T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYORAFİNERİ ANLAYIŞI İLE ŞEKER PANCARI MELASINDAN 5-AMİNOLEVÜLİNİK ASİT (5-ALA) VE BİYOHİDROJEN ÜRETİMİ

Ümmühan ALPARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak-2014
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.

Ümmühan ALPARSLAN

Tarih: 16.01.2014

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

BİYORAFİNERİ ANLAYIŞI İLE ŞEKER PANCARI MELASINDAN 5-AMİNOLEVÜLİNİK ASİT (5-ALA) VE BİYOHİDROJEN ÜRETİMİ

Ümmühan ALPARSLAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gökhan KARS

2014, 79 Sayfa

Jüri
Yrd. Doç. Dr. Gökhan KARS
Doç. Dr. Rüstem DUMAN
Yrd. Doç. Dr. Abdullah Tahir BAYRAÇ

Dünyanın enerji ihtiyacının çoğunu karşılayan fosil yakıtlar hızla tükenmektedir. Bunun sonucunda alternatif yakıtlar üzerinde çalışmalar artmıştır. Biyohidrojen, yenilenebilir ve temiz bir enerji taşıyıcısı olarak uygun maliyetle elde edilebilen ve sürdürülebilir substratlardan üretilebilmektedir. Bu çalışmada da şeker pancarı melası kullanılarak *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 ile yüksek katma değerli ürünler olan H_2 ve 5-aminolevulinik asit (5-ALA) üretimi hedeflenmiştir.

Melastaki amonyum miktarı 2,5 ppm; toplam şeker miktarı %48-50 (g/g); toplam fenol miktarı 13.36-14.36 mg GAE/g melas olarak hesaplandı. Ayrıca melasın element içeriği de belirlenmiştir. Son olarak, melasın organik asit analizi ve hazırlanan besiyerlerin transmittans ölçümleri (522nm, 800 nm, 860nm) yapılmıştır. Farklı şeker konsantrasyonlarında hazırlanan besiyerlerine %10 ekim yapılarak hazırlanan kültürler 29 ^{o}C'de ışık altında inkübe edildi. OD_{660}, pH ve hidrojen üretim değerleri çeşitli zaman aralıklarında kaydedildi. Bunlara ek olarak, aynı koşullar altında 5-ALA üretimi araştırıldı. En yüksek bakteri yoğunluğu 5 gr şeker/L (OD660nm:5)'da elde edildi. Biyoreaktörlerde 0.32 L H_2/L kültür ile 0.54 L H_2/L kültür arasında üretim gerçekleşmiştir. Gaz kromotografisi analizlerine göre üretilen gazın %91-%92'sinin H_2 olduğu belirlenmiştir. Besiyerlerindeki hücre dışı ALA miktarının 20.4-34.8 µM olduğu spektrofotometrik yöntemle hesaplanmıştır. Böylece maliyet etkin bir işlemle, biyorafineri anlayışı ile yüksek katma değerli ürünler olan H_2 ve 5-ALA üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: 5-ALA, biyohidrojen, melas, *Rhodobacter sphaeroides*

ABSTRACT

MS THESIS

5-AMINOLEVULINIC ACID (5-ALA) AND BIOHYDROGEN PRODUCTION USING SUGAR BEET MOLASSES IN A BIOREFINERY CONSEPT

Ümmühan ALPARSLAN

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

2014, 79 Sayfa

Jury
Assist. Prof. Dr. Gökhan KARS
Associate Prof. Dr. Rüstem DUMAN
Assist. Prof. Dr. Abdullah Tahir BAYRAÇ

Fossil fuels providing world's energy demand are being consumed rapidly. Thus, studies on alternative fuels have been increased. Biohydrogen as being renewable and clean energy carrier can be produced from low cost and sustainable substrates. In this study, the production of high value added products, biohydrogen and 5-aminolevulinic acid (5-ALA), by *Rhodobacter sphaeroides* using sugar beet molasses was aimed.

2,5 ppm ammonium; 48-50% (g/g) total sugar; 13.36-14.36 mg GAE/g molasses total phenol were calculated in molasses. Besides, the element content of the molasses was determined. Lastly, the organic acid analysis of the molasses and transmittance measurements of the growth media were performed. After 10% inoculation, media at different sugar concentrations were incubated at 29^{o}C under light. The OD_{660}, pH and hydrogen production rates were monitored at various time intervals. In addition to these, 5-ALA production at the same conditions was investigated. The highest cell density was obtained in 5 gr sugar/L containing medium (OD_{660nm}: 5). 0.32 - 0.54 L H_2/L culture was produced in bioreactors. 91-92% of total gas was found to be H_2 after gas chromatography analysis. Extracellular 5-ALA amount in media was calculated as 20.4-34.8 µM by spectrophotometer. Thus high value-added products, 5-ALA and H_2, were produced in a biorefinery consept with a cost-effective process.

Keywords: 5-ALA, biohydrogen, molasses, *Rhodobacter sphaeroides*

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarımın her aşamasında bilgilerini, yardımlarını esirgemeyen hoşgörü ve sabrından dolayı değerli danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Gökhan KARS'a, tez çalşmam boyunca her zaman yanımda olan çalışma arkadaşım Ayça CEYLAN'a, tez projemi destekleyerek gerekli maddi olanağı sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne, yardımlarından dolayı arkadaşlarım Özdem ÖZDEMİR, Zeynep NALVURAN, Nilgün ZENGİN'e ve desteklerini benden esirgemeyen değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ümmühan ALPARSLAN
KONYA-2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **5**

2.1. Alternatif enerji kaynakları 5
2.1.1. Hidrojen enerjisi 7
2.2. Fotosentetik bakteri *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 11
2.3. Hidrojen üretimi 13
2.3.1. Hidrojen üretim metabolizmasında bulunan enzim sistemleri 13
2.3.2. Biyolojik yolla hidrojen üretimi 15
2.3.3. Biyohidrojen eldesinde kullanılan atık materyaller 24
2.4. Şeker pancarı 26
2.4.1. Melas 27
2.5. 5-Aminolevulinik asit (5-ALA) 27
2.5.1. Aminolevülinik asit (5-ALA) biyosentezi 29
2.5.2. 5-Aminolevulinik asitin (5-ALA) uygulama alanları 31

3. MATERYAL VE YÖNTEM **35**

3.1. Kullanılan mikroorganizma 35
3.1.1. *Rhodobacter sphaeroides*'in genel üreme ortamı 35
3.2. Hidrojen ve 5-Aminolevülinik asit üretiminde kullanılan substrat 37
3.2.1. Ön işlemler 38
3.3. Melas besiyerin hazırlanması 41
3.3.1. Melas besiyerinde *Rhodobacter sphaeroides*'in pH değişim ve üreme eğrisinin oluşturulması 43
3.4. Hidrojen düzeneğinin kurulması 44
3.4.1. Hidrojen miktarının gaz kromotografisi (GC) ile belirlenmesi 47
3.5. Melas besiyerin 5-Aminolevülinik asit üretimi için tasarlanması 47
3.5.1. 5-ALA miktarının spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi 48
3.5.2. 5-ALA standart eğrinin oluşturulması 49
3.5.3. Melas besiyerindeki ALA miktarların belirlenmesi 50

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **53**

4.1. Melasa uygulanan analizler 53
4.1.1. Melasta bulunan elementlerin miktarları 53
4.1.2. Melas besiyerinde organik asitlerin miktarları 54

4.1.3. Melasta bulunan toplam fenol miktarı 54
4.1.4. Melasta bulunan amonyum miktarları 56
4.1.5. Melas besiyerinde belirlenen konsantrasyonların transmittans ölçümleri 57
4.2. Melas besiyerinde üreyen *Rhodobacter sphaeroides*'in pH değişim ve üreme eğrisi 57
4.3. Melas besiyerinde üretilen hidrojen miktarları 59
4.3.1. Gaz kromatografi analizleri 62
4.4. 5-ALA miktar tayini 62

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 65

5.1 Sonuçlar 65
5.2 Öneriler 66

KAYNAKLAR 67

EKLER 74

ÖZGEÇMİŞ 79

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-ALA : 5-Aminolevülinik asit

ADP : Adenozin difosfat

Al : Alüminyum

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

dm : Desimetre

e^- : Elektron

EDTA : Etilen diamin tetra asetik asit

Fd : Ferrodoksin

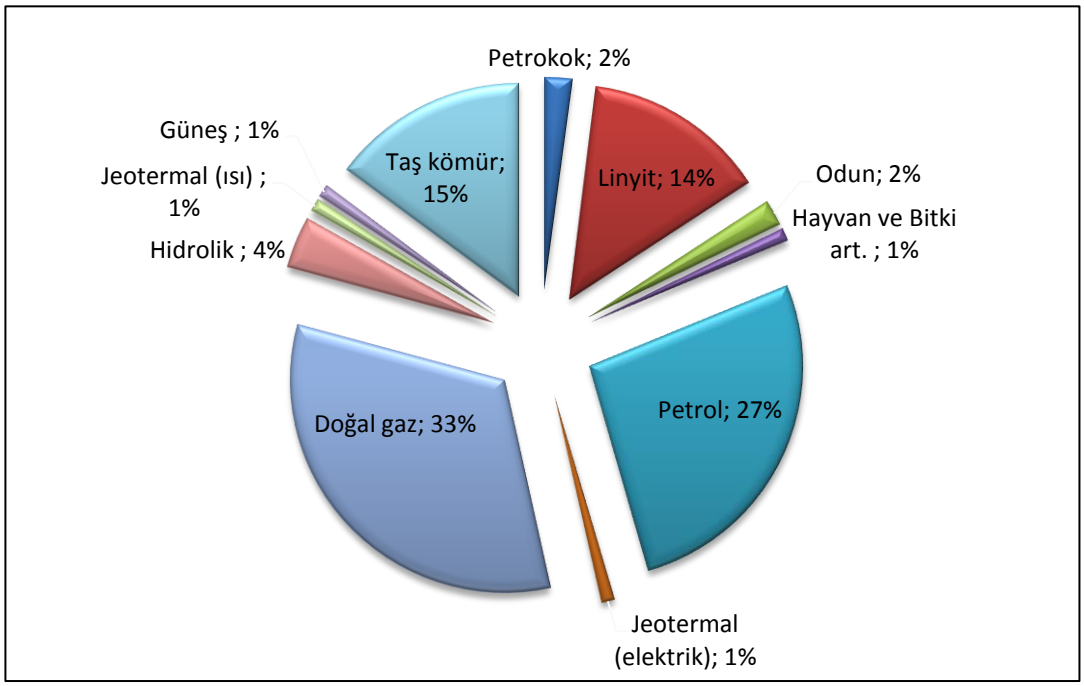
Fe	**:** Demir
G	**:** Gram
GAE	**:** Gallik asit eş değeri
H^+	**:** Hidrojen iyonu (proton)
H_2	**:** Hidrojen molekülü
H_3BO_3	**:** Borik asit
HCl	**:** Hidroklorik asit
HCOOH	**:** Formik asit
H_2O	**:** Su
H_2SO_4	**:** Sülfirik asit
K	**:** Potasyum
Kg	**:** Kilogram
K_2HPO_4	**:** Dipotasyum fosfat
KOI	**:** Organik madde içeriği
L	**:** Litre
M	**:** Molar
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
NH_3	**:** Amonyak
NH_4	**:** Amonyum
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 yoğunluk
OMW	**:** Zeytin fabrika atığı
PDT	**:** Fotodinamik tedavi
PEM	**:** Proton değişim membran
PHB	**:** Poli hidroksi bütirat
PNS	**:** Mor kükürtsüz (Purple non-sulfur)
PP IX	**:** Protoporfirin IX
PS I	**:** Fotosistem I
PS II	**:** Fotosistem II
S	**:** Kükürt
s	**:** Saat
SRWW	**:** Şeker rafinerisi atık suyu
TCA	**:** Trikarboksilik asit
UV	**:** Ultraviyole
v	**:** Hacim
VFA	**:** Uçucu yağ asitleri
Zn	**:** Çinko
$ZnCl_2$	**:** Çinko klorit
µL	**:** Mikrolitre
µm	**:** Mikrometre
µM	**:** Mikromolar

1. GİRİŞ

Yenidünya düzeni ve politikalarında ülkeler için iki konu önem kazanmıştır. İlki teknoloji diğeri ise enerjidir. Ülke politikalarında enerji hemen hemen başrol oynamaktadır. Gelişmiş ülkelerdeki yaşam biçimlerinde üstünlük sağlayan özellik enerji bolluğudur. Enerji olmadan endüstri, endüstri olmadan refah ve mutlu toplum veya bağımsızlığını koruyabilme yeteneği olmayacağı için enerjisiz bir ülke düşünülemez (Ünalan, 2002).

Enerji tüketimi de her geçen yılda çoğalan nüfusa ve sanayileşmeye paralel olarak artmaktadır. Dünyanın enerji ihtiyacının çoğu fosil yakıtlardan karşılanmaktadır. Bu nedenle enerji tüketimi arttıkça fosil yakıtlar da azalacaktır. Hızla tükenen fosil yakıtların doğaya fazla miktarda zararları da vardır. Dünyadaki enerji tüketim hızı fosil yakıtların oluşum hızının 300 bin katı kadar olup, bir günde bin yıllık bir fosil yakıt oluşumu tüketilmektedir (Yılmaz ve ark., 2003). Dünyada petrol rezervlerinin tükenme ömrünün 46-50 yıl, doğal gaz rezervlerinin tükenme ömrünün 63-119 yıl, kömürün ise 119-176 yılda tükeneceği tahmin edilmektedir (www.enerjienstitusu.com, 2011). Yapılan araştırmalar, fosil yakıt rezervlerinin azalmaya başladığını ve sürekli artan enerji talebine karşılık veremeyeceğini göstermektedir. 2010 yılına göre 2011 yılında Türkiye'de linyit, jeotermal, rüzgâr, güneş gibi kaynaklardan birincil enerji üretimi artarken; odun, hayvan ve bitki artığından birincil enerji üretiminin azaldığı tespit edilmiştir (Enerji Tabii ve Kaynaklar Bakanlığı, 2012). Türkiye'de 2011 yılındaki enerji tüketiminin kaynakları Şekil 1.1'de verilmiştir. 2011 yılında toplam enerji tüketimine göre sıralamada Türkiye 23. ülke konumundadır. Türkiye'de enerji tüketiminin büyük bir kısmını dışa bağımlı olunan petrol ve doğal gaz oluşturmaktadır. Enerji kaynakların enerji tüketimindeki payları sırasıyla doğal gaz (%33), petrol (%27), taş kömürü (%15), linyit (%14) ve hidrolik (%4) şeklindedir (Enerji Tabii ve Kaynaklar Bakanlığı, 2012; MMO, 2012).



Şekil 1.1. Türkiye'de 2011 yılında enerji tüketiminin kaynaklar bazında dağılımı (Enerji Tabii ve Kaynaklar Bakanlığı, 2012)

Fosil yakıtların kullanılmasıyla karbondioksit gazı atmosferde yoğun olarak birikir ve bu da küresel ısınmaya yol açar. Meydana gelen sıcaklık artışı da iklimin değişmesine, kutuplardaki buzulların erimesine, deniz seviyelerinin yükselmesine ve neticede verimli birçok tarım toprağının sular altında kalmasına neden olacaktır. Küresel ısı artışını önlemenin ilk koşulu, fosil yakıt kullanımını azaltarak, enerji altyapısını yenilenebilir enerjileri kullanmaya uygun duruma getirmektir (Keleş ve Hamamcı, 2002).

Fosil yakıtların tükenmesi ve dezavantajları bilim insanlarını çevre dostu, doğada bol miktarda bulunan, sürdürülebilir alternatif yakıtlar üzerinde araştırma yapmaya itmiştir ve problemlere karşılık, sürdürülebilir gelişim için yenilenebilir alternatifler üzerinde çalışılmaktadır. Alternatif enerji kaynakları; nükleer enerji, güneş enerjisi, rüzgâr enerjisi, dalga enerjisi, doğal gaz, jeotermal enerji, hidroelektrik, hidrojen, biyokütle, biyodizel ve biyogazdır (Şekil 1.2) (Ünalan, 2002).



Şekil 1.2. Alternatif enerji kaynakları

Güneşten gelen enerjinin doğrudan ya da dolaylı kullanımı sonucu yenilenebilir enerji kaynakları elde edilebilir. Yenilenebilir enerji kaynakları, sınırlı olmaması, çevreye daha az zarar vermesi veya hiç zarar vermemesi ve güvenilir olması nedeniyle fosil yakıtlardan daha avantajlı konumdadır. Alternatif enerjiler yerel birimler tarafından üretilebilmektedir (Mutlu, 2002). Alternatif kaynaklar arasında en ilgi çekici olanı evrende en çok bulunan, kullanım verimi yüksek, çok hafif, çevre dostu, oksijen ile yüksek bir enerji değeriyle yanıp suya dönüşen ve kolaylıkla hava ile karışabilen hidrojendir (Kapdan ve Kargı, 2006). Yenilenebilir olması nedeniyle hidrojen, geleceğin enerji taşıyıcısı olarak görülmektedir (Alnıak ve Bayramoğlu, 2009). Hidrojen, kullanılan diğer yakıtlara göre birçok avantajlara sahiptir. Bir yakıt hücresinde yüksek verimli enerji elde edilirken hiçbir zararlı madde meydana gelmeden yakıt olarak kullanılır. Tabi ki hidrojenle ilgili bazı dezavantajlar da vardır. Hidrojen oksijen ile ancak belirli koşullarda yanmaktadır. Depolama ve taşıma da en önemli problemlerdendir. Hidrojen gazı üretimi için biyolojik hidrojen üretimi iyi bir alternatiftir. Atık sorununu en aza indirmek ve sürdürülebilir gelişime uygun olarak, yenilebilir kaynaklardan biyohidrojen üretimi son yıllarda oldukça ilgi görmektedir ve yeşil teknoloji olarak bilinmektedir (Kapdan ve Kargı, 2006).

Biyohidrojen, yenilenebilir kaynaklardan biyolojik yöntemlerle elde edilir. Hidrojen üretimi için kullanılan her yöntem farklı bir enerji kaynağı (termal (ısı), elektroliz (elektrik) ya da fotolitik (ışık enerjisi vs.) gerektirir. Termokimyasal yöntemle hidrojen üretimi yüksek sıcaklık ve basınç altında gerçekleşebildiği için avantajlı konumda değildir. Ancak biyolojik işlemlerle hidrojen üretimi uygun sıcaklık ve basınç altında gerçekleştirebildiği için avantajlıdır (Arıkbıyıklı, 2007). Biyolojik işlemlerle hidrojen üretimiyle birlikte aynı zamanda yüksek katma değerli yan ürünler (B12 vitamini, karotenoidler, biyoplastik poli-β-hidroksi bütirat (PHB), 5-ALA gibi) elde edilebilir. Örneğin çevreyi kirletmeden biyolojik olarak bozunabilen polihidroksibütirat (PHB), ilaç sanayisinde, cerrahi malzemelerde ve ambalajlarda kullanılır ve ayrıca tıp, tarım ve biyoteknolojide çok önemli kullanım alanları olan 5-aminolevulinik asit (5-ALA) örnek olarak verilebilir. Hidrojen bazı alglerle, anaerobik bakterilerle ve fotosentetik bakterilerle üretilebilmektedir. Biyohidrojen yenilenebilir ve temiz bir enerji taşıyıcısı olarak uygun maliyetle elde edilebilir ve sürdürülebilir substratlardan üretilebilir. Örneğin, substrat olarak şeker pancarı melası uygun maliyetle, sürdürülebilir ve kolay elde edilebilir bir kaynaktır.

Biyorafineri kavramı, sürdürülebilir bir süreçle biyokütleden çeşitli ürün ve enerji elde edilebilme sürecidir (Cherubini, 2010). Bu genellikle biyoyakıt ve katma değeri yüksek ürünler şeklinde yapılmaktadır. Biyorafineri anlayışında kullanılacak substratın sürdürülebilir olması oldukça önemlidir. Bu çalışmada, biyorafineri anlayışına uygun olarak düşük maliyetli ve sürdürülebilir bir substrat olan şeker pancarı melasından *Rhodobacter sphaeroides* O.U.OO1 ile hidrojen ile birlikte aynı zamanda 5-aminolevülinik asit (5-ALA) üretimi gerçekleştirildi.

5-Aminolevülinik asit tıp, tarım ve biyoteknolojide çok önemli uygulama alanları olan ve yeni uygulama alanları geliştirilebilecek katma değeri yüksek bir üründür. Substrat olarak şeker pancarı melası ve asetat sürdürülebilir, uygun maliyetle ve kolay elde edilebilir. Şeker pancarı melası ve farklı organik asitler kullanılarak önemli miktarlarda hidrojen üretilebilmektedir (Kars, 2010; Yetiş, 2000; Uyar, 2009; Eroğlu, 2004). Şeker pancarı melası yaklaşık %48-50 sükroz içermesinden dolayı bakteriler için uygun bir karbon kaynağıdır (www.konyaseker.com). Ayrıca organik ve inorganik maddeler açısından zengin bir karışımdır. Bileşiminde çeşitli miktarlarda değişik vitaminler de ihtiva etmektedir (www.pankobirlik.com). Asetat ise farklı termofilik bakteriler tarafından melasın anaerobik fermentasyonu sonucunda fazla miktarlarda elde edilebilir (Özgür, 2010). Bu nedenle kolay elde edilebilir substrat çeşitidir.

5-ALA'nın kimyasal sentezi birçok karmaşık basamakları içermektedir. Kimyasal yollarla 5-ALA üretimi hem yüksek maliyetle hem de düşük verimle gerçekleşmektedir. Ancak bazı fotosentetik bakterilerle özellikle *Rhodobacter sphaeroides* ile gerçekleştiği zaman daha düşük maliyetle ALA üretimi mümkün olabilir (Sasaki, 2005). Bu bakteriler ürettikleri ALA'yı hücre dışına saldıkları için ürünün toplanması veya hasadında hem maliyeti düşürmekte hem de kolaylık sağlamaktadır (Tangprasittipap, 2002). 5- Aminolevülinik asit *R.sphaeroides* tarafından hücre dışına salgılanır. Besiyerindeki ALA miktarı bu yüzden spektrofotometre ile ölçülür (Chaikrissadakarn ve ark., 2004). *Rhodobacter sphaeroides* farklı organik asitleri de kullanarak önemli miktarlarda biyohidrojen üretimini gerçekleştirebilen mor kükürtsüz bir bakteridir (Kars, 2010; Yetiş, 2000; Uyar, 2009; Eroğlu, 2004). 5-ALA, porfirin, B12 vitamini ve klorofil gibi tetrapirollerin biyosentezinde öncü madde olarak kullanılmaktadır (Tangprasittipap, 2007; Beale, 2006; Sasaki, 2002).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Alternatif enerji kaynakları

Yenilenebilir enerji kaynakları; güneş enerjisi, rüzgâr enerjisi, biyokütle enerjisi, jeotermal enerji, hidroelektrik enerji, biyoenerji, hidrojen enerjisi, biyodizel ve deniz kökenli enerji kaynaklarıdır. Güneşten gelen enerjinin doğrudan ya da dolaylı kullanımı sonucu yenilenebilir enerji kaynakları elde edilir. Yenilenebilir enerji kaynakları sınırlı olmaması, çevreye daha az zarar vermesi veya hiç zarar vermemesi ve güvenilir olması nedeniyle fosil yakıtlardan daha avantajlı bir konumdadır. Alternatif enerjiler yerel birimler tarafından üretilebilmektedir. Böylece alternatif enerjiler çevreyi korumanın yanında, yerel demokrasinin en önemli özelliği olan, yerel kararların yerel halk tarafından alınıp, uygulamasının da bir aracı olacaktır (Mutlu, 2002).

