (asetil metil karbinol) dönüştürülür. Üçüncü adımda, asetoin, asetoin redüktaz (2,3-BD dehidrojenaz) enzimi tarafından 2,3-BD'ye indirgenir (Ji et al. 2011). Bu işlem, oksijen yokluğunda anaerobik reaksiyonlarla hücre içindeki $NAD^+/NADH_2$ dengesinin korunmasına yardımcı olur. 2,3-BD üretimi için gerekli olan enzimler, oksijen sınırlı olduğu durumlarda geç log ve durağan faz sırasında eksprese edilir (Jansen 2005).



Şekil 3. 2,3-BD üretiminde metabolik yolak (Ng et al. 2012)

2,3-BD Üreten Mikroorganizmalar

Literatürde birçok bakteriyel suşun, piruvattan 2,3-BD sentezleyebildiği bildirilmektedir. 2,3-BD üretimine yönelik çalışmaların çoğu, *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Serratia* cinsine ait türler olmak üzere *Enterobacteriaceae* familyasındaki bakteriler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* ve *Serratia* cinslerine ait türler, endüstriyel 2,3-BD üretiminde önemli bakteri türleri olarak bilinmektedir. *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* ve *Serratia marcescens*'e ait çeşitli bakteri suşları kullanılarak çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak, bu mikroorganizmalar risk 2 grubuna dahil edilmiş patojen mikroorganizmalardır, bu durum onları katı güvenlik regülasyonları ve artan proses maliyetleri nedeniyle endüstriyel ölçekli fermentasyon prosesleri için olumsuz yapmaktadır (Celińska and Grajek 2009).

Tablo 1. 2,3-BD üretiminde kullanılan bakteri türleri

Mikroorganizma	Karbon Kaynağı	2,3-BD (g/l)	Referans
K. pneumoniae	Glukoz	92,4	Qin et al. 2006
K. pneumoniae	Gliserol	49,2	Petrov and Petrova 2009
K. pneumoniae	Yer elması	84,0	Sun et al. 2009
K. oxytoca	Glukoz	95,5	Ji et al. 2009
K. oxytoca	Melas	118	Afschar et al. 1991
E. aerogenes	Glukoz	118	Jung et al. 2012
E. aerogenes	Melas	98,7	Jung et al. 2013
E. cloace	Glukoz ve Ksiloz	152	Li et al. 2015
E. cloace	Manyok	93,9	Wang et al. 2012
S. marcescens	Sükroz	139	Zhang et al. 2010
B. licheniformis	Glukoz	90,1	Ge et al. 2016
B. licheniformis	İnülin	103	Li et al. 2014a
B. licheniformis	Elma posası	113	Białkowska et al. 2015
B. amyloliquefaciens	Glukoz	92,3	Yang et al. 2011
B. amyloliquefaciens	Glukoz	132,9	Yang et al. 2013
P. polymyxa	İnülin	36,92	Gao et al. 2010
P. polymyxa	Sükroz	111	Häßler et al. 2012

Bununla beraber, *Bacillus* ve *Paenibacillus* cinslerinin güvenli kabul edilen (GRAS) mikroorganizmalar olması nedeniyle 2,3-BD üreten *Bacillus* suşlarına olan ilgi son zamanlarda artmaktadır. *Bacillus* ve *Paenibacillus* cinslerine ait gram-pozitif bakterilerin güvenli özelliklerinden dolayı, bu mikroorganizmalar endüstriyel fermentasyon prosesleri için umut verici konaklar olarak kabul edilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, üretim performanslarının *Klebsiella* türlerininkiyle karşılaştırılabilir olduğunu, ancak süreç verimliliği ve zengin ortam gereksinimi gibi bazı zorlukların olduğunu ortaya çıkarmıştır (Białkowska 2016). Öte yandan, *B. licheniformis*, *B. amlyloliquefaciens* ve *P. polymyxa* dahil olmak üzere birçok bakteriyel suşun 2,3-BD üretiminde iyi bir fermentasyon performansı ve verimi göstermiştir. *B. licheniformis* suşları GRAS mikroorganizmalar olarak sınıflandırılmakta ve 55°C'lik yüksek sıcaklık koşullarında gelişim gösterebilmekte, bu da fermentasyon proseslerinde kontaminasyon riskini azaltmaktadır. Bu nedenle bu mikroorganizmalar gelecek vaat eden endüstriyel üreticiler olarak ifade edilmektedir. Literatürde *B. licheniformis* suşlarının yüksek üretkenlik ve verim ile 2,3-Bütandiol fermentasyonunu gerçekleştirebildiği belirtilmektedir (Song et al. 2019).

2,3-BD Üretimine Etki Eden Faktörler

2,3-BD fermentasyonun verimliliği, substrat konsantrasyonu, sıcaklık, pH, havalandırma ve inokulum hacmi gibi çeşitli parametrelere bağlı olarak değişmektedir. Bununla beraber, sürekli, kesikli ve kesikli-beslemeli kültür protokolleri de fermentasyon proseslerinde önemli faktörler olarak kabul edilmektedir (Ji et al. 2011).

Karbon Kaynağı

Literatürde, endüstriyel 2,3-BD ve asetoin üretiminin ekonomik uygulanabilirliği büyük ölçüde hammadde maliyetine bağlı olduğu ifade edilmektedir (Jang and Choi 2018). Fermentasyon proseslerinde kullanılan karbon kaynakları esas olarak ticari rafine şekerlerdir. Son zamanlarda yenilenebilir kaynaklar 2,3-BD üretimi için iyi bir alternatif olmakta, üretim maliyetini minimize etmek için bol miktarlarda bulunan ve ucuz substratlar olarak tercih edilmektedir. Çeşitli hammaddeler, endüstriyel 2,3-BD üretimi için sürdürülebilirliklerine ve maliyetlerine göre değerlendirilmiştir. Fermentasyon proseslerinde hammadde maliyeti, toplam üretim maliyetinin büyük bir bölümünü oluşturduğundan dolayı, ucuz ve bol miktarda bulunan biyokütlelere olan ilgi artmıştır (Petrov and Petrova 2009). Çevresel sürdürülebilirlik göz önüne alındığında, atık ürünleri ve fazla biyokütleleri biyoteknolojik üretim proseslerinde kullanmanın ideal bir yaklaşım olacağı ifade edilmektedir. Selülozik olmayan biyokütleler arasında nispeten ucuz ve bol miktarda kullanılan substratlar arasında peynir altı suyu, melas, şeker kamışı, manyok ve ham gliserol bulunmaktadır. Lignoselülozik biyokütlelerin düşük maliyetle sürdürülebilir bir şekilde kullanılabilirliği ve dünya genelinde bol miktarda bulunan bir kaynak olmasından dolayı, bu biyokütleler biyoteknolojik proseslerde ilgi çekici bir seçenektir (Wang et al. 2012).

Şeker endüstrilerinin yüksek kıvamlı ve koyu kahverenkli bir yan ürünü olan melas, sükroz, mineraller, organik bileşikler ve vitaminler dahil olmak üzere çeşitli besinler içermektedir. Melas, düşük fiyatı ve zengin şeker bileşimi nedeniyle mikrobiyal fermentasyon çalışmalarında uygun bir karbon kaynağı olarak kabul edilmektedir. İçerdiği besleyici maddelerden dolayı kompleks bir fermentasyon substratı olarak bilinen melasın fermentasyon proseslerinde temel kullanım amacı karbon kaynağı olmasıdır (Akaraonye et al. 2012). Melas 2,3-BD üretim çalışmalarında da uygun bir hammadde kaynağı olarak kabul edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, *B. licheniformis* mikroorganizmasıyla ticari glukoz yerine melasın karbon kaynağı olarak kullanılmasıyla 2,3-BD fermentasyonu gerçekleştirilmiş ve böylece proses maliyetinde yaklaşık %45'lik bir düşüş olabileceği belirtilmiştir (Rebecchi et al. 2018). Başka bir çalışmada ise, melasın *B. subtilis* ile 2,3-BD üretiminde substrat olarak

kullanılabilirliği araştırılmıştır. Fermentasyon sonucunda, 2,13 g/l/s üretkenlik ve 0,42 g/g verim ile 89,6 g/l 2,3-BD elde edilmiştir (Wang et al. 2021).

Manyok, tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak bulunan ucuz ve bol miktarda nişasta içeren bir hammaddedir. Kolay ekim ve hasat yöntemleri sayesinde yıl boyunca kullanılabilmektedir. Manyok kökleri yüksek nişasta içeriğine sahip olduğundan dolayı, verimli karbonhidrat üretim hammaddelerinden biri olarak kabul edilmektedir. Manyok nişastası, manyok küspesi, manyok tozu ve taze manyok kökleri dahil olmak üzere değişik formlarda kullanılmaktadır (Pervez et al. 2014). Bir çalışmada, karbon kaynağı olarak manyok tozu kullanılmasıyla *E. cloace* suşu ile 2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar altında gerçekleştirilen fermentasyon prosesi sonucunda 93,9 g/l 2,3-BD elde edilmiştir (Wang et al. 2012).

Yer elması ucuz ve bol miktarda bulunan tahılsız bir hammaddedir. Taze yer elmasının karbonhidrat içeriği yaklaşık %20'dir ve bunun %70'inden fazlası inülindir. İnülin, çok sayıda fruktoz biriminden oluşup, inülinaz enzimi aktivitesi ile glukoz ve fruktoza hidrolize edilebilir (Szambelan et al. 2004). İnülin hidrolizatı, termofilik *B. licheniformis* suşu tarafından kullanılmasıyla 103 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiştir (Li et al. 2014a). İnülinaz takviyesi olmaksızın 2,3-BD üretiminde yer elması, *P. polymyxa* suşu tarafından substrat olarak kullanılmış ve fermentasyon prosesi sonucunda 36.92 g/l 2,3-BD elde edilmiştir (Gao et al. 2010).

Süt endüstrisinin bir yan ürünü olan peynir altı suyu yaklaşık %5 laktoz ve %1 protein içerir. Peynir altı suyunun 2,3-BD fermentasyon proseslerinde substrat olarak kullanımı çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Ancak, peynir altı suyundaki şeker konsantrasyonları düşük olup, peynir altı suyunun kullanıldığı fermentasyon proseslerinin verimi, nişasta ve şeker bazlı hammaddeler gibi substratlara kıyasla düşüktür. Bu nedenle, bu tür düşük üretim verim sorununun üstesinden gelmek için hücre immobilizasyon teknolojisi tercih edilmektedir (Champluvier et al. 1989).

Lignoselülozlar, aromatik polimerlere (lignin) sıkıca bağlı farklı şeker monomerleri içeren karbonhidrat polimerlerinden (selüloz ve hemiselüloz) oluşmaktadır. Bu kompakt yapı, lignoselülozik biyokütlenin doğrudan kullanılmasını zorlaştırmaktadır. Lignoselülozik biyokütle kullanılmadan önce normalde şekerleri serbest bırakmak üzere biyokütlenin hidrolizi için asit veya amonyak çözeltileri ile yüksek sıcaklık koşulları altında ön işleme tabi tutulması gerekmektedir. Genellikle asidik hidroliz sonucunda, mikroorganizmaların büyümesini engelleyen ve üretim performansını olumsuz yönde etkileyen furfural ve 5-hidroksimetilfurfural gibi toksik bileşikler açığa çıkmaktadır (Thomsen et al. 2009). Bunlara

rağmen, lignoselülozik biyokütleler ucuz ve bol miktarda bulunan hammaddeler olarak kabul edilmektedir. 2,3-BD üretim proseslerinde mısır koçanı ve elma posası gibi tarımsal ve odun atıklarından çeşitli lignoselülozik biyokütleler substrat olarak kullanılmaktadır (Song et al. 2019).

Azot Kaynağı

Azot kaynağı, bakteri gelişimi ve metabolit üretimi için önemli bir parametredir. Pepton, maya ekstraktı ve mısır maserasyon sıvısı (CSL) gibi organik nitrojen kaynaklarının 2,3-BD üretiminde olumlu etkisi olduğu bilinmektedir (Maina et al. 2022). Yapılan bir çalışmada, 33,4 g/l maya ekstraktı kullanılarak 3,49 g/l/s üretkenlik ile 139,9 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiştir (Zhang et al. 2010). Başka bir çalışmada ise, alternatif ve ucuz bir organik nitrojen kaynağı olan CSL ve maya ekstraktı karışımı *Bacillaceae* türleri ile 2,3-BD üretiminde nitrojen kaynağı olarak kullanılmıştır (Yang et al. 2013).

Oksijen Kaynağı

Oksijen kaynağı kontrolünün 2,3-BD fermentasyon proseslerinde önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, oksijen seviyesine bağlı olarak biyokütle ile 2,3-BD üretimi arasında ilişki olduğu rapor edilmiştir. 2,3-BD üretimini yüksek verimlerde gerçekleştirmek için düşük oksijen seviyelerinin gerekli olduğu belirtilmektedir. Ancak, fermentasyon üretkenliği, düşük oksijen seviyesi altında hücre biyokütlesi düşüş eğiliminde olduğundan azalır. Ayrıca, aerobik koşullar altında α-asetolaktat sentaz enzimi geri dönüşümsüz olarak inaktif olduğundan, kullanılan suşlara bağlı olarak fermentasyon performansını artırmak için optimize edilmiş bir oksijen seviyesi belirlemek gereklidir. Optimum aerobik koşulları sağlamada öne çıkan faktörler olarak oksijen transfer hızı (OTR), oksijen transfer katsayısı (K_La) ve solunum katsayısı (RQ) gibi parametreler kullanılmaktadır (Song et al. 2019). Oksijen kaynağının *P. polymyxa* ile 2,3-BD üretimi üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla kontrol parametresi olarak kLa faktörü test edilmiştir. 19.7 ile 194 h^{-1} aralığındaki çeşitli k_La değerlerinin fermentasyon verimine etkisi değerlendirilmiştir (Häßler et al. 2012). Ayrıca, 2,3-BD üretimini optimize etmek üzere çalkalama hızı kontrolüne dayalı stratejiler araştırılmıştır. *K. oxytoca* için iki aşamalı çalkalama hızı kontrol stratejisinde, büyüme fazının ilk 15 saati boyunca yüksek hücre büyümesi elde etmek için inkübatörler 300 rpm'ye ayarlanmış, ardından 2,3-BD üretimini maksimize etmek için 200 rpm'ye düşürülmüştür (Ji et al. 2009).

pH

Kültür ortamının pH seviyesinin kontrolü, fermentasyon sırasında 2,3-BD üretimini arttırmak için önemli bir parametre olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Genellikle, asidik koşulların alkollü bileşiklerin üretimi için uygun olduğu bilinmektedir. 2,3-BD üretimi, organik asitlerin birikmesi nedeniyle asidik koşullar altında indüklenebilir. Bu bağlamda, asetik asidin 2,3-BD üretim yolunun aktivasyonu için indükleyici işleve sahip olduğu belirtilmektedir (Van Houdt el. 2007). Fermentasyon ortamına %1'den daha az oranda asetik asit eklendiğinde *K. pneumoniae* tarafından 2,3-BD üretiminin 2 kattan fazla arttığı bildirilmiştir (Yu et al. 1982). Düşük pH seviyeleri ve asetik asit takviyesi 2,3-BD üretimi için etkili olsa da, düşük pH genellikle hücre büyümesi için zararlı olduğundan, fermentasyon proseslerinde her bir mikrobiyal suş için optimize edilmiş pH koşullarının bulunması gerekir. *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* ve *E. aerogenes* tarafından 2,3-BD üretimi için optimum pH değerleri 5-6 aralığındadır (Celińska and Grajek 2009). *Bacillus* suşları ise daha yüksek pH'ta yüksek miktarlarda 2,3-BD üretimi gerçekleştirebilir. *P. polymyxa* için optimal pH 6,3 ile 6,8 arasında iken, *B. licheniformis* için bu aralık pH 6-7 aralığındadır (Song et al. 2019).

Sıcaklık

Sıcaklık hücre büyümesi, mikrobiyal aktivite ve proses maliyeti açısından endüstriyel fermentasyon için önemli bir parametredir. Enzim aktivitesi, hücresel bütünlük ve ürün oluşumu mikrobiyal ortamdaki sıcaklığa bağlıdır. 2,3-BD üreten bakterilerin çoğu, 30 ile 37 °C arasında optimum büyüme sıcaklıklarına sahip olan mezofilik türlerdir (Fonseca et al. 2008). Artan sıcaklıkla beraber enzimatik süreçlerin hızlandığı ve ürün veriminin arttığı bilinmektedir. Örneğin, *B. licheniformis* ile gerçekleştirilen fermentasyon prosesinde sıcaklığın 34'ten 37 °C'ye kademeli olarak yükseltilmesiyle 2,3-BD üretimi ve üretkenliğinde artış tespit edilmiştir (Perego et al. 2003). Ancak, ılıman sıcaklık koşulları, kontaminasyon riski gibi endüstriyel fermentasyon proseslerinde bazı problemlere neden olmaktadır. Bu bağlamda, termofilik fermentasyon prosesleri, bakteriyel kontaminasyon riskini azaltabilir ve steril olmayan koşullarda gerçekleştirilebilir. Bu durum prosesleri daha verimli ve uygun maliyetli hale getirir. 2,3-BD üreten termofilik *B. licheniformis* suşları GRAS olarak sınıflandırıldığından ve optimum olarak 50-60 °C'de gelişim gösterdiğinden, endüstriyel üretim proseslerinde yaygın olarak tercih edilmektedir (Li et al. 2014b).

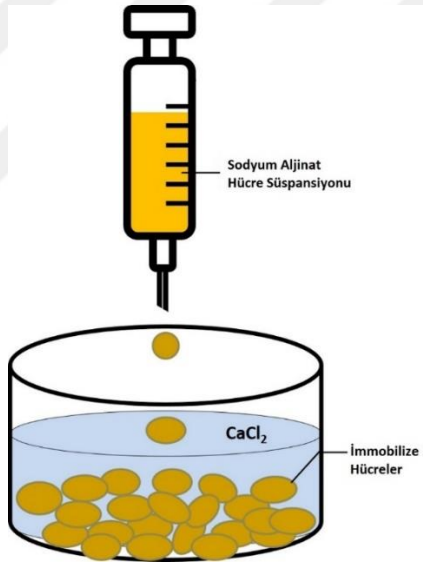
İnokülüm Hacmi

Genel olarak, 2,3-BD üretim proseslerinde inokülüm miktarı, tüketilen karbon kaynağına bağlı olarak üretkenliği etkilediği, ancak verimi etkilemediği belirtilmektedir.

Bununla birlikte, bazı çalışmalarda inokülüm miktarındaki artışın verim üzerinde de olumlu bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Artan inokülum miktarının 2,3-BD verimini ve üretkenliğini olumlu yönde etkileyebileceğinden, fermentasyon için optimum inokülum miktarını belirlemek önemlidir (Anvari and Safari Motlagh 2011).

Hücre immobilizasyonu

Hücre immobilizasyonu, hücrelerin hareketsiz hale getirilmesi için uygun bir matriste sabitlendiği biyoteknolojik bir işlemdir. İmmobilize sistem, biyolojik sistemin organik veya inorganik kaynaklı desteklerle (polimerik matris) birleşiminden oluşmaktadır. Hücre immobilizasyon teknolojisinin, çeşitli biyokimyasal maddelerin üretimi, biyoremediasyon ve ilaç üretimi gibi alanlarda uygulamaları bulunmaktadır. Aljinat, silika, polivinil alkol ve kitosan, düşük toksisite, biyolojik olarak parçalanabilirlik, yenilenebilirlik, mekanik kararlılık ve düşük maliyet gibi özelliklerinden dolayı yaygın olarak tercih edilen polimerik malzemeler olarak ifade edilmektedir (Sekoai et al. 2018).



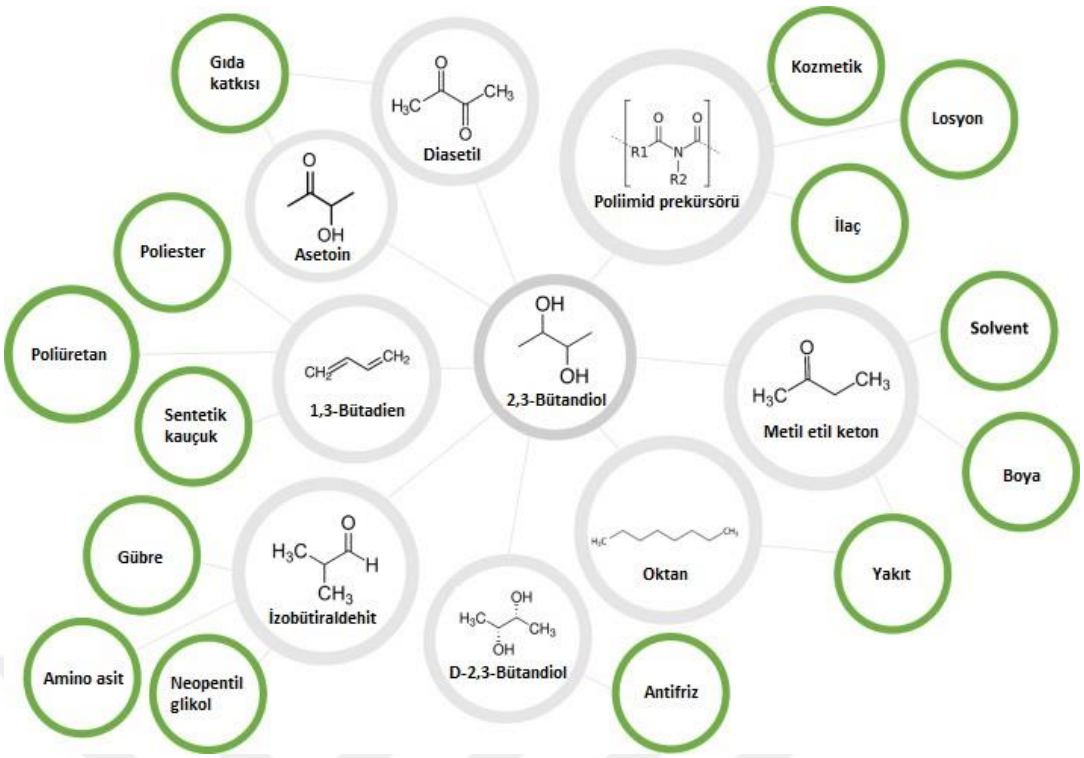
Şekil 4. Aljinat matrisiyle immobilize hücrelerin hazırlanışı (Gao et al. 2016)

Mikrobiyal fermentasyon prosesleri serbest ya da immobilize hücrelerle gerçekleştirilmektedir. Serbest hücrelere oranla immobilize edilmiş hücrelerin çeşitli avantajlara sahip olduğu belirtilmektedir. İmmobilize matriksler içerisinde mikrobiyal hücre yoğunluğu daha fazla olmakta, böylece metabolik reaksiyonlar daha hızlı ve daha kısa sürede gerçekleşmektedir. Bu bağlamda immobilize hücrelerle gerçekleştirilen proseslerde daha yüksek ürün verimleri elde edilmekte ve zaman ve enerji tüketimi konusunda tasarruf sağlanmaktadır. Ayrıca, immobilize edilmiş hücrelerin fermentasyon ortamına adaptasyonu daha kolay olup, metabolik reaksiyonlar daha kısa süreler içerisinde başlamaktadır. İmmobilize hücreler sıcaklık, pH, besin yetersizliliği ve inhibitör bileşikler gibi olumsuz çevresel koşullara

karşı toleransı daha yüksektir. Bununla beraber, immobilize hücrelerin hücre yoğunluğunun yüksek olmasından dolayı kültür ortamındaki kontaminasyon riski düşüktür. İmmobilize hücrelerin kültür ortamından uzaklaştırılması kolay olup, fermentasyon proseslerinde tekrar tekrar kullanılabilmektedir (Aydogan et al. 2014). İmmobilizasyon yöntemleri arasında, sodyum aljinat matrisine tutuklama yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir. Yöntemin ucuz ve uygulanmasının kolay olması ve kullanılan matriksin toksisite riskinin düşük olması ve biyouyumluluk özelliği gibi birçok avantajı bulunmaktadır (Duarte et al. 2013).

