T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ATIK ARPADAN *RHODOBACTER SPHAEROIDES* İLE BİYOHİDROJEN VE AMİNOLEVULİNİK ASİT ÜRETİMİ

Ayça CEYLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz-2012
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Ayça CEYLAN

Tarih: 19.07.2012

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ATIK ARPADAN *RHODOBACTER SPHAEROIDES* İLE BİYOHİDROJEN VE AMİNOLEVULİNİK ASİT ÜRETİMİ

Ayça CEYLAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gökhan KARS

2012, 91 Sayfa

Jüri
Yrd. Doç. Dr. Gökhan KARS
Doç. Dr. Tuna UYSAL
Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ

Yenilenebilir ve sürdürülebilir bir enerji taşıyıcısı olarak biyohidrojen geleceğin alternatif enerji kaynaklarındandır. Biyohidrojen çeşitli organik atık ve biyokütleler kullanılarak fotosentetik bakteriler ile üretilebilmektedir. Ayrıca bu biyoişlem sırasında biyohidrojenle birlikte B12 vitamini, poli hidroksi bütirat (PHB), 5-aminolevulinik asit (5-ALA) gibi katma değeri yüksek yan ürünler de elde edilebilir. Bu çalışmada da atık arpadan *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 kullanılarak biyohidrojen ve 5-ALA üretilmesi planlanmıştır.

Atık arpalardaki nişasta yüksek sıcaklıkta asit hidroliz işlemi (121^{o}C'de 30 dakika, pH:3) ile bakteriler tarafından kullanılır hale getirildi. Arpa hidrolizatındaki amonyum miktarı 2.5 ppm (Norateks amonyum kiti); toplam şeker miktarı 11.58-48.14 g/L (spektrofotometrik yöntem); toplam fenol miktarı 1012.67 µg GAE/g arpa (Folin ciocalteu yöntemi) olarak hesaplandı. Ayrıca ICP-MS ile hidrolizatların element analizleri de yapıldı. Hidrolizatlardan 5-11 g/L arasında şeker yoğunluklarında besiyerleri hazırlandı ve pH:7'ye ayarlandı. Hazırlanan besiyerleri, % 10 ekim yapılarak anaerobik koşullarda 29 ^{o}C'de ışık altında inkübe edildi. Biyoreaktörlerde 0.34 L H_2/L kültür ile 0.50 ml H_2/ml kültür arasında üretim gerçekleşti. Gaz kromotografisi analizlerine göre üretilen gazın % 80-95'inin H_2 olduğu belirlendi. Besiyerlerindeki hücre dışı ALA miktarı 20.448-67.424 µM olduğu spektrofotometrik yöntemle hesaplandı. Böylece maliyet etkin bir yöntemle aynı koşullarda yüksek katma değerli ürünler olan H_2 ve ALA üretildi.

Anahtar kelimeler: 5-ALA, atık arpa, biyohidrojen, *Rhodobacter sphaeroides*

ABSTRACT

MS THESIS

BIOHYDROGEN AND AMINOLEVULINIC ACID PRODUCTION FROM WASTE BARLEY BY *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

Ayça CEYLAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOLOGY

Advisor: Assist. Prof. Dr. Gökhan KARS

2012, 91 Pages

Jury
Assist. Prof. Dr. Gökhan KARS
Associate Prof. Dr. Tuna UYSAL
Assist. Prof. Dr. Aytaç KOCABAŞ

Biohydrogen as renewable and sustainable energy carrier is among the future alternative energy sources. Biohydrogen could be produced using organic waste and biomass by photosynthetic bacteria. High value-added byproducts such as vitamin B12, poly hydroxy butirat (PHB), 5-aminolevulinic acid can also be obtained in the same bioprocess in addition to biohydrogen. In this study, biohydrogen and 5-aminolevulinic acid (5-ALA) production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 using barley waste was planned.

Starch in the barley waste were rendered to be utilized by bacteria via acid hydrolysis at high temperature (121^{o}C, 30 minute, pH:3). 2.5 ppm ammonium (Norateks ammonium kit), 11.58-48.14 g/L total sugar (spectrophotometric method); 1012.67 µg GAE/g barley (Folin ciocalteu method) total phenol were determined in barley hydrolysate. Additionally, elements of hydrolysate were analyzed with ICP-MS. Media having different sugar concentrations (5-11g/L) were prepared and adjusted to pH:7. After 10% inoculation, media were incubated at 29^{o}C in anaerobic conditions under light. 0.34-0.50 ml H_2/ml culture was produced in bioreactors. 80-95% of produced total gas was hydrogen according to gas chromatography analysis. Extracellular 5-ALA amount in media was calculated as 20.448-67.424 µM by spectrophotometric method. Thus, high value-added products, H_2 and ALA, were produced in the same conditions via cost-effective process.

Key words: 5-Aminolevulinic acid, barley waste, biohydrogen, *Rhodobacter sphaeroides*

ÖNSÖZ

Enerji ihtiyacının hızla artması ve günümüzde yaygın olarak kullanılan yenilenemeyen enerji kaynaklarının gelecek için yetersiz olması; ucuz, yenilenebilir bir enerji kaynağı arayışını gündeme getirmiştir. Bu arayışta, temiz enerji olmasından, yenilenebilir kaynaklardan elde edilebilmesinden ve yüksek enerji taşıma kapasitesine sahip olmasından dolayı en güçlü adaylardan biri "hidrojen" olarak görülmektedir. İyi bir enerji taşıyıcı olmasının yanı sıra biyolojik üretimi sırasında yüksek katma değerli yan ürünlerin de üretilmesi; hidrojeni geleceğin enerjisi haline getirmektedir.

Tezimin her aşamasında benden bilgilerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Gökhan Kars'a; yardımlarından ve desteğinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Meltem Demirel Kars'a, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümünden Prof. Dr. İnci Eroğlu'na ve doktora öğrencisi Dominic Deo Androga'ya, tez projemi destekleyerek gerekli maddi olanağı sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne çalışma arkadaşım Ümmühan Alparslan'a ve desteklerini benden esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ayça CEYLAN
KONYA-2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ixx**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **5**

2.1. Hidrojenin Tarihçesi 5
2.2. Hidrojenin Üretim Yolları 5
2.2.1 Biyolojik yöntemle hidrojen üretimi 7
2.2.1.1. Biyofotoliz 8
2.2.1.1.1. Doğrudan biyofotoliz 8
2.2.1.1.2. Dolaylı biyofotoliz 10
2.2.1.2. Biyolojik yolla suyun gaza dönüşümü 12
2.2.1.3. Karanlık fermantasyon 12
2.2.1.4. Fotofermantasyon 17
2.3. *Rhodobacter sphaeroides* 25
2.4. Hidrojen Üretim Metabolizması 26
2.4.1. Enzim sistemleri 28
2.4.1.1. Nitrojenaz 28
2.4.1.2. Hidrojenaz 29
2.5. Biyohidrojen Üretiminde Substrat Olarak Atık Arpanın Kullanılması 30
2.6. Üretilen Yan Ürünler 31
2.6.1. 5-Aminolevulinik asit (5-ALA) biyosentezi ve metabolik yolaklar 31
2.6.1.1. 5-Aminolevulinik asitin (5-ALA) uygulama alanları 34

3. MATERYAL VE YÖNTEM **36**

3.1. Kullanılan Mikroorganizma 36
3.1.1. Büyüme besiyeri ve kültür şartları 36
3.1.1.1. *R. sphaeroides* için genel üreme koşulları 36
3.1.1.2. Kültür koşulları 38
3.2. Hidrojen ve ALA Üretiminde Kullanılan Substrat 39
3.2.1. Atık arpalarda uygulanan analizler 40
3.2.1.1. Ham yağ tayini 40
3.2.1.2. Ham protein tayini 41
3.2.1.3. Toplam nişasta miktarının belirlenmesi 42
3.2.2. Atık arpalarda asit hidroliz ön işlemi 43
3.2.2.1. Arpa hidrolizatlarında gerçekleştirilen analizler 43
3.2.2.1.1. Toplam şeker miktarının belirlenmesi 43
3.2.2.1.2. Arpa hidrolizatlarında element analizi 45

3.2.2.1.3. Toplam fenol miktarlarının belirlenmesi 45
3.2.2.1.4. Toplam amonyum miktarının belirlenmesi..... 46
3.2.3. Arpa hidrolizatlarından besiyeri hazırlanması 47
3.2.3.1. Arpa besiyerlerinde *R. sphaeroides*'in üreme eğrisi ve besiyerindeki pH değişim eğrisinin oluşturulması..... 51
3.2.4. Hidrojen düzeneğinin kurulması 51
3.2.4.1. Gaz kromotografisi ile hidrojen miktarının belirlenmesi 54
3.2.5. ALA üretimi için besiyeri tasarımı..... 54
3.2.5.1. Hücre dışı ALA miktarının spektrofotometrik yolla belirlenmesi 56

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 59

4.1. Atık Arpadaki Ham Yağ, Toplam Protein ve Nişasta Miktarları 59
4.2. Arpa Hidrolizatlarına Uygulanan Analizler..... 59
4.2.1. Arpa hidrolizatlarında bulunan toplam şeker miktarı..... 59
4.2.2. Arpa hidrolizatlarında bulunan bazı elementlerin miktarları 61
4.2.3. Arpa hidrolizatlarının toplam fenol miktarları 63
4.2.4. Arpa hidrolizatlarının amonyum miktarı..... 64
4.3. *R.sphaeroides*'in Arpa Besiyerlerindeki Üreme Eğrisi ve Besiyerlerinin pH Değişim Eğrisi 65
4.4. Arpa Besiyerlerinde Üretilen Hidrojen Miktarı..... 68
4.5. Arpa Hidrolizatlarından 5-Aminolevulinik Asit Üretimi 72

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 74

5.1 Sonuçlar 74
5.2 Öneriler 75

KAYNAKLAR 76

EKLER 83

ÖZGEÇMİŞ 91

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-ALA : 5-Aminolevulinik asit

ADP : Adenozin difosfat

Al : Aluminyum

ATP : Adenozin trifosfat

B : Bor

B&P : Biebl ve Pfenning

C : Karbon

Ca : Kalsiyum

CaCl : Kalsiyum klorür

$CH_2CH_2CH_2COOH$ ($C_4H_8O_2$) : Butirat

CH_3COCoA : Asetil CoA

CH_3COOH ($C_2H_4O_2$) : Asetat

$CH_3COCOOH$: Piruvat

CH_4 : Metan

$CH_4H_6O_5$: Malat

$C_3H_6O_2$: Propiyonat

$C_3H_6O_3$: Laktat

$C_6H_{12}O_6$: Glukoz

cm : Santimetre

Co : Kobalt

CO : Karbonmonoksit

CO_2 : Karbondioksit

CoA : Koenzim A

$CoCl_2$: Kobalt (II) klorit

Cr : Krom

Cu : Bakır

$CuCl_2$: Bakır (II) klorit

$CuSO_4$: Bakır (II) sülfat

Dk : Dakika

e^- : Elektron

EDTA : Etilen diamin tetra asetik asit

Fd : Ferrodoksin

Fe : Demir

G : Gram

GAE : Gallik asit eş değeri

H^+ : Hidrojen iyonu (proton)

H_2 : Hidrojen molekülü

H_3BO_3 : Borik asit

HCl : Hidroklorik asit

HCOOH : Formik asit

H_2O : Su

H_2SO_4 : Sülfirik asit

K : Potasyum

K. a. : Kuru ağırlık

Kg : Kilogram

K_2HPO_4 : Dipotasyum fosfat

L : Litre

LHC : Işık toplama kompleksi (Light-harvesting complex)

M : Molar

Mbç : Mega baz çifti

Mg : Magnezyum

$MgSO_4$: Magnezyum sülfat

Mj : Megajoule

ml : Mililitre

mm : Milimetre

mmol : Milimol

Mn : Mangan

$MnCl_2$: Mangan (II) klorit

Mo : Molibden

n : Mol

N : Normalite

N_2 : Azot molekülü

Na : Sodyum

NaCl : Sodyum klorür

$NaCO_3$: Sodyum Karbonat

NAD : Nikotinamid adenin dinükleotit

Na_2MoO_4 **:** Sodyum molibdat

NaOH **:** Sodyum Hidroksit

Na_2SO_4 **:** Sodtum sülfat

NFOR **:** Ferrodoksin oksidoreduktaz

NH_3 **:** Amonyum

NH_4 **:** Amonyak

NH_4BO_3 **:** Amonyum borat

$(NH_4)_2SO_4$ **:** Amonyum Sülfat

Ni **:** Nikel

$NiCl_2$ **:** Nikel (II) klorit

nm **:** Nanometre

O_2 **:** Oksijen

OD **:** Optik dansite

PEM **:** Proton değişim membran (Proton exchange membran)

PFHL **:** Piruvat-format hidrojenliaz

PFOR **:** Piruvat-ferrodoksin oksidoredüktaz

PHB **:** Poli hidroksi bütirat

PNS **:** Mor sülfürsüz bakteriler (Purple non-sulfur)

PP IX **:** Protoporfirin IX

PS I **:** Fotosistem I

PS II **:** Fotosistem II

RM **:** Reaksiyon Merkezi

S **:** Kükürt

s **:** saat

TCA **:** Trikarboksilik asit

v **:** Hacim

V **:** Vanadyum

VFA **:** Uçucu yağ asitleri

Zn **:** Çinko

$ZnCl_2$ **:** Çinko klorit

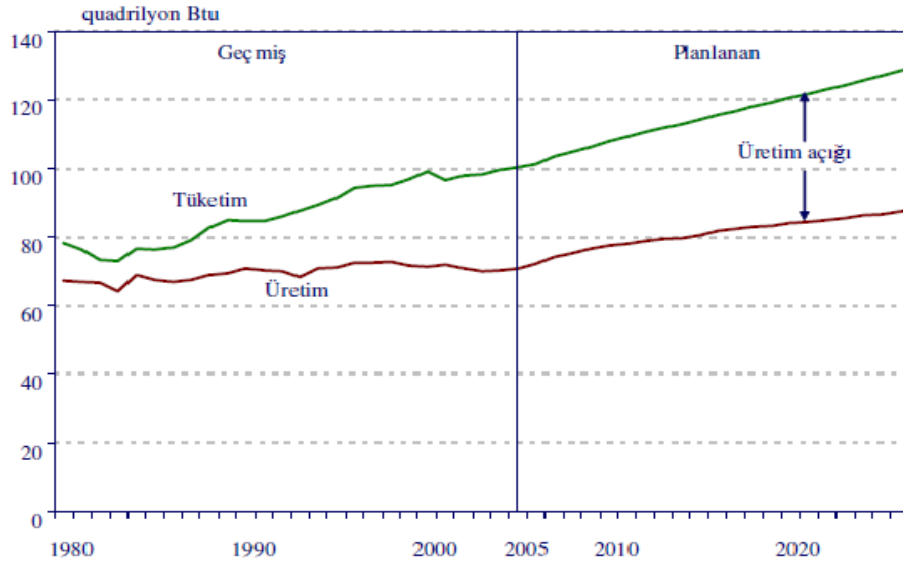
µL **:** Mikrolitre

µm **:** Mikrometre

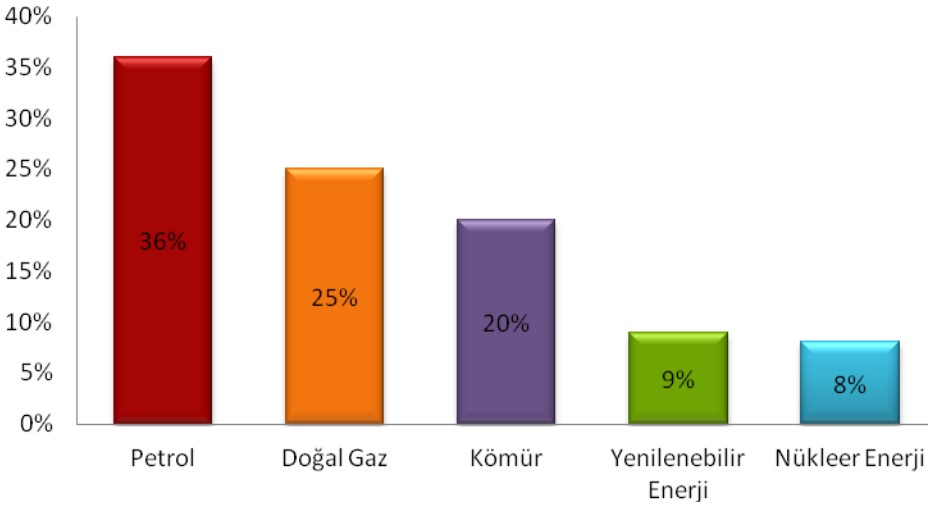
µM **:** Mikromolar

1. GİRİŞ

Hızla artan dünya nüfusuna paralel olarak dünyanın enerji ihtiyacı da hızla artmaktadır (Şekil 1.1) ve bu ihtiyacın çoğu petrol, kömür, doğal gaz gibi fosil yakıtlardan karşılanmaktadır (Şekil 1.2). Fakat hızla tükenmekte olan fosil yakıtlar, gelecekte dünyanın enerji ihtiyacını karşılamakta yetersiz kalacaktır.



Şekil 1.1. Dünya enerji üretim ve tüketim değerleri (Anonim, 2010)



Şekil 1.2. Enerji kaynaklarının dünyada kullanılma oranları (Anonymous, 2012)

Fosil yakıtlar gelecekteki enerji ihtiyacını karşılamada yetersiz olmasının yanı sıra, fosil yakıtların kullanımı doğaya zararlı maddelerin salınımına da sebep olur. Bu zararlı maddelerden bazıları, sera gazlarından olan metan ve karbondioksittir. Fazla miktarda fosil yakıt kullanılması, bu sera gazlarının atmosferde birikmesine ve bunun sonucunda da küresel ısınmaya sebep olur. Bu nedenlerle yenilenebilir ve sürdürülebilir enerji kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Güneş enerjisi, hidro enerji, jeotermal enerji, rüzgar enerjisi ve biyokütle enerjisi yenilenebilir enerji kaynaklarını oluşturur. Son zamanlarda bu enerji kaynaklarından biyokütle enerjisi ön plana çıkmıştır. Biyokütle enerjisinin avantajı, yaygın ve ucuz maliyetle elde edilebilir olmasıdır. Odun, yağlı tohumlar, karbonhidrat, elyaf ve protein bitkileri, bitkisel artıklar, hayvansal, evsel ve endüstriyel atıklar biyokütle içerisinde değerlendirilmektedir (Erengezgin, 2001). Biyokütle kullanılarak enerji elde edilmesinin çeşitli yolları vardır ve en çok dikkat çeken yollardan biri yüksek değerde enerji taşıma kapasitesine sahip hidrojenin biyokütleden üretimidir.

Hidrojen, periyodik tabloda ilk ve evrende en çok bulunan (% 75 oranında) elementtir. En hafif gazdır. Kokusuz ve renksizdir, doğada serbest halde bulunmaz, diğer elementlerle birleşik haldedir. Temiz yanması ve yüksek enerji taşıyabilme kapasitesinden dolayı çoğu bilim adamlarınca 21. yüzyılın enerjisi olarak kabul edilmektedir (Şentürk ve Büyükgüngör, 2010).

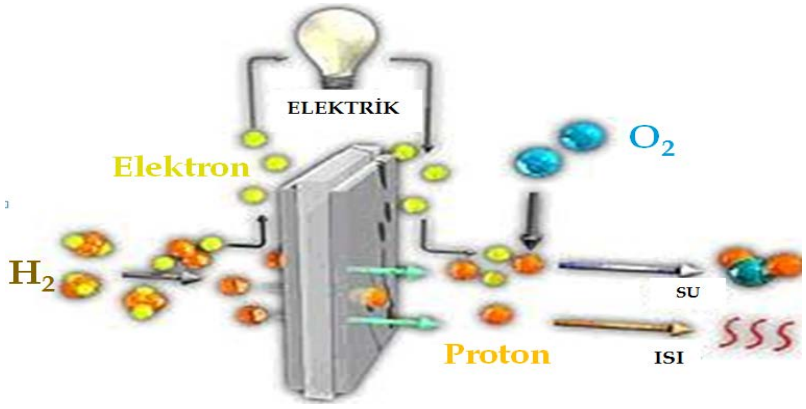
Hidrojen bir enerji kaynağı değil, enerji taşıyıcısıdır. Yüksek miktarda enerji taşıyabilme kapasitesine sahiptir. Kütle başına verdiği enerji miktarı, fosil yakıtlardan, doğal gazdan ve hatta bazı yenilenebilir enerji kaynaklarından daha yüksektir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Hidrojen ile çeşitli enerji kaynaklarının kütle başına verdiği enerji miktarlarının karşılaştırılması (Edwards ve ark., 2008)

Depolama Şekli	Spesifik Enerji Yoğunluğu (Mj/kg)
Hidrojen	120-142
Doğal Gaz	38-50
Petrol	41.868
Biyodizel	37.7
Etanol	23.4-26.8
Kömür	29.3-33.5

Hidrojenin yanması esnasında doğaya zararlı herhangi bir madde ve kül oluşmaz, yalnızca su buharı oluşur ve bu su buharından tekrar hidrojen elde etmek mümkündür. Hidrojen, petrol ve doğal gaza göre daha yüksek alevlenme sıcaklığına ($570^{o}C$) sahip olduğundan daha güvenlidir. Hidrojenin üretilebilmesi ışık enerjisi varlığı yeterlidir. Oysa fosil yakıtların oluşumu için çok uzun bir zaman gereklidir. Hidrojen üretimi organik atıkların enerji olarak geri dönüştürülebilmesini sağlar. Ayrıca hidrojenin biyolojik işlemlerle üretilmesi esnasında elde edilen değerli yan ürünler maliyet etkin bir işlem oluşumuna katkı sağlar.

Hidrojen, ekonomik depolama ve kullanım avantajına sahiptir. Gaz veya sıvı olarak çelik depolarda; gaz olarak metal hidritler, yapay veya doğal zeolitler içinde depolanabilir (Erengezgin, 2001). Hidrojenin ısı veya elektrik olarak günlük kullanımı proton değişim membranlı (PEM) yakıt pilleri ile gerçekleşmektedir. Yakıt pili içerisinde hidrojen gazı elektron kaybederek hidrojen iyonuna dönüşür. Elektronlar elektrik üretiminde kullanılırken; hidrojen iyonları yakıt pilinden geçtikten sonra oksijenle birleşerek su ve ısı enerjisini oluşturur (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. PEM yakıt pilleri aracılığıyla hidrojenden ısı ve elektrik elde edilmesi (Anonim, 2009)

Biyokütleden hidrojen üretimi, termokimyasal veya biyolojik işlemlerle gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada biyolojik işlemler yoluyla hidrojen üretilmiştir.

Biyolojik işlemlerle hidrojen üretiminde, hidrojenle birlikte yüksek katma değerli yan ürünler elde edilebilir. İlaç sanayisinde, cerrahi malzemelerde ve ambalajlarda kullanılan ve çevreyi kirletmeksizin biyolojik olarak bozunabilen bir ürün olan polihidroksibütirat (PHB); tıp, tarım ve biyoteknolojide çok önemli kullanım alanları olan 5-Aminolevulinik asit (5-ALA) hidrojenle birlikte üretilen yüksek katma değerli yan ürünlere örnek olarak verilebilir. Bu çalışmada substrat olarak atık arpa

kullanılarak uygun maliyetle hidrojenle birlikle yüksek katma değerli bir ürün olan 5-ALA'nın üretimi amaçlanmıştır.

5-ALA; porfirin, B12 vitamini ve klorofil gibi tetrapirollerin öncül maddesidir ve tetrapirollerin biyosentezini düzenler (Sasaki ve ark., 2002). 5-ALA'nın tarım, tıp ve biyoteknolojide çok çeşitli kullanım alanları vardır: Tarımda büyümeyi teşvik edici etmen olarak; biyobozunur, seçici bir böcek ilacı ve herbisit (Rebeiz ve ark., 1988) olarak kullanılır. Ayrıca bitkilere tuza ve soğuğa dayanlılık özelliği kazandırır (Sasaki ve ark., 2002). Tıpta ise tümör teşhisi ve kanser tedavisinde kullanılır.

Bu çalışmada kolay ve düşük maliyetle elde edilebilen atık arpalar kullanılarak yüksek katma değerli ürünler olan biyohidrojen ve 5-ALA'nın fotofermantasyon yoluyla aynı anda maliyet etkin bir işlemle üretilmesi ve böylelikle biyorafineri kavramı oluşturulması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Hidrojenin Tarihçesi

Hidrojenin ilk olarak elde edilmesi 16. yüzyılda İsviçreli simyacı Paracelcus tarafından, asitlerin bazı metaller üzerine etkisi araştırılırken gerçekleştirildi. Hidrojenin adlandırılması ise 1785 yılında Lavoisier tarafından yapılmıştır. Lavoisier ısıtılmış bir bakır tüpün içinde suyun ayrıştırılması sonucunda "yanmayan hava" üretimi gerçekleştirmiştir ve bu gaza "HİDROJEN" adı verilmiştir (Anonim, 2012).

2.2. Hidrojen Üretim Yolları

Hidrojen molekülü, hidrokarbonlar (fosil yakıtlar), su, biyokütle gibi birçok maddenin içerisinde bulunur. Çeşitli enerji kaynakları (ısı, elektrik enerjisi, yenilenebilir [güneş, rüzgar, jeotermal, dalga] enerjiler, nükleer enerji) kullanılarak bu maddelerden termokimyasal, elektrokimyasal veya biyolojik yöntemlerle hidrojen üretmek mümkündür (Çizelge 2.1) (Erbaş ve Erbaş, 2008).

Çizelge 2.1. Kullanılan ham maddeye, uygulanan işleme ve gerekli olan enerji kaynaklarına göre hidrojen üretimi (Amerika Birleşik Devletleri Enerji Bakanlığı [USDOE], 2004)

HAM MADDE	ÜRETİM YOLLARI	ENERJİ KAYNAKLARI
FOSİL YAKITLAR -Kömür -Doğalgaz -Petrol BİYOKÜTLE ATIK MADDELER SU	TERMOKİMYASAL -Buhar reformasyonu -Kısmi oksidasyon -Gazlaştırma -Piroliz ELEKTROKİMYASAL -Elektroliz -Foto-elektrokimyasal BİYOLOJİK -Fotoliz -Fotofermantasyon -Karanlık fermantasyon -Kombine sistemler	TERMAL -Fosil -Yenilenebilir -Nükleer ELEKTRİK -Fosil -Yenilenebilir -Nükleer FOTOLİTİK -Güneş

Hidrojenin termokimyasal üretim yolları arasında doğalgazın buhar reformasyonu, fosil yakıtların kısmi oksidasyonu, kömürün ve biyokütlenin gazlaştırılması ile biyokütlenin pirolizi yer alır. Günümüzde üretilen hidrojenin % 90' ı doğalgazın buhar reformasyonu ile elde edilmektedir. Kömürün gazlaştırılması ve elektroliz de diğer en çok tercih edilen yöntemlerdendir (Das ve Veziroğlu, 2001). Biyokütlenin gazlaştırılması yöntemi ise ham madde olarak ucuz ve yenilenebilir bir kaynak kullanıldığından çok düşük maliyetli bir üretim yoludur.

Termokimyasal üretimde yüksek sıcaklık (800-900^{o}C) ve basınç gereksinimi bu yöntemin sınırlayıcı faktörlerindendir. Ayrıca termokimyasal üretimde hidrojenle (H_2) beraber karbondioksit (CO_2), metan (CH_4) gibi sera gazları da oluştuğundan çevre açısından sağlıklı bir yöntem de değildir.

Elektrokimyasal yöntemlerden biri olan suyun elektrolizinde, suyun içinden elektrik akımı geçirilerek suyun parçalanması sağlanır ve böylelikle hidrojen elde edilir. Bu yöntem güneş, rüzgar, dalga enerjisi, jeotermal ve hidrolik enerji gibi yenilenebilir enerji kaynakları kullanılmadığı sürece en pahalı yöntemdir ve bu yöntemde yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanılması, yöntemin çevre açısından temiz bir hidrojen üretim yolu olabilmesini de sağlayacaktır (Erbaş ve Erbaş, 2008). Günümüzde foto-elektrokimyasal yöntem adı altında suyun elektrolizi için gerekli olan enerjinin güneş enerjisinden karşılandığı bir yöntem ile gerekli enerjinin rüzgar enerjisinden karşılandığı bir yöntem geliştirilmiştir (Öztürk, 2009). Foto-elektrokimyasal yöntemin olumsuz yanı çok yüksek bir maliyete sahip olmasıdır. Rüzgar enerjisinin kullanıldığı elektroliz işleminin olumsuz yanı ise rüzgar türbinlerinin yüksek gürültüye sebep olması ve haberleşme sistemlerinden dağılan elektro-manyetik dalgaları etkilemesidir (Öztürk, 2009).

Termokimyasal yöntemde yüksek sıcaklık ve basınca gerek duyulması, ham madde olarak çoğunlukla fosil yakıtların kullanılması, ayrıca çevreye zararlı gazların salınması; elektrokimyasal yöntemlerin de yüksek enerji gereksinimi dolayısıyla yüksek maliyete ihtiyaç duyulması gibi tüm olumsuz yanları göz önüne alındığında biyolojik yolla hidrojen üretimi, geliştirildiği takdirde en avantajlı yol olarak görülmektedir. Biyolojik yöntemle hidrojen üretimi normal sıcaklık ve basınçta gerçekleştiği için enerji ihtiyacı düşüktür. Bu yöntemle hidrojen üretimi esnasında doğaya zararlı herhangi bir madde salınmadığı gibi atık maddelerden de hidrojen üretimi mümkün olmaktadır. Ayrıca biyolojik yolla hidrojen üretiminde enerji kaynağı olarak yenilenebilir ve sürdürülebilir enerji kaynakları kullanılabilir.

2.2.1.Biyolojik yöntemle hidrojen üretimi

Çeşitli fotosentetik mikroorganizmaların yenilenebilir enerji kaynaklarını (güneş, su, biyokütle) kullanarak, doğal metabolizmaları sonucu hidrojen üretmesi ve mikroorganizmaların bu özelliğinin hidrojen üretiminde kullanılması biyolojik yöntemle hidrojen üretimi olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemle üretilen hidrojen ise "biyohidrojen" olarak adlandırılmaktadır. Biyohidrojen üreten fotosentetik mikroorganizmalar arasında yeşil algler, mavi-yeşil algler (Cyanobacteria), fermantatif bakteriler ve fotosentetik bakteriler bulunur (Das ve Veziroğlu, 2001). Çizelge 2.2'de hidrojen üreten mikroorganizmalar verilmiştir.

Çizelge 2.2. Biyohidrojen üreten mikroorganizma çeşitleri ve türleri (Das ve Veziroğlu, 2001)

Mikroorganizma Çeşitleri	Türleri
Yeşil Algler	*Chlamydomonas reinhardii* *C. moewusii* *Scenedesmus obliquus*
Siyanobakteriler **Heterocystous**	*Anabaena azollae* *Anabaena CA* *A. variabilis* *A. cylindrica* *Nostoc muscorum* *N. spongiaeforme* *Westiellopsis prolica*
Fotosentetik Bakteriler	*Chlorobium limicola* *Chloroexu aurantiacus* *Chromatium sp. Miami* PSB 1071 *Halobacterium halobium* *Rhodobacter sphaeroides* *R. capsulatus* *R. sulidophilus* *Rhodopseudomonas sphaeroides* *R. capsulata* *R. palustris* *Rhodospirillum rubnum* *Thiocapsa roseopersicina*
Fermentatif Bakteriler	*Citrobacter intermedius* *Clostridium butyricum* *C. pasteurianum* *Desulfovibrio vulgaris* *Enterobacter aerogenes* *E. cloacae* *Escherichia coli* *Megasphaera elsdenii*

Biyolojik yöntemle biyohidrojen üretimi diğer yöntemlere oranla daha avantajlıdır, çünkü:

- ✓ Biyohidrojen üretimi esnasında zararlı maddeler oluşmaz
- ✓ Düşük basınç ve sıcaklık gibi daha ılımlı şartlarda gerçekleşebilir.
- ✓ Çeşitli atıkların enerji üretiminde değerlendirilmesine olanak sağlar.