Alternatif enerji kaynakları doğal enerji kaynaklarından meydana geldiği için, ithal enerjilere ödeme yapılmasını engellemekte ve dış borçları azaltmaktadır. Bunlardan yararlanmak için gerekli olan enerjilerin işletilmesi kolaydır ve uzman kişilere gerek yoktur (Mutlu, 2002). Alternatif enerjilerin doğal ve teknik potansiyelleri dünya enerji ihtiyacının tümünü karşılamaya yetecek düzeydedir. Mevcut potansiyelleri günlük olarak tüketilen atom ve fosil enerjilerden 15000-20000 kat daha fazladır (upav.org.tr, 2004). Alternatif enerji kaynaklarının ülke sınırları içinde bulunması, yakıt ve ulaşım açısından çok fazla tehlike teşkil etmemektedir (Savin, 2003). Bitkilerden elde edilen biyokütle enerjisi, kendi vatandaşımızın ve çiftçilerimizin önemli derecede kar elde etmelerine imkân sağlamaktadır (Mazza, 2004).

Güneş, rüzgâr, jeotermal ve deniz dalgalarından üretilen enerjinin, üretim düzeyi istenilen düzeyde olmayabilir. Ayrıca bunlardan elde edilen enerji seviyeleri kontrol altına tutulamayabilir (Özemre, 1996). Alternatif enerji kaynaklarının kurulum aşamasında ihtiyaç duyulan yüksek sermaye yatırımları, bu enerji kaynaklarının önündeki en önemli engeldir. Yenilenebilir enerji kaynaklarının başlangıç yatırımları, diğer kaynaklara göre pahalıdır. Ama uzun vadede ulusal ekonomi açısından kazanç sağlayan kaynaklardır (Kaygusuz ve Sarı, 2003). Artan enerji maliyetleri, birçok alanda yenilenebilir enerjileri daha ekonomik ve dolayısıyla tercih edilebilir olmasını sağlanabilir (Boztepe, 2009). İlk adım maliyetleri devlet desteği ile azaltılabilir. Diğer yandan, yerli ve yabancı yatırımcılar için destekleyici olmalı ve cazip imkânlar sunmalıdır. Bu teşvikler aynı zamanda ülke çıkarlarını korumalıdır ve değişen koşullara uyum sağlayıcı nitelikte de olmalıdır (Kaygusuz ve Sarı, 2003).

Güneş, dünyamıza ve diğer gezegenlere enerji veren sonsuz denebilecek bir güce sahip tek enerji kaynağıdır. Kömür, petrol, su potansiyeli, biyokütle, rüzgâr gibi diğer enerjiler, güneş ışınlarının maddeler üzerindeki fiziksel etkisinden oluşmaktadır. Basitliliği ve ucuzluğu nedeniyle en yaygın kullanılan güneş enerjisi uygulamasıdır. Evlere, yüzme havuzlarına ve sanayi tesislerine sıcak su sağlamakta kullanılırlar (Çakar ve ark., 2009). Güneşi tükenmesi güç bir kaynak olarak kabul edersek, alternatif enerji kaynakları içerisinde önemli bir yer tutacaktır.

Rüzgâr enerjisi, fosil yakıtlara nazaran elektriğin birimi başına daha pahalıya gelse de, hidro elektiriğin ardından en verimli ikinci yenilenebilir enerji kaynağıdır. Rüzgâr türbinleri kule şeklinde ve genellikle iki ya da üç kanatlıdır. Çapı metrelerce olabilir, kirlilik yaratmaz ve monte etmesi kolaydır. Kıyıda ya da açıkta bulunabilir ancak üretim rüzgâra bağlıdır. Bazıları rüzgâr türbinlerini, manzarayı bozduğu gerekçesiyle eleştirir (www.bbc.co.uk). Rüzgârdan yararlanılarak elde edilen enerjinin, doğaya bir zararının olmaması da göz önünde bulundurulması gereken bir özelliktir.

Jeotermal enerji olarak, dünyanın merkezindeki erimiş kayalardan oluşan mağmadan gelen ısı kullanılır. Bu ısı, ya kuyular açılarak ya da yüzeye yakın yerlerdeki su kaynakları ya da kayalardan elde edilir. Dünyada tüketilen enerjinin sadece yüzde 0.4'ü bu yolla elde edilmektedir. Örneğin İzlanda'da sıcak jeotermal sular, ısıtma amacıyla kullanılmak amacıyla doğrudan binalara pompalanır (Erdoğan, 2007). Bu enerjiyi elde etmek için teknolojiye ihtiyaç vardır, bu da artan bir maliyet demektir.

Hidroelektrik enerji hızla akan suyun enerjisiyle döndürülen elektrik jeneratörlerinden elde edilen elektriktir. Hidroelektrik enerji santralleri içme, kullanma ya da sanayi suyu sağlamak amacıyla ırmakların önü kesilerek oluşturulan baraj göllerinde kurulmaktadır (Yumurtacı ve Öztürk, 2007). Ülkemizdeki mevcut yağış miktarları ve akarsularımızın durumu göz önüne alındığında bu enerjinin elde edilmesi için yağmura ihtiyaç vardır. Bu enerji bol yağış alan ülkelerde kolay ve ucuz maliyetle elde edilebilir.

Biyogaz, bilindiği gibi hayvansal ve bitkisel organik atık maddelerin çürütülmesiyle oluşan metan gazı çevreye zarar veren bir etkendir. Ancak aktif gazın depolanması, depolanan gazların arıtılması ve daha sonra oluşan metan gazın yakılması yoluyla enerjiye dönüştürülerek biyoenerji sağlanabilmektedir. Ayrıca yakılması mümkün olmayan atıklar da tarım topraklarında gübre olarak kullanılmaktadır (Külekçi, 2009). Bu enerji otomobil ve gelecekte diğer sektörlerde de kullanılacaktır.

Deniz kökenli yenilenebilir enerjileri: deniz dalga enerjisi, deniz sıcaklık gradyent enerjisi, deniz akıntıları (boğazlarda) ve gel-git enerjisidir. Türkiye'de gel-git enerjisi olasılığı yoktur. Türkiye için söz edilebilecek olanlar deniz dalga enerjisi ve deniz akıntıları enerjisidir. İstanbul ve Çanakkale Boğazları'nda deniz trafiğinin yoğun olması nedeniyle deniz akıntıları enerjisinin kullanımı azalmıştır (Akay, 2005). Bu enerji, denizle iç içe olan ülkeler için kolay ve ucuz iken; deniz kıyısı olmayan ülkeler için pahalı ve iletimi zordur.

Hidrojen ise bir doğal yakıt olmayıp, birincil enerji kaynaklarından yararlanılarak su, fosil yakıtlar ve biyokütle gibi değişik hammaddelerden üretilebilen sentetik bir yakıttır. Üretilmesi aşamasında buhar iyileştirme, atık gazların saflaştırılması, elektroliz, termokimyasal süreçler, radyoliz gibi alternatif birçok hidrojen üretim teknolojileri mevcuttur. Üretilen hidrojen boru hatları veya tankerler ile büyük mesafelere taşınabilir (Ün, 2007). Hidrojenin taşınmasında engellerin olmaması, daha fazla kullanımı sağlayacaktır.

Yenilenebilir enerji kaynakları içerisinde güneş enerjisi gibi her zaman enerji üretmek mümkün değildir. Ama hidrojen ihtiyaç olan yerlere taşınabilir ve stoklanabilir (www.energyquest.ca.gov). Bunlar, hidrojenin diğer alternatif enerji kaynaklarından ayıran en önemli özelliklerinden birkaçıdır. Dünyanın enerji gereksiniminin büyük bölümünü karşılayan fosil kaynaklar hem gittikçe azalmakta hem de çok ciddi çevre ve hava kirliliğine sebep olmaktadır. Hidrojen, bir enerji taşıyıcı olarak bu sorunların çözümü için potansiyel oluşturmaktadır (İDER, 2003). Dünyanın ¾'ü su ile kaplıdır. Suyun içinde de hidrojen atomunun bulunması nedeniyle hidrojen dünyada en fazla bulunan elementtir.

2.1.1. Hidrojen enerjisi

Diğer yakıtlara göre hidrojen, birçok avantajlara sahiptir. Bir yakıt hücresinde yüksek verimli enerji elde edilirken hiçbir zararlı madde meydana gelmeden hidrojen yakıt olarak kullanılır. Hidrojen temiz bir güç kaynağı kullanılarak sudan elde edilirse hidrojen üretimi ve dağıtımında kirlilik oluşmayacaktır (Demirbaş, 2009). Hidrojen enerjisi yenilenebilir, temiz ve tükenmez bir enerjidir. Tabii ki bu elementle ilgili bazı dezavantajları da vardır. Hidrojen oksijen ile ancak belirli koşullarda yanmaktadır. Depolama ve taşıma da en önemli problemlerdendir. Ancak son yıllardaki çalışmalar bu problemlerin azalacağını göstermiştir. Hidrojen teknolojisi, kullanım alanının sürekli

gelişmesi ve enerji verimini arttıracak yöntemlerin de eklenmesiyle giderek önem kazanmaktadır (Kapdan ve Kargı, 2006).

Hidrojenin, gelecekte yaygın kullanım açısından çok ümit verici yakıtlardan biri olduğu düşünülür, düşük kirlilik içerir ve yenilenebilir bir yakıttır. Dünyada üretilen hidrojenin çoğu, özellikle de petrokimya endüstrisi için doğalgazdan elde edilir ve çoğunlukla metandan oluşur. Hidrojen biyokütle, hidroelektrik enerji, solar termal enerji, direk dönüşüm için fotovoltaik yöntemin kullanıldığı solar enerji ve rüzgâr enerjisi gibi yenilenebilir enerji kaynaklardan üretilebilir (Demirbaş, 2009).

2.1.1.1. Hidrojenin tarihçesi

Teknik yeniliklere paralel olarak dünya genelinde ekonominin gelişmesi, endüstri devrimiyle 1750 yılından bu yana, peş peşe beş ayrı dalgalanma biçiminde sürmüştür. 1750-1825 yılları arasındaki birinci dalgalanmanın başlıca enerji kaynağı kömürdür. 1825-1860 arasındaki ikinci dalgalanmada, ekonomiye ivme kazandıran elektrik olmuştur. 1860-1910 yılları arasındaki üçüncü dalgalanmada elektrik etkisini sürdürmüş, ama yeni kaynak olarak petrol ortaya çıkmıştır. 1910-1970 arasındaki dördüncü dalgalanmada ekonomiyi büyüten yeni enerji kaynağı nükleer enerjidir. Şimdi 1970'lerde başlayan 21. Yüzyılın neresinde biteceği henüz bilinmeyen yeni bir dalgalanma başlamıştır. Bu yeni dalgalanmayı etkileyen enerji türü ise hidrojendir. Hidrojen kullanım verimi yüksek bir yakıttır. Çevre dostudur. Oksijen ile yüksek bir enerji değeri ile yanıp suya dönüşür. Çok hafiftir ve kolaylıkla hava ile karışabilir. Sadece hidrojenin bu özellikleri bile geleceğin yakıtı olması için aday olmasını sağlar. Fosil yakıtların yeryüzüne ve atmosfere verdiği zararlar göz önüne alındığında hidrojenin ne kadar önemli olduğu daha iyi anlaşılacaktır (Alnıak ve Bayramoğlu, 2009).

Yenilenebilir olması nedeniyle hidrojen, geleceğin enerji taşıyıcısı olarak görülmektedir. Hidrojen üreten prosesler içinde bütün birincil enerji kaynakları kullanılabilir. Henüz diğer enerji kaynaklarına göre üretimi biraz pahalı olmakla birlikte çevreye sağladığı katkılar da var olduğundan yakın bir gelecekte toplam maliyetinin daha da düşeceği düşünülmektedir. Hatta hidrojenle ilgili araştırmaların gelişmesi devam ederse 2025 yılında dünya genel enerji tüketiminin %10'u hidrojene dönüştürülerek kullanılabilecektir (Alnıak ve Bayramoğlu, 2009).

Biyolojik hidrojen üretimi hidrojen gazı üretimi için iyi bir alternatiftir. Atık minimizasyon sorunları ve sürdürülebilir gelişime uygun olarak, yenilenebilir

kaynaklardan biyohidrojen üretimi son yıllarda oldukça ilgi görmektedir ve yeşil teknoloji olarak bilinir (Kapdan ve Kargı, 2006).

2.1.1.2. Hidrojenin özellikleri

Hidrojen renksiz, kokusuz, tatsız, yanıcı bir gazdır ve en hafif kimyasal maddedir (Şahin ve Yalçın, 2006). Hidrojen kullanışlı ve temiz bir yakıttır, toksik ve kanserojenik değildir (Demirbaş, 2009).

Hidrojenin difüzyon katsayısı da öteki yakıtlardan daha fazladır. Ayrıca gaz halindeki hidrojen kâğıt, kumaş, kauçuk gibi malzemelerden, platin, demir, çelik gibi bazı metallerden difüzyon yolu ile geçebilmektedir. Hidrojenin bu özelliği ise depolanmasına ilişkin bazı sorunlar yaratmaktadır (Bahadır, 2009). Hidrojen daha çok gaz halinde depolanabilir ama sıvı halinde veya bir kimyasal bileşik içinde de depolanabilir. Düşük yoğunluk olduğundan çok yer kaplar. Bu nedenle basınçlı tanklarda ve tüplerde sıkıştırılmış olarak saklanmaktadır. Hidrojen gazı, doğalgaz ile karıştırılarak borular aracılığıyla her yere taşınabilmektedir. Böylece doğal gazın verimi arttırılmaktadır. Hidrojen sentetik bir enerji taşıyıcısıdır. Bazı diğer prosesler tarafından üretilen enerjiyi taşır. Hava ile tamamen yandığı zaman hidrojenin yanma ürünleri su, oksijen ve azottan oluşur. Çok yüksek yanma sıcaklığı 3000 ^{o}C, yüksek alevlenme sıcaklığı 570 ^{o}C ve çok düşük yanma sıcaklığı -253 ^{o}C'dir. Petrol ile çalışan bir motor ile karşılaştırıldığında azot oksit emisyonları yakıt olarak hidrojen kullanan motorlarda çok azdır. Çizelge 2.1'de hidrojenin yakıt özellikleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Hidrojenin yakıt özellikleri (Demirbaş, 2009; Şahin, 2006).

Özellik	Birim	Değer
Kaynama noktası	Kelvin (K)	20.41
Donma noktası	K	13.97
Yoğunluk (sıvı)	kg/m^3	70.80
Yoğunluk (gaz)	kg/m^3	1.34
Kritik nokta sıcaklığı (T_K)	K	33
Kritik nokta basıncı (P_K)	Bar	12.9
Kritik sıcaklıktaki yoğunluk (d_K)	g/L	31.4
Hava ile tutuşma bölgesi	%	4.0-77.0
Tutuşma sıcaklıklığı	^{o}C	560
25^{o}C ve 1 bardaki ısı iletkenliği	Watt (W)/cmK	1.9
Difuzyon katsayısı	cm^2/s	0.61
Sabit basınçta spesifik ısı	KiloJul (kJ)/kg K	14.89
Havadaki patlama limiti	% (vol.)	4-75
Havadaki ateşleme enerjisi	MiliJul (mJ)	0.02
Ateşleme sıcaklığı	K	585
Havadaki alev alma sıcaklığı	K	2318

Alev yayma oranı	%	17-25
Havadaki stokiyometrik karışım	%	29.53
Stokiyometrik hava/yakıt	kg/kg	34.3/1
Alev hızı	cm/s	2.75
HHV ve LHV*	MegaJul (MJ)/kg	141.90-119.90
HHV ve LHV	MJ/m^3	11.89-10.05
***HHV: Yüksek ısıl değer**	**LHV: Düşük ısıl değer**	

2.1.1.3. Biyolojik yolla hidrojen üretim hızını etkileyen faktörler

Biyohidrojen üretimini etkileyen faktörler hidrojen üretimine katılan enzimler veya çevresel faktörlerdir. Yoğunluğu ve dağılımıyla hidrojen üretiminde ışık önemli bir etkendir ve amonyum miktarı, besiyeri sıvısının pH'sı, sıcaklık, tuz miktarı, ortamın oksijen içerip içermediği ve ortamdaki farklı metaller de üretim hızını etkileyen faktörler arasındadır. Ayrıca fotobiyoreaktörün şekilleride önemli olup reaktörlerin yüzey hacim oranı yüksek olarak tasarlanması gerekmektedir (www.meliksahtekin.com).

2.1.1.4. Hidrojenin üretilmesi, depolanması, taşınması ve kullanımı

Güneş enerjisinin yardımıyla suyu ayrıştırarak hidrojen elde edilmesi en temiz ve sürdürülebilir yöntemdir. İlk aşama, güneş enerjisinin önce yarı iletken kristallere dayalı güneş hücrelerinden yaklaşık %30 verimle elektrik enerjisine dönüşmesidir. Hidrojen üretiminde bundan sonraki adım ise elde edilen elektrik enerjisi kullanarak elektroliz yoluyla suyun O_2 ve H_2 ayrıştırılmasıdır (Bilim ve teknik, 2006).

Hidrojen gaz ya da sıvı formda depolanabilir. Doğal gazın tükendiği yer altı mağaralarında hidrojen gaz formunda depolanmaktadır. Hidrojenin diğer gazlara göre sızma olasılığı daha çok olmasından dolayı bu teknik ile depolamada sızıntı problem oluşturmamaktadır. Bazı ülkelerde bu teknik uygulanmaktadır. Bu ülkelerden biri olan Fransa, gazı (hidrojen bulunan karışım) mağarada başarı ile depolamaktadır. Gazın mağara içerisine, sonra da mağaradan dışarıya pompalanması için kullanılan enerji önem taşımaktadır (Ün, 2007).

Üretilen hidrojen depolanabilmekte aynı zamanda boru hatları veya tankerlerle taşınabilmektedir. Doğal gaz boru hatlarının gelecekte hidrojen taşınması için kullanılabileceği belirtilmektedir. Hidrojen gaz olarak boru hatlarıyla taşınabildiği gibi yüksek basınçlı gaz ve sıvılaştırılmış biçimde tankerlerle taşınabilir (www.obited.gazi.edu.tr). Taşıma yöntemide maliyet açısından önemlidir. O yüzden en

ucuz taşıma yöntemi taşınacak hidrojenin miktarına ve taşıma yapılan yola bağlı olmaktadır. Hidrojenin taşınması için uygulanan ve incelenen metodlar, karayolu, demiryolu, denizyolu ve boru hatlarıdır (Yumurtacı ve ark., 2002). Böylece hidrojen, ev ve iş yerlerine ulaşımı, insanların kullanımına sunulmuştur.

Hidrojen iki şekilde kullanılmaktadır.

1) Yakıt pil teknolojisi

2) Doğrudan yanmalı motor teknolojisi

Yakıt pili teknolojisi, konutlarda ısıtma amaçlı, doğrudan elektrik üreteci, taşıt araçlarında ve savunma sanayinde kullanılmaktadır. Doğrudan yanmalı motor teknolojisi ise sadece taşıtlarda kullanılmaktadır. Hidrojeni yakıt olarak kullanan ve kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine çeviren bu sistemler yakıt hücreleri diye adlandırılmaktadır ve bu sistemlerde hidrojenin yanma ürünleri sadece su ve su buharıdır. Bu sistemlerde hidrojen doğrudan ya da herhangi bir kaynak yardımıyla sisteme verilmektedir ve istenilen enerji böylece elde edilir (www. hydrogen.cankaya.edu.tr).

Hidrojenin kullanıldığı alanlar ise;

Düz cam üretiminde,

Işıl işlemlerde koruyucu ve reaktif atmosfer bileşeni olarak,

Enerji santral ekipmanlarının soğutulmasında,

Bitkisel yağların katılaştırılmasında,

Roket yakıt karışımlarında kullanılmaktadır.

Ayrıca hidrojen üretiminde üç çeşit mikroorganizma kullanılmaktadır. Bunlar algler, anaerobik bakteriler ve fotosentetik bakterilerdir. (Arıkbıyıklı, 2007).

2.2. Fotosentetik bakteri *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001

Rhodobacter cinsinde mor kükürtsüz bakterilerden 2 önemli tür yer almaktadır. Bunlar; *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 ve *Rhodobacter capsulatus*'tur (Van Niel, 1944). *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 proteobakterilerin α-alt grubu içerisinde yer alıp gram negatiftir (Imhoff ve ark., 1984). Çizelge 2.2'de bakterinin sistemağı verilmiştir.

Çizelge 2.2. *Rhodobacter sphaeroides'*in sistematiği (Imhoff ve ark., 1984)

Alem	**Bacteria**
Şube	Proteobacteria
Sınıf	Alphaproteobacteria

Takım	Rhodobacterales
Aile	Rhodobacteraceae
Cins	Rhodobacter
Tür	*Rhodobacter sphaeroides*

R.sphaeroides hücreleri kompleks bir ortamda yetiştiği için morfolojik olarak önemli derece çeşitlilik gösterir. Tanımlanan ortamlarda hücreleri, oval, kalp veya kısa çubuklar şeklinde olabilir (Pellerin ve Gest, 1983). Metabolizma ürünleri ve sahip oldukları renk pigmentlerinin karotenoid, spheroiden ile spheroidenon özelliklerinden dolayı renkleri farklı olmaktadır (Koku ve ark., 2002). Oksijenli ve oksijensiz ortamda üreyebilen *R.sphaeroides* anaerobik koşullar altında koyu kahverengi, aerobik koşullar altında ise pembe renklidir (Holt ve ark., 1984). Şekil 2.1'de de sıvı besiyerinde üreyen *R.sphaeroides*'in anaerobik ve aerobik ortamda renk değişikliği görülmektedir. *R. sphaeroides*'in üreme ortamı pH 6 - 8.5 ve sıcaklık 29^{o}C olması gerekir (Van Niel, 1944).



Şekil 2.1. *Rhodobacter sphaeroides*'in aerobik ve anaerobik koşullardaki görüntüleri

Göletler, göller ve lagünlerde bulunabilirler (Caumette, 1984). *R.sphaeroides* tarafından hidrojen üretimi anaerobik koşullar ve ışık altında, organik maddelerin parçalanmasıyla meydana gelir. Hidrojen üretimi için besiyerinde amonyum sınırlı miktarda olmalıdır. *R.sphaeroides,* fotosentetik ve mor kükürtsüz bir bakteri olup zengin sekonder metabolitlere sahiptir (Kars, 2008 (Doktora Tezi); Kars, 2010; Mackenzie, 2007; Sasaki, 2005). Ayrıca geniş metabolik aktivitelere sahiptir. Yani fotootrof, fotoheterotrof, fermantasyon, oksijenli ve oksijensiz solunum gibi çok farklı metabolik faaliyetlere sahiptir (Blankenship ve ark., 1995).