2,3-Bütandiolün Kullanım Alanları

2,3-bütandiol, kimya, kozmetik, gıda, tarım, yakıt ve havacılık gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılan kokusuz ve renksiz olan sıvı bir kimyasal bileşiktir. 2,3-BD, kimyasal kataliz kullanılarak dehidrasyon yoluyla 1,3-bütadiene dönüştürülmekte ve 1,3-bütadien sentetik kauçuk üretimi için kullanıldığından 2,3-BD'ye olan endüstriyel ilgi 2. Dünya Savaşı sırasında başlamıştır (Ji et al. 2011). 1,3-bütadien, bir su molekülünün 1,2-eliminasyonu ile üretilirken, diğer bir dehidrasyon ürünü ve etkili bir yakıt katkı maddesi ile endüstriyel bir çözücü olan metil etil keton (MEK) ise pinacolün yeniden düzenlemesi ile üretilmektedir. 2,3-BD'den yüksek kaliteli uçak yakıtı oktanı da üretilebildiği bildirilmektedir (Bialkowska 2016). 2,3-BD'nin donma noktası -30 °C'den düşük olduğundan dolayı antifriz ajan olarak kullanılabilir. Bununla beraber, polimer sentezinde monomer olarak kullanıldığı bilinmektedir (Syu 2001). 2,3-BD, poliüretan üretiminde ara ürünler olan poliol ve polimerik izosiyanatın üretiminde yeni bir zincir başlatıcı ve uzatıcı olarak kullanılmaktadır (Paciorek-Sadowska and Czupryński 2006).



Şekil 5. 2,3-BD'nin potansiyel uygulamaları (Maina et al. 2022)

Günümüzde kozmetik endüstrisi sürdürülebilir, çevre dostu ve doğal kozmetik hammaddeleri talep etmektedir. 2,3-BD'nin, kozmetik endüstrisindeki en uygun hammaddelerden biri olduğu kabul edilmektedir. Hem kozmetik hem de kişisel bakım ürünlerinin bir bileşeni olarak büyük bir potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir. Kozmetik ürünlerde hammadde olarak kullanım için güvenlik ve etkinlik de önemli parametrelerdir. 2,3-BD'nin doğada kolaylıkla bulunabilmesi nedeniyle minimum toksisiteye sahip olduğu belirtilmektedir. 2,3-BD akut toksisite, cilt veya göz tahrişi ve cilt hassasiyeti gibi olumsuz durumlara neden olmaz. Bununla beraber, 2,3-BD'nin kozmetikte nemlendirici, antiseptik ve yumuşatıcı bileşenler olarak kullanılabileceğini belirten veriler bulunmaktadır (Song et al. 2019).

2,3-BD'nin tarım endüstrisinde de çeşitli amaçlarla kullanıldığı belirtilmektedir. 2,3-BD'nin tarım ürünü olarak kullanımında dikkat edilmesi gereken en önemli faktör insan sağlığına ve çevreye olan etkisidir. 2,3-BD meyveler ve şaraplar gibi gıda ürünlerinin bir bileşeni olduğu için güvenli bir kimyasal olarak kabul edilmektedir (Jiang and Zhang 2010). Ayrıca, 2,3-BD'nin doğal bağışıklığı tetikleyebildiği ve doğal öldürücü hücre aktivitesini indükleyerek hasarlı karaciğer hücrelerinin temizlenmesinde görev aldığı bildirildiğinden, ilaç endüstrisinde ilgi görmektedir (Lai et al. 2012). 2,3-BD'nin anti-inflamatuar etkilere sahip olduğu da gösterilmiştir. Sıçanlarda endotoksin kaynaklı akut akciğer hasarını iyileştirilmesinde rol oynadığı rapor edilmiştir (Hsieh et al. 2007). Bununla beraber, 2,3-BD şarap ve bira gibi fermente gıdalar, bitkiler ve topraklar gibi doğal olarak hazırlanmış veya

oluşan ürünlerde bulunan doğal bir madde olduğundan, bağışıklık arttırıcı etkinliğine dayalı olarak gıda katkı maddesi veya bir sağlık takviyesi amacıyla kullanılabilir (Ryu et al. 2004). Bu bilgiler ışığında, 2,3-BD mikrobiyal fermentasyon prosesleri ile üretilebilen çevre dostu bir bileşik olarak kabul edilmektedir.

KURAMSAL TEMELLER

Li *et al.* (2014b) tarafından yapılan çalışmada, 2,3-BD üretimi için termofilik *B. licheniformis* X10 suşu lignoselülozik hidrolizattan izole edilmiştir. X10 suşunun, karbon katabolit baskısı olmadan aynı anda glukoz ve ksilozu kullanabildiği belirlenmiş ve furfural, vanilin, formik asit ve asetik asit dahil olmak üzere çeşitli fermentasyon inhibitörlerine karşı yüksek toleransa sahip olduğu bildirilmiştir. Kesikli-beslemeli fermentasyon prosesi sonucunda, mısır koçanı hidrolizatından 2.1 g/l/s üretkenlik ve %94.6 verimle 74.0 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiştir.

Dai *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, *Enterobacter cloacae* bakterisi ile melastan 2,3-BD ile fermentasyonu incelenmiştir. Fermentasyon ortamı, yanıt yüzeyi metodolojisi ile optimize edilmiş ve 2,3-butandiol üretimi, sterilizasyon olmayan koşullar altında ve organik nitrojen kaynağı eksikliğinde gerçekleştirilmiştir. 60 saatlik kesikli-beslemeli fermentasyon prosesi sonucunda, 0.39 g/g verim ile 99.5 g/l 2,3-BD elde edilmiştir.

Jiang *et al.* (2015) tarafından yapılan çalışmada, *P. polymyxa* mikroorganizmasının mannoz, galaktoz, selobiyoz, gliserol, glukoz ve ksiloz karışımı ile glukoz ve selobiyoz karışımı gibi geniş bir substrat spektrumunu kullanabildiği gösterilmiştir. Ayrıca, bakterinin iyonik sıvı ile önceden işlenmiş selülozun enzimatik hidrolizi ile elde edilen yüksek oranda konsantre glukozu da kullanabildiği belirtilmiştir. Herhangi bir işlem olmaksızın hidrolizatın, *P. polymyxa* tarafından %81.7 verim ve 0.7 g/l/s üretkenlik ile 2,3-bütandiol ve asetoin üretiminde başarıyla kullanıldığı rapor edilmiştir.

de Andrade *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada, 2,3-BD üretiminin hem katı faz mikro ekstraksiyon hem de sıvı-sıvı ekstraksiyon ile değerlendirildiği ve alternatif substratlar kullanılarak *Bacillus subtilis* LB5a suşu tarafından sürfaktin ve 2,3-BD'nin eş zamanlı üretimi optimize edilmiştir. Ayrıca *Bacillus subtilis*'in aktif karbon üzerinde oluşturduğu biyofilmin surfaktin üretimini artırabileceği bildirilmiştir. Merkezi bileşik tasarım deneyleri, her iki biyoürün için de en iyi substrat bileşiminin peynir altı suyu (27,7-34 g/l), aktif karbon (25 g/l) ve manyok atıksuyu (74 g/l) olduğunu göstermiştir. Optimize edilmiş fermentasyon koşullarında 27,07 mg/l sürfaktin ve 330 mg/l 2,3-BD (SPME artı sıvı-sıvı ekstraksiyonu) üretimi gerçekleştirilmiştir.

Deshmukh *et al*. (2016) tarafından yapılan çalışmada, *B. subtilis* mikroorganizması 2,3-BD verimini arttırmak için genetik olarak modifiye edilmiştir. Kofaktör mühendisliği ve

anahtar bir enzim olan bütandiol dehidrojenazın aşırı ekspresyonu gibi stratejiler araştırılmıştır. Her iki stratejide de melasın karbon kaynağı olarak kullanıldığı fermentasyon ortamında 2,3-BD verimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Kofaktör mühendisliği üretim veriminde %26'lık bir artışa yol açarken, bdhA'nın aşırı ekspresyonu verimde %11'lik bir artış sağlamıştır.

Ge *et al.* (2016) tarafından yapılan çalışmada, *B. licheniformis* MW3'te 2,3-BD'nin stereoizomer oluşum mekanizması araştırılmıştır. (2R,3R)-2,3-BD ve mezo-2,3-BD üretiminden iki stereospesifik 2,3-BD dehidrogenazın (2R,3R-BDH (gdh tarafından kodlanır) ve meso-BDH (budC tarafından kodlanır)) sorumlu olduğu belirlenmiştir. (2R,3R)-2,3-BD ve meso-2,3-BD'nin üretimi için sırasıyla *B. licheniformis* MW3 (Delta budC) ve *B. licheniformis* MW3 (Delta gdh) suşları tasarlanmıştır. 42 saatlik fermentasyondan sonra, *B. licheniformis* MW3 (Delta budC) ile 123.7 g/l (2R,3R)-2,3-BD üretilirken, 32 saatlik fermentasyon süresi sonunda *B. licheniformis* MW3 (Delta gdh) kullanılarak 90,1 g/l meso-2,3-BD sentezlenmiştir.

Guragain *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, *B. licheniformis* DSM 8785 mikroorganizması, farklı şeker tiplerinin bulunduğu fermentasyon ortamlarında 2,3-BD üretimi açısından değerlendirilmiştir. Glukoz, ksiloz ve karışık şeker (glukoz:ksiloz = 1:2) ortamındaki üretkenlikler sırasıyla 2,23, 1,58 ve 0,91 g/l/s olarak bildirilmiştir. Karbon kaynağı olarak glukozun bulunduğu kesikli-beslemeli proses sonucunda, sırasıyla 0.47 g/g verim ve 0.81 g/l/s üretkenlik ile 103 g/l BD üretimi gerçekleştirilmiştir.

Feng *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, 2,3-BD üretiminde sükroz kullanımını teşvik etmek için, *B. subtilis* Delta tet ve *B. subtilis* FJ-1 izolatlarında heterolog enerji koruyucu sükroz kullanım yolakları incelenmiştir. *Escherichia coli*'den cscB (sükroz permeazı kodlayan) ve *Streptococcus mutans*'tan gtfA (sakkaroz fosforilazı kodlayan) kombinasyonunun 2,3-BD üretimi için en dikkate değer artışı gösterdiği belirlenmiştir. Substrat olarak sükroz ve şeker kamışı suyundan Delta tet-CEG suşu ile 2,3-BD fermentasyonunda kontrol Delta tet suşuna kıyasla sırasıyla %36,5 ve %24,7 daha fazla üretim ve FJ-1-CEG suşu da kontrol FJ-1 suşundan sırasıyla %23,8 ve %44,5 daha fazla 2,3-BD ürettiği tespit edilmiştir.

Okonkwo *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, tripton, maya ekstraktı, amonyum asetat, amonyum sülfat, gliserol konsantrasyonu, sıcaklık ve inokülum miktarı faktörlerinin *P. polymyxa* DSM 365 ile 2,3-BD üretimi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için Box-Behnken tasarımı, Plackett-Burman tasarımı (PBD) ve cevap yüzeyi metodolojisi kullanılmıştır. Sonuçlar tripton, sıcaklık ve inokülüm miktarının 2,3-BD üretimini önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir ($p < 0.05$). Box-Behnken tasarımı ve cevap yüzeyi metodolojisi ile optimum tripton konsantrasyonu, inokülüm miktarı ve sıcaklık sırasıyla 3,5 g/l, %9,5 ve 35 ºC olarak

belirlenmiştir. Optimize edilmiş koşullarda gerçekleştirilen kesikli ve kesikli-beslemeli fermentasyon prosesleri ile sırasıyla 51,10 ve 68,54 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiştir.

Xiao *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, mısır hidrolizatından verimli bir asetoin üretimi için termofilik bir *Bacillus* suşu izole edilmiş, fermentasyon ortamı, Plackett-Burman tasarımıyla istatistiksel olarak optimize edilmiştir. Oksijenle zenginleştirilmiş hava (%65 oksijen) substrat tüketimini hızlandırmış fakat ürün verimini artırmamıştır. 600 rpm ile karşılaştırıldığında, 400 rpm karıştırma daha az asetoin ve daha fazla 2,3-BD üretimine yol açmıştır. Asetoin verimini artırmak için iki aşamalı bir pH kontrol stratejisi uygulanmıştır. 251 g/l mısır unundan 50,8 g/l asetoin ve 32,1 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiştir.

Yan *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus* spp FJ-4 suşu ile yüksek üretkenlik ve verimle kiral olarak saf D-2,3-BD üretimi amaçlanmıştır. Fermentasyon ortamının bileşimi, istatistiksel deneysel metodolojiler kullanılarak optimize edilmiştir. Kesikli-beslemeli fermentasyon prosesi sonucunda, 226,8 g/l glukozdan 100,0 g/l D-2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiş ve 0,44 g/g verim elde edilmiştir.

Dias *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada, 15 adet *P. brasilensis* suşu ile 20 g/l glukoz içeren modifiye edilmiş YEPD ortamında 32°C'de 8 saatlik fermentasyon prosesleri sonucunda 2,3-BD konsantrasyonlarının 5,5 ile 7,6 g/l arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. PB24 suşunun, 12 saatlik fermentasyon prosesinde 0,43 g/g verim ve 0,68 g/l/s üretkenlik ile 8,2 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonrasında yaklaşık 80 g/l glukoz içeren YEPD'de 27 g/l 2,3-BD'ye ulaşan bir artış gözlemlenmiştir.

Gao *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus licheniformis* mutantları olan WX-02 Delta budC ve WX-02 Delta gldA ile 2,3-BD fermentasyon proseslerinde *Miscanthus*'un uygun maliyetli bir biyokütle olarak kullanılma potansiyeli araştırılmıştır. Hem WX-02 Delta budC hem de WX-02 Delta gldA, optik olarak saf 2,3-BD üretiminde ksilozun yanı sıra glukoz ve ksilozdan oluşan karışımı da verimli bir şekilde kullanabildiği bildirilmiştir. İki mutant suşun da *M. floridulus* hidrolizatı ile verimli bir fermentasyon prosesi sonucunda optik olarak saf 2,3-BD'yi üretebildiği sonucuna varılmıştır.

Rebecchi *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada, standart şeker ve protein kaynaklarını kullanarak 2,3-BD verimini ve üretkenliğini artırmak için optimum Oksijen Transfer Hız (OTR) aralıklarının belirlenmesi ve melas ile tavuk eti gibi ucuz karbon ve azot kaynaklarının kullanılarak patojenik olmayan *B. licheniformis* ATCC9789 suşu tarafından fermentasyon proses maliyetinin düşürülmesi amaçlanmıştır. Glukoz, sığır eti ekstraktı ve pepton içeren pahalı ve standart bir fermentasyon ortamında OTR optimizasyonu (7-15 mmol/l/s aralığındaki OTR'ler) iyi bir 2,3-BD verimi (0,43 +/- 0,03 g/g) ve üretkenliği (0,91

+/- 0,05 g/l/s) sağlamıştır. Farklı karbon ve azot kaynaklarının kullanımı hem verimde hem de üretkenlikte yaklaşık %50'lik bir düşüşe sebep olmuştur. Ayrıca, fermentasyon ortamında ucuz bileşenlerin kullanımı proses maliyetini %45 oranında azaltabileceği belirtilmiştir.

Song *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus* cinsine ait izolatlar morfolojik, biyokimyasal ve genomik analizlerle taranmış, daha sonra seçilen suşlarla 2,3-BD'nin ekonomik üretiminde yaygın olarak tercih edilen karbon (glukoz, sükroz, früktoz ve ksiloz) ve nitrojen (maya ekstraktı ve mısır maserasyon sıvısı) kaynaklarının kullanılabilirliği test edilmiştir. Üretim verimini artırmak için iki aşamalı kesikli-beslemeli fermentasyon gerçekleştirilmiş, *B. licheniformis* GSC3102 izolatının, ucuz ve bol miktarda nitrojen kaynağını kullanarak 1,40 g/l/s üretkenlik ve 0,423 g/g verimle, 92,0 g/l 2,3 BD üretimi gerçekleştirdiği bildirilmiştir.

Psaki *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada, 2,3-BD üretimini artırmak amacıyla Plackets-Burman tasarımı, merkezi bileşik tasarım ve kısıtlı optimizasyon yöntemleri besin bileşimini optimize etmek için kullanılmıştır. $(NH4)_{(2)}SO_4$, maya ekstraktı ve KOH, üretim verimini etkileyen en önemli faktörler olarak belirlenmiştir. Optimum pH (6,3) ve sıcaklıkta (33,9 ºC) şeker kamışı melasıyla gerçekleştirilen kesikli-beslemeli fermentasyon sonucunda, 0,31 g/g verim ve 2,66 g/l/s üretkenlikle 50,6 g/l 2,3-BD konsantrasyonu elde edilmiştir.

O'Hair *et al.* (2020) tarafından yapılan çalışmada, pH 8,0-10,0 ve 40-55 ºC arasındaki değerlerde aktivite gösterebilen ve böylece kontaminasyon riskini azaltan *B. licheniformis* YNPS-TSU suşunun iyi bir 2,3-BD üreticisi olduğu belirtilmiştir. YNPS-TSU, 50 ºC ve pH 8-9 optimum koşullarda, 0,46 g/g gibi yüksek bir verimle 60 g/l glukozdan 27,4 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirmiştir. Ayrıca YNPS-TSU kodlu mikroorganizmanın sükroz, fruktoz, galaktoz, arabinoz, mannoz ve ksiloz gibi farklı karbonhidratların yanı sıra gliserol gibi alkolleri de fermente edebileceği bildirilmiştir. Prosesinin verimini artırmak için nitrojen ve mineral kaynaklarının 2,3-BD fermentasyonu üzerindeki etkileri de araştırılmıştır.

Amraoui *et al.* (2021) tarafından yapılan çalışmada, mutant *Enterobacter ludwigii* suşunun 2,3-BD üretimi için tek karbon ve enerji kaynağı olarak saf ksilozu kullanma potansiyeli araştırılmıştır. Ayrıca suşun 2,3-BD üretimi için şeker kamışı küspesinden (SCB) elde edilen detoksifiye edilmiş ve detoksifiye edilmemiş ksiloz bakımından zengin hidrolizat üzerinde gelişim kabiliyeti incelenmiştir. Fermentasyon ortamına %0,2 w/v maya ekstraktı eklenmesiyle, hücre büyümesi (%31), BD titresi (%43) ve verimde (%41) artış tespit edilmiştir. Kesikli-beslemeli fermentasyon sonrasında, sırasıyla 0.40 g/g verim ile saf ksilozdan 71.1 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiştir.

Vikromvarasiri *et al.* (2021) tarafından yapılan çalışmada, *B. subtilis*'te gliserolden 2,3-BD üretimini artırmak amacıyla yapılan gen nakavtlarının etkilerini değerlendirmek için akış dengesi analizi (FBA) simülasyonu kullanılmıştır. Dört gen (ackA, pta, lctE ve mmgA) sırayla nakavt edilmiş ve 2,3-BD üretimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. ackA ve pta'nın nakavt edilmesi 2,3-BD üretimi üzerinde herhangi bir göstermezken, lctE'nin nakavt edilmesi ise 2,3-BD üretiminde önemli bir artışa neden olmuştur. Ayrıca, fermentasyon verimi, mmgA'nın nakavt edilmesi ile artırılmıştır.

Tsigoriyna *et al.* (2021) tarafından yapılan çalışmada, selülolitik ve patojenik olmayan *B. licheniformis* 24 ile 2,3-BD fermentasyonu gerçekleştirilmiştir. Plackett-Burman tasarımı ve yanıt yüzeyi metodolojisi uygulanarak, proses parametreleri optimize edilmiştir. 2,3-BD üretimini artırmak için CCD deneyleri ile kültür ortamının optimum değerleri (maya ekstraktı, 13,38 g/l; tripton, 6,41 g/l; K_2HPO_4, 4,2 g/l; $MgSO_4$, 0,32 g/l) ve optimum sıcaklık (37,8 ºC), pH (6,23) ve havalandırma hızı (3,68 vvm), belirlenmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda 1,94 g/l/s üretkenlik ve 0,488 g/g verim ile 91,23 g/l 2,3-BD elde edilmiştir.

Song *et al.* (2021) tarafından yapılan çalışmada, yabanıl tip *B. licheniformis* suşları genellikle suş gelişimini ve metabolit üretimini engelleyen mukoid ekzopolimerler salgıladıklarından dolayı, CRISPR-Cas9 sistemi kullanılarak hem poliglutamat sentazı kodlayan pgsBCAE operonu hem de levansukrazı kodlayan sacB geni silinerek mukoid olmayan bir suş elde edilmiştir. Mısır maserasyon sıvısı (CSL) bazlı ortamda kesikli beslemeli fermentasyon prosesi sonucunda ihmal edilebilir miktarlarda yan ürünlerle birlikte 120 g/l'den fazla 2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiştir.

OHair *et al.* (2021) tarafından yapılan çalışmada, Yellowstone milli parkından izole edilen *B. licheniformis* suşlarının, 2,3-BD fermentasyon proseslerindeki etkinliği araştırılmıştır. *B. licheniformis* YNP1-TSU, YNP2TSU ve YNP3-TSU suşlarının tüm genomik dizileme verileri ve biyokimyasal sınıflandırmaları incelenmiştir. Her suşun optimal büyüme sıcaklığının 50°C olduğu ve suşların iyi bir 2,3-BD üreticisi olduğu bildirilmiştir. YNP1-TSU, YNP2-TSU ve YNP3-TSU suşları, steril olmayan (non-sterile) gıda atıklarında bulunan karışık şekerlerden sırasıyla 0,44 g/g, 0,45 g/g ve 0,43 g/g verimde 2,3-BD üretimi gerçekleştirmiştir.

Das *et al.* (2021) patojenik olmayan bir toprak izolatı olan *B. licheniformis*'in (BL1) 2,3-BD üretme potansiyelini araştırmıştır. Soya gevreği, soya unu, yağı alınmış soya ve soya küspesi bazlı hidrolizatların, nitrojen kaynakları olarak maya ekstraktı ve peptonun yerine kullanılabilirliği test edilmiştir. Yağı alınmış soya gevreği ve soya küspesi hidrolizatı, maya ekstraktı ve peptonla karşılaştırıldığında aynı fermentasyon verimi elde edilmiştir. Optimize

edilmiş koşullar altında gerçekleştirilen fermentasyon prosesi sonucunda, 0,43 g/g verim ve 0,48 g/l/s üretkenlik ile 11,06 g/l 2,3-BD elde edilmiştir. %5'in üzerindeki glukoz konsantrasyonlarının inhibitör etkisi olduğu ve spesifik büyüme hızında azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. 2,3-BD üretiminde nitrojen kaynağı olarak soya hidrolizatının kullanılması, proses maliyetinde %67 azalma sağladığı belirtilmiştir.

OHair *et al.* (2021) tarafından yapılan çalışmada, termofilik ve alkalifilik *B. licheniformis* YNP5-TSU suşunun gıda atıklarından steril olmayan fermentasyon koşullarında 2,3-BD üretme potansiyeli araştırılmıştır. 50 C^{o} ve pH 9.0'da, *B. licheniformis* YNP5-TSU mikroorganizması 24 saat içinde biber, ananas, lahana ve çeşitli atıklardan sırasıyla 5,2, 5,9, 5,9 ve 4,3 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirmiştir. Steril olmayan fermentasyonlardan elde edilen 2,3 BD konsantrasyonları ve verimlerin, steril fermentasyonlardan elde edilenlerle benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir.