Biyohidrojen üretimi üç temel grupta incelenir:

1. Biyofotoliz
   - ♦ Doğrudan biyofotoliz
   - ♦ Dolaylı biyofotoliz
2. Biyolojik yolla suyun gaza dönüşümü
3. Fermantasyon
   - ♦ Karanlık fermantasyon
   - ♦ Fotofermantasyon
   - ♦ Kombine sistemler

2.2.1.1. Biyofotoliz

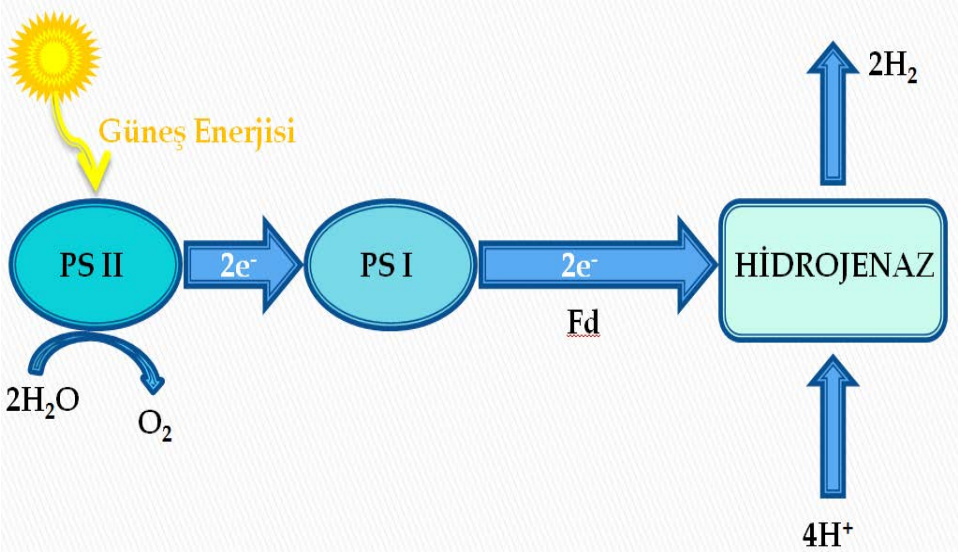
Yeşil ve mavi-yeşil algler tarafından suyun hidrojen ve oksijene parçalanması işlemidir (Genç, 2009). Biyofotoliz işlemi doğrudan biyofotoliz ve dolaylı biyofotoliz olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilir.

2.2.1.1.1. Doğrudan biyofotoliz

Doğrudan biyofotoliz, güneş enerjisi kullanılarak su molekülünün oksijen ve hidrojen iyonlarına dönüştürüldüğü ve sonrasında hidrojenaz enzimi aktivitesiyle hidrojen iyonlarından hidrojen gazı elde edildiği yöntemdir (Genç, 2009; Şentürk ve Büyükgüngör, 2010).

Güneş enerjisinin kimyasal enerji olarak hidrojen üretiminde kullanılmasını sağlayan yapı, mikroalglerde bulunan fotosentetik sistemlerdir. Doğrudan biyofotolizde fotosistem I (PS I) ve fotosistem II (PS II) olmak üzere iki çeşit fotosentetik sistem kullanılır. PS II'de alınan güneş enerjisi, kimyasal enerjiye dönüştürülerek su moleküllerinin hidrojen iyonlarına ve oksijene parçalanmasında kullanılır. Suyun parçalanmasıyla elde edilen iki elektron PS I aracılığıyla ferrodoksine (fd) aktarılır.

Daha sonra ferrodoksinden de hidrojenaz enzimine aktarılan elektronlar, hidrojenaz enzimi aktivitesi sonucu hidrojen iyonlarıyla birleşir ve hidrojen gazı oluşturulur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Doğrudan biyofotoliz yöntemi ile hidrojen üretimi (Leung ve ark., 2006)

$$2H_2O \xrightarrow{\text{Işık Enerjisi}} 2H_2 + O_2 \qquad (2.1)$$

Doğrudan biyofotoliz ökaryotik yeşil algler ile prokaryotik mavi-yeşil alglerde (siyanobakteriler), hidrojenaz enziminin aktivitesiyle gerçekleştirilir. Biyohidrojen üretiminde kullanılan hidrojenaz enzimi, oksijene son derece duyarlı olduğundan hidrojen üretimi için anaerobik ortam veya mikroaerobik ortam (ortamdaki oksijen miktarı % 0.1'den az olmalı) gerekmektedir (Şentürk ve Büyükgüngör, 2010). Yeşil alglerden *Chlamydomonas reinhardtii* fotosentez sonucu ürettiği oksijeni solunum reaksiyonu ile kullandığından, doğrudan biyofotoliz ile hidrojen üreten mikroorganizmaların en iyi bilinen örneklerinden biridir.

Doğrudan biyofotolizin olumsuz yanları çok yavaş gerçekleşmesi ve diğer biyolojik yolla hidrojen üretim yöntemlerine oranla çok düşük hidrojen verimine sahip olmasıdır.

2.2.1.1.2. Dolaylı biyofotoliz

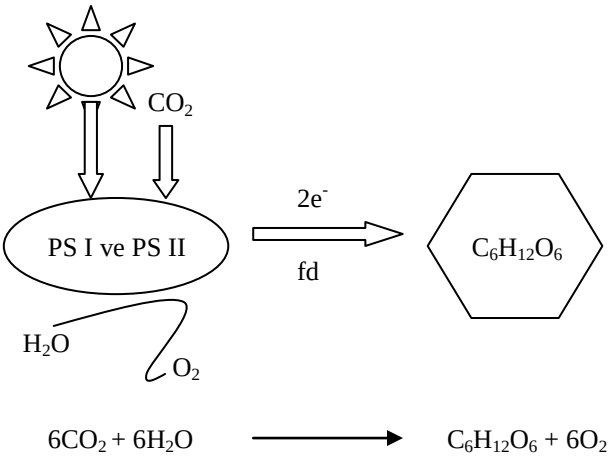
Dolaylı biyofotolizde fotosentetik mikroorganizma tarafından fotosentez yoluyla ilk olarak biyokütle üretilir ve daha sonra bu biyokütleden hidrojen elde edilir. Bu yöntem fototrofik mikroorganizmalar olan Siyanobakterilerin (mavi-yeşil algler) hem hidrojenaz hem de nitrojenaz enzimleri aktivitesiyle gerçekleştirilir. Siyanobakteriler gram pozitif bakterilerdir. Hidrojen üretiminde en iyi bilinen Siyanobakterilere *Anabaena cylindrica* ve *Anabaena variabilis* örnek olarak verilebilir.

Manish ve Banerjee (2008)'nin çalışmasında mutant *A. variabilis* türünde gerçekleşen dolaylı biyofotolizde hidrojen üretim hızı 0.355 mmol/saat.L olarak açıklanmıştır.

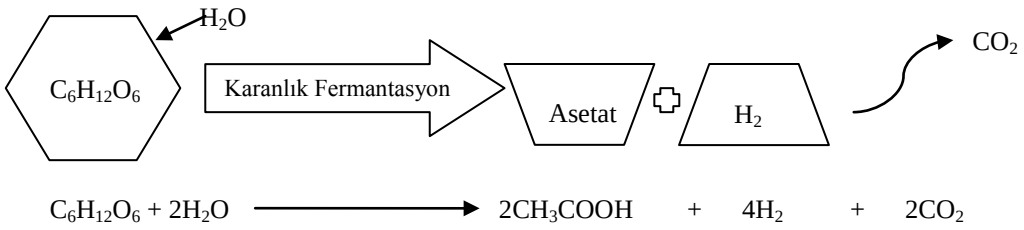
Dolaylı biyofotolizle hidrojen üretiminde kullanılan nitrojenaz enzimi oksijene duyarlıdır bu nedenle anaerobik ortamda hidrojen üretimi gerçekleştirilir.

Dolaylı biyofotolizde doğrudan biyofotolizde olduğu gibi fotosistem II ve fotosistem I aracılığıyla hidrojen üretilir. Dolaylı biyofotoliz yönteminde fotosentez yoluyla ilk olarak üretilen biyokütle, aerobik karanlık fermantasyonla 2 mol asetat/mol glukoz ve 4 mol hidrojen/mol glukozu oluşturur. Elde edilen 2 mol asetat/mol glukozdan fotofermantasyon yoluyla hidrojen üretilerek verim arttırılabilir (Şekil 2.2) (Genç, 2009; Şentürk ve Büyükgüngör, 2010).

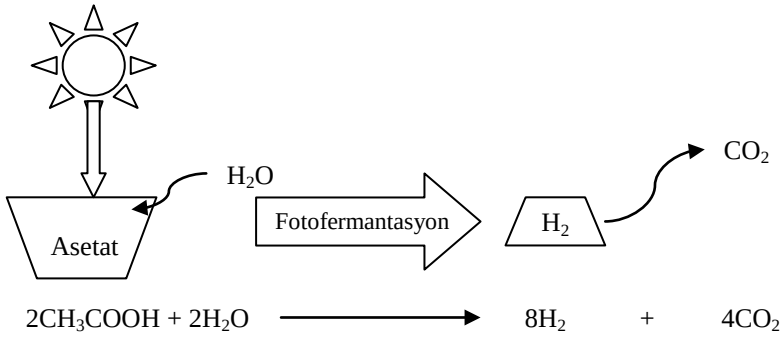
1. Safha: Fotosentez



2. Safha: Aerobik Karanlık Fermantasyon



3. Safha: Fotofermantasyon



Şekil 2.2. Dolaylı biyofotolizle hidrojen üretiminde gerçekleşen reaksiyonlar

Alglerle hidrojen üretimi, yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı (su, güneş) ile gerçekleşmesi ve kullanılan substratın (su) bol bulunabilmesi açısından avantajlıdır. Ayrıca atmosferdeki CO_2'i harcayarak, atmosfere O_2 salınımı sağladığından çevre dostu bir yöntemdir. Fakat kullanılan hidrojenaz enziminin oksijene çok duyarlı olması, substrat olarak herhangi bir atık maddenin kullanılamaması ve diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında elde edilen hidrojen miktarının düşük olması bu yöntemin biyohidrojen üretiminde daha az tercih edilmesine sebep olmaktadır.

2.2.1.2. Biyolojik yolla suyun gaza dönüşümü

Rhodospirillum rubrum gibi bazı fotoheterotrofik bakteriler substrat olarak karbonmonoksit (CO) kullanarak karanlıkta H_2 üretimi gerçekleştirebilirler.

$$CO + H_2O \longleftrightarrow CO_2 + H_2 \qquad \Delta G^o = -20.1 \text{ kJ/mol} \qquad (2.5)$$

Anaerobik ortamda CO, birkaç proteinin (CO dehidrojenaz, Fe-S protein ve CO'e-toleranslı hidrojenaz) sentezinde görev alır. CO oksidasyonundan üretilen elektronlar, hidrojen üretiminde kullanılmak üzere Fe-S proteini aracılığıyla hidrojenaza iletilir (Ensign ve Ludden, 1991).

Biyolojik yolla CO'dan biyohidrojen üreten mikroorgaznimalara *R. rubrum* ve *Rubrivax gelatinosus* gibi gram negatif bakteriler ile *Carboxydothermus hydrogenoformans* gibi gram pozitif bakteriler örnek olarak verilebilir (Soboh ve ark., 2002).

Biyolojik yoldan suyun gaza dönüşümü yöntemi henüz laboratuar ölçeklidir ve bu yöntem üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır.

2.2.1.3. Karanlık fermantasyon

Karanlık fermantasyon, karbonhidratlarca zengin organik substratların ışığa ihtiyaç duyulmaksızın anaerobik ortamda fermantasyon yoluyla biyohidrojene dönüştürülmesidir. Karanlık fermantasyonda karbonhidratça zengin substratlar üzerinde büyüyen bazı alg türleri de kullanılabilmesine rağmen öncelikli olarak anaerobik bakteri kullanılır. Fermantasyon reaksiyonları kullanılan anaerobik fermantatif bakteri türüne bağlı olarak mezofilik (25-40ºC), termofilik (40-65ºC), aşırı termofilik (65-80ºC) ve hipertermofilik (>80ºC) sıcaklıklarda gerçekleşebilir (Şentürk ve Büyükgüngör, 2010).

Karanlık fermantasyonla hidrojen üreten mikroorganizmalar zorunlu anaeroblar ve fakültatif anaerobik kemohetotroflar, anaerobik bakteriler gibi çok geniş bir çeşitliliğe sahiptir (Das ve Nath, 2004). Karanlık fermantasyonla hidrojen üreten mikroorganizma çeşitleri Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Karanlık fermantasyonla hidrojen üreten mikroorganizma çeşitleri (Vrije ve Claassen, 2005)

Mikroorganizma Çeşidi		**Örnek Türler**
Zorunlu Anaeroblar	**Klostridya**	*C. butyricum* *C. welchii* *C. pasteurianum* *C. beijerinckii*
	Rumen Bakterileri	*Ruminococcus albus*
	Termofiller	*Pyrococcus furious* *Thermotoga maritima* *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*
	Metanojenler	*Methanosarcina barkeri*
Fakültatif Anaeroblar	**Enterobakteriler**	*Enterobacter aerogenes* E.82005 *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 *Escherichia coli*
	Sitrobakteriler	*Citrobacter sp.*Y19
Aeroblar	**Alkalijenler**	*Alcaligenes eutrophus*
	Basiller	*B. lichenformis*

Karanlık fermantasyon sonucu biyofotolizde olduğu gibi saf H_2 elde edilmez. H_2 ile beraber karbondioksit, metan, hidrojen sülfit gazları ile basit uçucu yağ asitleri ve basit alkoller içeren sıvı metabolitler de üretilir. Karanlık fermantasyonda H_2 ile birlikte başka gazlar da üretildiğinden H_2'nin saflaştırılması için diğer gazlar uzaklaştırılmalıdır.

Karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde meydana gelen asetat ve bütirat yol izinden en yüksek hidrojen üretimi, teorik olarak 4 mol H_2/mol glukoz ile asetat yol izinde gerçekleşir (Reaksiyon 2.6).

Asetat: $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \longrightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2 \quad \Delta G^0 = -182.4$ kj (2.6)

Bütirat yol izinde ise teorik olarak 2 mol H_2 üretilir (reaksiyon 2.7).

Bütirat: $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow CH_2CH_2CH_2COOH + 2H_2 + 2CO_2 \quad \Delta G^0 = -257.1$ kj (2.7)

Ancak substratın bir kısmı bakterinin üreme ve gelişmesinde kullanıldığından pratikte teorikte belirtilenden daha az miktarda H_2 üretimi gerçekleşir (Kapdan ve ark., 2009).

Glikoliz yol izinde ise hidrojenaz varlığında öncelikle organik bileşen (glukoz) piruvata indirgenir ve hidrojen üretimi için gerçekleştirilen reaksiyonlar farklı bakteri gruplarının sahip oldukları enzimlere göre farklılıklar gösterir (Reaksiyon 2.8) (Turner ve ark., 2007).

$$\underset{\text{Glukoz}}{C_6H_{12}O_6} + 2NAD^+ \longrightarrow \underset{\text{Piruvat}}{2CH_3COCOOH} + 2NADH + 2H^+ \quad (2.8)$$

E. coli gibi Enterobakterlerde bulunan ve piruvatı formik asite indirgeyen enzim olan piruvat-format hidrojenliaz (PFHL) tarafından gerçekleştirilen reaksiyon 2.9'da verilmiştir (Benemann ve ark., 2002). Oluşan formik asit daha sonra parçalanarak H_2'i meydana getirir (Reaksiyon 2.10).

$$\underset{\text{Piruvat}}{CH_3COCOOH} + HCoA \rightarrow \underset{\text{Asetil-CoA}}{CH_3COCoA} + \underset{\text{Formik asit}}{HCOOH} \quad (2.9)$$

$$\underset{\text{Formik asit}}{HCOOH} \rightarrow H_2 + CO_2 \quad (2.10)$$

Clostridia türleri gibi zorunlu anaerobik bakterilerde bulunan piruvat-ferrodoksin oksidoredüktaz (PFOR) enziminin gerçekleştirdiği reaksiyon ise Reaksiyon 2.11'de verilmiştir. Bu reaksiyon sonucu elde edilen 2 molekül redükte ferrodoksinin oksitlenmesiyle oluşan elektronlar, protona ve moleküler hidrojene iletilir. Böylece hidrojen üretimi gerçekleşir (Seifert ve ark., 2012) (Reaksiyon 2.12).

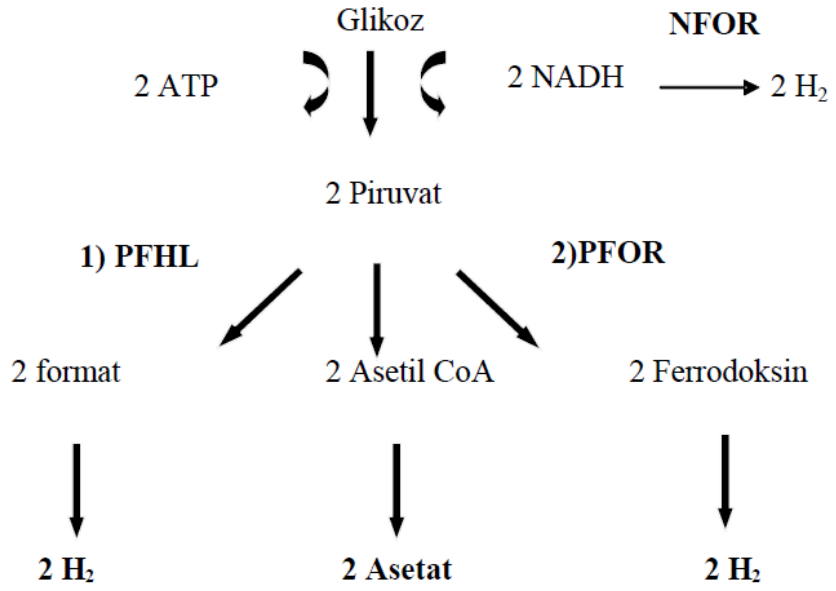
$$\text{Piruvat} + CoA + 2Fd_{(okside)} \longrightarrow \text{Asetil-CoA} + CO_2 + 2\,Fd_{(redükte)} \quad (2.11)$$

$$2Fd_{(redükte)} \rightarrow 2Fd_{(okside)} + H_2 \quad (2.12)$$

Enterik bakterilerde gerçekleşen reaksiyon sonucu elde edilen hidrojen verimi teorik olarak 2 mol H_2/mol glukozdur. *Clostridia* türlerinde ise glukozun piruvata indirgenmesi reaksiyonunda (Reaksiyon 2.9) elde edilen NADH'dan ferrodoksin oksidoreduktaz (NFOR) enzimi aracılığıyla 2 mol daha H_2 üretilir. Böylelikle bu reaksiyon sonucunda teorik olarak 4 mol H_2/mol glukoz elde edilmiş olur (Reaksiyon 2.13).

$$NADH + H^+ \rightarrow H_2 + NAD^+ \qquad (2.13)$$

Şekil 2.3'de glukoz fermantasyonu (glikoliz yol izi) ve elde edilen ürünler şematik olarak gösterilmiştir.



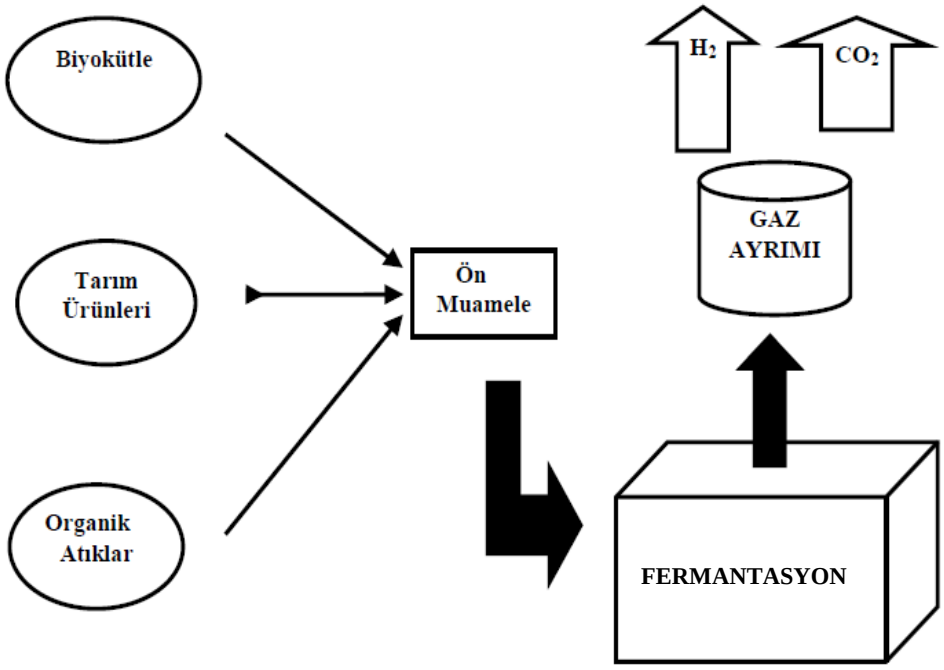
Şekil 2.3. Glukoz fermantasyonu ile hidrojen oluşum yol izi (Turner ve ark., 2007)

Karanlık fermantasyonda glukoz, sükroz, maltoz gibi basit şekerler doğrudan substrat olarak kullanılır. Fakat bu substratların maliyeti yüksektir. Bu nedenle karbonhidrat içeriği bol organik atıklardaki nişasta, selüloz gibi polisakkaritler çeşitli ön işlemlerle basit şekerlere parçalanarak bakteri tarafından kullanılır hale getirilir. Böylelikle çeşitli sanayi atıkları ve evsel atıklar biyohidrojen üretiminde değerlendirilir. Çizelge 2.4'de karanlık fermantasyonda kullanılan çeşitli biyokütle atıkları ve bu atıklara uygulanması gereken önişlemler verilmiştir.

Çizelge 2.4. Biyohidrojen üretimi için kolaylıkla kullanılabilen biyokütle atıkları (Şentürk ve Büyükgüngör, 2010)

Biyokütle Kaynağı	Kullanımı
Nişastalı tarımsal ve gıda sanayisi atığı	Glukoz ve maltoza hidrolize olduktan sonra organik asitlere ve son olarak da hidrojene dönüşür.
Selülozlu tarımsal ve gıda sanayisi atığı	Lignini uzaklaştırılmış ve ince ince öğütülmüş olmalıdır. Daha sonra nişasta gibi işleme tabi tutulur.
Karbonhidratça zengin sanayi atığı	Besin dengesi ve istenmeyen maddelerin giderimi için ön arıtım gerekebilir. Daha sonra nişasta olarak işlenir.
Atık su arıtım ünitelerinden elde edilen atık çamur	Ön arıtım gerekebilir. Organik asitlere ve son olarak da hidrojene dönüşür.

Karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminde hidrojenaz enzimi rol oynar. Şekil 2.4'de karanlık fermantasyonla hidrojen üretiminin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.4. Karanlık fermantasyon ile hidrojen üretiminin şematik gösterimi (Benemann ve Hallenbeck, 2002)

Karanlık fermantasyonla hidrojen üretimini etkileyen faktörler; substrat çeşidi, kullanılan bakteri, reaktör tipi, azot ve fosfor, metal iyonu (Fe, Mg), sıcaklık, pH ve hidrojenin kısmi basıncı olarak sayılabilir (Genç, 2009).

Karanlık fermantasyonda ışık kaynağına ihtiyaç duyulmaması gün ve gece boyunca sabit olarak hidrojen verimliliği sağlar. Bu yöntemde kullanılan fermantatif bakteriler yüksek hidrojen üretim hızına ve üreme hızına sahiptirler. Substrat olarak atık

maddeler kullanılabilir. Karanlık fermantasyonda H_2 ile beraber laktik asit, bütirik asit, asetik asit gibi değerli yan ürünler üretilebilir.

Argun ve ark. (2008) asidojenik bakteriler kullanarak toz buğday nişastasından kesikli karanlık fermantasyon yöntemiyle hidrojen üretmişlerdir. Çalışmalarında başlangıçtaki optimum substrat ve biyokütle yoğunluğunu bularak en yüksek derecede hidrojen verimini amaçlamışlardır. 2.6 g/L biyokütlede, buğday tozu yoğunluğunu 5-30 g/L arasında hazırlamışlar ve en yüksek hidrojen birikiminin 20 g/L yoğunluğunda olduğunu gözlemlemişlerdir. Optimum biyokütle yoğunluğu çalışmalarında ise hidrojen birikiminin en fazla gerçekleştiği biyokütle yoğunluğunu 2.5 g/L bulmuşlardır.

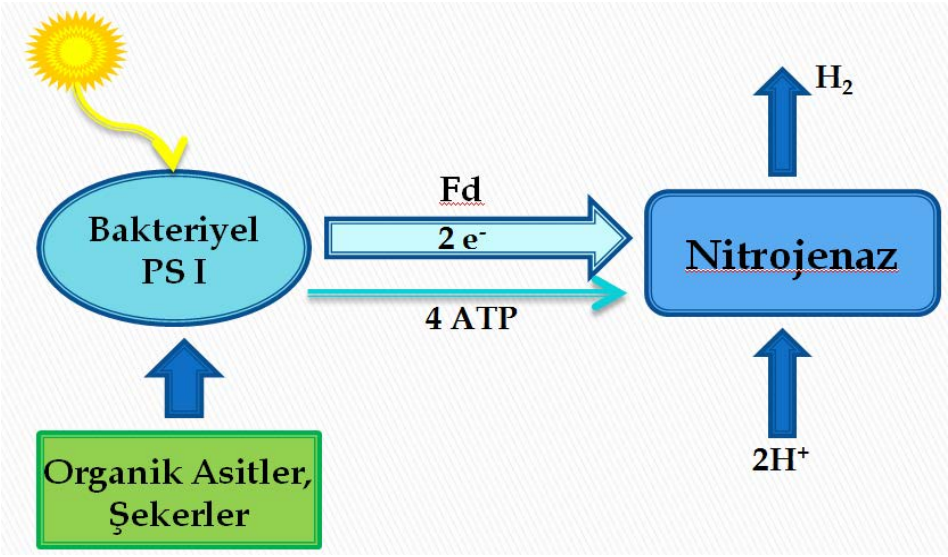
Saady ve ark. (2012) mezofilik şartlarda glukozdan biyohidrojen üretimine kültür kaynağının ve linoleik asidin (C 18:2) etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında *Bacteroidaceae* ve *Clostridiaceae* bakterilerinden farklı oranlarda birlikte kültür yapmışlardır. En yüksek hidrojen veriminin 3.11 ± 0.02 H_2/mol glukoz oranı ile linoleik asit uygulanmış *Bacteroidaceae* (% 26)-*Clostridiaceae* (% 10) kültüründe ve 3.11 ± 0.07 H_2/mol glukoz oranı ile linoleik asit uygulanmış *Bacteroidaceae* (% 33)-*Clostridiaceae* (% 10) kültüründe gerçekleştiğini belirlemişlerdir.

2.2.1.4. Fotofermantasyon

Fotofermantasyon, fotosentetik bakteriler tarafından biyokütle veya organik asitlerden güneş enerjisi ile hidrojen üretimidir. Fotofermantasyonla hidrojen üretimi, anaerobik ortamda, güneş ışığı veya bir ışık kaynağı altında, azot miktarı sınırlandırılmış ortamda gerçekleşir.

Fotosentetik bakterilerle hidrojen üretiminde nitrojenaz ve hidrojenaz enzimleri rol oynar. Nitrojenaz, fotofermantasyonla hidrojen üretimininde kullanılan ana enzimdir. Enzimin aktivitesi oksijen, amonyak veya yüksek N/C oranında engellendiğinden sınırlandırılmış amonyum ve oksijensiz şartlar gereklidir (Koku ve ark., 2003). Fotofermentatif bakteride bulunan hidrojen tüketen hidrojenaz enzimi (uptake hydrogenase) ise hidrojen molekülünün parçalanmasında görev alır.

Fotofermantasyon yapan mikroorganizmaların fotosistem II'leri yoktur. Bu nedenle suyu etkin olarak parçalayamazlar ve bunun sonucunda oksijen üretemezler. Böylelikle hidrojen üretiminde ihtiyaç duyulan anaerobik ortamın sürekliliği sağlanır (Genç, 2009). Bu mikroorganizmalar substrat olarak basit şekerler ve organik asitleri kullanma yeteneğine sahiptirler (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Fotofermantasyon yöntemi ile hidrojen üretimi (Benemann ve Hallenbeck, 2002)

Şekerden fotofermantasyonla hidrojen üretimi reaksiyonu Reaksiyon 2.14'de verilmiştir.

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + \text{Işık Enerjisi} \longrightarrow 12H_2 + 6CO_2 \qquad (2.14)$$

Fotofermantasyonda substrat olarak kullanılan organik asitlerin, hidrojen üretim reaksiyonları ve teorik olarak hidrojen üretim miktarları birbirinden farklıdır:

Malat: $C_4H_6O_5 + 3H_2O \longrightarrow 6H_2 + 4CO_2$ (2.15)

Laktat: $C_3H_6O_3 + 3H_2O \longrightarrow 6H_2 + 3CO_2$ (2.16)

Asetat: $C_2H_4O_2 + 2H_2O \longrightarrow 4H_2 + 2CO_2$ (2.17)

Propiyonat: $C_3H_6O_2 + 4H_2O \longrightarrow 7H_2 + 3CO_2$ (2.18)

Butirat: $C_4H_8O_2 + 6H_2O \longrightarrow 10H_2 + 4CO_2$ (2.19)

Fotofermantasyonda substrat olarak saf şekerlerin ve organik asitlerin bulunduğu sentetik besiyerleri kullanıldığında, hidrojen üretimi maliyetli olduğundan son yıllarda biyokütle ile karbonhidratlar ve organik atıklarca zengin atık maddelerin kullanımı üzerine çalışmalar yaygınlaşmıştır (Fırat, 2009). Fotofermantasyonla biyohidrojen üretiminde kullanılan substrat çeşitleri enerji bitkileri (Dallı darı [switch grass], filotu ya da çin kamışı [*Miscanthus*] gibi biyoyakıt üretimi için yetiştirilen bitkiler), sanayi

atıkları (şeker, zeytinyağı, un, bira fabrikaları vb. atıkları), evsel atıklar, zirai ve hayvan atıkları olarak sınıflandırılabilir.

Substrat olarak biyokütle veya atıkların kullanımının dezavantajı, bu maddelerin çoğunun hidrojen üretiminde doğrudan kullanılamamasıdır. Tercih edilen biyokütle veya atıkların karanlık fermantasyon veya fotofermantasyonla biyohidrojen üretiminde kullanılabilmeleri için çeşitli önişlemlere tabi tutulmaları gerekebilir.

Fotofermantasyonda substratta bulunan karbon kaynaklarının (basit şekerler veya organik asitler) bakteri tarafından parçalanabilmesi için güneşten veya bir ışık kaynağından elde edilen enerjiye ihtiyaç vardır. Bu nedenle seçilen substratın ışığı geçirebilir olması çok önemlidir. Bu amaçla ışığı tam olarak geçirmeyen bazı atık sular sulandırılarak kullanılabilir.