2.3. Hidrojen üretimi

Hidrojen üretim prosesleri arasında, biyolojik hidrojen üretimi alternatif ve yenilebilir enerji kaynağı olarak oldukça önem taşır (Kotay, 2008). Temel enerji kaynağı olarak fosil yakıtlar kullanıldığı için çevresel problem hızla artmaktadır. Fosil yakıtların yanmasıyla asit yağmurlarına sebep olan sera gazı ve toksik gazlar, CO_2, SO_2, NO_X ve diğer kirleticiler önemli miktarda üretilmektedir ve küresel ısınmaya neden olmaktadır (Ni ve ark., 2006). Alternatif enerji kaynakları ile bu sorunlar giderilebilir.

Biyokütle, hayvan atıkları, kentsel katı atıklar, ekin kalıntıları, küçük ağaç kalıntıları, tarımsal atıklar, talaş tozları, sucul bitkiler, kısa dönemli otsu türler, atık kağıt, tahıllar ve daha birçok maddeden elde edilebilir (Holladay, 2009). Biyokütleden enerji üretim prosesleri iki genel kısımda incelenir. Bu prosesler termokimyasal ve biyolojik proseslerdir (Levin, 2010). Termokimyasal proses 3 aşamada gerçekleşmektedir. Bunlar piroliz, geleneksel gazifikasyon ve süperkritik su gazifikasyonu (SCWG)'dur (Kalıncı, 2009). Termokimyasal prosesle hidrojen üretimi yüksek sıcaklık ve basınç altında gerçekleştiği ve ekonomik olmaması nedeniyle avantajlı konumda değildir. Biyohidrojen ise düşük sıcaklık ve basınç altında gerçekleştiği için avantajlı konumdadır ve yenilenebilir kaynaklardan hidrojenin biyolojik ya da fotobiyolojik yöntemlerle elde edilmesidir. Bütün bu yöntemlerde hidrojenaz ve nitrojenaz gibi hidrojen üreten enzimler ile kontrol edilir (Ni ve ark., 2006).

2.3.1. Hidrojen üretim metabolizmasında bulunan enzim sistemleri

Hidrojen üretim metabolizması fotosentetik zar aygıtı, karbon akışı (TCA döngüsü) ve enzim sistemleri diye incelenir (Koku ve ark., 2002). Enzim sistemlerinin (nitrojenaz ve hidrojenaz) aktivitesi karbon kaynağı, ışık yoğunluğu, metal iyonları (Fe, Mg), amonyak varlığı biyohidrojen üretimini etkiler. Biyohidrojen üretimi, mikroorganizmalarda bulunan hidrojen üreten enzimlere bağlıdır. Çok basit redoks reaksiyonunu bu enzimler katalizler:

$$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2 \qquad \textbf{(2.1)}$$

Hidrojen üreten üç ana enzim birçok hidrojen üretim sistemi tarafından kullanılır (Mathews ve Wang, 2009).

Bu üç ana hidrojen üreten enzim:

1-) Nitrojenazlar,

2-) [NiFe]- hidrojenazlar ve

3-) [FeFe]- hidrojenazlar'dir.

Azotu amonyağa fikse eden reaksiyonu katalizleyen ve aynı anda protonların (H^+) hidrojene zorunlu indirgenmesini sağlayan nitrojenazlardır. Hidrojenin üretimini sağlayan ana enzimdir.

Hidrojen üretiminde [NiFe]-hidrojenazlar nitrojenazlardan 15 kat daha etkilidir. [NiFe]-hidrojenazlar sadece hidrojen üretmez. Ayrıca uptake hidrojenazlar (hidrojen tüketen enzimler) olarak da iş yapabilir. Hidrojenden elektronları alır ve elektronları nikotinamid adenin dinükleotid fosfatı (NADP) indirgemekte kullanır.

En etkili hidrojen üretim enzimi [FeFe]- hidrojenazlardır. Nitrojenaz enzimlerinden 1000 kat ve [NiFe]- hidrojenazlardan da 10-100 kat daha iyi aktiviteye sahiptir. Çevre koşullarına bağlı olarak [FeFe]-hidrojenazlar hidrojen üretir ya da tüketebilirler. Genel olarak bu üç enzim oksijene hassastır ve uygun hızda hidrojen üretmek için oksijenin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. [NiFe]-hidrojenazlar ve [FeFe]-hidrojenazlar anaerobik mikroorganizma karışımı veya saf kültürler tarafından karanlık fermentasyonlarda kullanılabilir. Bu reaksiyonlarda oksijen üretilmediği veya tüketilmediği için, her iki hidrojenaz tipinin oksijen tarafından pasif hale sokulması çok az olasıdır (Mathews ve Wang, 2009).

Biyolojik hidrojen üretim proseslerinin en önemli enzimi hidrojenazdır. [NiFe]-hidrojenaz hem aerobik hem de anaerobik mikroorganizmalarda bulunan uptake hidrojenazdır. [FeFe]-hidrojenaz uptake hidrojenazın varlığında H_2 gazı kullanıldığı ve tüketildiği için, net H_2 üretiminde azalma görüldüğü için genetik mühendisliği uptake hidrojenazın üretiminden sorumlu geni çıkarmayı veya dönüştürmeyi hedeflemektedir. Ancak bu da genin pasif hale getirilmesi ile yapılabilir (Das ve ark., 2008). Hidrojenaz ve nitrojenaz gibi hidrojen üreten enzimlerin özellikleri Çizelge 2.3'de verilmiştir (Ni ve ark., 2006).

Çizelge 2.3. Nitrojenaz ve hidrojenazın özelliklerinin karşılaştırılması

Özellik	**Nitrojenaz**	**Hidrojenaz**
Substratlar	ATP, H^+ ya da N_2, elektronlar	H^+, H_2
Ürünler	H_2 ya da NH_4^+	ATP, H^+, H_2, elektronlar
Proteinlerin sayısı	İki (Mo-Fe ve Fe)	Bir
Metal bileşenler	Mo, Fe	Ni, Fe, S
Optimum sıcaklık	30°C (*A. vinelandii*)	55°C'de (*R.rubrum*), 70°C (*R.capsulatus*)
Optimum pH	7.1-7.3 (*A. vinelandii*)	6.5-7.5 (*R. sulfidophilus*)
İnhibitörler	N_2 (H_2 üretimi), $NH4^+$, O_2,	CO, EDTA, O_2, organik

	yüksek C/N oranı	bileşiklerin varlığı
Simulatörler	Işık	H_2 (*R.spheroides*), organik bileşiklerin yokluğu (*R.rubrum*, *R. capsulatus*)

2.3.2. Biyolojik yolla hidrojen üretimi

Fotosentetik proseslerle hidrojen üretimi, enerji krizi 1970'lerde patlak verdiği zaman daha çok ilgi görüp çalışmalar başlamıştır. Fakat bu çalışmalar laboratuar ölçekli olup uygulamaya geçirilmesi gerekmektedir. Hidrojenin biyolojik işlemlerle üretilmesinin birçok avantajları vardır. Bunlar;

- Uygun sıcaklık ve basınç altında gerçekleştirilmesi,
- Yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanılabilmesi (güneş, rüzgâr, su, biyokütle),
- Çevre kirliliğine yol açmaması,
- Üretimi sırasında organik atıkların kullanılması nedeniyle ekonomiktir ve önemli yan ürünlerin oluşması nedeniyle de avantajlıdır (Arıkbıyıklı, 2007).

Çeşitli biyohidrojen üretim prosesleri vardır.

1) Direkt biyofotoliz
2) Dolaylı biyofotoliz
3) Biyolojik yolla suyun gaza dönüşüm reaksiyonu
4) Fotofermentasyon
5) Karanlık fermentasyon proseslerdir (Levin, 2004).

2.3.2.1. Direk biyofotoliz

Direk biyofotoliz ile hidrojen üretimi, mikroalglerde bulunan fotosentetik sistemlerin kullanıldığı, hidrojen oluşturmak amacıyla güneş enerjisini kimyasal enerjiye dönüştüren biyolojik prosestir.

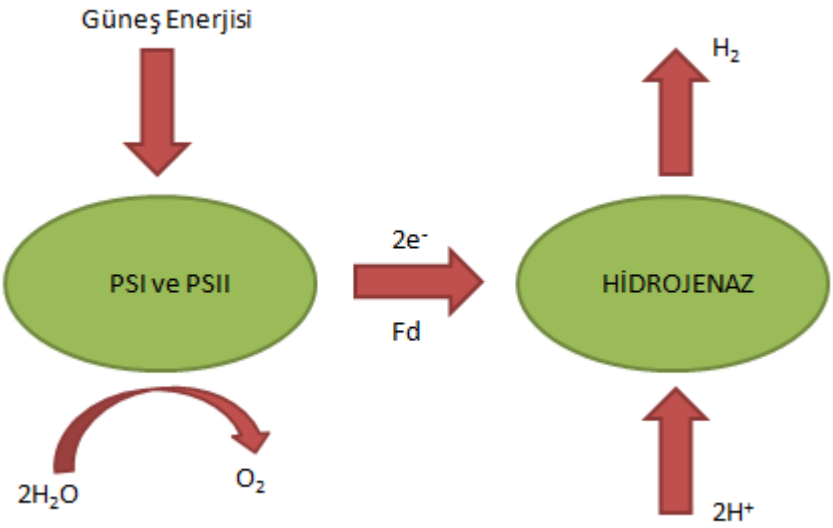
$$2H_2O - \text{Güneş enerjisi} \rightarrow 2H_2 + O_2 \qquad \textbf{(2.2)}$$

Direk biyofotolizde 2 çeşit fotosentetik sistem kullanılır. Bu sistemlerde fotosistem I (PSI) ve fotosistem II (PSII)'dir.

Biyofotoliz prosesinde sudan gelen iki proton ile hidrojenazın varlığında hidrojen oluşumu sağlanır. Yeşil bitkiler hidrojenaz yoksun olduğu için hidrojen üretme yeteneğine sahip değillerdir. Ancak direk biyofotolizde ökaryotik yeşil alg ve

prokaryotik mavi-yeşil agler (siyanobakteri) gibi mikroalgler ile hidrojenazın aktivitesiyle hidrojen üretimi gerçekleştirilir.

Bu proseste PSI sistemi ışık enerjisini absorbe ederek elektronları oluşturur. PSII tarafından alınan güneş enerjisi absorbe edilerek oluşturulan elektronlar ferrodoksine (Fd) iletir. Hidrojenaz enziminin aktivitesi sonucunda ise ferrodoksinden gelen elektronlar alınarak hidrojen üretimi sağlanır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Direk biyofotoliz (Şentürk ve Büyükgüngör, 2010)

Hidrojenaz enzimi oksijene duyarlıdır. Hidrojen üretiminin sürdürülebilir olması amacıyla da hidrojenaz enzimi için oksijen içeriği % 0,1'in altındaki düşük seviyelerde tutulması gerekir. Fakat substratın önemli miktarı bu proses süresince harcandığı ve solunum olduğu için verimlilik düşüktür (Ni ve ark., 2006).

2.3.2.2. Dolaylı biyofotoliz

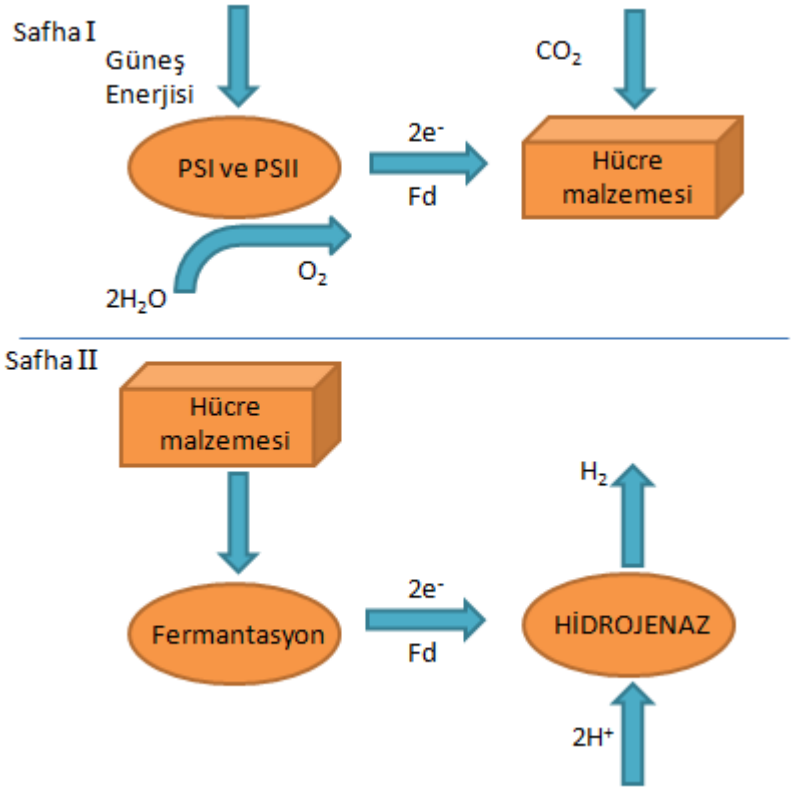
Direk biyofotolizde gözlenen oksijenin engelleyici etkisinde kalmamak için dolaylı biyofotoliz önerilmiştir. Dolaylı biyofotolizde fotosentetik mikroorganizmalar ile fotosentezle ilk olarak biyokütle üretilir ve daha sonra bu biyokütleden hidrojen elde edilir. Dolaylı biyofotoliz siyanobakterilerle (mavi-yeşil algler) gerçekleştirilir ve fotosistem II ve fotosistem I ile hidrojen üretilir. Dolaylı biyofotoliz yönteminde fotosentez yoluyla ilk olarak üretilen biyokütle, aerobik karanlık fermentasyonla 2 mol asetat/mol glukoz ve 4 mol hidrojen/mol glukozu oluşturur. Elde edilen 2 mol

asetat/mol glukozdan fotofermentasyon yoluyla hidrojen üretilerek verim arttırılabilir (Şekil 2.3) (Genç, 2009; Şentürk ve Büyükgüngör, 2010). Atmosferdeki CO_2'i harcayarak, atmosfere O_2 salınımı sağladığından dolayı çevre dostu bir yöntemdir. Fakat hidrojenaz enziminin oksijene duyarlı olması, substrat olarak atık maddenin kullanılamaması ve üretilen hidrojen miktarının düşük olmasından dolayı bu yöntem biyohidrojen üretiminde daha az tercih edilmektedir.

Mavi-yeşil algler (siyanobakteriler) hidrojen üretmek için dolaylı biyofotolizde aşağıdaki reaksiyonlar kullanılır (Ni, 2006).

$$12H_2O + 6CO_2 \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \quad \textbf{(2.3)}$$

$$C_6H_{12}O_6 + 12H_2O \rightarrow 12H_2 + 6CO_2 \quad \textbf{(2.4)}$$



Şekil 2.3. Hidrojen üretimi için dolaylı biyofotoliz (Şentürk ve Büyükgüngör, 2010)

Nitrojenazın aktivitesini oksijen engeller bu yüzden anaerobik şartlarda hidrojen üretimi meydana gelir. Hidrojenin foto üretimi üzerine CO_2'nin engelleyici etkisi olmakla birlikte hidrojen gelişim safasında CO_2 bazı kültürler için gereklidir. CO_2 derişiminin düşük olması daha yüksek hidrojen üretimine yol açtığı belirlenmiştir (Das ve Veziroğlu, 2008).

Troshina ve ark., (2002) çalışmasında *Cyanobacterium gloeocapsa alpicola* tarafından yapılan dolaylı biyofotoliz ile optimum hidrojen üretiminde pH değeri 6.8-8.3 olması gerektiği ve sıcaklığın da 30ºC'den 40ºC'ye artırıldığı zaman hidrojen üretimin iki kata kadar çıktığı belirlenmiştir.

2.3.2.3. Karanlık fermentasyon

Karanlık fermentasyon, karbonhidratlarca zengin substratlar ile karanlıkta üreyen anaerobik bakteri tarafından H_2 üretimi gerçekleştirilir. Fermentasyon reaksiyonları mezofilik (25-40ºC), termofilik (40-65ºC), aşırı termofilik (65-80ºC) ve hiper termofilik (>80ºC) koşullarda gerçekleşebilir. Karanlık fermentasyon prosesleri, direk ve dolaylı biyofotoliz sistemlerin direk saf hidrojen üretiminden farklı olarak öncelikli H_2 ve CO_2 içeren karışık biyokütle üretir. Fakat daha az miktarda CH_4, CO ve H_2S içerebilir. Karanlık fermentasyon sistemleri hidrojen eldesi ve elde edilen enerjinin yakıt hücrelerinde kullanımı için yüksek bir potansiyel sunmaktadır (Levin ve Chahine, 2010). Karanlık fermentasyon da öncelikli olarak anaerobik bakteri kullanır. Ayrıca karbonhidratça zengin substratlar üzerinde üreyen bazı alg türleri de kullanılabilir.

Biyokütlenin fermantatif prosesler için kullanıldığında biyolojik parçalanabilir olması, yüksek miktarlarda elde edilebilir olması, yüksek karbonhidrat içeriğine sahip olması ve pahalı olmaması gerekmektedir. Glikoz ve laktoz gibi basit şekerler kolaylıkla biyolojik parçalanmaya uğramasına rağmen pahalı ve yüksek miktarlarda kolaylıkla elde edilemezler. Biyohidrojen üretimi için kolaylıkla kullanılabilen başlıca biyokütle atıkları Çizelge 2.4'de verilmiştir (Holladay ve ark., 2009).

Çizelge 2.4. Biyohidrojen üretimide kolaylıkla kullanılabilen başlıca biyokütle atıkları

Biyokütle Materyali	Açıklamalar
Nişastalı tarımsal ve gıda endüstrisi atığı	Glikoz ve maltoza hidrolize olduktan sonra organik asitlere ve son olarak da hidrojene dönüşür.
Selülozlu tarımsal ve gıda endüstrisi atığı	Direk delignifikasyona gitmiş ve ince ince öğütülmüş olmalıdır. Daha sonra nişasta gibi işleme tabi tutulur.
Karbonhidratça zengin endüstriyel atık	Besin dengesi ve istenilmeyenlerin giderimi için ön arıtım gerekebilir. daha sonra nişasta olarak işlenir.
Atıksu arıtım ünitelerinden elde edilen atık çamur	Ön arıtım gerekebilir, organik asitlere dönüşür ve son olarak da hidrojene dönüşür.

Anaerobik fermentasyonda üretilen gaz H_2, CO_2, CH_4, CO ve bazı hidrojen sülfitlerin karışımıdır. Bu nedenle hidrojeni yüksek saflıkta elde etmek için ayırma aşaması olması gerekir. Karanlık fermentasyon prosesleri için hidrojenin kısmi basıncı

etkili bir faktördür ve hidrojen basınıcını arttırken hidrojen üretimini azaltır. Fermentasyon prosesi asetik asit, bütirik asit ve daha önemli bir problem olan diğer organik asitleri üretir. Bu organik asitler metabolik akışı yönlendirerek hidrojen verimini baskılayabilir ve bu asitlerin oluşumu aynı zamanda sistemdeki komplekslik ve maliyete ek olarak daha sonrasında atıksu arıtımını gerektirir. Bu işlemlerden herhangi birinin hidrojen üretimini arttırmak ve prosesi basitleştirmek için yok edilmesi gerekebilir (Holladay ve ark., 2009).

Mikroalglere ilave olarak karbonhidratça zengin substratların kullanılması ile anaerobik bakterilerin fermentasyonu ile 30-80^{o}C'de hidrojen üretebilir. Biyofotoliz prosesinde sadece saf hidrojen üretilirken karanlık fermantasyonda ise tam aksine çoğunlukla kullanılan substrat ve reaksiyon prosesine bağlı olarak CH_4 ya da H_2S gibi diğer gazlar ile birleşen H_2 ve CO_2 üretilmektedir (Manish ve ark., 2008). Karanlık fermentasyon ile hidrojen üretim teknolojisi ticari olarak değer kazanmıştır. Çünkü bu hidrojen üretim teknolojisi çok fazla alan gerektirmez ve hava koşullarından etkilenmez (Ni ve ark., 2006).

2.3.2.4. Fotofermentasyon ile hidrojen gazı üretimi

Bazı foto heterotrofik bakteriler organik asitlerden anaerobik koşullarda ve ışık varlığında H_2 ile CO_2 üretebilmektedir. Bu nedenle anaerobik fermentasyon sonucu oluşan organik asitlerden fotosentetik bakteriler yardımıyla hidrojen gazı üretilebilir.

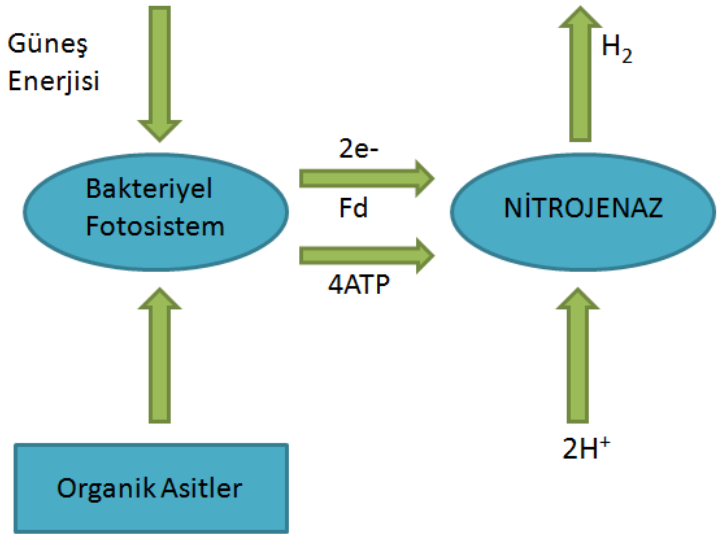
Bu kabiliyetteki foto- sentetik bakterilerden bazıları; *Rhodobacter spheroides* (Koku ve ark., 2003; Federov ve ark., 1998; Fascetti ve ark., 1995), *Rhodobacter capsulatus* (Shi ve ark., 2004), *Rhodovulum sulfidophilum* W-1S (Maeda ve ark., 2003) ve *Rhodopseudomonas palusutris* (Barbosa ve ark., 2001)'dir.

Fotosentetik mikroorganizmalar içerisinde mor kükürtsüz (PNS) bakteriler en iyi miktarlarda hidrojen ürettir (Melnicki ve ark., 2008). PNS bakteriler geniş metabolik aktiviteye (Aerobik, anaerobik, fotosentetik veya fermentatif üreme biçimleri gösterebilir) sahiplerdir (Kars, 2008; Joshi, 1996; Qian, 1996; Oelze, 1996; Wang, 1993). Biyohidrojen üretiminde yaygın olarak kullanılan PNS bakterilerden bazıları *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* ve *Rhodobacter* cinsi bakterilerdir. Bunların içinden ise hidrojen üretiminde yaygın olarak kullanılan bakteri *Rhodobacter sphaeroides*'dir.