Okonkwo *et al.* (2021) tarafından yapılan çalışmada, *P. polymyxa* kullanılarak detoksifiye edilmemiş buğday samanı hidrolizatının (WSH) 2,3-BD'ye fermentatif dönüşümü araştırılmıştır. Sonuçlar, *P. polymyxa*'nın lignoselülozik şeker türevlerini (glukoz, ksiloz ve arabinoz) birlikte kullandığını göstermiştir. 8:11:1 oranında glukoz-ksiloz-arabinoz içeren fermentasyon kültürlerinde, 2,3-BD veriminde ve üretkenlikte sırasıyla 1,03 ve 1,18 kat artış belirlenmiştir. *P. polymyxa*, %60, %80 ve %100 WSH'de lignoselüloz kaynaklı mikrobiyal inhibitör bileşiklere karşı önemli bir tolerans göstermiştir. 2,3-BD konsantrasyonları %60, %80 ve %100 WSH'de sırasıyla 32, 31 ve 23 g/l olarak tespit edilmiştir.

Wang *et al.* (2021) tarafından yapılan çalışmada, *B. subtilis* CS13 ile gerçekleştirilen fermentasyon prosesinde 2,3-BD verimini artımak için proses parametleri optimize edilmiştir. Optimize edilmiş fermentasyon ortamında 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda maksimum 2,3-BD miktarı (125,5 +/- 3,1 g/l) bildirilmiştir. En yüksek 2,3-BD konsantrasyonu ve üretkenliği, 500 rpm karıştırma ve 2 l/dk havalandırma hızında eş zamanlı olarak tespit edilmiştir. Ayrıca melasın karbon kaynağı olarak kullanıldığı fermentasyon sonunda, 2,13 +/- 0,07 g/l/s üretkenlik ve 0,42 g/g verimle 89,6 +/- 2,8 g/l 2,3-BD elde edilmiştir.

Han *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışmada, tütün atıklarından izole edilen *B. amyloliquefaciens* T4 suşunun, nikotin gibi toksik inhibitörlere karşı direnç gösterebildiği ve yüksek konsantrasyonda (%20) glukoz içeren fermentasyon ortamında 2,3-BD üretimi için uygun bir mikroorganizma olduğu belirtilmiştir. 50 g/l tütün atığından 48 saat süren fermentasyon prosesi sonucunda, ilave karbon kaynağı olarak 200 g/l glukoz içeren ve içermeyen kültür ortamında sırasıyla 30,06 ve 1,54 g/l 2,3-BD üretildiği belirlenmiştir.

Hazeena *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışmada, tarımsal ve endüstriyel atıklardan 2,3-BD üretmek için biyoproses tasarımı amaçlanmıştır. 13 farklı biyokütle örneği hidrolize olabilen şekerler için araştırılmıştır. Alkali ön işlemi işlenmiş biyokütle ile ve enzim hidrolizi ise ticari selülaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm biyokütle hidrolizatları arasında yulaf kabuğu ve ladin kabuğu biyokütlesinin maksimum miktarda toplam indirgeyici şeker üretebildiği belirlenmiştir. *Enterobacter cloacae* SG1 kullanılarak batık kültür fermentasyon prosesleri için, maksimum hidrolize edilebilir şekerlere sahip yulaf kabuğu ve ladin kabuğu biyokütlesi seçilmiştir. Fermentasyondan sonra yulaf kabuğu ve ladin kabuğundan sırasıyla 37,59 ve 26,74 g/l 2,3-BD elde edilmiştir.

Ma *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışmada, karbon kaynağı olarak mısır koçanı hidrolizatı kullanılmasıyla *E. cholerae* suşu ile 2,3-BD üretimi araştırılmıştır. Konsantre mısır koçanı hidrolizatının toplam şeker içeriğinin 233 g/l olduğu ve hiçbir inhibitör etki göstermediği belirtilmiştir. Optimum koşullardaki fermentasyon prosesi sonucunda, 0.30 g/g verim ve 0.66 g/l/s üretkenlik ile 47.23 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiştir.

Narisetty *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışmada, *E. ludwigii*'nin ekmek atıklarından (BW) 2,3-BD üretme potansiyeli araştırılmıştır. İlk olarak, optimum inokülüm miktarı ve maya ekstraktı konsantrasyonu belirlenip, ardından asit ve enzimatik hidroliz ile BW'den şekerlerin ekstraksiyonu yapılmıştır. Glukoz verimi 330-530 g/kg BW olarak rapor edilmiş ve açığa çıkan şekerlerin, *E. ludwigii* tarafından 2,3-BD üretiminde karbon kaynağı olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Asit ve enzimatik hidrolizden elde edilen glukoz bakımından zengin hidrolizatların kullanıldığı 96 saatlik kesikli-beslemeli fermentasyon prosesi sonucunda, sırasıyla 0,47, 0,42 ve 0,48 g/g verimle 144,5, 135,4 ve 138,8 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiştir.

Zhang *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışmada, 2,3-BD üretimini teşvik etmek için Quarum algılama (QS) sistemini etkinleştiren bir sinyal molekülü olarak asetik asidin etkisi araştırılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* W141'nin hücre yoğunluğu eşik konsantrasyonundan düşük olduğunda 2,3-BD üretimini gerçekleştiremediği bildirilmiştir. Fermentasyon ortamına 1,5 g/l asetik asit eklendiğinde 2,3-BD konsantrasyonu 3,01 +/- 0,04 g/l olarak tespit edilmiştir. Daha sonra, *S. cerevisiae* W141, *Acetobacter pasteurianus* ile optimum koşullar altında birlikte kültüre edildiği zaman, asetik asit üretimi, orijinal suşa ve 1,5 g/l asetik asit ile kültüre edilen suşa kıyasla sırasıyla %76,7 ve %30,6 artış göstermiş ve 2,3-BD veriminde %81,9 ve %3,3 oranında artış tespit edilmiştir.

Folle *et al.* (2023) tarafından yapılan çalışmada, *P. polymyxa* ATCC 842 ile optik olarak aktif (R,R)-2,3-BD üretiminde farklı ortam bileşiminde ve iki hava akışında (0,2 veya 0,5 vvm)

bir organik nitrojen ve vitamin kaynağı olarak ticari bir ham maya özütü Nucel'in (R) kullanımı araştırılmıştır. 0,2 vvm'lik hava akımı (deney R6) ile gerçekleştirilen ham maya ekstraktı ile formüle edilen ortam (M4), mikroorganizma gelişim süresinin kısalmasına olanak sağlamış ve toplam glukoz tüketimine kadar çözünmüş oksijen değerlerini düşük seviyelerde tutulmasını sağlamıştır. Bu nedenle, R6 deneyi, 0,5 vvm'lik hava akışında yürütülen standart ortamla (deney R1) karşılaştırıldığında %41 oranında daha iyi fermentasyon verimine neden olmuştur. R6'daki maksimum spesifik büyüme oranının daha düşük olduğu belirtilmiş, fakat nihai hücre konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. Ayrıca, fermentasyon ortamının (formüle edilmiş-M4 ve düşük hava akışı-0,2 vvm), kesikli-beslemeli kültürde (R,R)-2,3-BD üretimi için iyi bir alternatif olduğu rapor edilmiş ve 24 saatlik proses sonucunda 30 g/l metabolit üretimi gerçekleştirilmiştir.

Li *et al.* (2023) tarafından yapılan çalışmada, böcek bağırsağından izole edilen *K. pneumoniae* PX14 suşunun ön işlem görmemiş lignoselülozik biyokütle (LCB) üzerinde selüloz için %51.48, hemiselüloz için %62,13 ve lignin için %41,42 oranlarında degradasyon aktivitesi gösterdiği ve 3,26 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Bambu biyokütle içeren ortam üzerinde kültürlenen PX14'ün salgı proteinleri, ticari selülaz ile bir enzim kokteyli oluşturmak için ekstrakte edilmiştir. Elde edilen enzim kokteyli, ön işleme tabi tutulmamış LCB'nin verimli bir şekilde sakarifikasyonunu sağlayarak, 42,90 g/l konsantrasyonda indirgeyici şekerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bu yüksek şeker titresi ayrıca, optimizasyon işlemlerinden sonra PX14 tarafından 19,11 g/l 2,3-BD'ye dönüştürülmüştür. Enzim kokteylinin, ön işlem görmemiş LCB'den eşzamanlı olarak sakkarifikasyon ve 2,3-BD fermentasyonunda ilk kez uygulandığı rapor edilmiştir. Kesikli-beslemeli fermentasyon prosesi sonucunda, PX14'ün yüksek substrat konsantrasyonu toleransı sayesinde 0,36 g/l/s üretkenlik ile 47,46 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiştir.

Sheng *et al.* (2023) tarafından yapılan çalışmada, ticari uygulamalara sahip organik bileşikler olan 3 hidroksibutanon (asetoin) ve 2,3-BD fermentasyon prosesleri için rekombinant termofilik olan *Parageobacillus thermoglucosidasius* NCIMB 11955 suşu kullanılmıştır. Heterolog asetolaktat sentaz (ALS) ve asetolaktat dekarboksilaz (ALD) enzimleri kullanılarak fonksiyonel bir 2,3-BD biyosentetik yolağı tasarlanmıştır. Yan ürünlerin oluşumu, diğer metabolik yolların delesyonuyla en aza indirilmiştir. 6,6 g/l 2,3-BD (0,33 g/g glukoz) baskın fermentasyon metaboliti olarak elde edilmiştir. Ayrıca, Delta acoB1 mutantının elde edilmesi yoluyla ve glukoz konsantrasyonunun 2,3-BD üretimi üzerindeki etkisini test ederek, %5 glukoz ile desteklenmiş fermentasyon ortamında 15,6 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiştir.

Suttikul *et al.* (2023) *B. subtilis* GD5'in optimize edilmiş sükroz bazlı fermentasyon ortamında 2,3-BD üretme yeteneğini ve fermentasyon verimine karbon nitrojen (C/N) oranının etkisi ile alternatif düşük maliyetli nitrojen kaynaklarının (mısır maserasyon sıvısı, soya fasulyesi küspesi ve amonyum sülfat) etkisini araştırmıştır. Toplu biyoreaktör fermentasyonlarında farklı çözünmüş oksijen (DO) konsantrasyonları değerlendirilmiştir. DO kontrol edilmeden gerçekleştirilen fermentasyon proseslerinde en iyi üretim 5,88 g/l olarak belirlenmiştir. 2,3-BD üretimini artırmak için en uygun DO koşulları altında kesikli-beslemeli proses gerçekleştirilmiş ve 0,52 g/g üretim verimi ile 42,31 g/l 2,3-BD elde edilmiştir.

Tinoco ve Freire (2023) tarafından yapılan çalışmada, mikroaerobik koşulları sağlamak için oksijen transfer hızını (OTR) sabit ve 1,68 mmolO_2/l/h'nin altında tutarak, 70 l'lik bir pilot biyoreaktörde *P. peoriae* NRRL BD-62 suşu ile 2,3-BD üretimi amaçlanmıştır. 0,90 g/l/s üretkenlik ve 0,40 g/g verim ile üretim gerçekleştirilmiştir. 26 saatlik fermentasyon sonucunda asetoin birikimi tespit edilmemiş ve yaklaşık %98'lik bir levo-2,3-BD optik saflığı elde edilmiştir.

Vikromvarasiri *et al.* (2023) tarafından yapılan çalışmada, *B. subtilis* ile 2,3-BD üretiminde fermentasyon verimini artırmak için tek seviyeli FBA ve OptKnock yöntemlerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Tek seviyeli FBA, ackA, pta, lctE ve mmgA delesyonunun gliserolden 2,3-BD üretimini artıracağını göstermiştir. Tek seviyeli FBA, *B. subtilis*'te 2,3-BD verimini artırmak için metabolik tasarım ve manipülasyonun etkili bir yaklaşım olduğunu göstermiş, bu yaklaşım ile suşların fenotiplerinin yüksek hassasiyetle tahmin edilebileceği ortaya konmuştur.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Tablo 2. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Cihazlar	Marka/Model
Otoklav	HMC Hirayama
Çalkalamalı inkübatör	ZHWY 2102C
Saf su cihazı	Barnstead EASYpure UV/UF
Spektrofotometre	Beckman Coulter
PCR Cihazı	Senso Quest-Labcycler
Jel Görüntüleme Sistemi	VILBER LOURMAT-Quantum
Nanodrop	Thermo – MultiscanGo
Steril kabin	Telstar Bio-II-A
Magnetik karıştırıcı	Heidolph
İnkübatör	Thermo
Vorteks	Wisemix VM-10
Santrifüj	Hettich Mikro 220 R
Su banyosu	Memmert WNB14
-86°C Dondurucu	Glacier Ultralow Freezer
GC-MS	Shimadzu QP2010 ULTRA
pH Metre	Mettler Toledo - SevenCompact

Tablo 3. Tez Çalışmasında Kullanılan Besiyerleri, Kitler ve Kimyasallar

Kimyasal Adı	Marka
TSA (Tryptic Soy Agar)	Sigma-Aldrich
TSB (Tryptic Soy Broth)	Sigma-Aldrich
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	Promega
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems	Promega
pGEM- T- Easy Vector System	Promega
Agaroz	Sigma-Aldrich
Lizozim	Sigma-Aldrich
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich

Tablo 3. (devamı)

TAE Buffer	Sigma-Aldrich
Xgal	Sigma-Aldrich
IPTG	Sigma-Aldrich
Amfisilin	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür (NaCI)	Merck
Klasiyum Klorür ($CaCI_2$)	Merck
Potasyum Hidroksit (KOH)	Merck
DNA Marker	Sigma-Aldrich
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich
Etidyum Bromür (EtBr)	Sigma-Aldrich
6X Yükleme Tamponu	Sigma-Aldrich
dNTP	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Kristal Violet	Merck
Safranin	Merck
Lügol	Merck
Malaşit Yeşili	Merck
İmmersiyon Yağı	Sigma-Aldrich
Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	Sigma-Aldrich
Oksidaz Test Kiti	Sigma-Aldrich
Alfa Naftol	Sigma-Aldrich
Sodyum Aljinat	Sigma-Aldrich
Etil asetat	Sigma-Aldrich

Kullanılan çözeltiler

%5 Alfa naftol çözeltisi

Voges-Proskauer testinde kullanılmak üzere, 5 g alfa naftol alınarak 100 ml saf etanol içerisinde çözünmesi ile elde edildi.

%40 potasyum hidroksit çözeltisi

40 g potasyum hidroksitin 100 ml saf su içerisinde çözünmesi ile elde edildi.

50 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisi

1,46 g EDTA alınarak 100 mL saf su içerisinde çözündürüldü ve pH‟sı 8‟e tamamlandı.

Lizozim çözeltisi

DNA izolasyonunda kullanılmak üzere, 10 mg/ml olacak şekilde steril saf su içerisinde hazırlandı.

Amfisilin çözeltisi

Klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere, 20 mg/ml olacak şekilde steril saf su ile hazırlandı. 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek, steril edildi. Kullanılıncaya kadar, -20°C'de muhafaza edildi.

X-Gal çözeltisi

40 mg X-gal 1 ml dimetilformamid içerisinde çözündürüldü. Işık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılarak, -20°C'de muhafaza edildi.

IPTG çözeltisi

IPTG çözeltisi son konsantrasyonu 23,8 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Bu amaçla 23,8 mg IPTG, 1 ml saf suda çözdürülerek, 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirildi. Daha sonra kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

1XTAE tamponu

Agaroz jel elektroforez deneylerinde yürütme tamponu olarak kullanılmak üzere, 20 ml 50XTAE tamponundan alındı ve hacmi saf su 1000 ml'ye tamamlandı.

100 mM kalsiyum klorür çözeltisi

1,11 g $CaCl_2$ 100 ml saf su içinde çözünmesi ile elde edildi. Hazırlanan çözeltinin ağzı pamukla kapatılarak otoklavlandı ve kullanılıncaya kadar buzdolabında (+4°C) muhafaza edildi.

%0,9 NaCl çözeltisi

Bakterilerin izolasyonunda kullanılmak üzere, 0,9 g NaCl 100 ml saf su içerisinde çözünmesi ile elde edildi.

Kristal violet çözeltisi

2 g kristal violet 20 ml %96'lık etanolde çözündürüldü ve son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Safranin çözeltisi

1 g safranin 10 ml %96'lık etanolde çözündürüldü ve son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

%3 sodyum aljinat çözeltisi

İmmobilizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, 3 g sodyum aljinat 100 ml saf su içerisinde çözünmesi ile edildi.

%2,5 kalsiyum klorür çözeltisi

25 g $CaCl_2$ 1000 ml saf su içerisinde çözünmesi ile elde edildi.

Örnek toplanması

Farklı toprak ve kaplıca suyu örnekleri (tarla toprağı, orman altı toprağı, pasinler ve ılıca kaplıca suları) aseptik koşullarda laboratuvar ortamına getirildi ve izolasyon çalışmalarında kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Çalışmada kullanılan melasın kimyasal içeriğinin belirlenmesi

Erzurum Şeker Fabrikasından temin edilen melasın şeker içeriği Fenol-Sülfürik Asit Yöntemi kullanılarak sükroz standardına göre belirlendi (Dubois et al. 1956). Toplam azot içeriğinin tespit edilmesinde micro-Kjeldahl cihazı kullanıldı ve belirlenen azot içeriğinin 6,25 faktörüyle çarpılmasıyla toplam protein içeriği tespit edildi. Kül içeriği ise kuru numunenin kül fırınında yakılması sonucu belirlendi. Melasın pH değeri pH metre kullanılarak ölçüldü.

2,3-Bütandiol üreten mikroorganizmaların izolasyonu

2,3-Bütandiol üretme potansiyeli olan mikroorganizmaların izolasyonu aerobik koşullarda ve karbon kaynağı olarak melasın bulunduğu besiyeri ortamı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla, toprak örneklerinden 1 g alındı ve %0,9'luk fizyolojik steril su (%0,9 NaCl) kullanılarak bir seri dilüsyon (10^{-1}-10^{-7}) hazırlandı. Her bir dilüsyondan 100 µl alınarak melas bazlı agar besiyerine yayma ekim yöntemiyle inoküle edilerek farklı sıcaklıklarda (40-60 ºC) 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Kaplıca suyu örneklerinde ise, steril ağzı kapalı şişeler içerisinde alınan su örneklerine TSB (Tripton Soya Broth) besiyeri eklendi ve 40-60°C'de çalkalamalı inkübatörde 24-48 saat süre boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında dilüsyon serileri hazırlanıp, her bir dilüsyondan 100 µl örnek melas bazlı agar besiyerine inoküle edilerek farklı sıcaklıklarda (40-60 ºC) 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda gelişen kolonilerden hücre ve koloni morfolojisi bakımından farklı olduğu düşünülen izolatlar seçildi. TSA besiyerine 3 faz çizgi ekim yapılarak

55°C'de inkübasyona bırakıldı. Saflaştırılan kolonilerin uzun süreli muhafazası için, stok kültürler hazırlandı ve kullanılıncaya kadar (-86 ºC) muhafaza edildi.

İzolatların Voges–Proskauer testi

2,3-Bütandiol üretme potansiyeli olan izolatları belirlemek amacıyla metabolik yolaktaki asetoin tespiti için kullanılan Voges–Proskauer (VP) testi uygulandı. Bu amaçla, izolatların saf kültürleri glukoz (5 g/l), pepton (7 g/l) ve dipotasyum fosfat (5 g/l) içeren besiyeri ortamına inoküle edildi ve örnekler çalkalamalı inkübatörde 55 ºC'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, örneklere sırasıyla 6 damla %6'lık alfa naftol ve 2 damla %40'lık potasyum hidroksit çözeltisi eklenip iyice homojenize olması sağlandı. 30 dakika içerisinde örneklerde renk değişimi gözlendi. VP testi pozitif çıkan izolatlar 2,3-Bütandiol üretme potansiyeli olan mikroorganizmalar olarak seçildi.

Pozitif izolatların 2,3-Bütandiol fermentasyonu ve GC-MS analizleri

VP testi pozitif olan izolatların TSB besiyerinde ön kültürleri hazırlandı. OD (600nm) 1.0 değerine ulaşan ön kültürlerden 1 ml alınarak karbon kaynağı olarak melas içeren 100 ml'lik fermentasyon ortamına (melas 25 ml/l, pepton 5 g/l, pH 7,0) inoküle edildi ve 55 ºC'de 36 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında fermentasyon ortamından örnek alınarak 2,3-Bütandiol tayini için GC-MS analizine gönderildi.

En yüksek 2,3-Bütandiol verimine sahip olan izolatın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin araştırılması

Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Gram boyama

İzolatın Gram özelliklerinin belirlenmesinde, temiz bir lam üzerine, taze bakteri kültüründen (24 saatlik) alınarak smear preparat hazırlandı. Preparat kristal violet boyası ile 1 dk boyunca muamele ediltikten sonra, saf su ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı. Preparatın üzerine boyanın nüfuz etmesini sağlamak amacıyla lügol eklendi ve 1 dk bekletildi. Sonrasında, %96'lık etil alkol ile 15-20 saniye boyunca yıkandı. Saf sudan geçirilen preparat, safranin ile 30-45 saniye muamele edildi ve saf su ile hafif bir şekilde yıkandı. İşlemler sonrasında preparat kurutularak, immersiyon yağı ile 100X'lik objektifte mikroskobik inceleme yapıldı.

Endospor boyama

Endospor varlığını tespit etmek amacıyla, izolat TSA besiyerine inoküle edildi ve 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, petrilerde gelişen bakteri izolatları çeşitli stres şartlarına (sıcak-soğuk, yaşlanma ve kuruma) maruz bırakıldı. Daha sonra,

kültürden örnek alınarak temiz lam üzerinde smear hazırlandı ve kaynayan su banyosu üzerine konuldu. Preparatın malaşit yeşili boyası ile tamamen boyanması sağlandı ve üzerine kurutma kağıdı yerleştirildi. Kurutma kağıdının sürekli ıslak kalması sağlanarak boyama işlemine 5 dk boyunca devam edildi. Sonrasında, kurutma kağıdı uzaklaştırıldı ve preparat saf su ile yıkandı. Ardından, preparat safranin boyası ile 20-30 saniye muamele edildi ve saf su ile hafifçe yıkandı. İşlemler sonrasına preparat kurutularak, endospor varlığı mikroskobik incelemelerle tespit edildi.

Hareketlilik testi

Hareketlilik testi için izolat, TSB + %0,6"lık agar içeren tüplere iğne öze yardımıyla inoküle edilip, 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Tüplerde oluşan ekim çizgisine göre gelişim durumu incelenerek izolatın hareketlilik durumu belirlendi.

Fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi

İzolatın gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi

İzolatın büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla TSB besiyeri kullanıldı. İzolat sıvı besiyerlerine inoküle edildi ve farklı sıcaklıklarda (15°C, 25°C, 35°C, 45°C, 55°C ve 55°C) çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda spektrofotometrede (OD600) ölçümler alınarak, izolatların optimum, maksimum ve minimum büyüme sıcaklıkları tespit edildi.

İzolatın gelişebildiği pH aralıklarının belirlenmesi

İzolatın gelişebildiği pH aralıklarının belirlenmesi amacıyla farklı pH değerlerinde (pH:4-11) TSB besiyerleri hazırlandı. İzolat hazırlanan besiyerlerine inoküle edildi ve örnekler çalkalamalı inkübatörde 48 saat süre boyunca inkübe edildi. Süre sonunda izolatın üreyebildiği minimum ve maksimum pH değerleri spektrofotometre (OD600) kullanılarak belirlendi.