Fotofermantasyonla hidrojen üretimini sınırlandıran diğer bir faktör besiyerinde bulunan amonyum miktarıdır. Fotofermantatik bakteriler sahip oldukları nitrojenaz enziminin aktivitesiyle aynı zamanda azot bağlayan bakterilerdir. Ortamda bulunan fazla miktardaki amonyum, nitrojenaz enzimi üzerinde negatif geri bildirim yaparak enzimin inaktivasyonuna sebep olur ve hidrojen üretimi gerçekleşmez. Bu nedenle tercih edilen substrattaki amonyum miktarının nitrojenaz enzimi aktivitesini inhibe edecek düzeyde olmaması gerekir. Eğer substrattaki amonyum miktarı nitrojenaz enzimini inhibe edecek düzeyde ise çeşitli yollarla substrattaki amonyum uzaklaştırılmalıdır.

Andrago ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada melas karanlık fermantasyon sıvısındaki amonyum iyonlarını zeolit bazlı uzaklaştırma yöntemi ile uzaklaştırarak fotofermantatif hidrojen üretimi gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla doğal bir zeolit olan klinoptilolit kullanmışlardır. Sodyum formunda klinoptilolit çözeltisini örneklere uygulayarak % 79-90 molar oranında amonyum iyonlarını uzaklaştırmışlardır. Klinoptilolit uygulanmayan besiyerlerinde hidrojen üretimi olmazken, uygulanan besiyerlerinde ise 1.11-1.16 mmol H_2/L_k.saat oranlarında hidrojen üretiminin gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Substrat olarak atıkların veya biyokütlenin kullanımında bir diğer faktör de substratın karbon kaynağı içeriğidir. Fotofermantatik bakteriler metabolizmalarında glukoz, sükroz, maltoz vb. gibi basit şekerler ile asetat, bütirat gibi organik asitleri kullanabilmektedirler. Bu nedenle seçilen substratın içeriğindeki karbon kaynağı çeşidi önemlidir. Eğer substrat lignoselülozik biyokütle gibi selüloz, nişasta vb. polisakkaritlerce zenginse, bu polisakkaritlerin çeşitli hidroliz işlemleriyle basit

şekerlere parçalanması gerekir. Bu amaçla kullanılan önişlemler mekanik, fizikokimyasal ve biyolojik önişlemler olarak sınıflandırılabilir (Ntaikou, 2010).

Mekanik önişlemler, uygulanacak diğer işlemlerden önce gelir ve genellikle öğütmeyi kapsar. Substrat öğütülerek, yüzey alanının artması sağlanır ve böylelikle mekanik önişlemden sonra uygulanacak işlemlerle polisakkaritlerin basit şekerlere parçalanma oranı daha da arttırılmış olur.

Fizikokimyasal önişlemler, lignoselülozik biyokütleye asidik, alkalin veya oksidatif şartlar ile yüksek sıcaklık veya her ikisi birden aynı anda uygulanmasıdır. Bu önişlemle selüloz, hemiselüloz ve ligninin hidrolizi gerçekleştirilir. Yüksek sıcaklık uygulama, termal önişlem olarak da adlandırılmaktadır. Asidik ortam oluşturmak için yoğun sülfirik asit (H_2SO_4) veya hidroklorik asidin (HCl) kullanıldığı ve yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen asit hidroliz önişlemi fizikokimyasal önişlemler içinde gruplandırılır. Asit hidroliz önişleminin uygulandığı bazı durumlarda sırayla ksiloz ve galaktoz, mannoz ve glukozun dehidrasyonuyla furfural, hidroksi metil furfural meydana gelmiş; buna ek olarak formik ve levulinik asidin de üretimi gözlenmiştir (Fengel ve Wegener, 1984).

Biyolojik önişlemlerde ise ligninin uzaklaştırılması hedeflenir. Böylelikle selüloz ve hemiselüloz serbest hale gelerek bunların enzimatik olarak parçalanmaları mümkün hale gelir. Biyolojik önişlemler enzimlerle veya tüm bir mikroorganizma (bazı bakteriler ve mantarlar) kullanılarak gerçekleştirilebilir (Widsten ve Kandelbauer, 2008). Bu önişlem pahalı olduğu için ve özel koşullar gerektirdiği için çok tercih edilen bir önişlem değildir.

Fotofermantasyonda kullanılan fotosentetik bakterilerin özellikleri şunlardır:

- Mezofilik bakterilerdir. En uygun üreme sıcaklıkları 30-35^{o}C ve pH'ları ise 7.0'dir.
- Çok yönlü metabolik yeteneğe sahiptirler. Anaerobik ortamda büyüyebildikleri gibi, aerobik ortamda da yaşamlarını sürdürebilirler. Fakat oksijen, nitrojenaz enzimini inhibe edeceğinden aerobik ortamda hidrojen üretimi gerçekleşmez. Bu bakteriler hidrojenle birlikte yan ürün olarak çeşitli yüksek katma değere sahip maddeler üretebilirler.
- Fotosistem II'leri olmadığından oksijen üretmezler. Böylece fotofermantasyonda hidrojen üretiminin, oksijen tarafından baskılanması önlenmiş olur.

Fotofermentatif hidrojen üretiminde en çok kullanılan fotofermantatif bakterilerden biri mor sülfürsüz bakteriler (PNS bakterileri) olarak bilinmektedir. PNS bakterileri ışık enerjisi ile basit şekerler ve organik asitlerden hidrojen üretme potansiyeline sahiptir. Bu bakteriler geniş dalga boyu aralığındaki ışığı (522-860 nm) absorbe etme yeteneğine sahiptirler ve hidrojen üretim mekanizması membran üzerinde elektron transfer işleminden ibarettir (Genç, 2009). PNS bakterilerinden biri olan *Rhodobacter sphaeroides*, hidrojen üretiminde kullanılan en iyi bilinen bakterilerinden biridir.

Fotofermantasyon, yüksek enerjili nitrojenaz enziminin kullanımını gerektirmesi, güneş enerjisi dönüşüm verimliliğinin düşük olması ve geniş alanları kaplayacak anaerobik foto-biyoreaktörlerin hazırlanması gerekliliği gibi olumsuz yanlarının dışında birçok avantaja sahiptir:

- Yüksek teorik dönüşüm verimine sahiptir.
- Oksijen üretilmediği için oksijenin hidrojen üretimindeki baskılayıcı etkisi yoktur.
- Her ne kadar ışık enerjisine ihtiyaç duyulsa da geniş spektrumdaki ışığın (400-950 nm) kullanılabilirliği söz konusudur.
- Çok çeşitli atıkların ve atık suların hidrojen üretiminde kullanılmasını sağlar.
- Organik substratların kullanımına olanak verdiği için atık su arıtımında kullanılabilme potansiyeline sahiptir.
- Fotofermantasyonda substrat olarak organik asitlerin kullanılabilmesi, karanlık fermantasyon sıvısından tekrardan hidrojen üretilerek hidrojen üretim verimliliğinin artmasını sağlar.
- Hidrojenle beraber çok değerli yan ürünler (PHB, 5-ALA) üretilebilir.

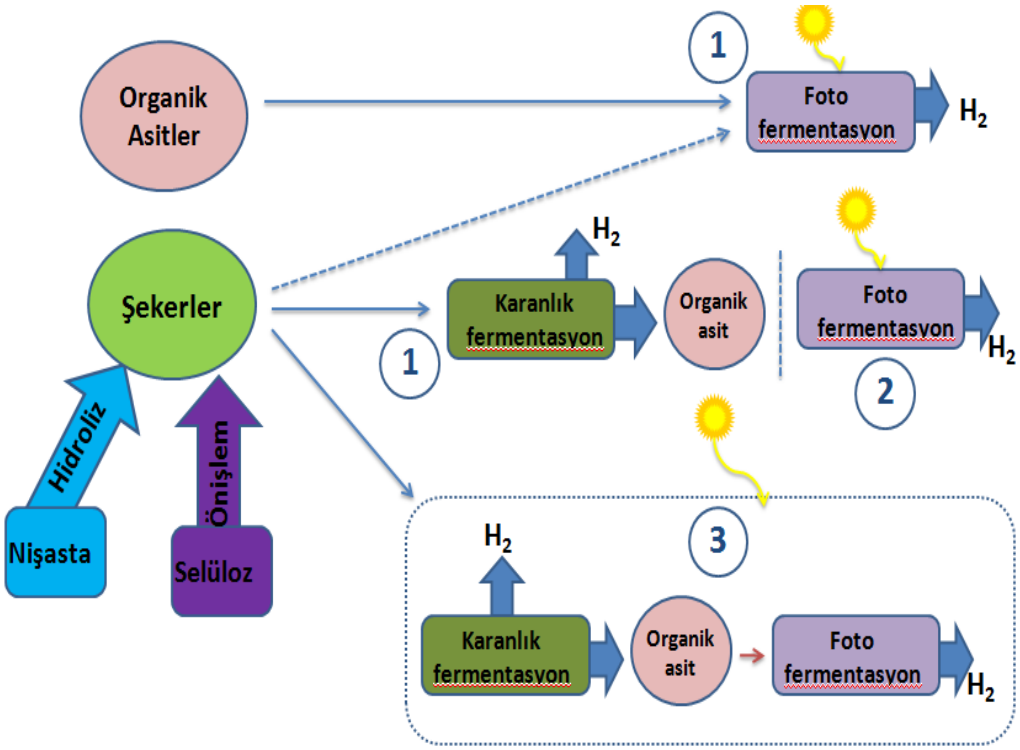
Mikrobiyal kültürün çeşidi, karbon kaynağı, ışık yoğunluğu, metal iyonları (Fe, Mg), amonyak varlığı, nitrojenaz ve hidrojenaz enzimlerinin aktivitesi fotofermantasyonla hidrojen üretimini etkileyen faktörlerdir.

Yetiş ve ark. (2000) substrat olarak şeker rafinerisi atık suyu kullanarak *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 tarafından fotofermantasyonla biyohidrojen üretimi gerçekleştirmişlerdir. Bunun için 0.41 kolon fotobiyoreaktör kullanmışlardır. % 20 oranında sulandırılmış melasta hidrojen üretim oranı 0.001 l hidrojen/saat/l iken; % 20 sulandırılmış melasa karbon kaynağı olarak sükroz veya L-malik asit, azot kaynağı olarak da glutamat eklendiğinde hidrojen oranının artarak 0.005 l hidrojen/saat/l olduğunu gözlemlemişlerdir.

Kapdan ve ark. (2009) asit hidroliz önişlemi uygulanmış buğday nişastalarından farklı *Rhodobacter sphaeroides* bakterileri kullanarak fotofermantasyon yoluyla biyohidrojen üretmişlerdir. Kesikli sistem kullanarak üç farklı *R. sphaeroides* saf suşlarından (RV, NRLL ve DSZM) hidrojen üretimi için en uygun suşu bulabilmeyi amaçlamışlar ve en yüksek hidrojen oranının (1.23 mol H_2/mol glukoz) *R. sphaeroides* RV suşunda gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Ayrıca *R. sphaeroides* RV suşunun buğday nişastası hidrolizatından hazırlanan farklı şeker yoğunluklarına sahip besiyerlerindeki hidrojen verimlerini de araştırmışlardır.

Afsar ve ark. (2011) buharda pişirilen patates kabuklarından hazırlanan hidrolizatların karanlık fermantasyon sıvılarında fotosentetik bakteriler tarafından hidrojen üretimini araştırmışlardır. Kesikli biyoreaktörde, termofilik karanlık fermantasyon sıvısında, farklı mor sülfürsüz bakteri suşlarının (*Rhodobacter capsulatus* DSM1710, *R. capsulatus hup*$^-$ YO3, *R. sphaeroides* O.U.001 DSM5864, *R. sphaeroides* O.U.001 *hup*$^-$ ve *Rhodopseudomonas palustris*) hidrojen üretkenliğini incelenmiştir. Karanlık fermantasyon sıvısındaki hidrojen üretim verimliliği ile glukoz eklenmiş karanlık fermantasyon sıvısındaki hidrojen üretim verimliliği karşılaştırıldığında *Rhodobacter sphaeroides* tarafından glukoz eklenmiş karanlık fermantasyon sıvısında en yüksek hidrojen üretiminin gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

Karanlık fermantasyon ve fotofermantasyon, hidrojen üretiminde tek basamaklı sistemler olarak kullanıldığı gibi; ardışık ve kombine sistemler olarak da kullanılarak hidrojen verimliliği arttırılabilir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Tek Basamaklı (1), Ardışık (2) ve Kombine (3) Sistemler (Genç, 2009)

Tek basamaklı sistemler, yalnızca karanlık fermantasyon veya yalnızca fotofermantasyon kullanılarak hidrojen üretilmesidir. Basit şeker, nişasta veya selüloz içeren substrattan doğrudan karanlık fermantasyon veya fotofermantasyon yoluyla biyohidrojen üretilir. Bu sistemde hidrojen verimi sınırlıdır.

Ardışık sistemlerde basit şeker içeren substratlar ilk önce karanlık fermantasyona uğratılır. Karanlık fermantasyon sonucunda hidrojen gazıyla beraber organik asit içeren atık sıvı da elde edilir. Organik asit içeren bu atık sıvı uygun pH'a ayarlanır ve fotofermantasyon için ihtiyaç duyulan diğer koşullar da sağlandıktan sonra fotofermantasyon işlemi gerçekleştirilir. Böylece daha fazla hidrojen verimi elde edilmiş olur.

Kombine sistemlerde ise ardışık sistemlerdeki işlemler uygulanır fakat zaman olarak farklılık vardır. Ardışık sistemlerde karanlık fermantasyon ve fotofermantasyon arka arkaya ama farklı zamanlarda gerçekleştirilir. Kombine sistemlerde ise karanlık fermantasyon ve fotofermantasyon aynı süre içinde gerçekleşir. Şeker içeren substrattan karanlık fermantasyon işlemi sonucu oluşan organik asitler, oluştuğu anda fotofermantasyona uğrar. Böylelikle aynı süre içerisinde hem karanlık fermantasyondan hem de fotofermantasyondan hidrojen gazı elde edilir. Kombine sistemlerle hidrojen

üretimi, karışık kültürler aracılığıyla gerçekleştirilir. Kombine sistemlerin avantajı, zamandan ve sarftan tasarruf edilmesidir.

Çizelge 2.5'de iki aşamalı karanlık ve fotofermantasyon sistemlerinin biyohidrojen üretimleri ve verimleri karşılaştırılmıştır.

Çizelge 2.5. İki aşamalı karanlık ve fotofermantasyon sistemlerinin biyohidrojen üretimleri ve verimleri (Pandu ve Joseph, 2012)

Substrat	**İnokulum**	**H_2 Verimi (mol/mol glukoz)**	**H_2 Üretim Oranı (mL/L.s)**	**Kaynaklar**
Melas	*Caldicellulosiruptor* ve *Rhodopseudomonas capsulatus*	4.2	7.1	Wang ve ark., 2003
Sükroz	*Clostridium pasteurianum*, *Rhodopseudomonas palustris* WP3-5	14.2 mol H_2/mol sükroz	-	Wang ve Wan, 2008
Nişasta İmalat Atığı	*C. butyricum*, *Enterobacter* HO-39, *Rhodobacter sp.* M-19	7.2	-	Wang ve ark., 2011
Cassava Nişastası	*Clostridium sp* ve *Rhodopseudomonas palustris*	6.07 mol H_2/mol sükroz	334.8	Wu ve ark., 2006
Glukoz	*E.coli* HD701 *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001	-	5.2	Yokoyama ve ark., 2007

Çizelge 2.6'da biyolojik hidrojen üretim yöntemlerinin olumlu ve olumsuz yönleriyle karşılaştırılmaları verilmiştir.

Çizelge 2.6. Biyolojik hidrojen üretim yöntemlerinin karşılaştırılması (Barbosa ve ark., 2001; Das ve Veziroğlu, 2008)

YÖNTEM	**OLUMLU YÖNLERİ**	**OLUMSUZ YÖNLERİ**
Doğrudan Biyofotoliz	Su ve ışıkta doğrudan üretilebilir.	Yüksek yoğunlukta ışık gerekir. O_2, inhibisyona sebep olabilir.
Dolaylı Biyofotoliz	Su ile H_2 üretilebilir.	Düşük fotokimyasal etkiye sahiptir. ≈% 30 O_2 gaz karışımında bulunur. O_2 hidrojenaz enzimini inhibe edebilir.
Karanlık Fermantasyon	Işık enerjisine ihtiyaç duyulmaz. Çeşitli karbonlu atıklar, substrat olarak kullanılabilir. Yan ürün olarak organik asitler üretilir. O_2 kısıtlama problemi yoktur.	CO_2 oluşur. Düşük verimde H_2 üretimi gerçekleşir. Yüksek H_2 verimi elde etmede işlem termodinamik olarak elverişsiz hale gelir.
Fotofermantasyon	Geniş ışık spektrumu kullanılabilir. fotofermentatif bakteriler tarafından kullanılabilir. Farklı atık maddeler kullanılabilir.	Işık çevrim etkisi düşüktür. O_2 varlığı nitrojenaz enzimini inhibe eder. Fotobiyoreaktör tasarımı zordur. Maliyet yüksek ve büyük ölçeklidir.
İki Aşamalı Fermantasyon	Daha yüksek oranda H_2 üretilebilir. Yan ürünler (metabolitler) etkin bir biçimde H_2'ye dönüştürülebilir.	Sürekli ışık kaynağı gerektirdiğinden büyük ölçekli işlemlere uygulanması zordur.

2.3. *Rhodobacter sphaeroides*

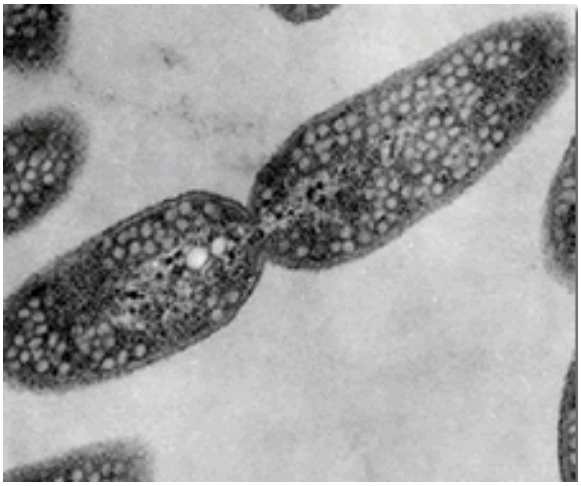
Önceleri *Rhodopseudomonas sphaeroides* olarak bilinen *Rhodobacter sphaeroides* mor sülfürsüz bakteriler grubuna giren gram negatif bir bakteridir. Proteobakterilerin α-altbölümü içerisinde yer alır (Imhoff ve ark., 1984). Derin göllerden ve durgun sulardan izole edilmişlerdir. Çizelge 2.7'de *R. sphaeroides*'in sistematik olarak sınıflandırılması verilmiştir.

Çizelge 2.7. *Rhodobacter sphaeroides*'in sistematik olarak sınıflandırılması (Imhoff ve ark., 1984)

Alem	Bacteria
Şube	Proteobacteria
Sınıf	Alphaproteobacteria
Takım	*Rhodobacterales*
Aile	*Rhodobacteraceae*
Cins	*Rhodobacter*
Tür	*Rhodobacter sphaeroides*

R. sphaeroides çok çeşitli metabolik özelliğe sahiptir. Fotoototrof, fotoheterotrof, oksijenli ve oksijensiz solunum, fermantasyon gibi çok farklı enerji elde etme mekanizmaları vardır (Blankenship ve ark., 1995). Ayrıca moleküler azotu bağlama yeteneğine sahiptirler; önemli tetrapirolleri, klorofilleri, hem ve B12 vitaminini sentezleyebilirler.

Hücre morfolojileri özellikle karışık besiyerlerinde çeşitlilik göstermekle birlikte küresel, oval şekillidirler (Şekil 2.7). Özellikle genç hücreler sahip oldukları düzensiz tek subpolar flagellaları sayesinde aktif olarak hareket edebilirler.



Şekil 2.7. *R. sphaeroides* ATCC 17039 (Garrity, 2005)

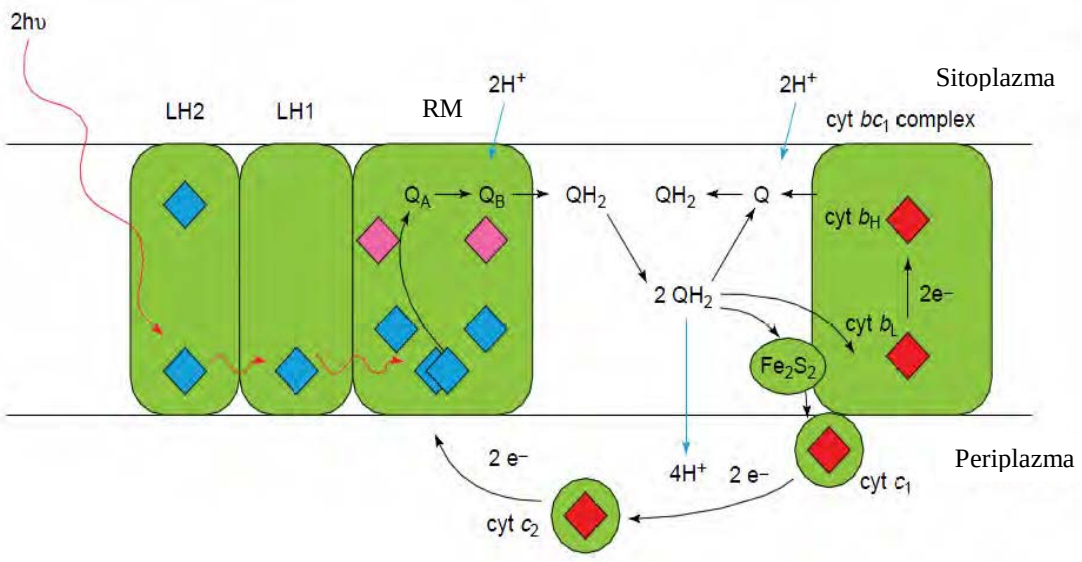
R. sphaeroides 2.4.1'de yapılan genomik çalışmalara göre bu bakterilerde yaklaşık 0.9 Mbç ve 3 Mbç büyüklüğünde iki adet kromozom ve beş adet ekstra kromozomal plazmid bulunur (Suwanto and Kaplan, 1989).

R. sphaeroides'in üreme ortamı pH:6-8.5 ve 30^{o}C'nin altındaki sıcaklıkta olmalıdır (Van Niel, 1944). Oksijenli ve oksijensiz ortamda büyüyen bakterilerin metabolizma ürünleri ve sahip oldukları karotenoid, spheroiden ile spheroidenon renk pigmentlerinin özelliği sayesinde renkleri de farklı olmaktadır.

2.4. Hidrojen Üretim Metabolizması

R. sphaeroides ve diğer PNS bakterileri ile hidrojen üretimi yenilenebilir enerji kaynakları (güneş, biyokütle) kullanılarak gerçekleştirilir. Işık altında, azot sınırlandırılmış anaerobik ortamda, çeşitli organik substratlardan hidrojen üretilir. Hidrojen üretim metabolizması fotosentetik zar aygıtı, karbon akışı (TCA döngüsü) ve enzim sistemleri olarak gruplandırılarak incelenebilir (Koku ve ark., 2002).

Fotosentetik zar aygıtı, güneş ışınlarının toplandığı ve bu ışınlardan gelen güneş enerjisinin kimyasal enerjiye (ATP) çevrildiği yerdir. Bu kimyasal enerji bakterinin üremesinde ve hidrojen üretimi için nitrojenaz enzimi aktivitesinde kullanılır. Bakterinin sitoplazmik zarı içerisinde bulunan fotosentetik zar aygıtı, ışık toplama kompleksi (LHC) veya antenler, reaksiyon merkezi (RM) ve sitokrom bc_1 olmak üzere üç adet transmembran proteinden oluşur (Şekil 2.8) (Vermeglio ve Joliot, 1999).



Şekil 2.8. *Rhodobacter sphaeroides* fotosisteminde elektronların ışıkla uyarılmış dairesel akış şeması (Vermeglio ve Joliot, 1999)

LHC antenleri, bakteriyofil ve karotenoid moleküllerini içerir. Karotenoidler, görünür dalga boyundaki ışığı absorblarken; bakteriyofiller aktif değillerdir ve singlet oksijenlerin zararlarına karşı anten sistemlerini korumakla görevlidirler (Isaacs ve ark., 1995; Jones, 1997). Çoğu mor bakterilerde LHC, LH1 ve LH2 olmak üzere iki farklı anten yapısından oluşur.

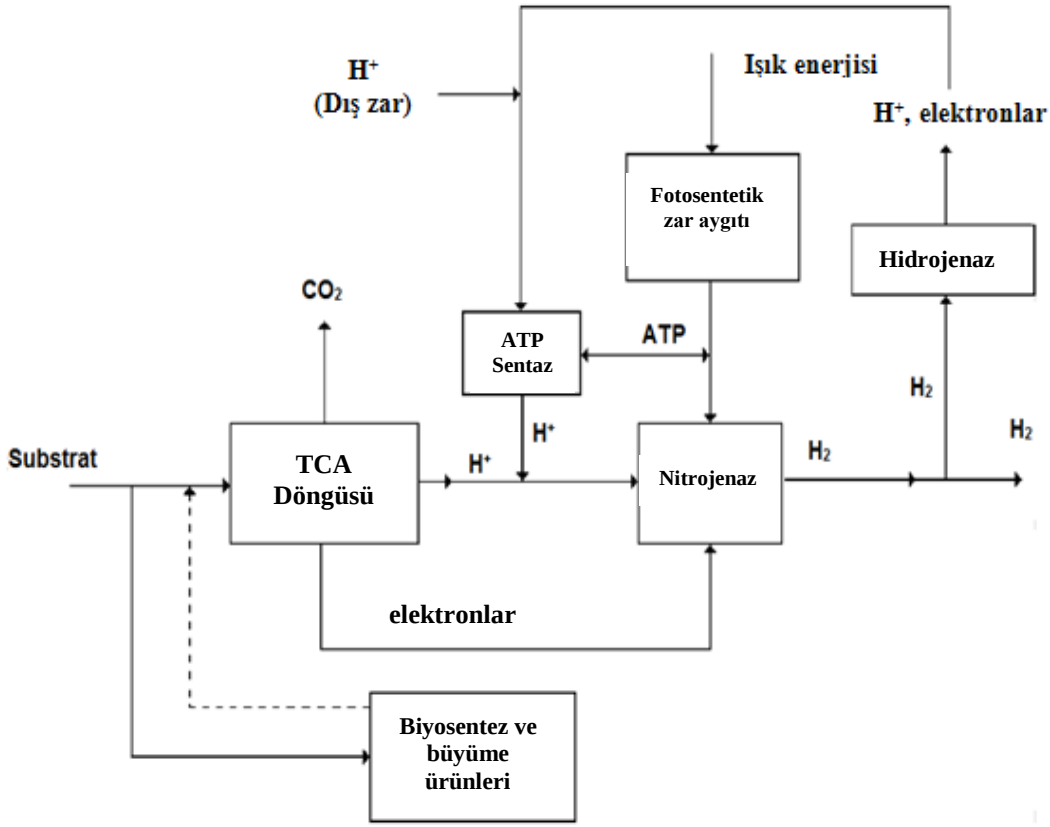
Reaksiyon merkezi (RM) ise L, M ve H olmak üzere üç adet polipeptid alt biriminden oluşur ve dört molekül bakteriyoklorofil a, iki molekül bakteriyofeofitin a, iki molekül ubikinon (Q_A, Q_B) ve iki molekül karotenoid pigmenti içerir (Seifert, 2012).

LHC antenlerinden absorbe edilen fotonlardan gelen ışık enerjisi, antenden enerjinin hareketli formları olan ve ekskiton adı verilen paketler halinde reaksiyon merkezine aktarılır (Şekil 2.8) (Madigan ve Martingo, 2000). Reaksiyon merkezinde bakteriyoklorofil a, ekskiton ile uyarılır ve bundan sonraki elektron akışı şu sırayla gerçekleşir:

Bakteriyoklorofil a → Bakteriyofeofitin a → Ubikinon → Fe_2S_2 → Sitokromlar → RM

Son olarak elektron akışıyla oluşturulan bu proton gradienti, ATPaz tarafından ATP üretiminde kullanılır.

Trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde organik substratın CO_2'ye parçalanmasıyla meydana gelen elektronlar, NAD ve ferrodoksin gibi taşıyıcılarla nitrojenaza iletilir. TCA döngüsünde oluşan protonlar ve elektronlar ile ATP sentazdan oluşan ATP ve protonlar kullanılarak nitrojenaz enziminin aktivitesiyle moleküler hidrojen elde edilir (Şekil 2.9) (Seifert ve ark., 2012). Hidrojenaz enzimi ise moleküler hidrojeni protona ve elektronlara parçalar.



Şekil 2.9. Fotofermantasyon işleminde hidrojen üretim şeması (Koku, 2002)

2.4.1. Enzim sistemleri

Nitrojenaz ve hidrojenaz enzimleri, hidrojen üretim metabolizmasında kullanılan iki temel enzim çeşididir.

2.4.1.1. Nitrojenaz

Mor sülfürsüz bakterilerde hidrojen üretimini katalizleyen temel enzim nitrojenaz enzimidir. Bu enzim aynı zamanda atmosferdeki serbest azotu bağlayarak diğer canlılar tarafından kullanılabilen bir form olan amonyağa çevirir ve dünyadaki azot döngüsünde yer alır.

Üç çeşit nitrojenaz enzimi vardır ve her biri dinitrojenaz (Mo-Fe protein veya V-Fe protein ya da Fe-Fe protein içerir) ve dinitrojenaz reduktaz (Fe protein) olmak üzere iki ayrı protein biriminden oluşur. Redüktaz protein biriminin asıl görevi elektronları; azotu amonyuma indirgeyen nitrojenaza taşımaktır. Enzim ayrıca diğer elektronları protonlara taşıyarak hidrojen molekülü elde edilmesini sağlar (Seifert, 2012). Azotun

amonyuma çevrilmesi reaksiyonu, azotların sahip olduğu üçlü bağlardan dolayı yüksek enerji gerektiren bir reaksiyondur (reaksiyon 2.20).

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i \quad (2.20)$$

Anaerobik şartlarda, ortamda moleküler azot kaynağı bulunmadığında gerçekleşen hidrojen üretim reaksiyonu ise reaksiyon 2.21'de verilmiştir:

$$2H^+ + 2e^- + 4ATP \rightarrow H_2 + 4ADP + 4P_i \quad (2.21)$$

Çoğu mor sülfürsüz bakteride bulunan nitrojenaz enzimi molibdene sahiptir, bu nedenle hidrojen üretiminde molibden gerekli bir elementtir (Yakunin ve ark., 1991).

Nitrojenaz enziminin aktivitesi oksijen ve amonyum varlığında veya yüksek N/C oranlarında inhibe olur (Koku ve ark., 2003). Bu nedenle hidrojen üretimi için oksijensiz ve sınırlı miktarda amonyum içeren bir ortama ihtiyaç vardır. 2 mM'dan yüksek yoğunluktaki amonyuma sahip besiyerlerinde hidrojen üretimi durmaktadır (Yokoi ve ark., 1998). Azot kaynağı olarak amonyum tuzlarının varlığı biyohidrojen üretimini inhibe ederken; albumin, glutamat ve maya özütü gibi proteinler biyohidrojen üretimini arttırmaktadır (Takabatake ve ark., 2004). Yüksek yoğunlukta azot varlığında azot bağlama metabolizması hidrojen üretim metabolizmasına baskın gelmektedir ve ayrıca hücre büyokütlesi de artmaktadır (Fascetti ve Todini, 1995).