Fotosentetik bakterilerde hidrojen gazı oluşumunu katalizleyen enzim nitrojenazdır (Kapdan ve Kargı, 2006). Bu enzimin aktivitesi oksijen, azot ve yüksek

N/C oranlarında inhibe olmaktadır (Koku ve ark., 2003). Protein, albumin, glutamat, maya özü gibi maddelerin azot kaynağı olarak kullanılması hidrojen gazı üretimini arttırırken amonyum tuzlarının kullanımında daha düşük hidrojen gazı üretimin olduğu gözlenmiştir (Oh ve ark., 2004).

Moleküler hidrojen üreten fotosentetik mikroorganizma güneş enerjisi varlığında indirgenmiş bileşikleri (organik asitleri), azotun sınırlı olduğu şartlar altında kullanarak nitrojenaz ile hidrojen üretir. Bu mikroorganizmalar elektron vericisi olarak asetik asit gibi basit organik asitleri kullanabilirler. Elektronlar, ATP formunda enerji kullanan ferredoksin ile nitrojenaza taşınır. Azot mevcut olmadığı zaman, nitrojenaz enzimi protonu hidrojene indirgeyebilir. Fotosentetik bakteriler nitrogenaz aktivitesi ile hidrojen üretme kapasitesine sahip olup güneş enerjisi ve organik asit ya da biyokütle kullanarak hidrojen üretimini gerçekleştirir. Foto fermentasyon prosesi Şekil 2.4'de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.4. Fotofermentasyon (Şentürk ve Büyükgüngör, 2010)

Mor kükürtsüz bakteriler fotofermantasyonla hidrojeni üretmek için nitrojenaz aktivitesine ihtiyaç duyar. Nitrojenaz enzimi, atmosferik azotun amonyağa dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Bu proseste ışığı toplayan pigmentler klorofil, karotenoidler ve fikobilin'ler ışık enerjisini ayırırlar. Güneş ışığı suyu proton, elektron ve oksijene dönüştürür. Nitrojenaz enzimi amonyak, hidrojen ve ADP oluşturmak için ATP ve azot ile proton ve elektronları tepkimeye sokmak için kullanılır (Sorensen, 2005).

Bu prosesin avantajları olduğu kadar dezavantajlarıda vardır. Avantajları; oksijen prosesi inhibe etmez ve bu bakteri çok farklı koşullarda (kesikli prosesler ve sürekli kültürler, agar jel, gözenekli cam, aktive edilmiş cam ya da poliüretan köpük içinde immobilizasyon) kullanılabilir (Levin ve ark., 2004; Kovács ve ark., 2006; Kapdan ve Kargı, 2006). Dezavantajları; nitrojenaz enziminin yavaşlatıcı olması, organik asitlerin sınırlı kullanılabilirliliği, prosesin nispeten yüksek miktarda enerji gerektirmesi ve hidrojenin tekrar oksidasyonunun gerekiyor olmasıdır. Nitrojenaz enerji ihtiyacını azaltmak ve aktivitesini artırmak için C/N oranı korunmalıdır.

Fotosentetik mikroorganizma, anaerobik ortamda ışığa bağımlı elektron taşınım işlemi ile organik bileşiklerden hidrojen üretir. Fotosentetik bakterinin optimum gelişme sıcaklığı 30-35^{o}C aralığı ve pH'ı 7,0 dır (Kapdan ve Kargı, 2006). Fotosentetik bakterinin kullanımındaki avantaj, bu organizmaların çok yönlü metabolik aktivitesine sahip olması ve böylece H_2 üretiminin O_2 ile engellenmesinin önüne geçilmesidir. Bu bakterilerin fotosentezi yürütebilmesi için organik veya inorganik elektron kaynağına ihtiyacı vardır. Pek çok organik atığın kullanımı bu konuda uygun bulunmuştur (Das ve Veziroğlu, 2008).

Hidrojen üretimi için son yıllarda endüstriyel ve tarımsal atıkların etkili bir şekilde yönetimi ile ilgili bazı incelemeler yapılmıştır. Hidrojen çeşitli tipteki biyokütle atıklarının fotofermantasyonu ile üretilebilir ve bu durum Çizelge 2.5'de özetlenmiştir (Ni ve ark., 2006).

Çizelge 2.5. Foto fermentasyon ile hidrojen üretimi üzerine örnek çalışmalar

Biyokütle Tipi	Bakteri sistemi	Hidrojen Dönüşüm Verimliliği	Referans
Laktik asit	İmmobilize edilmiş *Rhodobacter sphaeroides*	0.21 mL H_2 h^{-1} mL^{-1} PU matris	Fedorov ve ark., 1998
Laktat hammadde	*Rhodobacter capsulatus*	80 mL H_2 h^{-1} I^{-1}	Tsygankov ve ark., 1998
Atıksu	İmmobilize edilmiş *Rhodobacter sphaeroides*	2.1 I H_2 h^{-1} m^2 agar jel	Zhu ve ark., 1999
Şeker rafineri atıksuyu	*Rhodobacter sphaeroides* O.U.001	0.005 I H_2/h/I kültür	Yetiş ve ark., 2000.

Aynı zamanda foto fermentasyon üç temel dezavantaja sahiptir:

1) Yüksek enerjili nitrojenaz enziminin kullanımını gerektirir.

2) Güneş enerjisi dönüşüm verimliliği düşüktür.

3) Geniş alanları kaplayacak anaerobik foto biyoreaktörlerin hazırlanması gerekir (Ni ve ark., 2006).

2.3.2.4.1. Fotofermantasyonla hidrojen gazı üretimine substrat tipinin etkisi

Hidrojen gazı üretiminde fotosentetik bakteri ile endüstriyel atıksular kullanılabilmesine rağmen bu kültürler karbon kaynağı olarak organik asitleri tercih eder. Endüstriyel atıklardan hidrojen gazı üretiminde en önemli problemlerden biri ışığın geçirgenliğini azaltan atıksuyun rengidir. Fotobiyoreaktörün tasarımı, uygun ışık kullanımı ve ışığın geçirgenliği, yüksek hidrojen üretim verimi için esastır. Yüksek amonyak derişimlerinin nitrojenaz enzimini engellemesi ile hidrojen verimliliğini azaltması da diğer bir problemdir. Endüstriyel atıklardaki yüksek organik madde içeriği (KOD) ve bazı zehirli bileşikler (ağır metaller, fenoller ve PAH), hidrojen üretiminden önce ön arıtım ile giderilmelidir (Kapdan ve Kargı, 2006).

Fotofermentasyon performansı mikrobiyal kültürün tipine ve karbon kaynağına olduğu kadar ışık yoğunluğuna da bağlı olarak değişir. Işık yoğunluğunun artması, hidrojen verimi ve üretim hızı üzerinde pozitif etki etki yaratır, fakat ışık dönüşüm verimi üzerine ters etkiye sahiptir (Nath ve Das, 2009).

Obeid ve ark. (2009)'ı tarafından yapılan çalısmada *Rhodobacter capsulatus* ile fotofermentasyon ile hidrojen üretiminde ışık yoğunluğunun etkisi incelenmiştir (Obeid,2009). Karbon ve hidrojen kaynağı olarak laktatın kullanıldığı çalısmada ışık yoğunluğunun artısı ile hidrojen üretim hızının arttığı görülmüştür. 50000 lux'de hidrojen üretim hızı, 6000 lux'de elde edilenden 6 kat yüksek olmuştur. Ayrıca ışık yoğunluğunun artışı biyokütle üretimini de artırmıştır. Işık yoğunluğunun 6000 lux'den 50000 lux'e çıkması biyokütle üretimini ifade eden protein derişimini 3,1g/L'den 4 g/L'ye artırmıştır.

Hidrojen veriminde bakteri türü olduğu kadar tüketilen organik asitte etkilidir. Fotobiyoreaktörde 30-33^{o}C'de, 150-200W/m^{2} ışık yoğunluğunda ve pH 6.7'de mikrobiyal hidrojen üretiminin belirlenmesinde substrat dönüşüm verimliliği değerlendirilmiştir. Substrat dönüşüm verimliliği büyüme veya alternatif biyosentezden daha ziyade hidrojen üretimi için kullanılan substratın ne oranda olduğudur. En yüksek substrat dönüşüm verimliliği ve hidrojen üretim hızı, en kısa lag süresinde (ekimden sonra gaz üretiminin başlaması arasında geçen süre) ve en yüksek hidrojen miktarı log fazında elde edimiştir. Ayrıca hidrojen miktarı malat içeren ortamdan elde edilmiştir. Bütirat içeren ise en düşük miktarda kalmıştır. Bunun sebebi ise bütiratın poli-β-

hidroksibütirat (PHB) maddesine kolay dönüşüm olasılığı ile açıklanmıştır. PHB üretimi, fotohidrojen üretimi ile rekabet eder; bu rekabetin sebebi ise PHB üretimi ve hidrojen üretiminde organik asitlerin metabolizmasından oluşan aynı indirgeyici gücün kullanılmasıdır. Substrat karışımının fotofermentasyonu sırasında substrat dönüşümü ve hidrojen üretiminin daha yüksek mikarda olduğu belirlenmiştir (Nath ve Das, 2009).

Ön arıtılmış şeker rafinerisi atıksuyundan (SRWW) *R.sphaeroides* O.U.001 tarafından fotofermentasyon ile biyoreaktörlerde hidrojen üretilmiştir (Yetiş ve ark., 2000). SRWW %20 oranında sulandırılıp 32ºC'de hidrojen üretim oranı 3,8 mL/L.saat olarak belirlenmiştir. Malik asitin (20 g/L) SRWW içerisine eklenmesi ile üretim oranını saatte 5 mL/L' ye artırmıştır (Kapdan ve Kargı, 2006).

2.3.2.5. Biyolojik yoldan suyun gaza dönüşümü (WGS)

Bazı fotoheterotrofik bakteriler (*Rhodospirillum rubrum* gibi) CO oksitlenmesi ve H^+'nın H_2'ye indirgenmesi reaksiyonlarını birleştirir ve ATP üretmek için tek karbon kaynağı olarak CO kullanılır. Böylece karanlıkta hayatta kalabilir.

$$CO + H_2O \leftrightarrow CO_2 + H_2 \quad \Delta G^o = -20.1 \text{ kJ/mol} \qquad \textbf{(2.6)}$$

Hidrojen üretiminde bu prosesin tercih edilmesinin sebebi reaksiyon sonucunda CO_2 ve H_2 açığa çıkmasıdır. Bu proses için yetiştirilen organizmalar *Carboxydothermus hydrogenoformans* gibi gram pozitif bakteri ve *R. rubrum* ve *Rubrivax gelatinosus* gibi gram negatif bakteridir (Soboh ve ark., 2002). Anaerobik ortamda CO, birkaç proteinin (CO dehidrojenaz, Fe-S protein ve CO'e-toleranslı hidrojenaz) sentezinde görev alır. CO oksidasyonundan üretilen elektronlar hidrojen üretimi için hidrojenazla Fe-S proteini aracılığı ile transfer edilir (Ensign ve Ludden, 1991). Hidrojen üretimi için biyolojik yolla suyun gaza dönüşüm reaksiyonu hala laboratuar ölçeklidir ve bu konuda sadece birkaç çalışma vardır. Bu çalışmalarda ortak hedef hidrojen üretim oranını değerlendirmek ve yüksek CO alımına sahip olan uygun mikroorganizmaları tanımlamaktır (Ni ve ark., 2006). *Rhodospirllacae* ailesinden bazı fotoheterotrofik bakterilerin sadece CO üzerinden beslenerek karanlıkta üreyebildiği bulunmuştur. WGS reaksiyonu sonucunda CO'in CO_2'e oksidasyonunun gerçekleştiği belirlenmiştir. Fakat prosesi katalize etmek için metalden daha çok enzimler kullanılmıştır. Düşük sıcaklık ve basınçta meydana geldiği için termodinamik olarak CO'in CO_2 ve H_2'ye yüksek oranda dönüşümü tercih edilir. Bu prosesle hidrojene dönüşüm oranı diğer biyolojik

prosesler ile karşılaştırıldığında gerçekten yüksektir. Önemli biyohidrojen üretim prosesleri Çizelge 2.6'da avantajları, Çizelge 2.7'de ise dezavantajları karşılaştırılmıştır (Nath ve Das, 2004).

Çizelge 2.6. Biyolojik hidrojen üretim proseslerinin avantajların karşılaştırılması

Proses	Mikroorganizma Tipi	Avantaj
Direk Biyofotoliz	Yeşil alg	Su ve güneş ışığından direk olarak H_2 üretebilir. Solar dönüşüm enerjisi ağaçlar ve küçük bitkilere nazaran 10 kata kadar artar.
Dolaylı Biyofotoliz	Siyanobakteri	Sudan H_2 üretebilir. Atmosferden gelen N_2'yi sabitleme yeteneğine sahiptir.
Foto fermentasyon	Fotosentetik bakteri	Geniş spektrumlu ışık enerjisi bu bakteri tarafından kullanılabilir. Damıtılmış atıksu, atık vb. gibi farklı atık materyaller kullanılabilir.
Karanlık fermentasyon	Fermantatif bakteri	Işık olmaksızın büyün gün boyunca H_2 üretebilir. Çeşitli karbon kaynakları substrat olarak kullaılabilir. Yan ürün olarak bütirik, laktik asit ve asetik asit gibi değerli metabolitler üretir. Anaerobik prosestir, bu yüzden O_2 kısıtlayıcı değildir.

Çizelge 2.7. Biyolojik hidrojen üretim proseslerinin dezavantajların karşılaştırılması

Proses	Mikroorganizma Tipi	Dezavantaj
Direk Biyofotoliz	Yeşil alg	Yüksek ışık yoğunluğu gerekir. O_2 sistem için tehlike olabilir.
Dolaylı Biyofotoliz	Siyanobakteri	Daha düşük fotokimyasal verimlilik olabilir. Hidrojenaz enziminin alımı H_2'nin degredasyonunu durdurmak için kaldırılmalıdır. Gaz karışımı içinde yaklaşık %30 O_2 bulunur. O_2 nitrojenaz üzerinde sınırlayıcı bir etkiye sahiptir.
Foto fermentasyon	Fotosentetik bakteri	Işık dönüşüm verimliliği çok düşüktür. O_2 hidrojenazın kuvvetli bir sınırlayıcısıdır.
Karanlık fermentasyon	Fermantatif bakteri	Elde edilebilir H_2 verimi nispeten düşüktür. Verim arttırdığı için H_2 fermentasyonu termodinamik olarak tercih edilmez olur. Gaz karışım ürünü ayrılmak zorunda olan CO_2 içerir.

2.3.3. Biyohidrojen eldesinde kullanılan atık materyaller

Biyolojik hidrojen üretimi hidrojen gazı üretimi için iyi bir alternatiftir. Atıkları minimize etme sorunları ve sürdürülebilir gelişime uygun olarak, yenilenebilir kaynaklardan biyohidrojen üretimi son yıllarda oldukça ilgi görmektedir ve yeşil teknoloji olarak bilinir.

Fosil yakıtların yerine geçecek şekilde artan enerji ihtiyacını karşılamak için yeni ve umut verici yaklaşım olarak biyolojik hidrojen üretimi ile hem atık materyal kullanımı hem de temiz enerji kaynağının üretimi sağlanmış olur (Kapdan ve Kargı, 2006).

Biyolojik hidrojen üretimi amacıyla çeşitli biyokütle yakıtları kullanılabilmektedir. Bu kaynakları dört genel kategoride inceleyebiliriz:

Enerji ürünleri: Otsu enerji ürünleri, ağaçsı enerji ürünleri, endüstriyel ürünler, tarımsal ürünler ve sucul ürünler,

Tarımsal kalıntılar ve atık: Ekin atığı ve hayvan atığı,

Orman atığı ve kalıntıları: Öğütülmüş ağaçsı atık, tomruk kalıntıları, ağaçlar ve çalı kalıntıları,

Endüstriyel ve kentsel atıklar: Kentsel katı atık (MSW), atık çamur ve endüstriyel atıklardır (Ni ve ark., 2006).

Dünya üzerinde yaklaşık olarak 2 milyar ton biyokütle vardır ve bu oran her yıl 0,2 milyar ton artmaktadır. Yıllık biyokütle üretimi, dünyadaki yıllık enerji tüketiminin yaklaşık olarak 10 katına denk gelir. Biyokütle enerji üretimi için, özellikle de hidrojen üretimi, substrat olarak kullanılabilir (Miyake, 2001).

2.3.3.1. Atık materyalin tipi

Seçilecek ham maddenin kolay elde edilebilir, ucuz, karbonhidratça zengin ve ayrıştırılabilir nitelikte olmasıdır. Hidrojen gazı üretiminde glukoz, sakkoroz, laktoz gibi ayrıştırılması kolay şekerlerin kullanımı arzu edilir. Ancak saf karbonhidratların ham madde olarak kullanılması maliyeti arttırır. Bu nedenle hidrojen gazı üretiminde nişasta içeriği zengin zirai atıkların kullanılması önemli avantajlar sağlamaktadır (Argun, 2007).

2.3.3.1.1. Katı atıkların değerlendirilmesi

Günümüzde birçok atık materyalin önemi giderek artmaktadır. Tarımsal ürün atıkları, orman ürünleri endüstri artıkları, orman artıkları ve şehir artıklarının biyobenzin gibi taşımacılık ve diğer sektörlerde kullanılabilir enerjiye dönüştürülmesi hem ekonomik gelişme, hem de çevre kirliliğinin önlenmesi açısından çok önemli bir konudur (Potts, 1998).

Bu konuya ülkemizde gereken önem verilmemiştir. Dünyadaki mevcut enerji ağının bir asırdan fazla süredir fosil yakıtlara özellikle de petrole bağlı olarak

geliştirilmesi ve bu enerji sisteminin olumsuz etkilerinin küresel ısınma, iklim değişiklikleri ve dünyadaki mevcut dengenin bozulması şeklinde ortaya çıkması çevre dostu alternatif enerji kaynaklarını gündeme getirmiştir.

2.3.3.1.2. Sıvı yakıtların sürdürülebilir üretimi ve organik kimyasallar

Dünyada üretilen petrolün büyük çoğunluğu yakılarak değerlendirilmekte olup yakma neticesinde ortaya çıkan zararlı atıklar küresel ısınmaya ve iklim değişiklerine sebep olmaktadır. Petrolün yakma yerine petrokimya sanayinde kullanılması hem bu zaralı etkilerin azalmasını hem de daha yaralı çevre dostu mamul maddelerin üretilmesini sağlayacaktır. Taşımacılık sektöründe kullanılan yakıtların yaklaşık % 97'si petrolden ve organik kimyasalların çoğunluğu petrol ve diğer fosil kaynaklardan elde edilmektedir (Anonymous, 1998). Taşımacılık sektörünün % 97 oranında petrole bağımlı olması petrol yerine teknik ve ekonomik açıdan uygun olan yakıtın bulunması konusunda zorlukları göstermektedir.

Bununla birlikte sürdürülebilir kaynaklardan sadece biyokütle, insan ve hayvan beslenmesi yanında sıvı yakıtlara ve kimyasal maddelere kolaylıkla dönüştürülebilir (Wyman, 1999). Teknik ve ekonomik açıdan bu şekildeki bir uygunluk, enerji ihtiyacını karşılamak içi biyokütleden biyobenzin ve kimyasal ürünleri elde etmenin önemini ortaya koymaktadır.

Diğer taraftan biyobenzin üretiminde ortaya çıkan yan ürünler elektrik ve ısı enerjisine dönüştürülebilmesine rağmen bu ihtiyaçlar diğer sürdürülebilir teknolojilerle (rüzgâr, güneş, jeotermal, nükleer ve fotovoltaj teknolojiler) karşılanabilir ve biyobenzin yan ürünlerinin diğer kullanımlarla (hayvan yemi, kompozit malzeme, kâğıt hamuru ve kağıt gibi) rekabeti önlenir. Ayrıca biyokütleden elde edilen ürünlerin çevre dostu olması ve canlı sağlığı açısından tehdit oluşturmaması diğer bir önemli özelliğidir (Wyman, 1999).

2.4. Şeker pancarı

Şeker üretiminde kullanılan şeker pancarı (*Beta vulgaris var. saccharifera)* iki yıllık, yazlık bir sanayi bitkisidir. Şeker endüstrisinin hammaddesi olan şeker, şeker pancarının kök ve gövdesinden elde edilir. Şeker pancarının işlenmesi esnasında melas ve küspe gibi değerli yan ürünler elde edilir. İşlenen şeker pancarının yüksek kalite elde edilebilmesi için şeker varlığının yüksek, melas oluşturucu maddelerin ise düşük olması

gerekir. Küspe (posa) besleyici bir hayvan yemidir. Melas ise kimya, alkol ve maya sanayinde kıymetli bir hammaddedir (pankobirlik.com).

2.4.1. Melas

Şeker üretim işlemlerinde son şeker santrifüjlerinden çıkan şurup melastır. Melas, koyu kahverenkli ve çok ağdalı, pekmez görünümünde bir maddedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Şeker pancarından melas

Bu madde, yaklaşık olarak % 48-50 oranında şeker, % 30 oranında şeker dışı maddeler ve % 20 oranında da su kapsar ve kapsadığı bu yüksek orandaki şeker nedeniyle çok aranılan ve tüketilen değerli bir hammaddedir (amasyaseker.com.tr).

Ayrıca organik ve inorganik maddeler açısından zengin bir karışımdır. Bileşiminde çeşitli miktarlarda değişik vitaminler de ihtiva etmektedir. Bu özellikleri nedeniyle bazı sanayi kollarının ana ham maddesi durumundadır. Melas ülkemizde başlıca maya üretimi, yem sanayi, alkol üretimi, vs. gibi alanlarda kullanılmaktadır (pankobirlik.com).

Biyorafineri anlayışına göre şeker pancarı melas substrat olarak kullanılarak hidrojen üretimi gerçekleşirken aynı zamanda yüksek katma değerli yan ürün olan 5-ALA üretimide gerçekleştirilir.

2.5. 5-Aminolevulinik asit (5-ALA)

Tıp, tarım ve biyoteknolojide birçok uygulama alanı olan 5-aminolevulinik asit ve biyohidrojen biyorafineri anlayışı ile uygun maliyetli substrat kullanılarak üretilebilir. 5-Aminolevulinik asit (5-ALA), porfirin, B12 vitamini ve klorofil gibi tetrapirollerin biyosentezinde öncü madde olarak kullanılmaktadır (Tangprasittipap, 2007; Beale, 2006; Sasaki, 2002). 5-Aminolevülinik asit (ALA) ya da 5-amino-4-

pentanoik asit fotodinamik bir etkiye sahiptir. Herbisit, böcek ilacı olarak kullanılmaktadır. Bitkiler için zararsızdır. Ayrıca sebzelerin büyümesini teşvik edici etkiye sahiptir (Sasikala ve ark., 1993). Şuan ise daha ileri uygulamaları ilaç ve eczacılık üretiminde kullanılmaktadır (Levy, 1995).