İzolatın gelişebildiği tuz konsantrasyonunun belirlenmesi

İzolatın gelişebildiği tuz aralıklarının belirlenmesinde, farklı tuz konsantrasyonlarında (%2, %4, %6, %8, %10 ve %12) TSB besiyerleri hazırlandı. Hazırlanan besiyerlerine izolat inoküle edildi ve örnekler çalkalamalı inkübatörde 48 saat süre boyunca inkübe edildi. Süre sonunda izolatın üreyebildiği minimum ve maksimum tuz konsantrasyon değerleri spektrofotometre (OD600) kullanılarak belirlendi.

Biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Katalaz testi

Katalaz enzimi, hidrojen peroksitin (H_2O_2), H_2O ve O_2 gazına dönüşümünü katalizler. Reaksiyon sonucunda oluşan O_2 gazı kabarcık oluşumuna neden olur. Katalaz testi için TSA besiyerinde geliştirilen taze bakteri kültüründen (24-48 saatlik) bir öze dolusu alındı ve lam üzerine konuldu. Bakteri kültürünün üzerine bir damla %3'lük H_2O_2 çözeltisi damlatıldı. Kabarcık oluşumunun gözlenmesi katalaz pozitif, oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirildi.

Oksidaz testi

İzolatın, sitokrom c proteinine sahip olup olmadığı oksidaz testi ile tespit edildi. Oksidaz testinde, organizmanın oksidaz enzimine sahip olması durumunda, enzimin reaksiyon girmesi sonucunda mavi renk oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu test için %1 tetra metil-p-fenilendiamin dihidroklorid içeren kitler kullanıldı. TSA besiyerinde geliştirilen 24-48 saatlik bakteri kültürünün üzerine 1 damla oksidaz sölüsyonu damlatıldı. Mavi renk oluşumunun gözlenmesi oksidaz pozitif, renk değişiminin gözlenmemesi ise oksidaz negatif olarak değerlendirildi.

İzolatın moleküler identifikasyonu

En yüksek 2,3-BD üretimi gerçekleştirilen BD43 kodlu izolatın moleküler olarak identifikasyonu yapıldı. Bu amaçla, 16S rRNA bölgesi klonlarak dizi analizi yapıldı.

16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

Genomik DNA izolasyonu

En yüksek 2,3-Bütandiol verimine sahip olan izolat, TSA besiyerine çizgi ekim yöntemi ile inoküle edilerek 55 ºC'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Petrilerde gelişen mikroorganizmalardan saf koloni alınarak, TSB besiyeri içeren 100 ml'lik erlene inoküle edildi. Kültür çalkalamalı inkübatörde 55°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Sonrasında, gelişen izolata ait DNA örnekleri, Promega WizardR Genomic DNA Purification Kiti (A2360) kullanılarak, üretici firma protokolüne uygun olarak izole edildi.

16S rRNA PCR işlemi

16S rRNA gen bölgesi evrimsel açıdan korunmuş bölge olma özelliği taşımaktadır ve bakteri sistematiği açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla, 16S rRNA gen bölgesi hedef bölge olarak seçildi ve evrensel primerler kullanılarak in vitro koşullarda amplifiye edildi. PCR işlemi

yapılacak her bir örnek için 30 µl'lik reaksiyon tüpleri hazırlandı. Tüpler içerisinde 14,1 µl steril saf su, 3 µl 10X PCR tamponu, 1,8 µl $MgCl_2$, 0,6 µl dNTPs, 0,3 µl 50 µM primer 27F (forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'), 0,3 µl 50 µM primer 1492R (reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3'), 1,2 µl DMSO ve 0,3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz ile 25 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışıma 3µl kalıp DNA (100 ng) eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlandı. PCR reaksiyonu için Tablo 4'deki PCR protokolü uygulandı. Amplifikasyon sonrasında, 5 µl PCR ürünü %1'lik jel elektroforezi ile analiz edildi (Adiguzel 2006).

Tablo 4. 16S rRNA PCR Protokolü

İşlem	Sıcaklık (ºC)	SÜRE (dk)	DÖNGÜ SAYISI
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Primerin Bağlanması	52	1	36
Uzama	72	2	36
Son Uzama	72	5	1
Saklama	4	∞	

Kompetent hücrenin hazırlanması

16S rRNA gen bölgesi amplifiye edildikten sonra, klonlama proseslerinde kullanılmak üzere kompetent hücre hazırlandı. Bu amaçla, *Escherichia coli* JM101 suşu kullanıldı (Adıgüzel 2006; Adıgüzel 2008).

Ligasyon işlemi

Amplifiye edilen PCR ürünleri ligasyon işlemi ile pGEM®-T Easy (Promega) vektörüne aktarıldı. Ligasyon işlemi için 1 µl vektör, 1 µl T4 DNA ligaz, 3 µl PCR ürünü ve 5 µl 2X ligasyon buffer kullanıldı. 0,2 ml'lik tüplerde bir araya getirilen karışım 16°C'de 14 saat bekletildikten sonra, kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Transformasyon işlemi

Ligasyon işlemi sonrasında, amplifiye edilen gen bölgesini taşıyan vektörler transformasyon işlemi ile ısı şok yöntemi kullanılarak kompetent bakterilere aktarıldı. Ardından, bakteriler X-gal, IPTG ve amfisilin içeren LB agar besiyerlerine yayma ekim yöntemiyle inoküle edilerek 37°C'de 12-14 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

Koloni seçme ve sıvı kültüre alma

İnkübasyon sonrasında, petrilerde mavi-beyaz koloni taraması yapıldı. Beyaz koloniler geni ihtiva eden pozitif koloniler olarak seçildi ve amfisilinli LB broth besiyerlerine inoküle edilerek, inkübasyona bırakıldı.

Koloni PCR için Hazırlık ve PCR reaksiyonu

Pozitif olarak seçilen koloniler steril swap çubuk ile alınarak PCR reaksiyon tüplerine aktarıldı. Her bir reaksiyon tüpünde 16,1 µl dH_2O, 3 µl tampon ($MgCl_2$'li), 0,6 µl dNTP mix, 1,8 µl $MgCl_2$ (25mM), 2 µl 5 µM **T7** (5'-AATACGACTCACTATAG–3'), 2 µl 5 µM **SP6** (5'–ATTTAGGTGACACTATAG–3'), 0,3 µl Taq DNA polimeraz ve 1,2 µl DMSO karışımı hazırlandı. Koloni PCR için Tablo 5'teki PCR protokolü uygulandı. Reaksiyon sonrasında 5 µl PCR ürünü %1'lik jel elektroforezi ile analiz edildi.

Tablo 5. Koloni PCR protokolü

İşlem	Sıcaklık (ºC)	SÜRE (sn, dk)	DÖNGÜ SAYISI
Ön Denatürasyon	94	10 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	35
Bağlanma	55	30 sn	35
Uzama	72	2 dk	35
Uzama	72	10 dk	1
Saklama	4	∞	

Plazmit izolasyonu, kontrolü ve konsantrasyonlarının ölçümü

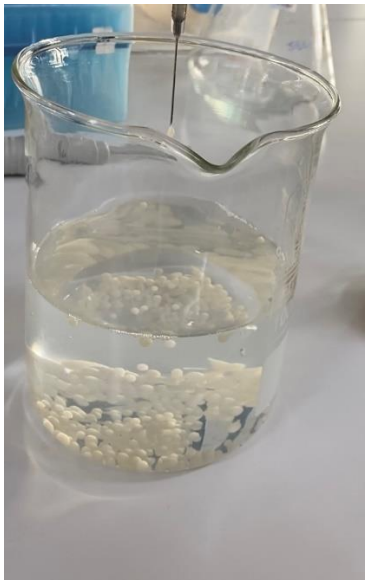
BD43 suşuna ait Plazmit izolasyonu Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, A1330) kiti kullanılarak firmanın prosedürü doğrultusunda gerçekleştirildi. İzole edilen plazmidin konsantrasyonu >100 ng/µl olacak şekilde nanodrop cihazı (Thermo Scientific, Multiskan GO, USA) ile ayarlandı ve sekans analizinin yapılması için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi.

DNA dizi analiz sonuçlarının işlenmesi ve değerlendirilmesi

Macrogenden alınan sekans sonuçları, BioEdit programı ile analiz edilerek, FASTA formatına çevrildi. Sonrasında, primer içeren bölgeler ve tekrar dizileri tespit edilerek sekanslar anlamlı hale getirildi. Anlamlı hale getirilen sekans verileri http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch ve http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify internet adresleri kullanılarak izolatın tür düzeyinde tanılaması yapıldı.

İmmobilize bakteri hücrelerinin hazırlanması

İmmobilize edilmiş bakteri hücrelerinin hazırlanmasında 2 litre TSB besiyeri kullanıldı. 2 litre besiyeri 10 adet 500 ml'lik erlenlere her erlende 200 ml besiyeri olacak şekilde bölündü ve otoklavlandı. BD43 kodlu izolatın ön kültürü her besiyerine inoküle edildi ve çalkalamalı inkübatörde 55 ºC'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, gelişen bakteri kültürünün tamamı 5000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, bakteri hücreleri steril fizyolojik su ile yıkanarak immobilize hücre yataklarının hazırlanması için kullanıldı. İmmobilize hücre hazırlanması işlemi 3 farklı beherde gerçekleştirildi. İlk beherde 100 ml steril fizyolojik su içinde %3'lük sodyum aljinat çözeltisi hazırlandı. Sodyum aljinat matriksinin daha iyi çözünmesi için su banyosu içerisinde sıcaklık uygulaması yapıldı. İkinci beherde yaklaşık 20 g ıslak bakteri hücresi 100 ml steril fizyolojik su içerisinde çözüldü. Üçüncü beherde ise 25 g kalsiyum klorür 1 litre saf suda çözülerek % 2.5'lik çözelti hazırlandı. Beherler içerisindeki çözeltiler hazırlandıktan sonra, ikinci beherdeki mikroorganizma süspansiyonu birinci behere aktarılıp bakteri hücrelerinin matrisle iyice homojenize olması sağlandı. Ardından, birinci beherdeki bakteri hücresi+matriks çözeltisi (200 mL) steril enjektörle çekilerek üçüncü beherdeki kalsiyum klorür çözeltisine 5-10 cm yükseklikten damlalar halinde bırakıldı. Üçüncü beherde oluşan yatakların iyice sertleşmesi amacıyla yataklar 20 dk süre boyunca çözelti içerisinde bekletildi. Sonuç olarak, 60 g immobilize hücre elde edildi ve yaş hücre ağırlığı 20,4 g olarak belirlendi. Elde edilen yaklaşık 3 mm çaplı immobilize hücre yatakları steril fizyolojik su ile yıkanarak, kullanılıncaya kadar +4 ºCde muhafaza edildi (Taskin 2013; Aydogan et al. 2014; Arslan 2015).



Şekil 6. İmmobilize hücrelerin hazırlanması

İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminin optimizasyonu

İdentifikasyonu yapılan izolatın hücreleriyle hazırlanan immobilize hücreler ile 2,3-BD üretimini artırmak amacıyla steril olmayan (non-steril) fermentasyon koşullarında sıcaklık, pH, melas konsantrasyonu, yatak miktarı, yatak hacmi ve inkübasyon süresi parametreleri optimize edildi.

İmmobilize edilmiş hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum sıcaklığın belirlenmesi

Optimizasyon çalışmalarında ilk olarak optimum sıcaklık değeri belirlendi. Bu amaçla diğer kültür parametreleri sabit tutularak (25 ml/l melas, 5 g/l pepton, pH 7, 5 g yatak miktarı, 3 mm yatak hacmi ve 36 saat inkübasyon süresi) 40, 45, 50, 55, 60 ve 65 ºC'de ve steril olmayan koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon prosesleri ile farklı sıcaklık değerlerinin 2,3-BD üretimi üzerinde etkisi araştırıldı. Prosesler sonucunda kültürlerin 2,3-BD analizleri yapılarak optimum sıcaklık değeri belirlendi.

İmmobilize edilmiş hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum pH'ın belirlenmesi

Belirlenen optimum sıcaklık değerinde, diğer kültür parametreleri sabit tutularak (25 ml/l melas, 5 g/l pepton, 5 g yatak miktarı, 3 mm yatak hacmi ve 36 saat inkübasyon süresi) fermentasyon prosesi için farklı pH değerlerine (pH 4-9) sahip besiyerleri hazırlanıp immobilize hücrelerle inoküle edildikten sonra inkübasyona bırakıldı. Fermentasyon sonucunda, üretim ortamlarındaki 2,3-BD analizleri yapılarak optimum pH değeri tespit edildi.

İmmobilize edilmiş hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum melas konsantrasyonunun belirlenmesi

Belirlenen optimum sıcaklık ve pH değerinde diğer kültür parametleri sabit tutularak (5 g/l pepton, 5 g yatak miktarı, 3 mm yatak hacmi ve 36 saat inkübasyon süresi) 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 ml/l melas konsantrasyonlarının 2,3-BD üretimi üzerindeki etkisi araştırıldı. Prosesler sonucunda, 2,3-BD analizlerinin yapılmasının ardından optimum melas konsantrasyonu belirlendi.

İmmobilize edilmiş hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum yatak miktarının belirlenmesi

Optimum yatak miktarını belirlemek için, en uygun sıcaklık, pH ve melas konsantrasyonunda diğer kültür parametreleri sabit tutularak (5 g/l pepton, 3 mm yatak hacmi ve 36 saat inkübasyon süresi) 5, 10, 15 ve 20 g yatak miktarlarının 2,3-BD fermentasyonuna

etkisi incelendi. Fermentasyon sonucunda, 2,3-BD analizleri yapılarak optimum yatak miktarı tespit edildi.

İmmobilize edilmiş hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum yatak hacminin belirlenmesi

Önceden belirlenen parametrelerin optimum koşullarında, pepton konsantrasyonu (5 g/l) ve inkübasyon süresi sabit tutularak (36 saat) 3, 5 ve 7,5 mm yatak hacmine sahip immobilize hücrelerin 2,3-BD üretimine etkisi araştırıldı. Prosesler sonucunda, metabolitin analizi yapılarak optimum yatak hacmi belirlendi.

İmmobilize edilmiş hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi

Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla önceden belirlenen optimum kültür parametlerinde ve 5 g/l pepton konsantrasyonunda farklı inkübasyon sürelerinin (12, 24, 36, 48 ve 60 saat) 2,3-BD üretimine etkisi araştırıldı. Fermentasyon prosesleri sonucunda, 2,3-BD analizleri yapıldı ve optimum inkübasyon süresi belirlendi.

Serbest hücreler ile 2,3-BD üretiminde optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi

Önceden belirlenen optimum kültür parametlerinde ve 5 g/l pepton konsantrasyonunda farklı inkübasyon sürelerinin (12, 24, 36, 48 ve 60 saat) 2,3-BD üretimine etkisi araştırıldı. Bu amaçla, 5,01 g yaş bakteri hücresi 3 ml steril fizyolojik su ile homojenize edilerek 100 ml'lik fermentasyon ortamlarına inoküle edildi. Prosesler sonucunda, kültür ortamlarındaki 2,3-BD analizleri yapıldı ve optimum inkübasyon süresi belirlendi.

İmmobilize edilmiş hücrelerin tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması

Belirlen optimum koşullarda, immobilize edilmiş hücrelerin (yataklar) art arda kaç kez kullanılabileceği ve fermentasyon verimi üzerindeki etkisi araştırıldı.

Kültür ortamındaki kontaminasyon tespiti

Fermentasyon prosesleri sonucunda, kültür ortamından örnekler alınarak, seri dilüsyonlar (10^{-1}-10^{-5}) hazırlandı. Örnekler TSA ve NA (pH 5-8) besiyerlerine yayma ekim yöntemiyle inoküle edildi ve farklı sıcaklık derecelerinde (20, 25, 30, 35, 40 ve 45 ºC) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, petrilerde gelişen kolonilerin morfolojileri incelenerek, test izolatıyla karşılaştırılması yapıldı. Test izolatından farklı olduğu düşünülen kolonilerin mikroskobik incelemeriyle beraber biyokimyasal testleri yapıldı. Yapılan incelemeler sonucunda kültür ortamındaki kontaminasyon durumu belirlendi.

2,3-BD miktarının belirlenmesi

Optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon prosesi sonucunda, kültür ortamı 5000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi. Süpernatant kısım organik madde ekstraksiyonunda verimi artırmak için NaCI tuzu ile doygun hale getirildi (Backer et al. 2022). Doygun hale getirilen solüsyon hacimce 2 kat miktarda etil asetat ile muamele edildi (3 tekerrür) ve faz oluşumu gözlendi. Su fazı uzaklaştırıldıktan sonra organik madde fazı metabolit miktarını belirlemek için GC-MS analizine gönderildi (Han et al. 2022).



Şekil 7. Etil asetat ekstraksiyonu sonucu faz oluşumu

ARAŞTIRMA BULGULARI

Melasın Kimyasal İçeriğinin Belirlenmesi

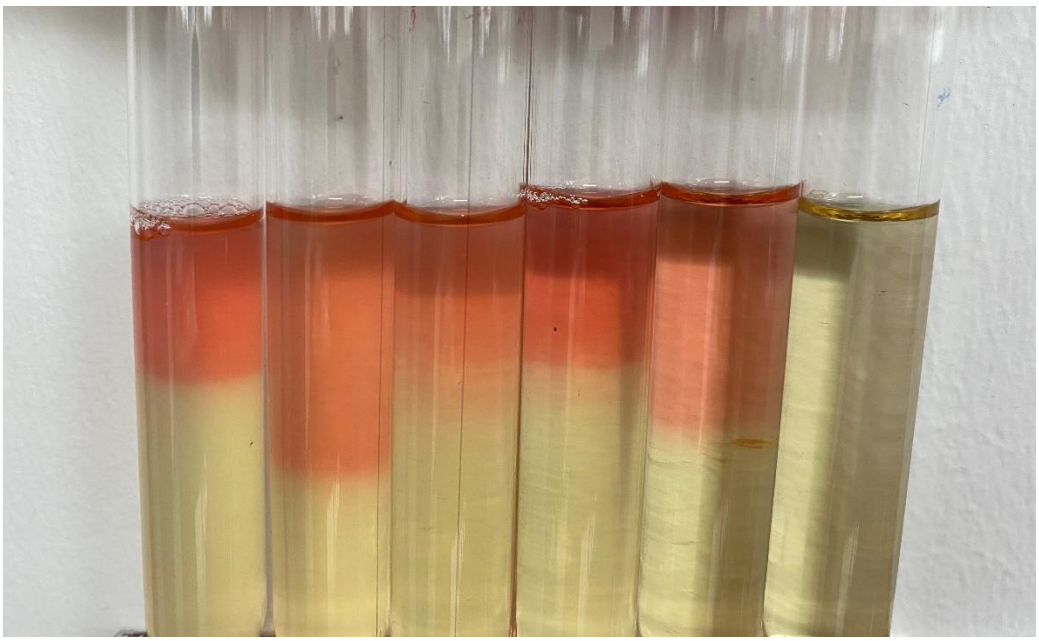
Melasın toplam şeker içeriği %48,3, toplam azot içeriği %1.7 ve pH değeri ise 8.2 olarak ölçüldü.

Tablo 6. Melasın Kimyasal İçeriği

Parametre	**Miktar/Seviye**
Toplam şeker	%48,3 (483 g/l)
Toplam azot	%1,7
Protein	%10,625 (106,25 g/l)
pH	8,2

2,3-BD Üretme Potansiyeli Olan Bakterilerin İzolasyonu

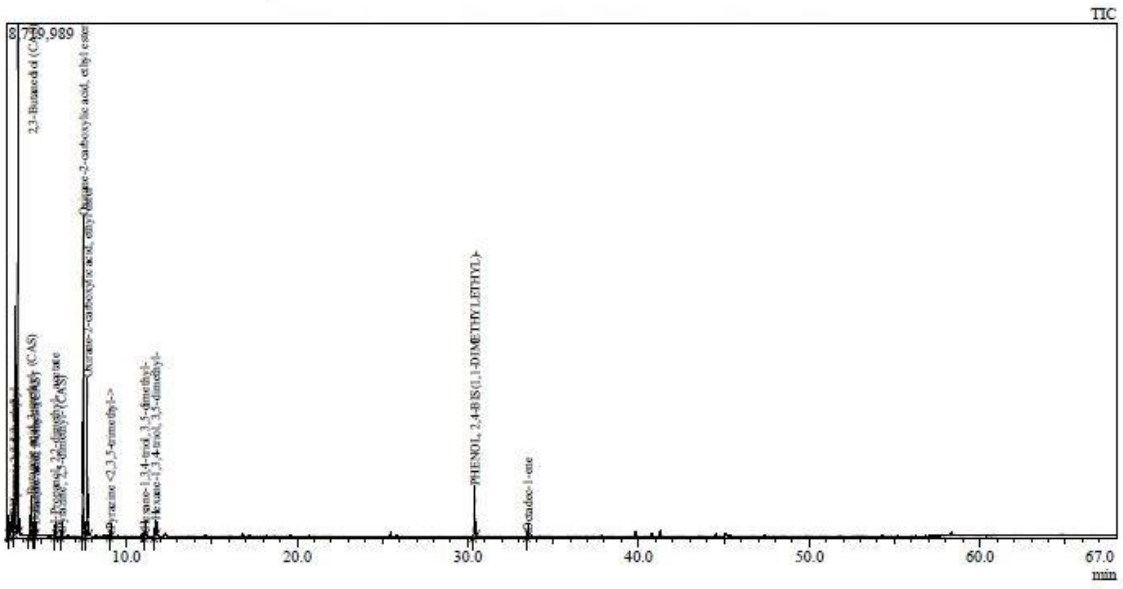
Bu çalışmada Erzurum ili ve çevresinden çeşitli toprak ve su örnekleri (tarla toprağı, orman altı toprağı, pasinler ve ılıca kaplıca suları) toplandı. Aseptik koşullarda laboratuvar ortamına getirilen örneklerden bakterilerin izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonucunda, toplam 52 adet bakteri izolatı elde edildi. İzolatlar arasından 2,3-Bütandiol üretme potansiyeli olan mikroorganizmaları belirlemek amacıyla asetoin tespitinde kullanılan VP testi uygulandı. VP testi sonucunda, 52 izolattan 17 tanesinin kırmızı renk oluşturduğu gözlendi ve bu izolatlar VP testi açısından pozitif ve potansiyel 2,3-BD üreticisi olarak değerlendirildi. Pozitif izolatlar arasında özellikle 5 izolatın daha yoğun renk oluşumu gösterdiği belirlendi. VP testi pozitif olan ve daha yoğun renk oluşumu gösteren izolatların GC-MS analizleri sonucunda en yüksek 2,3-BD verimine sahip olan bakteri seçilerek, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. Daha sonra, izolatın 16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi yapılarak moleküler düzeyde karakterizasyonu yapıldı. İdentifikasyonu yapılan izolatla gerçekleştirilen fermentasyon çalışmalarında üretilen metabolitin verimini artırmak amacıyla kültür parametrelerinin optimizasyonu yapıldı. Optimize edilen kültür koşullarında gerçekleştirilen fermentasyon prosesi sonucunda, 2,3-BD konsantrasyonu GC-MS analizleri ile tespit edildi.