2.4.1.2. Hidrojenaz

Hidrojen metabolizmasında görev alan tersinir hidrojenaz ve hidrojen tüketen (uptake) hidrojenaz olmak üzere iki çeşit hidrojenaz enzimi vardır. Tersinir hidrojenaz, hidrojen oluşumunu katalizlerken, membrana bağlı hidrojen tüketen (uptake) hidrojenaz ise öncelikle hidrojen harcanmasını katalizler (Hall ve ark., 1995). Hücrelerin redoks durumuna göre bu enzimler baskılanır veya aktifleşirler. En iyi hidrojen üretimi nitrojenaz, tersinir hidrojenaz ve hidrojen tüketen nitrojenazın aktivitesinin dengelendiği durumda gerçekleşmektedir (Nandi ve ark., 1998).

Hidrojenaz enziminin katalizlediği reaksiyon, reaksiyon 2.22'de verilmiştir:

$$H_2 \longleftrightarrow 2H^+ + 2e^- \quad (2.22)$$

Hidrojenaz enzimi başlıca karbon monoksit ve oksijenle inhibe olmaktadır fakat nitrojenaz enzimine oranla daha az duyarlıdır. Hidrojenaz, nikel enzimlerinden olduğu için nikel miktarının sınırlı olması bu enzimin sentezini azaltabilir (Fissler ve ark., 1994).

Çizelge 2.8'de nitrojenaz ve hidrojenaz enzimlerinin özellikleri karşılaştırılmıştır.

Çizelge 2.8. Nitrojenaz ve hidrojenaz enzimlerinin özelliklerinin karşılaştırılması (Koku ve ark., 2002)

Özellikler	Nitrojenaz	Hidrojenaz
Substratlar	ATP, H^+ veya N_2, elektronlar	H_2
Ürünler	H_2 veya NH_4^+	ATP, H^+, elektronlar
Protein Sayısı	2 (Mo-Fe ve Fe)	1
Metal Bileşenler	Mo, Fe	Ni, Fe, S
Optimum Sıcaklık	30°C (*A. vinelandii*)	55°C (*R. rubrum*) 70°C (*R. capsulatus*)
Optimum pH	7.1-7.3 (*A. vinelandii*)	6.5-7.5 (*R. sulfidophilus*)
İnhibitörler, Baskılayıcılar	N_2 (yalnızca hidrojen üretiminde), NH_4^+, O_2, Yüksek N/C oranı	CO, EDTA, O_2, organik bileşiklerin varlığı
Situmilatörler	Işık	H_2 (*R. sphaeroides*) Organik bileşiklerin yokluğu (*R. rubrum*, *R. capsulatus*)

2.5. Biyohidrojen Üretiminde Substrat Olarak Atık Arpanın Kullanılması

Arpa (*Hordeum vulgare* L.); taneleri malt, yem ve gıda maddesi olarak kullanılan buğdaygillerden tek yıllık bir tahıl bitkisidir (Anonim, 2012). Çizelge 2.9'da arpanın sistematik olarak sınıflandırılması verilmiştir.

Çizelge 2.9. Arpa (*Hordeum vulgare* L.)'nın sistematik olarak sınıflandırılması

Üst Alem	Eukarya
Alem	Plantae
Bölüm	*Magnoliophyta*
Sınıf	*Liliopsida*
Takım	*Poales*
Familya	*Poaceae*
Cins	*Hordeum*

Arpa dünya sıralamasında üretimde mısır, buğday ve pirinçten sonra 4. sırada yer alırken, Türkiye'de ise buğdaydan sonra ikinci sıradadır. Eski dönemlerde besin olarak tüketilen en önemli kültür bitkilerinden biri olan arpa günümüzde daha çok

hayvan yemi olarak ve biracılıkta kullanılmaktadır. Dünyada ekimi yapılan arpanın % 65'i hayvan yemi olarak, % 33'ü malt olarak bira ve viski yapımında ve biyodizel üretiminde, % 2'si ise gıda sanayisinde kullanılmaktadır. Türkiye'de ise üretilen arpanın % 90'ı hayvan yemi olarak ve geri kalanı ise gıda sanayisinde ve malt ile bira üretiminde kullanılmaktadır (Anonim, 2012).

Buğday, arpa, patates, şeker pancarı vb. gibi daha birçok besin değeri yüksek tarımsal ürünler (biyokütle kaynakları); biyohidrojen üretiminde substrat olarak kullanılarak düşük maliyette hidrojen üretimi gerçekleştirilebilir. Fakat hidrojen üretiminde doğrudan tarım ürünlerinin kullanılması, gelecekte enerji üretimi ile besin üretiminin rekabet içine girmesine sebep olacaktır. Bu nedenle yiyecek olarak kullanılan tarımsal ürünler yerine biyokütle içeren atıkların kullanılması; hem maliyet, hem gelecekte yiyecek rekabetinin oluşturulmaması, hem de atıkların enerji üretiminde geri dönüşümünün sağlanması açısından çok daha önemlidir. Bu nedenle bu çalışmada substrat olarak atık arpa tercih edilmiştir.

2.6. Üretilen Yan Ürünler

Fotosentetik bakterilerle biyohidrojen üretiminde hidrojenle birlikte B12 vitamini, karotenoidler, biyoplastik poli-β-hidroksi bütirat (PHB), 5-Aminolevulinik asit (5-ALA) gibi değerli yan ürünler elde etmek de mümkündür. Bu çalışmada hidrojenle birlikte 5-ALA'nın üretilmesi amaçlanmıştır.

2.6.1. 5-Aminolevulinik asit (5-ALA) biyosentezi ve metabolik yolaklar

5-Aminolevulinik asit (5-ALA) ya da 5-amino-4-okso-pentanoik asit; porfirin, B12 vitamini ve klorofil gibi tetrapirollerin biyosentezinde öncül madde olarak görev alır (Tangprasittipap ve Prasertsan, 2002; Sasaki ve ark., 2002).

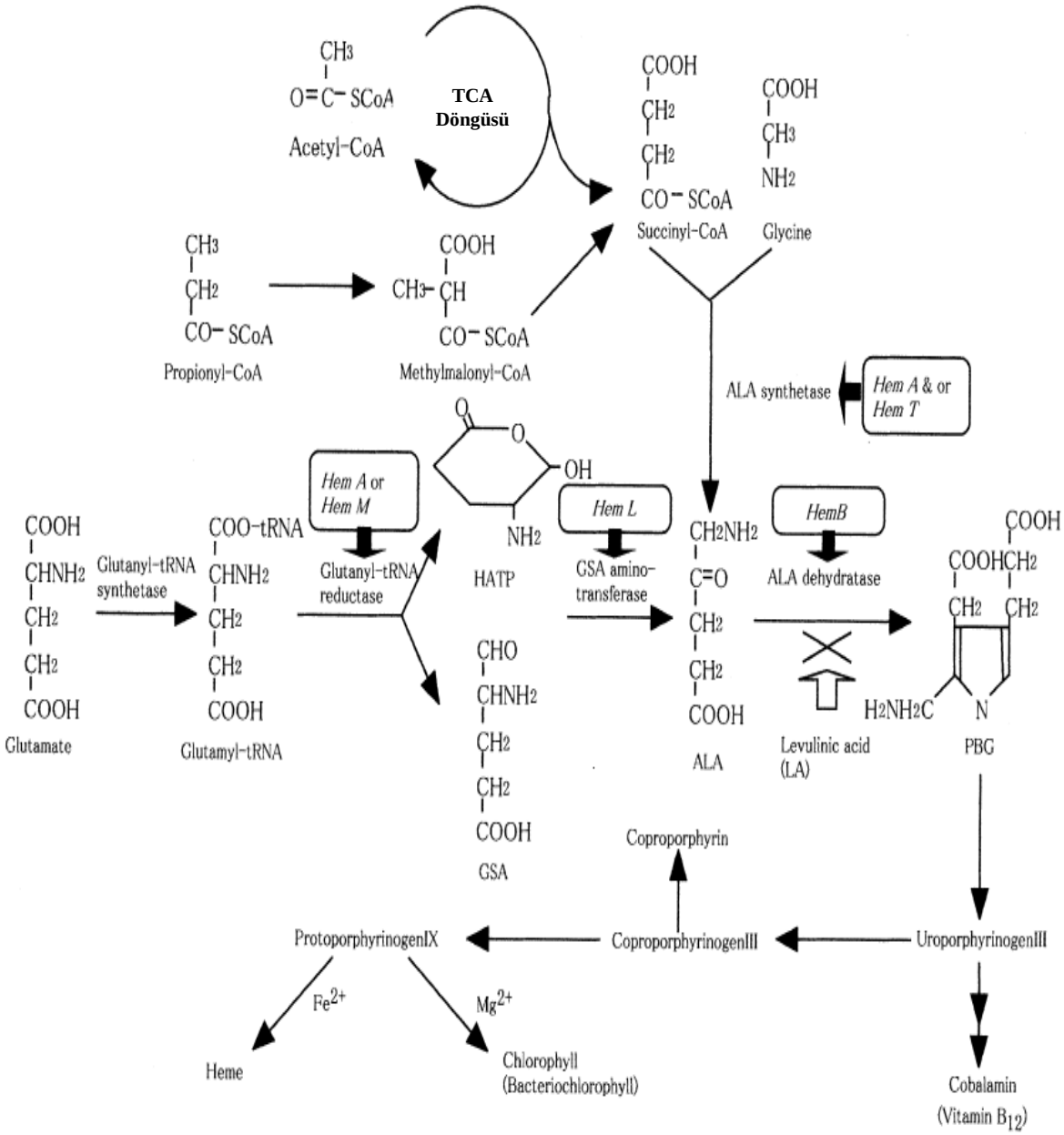
5-ALA'nın kimyasal sentezi birçok karmaşık reaksiyon sonucu gerçekleştiğinden maliyeti yüksektir. ALA'nın algler, anoksijenik fotosentetik bakteriler ve kemotrofik bakteriler tarafından biyosentezinde, kimyasal senteze oranla daha uygun maliyetle üretim sağlanır (Tangprasittipap ve Prasertsan, 2002). *Rhodobacter sphaeroides* gibi anoksijenik fototrofik bakterilerde ALA üretimi fazla olduğu gibi, bu bakterilerde üretilen ALA hücre dışına gönderildiği için ALA'nın besiyerinden elde

edilmesi işlemi de daha kolay ve daha uygun maliyetlidir. Bu nedenle ALA'nın biyosentezinde bu bakteriler tercih edilmektedir.

ALA'nın biyosentez işlemi, süksinil CoA ve glisinin kullanıldığı C4 yolağı (Shemin yolağı) ile glutamatın kullanıldığı C5 yolağı olmak üzere iki farklı yolakla gerçekleşir. C4 yolağı memeli hücrelerinde, maya, mantar ve çoğu mor sülfürsüz bakteri grupları ile bazı kemotroflarda gözlenmiştir (Sasaki ve ark., 1990). Bu yolakta kullanılan süksinil CoA, TCA döngüsünden sağlanırken; bazı bakterilerde ise metilmalonil CoA yolağıyla propionil CoA'dan sentezlenir (Sasaki ve ark., 1990). C4 yolağında süksinil CoA ve glisinden ALA üretimini sağlayan anahtar enzim ALA sentazdır (ALAS) (Beale, 2006). Bu enzim Hem A ve Hem T genleri tarafından kodlanır.

ALA biyosentezinde C5 yolağı ise yüksek bitkiler, algler ve birkaç bakteri ile mor ve yeşil sülfürlü bakterilerde de gözlenmiştir (Kajiwara ve ark., 1994; Sasikala ve Ramana, 1995). C5 yolağında ALA sentezi glutamattan, glutamil tRNA redüktaz enzimi aktivitesiyle gerçekleştirilir. Glutamil tRNA redüktaz enzimi Hem A ile Hem M genleri tarafından kodlanır (Sasaki 2002).

Şekil 2.10'da ALA ve porfirin, B12 vitamini, klorofil gibi tetrapirollerin biyosentez yolakları verilmiştir.



Şekil 2.10. ALA ve porfirin, B12 vitamini, klorofil gibi tetrapirollerin biyosentezi (Sasaki ve ark., 2002)

Farklı bakteri grupları tarafından üretilen ALA miktarları Çizelge 2.10'da verilmiştir. Bu çizelgeye göre en çok ALA üreten bakteriler sırayla *R. sphaeroides* (27,5 mM) ve *E. coli* (20 mM) olmuştur. Bu verilerden anlaşılacağı üzere, *R. sphaeroides* ALA üretiminde önemli yere sahiptir. Ancak *R. sphaeroides*'in ALA üretim verimliliğini arttırmaya yönelik çalışmalar yeterli değildir.

Çizelge 2.10. Farklı bakteri grupları tarafından üretilen ALA miktarları (Sasaki ve ark., 2002)

Grup	C ve N Kaynağı	ALA (µM)
Anoksijenik Fotosentetik Bakteriler		
Chlorobium limicola	Glutamat	3.95
Chloroflexus aurantiacus	Glutamat	0.58
Rhodopseudomonas palustris	Süksinat ve glisin	0.75
Rhodobacter sphaeroides	Süksinat ve glisin	2000
R. sphaeroides	Asetik, propiyonik, bütirik asit ve glisin	4200
R. sphaeroides	Süksinat ve glisin	16000
R. sphaeroides	Süksinat ve glisin	160
R. sphaeroides CR520	Glukoz ve glisin	14300
*R. sphaeroides*CR720	Glukoz ve glisin	27500
Rhodovulum sp.	Glutamat ve glisin	2000
Oksijenik Fotosentetik Bakteriler		
Anacystis nidulans	Glutamat	0.38
Anabaena variabilis	Glutamat	0.019
Algler		
Agmenellum quadruplicatum	Glutamat	0.225
Cyanidium caldarium	Glutamat	0.483
Chlorella vulgaris	CO_2	1400
C. sp.	Glukoz ve glisin	2000
C. regularis	Glukoz ve glisin	3700
Aeroblar		
Pseudomonas riboflavina	L-Alanin	200
Propionibacterium shermanii	Süksinat ve glutamat	40
Escherichia coli	Süksinat ve glisin	2250
E. coli	Süksinat ve glisin	20000
Anaeroblar		
Clostridium thermoaceticum	Glukoz ve L-sistein	155
Methanosarcina barkeri	Metanol ve 2-oksoglutamat	0.40
Metanobacterium thermoautotrophicum	H_2 ve CO_2	0.20

2.6.1.1. 5-Aminolevulinik asitin (5-ALA) uygulama alanları

5-Aminolevulinik asidin (5-ALA) tarım, tıp ve biyoteknoloji alanlarında kullanılma potansiyeli vardır (Çizelge 2.11) (Sasaki, 2002). ALA porfirin, B12 vitamini ve klorofil gibi tetrapirollerin sentezinde öncül madde olarak görev alır. Fazla miktarlarda ALA kullanıldığı zaman hücrede (bitki veya hayvan) protoporfirin IX birikimi olmaktadır. Protoporfirin IX (PP IX), belirli dalga boyundaki ışık altında hücrede serbest oksijen radikalleri oluşturur ve bu da hücreye zarar vererek sonunda hücrenin apoptoz veya nekroz yoluyla ölmesine sebep olur. Protoporfirin IX floresan bir

madde olması nedeniyle de özellikle kanser teşhisinde avantaj sağlar (Sasaki, 2002; Tangprasittipap, 2002; Beale, 2006).

Çizelge 2.11. ALA' nın uygulama alanları (Sasaki, 2002)

Alan	Uyguluma
Tarım	Biyobozunur herbisit
	Biyobozunur pestisit
	Tuza dayanıklılık
	Soğuğa dayanıklılık
	Büyümeyi destekleyici faktör
Tıp	Ağır metal zehirlenmesi tanısı
	Beyin tümörü tanısı
	Kozmetik ve dermatolojik uygulama
	Kanser tedavisi
	Romatoid artrid tedavisi
Biyoteknoloji	B12 vitamini üretimi
	Porfirin üretimi
	Bitki ve hayvan hücre kültürü

Hayvanlara ve çevreye zararsız olması ALA'nın herbisit ve pestisit olarak kullanılma potansiyelini arttırmıştır (Tangprasittipap, 2002). ALA uygulanan zirai zararlılarda (bitki ve böcekler) yüksek derişimlerde PP IX birikimi olmaktadır ve bu zirai zararlılar ışığa maruz kaldıklarında hücreleri öldüren serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Ancak, ALA uygulamasından sonra karanlıkta tutulan bitkilerde ise PPIX birikimi olmasına rağmen serbest oksijen radikalleri oluşmamakta ve bitkilere herhangi bir zarar vermemektedir. Tam tersine, ALA uygulaması büyümeyi hızlandırıcı, tuza ve soğuğa dayanıklılığı arttırıcı etki yapmaktadır (Sasaki, 2002; Tangprasittipap, 2002; Beale, 2006). ALA uygulamasının turpta (*Raphanus sativus*) karbondioksit alımını ve fotosentetik aktiviteyi arttırdığı gözlemlenmiştir (Sasaki, 2002).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Mikroorganizma

Bu çalışmada hidrojen ve ALA üretimi için yabanıl tip *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 (DSM 5864) kullanılmıştır.

3.1.1. Büyüme besiyeri ve kültür şartları

3.1.1.1. *R. sphaeroides* için genel üreme koşulları

R. sphaeroides'in genel üreme ortamı karbon ve azot kaynağı olarak malat ve glutamatın (15 mM/2mM) kullanıldığı Biebl ve Pfenning (B&P) minimal besiyeridir (Biebl ve Pfenning, 1981). Bakteriler hidrojen üretim besiyerine ekilmeden önce B&P minimal besiyerinde çoğaltıldı. B&P minimal besiyeri hazırlamak için Çizelge 3.1'de verilen miktarlarda kimyasallar 1 litre suda çözüldü ve NaOH ilavesiyle pH: 6.9-7'ye ayarlandı. B&P minimal besiyerine eklemek üzere 20X eser element, 2X demir sülfat ve 20X vitamin çözeltisi hazırlandı.

Çizelge 3.1. B&P minimal besiyeri (15 mM Malat/2mM Na Glutamat) içeriği

İçerik	g/L
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4.7H_2O$	0.2
DL- Malik Asit	2
Na Glutamat.H_2O	0.37
NaCl	0.4
$CaCl_2.2H_2O$	0.05

Eser element çözeltisi (20X): Çizelge 3.2'deki miktarlarda kimyasallar tartılarak 50 mL distile suda çözdürüldü. Böylece 20X eser element çözeltisi hazırlanmış oldu.

Çizelge 3.2. Eser element (20X) çözeltisinin içeriği

İçerik	mg/L
$ZnCl_2$	70
$MnCl_2.4H_2O$	100
H_3BO_3	60
$CoCl_2.6H_2O$	200
$CuCl_2.2H_2O$	20
$NiCl_2.6H_2O$	20
$Na_2MoO_4.2H_2O$	40
HCl (% 37 [v/v])	0.675 mL

Demir Sülfat ($FeSO_4$) çözeltisi (2X): 0.02 gram $FeSO_4$ tartılarak 10 mL distile suda çözdürüldü. Böylece 2X demir sülfat çözeltisi hazırlanmış oldu.

Vitamin çözeltisi (20X): Çizelge 3.3'deki miktarlarda thiamin, niasin ve biotinden tartılarak 50 mL distile suda çözdürüldü. Böylece 20X vitamin çözeltisi hazırlanmış oldu.

Çizelge 3.3. Vitamin çözeltisi içeriği

Vitaminler	mg/L
Thiamin	500
Nikotinik asit (Niasin)	500
Biotin	15

Hazırlanan B&P minimal besiyeri, eser element çözeltisi ve demir sülfat çözeltisi 121^{o}C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Yüksek sıcaklıkta vitaminlerin yapısı bozulacağından vitamin çözeltisinin sterilizasyonu 0.45 μm gözenekli filtreden geçirilerek sağlandı.

Otoklavdan sonra B&P besiyerine eser element ve demir sülfat çözeltisi eklendi. B&P besiyerinin 30^{o}C'ye kadar soğumasından sonra ise vitamin çözeltisi eklendi (Çizelge 3.4).

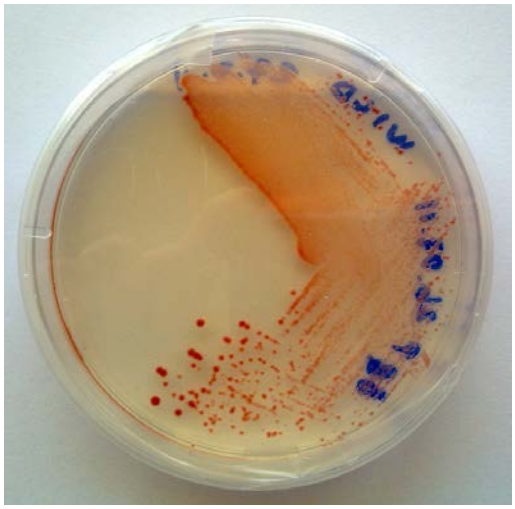
Çizelge 3.4. 1 litre B&P minimal besiyerine eklenen eser element, demir sülfat ve vitamin çözeltileri miktarları

Çözeltiler	ml/L
Eser Element Çözeltisi (20X)	0.05
Demir Sülfat Çözeltisi (2X)	1
Vitamin Çözeltisi (20X)	0.05

R.sphaeroides'in çoğaltılmasında kullanılan katı besiyeri, B&P minimal besiyerine otoklavdan önce agar (% 1.5) eklenerek hazırlandı. Otoklavdan sonra eser element, demir sülfat ve vitamin çözeltileri eklenerek karıştırıldı. Besiyeri petri kaplarına dökülerek katılaşması beklendi.

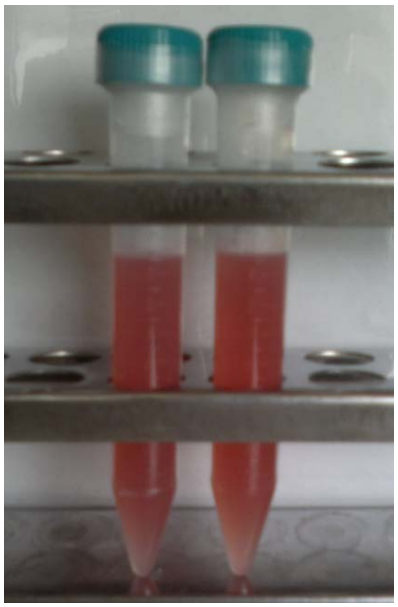
3.1.1.2. Kültür koşulları

Bakterileri aktifleştirmek amacıyla stoklanmış *R.sphaeroides*'den öncelikle katı besiyerlerine ekim yapıldı (Şekil 3.1). Besiyerlerinin kurumaması için petri kaplarının kenarları parafilm ile sarıldı.



Şekil 3.1. *R.sphaeroides*'in B&P katı besiyerindeki görüntüsü

Bakteriler katı besiyerlerinde, aerobik ve ışıksız ortamda, 29^{o}C sıcaklıktaki inkübatörde (Binder BD 53) 3-4 gün inkübasyonla çoğaltıldıktan sonra sıvı besiyerine ekim yapıldı. Sıvı besiyerleri aerobik koşullarda, ışık kaynağı altında (75 watt Tungsten lambası) ve 29^{o}C'de iki gün bekletildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *R.sphaeroides*'in B&P sıvı besiyerindeki görüntüsü

Hidrojen ve ALA üretiminde gerekli olan anaerobik koşullar, besiyerlerinin üzerinden 3 dakika argon gazı geçirilerek sağlandı.

3.2. Hidrojen ve ALA Üretiminde Kullanılan Substrat

Hidrojen ve ALA üretiminde Çumra Efes Pilsen Malt Üretim Fabrikasından alınan ve malt üretiminde kullanılmayan elek altı, atık arpalar substrat olarak değerlendirildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Efes Pilsen Malt Üretim Fabrikasından elde edilen atık arpalar

Atık arpalar oda sıcaklığında çimlendirilerek çimlenme oranlarının % 74 civarlarında olduğu gözlemlendi. Atık arpaların öncelikle ham yağ, ham protein ve nişasta tayinleri yapıldı. Sonra atık arpalar asit hidroliz ön işleminden geçirildi ve arpa hidrolizatlarının toplam şeker miktarı, çeşitli elementlerin miktarları, toplam fenol ve amonyum miktarları belirlendi.

3.2.1. Atık arpalarda uygulanan analizler

3.2.1.1. Ham yağ tayini

Atık arpalardaki ham yağ miktarı Goldfish yöntemine göre belirlenmiştir (Wrolstad ve ark., 2005). Atık arpalar 1 mm elekten geçecek şekilde öğütüldü (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Öğütülen atık arpalar

Öğütülen arpalardan 1 gram tartılarak kurutma kağıdının üzerine konuldu ve kurutma kağıdı katlanarak yağ kartuşu içine yerleştirildi. Yağ kartuşları, yağ ekstraksiyon cihazına (Velp SER 148) yerleştirildi. Krozelerin darası alındıktan sonra içine 50 mL hekzan eklendi. Krozeler, yağ ekstraksiyon cihazına yağ kartuşlarının altına gelecek şekilde yerleştirildi. Daha sonra yağ ekstraksiyon cihazının kolu çekilerek kartuşların krozedeki hekzan içine gömülmesi sağlandı. 1 saat boyunca yağların ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Ekstraksiyon işleminin son 15 dakikasında kroze içerisindeki hekzan uçuruldu. Böylelikle kroze içinde ekstrakte edilen yağ kaldı. Krozeler 105^{o}C'de 3 saat kurutuldu. Krozelerin son ağırlıkları tartılarak % yağ oranı hesaplandı.

$$\% \text{ Ham Yağ} = \frac{\text{Son tartım} - \text{İlk tartım}}{\text{Numune miktarı}} \times 100$$

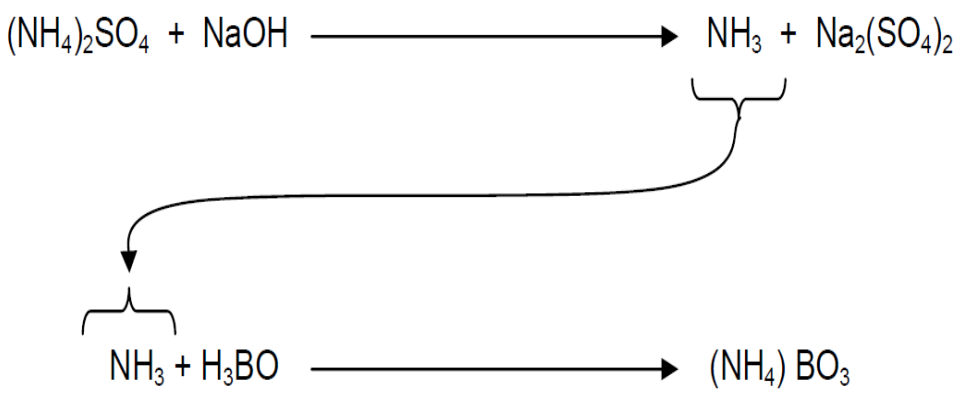
3.2.1.2. Ham protein tayini

Atık arpalarda ham protein tayini Kjeldahl yöntemi ile gerçekleştirildi (Wrolstad ve ark., 2005). 1 mm elekten geçecek şekilde öğütülen atık arpalardan 0.5 gram tartıldı ve Kjeldahl tüpüne konuldu. Üzerine katalizör olarak bir tablet Na_2SO_4 ve bir tablet $CuSO_4$ atıldı. Tüplere 15 mL % 96'lık H_2SO_4 eklendi. Tüpler Kjeldahl yaş yakma ünitesine yerleştirildi. Yaş yakma süresince buharlaşan H_2SO_4'ü ortamdan uzaklaştırmak için vakum sistemi çalıştırıldı. 420^oC'de 45 dakika yakılarak yaş yakma basamağı tamamlandı. Böylece atık arpalar konsantre sülfürik asit (H_2SO_4), katalizör ve ısı etkisiyle yakıldı. Atık arpadaki azotun, sülfürik asidin sülfat kökü ile bağlanmasıyla amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) oluştu:

$$\text{Azotlu Madde} + H_2SO_4 \xrightarrow{\text{Sıcaklık + Katalizör}} (NH_4)_2SO_4 + H_2O + CO_2 + SO_2 \qquad (3.1)$$

Yaş yakma işleminden sonra tüpler yaş yakma ünitesinden alınarak soğumaya bırakıldı.

Kjeldahl yöntemi ile ham protein tayininde ikinci basamak distilasyon işlemidir. Distilasyonda amaç yaş yakma sonucu oluşan amonyum sülfatın $(NH_4)_2SO_4$ sodyum hidroksitle (NaOH) muamele edilerek NH_3 (amonyak) oluşturulması ve sonrasında borik asit tarafından tutularak amonyum borata $(NH_4)BO_3$ dönüştürülmesini sağlamaktır (Şekil 3.5) (Kutlu, 2008).



Şekil 3.5. Amonyum sülfatın [$(NH_4)_2SO_4$] amonyum borata [$(NH_4)BO_3$] dönüşüm reaksiyonu (Kutlu, 2008)

Tüpler soğuduktan sonra distilasyon cihazının (Velp UDK 132) tüp kısmına yerleştirildi. Cihazın distile içeriği toplayıcı kısmına da içerisinde 50 mL borik asit bulunan balon joje yerleştirildi. Cihazın distilasyon zaman düğmesi ayarlanarak distilasyon işlemi başlatıldı. Distilasyon işlemi bitiminde Kjeldahl tüpü cihazdan alındı ve içeriği çeşme suyunun açık olduğu lavaboya yavaşça döküldü. Daha sonra balon joje alınarak içerisine 6 mL indikatör eklendi. Balon joje içerisine titrasyon işlemi ile renk dönüşümü gerçekleşinceye kadar 0.1 N HCl eklendi. Renk dönüşümünün gerçekleştiği HCl miktarı kaydedildi.

Örnekler iki tekrarlı yapıldı ve bununla beraber içerisinde örnek bulunmayan bir de kör yapıldı.