5-ALA genelde kimyasal yollarla sentezlenmektedir. Fakat 5-ALA' nın kimyasal sentezi birçok karmaşık basamakları içermektedir. Ayrıca yüksek maliyet ve düşük verimle gerçekleşmektedir. Ancak yüksek katma değerli ürün olan ALA'nın sentezi bazı fotosentetik bakterilerle *R. sphaeroides* gibi daha düşük maliyetle gerçekleştirilebilinir (Sasaki, 2005). Bu bakteriler ürettikleri ALA'yı hücre dışına salgıladıkları için ürünün toplanması veya hasadında hem maliyeti düşürerek hem de kolaylık sağlayarak avantaj sağlamaktadır (Tangprasittipap, 2002). Ayıca ALA'nın hücre dışına salgılanması, besiyerinde ALA miktarının spektrofotometreyle ölçülmesini mümkün kılar (Chaikritsadakarn ve ark., 2004). *R. sphaeroides* gibi diğer mor kükürtsüz bakterilerde genom dizi analizi yapılmış ve genler tanımlanmıştır. Bu nedenlede *R. Sphaeroides* biyoteknolojik ürünlerin üretilmesinde doğrudan ve konak olarak kullanılmaktadır. *R.sphaeroides* genomu; 2 yuvarlak kromozom ve 5 tane büyük plazmitten oluşmaktadır. Bu kromozomlar, kromozom I (2973 kb) ile kromozom II (911 kb)'dir. Plazmitler ise; pRS241a (113.6 kb), pRS241b (104 kb), pRS241c (100 kb), pRS241d (99 kb), pRS241e (42 kb)'dir (Mackenzie, 2001).

Biyohidrojen üretim çalışmalarında da *R. sphaeroides* ile farklı organik asitleri de kullanarak önemli miktarlarda hidrojen üretmektedir (Kars, 2010; Yetiş, 2000; Uyar, 2009; Eroğlu, 2004). Aynı zamanda Çizelge 2.8'de de görüldüğü gibi araştırmalara göre en çok ALA üreten bakteri *Rhodobacter sphaeroides(*27.5 mM) ve *E.coli* (20 mM) olmuştur.

Çizelge 2.8. Farklı bakteri grupları tarafından üretilen ALA miktarları (Sasaki, 2002)

Grup	C ve N Kaynağı	ALA (µM)
Anoksijenik Fotosentetik Bakteri		
Chlorobium limicola	Glutamat	3.95
Chloroflexus aurantiacus	Glutamat	0.58
Rhodopseudomonas palustris	Suksinat ve Glisin	0.75
Rhodobacter sphaeroides	Suksinat ve Glisin	2000
R. sphaeroides	Asetik, Propiyonik, Bütirik asit ve Glisin	4200
R. sphaeroides	Suksinat ve Glisin	16000
R. sphaeroides	Suksinat 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 Bakteri		
Anacystis nidulans	Glutamat	0.38
Anabaena variabilis	Glutamat	0.019
Algler		
Agmenellum quadruplicatum	Glutamat	0.225
Cyanidium caldarium	Glutamat	0.483
Chlorella vulgaris	CO2	1400
Chlorella sp.	Glukoz ve Glisin	2000
Chlorella regularis	Glukoz ve Glisin	3700
Aerobik Bakteriler		
Pseudomonas riboflavina	L-Alanin	200
Propionibacterium shermanii	Suksinat ve Glutamat	40
Escherichia coli	Suksinat ve Glisin	2250
E. coli	Suksinat ve Glisin	20000
Anaerobik Bakteriler		
Clostridium thermoaceticum	Glukoz ve L-Sistein	155
Methanosarcina barkeri	Metanol ve 2-oxoglutamat	0.40
Metanobacterium thermoautotrophicum	H_2 ve CO_2	0.20

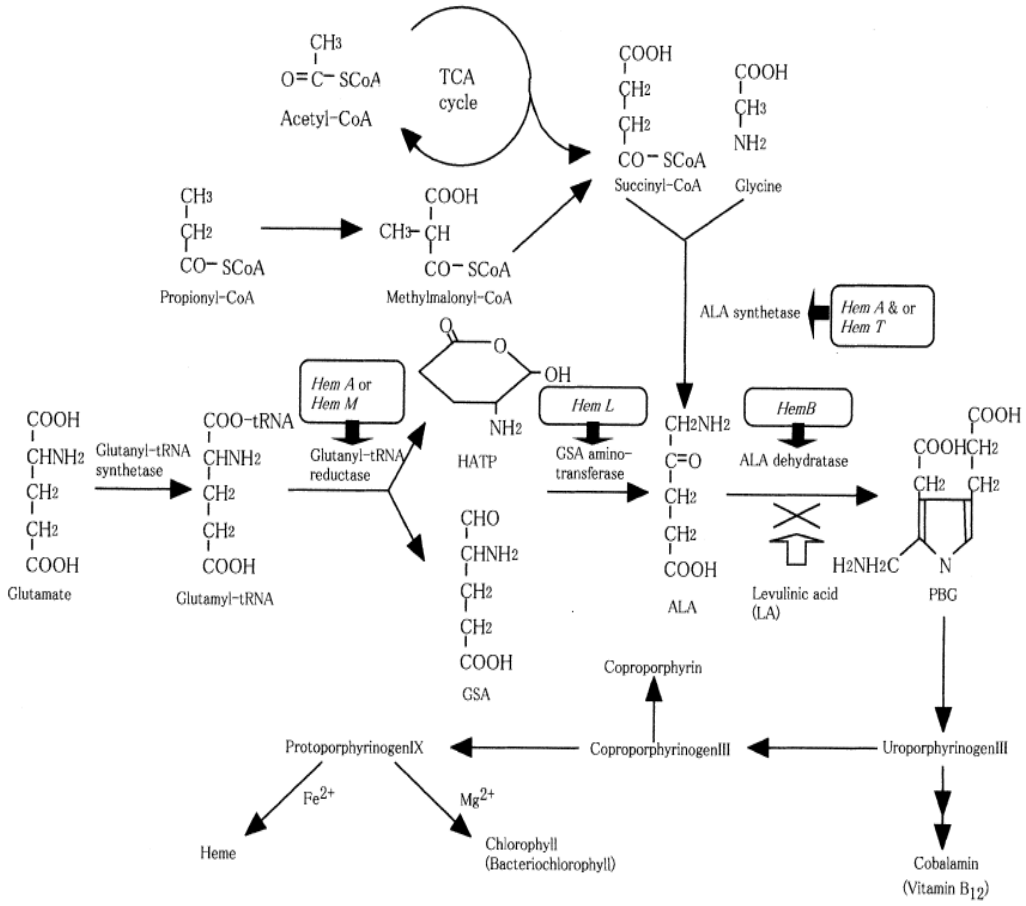
2.5.1. Aminolevülinik asit (5-ALA) biyosentezi

5-ALA, porfirin, B12 vitamini ve klorofil gibi tetrapirollerin biyosentezinde öncü madde olarak kullanılmaktadır (Tangprasittipap, 2007; Beale, 2006; Sasaki, 2002). ALA sentezinde glutamat karbon ve azot kaynağı olarak kullanılsada pek çok bakteri tarafından diğer substratlar da ALA sentezinde kullanılabilir.

Fotosentetik ve mor kükürtsüz bakteri olan *R.sphaeroides* fotosentetik koşullarda (ışık altında ve anaerobik koşullarda) karbon ve enerji kaynağı olarak glikoz, asetik, propiyonik ve bütirik gibi uçucu yağları kullanarak önemli miktarda ALA üretimi gerçekleştirir (Tangprasittipap, 2002). *R. sphaeroides* fotosentetik olmayan koşullarda ALA üretemezler. Süksinil CoA ve glisin kullanarak ALA üretimini sağlayan C-4 yolunun anahtar enzimi ALA sentaz enzimidir (Beale, 2006). Ayrıca *R.sphaeroides'*nin üreme ortamına glisin, süksinat ve levülinik asit (ALA dehidrataz inhibitörü) ilavesiyle ürettiği ALA miktarı artar. Ancak oksijen, ALA sentaz biyosentezini baskılayarak ALA üretimini negatif yönde etkiler. Bu nedenle en fazla ALA üretimi anaerobik koşullarda elde edilir (Tangprasittipap, 2002).

Canlılarda ALA biyosentezi iki farklı yolla gerçekleşmektedir. Bunlar; C-4 yolu ve C-5 yoludur.

C-4 yolu; süksinil-CoA ve glisin kullanılarak, C-5 yolu; glutamat kullanarak ALA'nın sentezlenmesi sağlanır (Sasaki, 2002). Bu iki yolda Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6. 5-ALA biyosentez yolu (Sasaki, 2002)

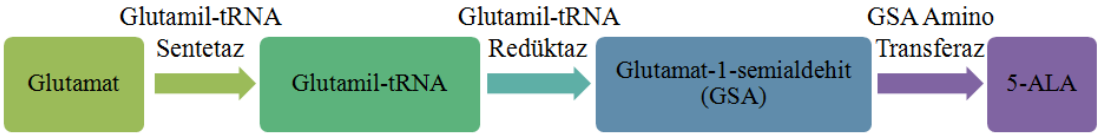
ALA'yı glisin ve süksinat kullanarak C-4 yolu ile üretenler; α-proteobakterilerle, plastid içermeyen maya, mantar ve hayvanlar gibi ökaryotlardır. Glutamat kullanarak ALA'yı C-5 yolu ile üretenler; α-proteobakateriler dışındaki birçok bakteri, bitkiler, algler ve arkealardır (Beale, 2006).

Şekil 2.7'da da gösterildiği gibi C-5 yolu ile glutamattan ALA sentezini sağlayan 3 enzim vardır. Bunlar glutamil-tRNA sentetaz, glutamil- tRNA redüktaz ve glutamat-1-semialdehit (GSA) amino transferaz enzimleridir. Ayrıca C-5 yolu kullanılarak ALA üretimi üç basmakta gerçekleşmektedir:

1) Glutamat,

2) Glutamil-tRNA ve

3) Glutamat-1-semialdehit (GSA) ile ALA üretimi gerçekleşir.



Şekil 2.7. C-5 yolağı ile ALA üretimi

C-4 yolu ile ALA'yı sentezleyen bazı bakteriler aynı zamanda C-5 yolunun sahip olduğu bazı enzimlerini de sentezleyebilmektedir. *Rhodobacter sphaeroides* ALA'yı C-4 yolu ile sentezleyebilmektedir. Ancak C-5 yolundaki bazı enzimlere de sahiptir. 1. Glutamil-tRNA sentetaz ve 3. GSA amino transferaz enzimlerine sahipken 2. Glutamil-tRNA redüktaz enzimi bulunmamaktadır. Bazı bakterilerde *E. coli, C.saccharolyticus, C. glutamicum* R gibi C-5 yolunun her üç enzimide mevcuttur. *E.coli* ise fotosenteik olmayan (aerobik ve ışıksız ortam) koşullarda 5-ALA'yı üretebilir. *E.coli* C-5 yolunun enzimleri bulunmasından dolayı ALA üretimide C-5 yolu ile gerçekleşmektedir. *E.coli*, ışıksız ve oksijenli ortamda ALA üretebilmektedir. Bu yüzden de bu enzim, karanlık ve oksijenli ortamda aktiftir. *E.coli*'de ALA sentezi için C-5 yolağının kullanıldığı radyoaktif işaretleme yöntemiyle de tespit edilmiştir (Li, 1989).

2.5.2. 5-Aminolevulinik asitin (5-ALA) uygulama alanları

ALA'nın tıp, tarım, biyoteknolojide çok farklı, önemli uygulama alanları mevcuttur ve katma değeri yüksek bir üründür.

Tarım alanında uygulama alanları biyobozunur herbisit, biyobozunur pestisit, tuza dayanıklılık, soğuğa dayanıklılık ve büyümeyi destekleyici faktörlerdir. Tıp alanında uygulama alanları ağır metal zehirlenmesi tanısı, beyin tümörün tanısı, kozmetik ve dermatolojik uygulama, kanser tedavisi ve romatoid artrid tedavisinde uygulanır. Biyoteknoloji alanında ise B12 vitamini üretiminde, bitki ve hayvan hücre kültürü ve porfirin üretiminde uygulanır (Sasaki, 2002).

ALA maliyet açısından ve süreçten dolayı ticari olarak kullanılamamaktadır. Fakat özgün, sürdürülebilir ve maliyet açısından ALA üretimi mümkündür.

Fazla miktarlarda ALA kullanıldığı zaman hücrede protoporfirin IX dönüşümü olmaktadır. Protoporfirin IX (PPIX) floresan özellikte bir maddedir. Protoporfirin IX (PPIX) ise belirli dalga boylarında ve ışık altında serbest oksijen radikalleri

oluşturmaktadır. Böylece hücreye zarar verir ve sonuç olarakta hücre apoptoz veya nekroz yoluyla ölmektedir (Sasaki, 2002; Tangprasittirap, 2002; Beale, 2006). ALA'nın etki mekanizması ve fotodinamik tedavi bu esasa dayanmaktadır.

Fotodinamik tedavi; malign hastalıkların tedavisinde kullanılır (Birol, 2009). Retinada bulunan sarı noktataki bozulmalarına, yaşa bağlı olarak dejanarasyon tedavisinde kullanılır.

Fotodinamik tedavi (PDT) ışığa duyarlı maddenin topikal ya da sistemik yolla uygulanmasından sonra ilgili bölgenin lazer ve lazer olmayan ışık kaynakları ile bir tür fotokemoterapidir (Dougherty, 1998). Işık kaynağı olarak laser ve inoherent ışık kaynakları kullanılmaktadır.

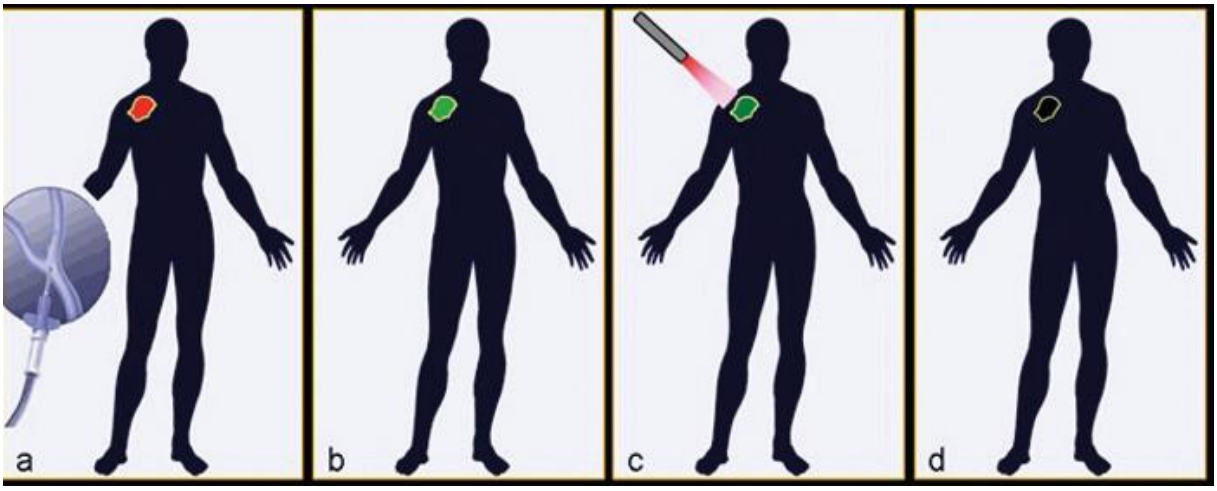
Hayvanlara ve çevreye zararsız olmasından ALA, herbisit ve pestisit olarak kullanma potansiyelini artırmıştır. Tuza ve soğuğa karşı dayanabilmeyi arttırıcı etkisi vardır.

Katma değeri yüksek ürünlerin bir biyosüreç ile üretilmesi sırasında göz önünde bulundurulması gereken konulardan biri uygun maliyetli (cost-effective) bir sürecin gerçekleştirilmesi ve ürün elde edilmesidir. Ancak bazı ürünler az miktarlarda ve düşük verimlilikle üretildiklerinde maliyet artmakta ve ürünün ticarileşmesi pek mümkün olmamaktadır. Son zamanlarda geliştirilen biyorafineri anlayışına göre katma değeri yüksek birkaç ürün aynı anda tek bir süreçle üretildiğinde maliyet etkin bir süreç geliştirilebilmektedir (Taylor, 2008; Hatti-Kaul, 2007; Kaparaju, 2009; www.biorefinery.nl). Substratın sürdürülebilirliği çok önemlidir. Biyorafineri konseptine uygun olarak düşük maliyetli ve sürdürülebilir bir substrat olan şeker pancarı melasından 5-aminolevulinik asit ile aynı zamanda hidrojen üretimi de gerçekleştirilebilir.

2.5.2.1. Kanser tedavisinde fotodinamik tedavi

Kanser hastalığın henüz tedavisi bulunamamıştır. Bazı genlerde normal hücreler farklılaşabilir aşırı bir şekilde kontrolsüzce çoğalabilir. Bu sürekli çoğalma, tümör adı verilen kitle oluşumuna neden olur. Vücuttaki tüm doku ve organlarda tümör meydana gelebilir. Tümörler benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olabilirler. Malign olan tümörlere kanser denir. Araştırmacılar artan kanser hastalığın tedavisini araştırmalarını arttırmıştır. Günümüzde kanser tedavisinde 3 ana yöntemi vardır. Bunlar; cerrahi girişim, kemoterapi ve radyoterapi yöntemleridir. Kanserli bir doku, ameliyatla alınabilir. Kemoterapi, normal hücrelere en az zararı vererek kanserli hücreleri öldüren

bir ilaç yöntemidir. Radyoterapi, ışınla (X-ışını, gamma ışını vb.) tedavi yöntemidir. Bu her üç yöntemde kanserin tekrarlanması olasılığı oldukça yüksektir. Fakat fotodinamik tedavi (PDT) yöntemi yan etkisi yok denecek kadar azdır. Bu tedavi yöntemi birçok ülkelerde sağlık kurumu tarafından kanser tedavisi yönteminde onaylanmıştır. 1980'lerin başında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (US-FDA) hematoporphyrin (HpD) türevi olan Photofrin (PH) isimli ilacın kanser tedavisinde kullanılmasına onay verilmiştir. PDT ilaçları belli bir dalga boyundaki ışığa duyarlıdırlar. Bu ilaçlar, normal hücreden çok tümörlü dokuda birikme ve korunabilme eğilimleri oldukça fazladır. PDT yönteminde kullanılan ışığın dalga boyu genellikle 600-900 nm'dir. PDT yöntemi uygulanması ışığa duyarlı ilacın hastaya damar yoluyla verilmesinin ardından bu ilacın tümörlü dokuda birikmesini ve belli dalga boyundaki ışık ile uyarılarak tümörü yok edilmesine dayanır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Fotodinamik terapide (PDT) hastaya damar yoluyla verilen (a) ışığa-duyarlı ilaç belli bir süre sonra tümörlü dokuda birikir (b). Daha sonra uygun dalga boyundaki ışıkla uyarılan ilaç (c), kanserli dokunun nekrozuna neden olur (d) (Bilim ve Teknik, 2009)

PDT uygulamalarında fototoksik etki sonucu hücre ölümü gerçekleşir. PDT yöntemi uygulanan dokunun çevresindeki dokuya zarar vermeden tümörlü bölgedeki hücrelerin ölmesine neden olur. PDT tümörlü bölgenin yok edilmesini sağlasa da, tamamen bu bölgenin kanserli hücrelerden arınmış olduğu söylenemez. Geride kalan birkaç hücre tekrar tümör oluşumuna neden olabilir. Kanserin PDT ile tedavisinden sonra, bu hücrelerin hayatta kalmalarını sağlayan proteinlerin etkinliği engellenerek tümörün tekrar oluşmasını önemli derecede azaltır (Bilim ve Teknik, 2009).

PDT, tedavi amaçlı kullanılmasından başka tanı amaçlıda kullanılmaktadır. Dermatolojideki uygulamalarında tümörlü bölgeye topikal olarak uygulanan 5-ALA

deride porphyrin oluşumuna neden olur. Porphyrince zengin tümör dokusu "Wood's light" adı verilen ışık 370-400 nm ile aydınlatılınca kiremit-kırmızı renginde floresan ışıma yapar. Tümörlü bölge sınırları renk farkı ile belirlenir. Aynı bölge kırmızı ışık ile tekrar ışıtıldığında ise tümörlü bölge tedavi edilir.

PDT'nin kanser tedavisindeki klinik uygulamalarına Amerika, Asya ve Avrupa'nın birçok ülkesinde onay verilmiştir ve onay verilmesiyle yeni ışığa duyarlılaştırıcı üretme arayışları hız kazanmıştır. Kanser tedavisinde 3 ana yöntem olan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahiye PDT yöntemi destek veya alternatif olabilecek bir tedavi yöntemidir (Bilim ve Teknik, 2009).

Ve böylece fotodinamik terapinin kolay uygulanabilir olması, kanser tedavisindeki olumlu sonuçları, yan etkilerin yok denecek kadar az olması, hastalarında memnuniyetiyle kanser tedavisinde uygulanan 3 ana yönteme destek veya alternatif olabilecek bir tedavi yöntemidir.

Fotodinamik tedavi; Dermatolojide malign hastalıkların tedavisinde kullanılır. Kolay ve düşük maliyetle ALA elde edilebilirse fotodinamik tedavinin maliyetide düşecektir. Tıp, tarım, biyoteknolojidede daha yaygın kullanılabilecektir.

Katma değeri yüksek ürünlerin bir biyosüreç ile üretilmesi sırasında göz önünde bulundurulması gereken konulardan biri uygun maliyetli (cost-effective) bir sürecin gerçekleştirilmesi ve ürün elde edilmesidir. Ancak bazı ürünler az miktarlarda ve düşük verimlilikle üretildiklerinde maliyet artmakta ve ürünün ticarileşmesi pek mümkün olmamaktadır. Son zamanlarda geliştirilen biyorafineri anlayışına göre katma değeri yüksek birkaç ürün aynı anda tek bir süreçle üretildiğinde maliyet etkin bir süreç geliştirilebilmektedir (Taylor, 2008; Hatti-Kaul, 2007; Kaparaju, 2009; www.biorefinery.nl/biopol).

Biyorafineri kavramı, sürdürülebilir bir süreçle biyokütleden çeşitli ürün ve enerji elde edilmesidir (Cherubini, 2010). Bu genellikle biyoyakıt ve katma değeri yüksek ürünler şeklinde yapılmaktadır. Substratın sürdürülebilirliği çok önemlidir. Biyorafineri anlayışına uygun olarak düşük maliyetli ve sürdürülebilir bir substrat olan şeker pancarı melasından 5-aminolevulinik asit ile aynı zamanda hidrojen üretimi de gerçekleştirilebilir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan mikroorganizma

Yabanil tip *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864) ile hidrojen ve 5-ALA üretimi için çalışılmıştır.

3.1.1. *Rhodobacter sphaeroides*'in genel üreme ortamı

Genel üreme ortamı Biebl ve Pfenning (BP) minimal besiyeridir. Bu besiyerinde karbon ve azot kaynağı olarak malat (15mM) ve glutamat (2mM) kullanılmaktadır (Biebl ve Pfenning, 1981). BP besiyeri Çizelge 3.1'de görüldüğü gibi kimyasallar sırasıyla tartılıp 500 mL distile suda çözdürüldü. Daha sonra bakteri için uygun olan pH aralığı NaOH ilavesi ile 6.9 - 7'ye ayarlandı. BP minimal besiyerine eklemek için eser element (20X), demir sülfat (2X) ve vitamin solüsyonu (20X) hazırlandı.