Şekil 8. Voges-Proskauer testi sonucunda renk oluşumları

Tablo 7. İzolasyon Kaynakları ve İzolatların Kodları

İzolasyon kaynağı	**İzolat kodu**
Tarla toprağı 1	BD1-3
Tarla toprağı 2	BD4-5
Tarla toprağı 3	BD6-9
Tarla toprağı 4	BD10-12
Orman altı toprağı 1	BD13-15
Orman altı toprağı 2	BD16-18
Orman altı toprağı 3	BD19-23
Orman altı toprağı 4	BD24-26
Pasinler kaplıca suyu	BD27-37
Ilıca kaplıca suyu	BD38-52



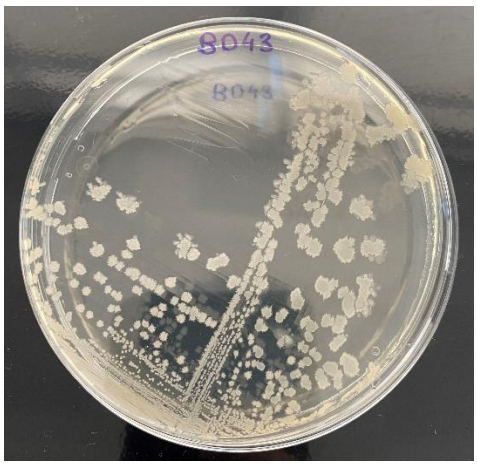
Peak Report TIC

Peak#	R. Time	Area	Area%	Height	Name
1	3.094	879760	1.51	346801	Propanoic acid, 2-methyl-
2	3.136	618270	1.06	283012	2-Hexene, 2,3-dimethyl-
3	3.636	24272116	41.63	8623908	2,3-Butanediol (CAS)
4	4.433	2904527	4.98	667454	Butanoic acid, 3-methyl- (CAS)
5	4.616	1128318	1.94	346010	Butyric acid <2-methyl->
6	4.650	304726	0.52	168121	Butanoic acid, 2-ethyl- (CAS)
7	5.814	403588	0.69	167244	1-Propanol, 2,2-dimethyl-, acetate
8	6.185	236951	0.41	91412	Pyrazine, 2,5-dimethyl- (CAS)
9	7.478	15384020	26.38	5412833	Oxirane-2-carboxylic acid, ethyl ester
10	7.709	7332770	12.58	2658567	Oxirane-2-carboxylic acid, ethyl ester
11	9.062	282731	0.48	97023	Pyrazine <2,3,5-trimethyl->
12	11.065	282088	0.48	89286	Hexane-1,3,4-triol, 3,5-dimethyl-
13	11.694	887725	1.52	259842	Hexane-1,3,4-triol, 3,5-dimethyl-
14	30.396	3132645	5.37	854059	PHENOL, 2,4-BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)-
15	33.499	259592	0.45	80312	Octadec-1-ene
		58309827	100.00	20145884	

Şekil 9. En yüksek 2,3-BD üretme potansiyeli olan izolatın GC-MS analizi sonucu

En yüksek 2,3-BD Verimine Sahip Olan İzolatın Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

GC-MS analizi sonucunda, en yüksek 2,3-BD verimine sahip olan bakteri izolatının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. Yapılan deneyler sonrasında, BD43 kodlu izolatın çubuk şeklinde, gram pozitif ve spor oluşturan bakteri izolatı olduğu tespit edildi. İzolatın gelişebildiği sıcaklık aralığı 35-65 ºC, pH aralığı 6-9 ve tuz konsantrasyonu aralığı %2-4 olarak belirlendi. Ayrıca, yapılan biyokimyasal testler sonucunda, izolatın katalaz ve oksidaz pozitif olduğu sonucuna varıldı.



Şekil 10. BD43 kodlu izolatın petri görüntüsü

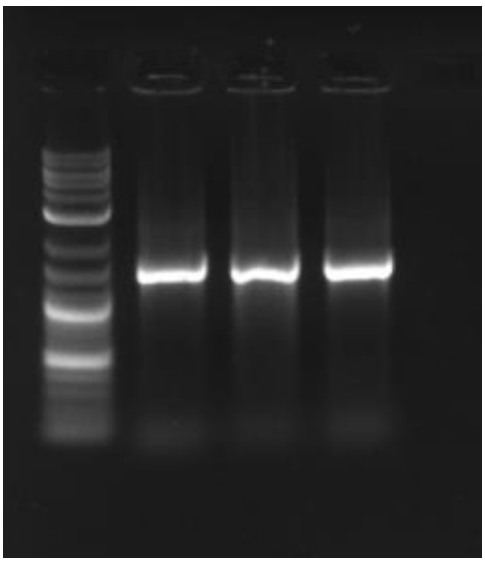
Tablo 8. BD43 Kodlu İzolatın Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

	BD43
Gram	+
Endospor	+
Katalaz	+
Oksidaz	+
Sıcaklık (ºC)	35-65
pH	6-9
Tuz (%)	2-4

BD43 Kodlu İzolatın Moleküler İdentifikasyonu

16S rRNA bölgesinin aplifiye edilmesi

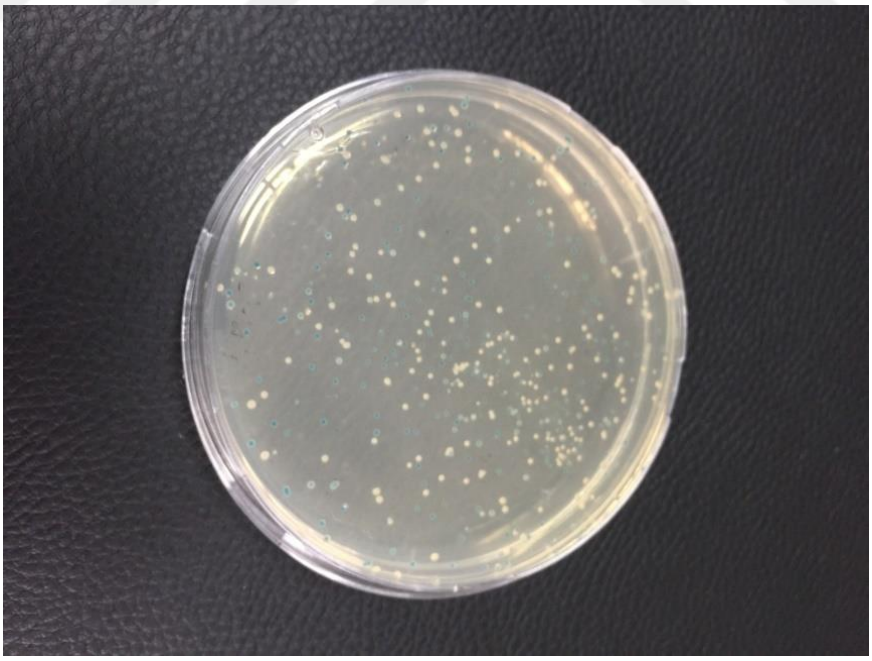
İzolatın DNA'sı ekstrakte edildi ve 16S rRNA gen bölgesi evrensel 27F ve 1492R primerleri kullanılarak PCR reaksiyonu ile amplifiye edildi. Reaksiyon sonrası, PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Yürütme sonrası görüntüleme yapılarak, 1500 bç büyüklüğünde tek bir bant gözlendi.



Şekil 11. 16S rRNA PCR jel görüntüsü

Amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

16S rRNA gen bölgesi amplifiye edildikten sonra uygun vektör sistemi kullanılarak klonlama aşamasına geçildi. Bu amaçla, ligasyon ve transformasyon işlemleri gerçekleştirildi. Ardından, bakteriler amfisilin, X-gal ve IPTG içeren petrilere yayma ekim yöntemiyle inoküle edilip, inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, petrilerde mavi-beyaz koloni oluşumu gözlendi.



Şekil 12. Transformasyon sonrası mavi-beyaz tarama

Koloni PCR ve plazmit izolasyonu

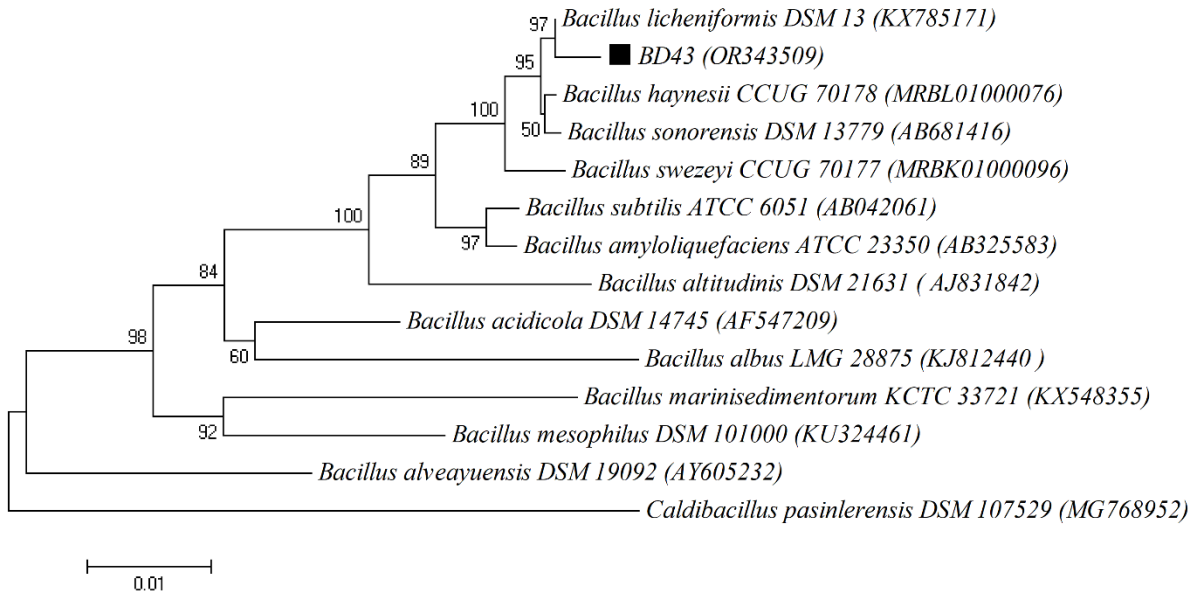
Beyaz kolonilerin ilgili gen bölgesini ihtiva ettiğini doğrulamak amacıyla koloni PCR yapıldı. PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra, 1500 bç'de bant veren koloniler seçildi. Seçilen koloniler plazmit izolasyonu için antibiyotikli besiyerine inoküle edilip, inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, pilazmit izolasyonu gerçekleştirilip, örnekler sekans analizi için Macrogen (Hollanda) firmasına gönderildi.

Sekans Analizi Sonuçları

Elde edilen 16S rRNA sekans verileri anlamlı hale getirirek GenBank'ta yer alan diğer bakteriyal 16S rRNA gen dizileri ile mukayese edildi. Analizler sonucunda izolatın türü ve benzerlik oranı belirlendi.

Tablo 9. İzolatın 16S rRNA Dizi Analiz Sonucu

İzolat kodu	İzolat ismi	Benzerlik Oranı	Genbank Numarası
BD43	*Bacillus licheniformis*	%99	OR34350



Şekil 13. BD43 kodlu izolatın Neighbour-Joining yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı

İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminin Optimize Edilmesi

İmmobilize hücrelerle 2,3-BD üretimini artırmak için steril olmayan (non-steril) fermentasyon koşullarında optimum sıcaklık, pH, melas konsantrasyonu, yatak miktarı, yatak hacmi ve inkübasyon süresi değerleri belirlendi.

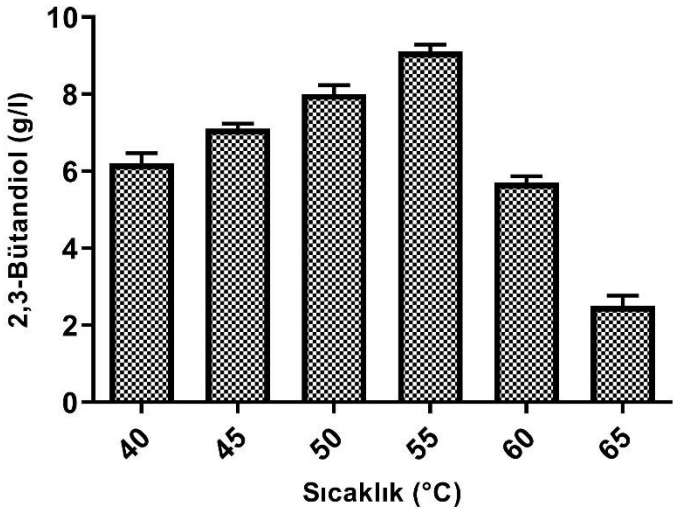
İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde sıcaklığın etkisi

Sıcaklığın 2,3-BD üretimine etkisini araştırmak amacıyla diğer parametreler sabit tutularak (25 ml/l melas, 5 g/l pepton, pH 7, 5 g yatak miktarı, 3 mm yatak hacmi ve 36 saat inkübasyon süresi) 40, 45, 50, 55, 60 ve 65 ºC'de gerçekleştirilen fermentasyon proseslerinin üretim verimine etkisi araştırıldı. Sonuçlar tablo 10 ve şekil 14'de gösterildi. Fermentasyon sonrası kültür ortamından alınan örneklerin analiz edilmesiyle, sıcaklığın 55 ºC'ye kadar artması 2,3-BD konsantrasyonunda olumlu etki gösterdi. En yüksek 2,3-BD konsantrasyonu 55 ºC'de 9,1 g/l olarak ölçüldü. Daha yüksek sıcaklık değerlerinde gerçekleşen proseslerde ise üretim veriminde düşüşler tespit edildi. Ayrıca, steril olmayan koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon proseslerinde kültür ortamındaki kontaminasyon varlığı araştırıldı. 40 ºC' de yoğun derecede kontaminasyon tespit edilirken, sıcaklığın artmasıyla beraber fermentasyon ortamındaki kontaminasyon azalış gösterdi, 60 ve 65 ºC'de ise herhangi bir kontaminasyon gözlemlenmedi. 2,3-BD fermentasyonunda optimum sıcaklık değeri 55 ºC olarak belirlendi.

Tablo 10. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık (ºC)	2,3-BD (g/l)	Kontaminasyon
40	6,2	+++
45	7,1	++
50	8,0	+
55	9,1	+
60	5,7	-
65	2,5	-

+++:Yoğun derecede kontaminasyon
++:Orta derecede kontaminasyon
+:Az derecede kontaminasyon



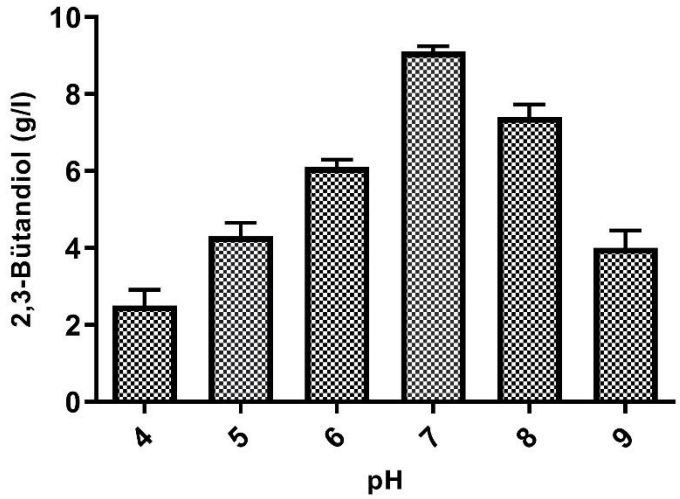
Şekil 14. İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde sıcaklığın etkisi

İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde pH'ın etkisi

Optimal değeri 55 ºC olarak belirlenmiş sıcaklıkta üretim besiyerlerinin pH'ı 4-10 olarak ayarlanıp diğer kültür parametreleri sabit tutularak (25 ml/l melas, 5 g/l pepton, 5 g yatak miktarı, 3 mm yatak hacmi ve 36 saat inkübasyon süresi) gerçekleştirilen proseslerde pH etkisi incelendi. Sonuçlar tablo 11 ve şekil 15'de gösterildi. Asidik pH değerlerinde düşük üretim verimleri elde edildi. Nötral pH değerlerine yaklaştıkça 2,3-BD konsantrasyonu artış gösterdi ve maksimum 9,1 g/l olarak pH 7'de elde edildi. Artan pH değerlerinde ise 2,3-BD konsantrasyonlarında düşüş belirlendi. Asidik (4 ve 5) ve bazik (9) pH değerlerinde kontaminasyon riski tespit edilmezken, pH 6, 7 ve 8'de az derecede kontaminasyon gözlendi. 2,3-BD konsantrasyonun maksimum olduğu pH 7, optimal değer olarak belirlendi.

Tablo 11. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde pH'ın Etkisi

pH	2,3-BD (g/l)	Kontaminasyon
4	2,5	-
5	4,3	-
6	6,1	+
7	9,1	+
8	7,4	+
9	4,0	-



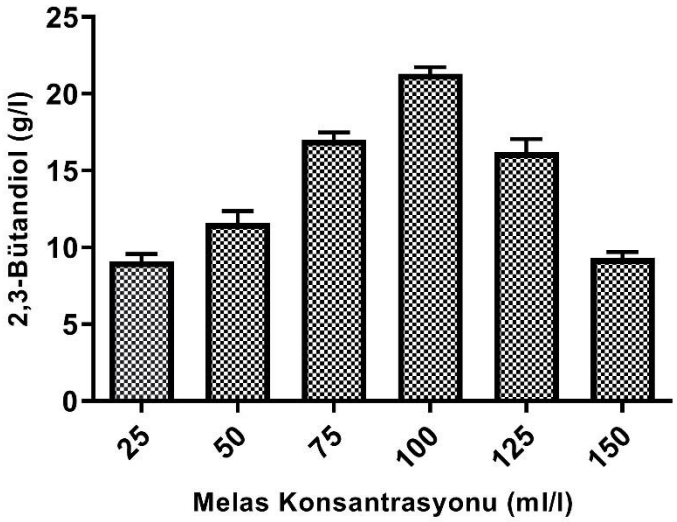
Şekil 15. İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde pH'ın etkisi

İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde melas konsantrasyonunun etkisi

Melas konsantrasyonun etkisini belirlemek için önceden belirlen optimum koşullarda (55 ºC ve pH 7) melas konsantrasyonları farklı olan (25, 50, 75, 100, 125 ve 150 ml/l) üretim besiyerleri hazırlandı ve diğer parametreler sabit tutularak (5 g/l pepton, 5 g yatak miktarı, 3 mm yatak hacmi ve 36 saat inkübasyon süresi) prosesler gerçekleştirildi. Sonuçlar tablo 12 ve şekil 16'da belirtildi. 100 ml/l' ye kadar kademeli olarak artan melas konsantrasyonlarında 2,3-BD üretiminde artış belirlendi. Maksimum üretim 100 ml/l melas konsantrasyonunda 21,3 g/l olarak tespit edildi. Öte yandan, 125 ve 150 ml/l melas içeren fermentasyon ortamlarında 2,3-BD konsantrasyonu kademeli olarak azaldı. Ayrıca, 100 ml/l'ye kadar artan melas konsantrasyonlarında (25, 50, 75 ve 100 ml/l) fermentasyon ortamında az derecede kontaminasyon gözlendi. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise kültür ortamında kontaminasyon tespit edilmedi. Çalışmanın diğer aşamalarında optimum melas konsantrasyonu 100 ml/l olarak belirlendi.

Tablo 12. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde Melas Konsantrasyonunun Etkisi

Melas Konsantrasyonu (ml/l)	2,3-BD (g/l)	Kontaminasyon
25	9,1	+
50	11,6	+
75	17,0	+
100	21,3	+
125	16,2	-
150	9,3	-



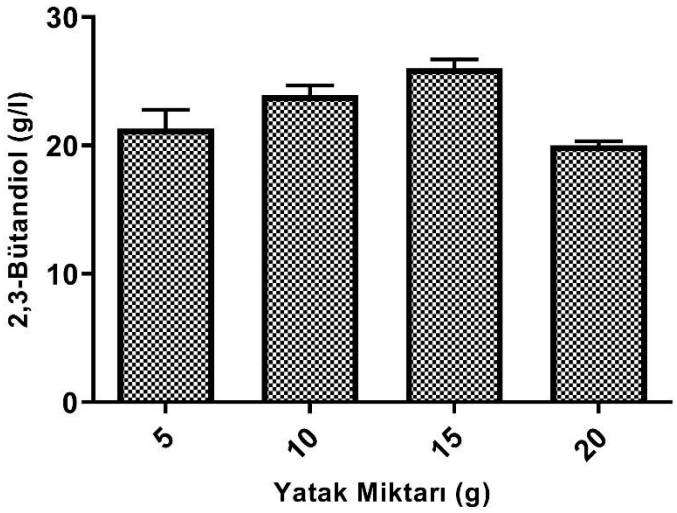
Şekil 16. İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde melas konsantrasyonunun etkisi

İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde yatak miktarının etkisi

Optimum kültür şartları için belirlenen 100 ml/l melas ve 5 g/l pepton konsantrasyonlarında pH'sı 7'ye ayarlanmış steril olmayan fermentasyon besiyerinde 55 ºC sıcaklıkta diğer kültür parametreleri sabit tutularak (3 mm yatak hacmi ve 36 saat inkübasyon süresi) farklı yatak miktarlarının (5, 10, 15 ve 20 g) 2,3-BD üretimine etkisi araştırıldı. Sonuçlar tablo 13 ve şekil 17'de belirtildi. Yatak miktarının 5'den 15'e kademeli olarak artırılmasıyla metabolit konsantrasyonunda artış gözlendi ve maksimum 2,3-BD konsantrasyonu 15 g yatak miktarıyla gerçekleştirilen proses sonucunda 26,0 g/l olarak tespit edildi. Bununla beraber, artan yatak miktarının kontaminasyon üzerindeki etkisi incelendiğinde 5 g yatak miktarında az derecede kontaminasyon belirlenirken, diğer yatak miktarıyla (10, 15 ve 20 g) gerçekleştirilen fermentasyonlarda kontaminasyon riski tespit edilmedi. 2,3-BD üretiminin maksimum olduğu 15 g optimal yatak miktarı olarak belirlendi.

Tablo 13. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde Yatak Miktarının Etkisi

Yatak Miktarı (g)	2,3-BD (g/l)	Kontaminasyon
5	21,3	+
10	23,9	-
15	26,0	-
20	20	-



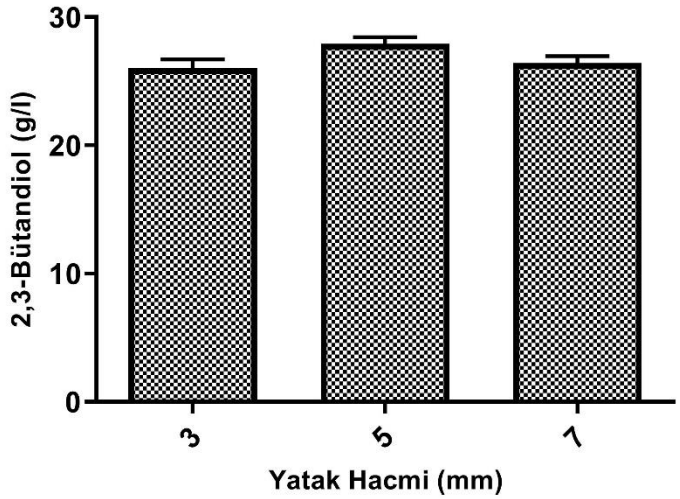
Şekil 17. İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde yatak miktarının etkisi

İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde yatak hacminin etkisi

Yatak hacminin 2,3-BD üretimine etkisini belirlemek amacıyla diğer kültür parametreleri sabit tutularak (55 ºC, pH 7, 100 ml/l melas ve 5 g/l pepton, 15 g yatak miktarı ve 36 saat inkübasyon süresi) farklı yatak hacimlerinin (3, 5 ve 7 mm) fermentasyon prosesine etkisi incelendi. Sonuçlar tablo 14 ve şekil 18'de belirtildi. Maksimum 2,3-BD üretimi 5 mm yatak hacminde 27,9 g/l olarak tespit edildi. Farklı yatak hacimlerinde gerçekleştirilen proseslerde kontaminasyon gözlenmedi. Optimal yatak hacmi 5 mm olarak belirlendi.