Örneklerdeki protein miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Toplam N} = \frac{1.4007 \times (\text{Titrasyonda harc. HCl} - \text{Kör için Harc. HCl}) \times \text{Faktör} \times 1.4}{\text{Örnek miktarı}}$$

$$\% \text{ Ham Protein} = \text{Toplam N} \times 6.25$$

3.2.1.3. Toplam nişasta miktarının belirlenmesi

Toplam nişasta miktarı polarimetrik yöntemle belirlendi (Anonim, 2011). 1 mm elekten geçecek şekilde öğütülen arpalardan 3 gram tartıldı ve bir erlene konuldu. Üzerine 50 mL % 1'lik HCl çözeltisi eklendi. 90^oC'deki su banyosunda ilk 3 dakika çalkalamak suretiyle 15 dakika bekletildi. Su banyosundan çıkarıldıktan sonra üzerine 40 mL saf su eklendi. Sonra çeşme altında soğutuldu. Üzerine 10 mL % 4'lük Wolfram

fosforik asit çözeltisi eklendi. Filtre kağıdı ile süzüldü. Polarimetrede (Krüss P 3001) okundu ve okunan değere göre % nişasta miktarı hesaplandı:

$$\% \text{ Nişasta miktarı} = \frac{\text{Polarimetrede ölçülen değer x Son hacim}}{\text{Arpa sabiti x Örnek miktarı}} \times 100$$

3.2.2. Atık arpalarda asit hidroliz ön işlemi

R.sphaeroides karbon kaynağı olarak organik asitler ile monosakkarit ve disakkaritleri kullanma kabiliyetine sahiptir (Koku ve ark., 2002). Atık arpalarda bulunan nişastaların monosakkaritlere ve disakkaritlere parçalanması amacıyla atık arpalara asit hidroliz işlemi uygulandı (Kapdan ve ark., 2009). Atık arpalar öncelikle 2 mm açıklıklı elekten geçecek şekilde öğütüldü. % 3, % 6 ve % 9 yoğunluklarında arpa hidrolizatları elde edilmek amacıyla, toz haline gelen arpalardan 3 gram, 6 gram ve 9 gram tartılarak ayrı ayrı şişelere konuldu. Her birinin üzerine 100 mL saf su eklenerek karıştırıldı. Daha sonra bu karışımlar derişik sülfürik asitle (H_2SO_4) pH:3'e ayarlandı. Bu karışımlar otoklavda 121^{o}C'de 30 dakika asit varlığında hidroliz edildi. Hidroliz işleminden sonra katı kısmı uzaklaştırmak amacıyla hidrolizatlar 8500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısımları alınarak filtre kağıdından geçirildi. Daha sonra hidrolizatlar 10 M NaOH ile pH:7'ye ayarlandı. pH ayarlandıktan sonra hidrolizatların renginin koyulaştığı ve bekletildiği takdirde çökmelerin olduğu gözlendi. Hidrolizatların renginin daha saydam olması bakterilerin ışıktan daha fazla faydalanabilmeleri için önemli olduğundan hidrolizatlar 8500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısımları alındı. Elde edilen hidrolizatlarda toplam şeker, organik asit, toplam fenol ve amonyum miktarlarının belirlenebilmesi için analizler yapıldı. Daha sonra bu hidrolizatlardan hidrojen ve ALA üretimi için besiyerleri hazırlandı.

3.2.2.1. Arpa hidrolizatlarında gerçekleştirilen analizler

3.2.2.1.1. Toplam şeker miktarının belirlenmesi

Arpa hidrolizatındaki toplam basit şeker miktarı, asit-fenol spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir (Dubois ve ark., 1956). Bu yöntemde gerekli olan kimyasallar ve bu kimyasalların hazırlanışı aşağıda verilmiştir:

10 mL % 4'lük fenol hazırlanışı: 0.4 gram fenol, 10 mL distile suda çözdürüldü.

40 mL % 96 sülfirik asit hazırlanışı: Derişimi % 98.51 olan H_2SO_4'den 39.18 mL alınarak distile su ile 40 mL'ye tamamlandı. Böylelikle 40 mL % 96'lık H_2SO_4 hazırlandı.

1 mg/mL şeker standartları: Standart eğrinin çıkarılması için şeker standartları hazırlandı. 0.1 gram glukoz tartılarak 10 mL distile suda çözdürüldü. Elde edilen bu çözelti 10 mg/mL oldu. Bu çözeltinin 1 mg/mL yapılması için, hazırlanan 10 mg/mL'lik çözeltiden 100 µL alınarak üzerine 900 µL distile su eklendi.

Öncelikle standart eğri oluşturuldu. Bu amaçla 1 adet kör ve 10 adet standart için toplam 11 adet temiz deney tüpü hazırlandı. Bu deney tüplerine Çizelge 3.5'de verilen miktarlarda distile su, önceden hazırlanmış olan 1 mg/mL şeker standartları, % 4'lük fenol ve % 96'lık H_2SO_4'den her tüpe sırayla eklendi. Daha sonra tüplerden 2 mL alınarak küvetlere konuldu ve spektrofotometre (Biochrom Libra S22) ile OD 490 nm'de ölçümler yapıldı. Ölçülen değerlerden şeker standart eğrisi çıkarıldı.

Çizelge 3.5. Arpa hidrolizatlarında toplam şeker miktarının belirlenebilmesi için şeker standart eğrisinin çıkarılması

Standartlar	dH_2O	Glukoz Miktarı	% 4'lük Fenol	% 96'lık H_2SO_4	Son Hacim
Kör	50 µL	-	500 µL	2.5 mL	3.05 mL
1.Tüp	45 µL	5 µL	500 µL	2.5 mL	3.05 mL
2.Tüp	40 µL	10 µL	500 µL	2.5 mL	3.05 mL
3.Tüp	35 µL	15 µL	500 µL	2.5 mL	3.05 mL
4.Tüp	30 µL	20 µL	500 µL	2.5 mL	3.05 mL
5.Tüp	25 µL	25 µL	500 µL	2.5 mL	3.05 mL
6.Tüp	20 µL	30 µL	500 µL	2.5 mL	3.05 mL
7.Tüp	15 µL	35 µL	500 µL	2.5 mL	3.05 mL
8.Tüp	10 µL	40 µL	500 µL	2.5 mL	3.05 mL
9.Tüp	5 µL	45 µL	500 µL	2.5 mL	3.05 mL
10.Tüp	-	50 µL	500 µL	2.5 mL	3.05 mL

Standart eğri çıkarıldıktan sonra, % 3, % 6 ve % 9'luk arpa ile yapılan hidrolizatların şeker miktarları hesaplandı. Bunun için her bir hidrolizattan iki örnek alınarak üzerlerine çizelge 3.6'da verilen miktarlarda kimyasallar eklendi ve oluşan renk spektrofotometrede OD 490 nm'de ölçüldü. Önceden çıkartılmış olan şeker standart eğrisine göre hidrolizatlardaki şeker miktarları belirlendi.

Çizelge 3.6. % 3, % 6 ve % 9'luk arpa hidrolizatlarındaki toplam şeker miktarının belirlenmesi için eklenen kimyasal ve miktarları

	TÜPLER	NUMUNE MİKTARI	% 4'LÜK FENOL	% 96'LIK H_2SO_4	dH_2O (mL)	SON HACİM
% 3'LÜK ARPA HİDROLİZATI	1	5 µL	500 µL	2.5 mL	45 µL	3.05 mL
	2					
% 6'LIK ARPA HİDROLİZATI	1	5 µL	500 µL	2.5 mL	45 µL	3.05 mL
	2					
% 9'LUK ARPA HİDROLİZATI	1	5 µL	500 µL	2.5 mL	45 µL	3.05 mL
	2					

3.2.2.1.2. Arpa hidrolizatlarında element analizi

% 3, % 6 ve % 9 yoğunluklarındaki arpa hidrolizatlarında bulunan çeşitli elementlerin (B, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Al, Ca, Mg, Na, K) miktarları ICP-MS (Perkin Elmer Elan DRC-e) ile belirlendi.

3.2.2.1.3. Toplam fenol miktarlarının belirlenmesi

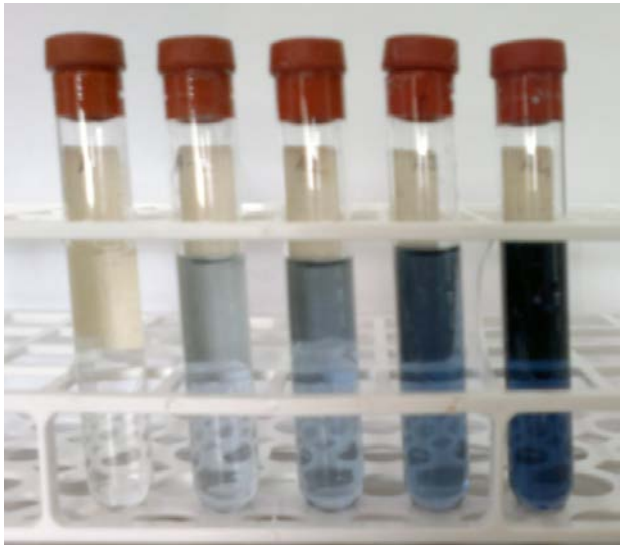
% 3 yoğunluğundaki arpa hidrolizatının toplam fenol miktarlarının belirlenmesinde Folin-Ciocalteu yöntemi kullanıldı (Ragaee ve ark., 2006). Hidrolizatlardaki fenol miktarları gallik asit eş değerine (GAE) göre hesaplandığından öncelikle gallik asit standart eğrisi çıkarıldı.

Gallik asit stok çözeltisi hazırlanması: 0.05 g kuru gallik asit tartıldı ve falkon içinde 1 mL etanolde çözdürüldü. 9 mL deiyonize su ile 10 mL ye tamamlandı.

% 10'luk sodyum karbonat ($NaCO_3$) çözeltisi hazırlanması: 60 mL deiyonize su manyetik karıştırıcıda kaynama noktasına gelinceye kadar ısıtıldı. Isınan suyun üzerine 7.5 g sodyum karbonat eklenerek balık aracılığıyla karıştırıldı ve

çözünmesi sağlandı. Çözelti oda sıcaklığında soğutuldu. Soğuduktan sonra birkaç sodyum karbonat kristali çözeltiye eklendi. Çözelti 24 saat oda sıcaklığında bekletildi. Ertesi gün toplam hacmi 75 mL yapmak için 15 mL deiyonize su eklendi.

6 adet tüpe sıra ile 0 – 0.1 – 0.2 – 0.3 – 0.5 - 1 mL önceden hazırlanmış gallik asit stok çözeltisinden eklenerek steril saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Böylelikle standartlar seyreltilmiş oldu. Seyreltilen gallik asit çözeltilerinden 100 µL alınarak 6 adet temiz deney tüpüne aktarıldı. % 3'lük arpa hidrolizatından ise 100 µL, 200 µL, 400 µL ve 800 µL olmak üzere dört farklı miktarda alınarak temiz deney tüplerine eklendi. Her bir tüp ikişer kez tekrarlandı. Standartların ve örneklerin bulunduğu deney tüplerinin her birine 6.5 mL deiyonize su eklendi. Tüpler 10 saniye vortekslendi. Her tüpe 500 µL Folin's Reagent eklenerek 10 saniye vortekslendi. Tüpler 8 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tüplere 3 mL % 10'luk $NaCO_3$ çözeltisinden eklendi. 10 saniye vortekslendi. Tüpler 40^{o}C'deki çalkalamalı inkübatöre yerleştirilerek 200 rpm'de 30 dakika çalkalandı. Standartlar ve örnekler OD 765 nm'de spektrofotometrede (Biochrom Libra S22) okundu (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Folin Ciocalteu yöntemi uygulanmış % 3 arpa hidrolizatında fenol miktarlarına göre renk değişikliği

3.2.2.1.4. Toplam amonyum miktarının belirlenmesi

Amonyum hidrojen üretiminden sorumlu nitrojenaz enzimini baskılayan bir bileşiktir (Kars ve Gündüz, 2010). Dolayısıyla hidrojen üretim besiyerindeki miktarı baskılayıcı miktarın altında olmalıdır. Bu nedenle, arpa hidrolizatlarında bulunan

toplam amonyum miktarı, amonyum test kiti (Norateks, Türkiye) ile ölçüldü. Arpa hidrolizatları koyu renkli olduğu ve sahip olduğu rengin sonucu etkilememesi için % 3 arpa hidrolizatı 5 kat sulandırılarak ölçüm yapıldı. 1 mL % 3'lük arpa hidrolizatı temiz bir deney tüpüne alındı. Üzerine 4 mL saf su eklendi ve karıştırıldı. 5 kat sulandırılmış % 3 arpa hidrolizatı üzerine kit içerisinde bulunan NH_4-1'den 2 damla, NH_4-2'den de 4 damla damlatıldı ve çalkalandı. Renk oluşumu için 5 dakika beklendi. Kit içerisinde bulunan skala ile oluşan renk karşılaştırılarak toplam amonyum miktarı belirlendi.

3.2.3. Arpa hidrolizatlarından besiyeri hazırlanması

R. sphaeroides ile hidrojen ve ALA üretiminde iki önemli faktör; besiyerinin ışık geçirgenliği ve amonyum miktarının bakteride bulunan nitrojenaz enzim aktivitesini inhibe edecek düzeyde olmamasıdır (Koku ve ark., 2002). % 3'lük arpa hidrolizatından hazırlanan besiyerleri amonyum miktarı bakımından uygundur fakat % 9'luk arpa hidrolizatı ile hazırlanan besiyerine göre daha az saydamdır. Bu nedenle arpa hidrolizatlarından besiyeri hazırlarken % 3 ve % 9'luk arpa hidrolizatları kullanıldı.

% 3 ve % 9'luk arpa hidrolizatlarının her birinden farklı şeker yoğunluğuna sahip 45 mL'lik besiyerleri hazırlandı ve besiyerlerine % 10'luk (v/v) ekim yapıldı (45 mL Besiyeri + 5 mL inokulasyon=50 mL) (Şekil 3.7). Besiyerleri için 50 mL hacimli cam penisilin şişeleri ve kauçuk tıpalar kullanıldı.



a **b**

Şekil 3.7. a. % 3 arpa hidrolizatından hazırlanan besiyerleri; **b.** % 9 arpa hidrolizatından hazırlanan besiyerleri

Çizelge 3.7’ de % 3 ve % 9’luk arpa hidrolizatlarından hazırlanan farklı şeker yoğunluklarına sahip besiyerleri verilmiştir.

Çizelge 3.7. % 3 ve % 9’luk arpa hidrolizatlarından farklı şeker miktarlarına göre hazırlanan besiyerleri

ARPA YOĞUNLUĞU	ŞEKER MİKTARI			
% 3 Arpa	5 g/L	6 g/L	7 g/L	8g/L
% 9 Arpa	5 g/L	7 g/L	9 g/L	11 g/L

Asit-fenol spektrofotometrik yöntem ile belirlenen % 3’lük arpa hidrolizatında bulunan toplam şeker miktarı 11.58 g glukoz/L; % 9’luk arpa hidrolizatında bulunan şeker miktarı ise 48.15 g glukoz/L olarak bulundu. Bu sonuçlara göre farklı şeker yoğunluğuna sahip her bir besiyeri için besiyerine eklenecek arpa hidrolizatı miktarı standardize amaçlı ayrı ayrı hesaplandı. Çizelge 3.8 ve 3.9’da 45 mL besiyerlerine eklenecek % 3 ve % 9 arpa hidrolizatları miktarları verilmiştir.

Çizelge 3.8. Farklı şeker yoğunluğuna sahip 45 mL besiyerlerine % 3 arpa hidrolizatından eklenen miktar

Şeker Yoğunlukları	**% 3 Arpa Hidrolizatından Eklenen Miktar**
5 g/L	21.55 mL
6 g/L	25.86 mL
7 g/L	30.17 mL
8 g/L	34.48 mL

Çizelge 3.9. Farklı şeker yoğunluğuna sahip 45 mL besiyerlerine % 9 arpa hidrolizatından eklenen miktar

Şeker Yoğunlukları	**% 9 Arpa Hidrolizatından Eklenen Miktar**
5 g/L	5.19 mL
7 g/L	7.27 mL
9 g/L	9.35 mL
11 g/L	11.42 mL

Daha önce yapılan ICP-MS analizi sonucuna göre arpa hidrolizatlarında bulunan Mg, Ca, Mo, Co, Fe, B gibi gerekli elementlerin *R.sphaeroides*'in üremesi ve hidrojen ile ALA üretebilmesi için yeterli olmadığı belirlendi. Bu nedenle içerisinde çizelge 3.10'da verilen miktarlarda $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$ ve ayrıca tampon olarak K_2HPO_4 bulunan 500 mL (2X) stok çözeltisi ile aynı miktarlarda $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$, K_2HPO_4 bulunan 200 mL (5X) stok çözeltisi hazırlandı.

Çizelge 3.10. 2X ve 5X olarak hazırlanan stok çözeltilerine eklenen $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$ ve K_2HPO_4 miktarları

İçerik	2X Çözelti (g)	5X Çözelti (g)
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	0.2
$CaCl_2.2H_2O$	0.025	0.025
K_2HPO_4	0.5	0.5
dH_2O	500 mL	200 mL

% 3 arpa hidrolizatından elde edilen besiyerlerine 5X stok çözeltisinden 10 mL; % 9 arpa hidrolizatlarından elde edilen besiyerlere ise 2X stok çözeltisinden 25 mL eklendi. % 3' lük arpa hidrolizatından hazırlanan besiyerlerine 2X stok çözeltisinden 25 mL eklendiğinde besiyeri hacminin 45 mL'yi geçmesinden dolayı iki ayrı yoğunlukta stok çözeltisi hazırlandı.

Arpa hidrolizatlarında fazla miktarda sodyum bulunduğundan ve sodyum fazlalığının neden olduğu osmotik basınç bakterileri olumsuz etkileyeceğinden NaCl arpa besiyerlerine eklenmedi. Arpa hidrolizatlarında yeteri kadar şeker olduğu için ve maliyeti azaltmak amacıyla besiyerine dışarıdan karbon kaynağı olarak malik asit de eklenmedi. Ayrıca arpa hidrolizatlarında amonyum bulunduğu için ve fazla miktarda amonyum bakterinin nitrojenaz enzimini inhibe edeceğinden dolayı dışarıdan azot kaynağı olarak Na-glutamat eklenmedi. Glutamat eklenmesi maliyeti de arttıracağından istenilen bir durum değildir. Çizelge 3.11'de B&P minimal besiyeri içeriği ile arpa besiyerleri içerikleri karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.11. *R. sphaeroides*'in sentetik büyüme besiyeri olan B&P minimal besiyeri ile arpa hidrolizatlarından hazırlanan besiyerlerinin içeriklerinin karşılaştırılması

Gereken Kimyasallar	B&P Minimal Besiyeri (g/L)	Arpa Besiyerleri (g/L)
K_2HPO_4	0.5	0.5
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	0.2
DL-Malik Asit	2	-
L-Glutamik Asit (Na Glutamat.H_2O)	0.37	-
NaCl	0.4	-
$CaCl_2.2H_2O$	0.05	0.025
Eser Element Çözeltisi (20X)	0.05 mL/L	0.05 mL/L
Demir Sülfat Çözeltisi (2X)	1 mL/L	1 mL/L
Vitamin Çözeltisi (20X)	0.05 mL/L	0.05 mL/L

Stok çözeltiler ile eser element, demir sülfat ve vitamin çözeltilerinden besiyerlere eklenen miktarlar Çizelge 3.12 ve 3.13'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. % 3'lük arpa hidrolizatından hazırlanan farklı şeker miktarlarındaki 50 mL hacimli besiyerlerine eklenen maddeler

Şeker Miktarına Göre Besiyerleri	5X Stok Çözeltisi (mL)	% 3 Arpa Hidrolizatı (mL)	HCl ilavesi ile pH:6,9-7.0'ye ayarlandı.	Eser Element Çözeltisi (µL)	Demir Sülfat Çözeltisi (µL)	dH_2O ilavesi ile son hacim 45 mL'ye tamamlandı.
5 g/L	10	21.55		2.5	50	
6 g/L	10	25.86		2.5	50	
7 g/L	10	30.17		2.5	50	
8 g/L	10	34.48		2.5	50	

Çizelge 3.13. % 9'luk arpa hidrolizatından hazırlanan farklı şeker miktarlarındaki 50 mL hacimli besiyerlerine eklenen maddeler

Şeker Miktarına Göre Besiyerleri	2X Stok Çözeltisi (mL)	% 9 Arpa Hidrolizatı (mL)	HCl ilavesi ile pH:6,9-7.0'ye ayarlandı.	Eser Element Çözeltisi (µL)	Demir Sülfat Çözeltisi (µL)	dH_2O ilavesi ile son hacim 45 mL'ye tamamlandı.
5 g/L	25	5.19		2.5	50	
7 g/L	25	7.27		2.5	50	
9 g/L	25	9.35		2.5	50	
11 g/L	25	11.42		2.5	50	

50 mL hacimli penisilin şişelerine stok çözeltileri ve arpa hidrolizatları eklendikten sonra besiyerlerinin pH'sı ölçüldü ve yaklaşık 7.9 olduğu belirlendi. HCl ilavesi ile besiyerleri pH: 6.9-7'ye ayarlandı. Besiyerlerine eser element ve demir sülfat çözeltilerinden eklendi. Daha sonra besiyerlerinin son hacimleri distile su ile 45 mL'ye tamamlandı ve besiyerleri ile kauçuk tıpalar ayrı ayrı 121^{o}C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

Otoklavdan sonra besiyerlerinin yaklaşık 30^{o}C'ye kadar soğuması beklendi. Besiyerleri soğuduktan sonra her şişeye daha önceden 0.45 μm gözenekli filtreden geçirilerek steril edilmiş vitamin çözeltisinden 2.5 μL eklendi. Besiyerlerine 2 gün B&P besiyerinde inkübe edilmiş bakterilerden % 10'luk (v/v) ekim yapıldı. Daha sonra şişelerin tıpaları sıkıca kapatıldı. İlk olarak arpa besiyerlerinde *R. sphaeroides*'in üreme eğrisi çıkarılması planlandığından bakteriler 29^{o}C'deki inkübatörde ve ışık kaynağı olarak 75 watt ampul kullanılarak inkübe edildi. Çeşitli zaman aralıklarında optik yoğunluk ölçülerek üreme eğrileri oluşturuldu.

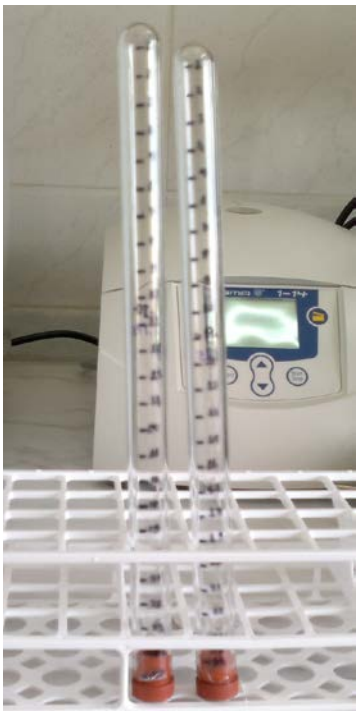
3.2.3.1. Arpa besiyerlerinde *R. sphaeroides*'in üreme eğrisi ve besiyerindeki pH değişim eğrisinin oluşturulması

% 3 ve % 9' luk arpa hidrolizatlarından hazırlanan besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra besiyerlerinden her gün 1 mL örnek alındı ve örnek alınan saatler kaydedildi. Alınan örneklerin öncelikle pH metre (WTW pH 330i) ile pH'ları ölçüldü ve bu değerlerle besiyerlerinin pH değişim eğrileri oluşturuldu. Daha sonra spektrofotometrede (Biochrom Libra S22) OD 660 nm'de ölçüm yapılarak alınan verilerden *R.sphaeroides*'in % 3 ve % 9 arpa hidrolizatlarından elde edilen besiyerlerindeki üreme eğrileri çıkarıldı.

3.2.4. Hidrojen düzeneğinin kurulması

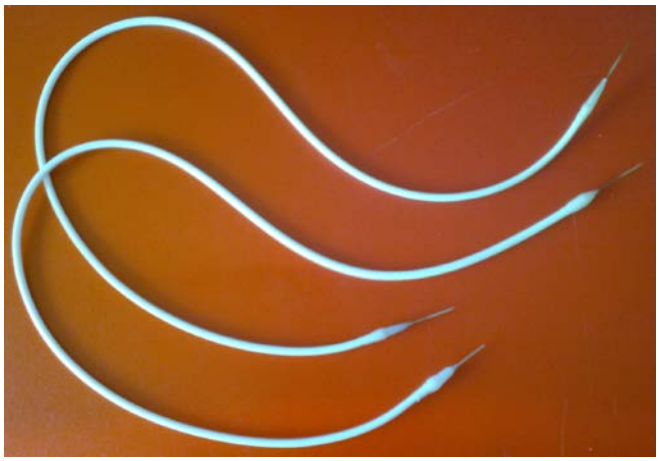
R.sphaeroides'in arpa besiyerlerindeki üreme eğrisi çıkarıldıktan sonra hidrojen üretim aşamasına geçildi. Farklı şeker derişimlerine sahip besiyerleri 50 mL hacimli penisilin şişelerinde hazırlandı. Besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra steril tıpalar sıkıca kapatıldı ve parafilmlendi. Anaerobik ortam sağlamak için her bir besiyerinin üzerinden 3 dakika argon gazı geçirildi. Hidrojen üretim düzeneği Uyar ve arkadaşlarının (2007) geliştirdiği yöntemle gerçekleştirildi.

Hidrojenin biriktiği 25-30 cm uzunluğundaki deney tüpleri hazırlandı (Şekil 3.8). Bu deney tüplerinde, tüplerin alt kısmından başlamak üzere cetvel aracılığıyla her cm işaretlendi. İşaretlenen kısımlardan rastgele 2 aralık belirlenerek bu iki aralık arasının kaç mL su aldığı belirlendi. Her tüp için 2 değer ölçüldü ve bunların ortalaması alındı. Daha sonra deney tüpleri ağzına kadar saf su ile doldurulduu ve ağızları kauçuk tıpalarla kapatıldı. Bu deney tüpleri ağız kısımları aşağı gelecek şekilde portüplere yerleştirildi.



Şekil 3.8. Hidrojenin toplandığı dereceli deney tüpleri

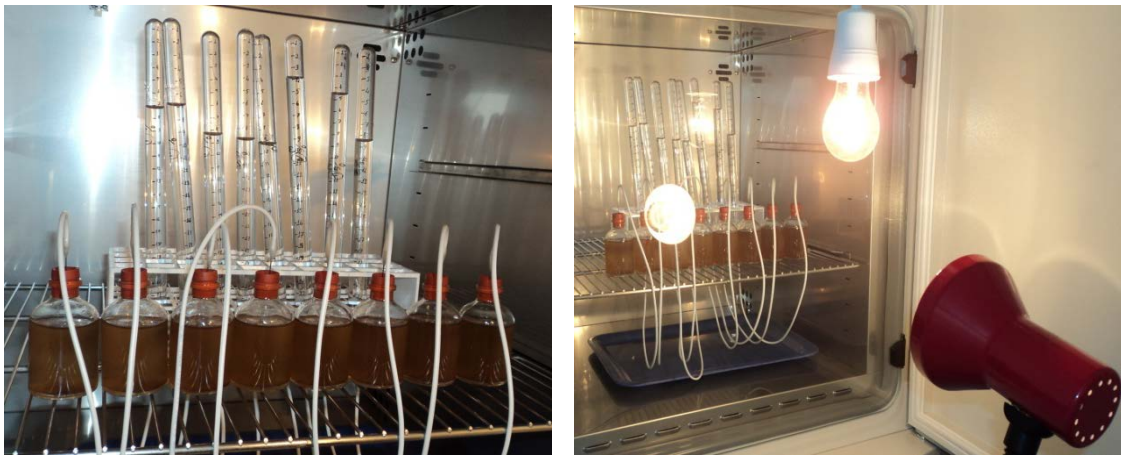
Besiyerlerinde biriken gazın hazırlanan deney tüplerine iletilebilmesi için kablolar hazırlandı. Yaklaşık 1 cm çapındaki elektrik kabloları 50 cm boyunda kesildi ve bu kabloların içerisindeki teller çıkarıldı; böylelikle kabloların yalıtım kısımları kaldı. Yeşil renkli enjeksiyon iğnelerinin plastik kısımları çıkarıldı. Geriye kalan iğne kısımları, hazırlanan kabloların her iki ucunda bir iğne olacak şekilde yapıştırıldı. İğnenin tıkanmamasına dikkat edildi. Daha sonra iğne ile kablonun birleştiği kısım parafilmlendi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Hidrojen düzeneğinde kullanılan kablolar

Deney düzeneği kurulmadan önce hazırlanan kabloların içerisinden % 70 alkol geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. Kabloların içerisindeki alkol tamamen boşaltıldı.

Kabloların bir ucundaki iğne, ters çevrilmiş deney tüplerinin kauçuk tıpalarına takıldı. Deney tüplerinin kauçuk tıpalarına bir de ucu boşta kalacak şekilde şırınga iğneleri takıldı. Kabloların diğer ucundaki iğne ise besiyerlerinin bulunduğu şişelerin kauçuk tıpalarına takıldı. Besiyerleri 29^{o}C'deki inkübatöre yerleştirildi ve yaklaşık10 cm önlerine 75 watt ve 100 watt olmak üzere iki adet tungsten ışık kaynağı konuldu. Böylelikle hidrojen üretim düzeneği tamamlanmış oldu (Şekil 3.10 ve 3.11).



Şekil 3.10. % 3 arpa hidrolizatından hazırlanan besiyerlerinde hidrojen üretim düzeneği



Şekil 3.11. % 9 arpa hidrolizatından hazırlanan besiyerlerinde hidrojen üretim düzeneği

R. sphaeroides tarafından üretilen gaz miktarı su yer değiştirme prensibine göre ölçüldü. Bu ilkeye göre bakteri tarafından üretilen gaz, kurulan düzenekteki kablolardan geçerek deney tüpüne gider ve deney tüpünün üst kısmında birikir. Deney tüpüne gelen gazın oluşturduğu basınç; üretilen gaz kadar saf suyun açıkta bırakılan şırınga iğnesinden dışarı akmasını sağlar.

3.2.4.1. Gaz kromotografisi ile hidrojen miktarının belirlenmesi

R. sphaeroides tarafından üretilen gazın hidrojen gazı miktarı gaz kromotografisi ile belirlendi. Deney tüplerinde biriken gazdan, şırınga (Hamilton, 22 GA 500 µL, gaz sızdırmaz #1750) ile 100 µL örnek alındı ve gaz kromotografisine (Agilent, 6890N) enjekte edildi. Supelco Carboxen 1010 kolonu ve termal iletkenlik dedektörü (TCD) kullanıldı. Gaz analizinde taşıyıcı gaz olarak 22.3 mL/dk akış hızında argon gazı kullanıldı. Fırın, enjektör ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla 140^{o}, 160^{o}C, 170^{o}C olarak ayarlandı.

3.2.5. ALA üretimi için besiyeri tasarımı

ALA üretimi için % 9' luk arpa hidrolizatıyla hazırlanan besiyerleri kullanıldı çünkü bu besiyerlerinin saydamlığı % 3 arpa hidrolizatından hazırlanan besiyerlerine oranla daha fazlaydı. ALA'nın öncül maddesi olan levulinik asit ile B12 vitamini varlığı ALA üretimini arttırmaktadır (Sasaki ve ark., 1990). Bu nedenle ALA üretim besiyerine hidrojen üretiminde kullanılan besiyerlerinden farklı olarak levulinik asit ve B12

vitamini de eklendi. Besiyerlerine eklenmek üzere B12 vitamini ve levulinik asit çözeltisi hazırlandı:

B12 vitamini çözeltisi: 5 mg B12 vitamini 10 mL suda çözdürüldü ve 0.45 μm por açıklıklı filtreden geçirilerek sterilize edildi. % 9' luk arpa hidrolizatından hazırlanan her bir besiyerine otoklavdan sonra 20X vitamin çözeltisi ile birlikte 250 μL B12 vitamini çözeltisinden eklendi.

3 M levulinik asit çözeltisi (2X): 3.484 gram levulinik asit tartılarak 4 mL distile suda çözdürüldü. 10 M NaOH ilavesi ile pH:6.9-7'ye ayarlandı. Distile su ile 10 mL'ye tamamlandı. 0.45 μm gözenekli filtreden geçirilerek sterilize edildi.
Besiyerindeki levulinik asit varlığı bakterilerin üremesini azaltır. 50 mM üzerindeki levulinik asit varlığı bakterilerin hücre üremesini tamamen durdurur (Tangprasittipap ve Prasertsan, 2002). Bu nedenle her bir besiyerlerine 30 mM levulinik asit 34. saatte yani bakterilerin log fazının sonlarına doğru eklenmiştir.

Çizelge 3.14'de ALA besiyerlerine eklenen çözeltiler verilmiştir.