Çizelge 3.1. Biebl ve Pfenning (BP) minimal besiyeri (500mL) içeriği

İçerik	Gerekli olan miktarlar
KH_2PO_4	0.25 gr
$MgSO_4.7H_2O$	0.1 gr
Malik asit	1 gr
Glutamik asit	0.185 gr
NaCl	0.2 gr
$CaCl_2.\ 2H_2O$	0.025 gr

Eser element çözeltisi (20X)

Kimyasallar Çizelge 3.2'de gösterildiği gibi sırasıyla tartılıp 50 mL distile suda çözdürüldü. Böylece 20X'lik eser element solüsyonu hazır hale getirilmiş oldu.

Çizelge 3.2. 20 X'lik eser element çözeltisinin içeriği

İçerik	MW	Gerekli olan miktarlar
$ZnCl_2$	136.28 gr/mol	0.07 gr
$MnCl_2.\ 4H_2O$	197.91 gr/mol	0.1 gr
H_3BO_3	61.83 gr/mol	0.06 gr
$CoCl_2.\ 6H_2O$	129.84 gr/mol	0.2 gr
$CuCl_2.\ 2H_2O$	d: 2.51	0.02 gr
$NiCl_2.\ 6H_2O$	237.70 gr/mol	0.02 gr
$Na_2.\ MoO_4.\ 2H_2O$	241.95 gr/mol	0.04 gr
HCl (%37 v/v)	36.46 gr/mol	0.675 gr

Demir sülfat ($FeSO_4$) Çözeltisi (2X)

0.02 gr demir sülfat tartılıp 10 mL distile suda çözdürüldü. Böylece 2X'lik demir sülfat çözeltisi hazırlanmış oldu.

Vitamin çözeltisi (20X)

Kimyasallar Çizelge 3.3'de verilen miktarlara göre tartıldı. 50 mL distile suda çözüdürülerek 20X'lik vitamin çözeltisi hazırlanmış oldu.

Çizelge 3.3. Vitamin çözeltisinin (20X) içeriği

İçerik	MW	Gerekli olan miktarlar
Thiamine hydrochloride	337.27 gr/mol	0.5 gr
Nicotiric acid (Niocin)	123.1 gr/mol	0.5 gr
Biotin	244.31 gr/mol	0.15 gr

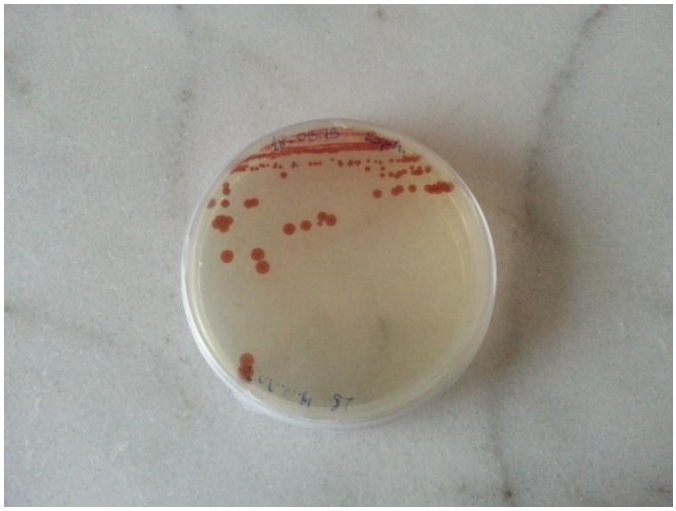
Hazırlanan BP minimal besiyeri, eser element çözeltisi ve demir sülfat çözeltisi 121^{o}C'de 20 dk otoklavlandı ve böylece sterilizasyonları sağlandı. Yüksek sıcaklıkta vitaminin yapısı bozulacağından, 20X'lik vitamin çözeltisi 0.45 µM şırınga filtreden geçirilerek steril edildi. Otoklavdan sonra BP besiyerine Çizelge 3.4'de belirtilen miktarlarda eser element, $FeSO_4$ çözeltisi eklendi. 30^{o}C'ye soğuması beklenildikten sonra vitamin çözeltisi de eklendi.

Çizelge 3.4. BP besiyerine eklenmesi gereken çözeltiler

Çözeltiler	Miktarları (mL/L)
Demir sülfat çözeltisi (2X)	1
Eser element çözeltisi (20X)	0.05
Vitamin çözeltisi (20X)	0.05

Ekim yapılmadan önce *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001'in aktifleştirilmesi için BP minimal katı besiyerinde üretildi. Bu amaçla, BP minimal besiyeri %1.5 agar ilavesi ile hazırlanıp otoklavlandıktan sonra sıcaklık 50^{o}C'ye düşünce eser element çözeltisi, demir sülfat çözeltisi ve vitamin çözeltisi eklendi. İyice karışması sağlanarak petri kaplarına döküldü ve katılaşması için beklenildi. Daha sonra katı BP minimal besiyerine stoklanmış *Rhodobacter sphaeroides*'den çizgi ekim yapıldı ve besiyerin kurumaması için petri kapların kenarları sıkıca parafilmlenip 29^{o}C'de inkübasyona bırakıldı. 3-4 gün inkübasyon sonrası katı BP besiyerinden sıvı besiyerine öze

yardımıyla ekim yapıldı. Şekil 3.1'de de *R.sphaeriodes*'in katı besiyerindeki görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.1. *Rhodobacter sphaeriodes*'in katı besiyerindeki görüntüsü

Sıvı besiyerindeki bakteri ışık altında (100 W'lık tungsten lamba) aerobik koşullarda, 29^{o}C'de 2-3 gün inkübasyona bırakıldı. Üretilen kültürden ise tekrar aynı koşullarda BP sıvı besiyerine %10 (v/v) olacak şekilde ekim yapıldı. Daha sonra hidrojen ve aminolevülinik asit üretimin olacağı melas besiyerine aktifleştirilen *R.sphaeroides* kültüründen %10 ekim yapıldı.

Ayrıca hidrojen ve 5-ALA üretimi için melas besiyerine ekim yapıldığında anaerobik koşulların sağlanması amacıyla, besiyerleri 1-3 dk saf argon gazından geçirildi. Bu işlem ortamdaki oksijenin, nitrojenaz enzimin aktivistesini inhibe etmemesi için gerçekleştirildi.

3.2. Hidrojen ve 5-Aminolevülinik asit üretiminde kullanılan substrat

Hidrojen ve 5-ALA üretiminde Konya şeker fabrikasından alınan şeker pancarından melas substrat olarak kullanıldı. Hayvan yemi olan melas koyu renkte, ağda görünümde ve yoğun kıvamda olduğu için direk besiyeri olarak kullanılamaz. Bazı ön işlemlerden geçirilmesi ve seyreltilmesi gerekmektedir. Ayrıca hidrojen ve ALA üretiminde substrat için önemli olan bazı analizlerin yapılması gerekmektedir. Melasın element içeriği, organik asit içeriği, amonyum miktarı, transmittans (ışık geçirgenliği) ve toplam fenol miktarı araştırıldı.

3.2.1. Ön işlemler

3.2.1.1. Melas konsantrasyonun ayarlanması

Melasın yoğunluğu (1.35 g/mL) düşünülerek stok melas çözeltisi hazırlandı. Melasta yaklaşık %48-50 (w/w) oranında şeker vardır (www.konyaseker.com). Melasın yoğunluğu ile 1 gr'da ki hacminin 0.741mL olduğu hesaplandı. Stok melasın hazırlanışı 5 gr melas temiz bir falkona tartıldı ve 5 mL distile su ile vorteks yardımıyla çözdürüldü. 8.500 rpm'de 10 dk santrifüjlendi ve başka bir temiz falkona süpernatant kısmı alınarak stok melas hazır hale getirildi. Böylece stok olarak hazırladığımız melasın konsantrasyonu 0.574 g/mL olarak belirlendi. Besiyerlerinde melastaki şeker miktarının oranına göre 5 farklı konsantrasyonda (2.5 gr şeker/L, 3.1 gr şeker/L, 3.76 gr şeker/L, 4.38 gr şeker/L ve 5 gr şeker/L) dublike olarak 60 mL'lik reaktörlerde hazırlandı.

Bakteri üremesi, hidrojen ve 5-ALA üretimi için melas besiyerinin uygunluğunu değerlendirmek amacıyla öncelikle gerekli analizler yapıldı. Melasta bulunan B, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Al, Ca, Mo, Na ve K elementlerinin analizleri Endüktif Eşleşmiş Plazma/Kütle Spektrometrisi (ICP-MS (Perkin Elmer Elan DRC-e), İLTEK) ile belirlendi. Molibden ve demir nitrojenaz enzim yapısında bulunduğu için miktarının bilinmesi önemlidir. Amonyum miktarı ise amonyum tespit kiti (Norateks markalı amonyum kiti) ile bulunmuştur. Amonyumun nitrojenaz enzim aktivitesini baskıladığı bilindiği için melastaki miktarının belirlenmesi oldukça önemlidir. Hidrojen gazı, içi distile su ile dolu cam tüplerde toplanarak Gaz Kormotografisi (GC) ile belirlendi.

3.2.1.2. Element analizi

Melasta bulunan B, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Al, Ca, Mo, Na ve K elementlerin analizi Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometrisi (ICP-MS (Perkin Elmer Elan DRC-e), İLTEK) ile belirlendi. Nitrojenaz enzim yapısında molibden ve demir bulunduğu için melastaki miktarlarının bilinmesi oldukça önemlidir.

3.2.1.3. Melas besiyerinde bulunan organik asit bileşimi

Melas besiyerinde bulunan 9 farklı organik asitlerin (asetik asit, laktik asit, bütirik asit, formik asit, propiyonik asit, malik asit, sitrik asit, fumarik asit ve süksinik asit) miktarları yüksek performanslı sıvı kromotografisi (HPLC, Shimadzu Sınıf-Vp 10A, Japonya) ile tespit edildi. 214 nm'de UV dedektörü ve Shimadzu Sınıf-Vp 10A

HPLC kolonu ACE C18 (250mm 4.6 mm, 5 mm) kullanılarak analizler yapıldı. Fırın sıcaklığı 30^{o}C'e ayarlandı ve mobil faz olarak, 0.2 M KH_2PO_4 0.8 mL/dk'lık bir akış oranı ile organik asitlerin miktarları belirlendi. Şeker pancarı melasında yüksek miktarda şeker olmasının yanı sıra, içerisinde organik asitlerin de bulunması *Rhodobacter sphaeriodes* için oldukça önemlidir. Maliyet açısından düşünüldüğünde fotofermantasyonda substrat olarak organik asitlerin ve saf şekerlerin bulunduğu besiyerler ile çalışılması uygundur (Fırat, 2009).

3.2.1.4. Melas besiyeri için belirlenen konsantrasyonların transmittans ölçümleri

Tranmittans ölçümü için, belirlenen konsantrasyonlarla (2.5 gr/L, 3.1 gr/L, 3.76 gr/L, 4.38 gr/L ve 5 gr/L) toplam hacim 3 mL olacak şekilde melas besiyeri hazırlandı. Hazırlanan melas besiyerlerinden 2 mL alınarak doğrudan kuartz küvetlere (10mm) aktarıldı. Referans olarak 2 mL distile su kullanıldı. Transmittans ölçümü UV spektrofotometrede 522 nm, 800 nm ve 860 nm dalga boylarında gerçekleştirildi. Fotosentetik bakteriler geniş dalga boylarındaki (522-860 nm) ışığı absorbe etme yeteneğine sahip olduklarından ışık geçirgenliği bakterinin üremesi için gereklidir (Genç, 2009).

3.2.1.5. Toplam fenol miktarlarının belirlenmesi

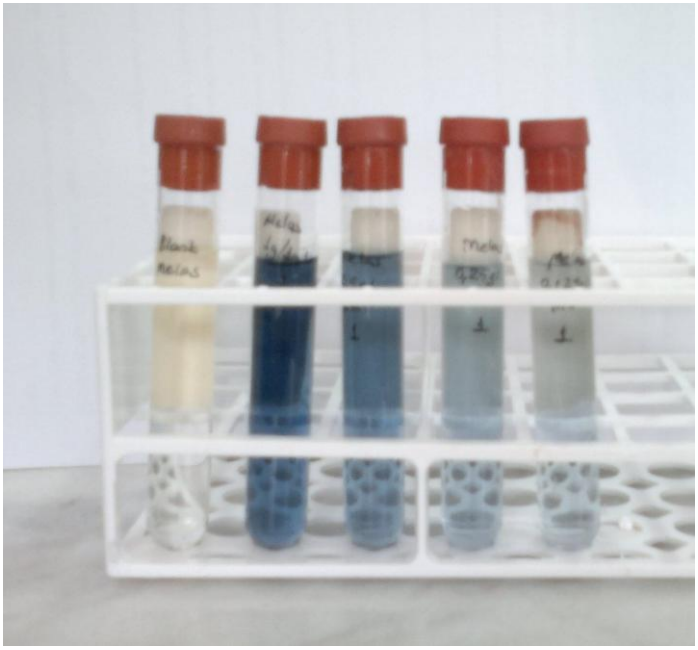
Folin-Ciocalteu yöntemi ile melasta bulunan toplam fenol miktarı belirlendi (Ragaee ve ark., 2006). Melastaki fenol miktarı gallik eş değerine (GAE) göre hesaplandığından, öncellikle gallik asit standart eğrisi oluşturuldu. Bu standart için gerekli olan kimyasallar gallik asit ve %10'luk sodyum karbonat ($NaCO_3$) çözeltileridir.

Gallik asit çözeltisi toplam hacim 10 mL olacak şekilde hazırlandı. İlk olarak 0.05 gr kuru gallik asit tartıldı ve 1 mL etanolde çözdürüldü. Üzerine 9 mL deiyonize su eklenerek hacim 10mL'ye tamamlanarak gallik asit çözeltisi hazır hale getirildi.

%10'luk sodyum karbonat ($NaCO_3$) çözeltisi ise toplam hacim 75 mL olacak şekilde hazırlandı. Öncelikle 60 mL deiyonize su manyetik karıştırıcıda kaynama noktasına gelinceye kadar ısıtıldı. Isınan suyun üzerine 7.5 gr sodyum karbonat eklendi ve manyetik balık yardımıyla iyice karışması sağlanarak çözdürüldü. Daha sonra oda sıcaklığında soğutuldu. Soğutulan çözeltiye 2-3 tane sodyum karbonat ($NaCO_3$) kristali eklendi ve 24 saat oda sıcaklığında bekletildi. Ertesi gün çözeltinin üzerine toplam hacim 75 mL'ye tamamlamak için 15 mL deiyonize su eklenerek hazır hale getirildi.

Hazırlanan kimyasallardan sonra standart eğri için olan aşamaya başlandı. 6 adet cam deney tüpleri hazırlandı. Önceden hazırlanan gallik asit stok çözeltisinden 6 tüpe sıra ile 0- 0.1- 0.2- 0.3- 0.5- 1 mL olacak şekilde eklendi ve steril su ile hacimleri 10 mL'ye tamamlandı. Böylece standartlar seyreltildi. Seyreltilen gallik asit çözeltilerinden 0.1 mL alınarak başka 6 tane temiz tüpe aktarıldı. Melasın içerisindeki toplam fenol miktarını belirlemek için ise 4 farklı konsantrasyon (0.57 gr/mL, 0.29 gr/mL, ,144 gr/mL ve 0,072 gr/mL) ayarlandı ve bu yüzden 4 tüp hazırlandı. Her tüpe stok melastan 0.02 mL olarak eklendi.

Standartların ve örneklerin bulunduğu deney tüplerinin her birine 6.5 mL deiyonize su eklendi ve vortekslendi. Sonra her tüpe 0.5 mL Folin's Reagent eklendi. 8 dk oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 3 mL $NaCO_3$ çözeltisinden eklendi ve 10 sn vortekslendi. Daha sonra çalkalamalı inkübatörde 40^{o}C'de 200 rpm'de 30 dk çalkalandı. Bu işlemde bittikten sonra standartlar ve örnekler OD_{765nm}'de spektrofotometrede (Biochrom Libra S22) ölçüldü (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Folin-Ciocalteu yöntemi ile melasta bulunan toplam fenol miktarlarına göre renk değişikliği

3.2.1.6. Toplam amonyum miktarının belirlenmesi

Hidrojen üretiminden sorumlu nitrojenaz enzimini baskılayan bileşik, amonyumdur (Kars ve Gündüz, 2010). Hidrojen üretim besiyerlerindeki miktarı da bu

yüzden baskılayıcı miktarın altında olmalıdır. Melasta bulunan toplam amonyum miktarı, amonyum test kiti (Norateks, Türkiye) ile belirlendi.

Melas koyu renkli olduğu için ve sahip olduğu rengin sonucu etkilememesi için seyreltilerek ölçüm yapıldı. Öncelikle stok melasın 5 gr ham melas (d:1.35 gr/mL) tartılıp 5 mL distile suda çözdürüldüğü için 2.35 kat dilue edilidiği bulundu. 0.05 mL stok melas çözeltisinden temiz bir deney tüpüne eklendi. Üzerine 4.95 mL distile su eklenerek hacim 5 mL'ye tamamlandı ve böylece 100 kat seyreltilmiş oldu. Toplamda da melas 235 kat seyreltilmiş oldu. 235 kat seyretilmiş melas üzerine kit içerisinde bulunan NH_4-1 solüsyonundan 2 damla, NH_4-2 solüsyonundan da 4 damla damlatıldı ve çalkalandı. Renk oluşumu için 5 dk beklendi. Kit içerisinde bulunan renk skalası ile oluşan renk karşılaştırılarak toplam amonyum miktarı belirlendi.

3.3. Melas besiyerin hazırlanması

Melas besiyerini hazırlanmadan önce melasın element analizi, amonyum miktarı, organik asit miktarı, ışık geçirgenliği gibi özellikleri değerlendirildi. Şeker miktarına göre farklı konsantrasyonlarda (2.5 gr şeker/L, 3.1 gr şeker/L, 3.76 gr şeker/L, 4.38 gr şeker/L ve 5 gr şeker/L) besiyerleri toplam hacmi 50 mL olacak şekilde 60 mL'lik şeffaf cam şişeler içerisinde hazırlandı. Aktifleştirilen *Rhodobater sphaeroides* kültüründen %10'luk (v/v) ekim yapmak üzere besiyerlerine 5 mL eklendi.

Melas besiyerleri şeker miktarına göre farklı konsantrasyonlarda (2.5 – 5 gr şeker/L) dublike olarak hazırlandı. Melasta bulunan şeker miktarına (%48-50) bağlı olarak, stok melas çözeltisinden (0.574 g/ mL) eklenecek miktarlar hesaplandı (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Farklı konsantrasyonlarda melas besiyerlerine eklenecek stok melasın miktarları

Şeker Miktarına Göre Konsantrasyonları	Stok Melas (0.574 gr/mL) Miktarlar
2.5 gr şeker/L	455 µL
3.1 gr şeker/L	568 µL
3.76 gr şeker/L	682 µL
4.38 gr şeker/L	795 µL
5 gr şeker/L	910 µL

ICP-MS analizi sonucuna göre melasta fazla miktarda bulunan elementler (Na, K) besiyerine eklenmedi. Yeterli miktarda olmayan elementler (Mg, Ca, Mo, Co, Fe, B) eklendi. Bu nedenle *R.sphareoides*'in genel üreme ortamı olan BP minimal besiyerindeki kimyasallardan bazıları çıkartılarak stok çözeltisi hazırlandı.

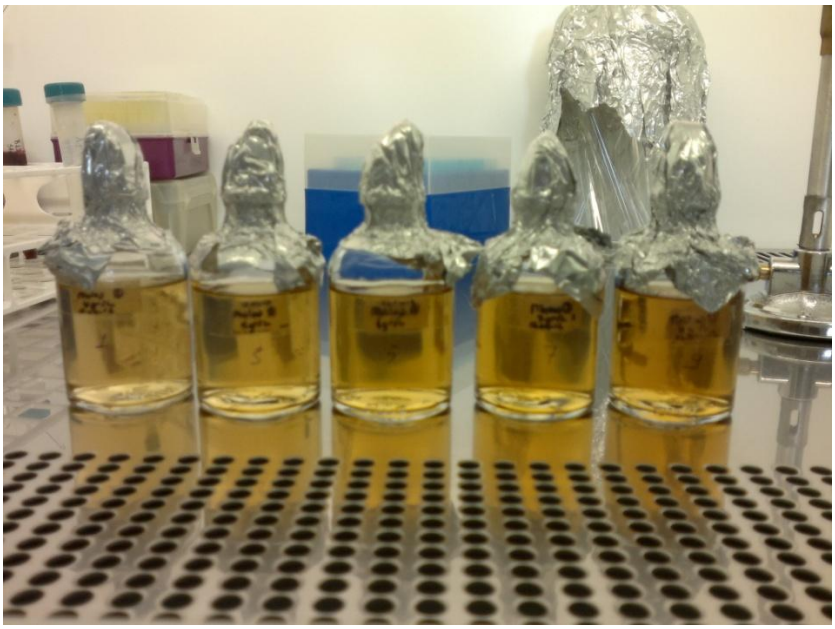
Stok çözeltisinin miktarları Çizelge 3.6'da verilmiştir. Kimyasallar $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$ ve ayrıca tampon olarak K_2HPO_4 sırasıyla tartıldı ve 500 mL distile suda çözdürüldü. Böylece 2X'lik stok çözeltisi hazırlandı.

Çizelge 3.6. Stok çözeltisinin (2X) içeriği

Kimyasallar	2X çözelti (g)
$MgSO_4.7H_2O$	0.2
$CaCl_2.2H_2O$	0.025
K_2HPO_4	0.5

Melas besiyerlerine hazırlanan stok çözeltisinden (2X) 25 mL eklendi. Melas besiyerinde fazla miktarda şeker bulunduğu için karbon kaynağı olarak malik asit eklenmedi. Melasta amonyum bulunduğu ve nitrojenaz enzimini inhibe edeceği için azot kaynağı olarak Na-Glutamat da eklenmedi. Böylece stok çözeltisine eklenmeyen malik asit ve Na-glutamat ile hedeflenen düşük maliyetli besiyeri hazırlandı.

Şeffaf cam şişelerine (60 mL) stok çözeltisi (2X) eklendikten sonra Çizelge 3.7'de verilen miktarlarda melas eklendi. Melas miktarları ise melasta bulunan şeker miktarına göre hesaplandı. Melas besiyerlerinin pH'sı ölçüldü ve 8.3 - 8.5 olduğu belirlendi. HCl ile pH 6.8 - 6.9'a ayarlandı. pH ölçümünden sonra eser element ve $FeSO_4$ çözeltilerinden eklendi. Besiyerlerinin son hacimleri distile su ile 45 mL'ye tamamlandı. Ağızları pamuk ve alimunyum folyo ile kapatıldı. Sonra 121^oC'de 20 dk otoklavlanarak steril edildi. Besiyerleri ile birlikte şişeler için kullanılacak kauçuk özellikteki tıpalar da bir beher içerisinde otoklavlanarak steril edildi. Otoklavdan sonra besiyerleri uygun sıcaklığa (30^oC) gelmeleri için bekletildi (Şekil 3.3). Daha sonra steril vitamin solüsyonundan (2X) her bir şişeye 2.5 µl eklendi. Vitaminden sonra her bir şişeye %10 (v/v) olacak şekilde önceden BP besiyerinde 2 gün inkübe edilerek aktifleştirilmiş *Rhodobacter sphaeroides* kültüründen 5 mL alınarak ekim yapıldı.