Tablo 14. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde Yatak Hacminin Etkisi

Yatak Hacmi (mm)	2,3-BD (g/l)	Kontaminasyon
3	26,0	-
5	27,9	-
7	26,4	-



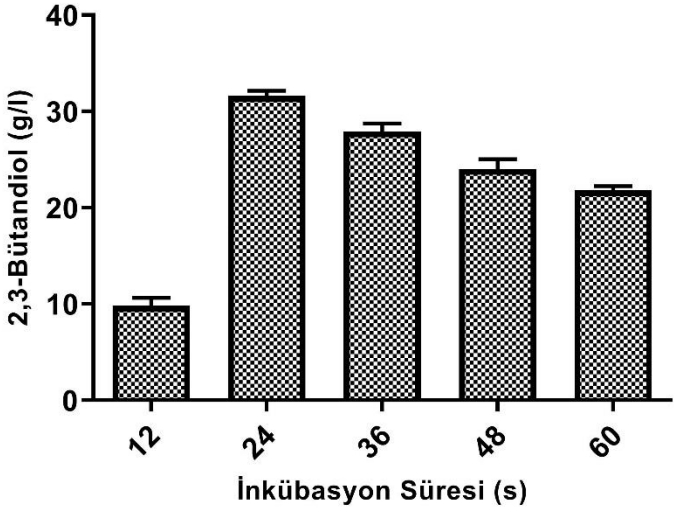
Şekil 18. İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde yatak hacminin etkisi

İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde inkübasyon süresinin etkisi

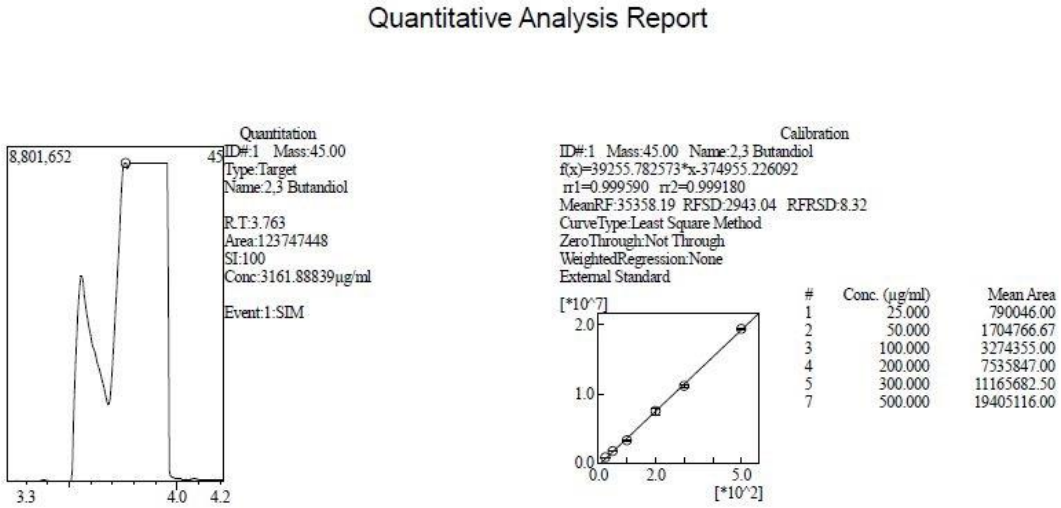
Önceden belirlenen optimum kültür koşullarında (55 ºC, pH 7, 100 ml/l melas ve 5 g/l pepton, 5 g yatak miktarı ve 5 mm yatak hacmi), farklı inkübasyon sürelerinin 2,3-BD üretimine etkisi araştırıldı. Sonuçlar tablo 15 ve şekil 19'da belirtildi. Maksimum 2,3-BD konsantrasyonu 24 saatlik inkübasyon sonunda 31,6 g/l olarak elde edildi. Artan inkübasyon sürelerinde metabolit konsantrasyonlarında kısmi düşüş tespit edildi. Farklı inkübasyon sürelerinde gerçekleştirilen fermentasyon proseslerinde kontaminasyon riski gözlenmedi. 2,3-BD fermentasyonunda optimum inkübasyon süresi 24 saat olarak belirlendi. Böylece, optimize edilmiş koşullarda fermentasyon prosesi sonucunda 31,6 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirildi.

Tablo 15. İmmobilize Edilmiş Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi

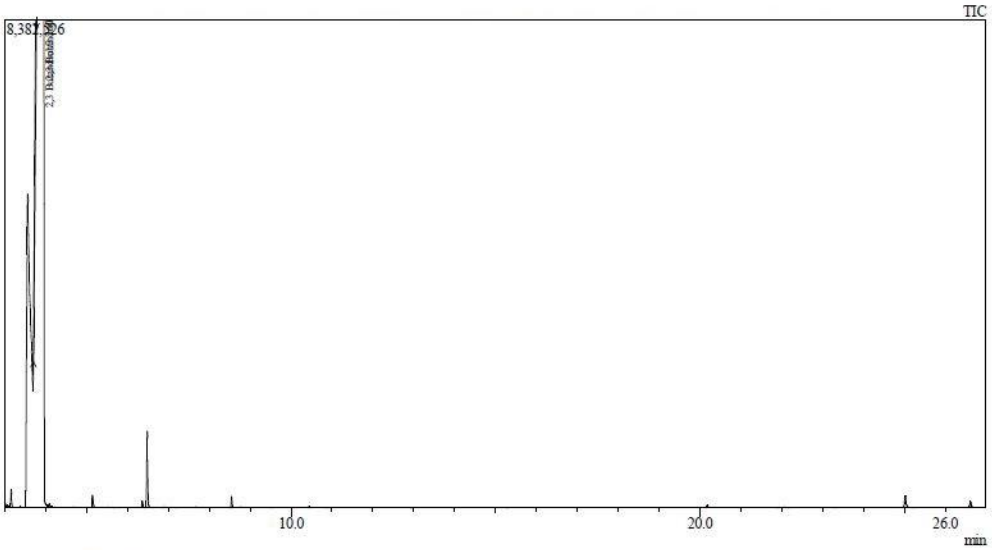
İnkübasyon Süresi (saat)	**2,3-BD (g/l)**	**Kontaminasyon**
12	9,8	-
24	31,6	-
36	27,9	-
48	24,0	-
60	21,8	-



Şekil 19. İmmobilize edilmiş hücrelerle 2,3-BD üretiminde inkübasyon süresinin etkisi



Şekil 20. Kantitatif GC-MS analizi için 2,3-BD standardı



Quantitative Result Table

ID#	R.Time	Name	Conc.	Conc.Unit	m/z	Area	Height
1	3.763	2,3 Butandiol	3161.888	µg/ml	45.00	123747448	8330098

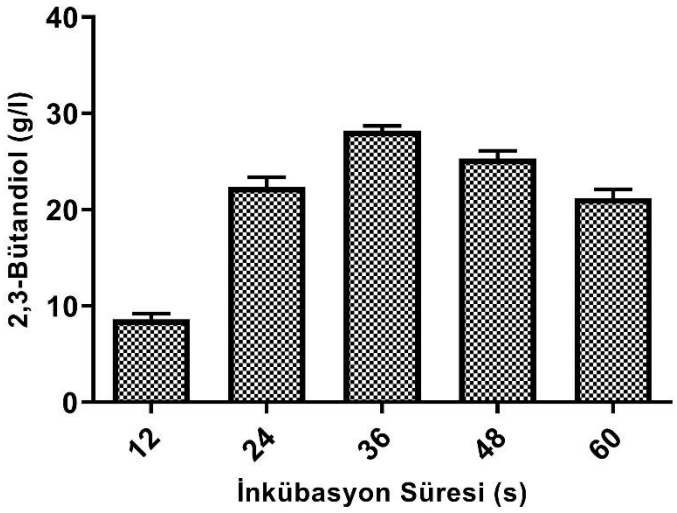
Şekil 21. Optimize edilmiş koşullarda kantitatif GC-MS analiz sonucu

Serbest hücrelerle 2,3-BD üretiminde inkübasyon süresinin etkisi

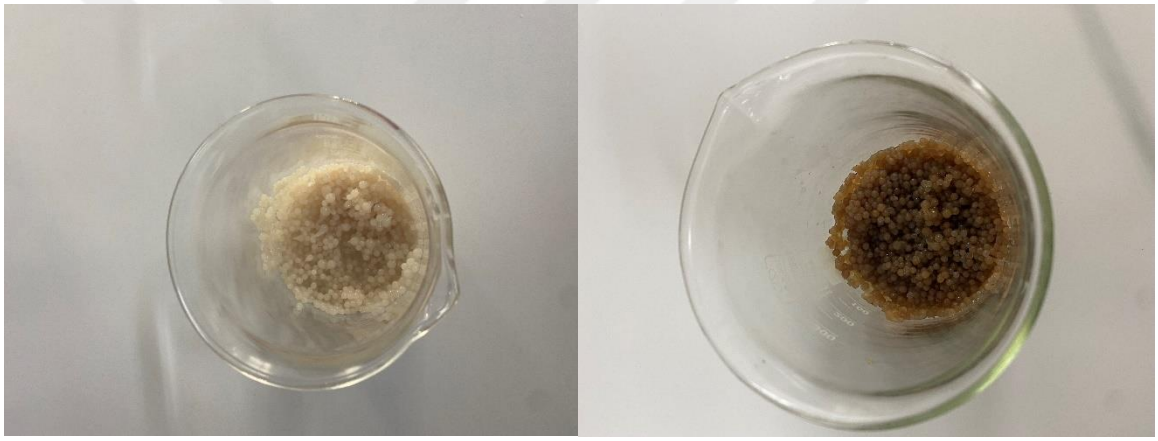
Belirlenen optimum kültür koşullarında (55 ºC, pH 7, 100 ml/l melas ve 5 g/l pepton), farklı inkübasyon sürelerinin serbest hücrelerle 2,3-BD üretimine etkisi araştırıldı. Sonuçlar tablo 16 ve şekil 22'de belirtildi. Maksimum 2,3-BD konsantrasyonu 36 saatlik inkübasyon süresi sonunda 28,2 g/l olarak elde edildi. Artan inkübasyon sürelerinde metabolit konsantrasyonlarında düşüş tespit edildi. Farklı inkübasyon sürelerinde gerçekleştirilen fermentasyon proseslerinde kontaminasyon riski gözlenmedi. Serbest hücrelerle gerçekleştirilen 2,3-BD fermentasyonunda optimum inkübasyon süresi 24 saat olarak belirlendi.

Tablo 16. Serbest Hücrelerle 2,3-BD Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi

İnkübasyon Süresi (saat)	**2,3-BD (g/l)**	**Kontaminasyon**
12	8,6	-
24	22,4	-
36	28,2	-
48	25,3	-
60	21,2	-



Şekil 22. Serbest hücrelerle 2,3-BD üretiminde inkübasyon süresinin etkisi



Şekil 23. Fermentasyon öncesi ve sonrasında immobilize hücreler

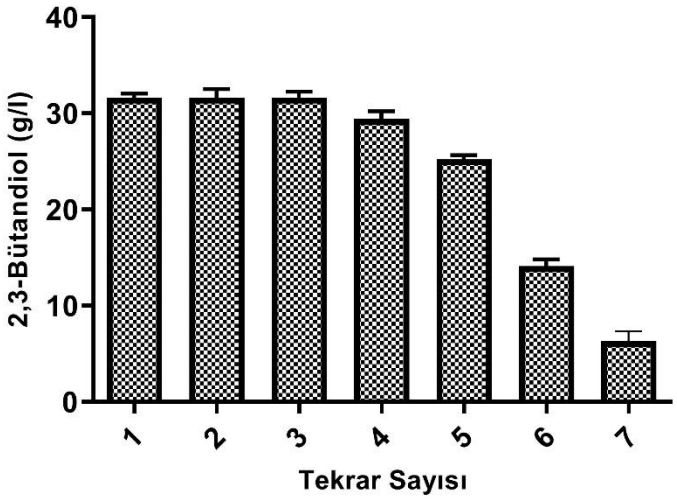
2,3-BD Üretiminde İmmobilize Edilmiş Hücrelerin Tekrar Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Optimal koşullar belirlendikten sonra immobilize hücrelerin tekrar kullanılabilirliği araştırıldı. Sonuçlar tablo 17 ve şekil 24'de belirtildi. Bu amaçla, her tekrar işlemi 24 saat süreyle gerçekleştirildi ve fermentasyon ortamındaki 2,3-BD içeriği analiz edildi. Tekrarın ardından immobilize hücreler steril fizyolojik su ile yıkanıp, ikinci tekrar işlemi için optimize koşullardaki fermentasyon ortamına inoküle edildi. Her tekrarda immobilize hücreler için aynı işlemler uygulandı. İlk 3 tekrarda immobilize hücrelerin aktivitesinde ve 2,3-BD konsantrasyonunda (31,6 g/l) değişiklik tespit edilmedi. 4 ve 5. tekrarların sonunda immobilize hücrelerin 2,3-BD üretme kapasitelerinde kısmi düşüş belirlendi. 6. tekrardan itibaren ise 2,3-BD üretiminde ciddi düşüş gözlemlendi. Ayrıca, ilk 3 tekrar sonunda immobilize yataklarda parçalanma tespit edilmedi. Ancak, 4 ve 5. tekrarlarda immobilize yatakların parçalanmaya başladığı ve yataklardan kültür ortamına hücre sızıntısının olduğu gözlendi. 6. tekrardan

itibaren ise immobilize yataklarda önemli derecede parçalanma ve yüksek miktarda hücre sızıntısı belirlendi. İlk 3 tekrarda kültür ortamında kontaminasyon tespit edilmedi. 4 ve 5. tekrarlarda immobilize yataklar parçalanmaya başladığından, fermentasyon ortamına hücre sızıntılarının olmasıyla az derecede kontaminasyon gözlendi. 6 ve 7. tekrarlarda ise yataklardaki parçalanma derecesi arttı ve buna bağlı olarak hücre sızıntılarındaki artışla beraber sırasıyla orta ve yoğun derecede kontaminasyon tespit edildi.

Tablo 17. 2,3-BD Üretiminde İmmobilize Edilmiş Hücrelerin Tekrar Kullanılabilirliği

Tekrar Sayısı	2,3-BD (g/l)	Kontaminasyon
1	31,6	-
2	31,6	-
3	31,6	-
4	29,4	+
5	25,2	+
6	14,1	++
7	6,3	+++



Şekil 24. 2,3-BD üretiminde immobilize edilmiş hücrelerin tekrar kullanılabilirliği

TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde, fosil yakıt kaynaklarının kıtlığı ve artan petrol fiyatları karşısında, biyolojik bazlı kimyasal bileşikler ve biyorafineriler önemli derecede ilgi görmektedir. Çoğunlukla ekolojik endişeler nedeniyle, daha önce atık olarak kabul edilen malzemeler de dahil olmak üzere yenilenebilir kaynaklara dayalı yeni ve çevre dostu biyoteknolojiler geliştirmek gerekli hale gelmiştir. Geçmişte sadece kimyasal proseslerle üretilebilen birçok kimyasal metabolit, artık yenilenebilir kaynaklar kullanılarak biyolojik olarak üretilme potansiyeline sahiptir. Endüstriyel ve tarımsal atıklardan veya yan ürünlerinden kimyasallar ya da enerji üretmek için tercih edilen fermentasyon prosesleri, geleneksel yakıtlardaki kıtlığın yanı sıra gıda ve yem kaynaklarının daha makul yönetimine duyulan ihtiyaç nedeniyle önem arz etmektedir (Pfleger and Takors 2023).

Yenilenebilir kaynakların mikrobiyal proseslerle dönüşümü ile elde edilebilecek bileşiklerden biri de 2,3-BD'dir. 2,3-BD'nin çok sayıda endüstriyel uygulaması olduğundan ve mikrobiyal üretim, platform kimyasallarının üretimi için petrol arzına olan bağımlılığı azaltacağından, mikrobiyal fermentasyon proseslerine olan ilgi önemli ölçüde artmıştır (Song et al. 2019).

Mikrobiyal fermentasyon proseslerinde kültür ortamına katılan glukoz, sükroz ve fruktoz gibi ticari karbon kaynakları proses maliyetini etkileyen önemli bir parametre olarak bilinmektedir. Bu nedenle, mikrobiyal proseslerde organik atıklar veya yan ürünleri saf karbon kaynakları yerine tercih edilmektedir. Bu bağlamda, yapılan çeşitli çalışmalarda melas, peynir altı suyu, narenciye atıkları, gliserol, meyve kabukları, buğday ve pirinç atıkları ile mutfak atıkları gibi doğal karbon kaynaklarının mikrobiyal fermentasyon proseslerinde substrat olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (Taskin et al. 2012; Arslan et al. 2016; Ortucu et al. 2017). Melasın yüksek şeker içeriği, suda çözünebilirliği ve herhangi bir ön hidroliz işlemi gerektirmemesi gibi özellikleri melası fermentasyon proseslerinde ilgi çekici bir substrat yapmaktadır. Melasın sitrik asit, glukonik asit, etil alkol, lipit, polisakkarit, tek hücre proteini ve bütandiol gibi primer ve sekonder metabolitlerin üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılabileceği rapor edilmektedir (Gajdoš et al. 2015; Erian et al. 2018; Mustafa et al. 2020; Karadayi et al. 2021). Yapılan çalışmalarda, melasın mikrobiyal 2,3-BD üretiminde de karbon kaynağı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Dai et al. 2015; Deshmukh et al. 2016; Psaki et

al. 2019). Bu yüzden, mevcut çalışmada, 2,3-BD üretim proseslerinde karbon kaynağı olarak melasın kullanılmasıyla proses maliyetinin azaltılması amaçlandı.

Mevcut tez çalışmasında, 2,3-BD üretme potansiyeli olan mikroorganizmaların izolasyonu farklı toprak [Tarla toprağı 1 (39°57'53"K 41°10'42"D), tarla toprağı 2 (39°55'22"K 40°40'48"D), tarla toprağı 3 (40°17'39"K 41°32'51"D), tarla toprağı 4 (40°27'37"K 41°52'21"D), orman altı toprağı 1 (40°27'48"K 40°57'54"D), orman altı toprağı 2 (39°51'00"K 41°17'07"D), orman altı toprağı 3 (40°33'13"K 42°20'19"D) ve orman altı toprağı 4 (39°53'18"K 41°19'35"D)] ve sıcak su örneklerinden [Pasinler kaplıcası (39°58'37"K 41°39'56"D) ve Ilıca kaplıcası (39°56'17"K 41°06'29"D)] gerçekleştirildi. Toplamda 52 adet bakteri izolatı elde edildi ve her bir izolata farklı kodlar verildi. Tarla toprağından izole edilenler için BD1-12, orman altı toprağından izole edilenler için BD13-26, ılıca kaplıcasından izole edilenler için BD27-37 ve pasinler kaplıcasından izole edilenler için ise BD38-52 kodları verildi. Bu izolatlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere stok kültürler hazırlanarak -20 ve -80 ºC'de muhafaza edildi.

2,3-BD üretme potansiyeli olan mikroorganizmaların izolasyonu sırasında genel besiyerleri olan TSA ve NA yerine melas ile hazırlanan agar besiyerleri kullanıldı. İzolasyon besiyerinde melas kullanılmasının amacı fermentasyon proseslerinde de karbon kaynağı olarak melas kullanılacağı için melası etkili bir şekilde kullanabilecek izolatları seçmekti. Bununla beraber, literatürde 2,3-BD üretiminin aerobik ve anaerobik koşullarda gerçekleştirilebileceği açıklanmaktadır (Song et al. 2019). Anaerobik kültürlerde yüksek verimler elde edilse de anaerobik proseslerin anoksik fermentasyon koşullarını sağlamanın zor ve maliyetli olması, kullanılan mikroorganizmaların oksijene olan yüksesk hassasiyeti, oksijenin sudaki düşük çözünürlüğü ve yoğun köpük oluşumu gibi dezavantajları olduğu belirtilmektedir (Huang and Tang 2007). Hatta, bazı çalışmalarda aerobik kültürlerde de yüksek verimlerde 2,3-BD üretimi gerçekleştirilebileceği açıklanmaktadır (O'Hair et al. 2020; Tsigoriyna et al. 2021). Bu bilgiler ışığında, mevcut çalışmada, aerobik koşullarda 2,3-BD üretimini gerçekleştiren bakterilerin izolasyonu hedeflendi. Bu amaçla, farklı ortamlardan alınan örnekler melas ile hazırlanan agar besiyerine inoküle edildikten sonra aerobik şartlarda inkübasyona bırakıldı ve hedef bakterilerin izolasyonu gerçekleştirildi.

Bakteri izolatlarının 2,3-BD üretme potansiyelini belirlemek amacıyla, asetoin saptamasında kullanılan Voges-Proskauer (VP) testi uygulandı. Yapılan deneyler sonucunda, 52 izolattan 17 tanesinin kırmızı renk oluşturduğu, dolayısıyla izolatlar VP testi açısından pozitif ve potansiyel 2,3-BD üreticisi olarak değerlendirildi. Pozitif izolatlar arasında özellikle 5 izolatın daha yoğun renk oluşumu sergilediği tespit edildi. Bununla beraber, asetoin tespiti

her ne kadar 2,3-BD üretimi için bir ön belirteç olarak kabul edilse de çalışmada VP pozitif olan ve daha yoğun renk oluşturan izolatlar melas ile hazırlanan fermentasyon ortamına inoküle edilip, 2,3-BD üretimi gerçekleştirdi ve prosesler sonucunda kültür ortamlarındaki 2,3-BD konsantrasyonları GC-MS yöntemi ile analiz edildi. Analizler sonucunda BD43 kodlu izolatın en yüksek miktarda 2,3-BD üretimi gerçekleştirdiği belirlendi. Çalışmanın devam eden aşamalarında BD43 kodlu izolatın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenip, moleküler identifikasyonu yapıldı. Ardından, 2,3-BD üretimini artırmak için bakteri hücrelerinin immobilizasyonu ve kültür ortamının optimizasyonu yapıldı.

BD43 kodlu izolatın morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar sonunda, çubuk şeklinde, gram pozitif ve spor oluşturan bakteri izolatı olduğu belirlendi. İzole edilen bakterinin fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi kapsamında, izolatın gelişim gösterebildiği sıcaklık aralığı 35-65 ºC, pH aralığı 6-9 ve tuz konsantrasyonu aralığı ise %2-4 olarak tespit edildi. Biyokimyasal testler neticesinde, bakteri izolatının katalaz ve oksidaz pozitif olduğu belirlendi. İzolatın tür düzeyinde identifikasyonu için 16S rRNA gen bölgesi klonlanarak sekans analizi yapıldı. Sekans analizi sonucunda, BD43 kodlu izolatın *Bacillus licheniformis*'e %99 oranında benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Literatürde, *K. pneumoniae, K. oxytoca, E. aerogenes, S. marcescens, P. polymyxa, B. amyloliquefaciens* ve *B. licheniformis* bakteri türlerinin 2,3-BD fermentasyon proseslerinde yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalar olduğu belirtilmektedir (Ji et al. 2011). Bu türler arasında *K. pneumoniae, K. oxytoca, E. aerogenes* ve *S. marcescens* patojen bakteriler olup, risk 2 grubunda sınıflandırılmaktadır. Bu mikroorganizmalarla gerçekleştirilen endüstriyel fermentasyon prosesleri insan sağlığı açısından tehdit oluşturacağı için tavsiye edilmemektedir (Song et al., 2019). Bu bağlamda, *B. licheniformis* suşları GRAS mikroorganizmalar olarak bilinmekte ve mikrobiyal fermentasyon proseslerinde ilgi çekici konaklar olarak kabul edilmektedir. *B. licheniformis* türlerinin proteaz, amilaz, invertaz, lipaz ve selülaz gibi enzimlere sahip olduğu ve bu sayede melas dahil birçok organik atık veya yan ürün üzerinde gelişim göstererek hedeflenen metabolitleri etkili bir şekilde üretebileceği belirtilmektedir (Doan et al. 2021; Muras et al. 2021). Bu yüzden, *B. licheniformis*'in karbon kaynağı olarak melas içeren fermentasyon ortamında 2,3-BD üretimini gerçekleştirebileceğini söylemek oldukça muhtemeldir.