Çizelge 3.14. % 9' luk arpa hidrolizatından hazırlanan ALA üretim besiyerlerine eklenen çözeltiler ve miktarları

Hazırlanan Çözeltiler	**50 mL (45 mL Besiyeri + 5 mL İnokulsayon) Hacimli Besiyerlerine Eklenen Miktar**
K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$ İçeren Stok Çözeltisi (2X)	25 mL
Demir Sülfat Çözeltisi (2X)	50 μL
Eser Element Çözeltisi (20X)	2.5 μL
Vitamin Çözeltisi (20X)	2.5 μL
B12 Vitamini Çözeltisi	250 μL
3 M Levulinik asit Çözeltisi (2X)	500 μL

% 9' luk arpa hidrolizatından hazırlanan besiyerleri ve kauçuk tıpalar 121^oC'de 20 dakika otoklavlandı. Otoklavdan sonra besiyerlerinin soğuması beklendi ve daha sonra her bir besiyerine Çizelge 3.14'deki miktarlarda vitamin çözeltisi ile birlikte B12 vitamini çözeltisi eklendi. Besiyerlerine % 10'luk (v/v) ekim yapıldı. Besiyerleri 3 dakika argondan geçirilerek anaerobik ortam oluşturuldu. Hazırlanan ALA besiyerlerinde bakterilerin ALA üretimleri ile birlikte hidrojen üretimleri de araştırıldı. Hidrojen düzeneği kurularak bakteriler 29^oC'deki inkübatörde 75 watt ve 100 watt ışık kaynakları altında inkübe edildi. 34. saatte düzenek bozuldu ve hazırlanan 3 mM

levulinik asit çözeltisinden her bir besiyerine 500 µL eklendi. Besiyerleri tekrardan argon gazından geçirilerek anaerobik ortam oluşturuldu. Hidrojen düzeneği kuruldu. 29^{o}C'de 75 watt ve 100 watt ışık kaynakları altında bakterilerin inkübasyonuna devam edildi.

3.2.5.1. Hücre dışı ALA miktarının spektrofotometrik yolla belirlenmesi

5-Aminolevulinik asit *R. sphaeroides* tarafından hücre dışına salgılandığı için, ALA'nın besiyerindeki miktarı spektrofotometrik yöntemle belirlendi (Chaikritsadakarn ve ark., 2004). Hidrojen üretiminde kullanılan % 3 ve % 9' luk arpa hidrolizatlarından hazırlanan besiyerleriyle ALA üretimi için hazırlanan besiyerlerinin hücre dışı ALA miktarına bakıldı. Bu yöntem için gerekli olan kimyasallar ve hazırlanışları aşağıda verilmiştir:

% 1 Asetilaseton içeren 1 M asetat tamponu (50 mL): 1 M asetat tamponundaki glasiyal asetik asit ($C_2H_4O_2$) miktarı:

Glasiyal asetik asidin moleküler ağırlığı: 60.05 g/mol; yoğunluğu: 1.049 g/cm^3

50 mL hacimli 1 M asetat tamponuna:

$$1\ \mathbf{M} = \frac{\mathbf{n}}{\mathbf{50 \times 10^{-3}}}$$

n=0.05 mol Glasiyal asetik asit

m= 3.0025 gram Glasiyal asetik asit olmalıdır.

d=1.049 g/cm^3 ise ve cm^3=mL olduğundan;

1 mL 1.049g Glasiyal asetik asit
x mL 3.0025 g Glasiyal asetik asit
} x= 2.862 mL glasiyal asetik asit eklenmelidir.

50 mL, 1 M asetik asit tamponu hazırlandı. 20 mL distile su üzerine 2.862 mL glasiyal asetik asit eklendi. Çözelti 25 mL'ye tamamlandı. NaOH ilavesiyle pH:4.7'ye ayarlandı. Tampon çözeltisi distile suyla 50 mL'ye tamamlandı.

Ehrlich reaktifi (50 mL): Ehrlich reaktifi % 2 (w/v) p-dimetil aminobenzaldehit ve 8 mL % 70 perklorik asit içeren 50 mL asetik asit çözeltisidir. 1 gram p-dimetil aminobenzaldehit tartılarak bir flaska konuldu. Üzerine 8 mL % 70 perklorik asit eklendi. Çözelti glasiyal asetik asit ile 50 mL'ye tamamlandı.

ALA standartları için hazırlanan 500 mM stok çözelti (1 mL): 8 farklı derişimde ALA standardı hazırlamak için öncelikle 1 mL 500 mM ALA stok çözeltisi hazırlandı. Bunun için 0.0838 g ALA, 1 mL steril saf suda çözdürüldü.

Öncelikle ALA standart eğrisi çıkarıldı. Bunun için 8 adet temiz deney tüpü hazırlandı ve bu deney tüplerine Çizelge 3.15'de belirtilen miktarlarda ALA stok çözeltisinden eklendi. Her tüpün hacmi saf su ile 100 µL'ye tamamlandı, tüpler vortekslendi. Tüplere 2 mL hazırlanan asetat tamponundan eklendi. Tüpler vortekslendi ve 15 dakika 100^{o}C'deki suda bekletildi. 15 dakika sonra tüpler buz içerisinde hızlıca soğutuldu ve tüplere 3.5 mL Ehrlich reaktifinden eklendi, tüpler vortekslendi. Renk oluşumu için 15 dakika beklendi. Daha sonra küvetlere çözeltilerden 2 mL alınarak spektrofotometrede OD 533 nm de ölçüm yapıldı ve ALA standart eğrisi çıkarıldı.

Çizelge 3.15. Besiyerlerinde hücre dışı ALA miktarının belirlenmesi için ALA standart eğrisinin çıkarılması

Standart Numaraları	**ALA Stok Çözeltisi (µL)**	**dH_2O (µL)**	**Asetat Tamponu (mL)**	15 dakika 100^{o}C'deki suda bekletildi.	Buzda hızlıca soğutuldu.	**Ehrlich Reaktifi (mL)**	Renk oluşumu için 15 dakika bekletildi.
1	0.781	99.219	2			3.5	
2	1.563	98.437	2			3.5	
3	3.125	96.875	2			3.5	
4	6.25	93.75	2			3.5	
5	12.5	87.5	2			3.5	
6	25	75	2			3.5	
7	50	50	2			3.5	
8	100	-	2			3.5	

% 3 ve % 9' luk arpa hidrolizatından hazırlanan besiyerleri ile ALA üretimi için hazırlanan besiyerlerinde hücre dışı ALA'nın tespiti için öncelikle ışık kaynağı altında

ve anaerobik koşullarda inkübe edilen besiyerleri 15 gün inkübasyondan sonra 8500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım filtre kağıdı ile süzüldü. Daha sonra bu besiyerlerinden 200 µL alınarak ALA standartlarına uygulanan işlemler uygulandı (Çizelge 3.16). Örneklerin analizinde kör tüpüne örneğin renkli olmasından dolayı 200 µL örnek de eklendi, renk oluşmaması için asetat tamponu yerine su kullanıldı; 3.5 mL Ehrlich reaktifi eklendi.

Eklenen 200 µL örnek spektrofotometrenin ölçebileceği kadar renk oluşturmadı. Bu nedenle besiyerlerindeki toplam ALA miktarının belirlenebilmesi için besiyerleri -110^{o}C'de liyofilizasyon işlemi ile yoğunlaştırıldı. Liyofilizasyon ürünleri 2 mL suda çözdürüldü ve bu örneklerden 500 µL alınarak ALA miktarları hesaplandı

Çizelge 3.16. % 3 ve % 9' luk arpa hidrolizatından hazırlanan besiyerleri ile ALA üretimi için hazırlanan besiyerlerinde hücre dışı ALA miktarının belirlenmesi

	Örnek Numaraları	**Örnek (µL)**	**Asetat Tamponu (mL)**	15 dakika 100^{o}C'deki suda bekletildi.	Buzda hızlıca soğutuldu.	**Ehrlich Reaktifi (mL)**	Renk oluşuncaya kadar 15 dakika bekletildi.
% 3 Arpa Besiyeri	**1**	200	2			3.5	
	2	200	2			3.5	
% 9 Arpa Besiyeri	**1**	200	2			3.5	
	2	200	2			3.5	
ALA Üretimi için Hazırlanan Besiyeri	**1**	200	2			3.5	
	2	200	2			3.5	

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Atık Arpadaki Ham Yağ, Toplam Protein ve Nişasta Miktarları

Atık arpalarda bulunan ham yağ, protein ve nişasta miktarları Çizelge 4.1'deki gibi hesaplandı.

Çizelge 4.1. Atık arpalarda bulunan ham yağ, protein ve nişasta miktarları

Örnek	Ham Yağ Miktarı (%)	Toplam Protein Miktarı (%)	Toplam Nişasta Miktarı (%)
Atık Arpa	2.45 ± 0.035	11.19 ± 0.46	37.5 ± 0.49

Czuchajowska ve ark. (1998)'nın çalışmalarında bütün bir arpa tanesinde % 65-68 nişasta, % 10–17 protein ve % 2–3 yağ olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada kullanılan atık arpaların nişasta miktarlarının ise daha az olduğu görülmektedir. Bunun nedeni kullanılan arpaların atık (kalitesiz, kırık, elek altı arpalar) olmasıdır.

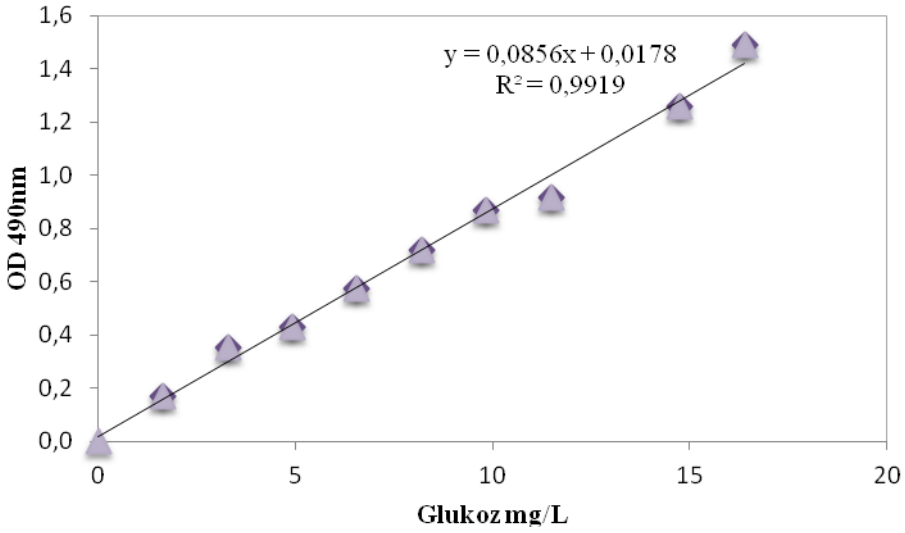
4.2. Arpa Hidrolizatlarına Uygulanan Analizler

Atık arpaların öğütülmesinden sonra arpada bulunan polisakkaritlerin basit şekerlere parçalanmasını sağlamak amacıyla uygulanan asit hidroliz ön işlemi sonucunda arpa hidrolizatları elde edildi. Arpanın biyohidrojen üretimi için uygun olup olmadığını anlamak amacıyla elde edilen arpa hidrolizatlarında toplam şeker, element, fenol ve amonyum miktarı analizleri yapılmıştır ve sonuçları aşağıda verilmiştir.

4.2.1. Arpa hidrolizatlarında bulunan toplam şeker miktarı

Glukoz, sükroz ve laktoz gibi şekerler kolayca parçalanabildiklerinden hidrojen üretiminde tercih edilen substratlardır (Kapdan ve Kargı, 2006). Ayrıca Shah ve ark. (2001)'nın çalışmalarında substrat olarak basit şekerlerin kullanımının hidrojen üretimini arttırdığı belirtilmiştir. Bu nedenle arpa hidrolizatında bulunan basit şeker miktarı biyohidrojen üretimini doğrudan etkiler.

Asit fenol spektrofotometrik yöntemi ile % 3, % 6 ve % 9'luk arpa hidrolizatlarında, asit hidroliz işlemi uygulanmadan önce arpada bulunan basit şekerler ile asit hidroliz işleminden sonra nişastanın ve diğer polisakkaritlerin hidrolizi sonucu oluşan basit şekerlerin toplam miktarları belirlenmiştir. Şekil 4.1'de asit fenol spektrofotometrik yöntem kullanılarak hesaplanan glukoz standart eğrisi verilmiştir. Bu eğri arpa hidrolizatlarındaki toplam şeker miktarının hesaplanması için gereklidir.



Şekil 4.1. Glukoz standart eğrisi

% 3, % 6 ve % 9'luk arpa hidrolizatlarının spektrofotometrede OD_{490nm} ölçümleri alınarak, elde edilen glukoz standart eğrisi üzerinden şeker miktarları hesaplanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Farklı yoğunluklardaki arpa hidrolizatlarında bulunan toplam şeker miktarları

Arpa Yoğunlukları	OD_{490nm}	Glukoz Konsantrasyonu (mg/L)	Sulandırma Faktörü	g Glukoz/L
% 3	1.643	18.986	610	11.582
% 6	3.136	36.428	610	22.221
% 9	6.774	78.928	610	48.146

Gubatz ve Shewry (2011)'nin çalışmasında olgun arpa tanesinde bulunan sükroz ve diğer şeker miktarlarının % 2-35 olduğu belirtilmiştir. Çizelge 4.3.'de arpa tanelerinin karbonhidrat bileşenleri verilmiştir (Henry, 1988).

Çizelge 4.3. Arpa tanelerinin karbonhidrat bileşenleri (Henry, 1988)

Karbonhidrat	**Alt Birimi**	**Miktar (%)**
Monosakkaritler	Glukoz	0.03-0.6
Disakkaritler	Fruktoz	0.03-0.16
	Sükroz	0.34-2.0
Oligosakkaritler	Maltoz	0.006-0.14
	Fruktanlar	0.019-0.97
Polisakkartiler	Rafinoz	0.14-0.83
β -D Glukanlar	Nişasta	51.5-72.1
	Pentozan (arabinoksilan)	4.4-7.8
	β-Glukanlar	3.64-6.11
	Selüloz	1.44-5.0
Toplam Karbonhidrat		78.0-83.9

Arpa taneleri ile atık arpa hidrolizatlarında bulunan basit şeker miktarları karşılaştırıldığında; Henry (1988) ile Gubatz ve Shewry (2011)'nin çalışmalarında belirtildiği üzere arpa tanesinde bulunan toplam basit şeker miktarı düşükken; asit hidroliz işlemi uygulanmış arpa hidrolizatlarında ise toplam basit şeker miktarı % 11-48 oranlarına kadar yükselmiştir. Bu sonuç asit hidroliz işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir.

4.2.2. Arpa hidrolizatlarında bulunan bazı elementlerin miktarları

Tüm bir arpa tanesinde bulunan toplam mineral miktarı % 1.5-2.5'tir (Quinde ve ark.,2004). Farklı yoğunluklardaki arpa hidrolizatlarında bulunan B, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Al, Ca, Mg, Na, K elementlerinin miktarları ICP-MS ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir. Miktarı belirlenen elementler *R.sphaeroides*'in üremesi ve hidrojen üretebilmesi için gerekli olan elementlerdir.

Çizelge 4.4. Farklı yoğunluklardaki arpa hidrolizatlarında bulunan ve *R.sphaeroides*'in üremesi için gerekli olan elementler ile miktarları

Arpa Hidrolizatları Yoğunlukları / Elementler	% 3 Arpa Hidrolizatı	% 6 Arpa Hidrolizatı	% 9 Arpa Hidrolizatı
B (mg/L)	0.449	0.407	0.425
Cr (mg/L)	0.052	0.1	0.174
Mn (mg/L)	0.4	0.619	1.078
Fe (mg/L)	0.153	0.302	0.443
Co (mg/L)	-	0.002	0.003
Ni (mg/L)	-	0.002	0.015
Cu (mg/L)	0.05	0.146	0.084
Zn (mg/L)	0.227	0.224	0.437
Mo (mg/L)	0.003	0.002	0.002
Al (mg/L)	0.041	0.078	0.205
Ca (mg/L)	13.405	25.32	41.542
Mg (mg/L)	33.7	68.341	122.477
Na (mg/L)	>800	>800	>800
K (mg/L)	>400	>400	>400

Arpa hidrolizatları kullanılarak tasarlanan besiyerlerine eklenecek elementlerin miktarları ICP-MS sonucuna göre materyal yöntem bölümünde verildiği gibi belirlenmiştir. Analiz sonucuna göre Na ve K miktarları ICP-MS cihazının ölçebileceği en üst sınırdan fazladır. Bu nedenle materyal ve yöntem kısmında da belirtildiği gibi dışarıdan herhangi bir Na ve K besiyerlerine eklenmemiştir. Arpa hidrolizatlarında analizi yapılan diğer elementler ise *R.sphaeroides*'in üremesi için yeterli miktarda olmadığından materyal ve yöntem bölümünde verildiği gibi bu elementlerden besiyerlerine eklenmiştir.

Holland ve ark. (1988)'nın çalışmalarında belirtilen arpa tanelerindeki mineral bileşenleri miktarı ile bu mineral bileşenlerin % 9'luk arpa hidrolizatlarındaki miktarlarının karşılaştırılması Çizelge 4.5'de verilmiştir.

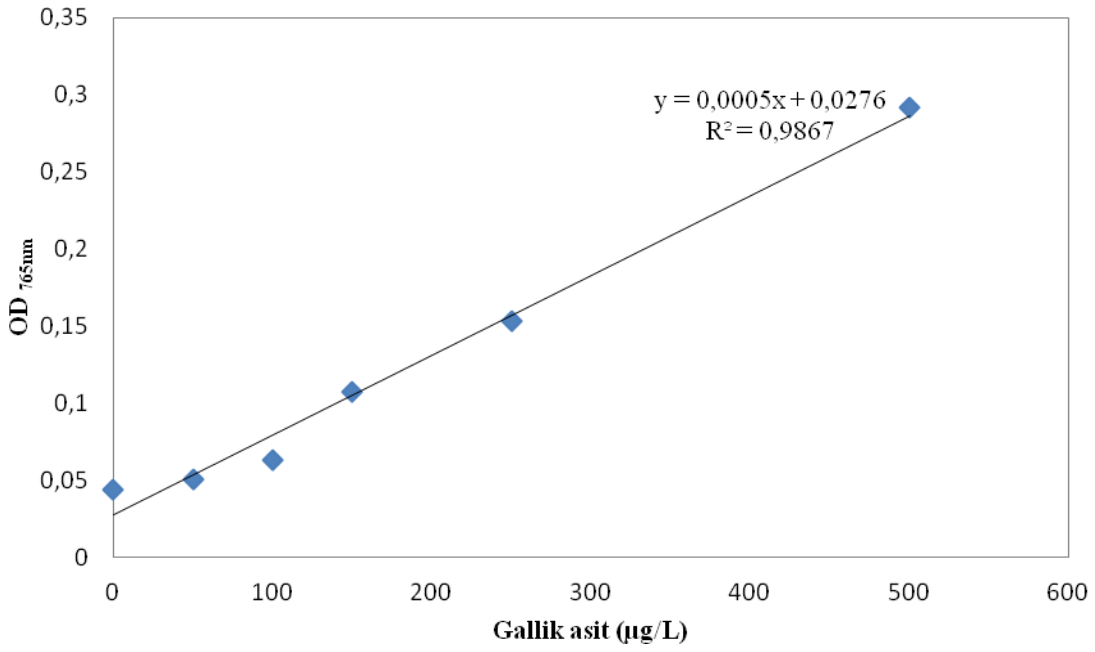
Çizelge 4.5. Holand ve ark. (1988)'nın çalışmalarında belirtilen arpa tanesinin mineral bileşenleri ile % 9'luk arpa hidrolizatındaki mineral bileşenlerin miktarlarının karşılaştırılması

	mg/kg						
Örnek	**K**	**Mg**	**Ca**	**Fe**	**Zn**	**Mn**	**Cu**
Arpa Tanesi	5600	910	500	60	33	17	4.0
% 9'luk Arpa Hidrolizatı	>400	1360.86	461.58	4.92	4.86	11.98	0.93

Bu çizelgeye göre % 9'luk arpa hidrolizatlarında bulunan Mg miktarı arpa tanelerindeki miktara göre fazladır. Ca, Fe, Zn, Mn, Cu miktarları ise arpa tanelerinde bulunan miktarlara oranla düşüktür. Bu farklılık; kullanılan arpaların farklı türlere ait olması veya farklı miktarlarda mineral içeren topraklarda yetiştirilmiş olması gibi sebeplerden kaynaklanıyor olabilir.

4.2.3. Arpa hidrolizatlarının toplam fenol miktarları

Folin Ciocalteu yöntemi ile % 3'lük arpa hidrolizatlarındaki toplam fenol miktarı gallik asit eş değeri (GAE) cinsinden bulundu. Hesaplamaların yapılabilmesi için gerekli gallik asit standart eğrisi şekil 4.2'deki gibidir.



Şekil 4.2. Gallik asit standart eğrisi

Ölçülen OD_{765nm} değerinin, gallik asit standart eğrisi içerisinde yer alması istendiği için materyal ve yöntem kısmında belirtildiği gibi farklı miktarlarda % 3'lük arpa hidrolizatından deney tüplerine eklenmişti. Yalnızca % 3'lük arpa hidrolizatından 100 µL eklenen tüpteki OD_{765nm} değeri (0.1795 nm), oluşturulan gallik asit standart eğrisi içinde yer aldığından 100 µL'deki toplam fenol miktarı hesaplandı (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Farklı yoğunluklardaki % 3'lük arpa hidrolizatlarının OD_{765nm} değerleri

% 3 Arpa Hidrolizatından Eklenen Miktar	Yoğunluk	OD 765 nm
100 µL	0.003	0.1795
200 µL	0.006	0.321
400 µL	0.012	0.584
800 µL	0.024	1.0225

Yapılan ölçümlere göre 0.003 yoğunluğundaki arpa hidrolizatında bulunan toplam fenol miktarı 1012.67 µg GAE/g arpa olarak hesaplandı.

Dvořáková ve ark. (2008)'nın çalışmalarına göre kuru arpada bulunan toplam fenol miktarı 211.4-572.8 µg GAE/g_{ka} olarak belirtilmiştir. Buna göre kullanılan atık arpanın toplam fenol içeriğinin yüksek olduğu görülmektedir.

4.2.4. Arpa hidrolizatlarının amonyum miktarı

Akköse (2008)'nin çalışmasında besiyerlerine amonyum kaynağı olarak 2 mM'dan fazla amonyum klorid (NH_4Cl) eklendiğinde, amonyumun nitrojenaz enzimini baskıladığı ve hidrojen üretimi olmadığı belirtilmiştir. Bu nedenle arpa hidrolizatlarından hazırlanan besiyerlerinin amonyum miktarları hidrojen üretiminin gerçekleşebilmesi için 2mM'dan az olmalıdır.

Arpa hidrolizatlarının amonyum miktarı açısından hidrojen üretimi için uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla % 3'lük arpa hidrolizatındaki amonyum miktarı amonyum kiti kullanılarak (Norateks, Türkiye) ölçüldü. 5 kat sulandırılmış % 3'lük arpa hidrolizatındaki amonyum miktarı 2.5 ppm (0.139 mM) olarak bulundu. Buna göre sulandırılmamış % 3 arpa hidrolizatında bulunan amonyum miktarı 12.5 ppm (0.693 mM) olacaktır. Akköse (2008)'nin çalışmasına göre % 3'lük arpa hidrolizatında bulunan amonyum miktarı hidrojen üretimini baskılayacak düzeyde değildir.

% 9'luk arpa besiyerindeki amonyum miktarı ise % 3'lük arpa hidrolizatında hesaplanan amonyum miktarının 3 katı olacaktır. Buna göre % 9'luk arpa hidrolizatında bulunan amonyum miktarı 37.5 ppm (2.079 mM)'dir. Şeker yoğunluğuna göre besiyerleri hazırlandığı için arpa hidrolizatları sulandırılmıştır. Böylelikle her bir besiyerinde çok daha az miktarda amonyum bulunmaktadır. Bu nedenle % 9 'luk arpa hidrolizatından hazırlanan besiyerlerindeki amonyum miktarları da hidrojen üretimini baskılayacak düzeyde değildir.

Çizelge 4.7'de % 3'lük arpa besiyerinde ve çizelge 4.8'de ise % 9'luk arpa besiyerlerinde bulunan amonyum miktarları verilmiştir.

Çizelge 4.7. % 3'lük arpa besiyerlerinin amonyum miktarları

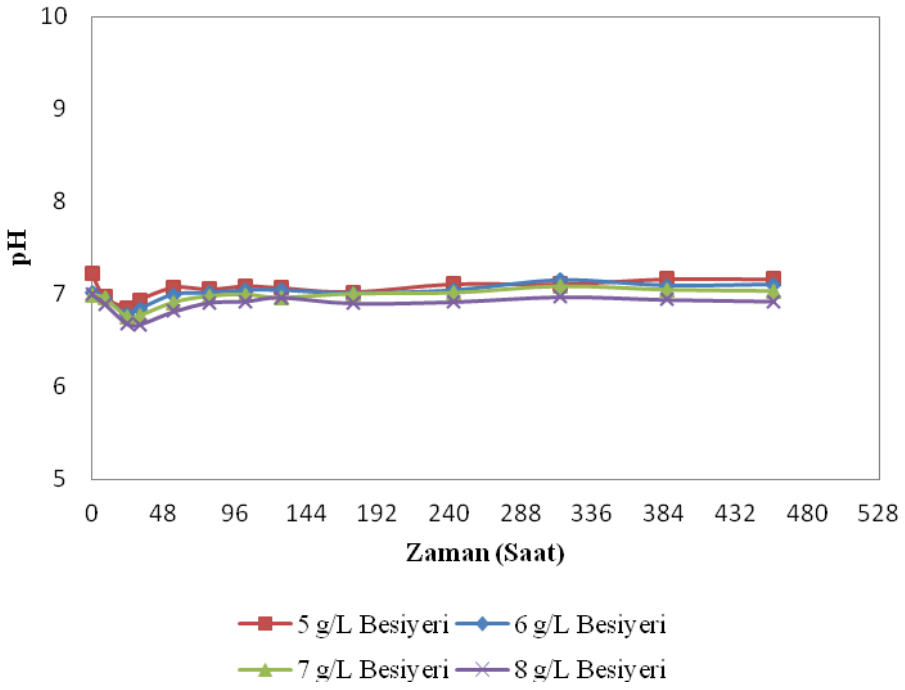
Şeker Yoğunluklarına Göre Besiyerleri	**5 g/L**	**6 g/L**	**7 g/L**	**8 g/L**
50 mL Besiyerindeki Amonyum Miktarı (mM)	0.299	0.359	0.418	0.478

Çizelge 4.8. % 9'luk arpa besiyerlerinin amonyum miktarları

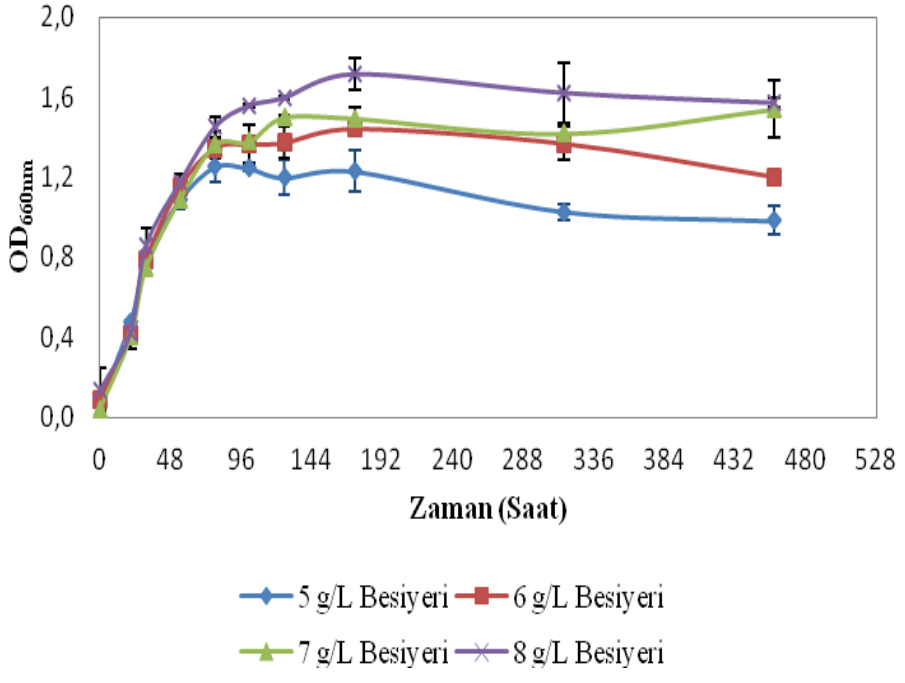
Şeker Yoğunluklarına Göre Besiyerleri	**5 g/L**	**7 g/L**	**9 g/L**	**11 g/L**
50 mL Besiyerindeki Amonyum Miktarı (mM)	0.215	0.302	0.389	0.475

4.3. *R.sphaeroides*'in Arpa Besiyerlerindeki Üreme Eğrisi ve Besiyerlerinin pH Değişim Eğrisi

Arpa besiyerlerine % 10'luk ekim yapıldıktan sonra % 3'lük arpa hidrolizatından elde edilen besiyerlerinde pH değişim eğrisi ile *R.sphaeroides*'in bu besiyerlerindeki üreme eğrisi şekil 4.3'de; % 9'luk arpa hidrolizatından elde edilen besiyerlerinde pH değişim eğrisi ile *R.sphaeroides*'in bu besiyerlerindeki üreme eğrisi ise şekil 4.4'de verilmiştir.