Şekil 3.3. Otoklavdan sonra melas besiyerinde belirlenen konsantrasyonlar

Çizelge 3.7. Besiyeri bileşenleri ve derişimleri

Melas Besiyerlerin Konsantrasyonları	Melas (0.574 gr/mL)	Stok Çözeltisi (2X)	pH'ı HCl ile 6.8'e ayarlanır.	Demir sülfat (2X)	Eser Element (20X)	Hacmi saf su ile 45 mL'ye tamamlanır.	Vit. Sol. (20X)	*R.sph.* (%10)
2.5 gr şeker/L	455 µL	25 ml		50 µL	2.5 µL		2.5 µL	5 mL
3.1 gr şeker/L	568 µL	25 ml		50 µL	2.5 µL		2.5 µL	5 mL
3.76 gr şeker/L	682 µL	25 ml		50 µL	2.5 µL		2.5 µL	5 mL
4.38 gr şeker/L	795 µL	25 ml		50 µL	2.5 µL		2.5 µL	5 mL
5 gr şeker/L	910 µL	25 ml		50 µL	2.5 µL		2.5 µL	5 mL

Sonra şişelerin ağızları alevden geçirilerek steril edilmiş kauçuk tıpalarla sıkıca kapatılıp parafilmlendi. 29^{o}C'de inkübatöre yerleştirildi ve ışık kaynağı olarak 2 adet 100 Watt'lık lamba (tungsten) kullanılarak inkübe edildi. İnkübatörün sıcaklığı dışarıdan takip edilirken aynı zamanda içerdende termometreyle takip edildi. pH metreyle (WTW Ph 330i) pH'sı ve UV spektrofotometreylede (Biochrom Libra S22) optik yoğunlukları ölçüldü. Böylece pH değişim ve üreme eğrileri oluşturuldu.

3.3.1. Melas besiyerinde *Rhodobacter sphaeroides*'in pH değişim ve üreme eğrisinin oluşturulması

Hazırlanan besiyerlerine %10'luk ekim yapıldıktan sonra besiyerlerinden hergün 1.5 mL olacak şekilde örnek alındı ve örnek alındığı zamanın tarih ve saati kaydedildi. Alınan örneklerin öncelikle pH'sı, daha sonra UV spektrofotometreyle (OD_{660nm}) optik yoğunlukları ölçüldü. pH'sı ölçülerek besiyerlerin pH değişim eğrisi oluşturuldu.

OD_{660nm}'de ölçüm yapılan değerlerle de *R. Sphaeroides*'in melas besiyerindeki üreme eğrileri oluşturuldu.

3.4. Hidrojen düzeneğinin kurulması

Rhodobacter sphaeroides melas besiyerindeki pH değişim ve üreme eğrilerinden sonra hidrojen düzeneği hazırlandı. Yine aynı konsantrasyonlar da aynı miktarlarda (2.5-5 gr şeker/L) 60 mL'lik şeffaf cam penisilin şişelerine toplam hacim 50 mL olacak şekilde besiyerleri dublike olarak hazırlandı. Besiyerlerine aktifleşirilen bakteriden %10'luk (v/v) ekim yapıldı. Ağızları kauçuk tıpa ile sıkıca kapatılıp ve hava alma olasılığını engellemek için parafilmlendi. *R.sphaeroides* hidrojen üretmesi için gerekli olan anaerobik ortam oluşturmak amacıyla besiyerleirnin 3 dk boyunca saf argon gazından geçirilmesi yeterli oldu. Önce şişenin tıpasına boş enjektör iğnesi (2mL) daha sonra argon tüpüne bağlanan serumun enjektör iğnesi (2mL) batırıldı. Boş enjektör iğnesinden besiyerindeki hava çıkartıldı ve böylece 3 dk sonunda anaerobik ortam sağlandı.

Hidrojen gazının birikmesi için 25-30 cm'lik cam deney tüpleri kullanıldı. Deney tüplerin dip kısımlarından başlanarak cm cinsinden ölçeklendirildi. Derecelendirilen deney tüplerin herhangi bir cm'si ile diğer başka bir cm'nin kaç mL su aldığı hesaplanarak deney tüpün ortalaması bulundu ve üzerine not edildi. Daha sonra cam deney tüplerin ağızlarına kadar distile su ile doldurularak ağızları kauçuk tıpalar ile sıkıca kapatılıp parafilmlendi. Bu deney tüpleri portüplere tıpaların ağızları aşağıya gelecek şekilde yerleştirildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Cam deney tüpü (25-30 cm)

Besiyerlerindeki biriken H_2 gazın deney tüplere iletilebilmesi için 50 cm uzunluğunda, yaklaşık 1 mm çapındaki elektrik kabloları kullanıldı. Bu amaçla ilk önce elektrik kablosu 50 cm olacak şekilde kesildi ve her bir kablonun içerisindeki teller pense yardımıyla çıkarıldı. Böylece kabloların sadece yalıtım kısımları kaldı. Daha sonra 5 mL'lik enjektörün sadece iğne kısmı kablolarda kullanılacağı için, iğnesi plastik kısımdan alev yardımıyla çıkarıldı. Hazırlanan kabloların her iki ucuna enjektör iğneleri yapıştırıldı ve kuruması için 1 gün oda sıcaklığında bekletildikten sonra iğne ile kablonun birleştiği kısımlar sıkıca parafilmlendi. Daha sonra hem sterilizasyon hem de iğne ucunun tıkanma olasılığı göz önüne alınarak kablolar %70'lik etil alkolden geçirildi. Alkolün kablo içerisinde kalmaması için dik bir şekilde tutularak tamamen boşaltıldı. Böylece hidrojen düzeneği için cam deney tüpleri ve kablolar hazır hale getirilmiş oldu (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Hidrojen düzeneği için hazırlanan 50 cm uzunluğunda elektrik kabloları

Hidrojen düzeneğin kurulumu için başlangıçta kablonun bir ucundaki iğne ters çevrilmiş halde portüpe yerleştirilen cam deney tüpünün tıpasına ve diğer ucu ise melas besiyerinin tıpasına takıldı. Melas besiyerinde üretilen hidrojen gazının kablolardan geçerek deney tüpünde birikmesini sağlamak için, deney tüpünün tıpasına takılan kablo iğnesinin yanına boş enjektör iğnesi de (5mL'lik) takıldı. Bu işlemlerden sonra hidrojen düzeneği 29^{o}C'de inkübatöre yerleştirildi. İnkübatörün kapağı açık bir şekilde önüne yaklaşık 40 cm uzaklığına 2 adet 100 W'lık lamba (tungsten) konuldu. Hidrojen üretimi gerçekleştikçe su yer değiştirme prensibine göre hidrojen gazı, su ile yerdeğiştirerek cam deney tüpünün üst kısımda birikti. Su, tahliye amacıla yerleştirilen boş iğne ucu ile uzaklaştırıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Melas besiyeri ile hidrojen üretim düzeneği

Su tahliyesi sonucu, derecelendirilen tüpte biriken hidrojen miktarı mL cinsinden hesaplandı. Hidrojen üretimi ölçülerek hidrojen üretim miktarın grafiği oluşturuldu.

3.4.1. Hidrojen miktarının gaz kromotografisi (GC) ile belirlenmesi

Cam tüplerde toplanan hidrojen gazın miktarı gaz kormotografisi ile belirlendi. Gaz kromotografisinde (Agilent, 6890 N), 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 ise sırasıyla 140 ^{o}C, 160^{o}C ve 170^{o}C'e ve analiz süresi 8 dk'ya ayarlandı. Deney tüpünde biriken gazdan, şırınga (Hamilton, 22 GA 0.5 mL, gaz sızdırmaz #1750) ile 0.1 mL örnek alınarak gaz kromotografisine enjekte edildi ve böylece hidrojen miktarı (%) belirlendi.

3.5. Melas besiyerin 5-Aminolevülinik asit üretimi için tasarlanması

Hidrojen üretimi için hazırlanan melas besiyerinin içeriğiyle aynıdır. Sadece farklı olarak melas besiyerine 5-ALA üretiminde etkisi bilinen levulinik asit ve B12 vitamin eklendi (Sasaki ve ark., 1990). Besiyerinde levulinik asit varlığı bakterin üremesini azaltır. 50 mM üzerindeki levulinik asit varlığı bakterinin üremesini tamamen durdurur (Trangprasittipap ve Prasertsan, 2002). Buna göre öncelikle levülinik asit (30mM) ve B12 vitamin çözeltileri hazırlandı. Daha sonra besiyerlerine B12 vitaminden 250 µL ve levulinik asit çözeltisinden de 500 µL olacak şekilde eklendi. B12 vitamin stok çözeltisi toplam hacmi 10 mL olarak hazırlandı. Önce B12 vitaminden 0.005 gr tartıldı ve 10 mL distile suda çözdürüldü. Sterilliği şırınga filtreden (0.45 µM) geçirilerek yapıldı. B12 vitamin çözeltisinin ne kadar ekleneceği deneyerek bulundu. Işık geçirgenliği *R. sphaeroides*'in hidrojen üretiminde önemli olduğu için B12 vitamin çözeltisinin pembe rengi besiyerlerinin rengini etkilemeyecek miktarda belirlendi. Bu yüzden en uygun miktar 250 µL olarak ayarlandı ve her bir besiyeri şişelerine eklendi.

Levülinik asit stok çözeltisi ise 3M ve 10 mL olarak hazırlandı. Öncelikle levulinik asitten (MA: 116.12) 3.484 gr tartıldı. 4 mL distile suda tamamen çözdürülüp pH'ı kontrol edildi ve 2.4 civarında olduğu görüldü. Bakteriler için uygun olan pH aralığı NaOH (10 M) ile 6.9'a ayarlandı. Sonra hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Steril kabin içerisinde ve alev yanında şırınga filtreden (0.45 µM) geçirilerek sterilizasyonu sağlandı.

Besiyerleri hazırlandıktan sonra 121^{o}C'de 20 dk otoklavlandı. Otoklavdan sonra vitamin çözeltisinden (20X) 2,5 µL ve B12 vitamin çözeltisinden 250 µL olarak eklendi. Daha sonra besiyerlerine geliştirilen kültürden %10'luk ekim yapıldı. Hidrojen düzeneğinde olduğu gibi düzenek kuruldu ve 2 adet 100 W'lık ampül (tungsten) ile 29^{o}C'de inkübe edildi. Böylece biyorafineri anlayışına göre melas besiyerinde *Rhodobacter sphaeroides* ile hidrojen üretimi gerçekleşirken aynı zamanda önemli yan ürün olan 5-ALA üretimi de gerçekleştirildi. Levülinik asitin besiyerindeki varlığının bakterinin üremesini azaltacağından *R.sphaeroides* üreme eğrisinde log fazın sonuna doğru durağan faza geçmeden (96.5 st) besiyerlerine 500 µL olarak eklendi. Steril edilen levülinik asit çözeltisi steril kabin içerisinde ve alev yanında besiyerlerine eklendi. Daha sonra şişelerin ağızları alevden geçirilerek tıpaları sıkıca kapatılıp parafilmlendi. Levülinik asit eklemek için şişelerin tıpaları açıldığı için anaerobik ortamı oluşturmak amacıyla her bir şişe 3 dk argon gazından geçirildi ve tekrar düzenek kurularak 5-ALA ve H_2 üretimine devam edildi.

3.5.1. 5-ALA miktarının spektrofotometrik yöntemle belirlenmesi

R.sphaeroides tarafından 5- Aminolevülinik asit hücre dışına salgılandığı için melas besiyerinden bakteri uzaklaştırılıp besiyerindeki 5-ALA miktarına kolorimetrik yöntemle bakıldı (Charikritsadakarn ve ark., 2004). Hidrojen üretimi ve ALA üretimi için kurulan düzeneklerin melas besiyerindeki ALA miktarları belirlendi. Bu yöntem için öncelikle gerekli olan çözeltiler asetat tamponu (1M) ve Ehrlich's reaktifi hazırlandı.

%1 asetilaseton içeren asetat tamponuna (0.1 mL, 1M, pH 4.7) eklenecek glasiyal asetik asitin miktarı (MA: 60.05 g/mol d:1.049 g/mL) belirlendi. Asetat tamponunun toplam hacminin 50 mL olmasından dolayı, 2.862 mL glasiyal asetik asit eklenmesi gerektiği hesaplandı. Son hacmi 50 mL olacak şekilde 1 M asetat tamponu hazırlamak için, 2.862 mL galasiyel asetik asit alınarak 20 mL distile su içerisine eklendi. Üzerine 0.5 mL asetilaseton ilave edilip hacim 25 mL distile su ile 50 mL'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda balık yardımıyla iyice karışması sağlandıktan sonra NaOH ile pH:4.7'e ayarlandı.

Ehrlich's reaktifinin (50 mL) hazırlamak için, 1 gr p-dimetilaminobenzaldehit tartılıp üzerine 8 mL (%70) perklorik asit eklendi ve iyice çözdürüldükten sonra glasiyal asetik asit ile hacim 50 mL'ye tamamlandı.

3.5.2. 5-ALA standart eğrinin oluşturulması

5-ALA (MA:167.59 g/mol) 500 mM ve 1 mL hacimde stok çözeltesi olarak hazırlandı. Öncelikle 0.0838 gr 5-ALA tartılıp 1 mL'de çözdürülüp ALA stok çözeltisi hazırlandı. Çizelge 3.8'de görüldüğü gibi ALA standart eğrisi için 8 farklı konsantrasyon belirlendi. Bu yüzden 8 tane standart için 1 tane de referans için deney tüpü hazırlandı. 8 deney tüpüne belirlenen miktarlarda ALA stok çözeltisinden (500mM) eklendi.

Çizelge 3.8. 5-ALA Standart eğrisi için belirlenen 8 farklı konsantrasyon ve eklenecek ALA stok çözeltisinin miktarları

Standart Numaraları	Konsantrasyonlar (mM)	500mM ALA stok çözeltisi (µL)
1	0.070	0.781
2	0.140	1.563
3	0.279	3.125
4	0.558	6.25
5	1.116	12.5
6	2.232	25
7	4.464	50
8	8.929	100

Çizelge 3.9'da da gösterildiği gibi ALA miktarı 100 µl ile başlayıp her seferinde yarıya indirilerek standartlar belirlendi. Her tüpün hacmi 100 µl olacak şekilde distile su ile tamamlandı ve vortekslendi. Üzerlerine 2 mL asetat tamponundan (1M) eklendi. Sonra 100^{o}C'de 15 dk süre ile benmaride bekletildi. 15 dk sonuna tüpler buz içerisinde hızlı bir şekilde soğutuldu. Daha sonra, önceden hazırlanan Ehrlich's reaktifinden 3.5 mL eklenip vortekslendi. Oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Bu süre içerisinde Şekil 3.7'de de görüldüğü gibi mor-kırmızı renk verdi.



Şekil 3.7. ALA standart eğrisi için belirlenen konsantrasyonların renk değişikliği

Referans için hazırlanan tüpe ise 100 µl distile su eklendi. Üzerine 2 mL asetat tamponu (1M) ve 3.5 mL Ehrlich's reaktifi ilave edilip vortekslendi. 8 tane standart ve 1 tane de referans için toplam 9 tane küvet hazırlanıp etiketlendi ve her bir tüpteki çözeltilerden küvetlere 2 mL alınarak eklendi. UV spektrofotometrede OD_{533nm}'de ölçülerek ALA standart eğrisinin grafiği oluşturuldu.

Çizelge 3.9. Kolorimetrik yöntemle ALA miktarının belirlenmesi için ALA standart eğrisinin oluşturulması

Standart numaraları	**ALA stok çözeltisi (µL)**	**Distile su (µL)**	**Asetat Tamponu (mL)**	**100°C'de 15 dk bekletildi.**	**Buz içerisinde hızlıca soğutuldu.**	**Ehrlich's Reaktifi (mL)**	**Renk oluşumu için 15 dk oda sıcaklığında 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	
Blank(Kör)	-	100	2			3.5	

3.5.3. Melas besiyerindeki ALA miktarların belirlenmesi

Melas besiyerindeki ALA miktarının belirlenmesi için *R.sphaeroides* üremesi durağan faza girdiği zaman düzenek bozularak bakteri besiyerinden uzaklaştırıldı. Öncellikle bozulan besiyerleri 2 kez 8.500 rpm'de 10 dk soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi ve supernatant filtre kâğıdı ile süzüldü. Bu işlemden sonra toplam ALA miktarını belirlemek için supernatant liyofilizasyon ile yoğunlaştırıldı. Öncelikle hazırladığımız supernatantlar, liyofilizatörün cam balon jojelerine konularak donması için -80 ^{o}C'de 1 gün bekletildi. Liyofilizatörde (-110^{o}C, 0.016 bar) örneklerimiz 2 gün kurutularak konsantre edildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Melas besiyerin liyofilizasyon işlemi

İki günün sonunda kuruyan örnekler 2 mL distile suda çözdürüldü. Bu örneklerden kolorimetrik yöntemle ALA miktarının belirlenmesi için 500 µl alındı. Çizelge 3.10'da görüldüğü gibi örneğin üzerine 2 mL asetat tamponu da eklendi. 100^{o}C'de 15 dk bekletildi. Sonra hızlı bir şekilde buz içerisinde soğutuldu. 3.5 mL ehrlich's reaktifinden eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Daha sonra spektrofotometrede $0D_{533nm}$'de ölçüldü.

Örneklerin analizinde referans olarak kullandığımız tüp için de örneğin (melas besiyeri) renkli olmasından dolayı 500 µL örnekten eklendi. Sadece örnek tüpünden farklı olarak referansta renk oluşumunu engellemek için 2 mL asetat tamponu yerine 2 mL distile su eklendi. Üzerine de 3.5 mL Ehrlich's reaktifinden eklenerek hazır hale getirildi (Çizelge 3.11). Her bir küvete eklenen örnek, referansı ile birlikte UV spektrofotometrede OD_{533nm}'de ölçüldü.

Çizelge 3.10. Hidrojen üretimi ve ALA üretimi için hazırlanan melas besiyerindeki ALA miktarların belirlenmesi

Konsantrasyonlar	Alınan Örnek Miktarları (µL)	Asetat Tamponu (mL)	100^{o}C'de 15 dk bekletildi.	Buz içerisinde hızlıca soğutuldu.	Ehrlich's Reaktifi (mL)	Renk oluşumu için 15 dk oda sıcaklığında bekletildi.
2.5 gr şeker/L	500	2			3.5	
3.1 gr şeker/L	500	2			3.5	
3.76 gr şeker/L	500	2			3.5	
4.38 gr şeker/L	500	2			3.5	
5 gr şeker/L	500	2			3.5	

Çizelge 3.11. Hidrojen üretimi ve ALA üretimi için hazırlanan melas besiyerindeki ALA miktarların belirlenmesinde kullanılan her bir konsantrasyon için farklı referans hazırlanması

Konsantrasyonlar	Alınan Örnek Miktarları (µL)	Distile su (mL)	100°C'de 15 dk bekletildi.	Buz içerisinde hızlıca soğutuldu.	Ehrlich's Reaktifi (mL)	Renk oluşumu için 15 dk oda sıcaklığında bekletildi.
2.5 gr şeker/L	500	2			3.5	
3.1 gr şeker/L	500	2			3.5	
3.76 gr şeker/L	500	2			3.5	
4.38 gr şeker/L	500	2			3.5	
5 gr şeker/L	500	2			3.5	

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Melasa uygulanan analizler

Melas besiyerinin *R.sphaeroides*'in hidrojen üretiminde ve ALA üretiminde melas besiyerinin uygun olup olmadığını öğrenmek için element analizi, toplam fenol miktarı, amonyum miktarı, organik asit ve ışık geçirgenliği (transmittans) incelendi.

4.1.1. Melasta bulunan elementlerin miktarları

Melasta bulunan B, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Al, Ca, Mo, Na ve K elementlerinin miktarları Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi ICP-MS ile belirlendi. Hidrojen üretimi için Fe (0.468 mg/L) ve Mo (0.012 mg/L) yeterli miktarda olmadığından eklendi. Bunun yanı sıra Na (>800 mg/L) ve K(>400 mg/L) elementlerinin miktarları çok yüksek bulunduğu için besiyeri ortamına eklenmedi.

Çizelge 4.1. Element analizi sonucunda melas besiyerinde bulunan elementlerin miktarı

Element	Miktar (mg/L)
B	0.098
Cr	0.115
Mn	0.475
Fe	0.468
Co	0.018
Ni	0.05
Cu	0.138
Zn	0.296
Mo	0.012
Al	0.033
Ca	12.223
Mg	1.958
Na	>800
K	>400

Ayrıca Mg, Ca, Mo, Co, Fe, B gibi gerekli elementlerin *R.sphareoides*'in üremesi ve hidrojen ile 5-ALA üretilmesi için yeterli olmadığı belirlendi. Yetersiz olan bu elementler de besiyerine eklendi. *Rhodobacter sphaeroides* ile hidrojen üretiminden sorumlu olan Mo-nitrojenaz enziminin yapısında Mo ve Fe buluduğu için miktarları çok önemlidir.

4.1.2. Melas besiyerinde organik asitlerin miktarları

Şeker pancarı melas sükroz yönünden zengin olmasının yanı sıra organik açısından da zengin bir substrattır. HPLC ile melas besiyerindeki 9 farklı organik asitin miktarları tespit edildi, Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Bu organik asitlerden bütirik asit ve sitrik asit tespit edilemedi. Melas besiyerinde en çok miktarda bulunan organik asitler ise sırasıyla laktik asit 42.24 mg/g ve asetik asit 16.90 mg/g olarak belirlendi.