Sıvı kültür ortamlarında primer ve sekonder metabolitlerin üretimi serbest ve immobilize hücreler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Mikrobiyal fermentasyon proseslerinde serbest hücreler yerine immobilize edilmiş hücreleri kullanmanın çeşitli avantajları bulunmaktadır. İmmobilize hücrelerin kullanımı sıcaklık ve pH gibi çevresel

streslere karşı hücreleri korumakta, fermentasyon sürekliliğini sağlayarak üretilen metabolitin verimini artırmakta, daha kısa fermentasyon süreleri sağlamakta, üretilen metabolitin saflaştırmasını kolaylaştırmakta ve immobilize hücrelerin tekrar kullanımını mümkün kılmaktadır. Ayrıca, immobilize hücrelerin yüksek hücre yoğunluğu sayesinde fermentasyon ortamındaki mikrobiyal kontaminasyonlar minimal seviyede tutulmaktadır (Aydogan et al. 2014). İmmobilizasyon yönteminin bu avantajlarından dolayı immobilize hücreler 2,3-BD, etil alkol, sitrik asit, antibiyotik, polisakkarit ve enzimler gibi birçok metabolitin üretiminde kullanılmaktadır (Kosseva 2011; Kumaravel and Gopal 2010; Jurchescu et al. 2013). Mikroorganizmaların hücre immobilizasyonunda aljinat, agaroz, karajenan, kitosan ve pektin gibi matriksler tercih edilmektedir (Kosseva 2011). Özellikle sodyum aljinat matriski kullanarak tutuklama yapmanın basit ve ucuz olması, biyouyumluluğu ve toksik olmaması gibi avantajlarından dolayı hücre immobilizasyonu çalışmalarında etkili bir şekilde kullanılabileceği belirtilmektedir. Ayrıca, aljinat matriksi kullanılarak elde edilen immobilize hücrelerin yüksek fermentasyon verimleri sağladığı açıklanmaktadır (Soares et al. 2022). Bu yüzden, mevcut çalışmada, *B. licheniformis* hücreleri sodyum aljinat matriksi ile immobilize edildi ve immobilize hücreler ile karbon kaynağı olarak melasın bulunduğu üretim besiyerinde steril olmayan fermentasyon koşullarında 2,3-BD üretimi gerçekleştirildi.

Mikrobiyal fermentasyon prosesleri genellikle steril ve steril olmayan koşullarda gerçekleştirilmektedir. Sterilizasyon işlemi mikrobiyal proseslerin verimli bir şekilde gerçekleşmesi ve kültür ortamındaki kontaminasyonu önlemek açısından önemlidir. Ancak, prosesler öncesinde üretim besiyerlerine uygulanan sterilizasyon işlemi özellikle endüstriyel ölçekte gerçekleştirilen büyük hacimdeki besiyerleri için yüksek maliyet oluşturmaktadır. Bu bağlamda, araştırmacılar, uygun mikroorganizma suşları seçilerek fermentasyon proseslerinin steril olmayan kültür koşullarında da gerçekleştirilebileceğini belirtmektedir. Endüstriyel ölçekte gerçekleştirilen proseslerdeki üretim besiyerleri hacminin çok yüksek olduğu ve sterilizasyon işlemi için gereken elektrik enerjisinin çok fazla olduğu dikkate alındığında mikrobiyal proseslerin sterilizasyon ön işlemi olmadan gerçekleştirilmesi, proses maliyetini önemli ölçüde azaltabileceği düşünülmektedir. Öte yandan, steril olmayan koşullarda gerçekleştirilen proseslerde kültür ortamında başta bakteriler olmak üzere istenmeyen mikrobiyal kontaminasyonların olabileceği bildirilmektedir. Dolayısıyla, üretim ortamındaki hedef mikroorganizmanın mikrobiyal aktivitelerinde düşüş veya aktivitesini tamamen kaybetmesi gibi durumlar ortaya çıkabilmektedir. Buna bağlı olarak, üretilmek istenen metabolitin veriminde de düşüşler olabileceği ifade edilmektedir (Chen and Wan 2017).

Steril olmayan kültür koşullarında sadece hedef mikroorganizmanın gelişimini destekleyen fakat diğer mikroorganizmaların gelişimini engelleyen sıcaklık ve pH gibi kültür parametreleri seçilmektedir. Mezofilik ve psikrofilik mikroorganizmalardan kaynaklanan kontaminasyonu azaltabilen ve 50 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda steril olmayan koşullarda fermentasyon proseslerini gerçekleştirmek için termofilik mikroorganizmaları kullanmak önemli bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen üretim proseslerinde mikroorganizmanın termofilik özelliğinden faydalanılmakta ve istenmeyen mezofilik ve psikrofilik özelliğe sahip kontaminantların gelişmesi engellenmektedir (Jiang et al. 2017). Literatürde, 2,3-BD üretimi için termofilik mikroorganizmaların kullanılması çeşitli çalışmalarda uygulanmıştır (Xiao et al. 2012; Ge et al. 2016; Li et al. 2014a; Li et al. 2014b). Xiao et al. asetoin ve 2,3-BD üretiminde termofilik *Geobacillus* suşunu kullanırken, Ge et al. *B. licheniformis* ile 50 °C'de glukozdan 2,3-BD üretimi gerçekleştirmiştir.

Hücre immobilizasyon teknolojisinin steril olmayan koşullar altında gerçekleştirilen mikrobiyal proseslerde kullanımı etkili bir yöntemdir. İmmobilize edilmiş yataklar içerisinde mikrobiyal yük fazla olduğundan immobilize hücreler üretim ortamında baskın populasyonlar olmakta ve kontaminantlara karşı üstünlük sağlamaktadır. Böylece kültür ortamındaki kontaminasyon minimize edilmektedir (Aydogan et al. 2014). Bununla beraber, steril olmayan koşullarda gerçekleştirilen fermentasyon proseslerinin maliyet açısından avantajı göz önüne alındığında, mevcut tez çalışmasında immobilize edilmiş *B. licheniformis* hücreleriyle karbon kaynağı olarak melasın bulunduğu üretim ortamında steril olmayan ve aerobik koşullarda 2,3-BD üretimi gerçekleştirildi.

Literatürde, mikrobiyal 2,3-BD üretiminin sıcaklık, pH, subtrat konsantrasyonu, oksijen kaynağı, inokülüm miktarı ve inkübasyon süresi gibi parametrelerden etkilendiği bildirilmektedir (Song et al. 2019; Maina et al. 2022). Bu nedenle, immobilize hücrelerle gerçekleştirilen 2,3-BD üretimini artırmak için bazı kültür parametreleri optimize edildi. Bu amaçla, ilk olarak fermentasyon proseslerinde optimal sıcaklık değeri tespit edildi. Yapılan deneyler sonucunda 2,3-BD üretiminin maksimum olduğu optimum sıcaklık değeri 55 ºC olarak belirlendi. Litetürde, *B. licheniformis* ile yapılan çalışmalarda da benzer optimal sıcaklık değerleri bildirilmiştir. Örneğin, OHair et al. 3 farklı *B. licheniformis* izolatı ile 2,3-BD fermentasyonu gerçekleştirmiş ve her izolat için optimum sıcaklık değerini 50 ºC olarak tespit etmiştir (OHair et al. 2021). Benzer şekilde, Xiao et al. (2017) mısır hidrolizatından steril olmayan koşullarda *B. licheniformis* ile 2,3-BD üretimi amaçlamış ve optimum fermentasyon sıcaklığının 50 ºC olduğunu bildirmiştir (Xiao et al. 2017). Ayrıca, farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen fermentasyon proseslerinde kültür ortamındaki kontaminasyon varlığı tespit

edildi. 40 ºC'de mezofilik mikroorganizmalardan kaynaklı yoğun derecede kontaminasyon gözlendi. Sıcaklığın kademeli olarak artırılmasıyla, mikrobiyal kontaminasyon derecesinde düşüş belirlendi ve 60 ve 65 ºC'de kontaminasyon riski gözlenmedi.

2,3-BD üretiminde kültür ortamının başlangıç pH'ının metabolit verimine etkisini araştırmak amacıyla farklı pH değerlerine sahip üretim besiyerleri ile mikrobiyal prosesler gerçekleştirildi. Başlangıç pH değerinin 4'den 7'ye yükseltilmesiyle 2,3-BD konsantrasyonunda kademeli olarak artış tespit edildi ve en yüksek üretim 9,1 g/l ile pH 7'de tespit edildi. Alkali pH değerlerinde ise pH 8'de kısmi bir azalma gözlenirken, pH 9'da üretimde ciddi düşüş belirlendi. Yapılan çalışmalarda da, *B. licheniformis* ile 2,3-BD üretiminde optimum pH değerlerinin 7 seviyelerinde olduğu bildirilmiştir (Guragain et al. 2017; Li et al. 2017; Gao et al. 2018). Öte yandan, asidik (pH 4 ve 5) ve bazik (pH 9) değerlerde gerçekleşen fermentasyon proseslerinde herhangi bir kontaminasyon riski tespit edilmezken, diğer pH değerlerindeki proseslerde ise az derecede kontaminasyon gözlemlendi.

Optimum sıcaklık ve pH belirlendikten sonra farklı melas konsantrasyonlarının 2,3-BD üretimine etkisi araştırıldı ve 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 ml/l test edildi. 100 ml/l'ye kadar artan melas konsantrasyonlarında metabolit üretiminde artış görüldü ve en yüksek 2,3-BD (21,6 g/l) 100 ml/l melas konsantrasyonunda elde edildi. Daha yüksek melas konsantrasyonlarının mikrobiyal aktiviteyi inhibe etmesiyle 2,3-BD üretiminde düşüşler tespit edildi. Şeker üretim prosesleri sırasında mikrobiyal aktivite için toksik olan ve fermentasyon verimlerini olumsuz olarak etkileyen 5-hidroksimetilfurfural ve metalik iyonlar (bakır, demir, çinko ve manganez) gibi çeşitli tehlikeli maddeler açığa çıkmaktadır (Xia et al. 2014). Bu doğrultuda, mikrobiyal aktivite üzerindeki inhibisyondan kaynaklanan düşük 2,3-BD üretimleri, artan melas konsantrasyonuyla birlikte inhibisyon etkisi olan elementlerin konsantrasyonlarının artmasına bağlanabilir. Dahası, yüksek melas konsantrasyonlarında 2,3-BD üretimindeki azalma üretim besiyerinin başlangıç C/N oranıyla da ilişkilendirilebilir (Suttikul et al. 2022). Öte yandan, 100 ml/l'ye kadar artan melas konsantrasyonlarında kültür ortamında az derecede kontaminasyon tespit edilirken, daha yüksek konsantrasyonlarda inhibitör elementlerin varlığına bağlı olarak mikrobiyal kontaminantların olumsuz etkilenmesiyle kontaminasyon görülmedi.

İmmobilize edilmiş hücrelerle gerçekleştirilen fermentasyon proseslerinde yatak miktarı ve hacminin fermentasyon proseslerine olan etkisi test edildi. Yatak miktarının 5'den 15'e artırılması sonucunda 2,3-BD konsantrasyonunda artış tespit edildi ve en yüksek üretim (26,0 g/l) 15 g yatak miktarıyla gerçekleştirilen proses ile elde edildi. Ayrıca, 5 g yatak miktarıyla gerçekleşen prosesde kültür ortamında az derece kontaminasyon gözlenirken, daha yüksek yatak miktarlarında kontaminasyon tespit edilmedi. Yüksek yatak miktarlarında daha

fazla miktarda 2,3-BD üretimi ve daha düşük oranda kontaminasyon görülmesi, yatakların içerisindeki hücre yoğunluğunun artması ve bu artışında olası istenmeyen kontaminantları engellemesi ile açıklanabilir. 15 g yatak miktarı üzerindeki yatak konsantrasyonlarında 2,3-BD miktarındaki azalma ise yatakların erlen içerisinde daha az yer değiştirmesi ve buna bağlı olarak da hücrelerin substratla daha az temas etmesine bağlanabilir. Yapılan önceki bir çalışmada da çok yüksek yatak miktarlarının ürün verimini azalttığı rapor edilmiştir (Arslan et al. 2016). Yatak hacminin 2,3-BD üretimine etkisini belirlemek amacıyla 3, 5 ve 7 mm yatak hacimleri test edildi ve en yüksek metabolit üretimi 5 mm yatak hacminde 29,7 g/l olarak belirlendi. Farklı yatak hacimlerinde gerçekleştirilen mikrobiyal proseslerde herhangi bir kontaminasyon riski tespit edilmedi.

Belirlenen optimum kültür koşullarında farklı inkübasyon sürelerinin üretim verimi üzerindeki etkisi incelendi. Maksimum 2,3-BD konsantrasyonu 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 31,6 g/l olarak belirlendi. Farklı inkübasyon sürelerinde gerçekleştirilen mikrobiyal proseslerde kontaminasyon tespit edilmedi. Böylece, immobilize *B. licheniformis* hücreleriyle optimize edilmiş steril olmayan kültür koşullarında 100 ml/l melastan (48,3 g/l şeker) 31,6 gl/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirildi. Yapılan diğer çalışmalarda, steril olmayan kültür koşullarında 2,3-BD üretimi gerçekleştirilmiş ve benzer verimler elde edilmiştir. Hazeena et al. *Enterobacter cloacae* ile yulaf (84,27 g/l şeker) ve ladin kabuğu böceği (46,21 g/l şeker) hidrolizatından steril olmayan koşullarda sırasıyla 37,59 ve 26,74 g/l 2,3-BD üretimi gerçekleştirmiştir (Hazeena et al. 2022). Meng et al. steril olmayan 2,3-BD fermentasyonunda *Vibrio natriegens* ile 105 g/l glukozdan 41,27 g/l 2,3-BD üretimi bildirmiştir (Meng et al. 2022). O'Hair et al. tarafından steril olmayan koşullarda *B. licheniformis* ile gerçekleştirilen 2,3-BD üretiminde, 60 g/l glukozdan 27,4 g/l 2,3-BD elde edilmiştir (O'Hair et al 2020). OHair et al. gıda atıklarından 3 farklı *B. licheniformis* suşları ile 2,3-BD üretimini araştırmış ve yaklaşık 22 g/l şekerden YNP1-TSU ile 9,87 g/l, YNP2-TSU ile 9,77 g/l ve YNP3-TSU ile 9,61 g/l 2,3-BD üretimi bildirmiştir (OHair et al. 2021).

Mikrobiyal proseslerde immobilize hücrelerin daha kısa fermentasyon süreleri sağladığı bilinmektedir (Aydogan et al. 2014). Bu doğrultuda, optimum fermentasyon koşullarında serbest hücrelerle 2,3-BD üretiminde optimum inkübasyon süresi araştırıldı. Bu amaçla, optimum yatak miktarındaki (15 g) yaş hücre miktarıyla (5.01 g) aynı olacak şekilde *B. licheniformis* hücreleri 3 mL steril fizyolojik saf su ile homojenize edilerek 100 ml'lik fermentasyon ortamlarına inkoküle edildi. Prosesler sonucunda, maksimum 2,3-BD konsantrasyonu 36 saatlik inkübasyon süresi sonunda 28,2 g/l olarak belirlendi.

Literatürde, immobilize edilmiş hücrelerin mikrobiyal proseslerde tekrar kullanılabilirliği önemli bir kriter olarak kabul edildiğinden, çeşitli çalışmalarda immobilize hücrelerle primer ve sekonder metabolitlerin üretiminde yatakların art arda kaç kez kullanılabileceği araştırılmıştır (Taskin 2013; Aydogan et al. 2014). Bu bağlamda, belirlenen optimum koşullar altında immobilize hücrelerin 2,3-BD üretiminde art arda kaç kez kullanılabileceği araştırıldı ve üretime olan etkisi incelendi. İlk 3 tekrar sonucunda 2,3-BD konsantrasyonunda değişiklik gözlenmedi. 4 ve 5. tekrar sonunda immobilize hücrelerin aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak metabolit üretimde kısmi düşüşler tespit edildi. 6. tekrardan sonra ise yatakların parçalanmasındaki artışa bağlı olarak 2,3-BD üretiminde ciddi düşüşler belirlendi. Bununla beraber, ilk 3 tekrardaki proseslerde kontaminasyon tespit edilmezken, 4 ve 5. tekrarda yatakların parçalanmaya başlamasıyla beraber yataklardan kültür ortamına kısmi hücre sızıntıları sonucunda az derece kontaminasyon görüldü. 6 ve 7. tekrarlarda ise yatakların parçalanmasındaki artışa ve ciddi hücre sızıntılarına bağlı olarak sırasıyla orta ve yoğun derecede kontaminasyon tespit edildi. İmmobilize yataklarıdaki parçalanma sodyum aljinata bağlı kalsiyum iyonlarının ortama salınmasına bağlanabilir. Diğer bir ifadeyle kalsiyum iyonlarının ayrılmasıyla yataklarda parçalanma olmuş olabilir. Kontaminasyondaki artış ise yatakların parçalanmaya başlaması ile ortama salınan ölü bakteri hücrelerinin kontaminant bakteriler tarafından substrat olarak kullanılmasıyla açıklanabilir.

Sonuç olarak, lokal olarak izole edilen ve patojen olmayan *B. licheniformis* BD43 suşunun aerobik koşullarda 2,3-Bütandiol fermentasyonunu gerçekleştirebileceği belirlendi. Fermentasyon proseslerinde maliyetin düşürülmesi amacıyla şeker fabrikasyonu atık ürünü olan melasın *B. licheniformis* BD43 tarafından substrat olarak etkili bir şekilde kullanılabileceği tespit edildi. Böylece hem üretim maliyetinin azaltılması hem de çevre kirliliği probleminin çözümüne katkıda bulunulması amaçlandı. Sodyum aljinat içerisinde immobilize edilmiş *B. licheniformis* BD43 hücreleri için uygun yatak miktarları ile yatak hacimlerinin seçilmesi ve kültür koşullarının optimize edilmesi ile 2,3-BD üretiminin artırılabileceği gözlendi. Bununla beraber, immobilize hücrelerin melasın dekolorizasyon işleminde de önemli bir rol oynadığı tespit edildi. İzolatın termofilik özellikleri ve hücre immobilizasyon teknolojisinin avantajları sayesinde üretim prosesleri öncesinde uygulanan otoklav adımının kaldırılmasıyla uzun sürelerde bekleme süresinin ve sterilizasyonda gerekli olan buhar için harcanan enerjinin ortadan kaldırılmasıyla fermentasyon proseslerinin steril olmayan koşullar altında da gerçekleştirilebileceği, böylece zaman ve enerji tasarrufu sağlanarak proses maliyetinin azaltılabileceği belirlendi. Mevcut çalışma, 2,3-BD'nin üretim proseslerinde fermentasyon maliyetlerinin azaltılması ve aynı zamanda atık karbon kaynağının biyoteknolojik açıdan değerli ürünler için kullanılması açısından önem arz etmektedir. Tez çalışması, melasın

immobilize *B. licheniformis* hücreleriyle steril olmayan 2,3-BD fermantasyonunda karbon kaynağı olarak kullanılabilme potansiyelini gösteren ilk çalışma olması nedeniyle önemlidir. Bu bağlamda, mevcut tez çalışmasında laboratuvar ölçeğinde yapılan deneyler sonucunda elde edilen bulgular ile 2,3-Bütandiol üretiminin sürdürülebilir ve çevre dostu bir proses ile daha az maliyet ve yüksek ürün verimleriyle gerçekleştirilebileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKÇA

Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Adıgüzel, G., Fermente Türk Sucuğndan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik Ve Genotipik Yöntemlerle Karakterizasyonu. 2008.

Afschar, A. S., Bellgardt, K. H., Vaz Rossell, C. E., Czok, A., & Schaller, K. (1991). The production of 2,3-butanediol by fermentation of high test molasses. Applied microbiology and biotechnology, 34, 582-585.

Akaraonye, E., Moreno, C., Knowles, J. C., Keshavarz, T., & Roy, I. (2012). Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus cereus* SPV using sugarcane molasses as the main carbon source. Biotechnology journal, 7(2), 293-303.

Amraoui, Y., Narisetty, V., Coulon, F., Agrawal, D., Chandel, A. K., Maina, S., ... & Kumar, V. (2021). Integrated fermentative production and downstream processing of 2,3-butanediol from sugarcane bagasse-derived xylose by mutant strain of *Enterobacter ludwigii*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 9(30), 10381-10391.

Anvari, M., & Safari Motlagh, M. R. (2011). Enhancement of 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* PTCC 1402. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011.

Arslan, N. P., Aydogan, M. N., & Taskin, M. (2016). Citric acid production from partly deproteinized whey under non-sterile culture conditions using immobilized cells of lactose—Positive and cold-adapted *Yarrowia lipolytica* B9. Journal of biotechnology, 231, 32-39.

Aydogan, M. N., Taskin, M., Canli, O., Arslan, N. P., & Ortucu, S. (2014). Tris–sucrose buffer system: a new specially designed medium for extracellular invertase production by immobilized cells of isolated yeast *Cryptococcus laurentii* MT-61. Folia microbiologica, 59, 9-16.

Backer, S. N., Bouaziz, I., Kallayi, N., Thomas, R. T., Preethikumar, G., Takriff, M. S., ... & Atieh, M. A. (2022). Brine solution: current status, future management and technology development. Sustainability, 14(11), 6752.

Barnard, D., Casanueva, A., Tuffin, M., & Cowan, D. (2010). Extremophiles in biofuel synthesis. Environmental technology, 31(8-9), 871-888.

Białkowska, A. M. (2016). Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32, 1-14.

Białkowska, A. M., Gromek, E., Krysiak, J., Sikora, B., Kalinowska, H., Jędrzejczak-Krzepkowska, M., ... & Turkiewicz, M. (2015). Application of enzymatic apple pomace hydrolysate to production of 2,3-butanediol by alkaliphilic *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 42(12), 1609-1621.

Celińska, E., & Grajek, W. (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol—current state and prospects. Biotechnology advances, 27(6), 715-725.

Champluvier, B., Francart, B., & Rouxhet, P. G. (1989). Co-immobilization by adhesion of β-galactosidase in nonviable cells of *Kluyveromyces lactis* with *Klebsiella oxytoca*:

Conversion of lactose into 2,3-butanediol. Biotechnology and bioengineering, 34(6), 844-853.

Chen, Z., & Wan, C. (2017). Non-sterile fermentations for the economical biochemical conversion of renewable feedstocks. Biotechnology letters, 39, 1765-1777.

Dai, J. Y., Zhao, P., Cheng, X. L., & Xiu, Z. L. (2015). Enhanced production of 2,3-butanediol from sugarcane molasses. Applied biochemistry and biotechnology, 175, 3014-3024.

Das, A., Prakash, G., & Lali, A. M. (2021). 2,3-Butanediol production using soy-based nitrogen source and fermentation process evaluation by a novel isolate of *Bacillus licheniformis* BL1. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 51(10), 1046-1055.

de Andrade, C. J., de Andrade, L. M., Bution, M. L., Dolder, M. A. H., Barros, F. F. C., & Pastore, G. M. (2016). Optimizing alternative substrate for simultaneous production of surfactin and 2,3-butanediol by *Bacillus subtilis* LB5a. Biocatalysis and agricultural biotechnology, 6, 209-218.

Deshmukh, A. N., Nipanikar-Gokhale, P., & Jain, R. (2016). Engineering of *Bacillus subtilis* for the production of 2,3-butanediol from sugarcane molasses. Applied Biochemistry and Biotechnology, 179, 321-331.