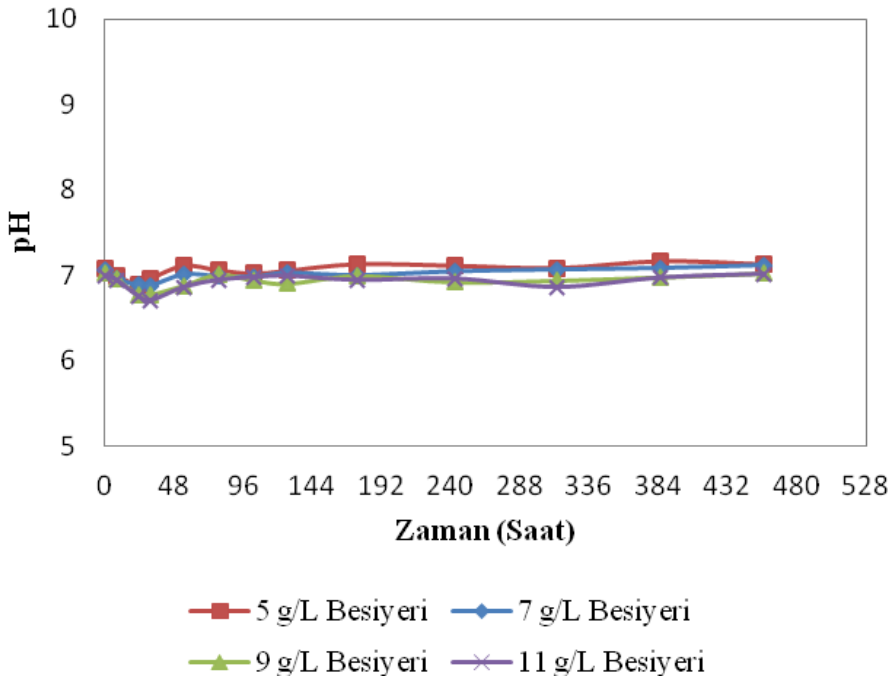


a)

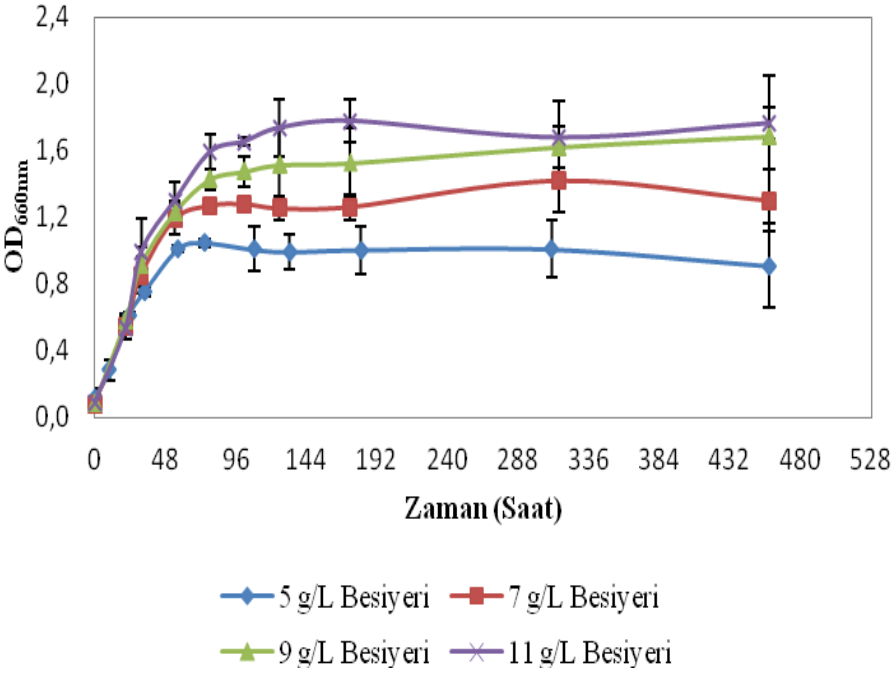


b)

Şekil 4.3. Ekim yapıldıktan sonra % 3'lük arpa hidrolizatından elde edilen besiyerindeki pH değişim eğrisi (a) ve *R.sphaeroides*'in bu besiyerindeki üreme eğrisi (b); ölçümler farklı zamanlarda alınmak üzere 2 tekrarlı olarak yapılmıştır.



a)



b)

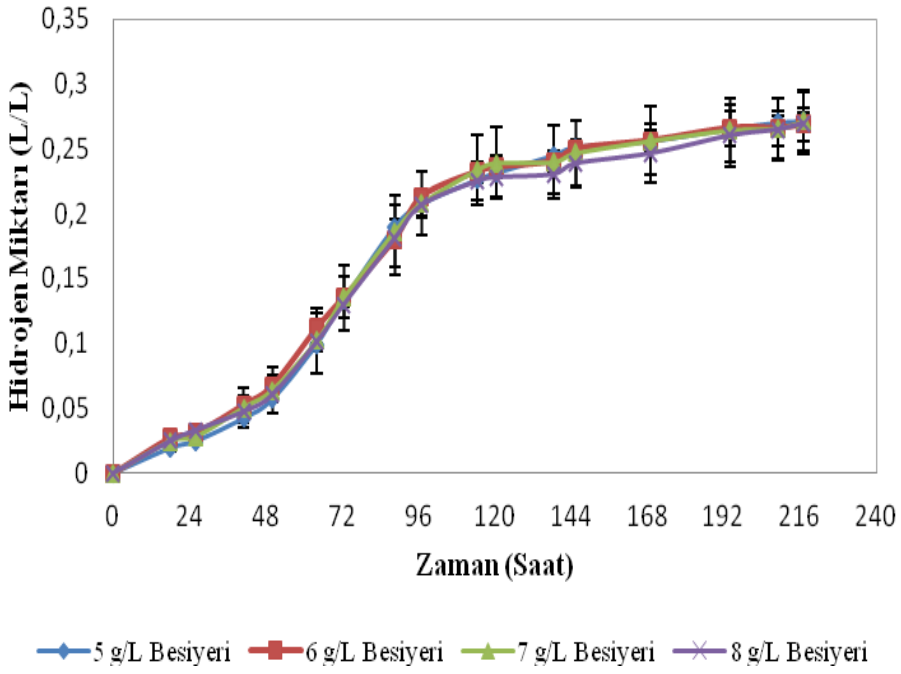
Şekil 4.4. Ekim yapıldıktan sonra % 9'luk arpa hidrolizatından elde edilen besiyerindeki pH değişim eğrisi (a) ve *R.sphaeroides*'in bu besiyerindeki üreme eğrisi (b); ölçümler farklı zamanlarda alınmak üzere 2 tekrarlı olarak yapılmıştır.

% 3 ve % 9'luk arpa hidrolizatlarından elde edilen besiyerlerindeki pH değişim eğrilerinde, önceden pH: 7' ye ayarlanan besiyerlerinin ilk 24 saat içerisinde pH: 6.8'e kadar düştüğü görülmektedir. Daha sonra besiyerlerinin pH'sı yeniden yükselerek pH: 7.1'e kadar çıkmaktadır.

R.sphaeroides'in % 3 ve % 9'luk arpa besiyerlerindeki üreme eğrilerinde ise bakterileri üremesinin yaklaşık 78. saate kadar devam ettiği görülmektedir.

4.4. Arpa Besiyerlerinde Üretilen Hidrojen Miktarı

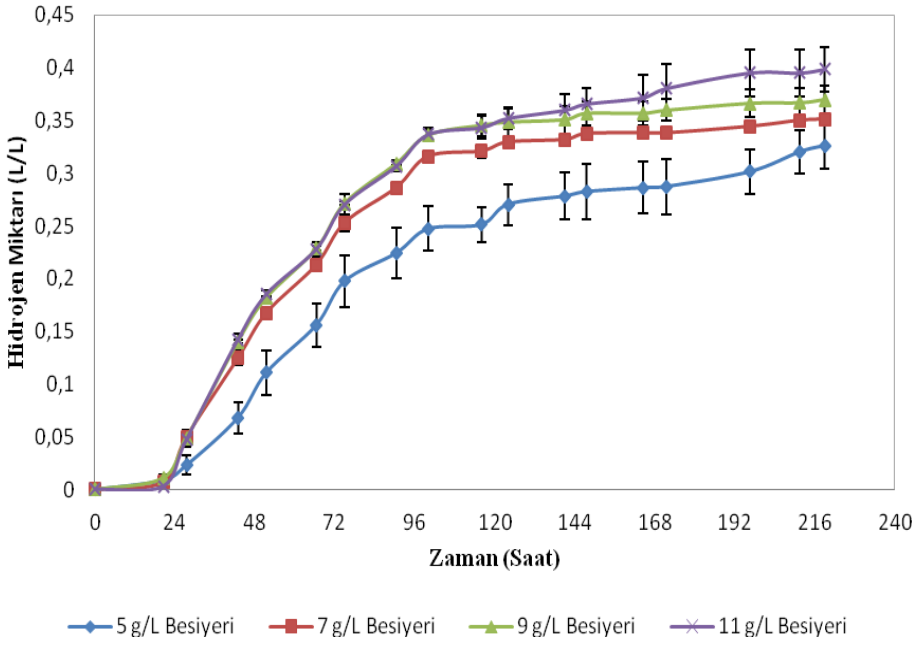
% 3'lük arpa besiyerlerinde üretilen toplam hidrojen üretim eğrisi şekil 4.5'de, % 9'luk arpa besiyerindeki toplam hidrojen üretim eğrisi ise 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.5. % 3'lük arpa besiyerinde toplam hidrojen miktarı eğrisi

Şekil 4.5'de görüldüğü gibi farklı şeker yoğunluğuna sahip % 3'lük arpa besiyerlerinde hidrojen üretimi birbirine çok yakındır. İstatistiksel olarak belirgin bir fark olmamakla birlikte 5 g/L şeker yoğunluğuna sahip besiyerinde üretilen hidrojen miktarı biraz daha fazladır (0.31 l H_2/l kültür). 0.29 l H_2/l kültür hidrojen üretim miktarı ile en az hidrojen üretimi ise 8 g/L şeker yoğunluğundaki besiyerinde gerçekleşmiştir.

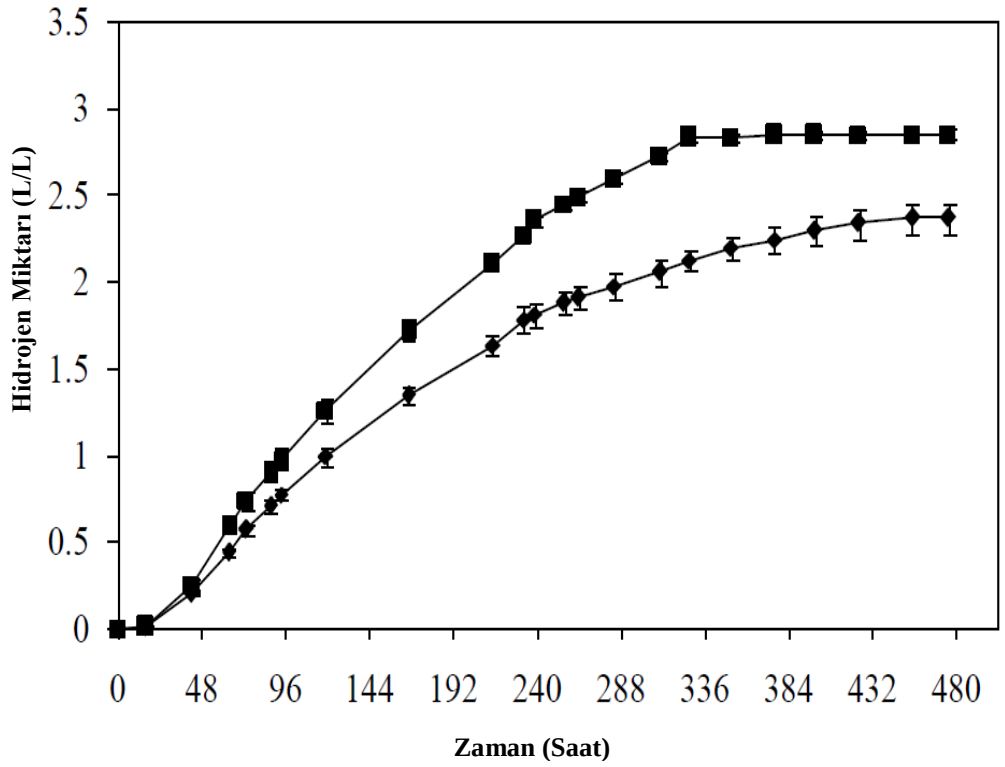
Bunun sebebi, 8 g/L şeker yoğunluğuna sahip besiyerinin, daha fazla hidrolizat içermesi ve buna bağlı olarak besiyerinin ışığı daha az geçirmesi olabilir.



Şekil 4.6. % 9'luk arpa besiyerinde toplam hidrojen miktarı eğrisi

Şekil 4.6'da görüldüğü gibi % 9'luk arpa besiyerlerinden 0.38 l H_2/l kültür değerle en az üretim 5 g/L şeker yoğunluğundaki besiyerinde; 0.41 l H_2/l kültür değerle en fazla üretim ise 11 g/L şeker yoğunluğundaki besiyerinde gerçekleşmiştir. 11 g/L şeker yoğunluğuna sahip besiyerinde gerçekleşen hidrojen üretiminin daha fazla olmasının sebebi, bu besiyerinin ışığın geçişini engellemeyecek yoğunluğa sahip olması ve şeker miktarının fazla olmasındandır.

Arpa besiyerlerindeki hidrojen üretimi ile sentetik malat/glutamat (15/2 mM) besiyerindeki hidrojen üretimi karşılaştırıldığında; Kars (2008)'ın çalışmasında malat/glutamat (15/2 mM) besiyerinde yaban tip *R.sphaeroides* O.U. 001 ile üretilen hidrojen miktarının 2.36 l H_2/l kültür olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Kars (2008) yaptığı çalışmada *R. sphaeroides* O.U. 001'in *hup* genlerini tahrip edilerek *hup* mutant *R. sphaeroides* O.U. 001 elde etmiştir. Böylelikle hidrojen verimini genetik manipulasyon yoluyla arttırmıştır. Kars (2008) çalışmasında *hup* mutant *R. sphaeroides* O.U. 001'deki hidrojen üretiminin 2.85 l H_2/l kültür olduğunu belirtmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Yaban tip (♦) ve *hup* mutant (■) *R.sphaeroides* O.U 001'in malat/glutamat (15/2 mM) besiyerinde ürettiği toplam hidrojen miktarı (Kars, 2008)

Kars (2008)'ın çalışmasına göre sentetik malat/glutamat (15/2 mM) besiyerinde üretilen hidrojen miktarının, arpa besiyerlerinde üretilen hidrojen miktarından çok daha fazla olduğu görülmektedir. Daha önceki çalışmalarda *R.sphaeroides*'in malat/glutamat (15/2 mM) besiyerinde diğer besiyerlerine göre çok daha iyi ürediği ve hidrojen ürettiği tespit edilmiştir (Kars ve ark., 2009). Bunun nedeni malat ve glutamatın doğrudan sitrik asit döngüsüne katılması ve böylece daha çabuk ve kolay metabolize olması olabilir. Ayrıca bakteriler daha önce arpa hidrolizatlarından hazırlanan besiyerinde üretilmediğinden, bu yeni besiyerlerine uyum sağlama süreci de geçirmektedirler. Bu nedenlerden dolayı malat/glutamat (15/2 mM) sentetik besiyerinde arpa besiyerine oranla daha fazla miktarda hidrojen üretimi gerçekleşmiş olabilir.

% 3 arpa besiyerlerinde üretilen toplam gazın biyohidrojen miktarları çizelge 4.9'da; % 9 arpa besiyerlerinde üretilen gazın biyohidrojen miktarları ise çizelge 4.10'de verilmiştir. % 3 ve % 9'luk arpa hidrolizatlarından hazırlanan besiyerlerindeki hidrojen üretimine ait gaz kromotografisi sonuçları ise ekler kısmında verilmiştir.

Çizelge 4.9. % 3'lük farklı şeker yoğunluğundaki besiyerlerinde üretilen toplam gazın biyohidrojen miktarları

		%		
	Gaz Çeşidi / Şeker Yoğunluğu	**H_2**	**Hava**	**CO_2**
% 3	**5 g/L**	81.51	18.03	0.465
	6 g/L	87.25	12.26	0.49
	7 g/L	89.16	10.13	0.71
	8 g/L	80.38	19.01	0.61

Çizelge 4.10. % 9'luk farklı şeker yoğunluğundaki besiyerlerinde üretilen toplam gazın biyohidrojen miktarları

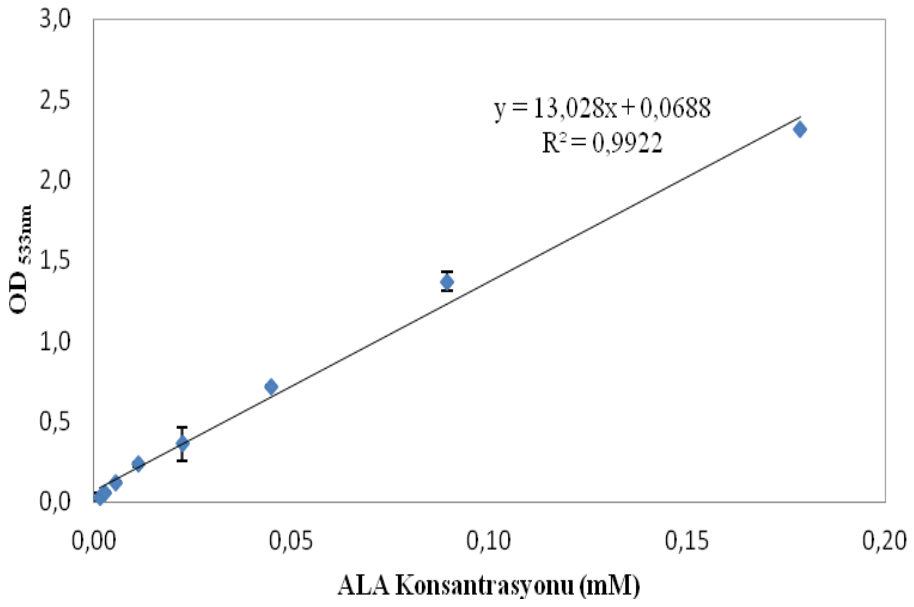
		%		
	Gaz Çeşidi / Şeker Yoğunluğu	**H_2**	**Hava**	**CO_2**
% 9	**5 g/L**	94.07	5.42	0.51
	7 g/L	95.23	4.25	0.52
	9 g/L	94.20	5.12	0.68
	11 g/L	94.50	4.87	0.63

Çizelge 4.7 ve 4.8'de verilen % 3 ve % 9 arpa besiyerlerinde üretilen toplam gazın biyohidrojen oranları karşılaştırıldığında % 9 arpa besiyerlerinde biyohidrojen oranının daha yüksek olduğu görülmektedir.

R.sphaeroides güneş ışınlarından aldığı enerjiyi kimyasal enerjiye yani ATP'ye çevirerek bu ATP'yi üremesinde ve hidrojen üretiminde kullanır (Koku ve ark., 2002). Bu nedenle besiyerinin ışığı geçirebilmesi bakterinin üremesi ve hidrojen üretebilmesi açısından çok önemlidir. % 9'luk arpa besiyerleri, % 3'lük arpa besiyerlerinden daha saydam olduğu için bu besiyerlerinde hidrojen üretimi daha avantajlıdır. Ayrıca % 9'luk arpa besiyerleri hazırlanırken daha az miktarda arpa hidrolizatı kullanılarak daha yüksek şeker yoğunluğuna sahip besiyerleri hazırlamak da mümkün olmuştur.

4.5. Arpa Hidrolizatlarından 5-Aminolevulinik asit Üretimi

Besiyerlerinde bulunan hücre dışı 5-ALA miktarının ölçümü için gerekli olan ALA standart eğrisi şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. ALA standart eğrisi

% 3 ve % 9'luk arpa hidrolizatlarından hazırlanan hidrojen üretim besiyerleri ile % 9'luk arpa hidrolizatından B12 vitamini ve levulinik asit eklenmesiyle hazırlanan ALA besiyerlerinin hücre dışı ALA miktarları spektrofotometrik bir yöntemle belirlendi. % 3 ve % 9'luk arpa hidrolizatından hazırlanan hidrojen üretim besiyerlerinde ALA tespit edilemedi. % 9'luk ALA besiyerinden ise 9 g/L ve 11 g/L şeker yoğunluğundaki besiyerlerinin ALA miktarı araştırıldı. Seçilen bu besiyerleri bakterilerin üremesi ve hidrojen üretimleri açısından daha uygun olduğundan, ALA üretimi için de bu besiyerleri seçilmiştir. Hidrojen üretim düzeneği bozulduktan ve besiyerleri 8500 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatantdan 200 µL örnek alınarak hücre dışı ALA miktarı belirlendi. Ancak ALA miktarıyla orantılı olarak çok az miktarda renk değişimi olduğu için spektrofotometrede OD_{533nm}'de ölçüm yapılamadı. Bu nedenle 50 ml hacimli besiyerlerindeki toplam ALA miktarını belirleyebilmek amacıyla besiyerleri liyofilize edilerek yoğunlaştırıldı. Daha sonra liyofilize ürünleri 2 mL saf suda çözdürüldü ve bu çözeltilerden 500 µL alınarak yeniden ALA miktarları hesaplandı (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Farklı yoğunluklardaki arpa besiyerlerinde 5-ALA miktarları

Besiyeri Çeşidi	ALA Miktarı (µM)
% 9 - 9 g/L (B12 vitamini ve levulinik asit eklenmiş)	67.424
% 9 – 11 g/L (B12 vitamini ve levulinik asit eklenmiş)	20.448

Choorit ve ark. (2011)'nın çalışmalarında mikroaerobik ışıklı ortamda *Rhodopseudomonas palustris* KG31'in uçucu yağ asitleriyle hazırlanan besiyerinde ürettiği hücre dışı ALA miktarının 11.70-13.06 µM olduğu belirtilmiştir. Çizelge 4.9'a göre arpa besiyerinde *R. sphaeroides* tarafından üretilen ALA miktarının daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun sebebi, iki çalışmada farklı karbon kaynakları kullanılmıştır. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda en iyi ALA üretiminin *R. sphaeroides* tarafından gerçekleştiği belirtilmiştir (Sasaki ve ark., 2002).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Yüksek katma değerli birden fazla ürünün aynı anda ve aynı yöntemle üretilmesi maliyet etkin bir süreç gelişimini sağlar ve bu süreç son zamanlarda biyorafineri anlayışı olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada da biyorafineri anlayışı ile biyohidrojenle birlikte tarım, tıp, biyoteknoloji gibi çeşitli alanlarda kullanılan ve yüksek katma değere sahip bir ürün olan 5-Aminolevulinik asidin (5-ALA) üretimi gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmada öncelikle Çumra Efes Pilsen Malt Üretim Fabrikası'ndan elde edilen ve yalnızca hayvan yemi olarak kullanılan atık arpaların *Rhodobacter sphaeroides*' in üremesine ve biyohidrojen üretimine uygun olup olmadığı araştırılmış. Bu amaçla arpalarda birçok analiz yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre karbonhidratlarca zengin ve amonyum düzeyi uygun olan arpa, çalışmada kullanılan *Rhodobacter sphaeroides*'in üremesi ve biyohidrojen üretebilmesi için yeterli bir substrattır. Daha sonra elde edilen bu sonuca göre *R.sphaeroides* atık arpalardan elde edilen besiyerlerinde üretilmiştir. Böylece atık arpa kullanılarak üretilen başlıca ürün *Rhodobacter sphaeroides*'in biyokütlesidir. *R. sphaeroides*, çok çeşitli metabolizmalara sahip olup hem iyi bir hidrojen hem de ALA üreticisi olduğundan bu çalışmada tercih edilmiştir. Farklı çalışmalarla atık arpa besiyerinde farklı mikroorganizma türleri de üretilebilir. Böylelikle atıklar kullanılarak sentetik besiyerlerinden daha uygun maliyetle mikroorganizmaların üretimi sağlanabilir.

Bu çalışmada *R. sphaeroides* kullanılarak atık arpadan elde edilen diğer ürünler biyohidrojen ve 5-ALA'dır. Atık arpalar biyohidrojen ve 5-ALA gibi yüksek katma değerli ürünlerin üretiminde substrat olarak değerlendirilmiş ve çok daha düşük maliyetle üretim sağlanmıştır. Özellikle 5-ALA ticari olarak kimyasal yollarla üretildiğinden ve bu yolların yüksek maliyete sebep olmasından dolayı, ALA'nın atık kullanılarak biyosentezinin gerçekleştirilmesi ve buna ek olarak hidrojenin de üretilmesi maliyet açısından çok önemlidir.

R. sphaeroides'in üremesi ve biyohidrojen ile ALA üretebilmesi için uygun arpa besiyeri tasarlandıktan sonra üretim gerçekleştirilmiştir. Böylelikle bilim insanlarınca geleceğin enerjisi olarak kabul edilen biyohidrojen ile çeşitli alanlarda yaygın kullanımı

olan ALA; atık arpaların substrat olarak değerlendirilmesiyle, uygun maliyette, aynı anda üretilmiştir.

5.2 Öneriler

Yapılan bu çalışma öncü bir çalışmadır ve bu çalışmada üretilen biyohidrojen ile ALA miktarları laboratuar ölçeklidir. Bu çalışma ile atık arpa gibi çeşitli fabrika atıklarının, maliyet etkin bir süreçle biyohidrojen ve ALA gibi yüksek katma değerli ürünler üretiminde değerlendirilebileceği belirlenmiştir. Bununla birlikte biyokütle yönünden zengin birçok atığın (fabrika atıkları, bitki, hayvan atıkları, evsel atıklar) yüksek katma değerli ürünler üretiminde değerlendirilebileceği üzerine çalışmalar devam etmektedir. Bu yöntem geliştirildiği ve ticari üretime geçildiği takdirde atıklardan üretilen biyohidrojenle dünyanın enerji ihtiyacı karşılanabilecektir. Böylelikle fosil yakıtların kullanımı sonucu ortaya çıkan ve küresel ısınmaya sebep olan sera gazlarının salınımı büyük ölçüde azalacaktır. Bununla birlikte hidrojen, biyolojik yollarla üretildiğinde, biyohidrojenle birlikle B12 vitamini, bütirik ve asetik asit gibi organik asitler, biyoplastik Polihidroksi bütirat (PHB), ALA vb. gibi yüksek katma değerli yan ürünlerin üretimi de sağlanacaktır.

Bu çalışmada üretilen ALA kanser tanı ve tedavisinde kullanıldığı gibi; herbisit, pestisit, bitkilerin büyümesini teşvik edici bir madde vb. olarak da çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bu çalışma geliştirildiği takdirde üretilen ALA miktarı da ticari boyuta ulaşabilecektir. Böylece ALA, biyosentez yoluyla çok daha uygun maliyetle üretilebilecek ve fiyatı düşürülerek elde edilmesi kolay bir madde olacaktır. Ayrıca uygun maliyetle ALA elde edilmesi sayesinde, ALA üzerinde daha fazla araştırma yapılacak ve böylece ALA'nın daha fazla kullanım alanı da ortaya çıkacaktır.

KAYNAKLAR

Afsar, N., Özgür, E., Gürgan, M., Akköse, S., Yücel, M., Gündüz, U., Eroğlu, İ., 2011, Hydrogen productivity of photosynthetic bacteria on dark fermenter effluent of potato steam peels hydrolysate, *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 432-438

Akköse, S., 2008, Expression analysis of nitrogenase genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 grown under different physiological conditions, Yüksek Lisans tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara

Androga D. D., Özgür, E., Eroğlu, İ., Gündüz, U., Yücel, M., 2012, Amelioration of photofermentative hydrogen production from molasses dark fermenter effluent by zeolite-based removal of ammonium ion, *International Journal of Hydrogen Energy*, Article in press, 1-9

Anonim, 2009, Yakıt Pili Teknolojileri, http://yakitpili.com/, [Ziyaret Tarihi: 9 Temmuz 2012]

Anonim, 2010, Dünyadaki enerji ihtiyacı, http://enerjilik.blogspot.com/ [Ziyaret Tarihi: 17 Haziran 2012]

Anonim, 2011, Gıdalarda nişasta tayini, http://www.belgeci.com/gidalarda-nisasta-tayini.html [Ziyaret Tarihi: 8 Temmuz 2012]

Anonim, 2012, Arpa, http://tr.wikipedia.org/wiki/Arpa [Ziyaret Tarihi: 5 Temmuz 2012]

Anonim, 2012, Hidrojenin Tarihçesi, http://www.kimyaegitimi.org [Ziyaret Tarihi: 27 Haziran 2012]

Anonymous, 2012, U.S. Energy Information Administration, *Monthly Energy Review*, Çizelge 1.3

Argun, H., Kargi, F.,Kapdan, I.K. Öztekin, R, 2008, Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: Effects of the initial substrate and biomass concentrations, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 6109–6115

Baik, B.-K., Ullrich, S. E., 2008, Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest, *Journal of Cereal Science*, 48, 233–242

Barbosa, M. J., Rocha, J. M. S., Tramper, J., Wijffels, R. H., 2001, Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria, *Journal of Biotechnol*ogy, 85, 25-33

Beale S.I., 2006, Biosynthesis of 5-Aminolevulinic acid, chlorophylls and bacteriochlorophylls: Biochemistry, biophysics, functions and applications, Grimm B., Porra R.J., Rüdiger W., Scheer H., *Springer*, The Netherlands, 147–158

Benemann, J.R. ve Hallenbeck P.C., 2002, Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1185–1193

Blankenship, R. E., Madigan, M. T. ve Bauer, 1995, Anoxygenic Photosynthetic Bacteria, *Kluwer Academic Publishers*, 871-883.