Dias, B. D. C., Lima, M. E. D. N. V., Vollú, R. E., da Mota, F. F., da Silva, A. J. R., de Castro, A. M., ... & Seldin, L. (2018). 2,3-Butanediol production by the non-pathogenic bacterium *Paenibacillus brasilensis*. Applied microbiology and biotechnology, 102, 8773-8782.

Doan, C. T., Tran, T. N., Nguyen, T. T., Tran, T. P. H., Nguyen, V. B., Tran, T. D., ... & Wang, S. L. (2021). Production of Sucrolytic Enzyme by *Bacillus licheniformis* by the Bioconversion of Pomelo Albedo as a Carbon Source. Polymers, 13(12), 1959.

Duarte, J. C., Rodrigues, J. A. R., Moran, P. J. S., Valença, G. P., & Nunhez, J. R. (2013). Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. AMB express, 3, 1-8.

Erian, A. M., Gibisch, M., & Pflügl, S. (2018). Engineered *E. coli* W enables efficient 2,3-butanediol production from glucose and sugar beet molasses using defined minimal medium as economic basis. Microbial Cell Factories, 17, 1-17.

Escobedo-Morales, G., Hernández-Beltrán, J. U., Balagurusamy, N., Hernández-Almanza, A. Y., & Luévanos-Escareño, M. P. (2022). Immobilized enzymes and cell systems: An approach to the removal of phenol and the challenges to incorporate nanoparticle-based technology. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 38(3), 42.

Feng, J., Gu, Y., Yan, P. F., Song, C., & Wang, Y. (2017). Recruiting energy-conserving sucrose utilization pathways for enhanced 2,3-butanediol production in *Bacillus subtilis*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 5(12), 11221-11225.

Field, J. L., Richard, T. L., Smithwick, E. A., Cai, H., Laser, M. S., LeBauer, D. S., ... & Lynd, L. R. (2020). Robust paths to net greenhouse gas mitigation and negative emissions via advanced biofuels. Proceedings of the National Academy of Sciences, 117(36), 21968-21977.

Folle, A. B., de Souza, B. C., Reginatto, C., Carra, S., da Silveira, M. M., Malvessi, E., & Dillon, A. J. P. (2023). Medium composition and aeration to high (R, R)-2,3-butanediol and acetoin production by *Paenibacillus polymyxa* in fed-batch mode. Archives of Microbiology, 205(5), 171.

Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Applied microbiology and biotechnology, 79, 339-354.

Fulmer, E. I., Christensen, L. M., & Kendali, A. R. (1933). Production of 2,3-butylene glycol by fermentation. Industrial & Engineering Chemistry, 25(7), 798-800.

Gajdoš, P., Nicaud, J. M., Rossignol, T., & Čertík, M. (2015). Single cell oil production on molasses by *Yarrowia lipolytica* strains overexpressing DGA2 in multicopy. Applied microbiology and biotechnology, 99, 8065-8074.

Gao, H., Khera, E., Lee, J. K., & Wen, F. (2016). Immobilization of multi-biocatalysts in alginate beads for cofactor regeneration and improved reusability. Journal of visualized experiments: JoVE, (110).

Gao, J., Xu, H., Li, Q. J., Feng, X. H., & Li, S. (2010). Optimization of medium for one-step fermentation of inulin extract from Jerusalem artichoke tubers using *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9 to produce R, R-2,3-butanediol. Bioresource technology, 101(18), 7076-7082.

Gao, Y., Huang, H., Chen, S., & Qi, G. (2018). Production of optically pure 2,3-butanediol from *Miscanthus floridulus* hydrolysate using engineered *Bacillus licheniformis* strains. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 34, 1-10.

Garg, S. K., & Jain, A. (1995). Fermentative production of 2,3-butanediol: a review. Bioresource Technology, 51(2-3), 103-109.

Ge, Y., Li, K., Li, L., Gao, C., Zhang, L., Ma, C., & Xu, P. (2016). Contracted but effective: production of enantiopure 2,3-butanediol by thermophilic and GRAS *Bacillus licheniformis*. Green Chemistry, 18(17), 4693-4703.

Guragain, Y. N., Chitta, D., Karanjikar, M., & Vadlani, P. V. (2017). Appropriate lignocellulosic biomass processing strategies for efficient 2,3-butanediol production from biomass-derived sugars using *Bacillus licheniformis* DSM 8785. Food and Bioproducts Processing, 104, 147-158.

Hakizimana, O., Matabaro, E., & Lee, B. H. (2020). The current strategies and parameters for the enhanced microbial production of 2,3-butanediol. Biotechnology Reports, 25, e00397.

Han, J., Wang, F., Li, Z., Liu, L., Zhang, G., Chen, G., ... & Zhang, H. (2022). Isolation and identification of an osmotolerant *Bacillus amyloliquefaciens* strain T4 for 2,3-butanediol production with tobacco waste. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 52(2), 210-217.

Häßler, T., Schieder, D., Pfaller, R., Faulstich, M., & Sieber, V. (2012). Enhanced fed-batch fermentation of 2,3-butanediol by *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. Bioresource technology, 124, 237-244.

Hazeena, S. H., Shurpali, N. J., Siljanen, H., Lappalainen, R., Anoop, P., Adarsh, V. P., ... & Binod, P. (2022). Bioprocess development of 2,3-butanediol production using agro-industrial residues. Bioprocess and Biosystems Engineering, 45(9), 1527-1537.

Hsieh, S. C., Lu, C. C., Horng, Y. T., Soo, P. C., Chang, Y. L., Tsai, Y. H., ... & Lai, H. C. (2007). The bacterial metabolite 2,3-butanediol ameliorates endotoxin-induced acute lung injury in rats. Microbes and infection, 9(12-13), 1402-1409.

Huang, W. C., & Tang, I. C. (2007). Bacterial and yeast cultures–process characteristics, products, and applications. Bioprocessing for value-added products from renewable resources, 185-223.

Jang, M. O., & Choi, G. (2018). Techno-economic analysis of butanol production from lignocellulosic biomass by concentrated acid pretreatment and hydrolysis plus continuous fermentation. Biochemical Engineering Journal, 134, 30-43.

Jansen, N. B., & Tsao, G. T. (2005). Bioconversion of pentoses to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. Pentoses and Lignin, 85-99.

Jansen, N. B., Flickinger, M. C., & Tsao, G. T. (1984). Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. Biotechnology and bioengineering, 26(4), 362-369.

Javidnia, K., Faghih-Mirzaei, E., Miri, R., Attarroshan, M., & Zomorodian, K. (2016). Biotransformation of acetoin to 2,3-butanediol: Assessment of plant and microbial biocatalysts. Research in Pharmaceutical Sciences, 11(4), 349.

Ji, X. J., Huang, H., & Ouyang, P. K. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review. Biotechnology advances, 29(3), 351-364.

Ji, X. J., Huang, H., Du, J., Zhu, J. G., Ren, L. J., Hu, N., & Li, S. (2009). Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. Bioresource technology, 100(13), 3410-3414.

Jia, X., Peng, X., Liu, Y., & Han, Y. (2017). Conversion of cellulose and hemicellulose of biomass simultaneously to acetoin by thermophilic simultaneous saccharification and fermentation. Biotechnology for biofuels, 10(1), 1-11.

Jiang, B., & Zhang, Z. (2010). Volatile compounds of young wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischet and Chardonnay varieties grown in the Loess Plateau Region of China. Molecules, 15(12), 9184-9196.

Jiang, Y., Xin, F., Lu, J., Dong, W., Zhang, W., Zhang, M., ... & Jiang, M. (2017). State of the art review of biofuels production from lignocellulose by thermophilic bacteria. Bioresource Technology, 245, 1498-1506.

Jiayang, Q. I. N., Zijun, X., Cuiqing, M. A., Nengzhong, X. I. E., Peihai, L. I. U., & Ping, X. U. (2006). Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glucose and ammonium phosphate. Chinese Journal of Chemical Engineering, 14(1), 132-136.

Jung, M. Y., Ng, C. Y., Song, H., Lee, J., & Oh, M. K. (2012). Deletion of lactate dehydrogenase in *Enterobacter aerogenes* to enhance 2,3-butanediol production. Applied Microbiology and Biotechnology, 95, 461-469.

Jung, M. Y., Park, B. S., Lee, J., & Oh, M. K. (2013). Engineered *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of sugarcane molasses in 2,3-butanediol production. Bioresource technology, 139, 21-27.

Jurchescu, I. M., Hamann, J., Zhou, X., Ortmann, T., Kuenz, A., Prüße, U., & Lang, S. (2013). Enhanced 2,3-butanediol production in fed-batch cultures of free and immobilized *Bacillus licheniformis* DSM 8785. Applied microbiology and biotechnology, 97, 6715-6723.

Karadayi, Y. I., Aykutoglu, G., Arslan, N. P., Baltaci, M. O., Adiguzel, A., & Taskin, M. (2021). Production of water-soluble sulfated exopolysaccharide with anticancer activity from *Anoxybacillus gonensis* YK25. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 96(5), 1258-1266.

Kosseva, M. R. (2011). Immobilization of microbial cells in food fermentation processes. Food and Bioprocess Technology, 4, 1089-1118.

Kumaravel, V., & Gopal, S. R. (2010). Immobilization of *Bacillus amyloliquefaciens* MBL27 cells for enhanced antimicrobial protein production using calcium alginate beads. Biotechnology and applied biochemistry, 57(3), 97-103.

Lai, H. C., Chang, C. J., Yang, C. H., Hsu, Y. J., Chen, C. C., Lin, C. S., ... & Lu, C. C. (2012). Activation of NK cell cytotoxicity by the natural compound 2,3-butanediol. Journal of Leukocyte Biology, 92(4), 807-814.

Li, L., Chen, C., Li, K., Wang, Y., Gao, C., Ma, C., & Xu, P. (2014). Efficient simultaneous saccharification and fermentation of inulin to 2,3-butanediol by thermophilic *Bacillus licheniformis* ATCC 14580. Applied and environmental microbiology, 80(20), 6458-6464.

Li, L., Li, K., Wang, K., Chen, C., Gao, C., Ma, C., & Xu, P. (2014). Efficient production of 2,3-butanediol from corn stover hydrolysate by using a thermophilic *Bacillus licheniformis* strain. Bioresource technology, 170, 256-261.

Li, L., Li, K., Wang, Y., Chen, C., Xu, Y., Zhang, L., ... & Xu, P. (2015). Metabolic engineering of *Enterobacter cloacae* for high-yield production of enantiopure (2R, 3R)-2,3-butanediol from lignocellulose-derived sugars. Metabolic engineering, 28, 19-27.

Li, L., Wei, X., Yu, W., Wen, Z., & Chen, S. (2017). Enhancement of acetoin production from *Bacillus licheniformis* by 2,3-butanediol conversion strategy: Metabolic engineering and fermentation control. Process Biochemistry, 57, 35-42.

Li, Y. Q., Wang, M. J., Gan, X. F., & Luo, C. B. (2023). Cleaner 2,3-butanediol production from unpretreated lignocellulosic biomass by a newly isolated *Klebsiella pneumoniae* PX14. Chemical Engineering Journal, 455, 140479.

Ma, L., Wang, J., Zhi, R., Lucia, L., Li, G., & Deng, Y. (2022). Utilization of corncob hydrolysate enables 2,3-butanediol production in *Enterobacter cholerae*. BioResources, 17(4), 5820.

Magee, R. J., & Kosaric, N. (1987). The microbial production of 2,3-butanediol. In Advances in applied microbiology (Vol. 32, pp. 89-161). Academic Press.

Maina, S., Prabhu, A. A., Vivek, N., Vlysidis, A., Koutinas, A., & Kumar, V. (2022). Prospects on bio-based 2,3-butanediol and acetoin production: Recent progress and advances. Biotechnology advances, 54, 107783.

Meng, W., Zhang, Y., Ma, L., Lü, C., Xu, P., Ma, C., & Gao, C. (2022). Non-sterilized fermentation of 2,3-butanediol with seawater by metabolic engineered fast-growing *Vibrio natriegens*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 10, 955097.

Muras, A., Romero, M., Mayer, C., & Otero, A. (2021). Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. Critical Reviews in Biotechnology, 41(4), 609-627.

Mustafa, G., Arshad, M., Bano, I., & Abbas, M. (2020). Biotechnological applications of sugarcane bagasse and sugar beet molasses. Biomass Conversion and Biorefinery, 1-13.

Narisetty, V., Zhang, L., Zhang, J., Lin, C. S. K., Tong, Y. W., Show, P. L., ... & Kumar, V. (2022). Fermentative production of 2,3-Butanediol using bread waste–A green approach for sustainable management of food waste. Bioresource Technology, 358, 127381.

Ng, C., Jung, M. Y., Lee, J., & Oh, M. K. (2012). Production of 2,3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae* by in silico aided metabolic engineering. Microbial cell factories, 11, 1-14.

O'Hair, J., Jin, Q., Yu, D., Poe, N., Li, H., Thapa, S., ... & Huang, H. (2020). Thermophilic and alkaliphilic *Bacillus licheniformis* YNP5-TSU as an ideal candidate for 2,3-butanediol production. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 8(30), 11244-11252.

OHair, J. A., Jin, Q., Li, H., Yu, D., He, Y., Thapa, S., ... & Zhou, S. (2021). Biochemical and genomic identification of novel thermophilic *Bacillus licheniformis* strains YNP1-TSU, YNP2-TSU, and YNP3-TSU with potential in 2,3-butanediol production from non-sterile food waste fermentation. Food and Bioproducts Processing, 129, 34-45.

OHair, J., Jin, Q., Yu, D., Wu, J., Wang, H., Zhou, S., & Huang, H. (2021). Non-sterile fermentation of food waste using thermophilic and alkaliphilic *Bacillus licheniformis* YNP5-TSU for 2,3-butanediol production. Waste Management, 120, 248-256.

Okonkwo, C. C., Ujor, V., & Ezeji, T. C. (2021). Production of 2,3-Butanediol from non-detoxified wheat straw hydrolysate: Impact of microbial inhibitors on *Paenibacillus polymyxa* DSM 365. Industrial Crops and Products, 159, 113047.

Ortucu, S., Yazici, A., Taskin, M., & Cebi, K. (2017). Evaluation of waste loquat kernels as substrate for lipid production by *Rhodotorula glutinis* SO28. Waste and biomass valorization, 8, 803-810.

Paciorek-Sadowska, J., & Czupryński, B. (2006). New compounds for production of polyurethane foams. Journal of applied polymer science, 102(6), 5918-5926.

Perego, P., Converti, A., & Del Borghi, M. (2003). Effects of temperature, inoculum size and starch hydrolyzate concentration on butanediol production by *Bacillus licheniformis*. Bioresource Technology, 89(2), 125-131.

Pervez, S., Aman, A., Iqbal, S., Siddiqui, N. N., & Ul Qader, S. A. (2014). Saccharification and liquefaction of cassava starch: an alternative source for the production of bioethanol using amylolytic enzymes by double fermentation process. BMC biotechnology, 14, 1-10.

Petrov, K., & Petrova, P. (2009). High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. Applied Microbiology and Biotechnology, 84, 659-665.

Pfleger, B. F., & Takors, R. (2023). Recent progress in the synthesis of advanced biofuel and bioproducts. Current Opinion in Biotechnology, 80, 102913.

Psaki, O., Maina, S., Vlysidis, A., Papanikolaou, S., de Castro, A. M., Freire, D. M., ... & Koutinas, A. (2019). Optimisation of 2,3-butanediol production by *Enterobacter ludwigii* using sugarcane molasses. Biochemical Engineering Journal, 152, 107370.

Quintana, N., Van der Kooy, F., Van de Rhee, M. D., Voshol, G. P., & Verpoorte, R. (2011). Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. Applied microbiology and biotechnology, 91, 471-490.

Rebecchi, S., Pinelli, D., Zanaroli, G., Fava, F., & Frascari, D. (2018). Effect of oxygen mass transfer rate on the production of 2,3-butanediol from glucose and agro-industrial byproducts by *Bacillus licheniformis* ATCC9789. Biotechnology for biofuels, 11, 1-14.

Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. Plant physiology, 134(3), 1017-1026.

Sekoai, P. T., Awosusi, A. A., Yoro, K. O., Singo, M., Oloye, O., Ayeni, A. O., ... & Daramola, M. O. (2018). Microbial cell immobilization in biohydrogen production: a short overview. Critical reviews in biotechnology, 38(2), 157-171.

Sheng, L., Madika, A., Lau, M. S., Zhang, Y., & Minton, N. P. (2023). Metabolic engineering for the production of acetoin and 2,3-butanediol at elevated temperature in *Parageobacillus thermoglucosidasius* NCIMB 11955. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 11.

Shi, L., & Moser, S. (2021). Transformative climate adaptation in the United States: Trends and prospects. Science, 372(6549), eabc8054.

Soares, R. C., Zangirolami, T. C., Giordano, R. L., Demeke, M. M., Thevelein, J. M., & Milessi, T. S. (2022). Cell immobilization using alginate-based beads as a protective technique against stressful conditions of hydrolysates for 2G ethanol production. Polymers, 14(12), 2400.

Song, C. W., Park, J. M., Chung, S. C., Lee, S. Y., & Song, H. (2019). Microbial production of 2,3-butanediol for industrial applications. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 46(11), 1583-1601.

Song, C. W., Rathnasingh, C., & Song, H. (2021). CRISPR-Cas9 mediated metabolic engineering of a mucoid *Bacillus licheniformis* isolate for mass production of 2,3-butanediol. Biochemical Engineering Journal, 175, 108141.

Song, C. W., Rathnasingh, C., Park, J. M., Lee, J., & Song, H. (2018). Isolation and evaluation of *Bacillus strains* for industrial production of 2,3-butanediol.

Sun, L. H., Wang, X. D., Dai, J. Y., & Xiu, Z. L. (2009). Microbial production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by *Klebsiella pneumoniae*. Applied microbiology and biotechnology, 82, 847-852.

Suttikul, S., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2022). Biotechnological production of optically pure 2,3-Butanediol by *Bacillus subtilis* based on Dissolved Oxygen Control Strategy. Fermentation, 9(1), 15.

Swain, M. R., Natarajan, V., & Krishnan, C. (2017). Marine enzymes and microorganisms for bioethanol production. In Advances in food and nutrition research (Vol. 80, pp. 181-197). Academic Press.

Syu, M. J. (2001). Biological production of 2,3-butanediol. Applied microbiology and biotechnology, 55, 10-18.

Szambelan, K., Nowak, J., & Czarnecki, Z. (2004). Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. Biotechnology Letters, 26(10), 845-848.

Taskin, M. (2013). Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tannin-rich persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. Bioprocess and biosystems engineering, 36, 165-172.

Taskin, M., Esim, N., & Ortucu, S. (2012). Efficient production of l-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. Food and Bioproducts Processing, 90(4), 773-779.

Tempels, T. H., & Van den Belt, H. (2016). Once the rockets are up, who should care where they come down? The problem of responsibility ascription for the negative consequences of biofuel innovations. SpringerPlus, 5(1), 1-12.

Thomsen, M. H., Thygesen, A., & Thomsen, A. B. (2009). Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw. Applied microbiology and biotechnology, 83, 447-455.

Tinôco, D., & Freire, D. M. (2023). Scale-up of 2,3-butanediol production by *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 using constant oxygen transfer rate-based strategy. Fuel, 340, 127603.

Tsigoriyna, L., Ganchev, D., Petrova, P., & Petrov, K. (2021). Highly efficient 2,3-butanediol production by *Bacillus licheniformis* via complex optimization of nutritional and technological parameters. Fermentation, 7(3), 118.

Van Houdt, R., Aertsen, A., & Michiels, C. W. (2007). Quorum-sensing-dependent switch to butanediol fermentation prevents lethal medium acidification in *Aeromonas hydrophila* AH-1N. Research in Microbiology, 158(4), 379-385.

Vikromvarasiri, N., Noda, S., Shirai, T., & Kondo, A. (2023). Investigation of two metabolic engineering approaches for (R, R)-2,3-butanediol production from glycerol in *Bacillus subtilis*. Journal of Biological Engineering, 17(1), 1-11.

Vikromvarasiri, N., Shirai, T., & Kondo, A. (2021). Metabolic engineering design to enhance (R, R)-2,3-butanediol production from glycerol in *Bacillus subtilis* based on flux balance analysis. Microbial cell factories, 20(1), 1-11.

Wang, A., Xu, Y., Ma, C., Gao, C., Li, L., Wang, Y., ... & Xu, P. (2012). Efficient 2,3-butanediol production from cassava powder by a crop-biomass-utilizer, *Enterobacter cloacae* subsp. dissolvens SDM. PLoS One, 7(7), e40442.

Wang, D., Oh, B. R., Lee, S., Kim, D. H., & Joe, M. H. (2021). Process optimization for mass production of 2,3-butanediol by *Bacillus subtilis* CS13. Biotechnology for biofuels, 14(1), 1-11.

Xia, J., Xu, Z., Xu, H., Liang, J., Li, S., & Feng, X. (2014). Economical production of poly (ε-l-lysine) and poly (l-diaminopropionic acid) using cane molasses and hydrolysate of streptomyces cells by *Streptomyces albulus* PD-1. Bioresource technology, 164, 241-247.

Xiao, Z., Gu, R., Hou, X., Zhao, J. Y., Zhu, H., & Lu, J. R. (2017). Non-sterilized fermentative production of acetoin with 2,3-butanediol as a main byproduct from maize hydrolysate by a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 92(11), 2845-2852.

Xiao, Z., Wang, X., Huang, Y., Huo, F., Zhu, X., Xi, L., & Lu, J. R. (2012). Thermophilic fermentation of acetoin and 2,3-butanediol by a novel *Geobacillus* strain. Biotechnology for biofuels, 5(1), 1-11.

Yan, P. F., Feng, J., Dong, S., Wang, M., Khan, I. A., & Wang, Y. (2017). Production of high levels of chirally pure d-2,3-butanediol with a newly isolated *Bacillus* strain. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 5(11), 11016-11023.

Yang, T. W., Rao, Z. M., Zhang, X., Xu, M. J., Xu, Z. H., & Yang, S. T. (2013). Effects of corn steep liquor on production of 2,3-butanediol and acetoin by *Bacillus subtilis*. Process Biochemistry, 48(11), 1610-1617.

Yang, T., Rao, Z., Zhang, X., Lin, Q., Xia, H., Xu, Z., & Yang, S. (2011). Production of 2,3-butanediol from glucose by GRAS microorganism *Bacillus amyloliquefaciens*. Journal of basic microbiology, 51(6), 650-658.

Yang, T., Rao, Z., Zhang, X., Xu, M., Xu, Z., & Yang, S. T. (2013). Improved production of 2,3-butanediol in *Bacillus amyloliquefaciens* by over-expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 2, 3-butanediol dehydrogenase. PLoS One, 8(10), e76149.

Yu, E. K., & Saddler, J. N. (1982). Enhanced production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid. Applied and Environmental Microbiology, 44(4), 777-784.

Zeng, A. P., & Sabra, W. (2011). Microbial production of diols as platform chemicals: recent progresses. Current Opinion in Biotechnology, 22(6), 749-757.

Zhang, C., Zhou, X., Tong, T., & Ge, J. (2022). Acetic acid acting as a signaling molecule in the quorum sensing system increases 2,3-butanediol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 52(5), 487-497.

Zhang, L., Yang, Y., Sun, J. A., Shen, Y., Wei, D., Zhu, J., & Chu, J. (2010). Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30. Bioresource Technology, 101(6), 1961-1967.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Mehmet Akif ÖMEROĞLU
Doğum tarihi:
Doğum Yeri:
Uyruğu:
E Mail:
Eğitim Bilgileri
Lisans: Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü (İngilizce) (2016)
Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı (2020)
Doktora: Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı (2023)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: İleri (C1)
Tezden Üretilmiş Yayınlar
-