Choorit, W., Saikeur, A., Chodok, P., Prasertsan, P., Kantachote, D., 2011, Production of biomass and extracellular 5-aminolevulinic acid by *Rhodopseudomonas palustris* KG31 under light and dark conditions using volatile fatty acid, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111 (6), 658–664

Czuchajowska, Z., Klamczynski, A., Paszczynska, B., Baik, B.-K., 1998, Structure and functionality of barley starches, *Cereal Chemistry*, 75, 747–754

Das, D. ve Veziroğlu, N., 2001, Hydrogen production by biological processes: a survey of literature, *International Journal of Hydrogen Energy*, 26, 13–28

Das, D. ve Nath, K., 2004, Improvement of fermentative hydrogen production: Various approaches, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 520–529

Das, D. ve Veziroğlu, N., 2008, Advances in biological hydrogen production processes, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 6046-6057

Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 8, 350-66

Dvořáková, M., Guido, L. F., Dostálek, P., Skulilová, Z., Moreira, M. M., Barros, A. A., 2008, Antioxidant properties of free, soluble ester and insoluble-bound phenolic compounds in different barley varieties and corresponding malts, *Journal of the Institute of Brewing*, 114 (1), 27-33

Edwards, P. P., Kuznetsov, V. L., David, W. I. F., Brandon, N. P., 2008, Hydrogen and fuel cells: Towards a sustainable energy future, *Energy Policy*, 36, 4356–4362

Ensign S.A., Ludden P.W., 1991, Characterization of the CO oxidation/H_2 evolution system of *Rhodospirillum rubrum*. Role of a 22-kDa Iron–Sulfur protein in mediating electron transfer between carbon monoxide dehydrogenase and hydrogenase, *Journal of Biological Chemistry*, 266, 27, 18395-18403

Erbaş, A. E., Erbaş, O., 2008, Enerji taşıyıcısı hidrojenin üretim yöntemleri ve depolama sorunları, *1. Mühendislik ve Teknoloji Sempozyumu*, Çankaya Üniversitesi, Ankara, 405-409

Erengezgin, Ç., 2001, Enerji: Yaşamın çekirdeği ve enerji mimarlığına doğru, *ÇA+BA Tasarım Sanat Uygulama Ltd. Şti.*, Bursa, 14

Fascetti E., Todini O., 1995, *Rhodobacter sphaeroides* RV cultivation and hydrogen production in a one and two stage chemostat, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 300–5

Fengel, D., Wegener, G., 1984, Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions, De Gruyter, Berlin

Fırat, G., 2009, Biyohidrojen üretiminde dinamik analiz, Yüksek Lisans tezi, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara

Fissler J., Schirra C., Kohring G. W., Ginhorn F., 1994, Hydrogen production from aromatic acids by Rhodopseudomonas palustris, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 395–9

Garrity, G. M.; Brenner, D. J.; Noel, N. R.; Staley, J. R., 2005, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two:The Proteobacteria, *Springer-Verlag*, 166

Genç, N., 2009, Biyolojik hidrojen üretim prosesleri, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11 (2), 17-36

Gubatz, S., Shewry, P. R., 2011, Barley: Production, improvement and uses, Steven E. Ullrich, *Wiley-Blackwell*, İngiltere, 391-447

Güler Şentürk, İ., Büyükgüngör, H., 2010, An examination of used different waste materials and biohydrogen production methods, *Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 28, 369-395

Hall, D.O., Markov, S.A., Watanable, Y., Rao, K.K., 1995., The Potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies, *Photosynthesis Research*, 46, 159–167

Henry, R. J., 1988, The carbohydrates of barley grain: A review, *Journal of the Institute of Brewing*, 94, 71-78

Holland, B., Unwin, I.D., Buss, D.H., 1988, Creals and creal products, The third supplement to McCance and Widdowson's the composition of foods, Royal society of Chemistry, Ministry of agriculture fisheries and food, Cambridge, 4

Imhoff J. F., Truper G. H., Pfenning N., 1984, Rearrangements of the species and genera of the phototrophic "purple non sulfur bacteria", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 340-343

Isaacs, N. W., Cogdell, R. J., Freer, A. A., Prince, S. M., 1995, Light-harvesting mechanisms in purple photosynthetic bacteria, *Current Opinion in Structural Biology*, 5, 794-797

Jones, M. R., 1997, Photosynthesis: A new twist to biological solar power, *Current Biology*, 7, 541-543

Kahveci, M. İ., 2007, Biohydrogen production via dark fermentation, Yüksek lisans tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul

Kajiwara, M., Mizutani, M., Matauda, R., Hara, K., Kojima, I., 1994, A new biosynthetic pathway of porphyrin form isopropanol, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77, 626-629

Kapdan, İ. K., Kargı, F., Öztekin, R., Argun, H., 2009, Bio-hydrogen production from acid hydrolyzed wheat starch by photo-fermentation using different *Rhodobacter sp*., *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 2201 – 2207

Karapınar Kapdan, İ., Kargı, F., 2006, Bio-hydrogen production from waste materials, *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 569–582

Kars, G., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L. Eroğlu, İ., 2006, Hydrogen production and transcriptional analysis of *nif*D, *nif*K and *hup*S genes in Rhodobacter sphaeroides O.U.001 grown in media with different concentrations of molybdenum and iron, International Journal of Hydrogen Energy, 31, 1536 – 1544

Kars, G., Gündüz, U., Rakhely, G., Yücel, M., Eroğlu, İ., Kovacs, K. L., 2008, Improved hydrogen production by uptake hydrogenase deficient mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 3056 – 3060

Kars, G., 2008, Improvement of biohydrogen production by genetic manipulations in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001, Doktora tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara

Kars, G., Gündüz, U., Yücel, M., Rakhely, G., Kovacs, K. L., Eroğlu, İ., 2009, Evaluation of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 and its *hup*SL deficient mutant using acetate and malate as carbon sources, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 2184 – 2190

Koku, H., Eroğlu, İ., Gündüz, U., Yücel, M., Turker, L., 2002, Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27, 1315-1329

Koku H., Eroğlu İ., Gündüz U., Yücel M., Türker L., 2003, Kinetics of biohydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter spheroides* O.U. 001, *International Journal of Hydrogen Energy*, 28, 381–8

Kothari, R., Singh, D. P., Tyagi, V. V., Tyagi, S. K., 2012, Fermentative hydrogen production – An alternative clean energy source, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 2337– 2346

Leung, D., Leung, M., Sumathy, K. and Ni, D., 2006, An overview of hydrogen production from biomass, *Fuel Processing Technology*, 87, 451–472

Madigan, M. T., Maringo, J. M., 2000, Brock mikroorganizmaların biyolojisi, 1, Prof. Dr. Cumhur Çökmüş, *Palme Yayıncılık*, Ankara

Maness, P.C., Weaver, P.F., 2001, Evidence for three distinct hydrogenase activities in *Rhodospirillum rubrum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 751-756

Manish, S. ve Banerjee, R., 2008, Comparison of biohydrogen production processes, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 279-286

Miyake, J., 1989, The Science of Biohydrogen, Biohydrogen, Editor: O.R. Zaborsky, *Plenum Press*, New York, 7-19

Nandi, R. ve Sengupta, S., 1998, Microbial production of hydrogen: An overview, *Critical Reviews in Microbiology*, 24 (1), 61–84

Ntaikou, I., Antonopoulou, G., Lyberatos, G., 2010, Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review, *Waste Biomass Valor*, 1, 21-39

Öztürk, M., 2009, Hidrojen üretim metotlarının incelenmesi, Doktora tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta

Pandu, K., Joseph, S. 2012, Comparisons and limitations of biohydrogen production processes: A review, *International Journal of Advances in Engineering & Technology*, 2 (1), 342-356

Quinde, Z., Ullrich, S.E., Baik, B.-K., 2004, Genotypic variation in colour and discolouration potential of barley-based food products, *Cereal Chemistry*, 81, 752–758

Ragaee, S., Abdel-Aal, E. M. and Noaman, M., 2006, Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use, *Food Chemistry*, 98, 32-38

Rebeiz, C. A., Juvik, J. A., Rebeiz, C. C., 1988, Porphyric insecticides, I. Concept and phenomenology, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 30, 11–27

Saady, N. M. C., Chaganti, S. R., Lalman, J. A., Heath, D., 2012, Impact of culture source and linoleic acid (C18:2) on biohydrogen production from glucose under mesophilic conditions, *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 4036-4045

Sasaki K., Tanaka T., Nishizawa Y., Hayashi M., 1990, Production of a herbicide, 5-aminolevulinic acid, by *Rhodobacter sphaeroides* using the effluent waste from an anaerobic digestor, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, 727–731

Sasaki, K., Watanabe, M., Tanaka, T., Tanaka, T, 2002, Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-Aminolevulinic acid, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 23–29

Sasaki, K., Watanabe, M.,Suda, Y., Ishizuka, A., Noparatnaraporn, N., 2005, Applications of photosynthetic bacteria for medical fields, Journal *of Bioscience and Bioengineering*, 100 (5), 481-488

Sasikala C.H. ve Ramana C.H., 1995, Biotechnological potentials of anoxygenic phototrophic bacteria, II. Biopolyesters, biopesticide, biofuel, and biofertilizer, *Advances in Applied Microbiology*, 41, 227–278

Seifert, K., Thiel, M., Wicher, E., Włodarczak, M., Łaniecki, M., 2012, Biogas, Sunil Kumar, *InTech*, Hırvatistan, 223-250

Shah, V., Garg, N., Madamwar, D., 2001, Ultrastructure of the fresh water cyanobacterium Anabaena variabilis SPU 003 and its application for oxygen-free hydrogen production, *FEMS Microbiology Letters*, 194, 71–5

Soboh B., Linder D., Hedderich R., 2002, Purification and Catalytic Properties of CO oxidizing: H_2-evolving enzyme complex from *Carboxydothermus Hydrogenoformans*, *Europe Journal of Biochemistry*, 269, 5712-5721

Suwanto A. ve Kaplan S., 1989, Physical and Genetic Mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 Genome: Presence of Two unique circular chromosomes, *Journal of Bacteriology*, 171, 5850-5859

Takabatake H., Suzuki K., Ko I.B., Noike T., 2004, Characteristics of anaerobic ammonia removal by mixed culture of hydrogen producing photosynthetic bacteria, *Bioresource Technoogy*, 95, 151–8

Tangprasittipap, A. ve Prasertsan, P., 2002, 5-aminolevulinic acid from photosynthetic bacteria and its applications, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 24 (4), 717-725

Turner , J., Sverdrup, G., Mann, M., Maness, P., Kroposki, B., Ghiardi, M., Evans, R. ve Blake, D., 2007, Renewable hydrogen production, *International Journal of Energy Research*, 32 (5), 379-407

USDOE (Amerika Birleşik Devletleri Enerji Bakanlığı), 2004, Hydrogen posture plan: An integrated research, development and demonstration plan, Washington, DC, U.S., Department of Energy, 24

Van Niel B.C., 1944, The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria, *Bacteriological Reviews* 8 (1), 1–118

Vermeglio, A., Joliot, P., 1999, The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter shaeroides*, *Trends in Microbiology*, 7 (11), 435-440

Vrije, T. de ve Claassen, P. A. M., 2005, Dark hydrogen fermentations, *Agrotechnological Research Institute ATO B.V.*, Wageningen, The Netherlands, http://www.microbes.jp/suiso/h2kiji/hb007.htm [Ziyaret Tarihi: 30 Haziran 2012]

Wang, C.C., Chang, C.W., Chu, C.P., Lee, D.J., Chang, V.V., Liao, C.S., 2003, Using filtrate of waste biosolids to effectively produce bio-hydrogen by anaerobic fermentation, *Water Research*, 37, 2789–93

Wang, J., Wan, W., 2008, Comparison of different pre-treatment methods for enriching hydrogen producing cultures from digested sludge, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 2934–41

Wang, Y. Y., Ai, P., Hu, C. X., Zhang, Y. L., 2011, Effects of various pretreatment methods of anaerobic mixed microflora on biohydrogen production and the fermentation pathway of glucose, *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 390-396

Widsten, P., Kandelbauer, A., 2008, Adhesion improvement of lignocellulosic products by enzymatic pre-treatment, *Biotechnology Advances*, 26, 379–386

Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D., Sporns, P, 2005, Handbook of food analytical chemistry: Pigments, colorants,flavors, components, texture, and bioactive food, *Wiley-Interscience*, 105-107

Wu, S.Y., Hung, C. H., Lin, C. N., Chen, H. W., Lee, A.S., Chang, J. S., 2006, Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high rate anaerobic bioreactors containing siliconeimmobilized and self flocculated sludge, *Biotechnology Bioengineering*, 93, 934-946

Yakunin A.F., Tsygankov A.A., Troshina O.Y., Gogotov I.N., 1991, Growth and nitrogenase activity of continuous cultures of the purple bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides* depending on the presence of Mo, V, and W in the medium, *Mikrobiyologiya*, 60, 41–6.

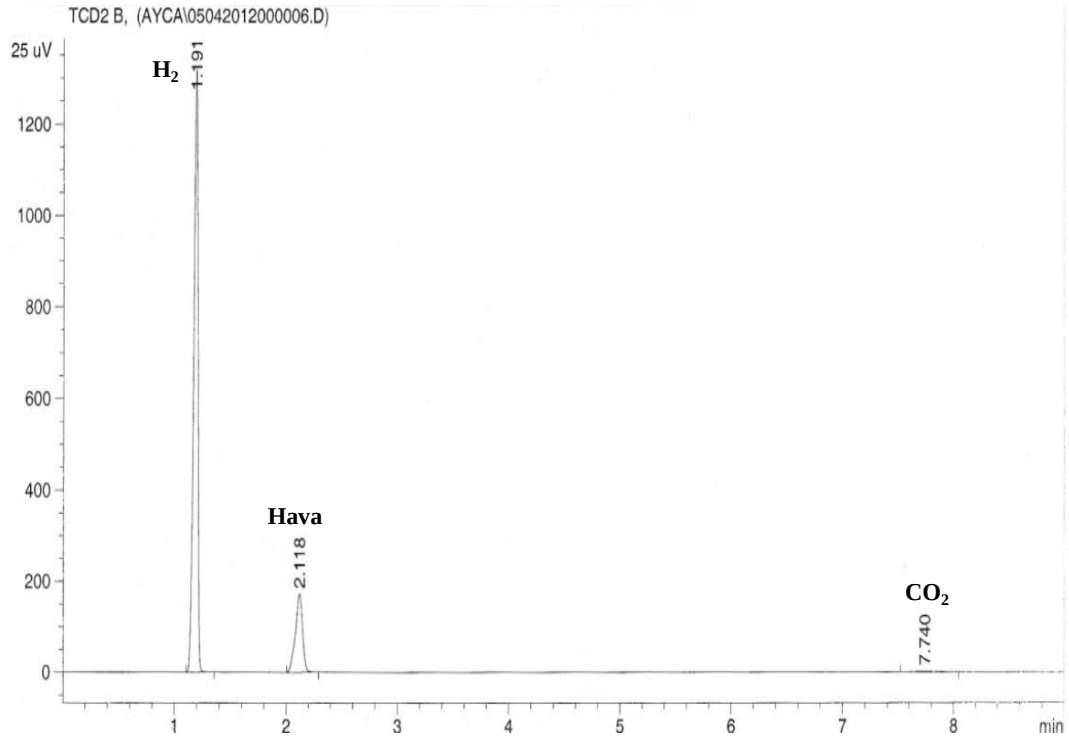
Yetiş, M., Gündüz, U., Eroğlu, İ., Yücel, M, Türker, L., 2000, Photoproduction of hydrogen from sugar refinery wastewater by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001, *International Journal of Hydrogen Energy*, 25, 1035-1041

Yokoi H., Mori S., Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y., 1998, H_2 production from starch by mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides* M-19, *Biotechnology Letters*, 20, 895–9

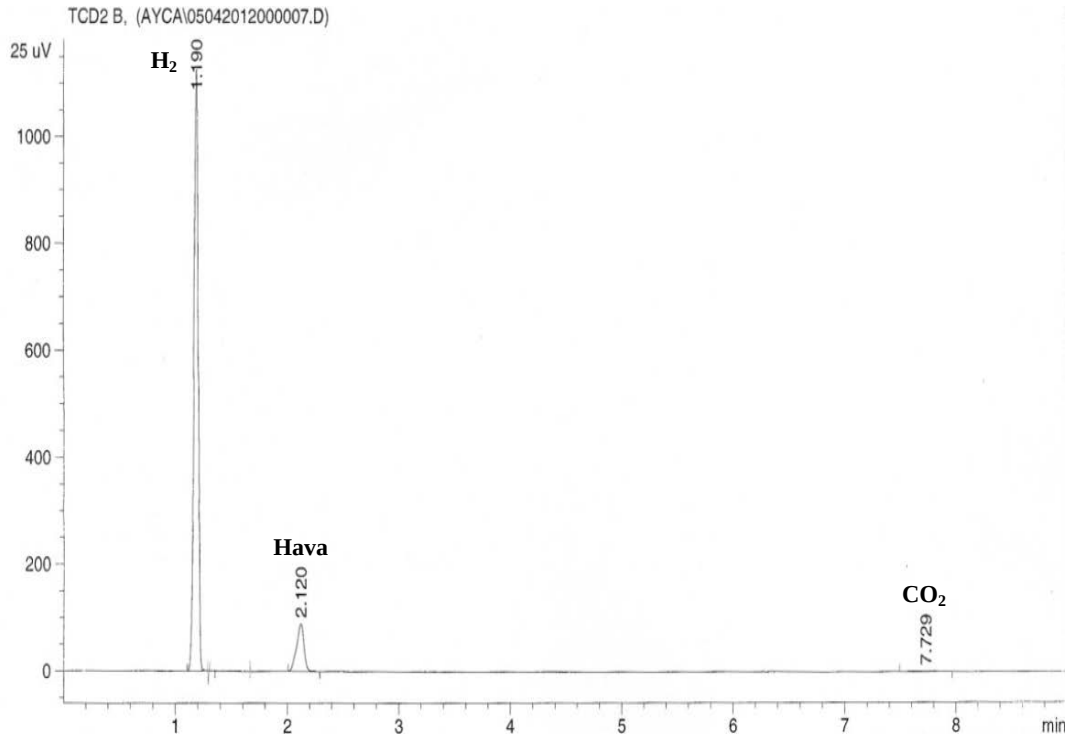
Yokoyama, H., Waki, M., Moriya, N., Yasuda, T., Tanaka, Y., Haga, K., 2007, Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74 (2), 474 - 83

EKLER

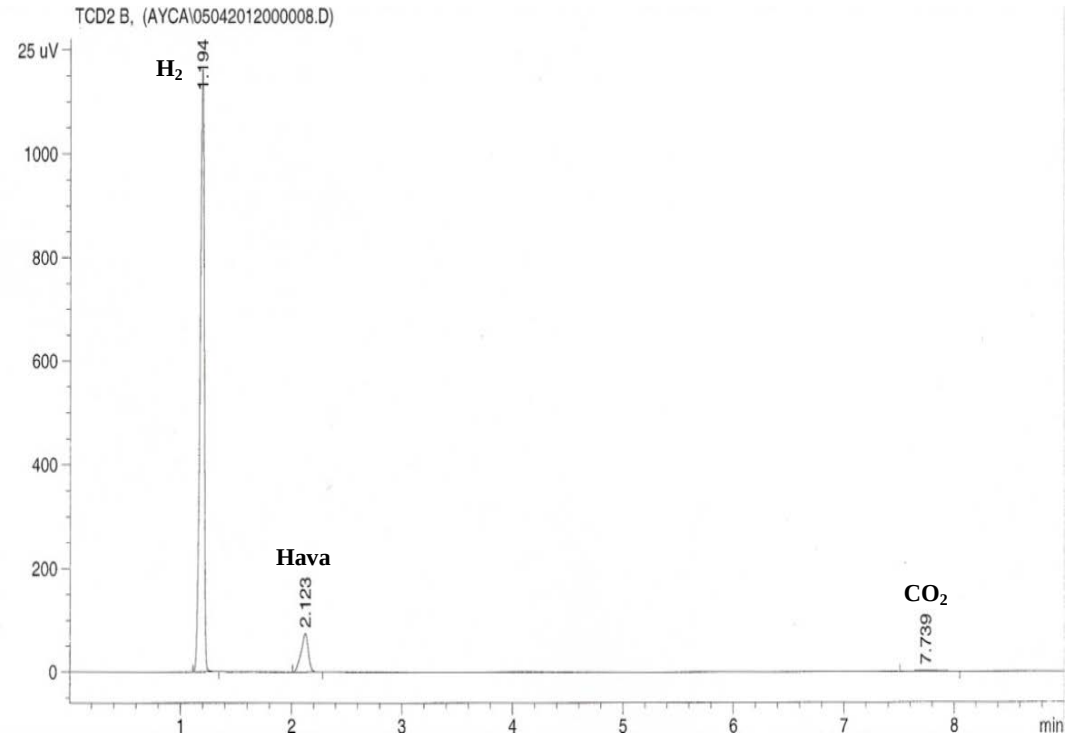
EK-1 % 3'lük 5 g/L Şeker Yoğunluğuna Sahip Besiyerinin Gaz Kromotografisi Sonucu



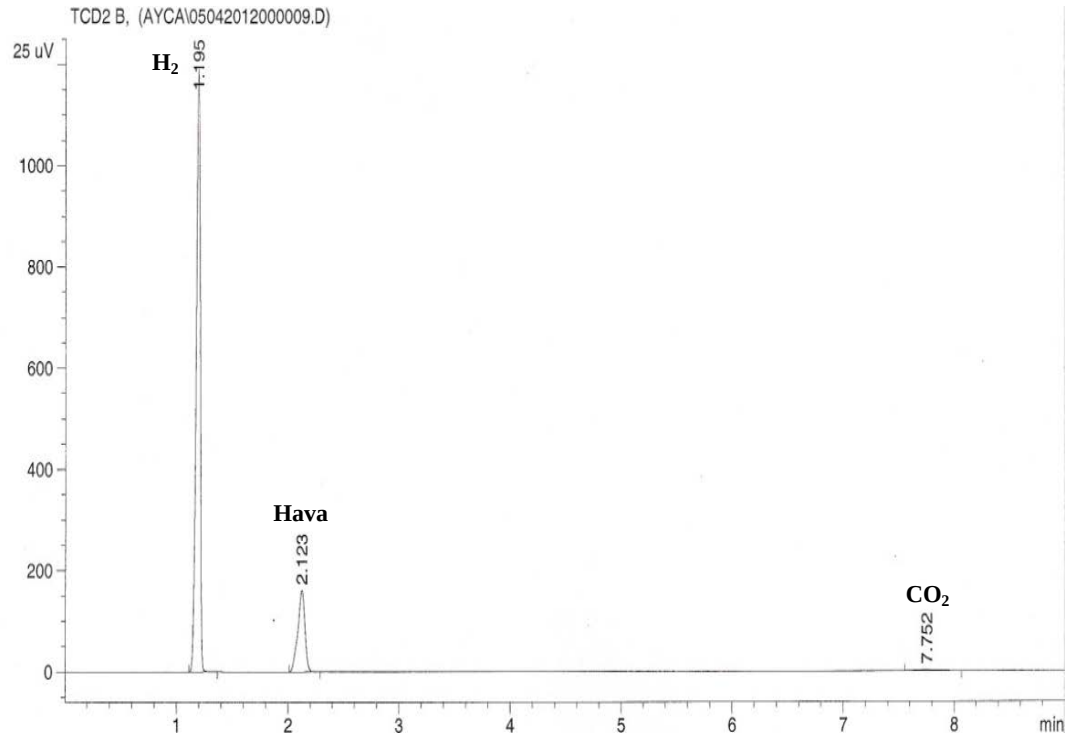
EK-2 % 3'lük 6 g/L Şeker Yoğunluğuna Sahip Besiyerinin Gaz Kromotografisi Sonucu



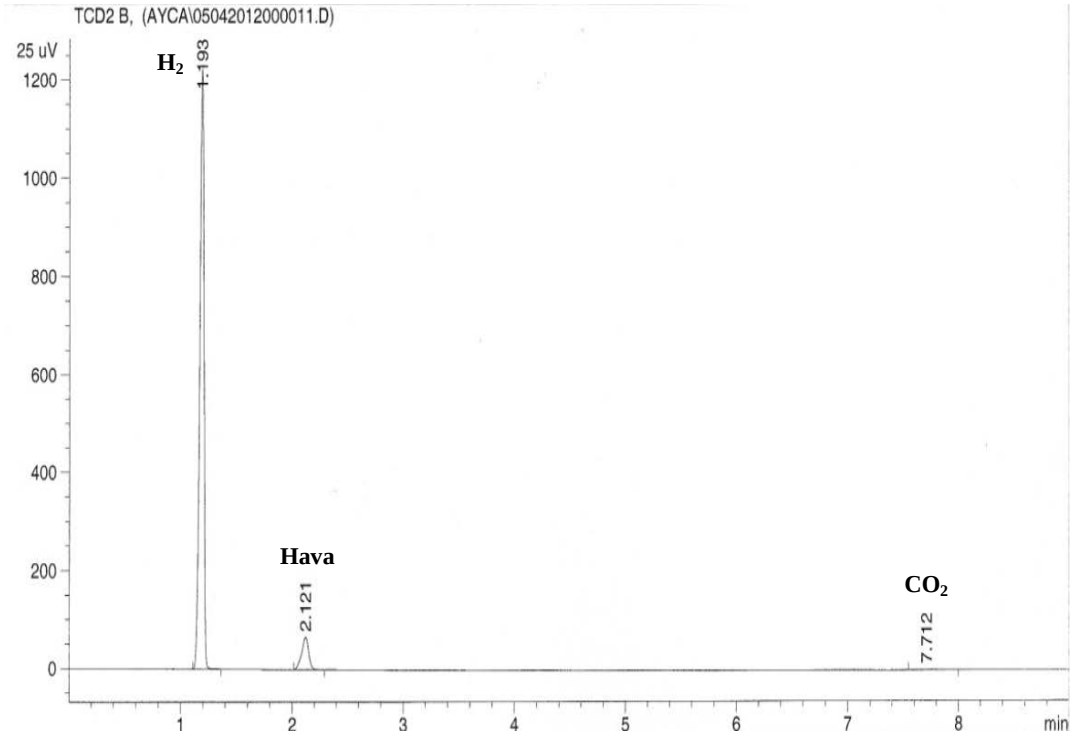
EK-3 % 3'lük 7 g/L Şeker Yoğunluğuna Sahip Besiyerinin Gaz Kromotografisi Sonucu



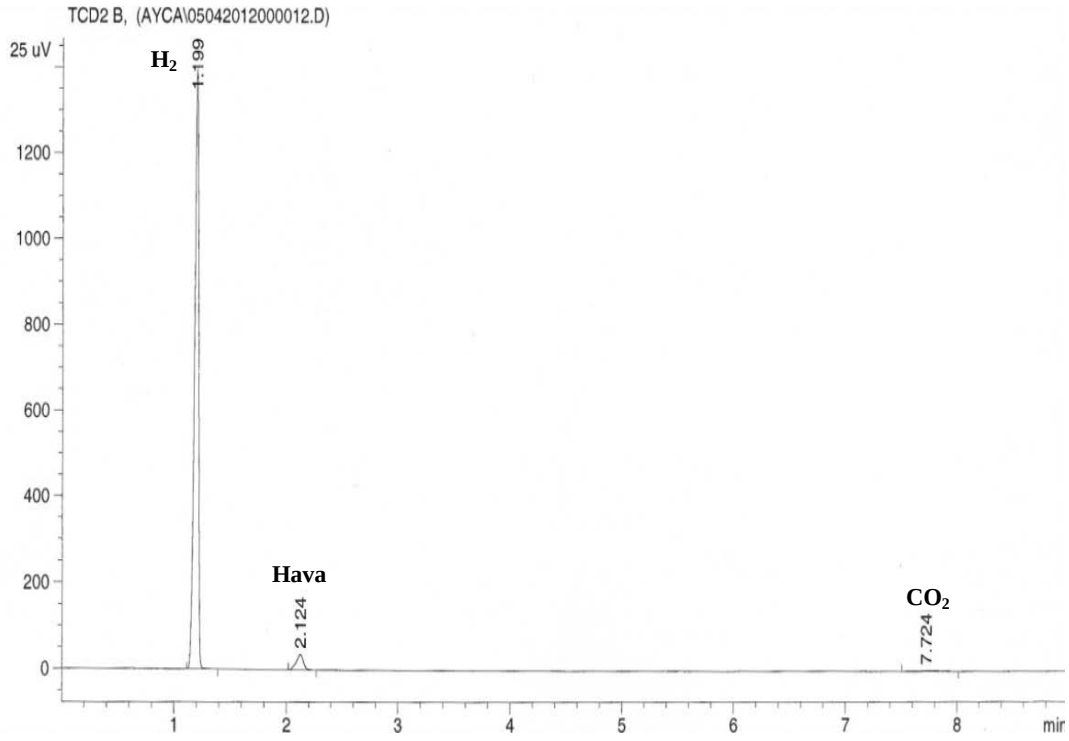
EK-4 % 3'lük 8 g/L Şeker Yoğunluğuna Sahip Besiyerinin Gaz Kromotografisi Sonucu



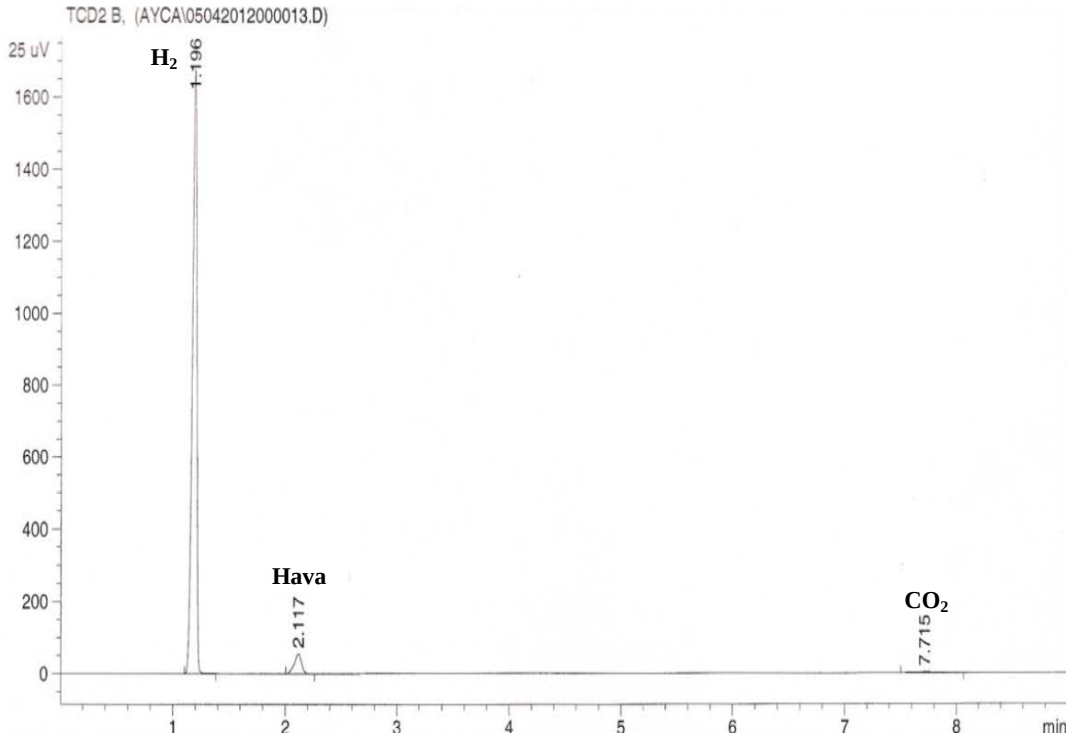
EK-5 % 9'luk 5 g/L Şeker Yoğunluğuna Sahip Besiyerinin Gaz Kromotografisi Sonucu



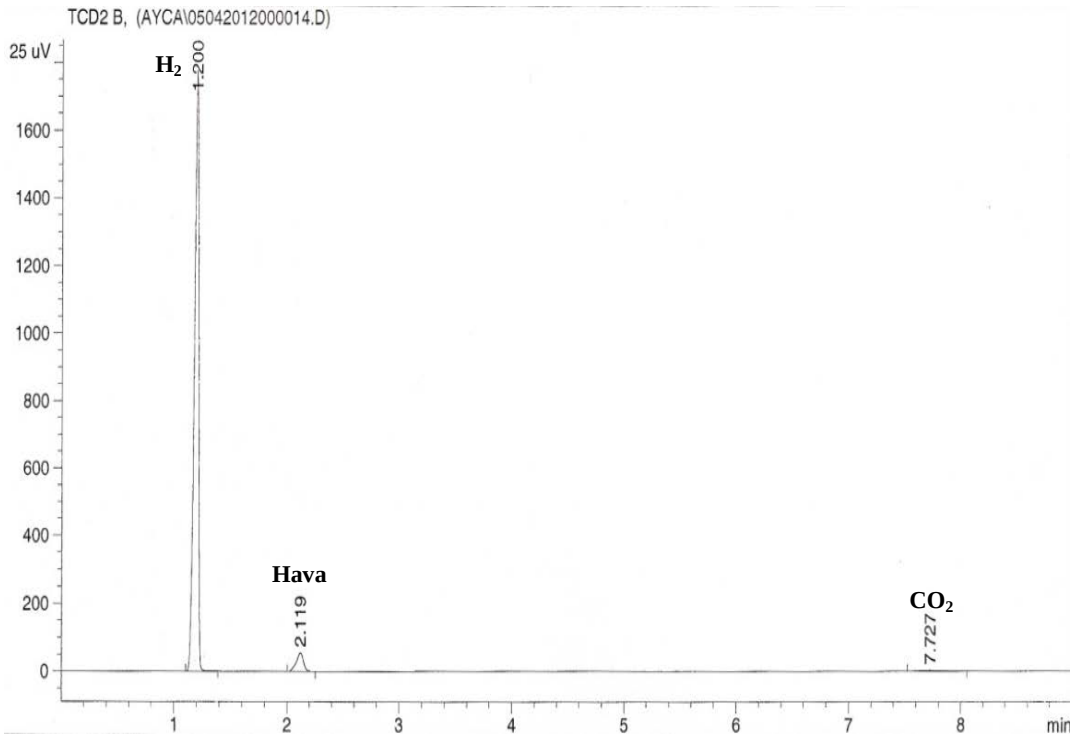
EK-6 % 9'luk 7 g/L Şeker Yoğunluğuna Sahip Besiyerinin Gaz Kromotografisi Sonucu



EK-7 % 9'luk 9 g/L Şeker Yoğunluğuna Sahip Besiyerinin Gaz Kromotografisi Sonucu



EK-8 % 9'luk 11 g/L Şeker Yoğunluğuna Sahip Besiyerinin Gaz Kromotografisi Sonucu



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Ayça Ceylan
Uyruğu	**:**	T. C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Konya-12.09.1988
Telefon	**:**	0537 248 89 65
Faks	**:**	-
e-mail	**:**	ayca-ceylan-@windowslive.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Konya Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı), Meram, Konya	2006
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Selçuklu, Konya	2010
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi , Biyoloji A. B. D., Selçuklu, Konya	2012
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2010	Genetikon	Laboratuvar sorumlusu

YABANCI DİLLER

İngilizce