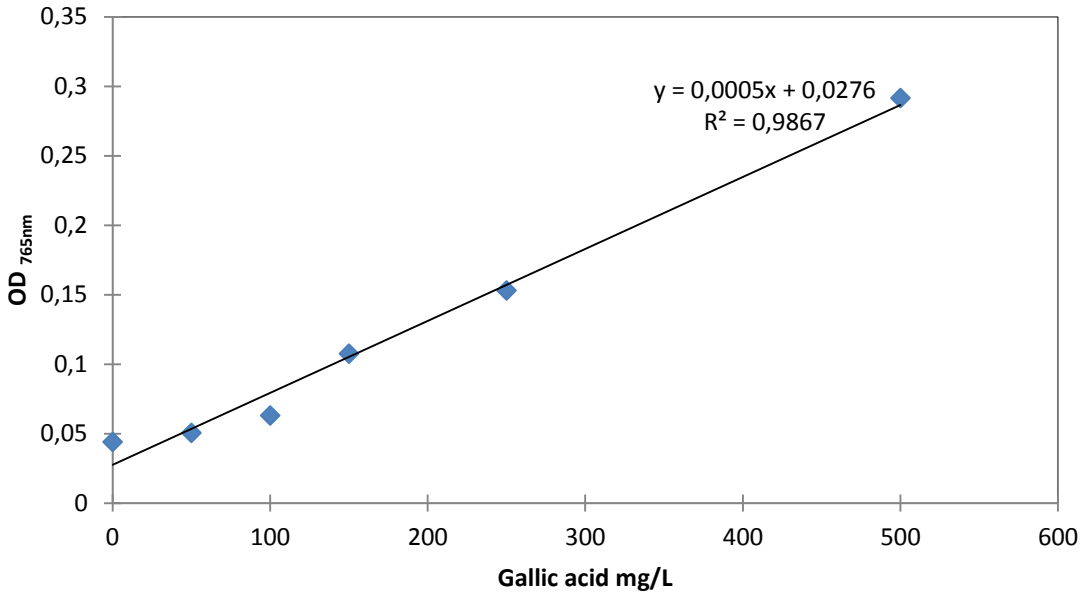
Çizelge 4.2. Melas besiyerinde bulunan organik asit bileşimleri

Organik asit	Miktarları (mg/g)
Asetik asit	16.90
Laktik asit	42.24
Bütirik asit	---
Formik asit	9.59
Propiyonik asit	4.94
Malik asit	5.94
Sitrik asit	---
Fumarik asit	0.61
Sükkinik asit	8.17

Laktik asit ve malik asitin (5.94 mg/g) varlığı hidrojen üretiminde olumlu bir etkiye sahiptir (Uyar ve ark., 2012). Süksinil CoA 5-ALA sentezinde ön madde olduğu için süksinik asit (8.17 mg/g) ALA üretiminde uyarıcı bir etkiye sahip olmuş olabilir. Organik asitlerin hidrojen üretim reaksiyonları ve teorik olarak hidrojen üretim miktarları birbirinden farklıdır. Hidrojen üretiminde bakterinin türünün önemli olması kadar tüketilen organik asitte etkilidir (Fırat, 2009). Bu çalışmada da maliyet yönü de düşünülerek fotofermentasyonda substrat olarak organik asitlerin ve şekerin bulunduğu melas ile çalışılmıştır. Sonuç olarak bu organik asitlerin varlığı ile düşük maliyetle hidrojen ve ALA üretimi gerçekleştirilmiştir.

4.1.3. Melasta bulunan toplam fenol miktarı

Melastaki toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile gallik asit eş değeri (GAE) cinsinden belirlendi. Bu yüzden ilk önce gallik asit standart eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Gallik asit (mg/L) standart eğrisi

OD_{765nm}'de ölçülen değerin gallik asit standart eğrisi içerisinde yer alması istendiğinden dolayı materyal ve yöntemde belirtildiği gibi farklı konsantrasyonlarda (0.57 gr/mL, 0.29 gr/mL, 0.144 gr/mL ve 0.072 gr/mL) belirlendi ve değerleri OD765nm'de ölçüldü. Sadece 0.144 gr/mL ve 0.072 gr/mL konsantrasyonları OD_{765nm}'de ölçüldüğünde sırasıyla 0.22 ve 0.131 olarak bulundu. Bu sonuçlar gallik asit standart eğrisi içerisinde yer aldığı için sadece bu konsantrasyonların toplam fenol miktarı hesaplandı (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyondaki melasın $0D_{765nm}$'deki değerleri

Eklenen Melas	Konsantrasyon	OD_{765nm}
20 µL	0.57 gr/mL	0.7645
20 µL	0.29 gr/mL	0.4335
20 µL	0.144 gr/mL	0.22
20 µL	0.072 gr/mL	0.131

Yapılan ölçümlere göre toplam fenol miktarları Çizelge 4.4'de de gösterildiği gibi 0.144 gr/mL konsantrasyonunda 13.36 mg GAE/g melas ve 0.072 gr/mL konsantrasyonunda ise 14.36 mg GAE/g melas olarak bulundu.

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda (0.144 ve 0.072 gr/mL) OD_{765nm}'deki değerlerine göre melastaki toplam fenol miktarı

Konsantrasyonlar	Dilusyon Faktörü (100/20µL)	mg GAE/L	mg GAE/g melas
0.144 gr/mL	5	1924	13.36
0.072 gr/mL	5	1034	14.36

Bakterinin üreme ortamında fazla miktarda fenolik maddelerin varlığı toksik etki eder fakat bu çalışmada melas, besiyerlerine seyreltilerek eklenmiştir. Bu nedenle toplam fenol miktarı bakterinin üremesine, hidrojen ve ALA üretimine engel teşkil etmemiştir.

Eroğlu ve ark. (2004)'nın çalışmasında besiyeri olarak zeytinyağı atık suları (OMW) ile *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 tarafından üretilen hidrojen miktarı araştırılmıştır ve zeytinyağı atık suyunda toplam fenol miktarı toksik etki yaratacak kadar fazla miktarda bulunmasından dolayı yüksek oranda seyreltilerek hidrojen veriminin arttırılması sağlanmıştır.

4.1.4. Melasta bulunan amonyum miktarları

Besiyerin amonyum miktarı büyük önem taşır. Hidrojen üretimi için besiyerinde amonyum miktarı fazla olmamalıdır. Bu yüzden melas besiyerinde belirlenen her bir konsantrasyonun amonyum miktarları hesaplandı. Amonyum 2 mM'dan fazla olduğu zaman amonyum nitrojenaz enzimini baskıladığı için H_2 üretimi gerçekleşmemektedir (Akköse, 2008). Bu nedenle H_2 üretimi için besiyerlerinin amonyum miktarları 2mM'dan az olmalıdır. Melas besiyerindeki amonyum miktarı ise amonyum test kiti (Norateks, Türkiye) kullanılarak belirlendi. 235 kat sulandırılmış melasın renk skalasında 2.5 ppm (1 ppm:1 mg/L) olarak belirlendi. Buna göre ham melasın amonyum içeriği 32.57 mM olarak hesaplandı. Ancak stok melas 100 kat seyreltildiği için amonyum miktarı 13.8592 mM olarak bulundu. Bu yüzden de farklı konsantrasyonlardaki melas besiyerinin dilusyon miktarına göre amonyum miktarları belirlendi. 2.5 gr şeker/L konsantrasyonda 0.455 mL stok melastan eklenmişti bu yüzden dilusyon faktörü 50 mL kültürde 109.89 kat dilue edildiği bulundu bundan dolayı amonyum miktarıda 0.126 mM (13.8592mM/109.89 kat dilue) olarak belirlendi. Diğer konsantrasyonların (3.1 gr şeker/L, 3.76 gr şeker/L, 4.38 gr şeker/L ve 5 gr şeker/L) amonyum miktarları sırasıyla 0.157 mM, 189 mM, 0.220 mM ve 0.252 mM olarak hesaplandı (Çizelge 4.5).

Akköse (2008)'nin çalışmasına göre melasta bulunan amonyum miktarı H_2 üretimini baskılayacak miktarda değildir. Çizelge 25'de görüldüğü gibi melas seyreltilerek besiyerler hazırlandığı için her bir besiyerinde daha az amonyum bulunmaktadır ve bu değerlere göre amonyum miktarın nitrojenaz enzimini baskılayıcı miktarlarda olmadığı belirlenmiştir. Böylece amonyum miktarı yönünden hidrojen

üretiminde uygun konsantrasyonlar olduğu ve uygun bir ortamda hidrojen üretimi elde edilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki melas besiyerinin amonyum miktarları

Şeker Miktarına göre Konsantrasyonlar	Melasın Dilusyon Miktarı	Amonyum Miktarı (mM)
2.5 gr şeker/L	109.89	0.126
3.1 gr şeker/L	88.028	0.157
3.76 gr şeker/L	73.314	0.189
4.38 gr şeker/L	62.893	0.220
5 gr şeker/L	54.945	0.252

4.1.5. Melas besiyerinde belirlenen konsantrasyonların transmittans ölçümleri

Rhodobacter sphaeroides güneş ışınlarından aldığı enerjiyi kimyasal enerjiye yani ATP'ye çevirir. Bu ATP'yi üremesinde ve hidrojen üretiminde kullanır (Koku ve ark., 2002). Hidrojen üretimi için besiyerinin ışığı geçirmesi çok önemlidir. Melas koyu renkli olduğu için ışık geçirgenliği 3 dalga boyunda (522 nm, 800 nm ve 860 nm) ölçüldü. Belirlenen konsantrasyonlarda ışık geçirgenliği 522 nm'de ölçüldüğünde (Çizelge 4.6) konsantrasyon arttıkça ışık geçirgenliğinin azaldığı görüldü. 800-860 nm (kızılötesi)'de ölçüldüğünde ise ışık geçirgenliğindeki fark yok denecek kadar azdır. Sonuçlar 800-860 nm'de besiyerinin daha az etkilendiği göstermektedir. Hidrojen üretiminde kızılötesi bölge önemli rol oynamaktadır ve görünür ışığa göre çok daha etkilidir (Uyar ve ark., 2007). Görünür ışıkta (522 nm) belirlenen en yüksek konsantrasyon olan 5 gr şeker/L'de, ışık geçirgenliği çok az düşmüştür. Bu sonuçlara göre de hidrojen üretiminde melas besiyerinin rengi, ışık geçirgenliği için bir problem oluşturmamaktadır.

Çizelge 4.6. Kültür ortamın 522, 800 ve 860nm dalga boylarındaki ışık geçirgenliğin ölçümü

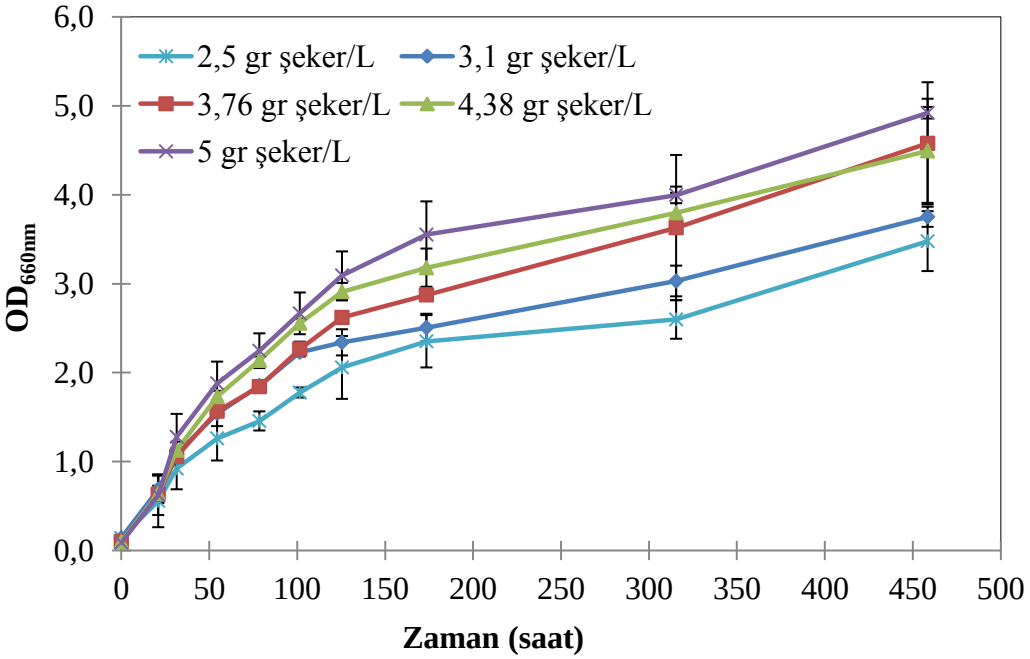
Şeker miktarına göre konsantrasyonları	Transmittans ölçümleri		
	522 nm	**800 nm**	**860 nm**
2.5 gr şeker/L	100.2	98.7	98.9
3.1 gr şeker/L	91.6	98.7	98.4
3.76 gr şeker/L	90.6	98.3	98.4
4.38 gr şeker/L	81.8	98.0	98.1
5 gr şeker/L	80.9	97.4	97.1

4.2. Melas besiyerinde üreyen *Rhodobacter sphaeroides*'in pH değişim ve üreme Eğrisi

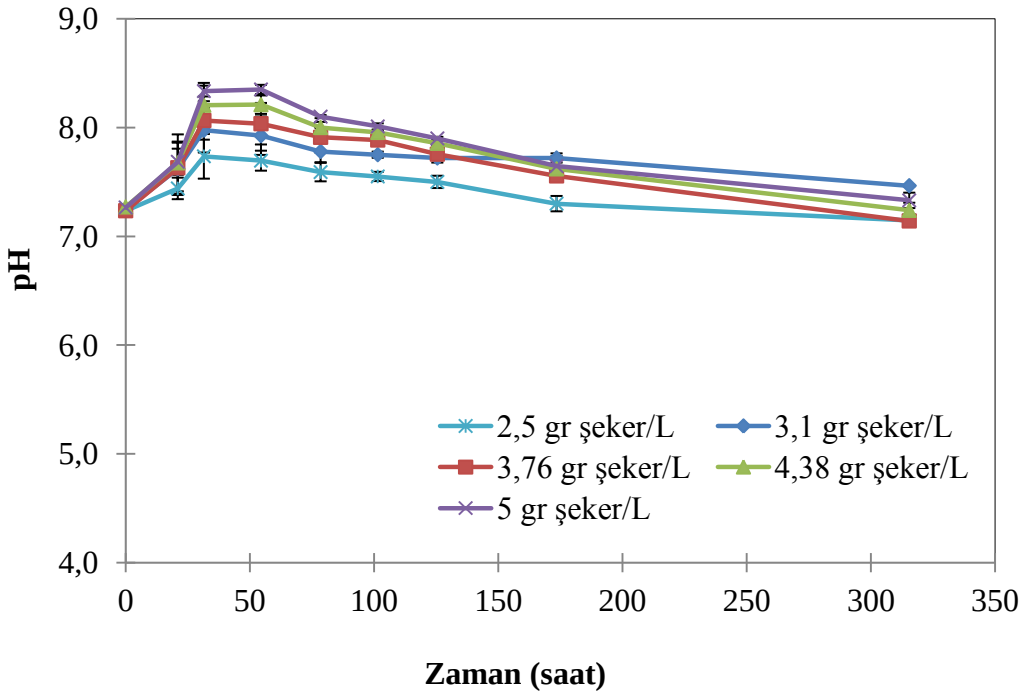
Melas besiyerlerine %10'luk ekim yapıldıktan sonra belirli aralıklarda örnek alındı. İlk önce pH'ları ölçüldü ve pH değişim eğrisinin grafiği oluşturuldu. Sonra

OD_{660nm} ölçüm yapılarak üreme eğrisi oluşturuldu. OD_{660nm}'deki ölçümler Şekil 4.2'de verilmektedir. Üreme 458,5. saate kadar devam etmiştir. Melas besiyerindeki üreme OD_{660nm}'de ölçüldüğünde, en fazla üreme en yüksek konsantrasyon olan 5 gr şeker/L'de (OD_{660nm}:5) elde edildi. Yüksek miktardaki karbon ve azot kaynağının üreme üzerinde olumlu etki yaptığı ve şeker konsantrasyonu arttıkça bakteri yoğunluğunun da arttığı bulunmuştur.

Hazırlanan melas besiyerinde pH'nın başlarda 8.5 civarına çıktığı görüldü. Daha sonraki günlerde ise pH'ın 7.0-6.9 değerleri arasında devam ettiği tespit edildi. Tampon olarak KH_2PO_4'ın uygun yoğunlukta kullanılması da pH'ın uygun aralıkta olmasına yardımcı olmuştur. pH'ın 7.0-6.9 civarında olması çok önemlidir, pH'ın bu aralıkta kalması bakteri üremesinin devamlılığını sağlamıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. *R. sphaeroides*'in melas besiyerindeki üreme eğrisi

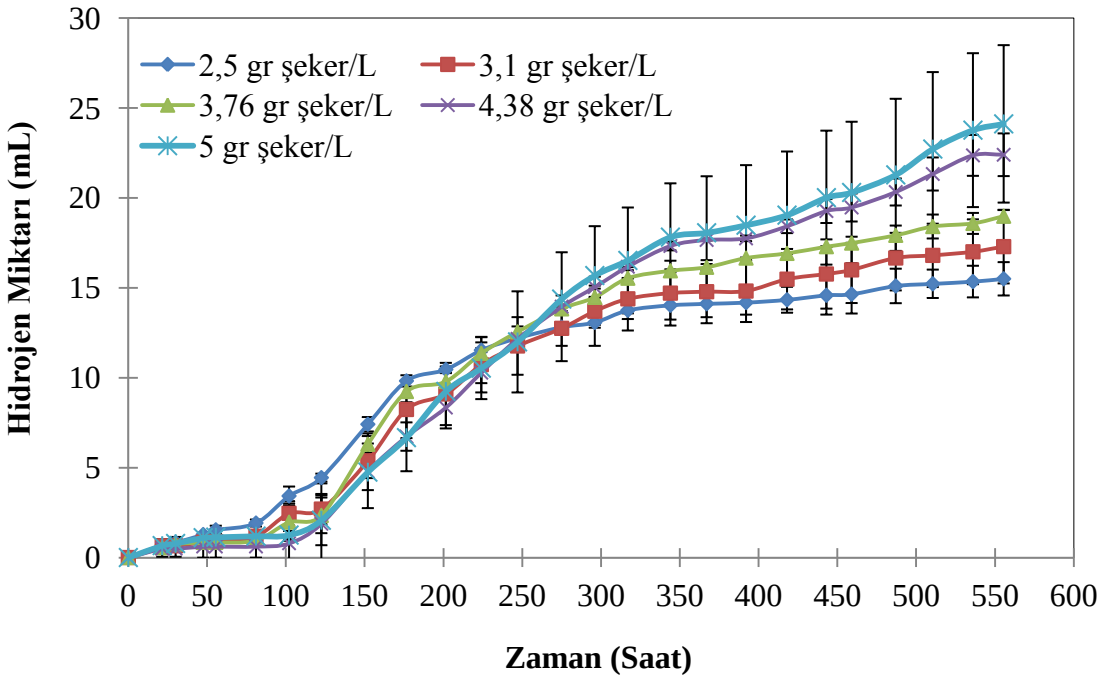


Şekil 4.3. Melas besiyerlerinin pH değişim eğrisi

Kars ve ark. (2009)'nın çalışmasında *Rhodobacter sphaeroides* mutant şusu *Hup*SL ile malat (15mM) ve asetat (30mM) içeren ortamda bakterinin üremesi incelenmiş, malatta OD_{660nm} 1.9, asetatta ise OD_{660nm} ölçüldüğünde 3.4 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında yabanil tip *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001'in melas besiyerindeki yoğunluğu daha yüksek miktarda bulunmuştur.

4.3. Melas besiyerindeki üretilen hidrojen miktarları

Melas besiyerinde üretilen toplam hidrojen miktarı Şekil 4.4'de verilmiştir. En fazla hidrojen üretimi en yüksek konsantrasyon olan 5 gr şeker/L'daki besiyerinde 24.12 mL (0.48 L H_2/L kültür) olarak elde edilmiştir. 5 gr şeker/L konsantrasyonun diğerlerine göre hidrojen miktarının yüksek çıkmasının sebebi, şeker miktarının fazlalığı olabilir. Çizelge 4.7'de de hidrojen üretim miktarları görülmektedir. En az hidrojen üretim miktarı 2.5 gr şeker/L konsantrasyondaki reaktörde elde edilmiştir.

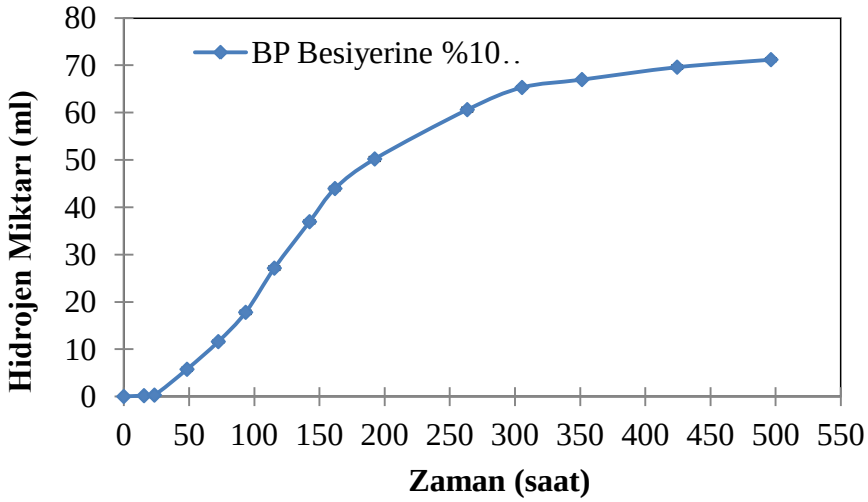


Şekil 4.4. Melas besiyerinde toplam hidrojen miktarı

Çizelge 4.7. Melas besiyerindeki *R.sphaeroides*'in ürettiği hidrojen miktarları (L H_2/ L Kültür)

Şeker Miktarına Göre Konsantrasyonları	Üretilen Hidrojen Miktarları
2.5 gr şeker/L	0,3100375 L H_2/L Kültür
3.1 gr şeker/L	0,34585 L H_2/L Kültür
3.76 gr şeker/L	0,379705 L H_2/L Kültür
4.38 gr şeker/L	0,4480256 L H_2/L Kültür
5 gr şeker/L	0,48238 L H_2/L Kültür

Rhodobacter sphaeroides ile BP besiyerindeki hidrojen üretimi için 60 mL'lik cam şeffaf şişelere hazırlanıp ekim yapılmıştır. Şekil 4.5'de de görüldüğü gibi üretilen hidrojen miktarı 71,1815 mL'ye kadar ulaşmış ve 1.42363 L H_2/L kültür olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5. *Rhodobacter sphaeroides*'in BP besiyerinde hidrojen miktarı

BP besiyerindeki üretilen hidrojen üretimi melas besiyerine göre daha yüksek miktarda bulunmuştur. Bunun sebebi BP besiyerinde aktifleştirilen bakteri tekrar besiyeri olarak BP besiyerine ekim yapılmasından dolayı uyum sağlama süreci geçirmemiş olabilir. Ayrıca sentetik malat (15 mM) ve glutamat (2mM) kullanıldığı için ve doğrudan sitrik asit döngüsüne katılarak daha kolay metabolize olmasından dolayı daha fazla hidrojen üretimi olmuş olabilir. Ancak melas besiyeriyle hidrojen üretimde amaç tcari olarak üretilmesine olanak sağlamaktır. Bu yüzden sentetik malat ve glutamatın kullanılması maliyet açısından uygun değildir.

Kars ve ark. (2006)'nın çalışmasında mutant *R. sphaeroides* O.U.001'in farklı konsantrasyonlarla demir (0.1 mM Fe-citrate) ve molibden (0.0165mM sodyum molibdate) varlığında hidrojen üretimi incelenmiştir. Molibden varlığında hidrojen üretimi 0.84 L H_2/L Kültür, demirin varlığında ise 1.14 L H_2/L Kültür olarak tespit edilmiştir. Yabanil tip *R. sphaeriodes* O.U.001 ile melas besiyerinde üretilen hidrojene göre (0.48238 L H_2/L Kültür) daha yüksek miktarlar elde edilmiştir. Bunun sebebi melas besiyerindeki karbon kaynağının eksik gelmesi olabilir. Şeker konsantrasyonu artırılarak hidrojen miktarı yükseltilebilir. Ayrıca Kars ve ark. (2006)'nın çalışmasında bakterinin mutant olması ve hidrojen üretiminde gerekli olan elementlerin demir veya molibdeninde eklenmesiyle yüksek miktarda hidrojen üretimi gözlemlenmiştir.

4.3.1. Gaz kromatografi analizleri

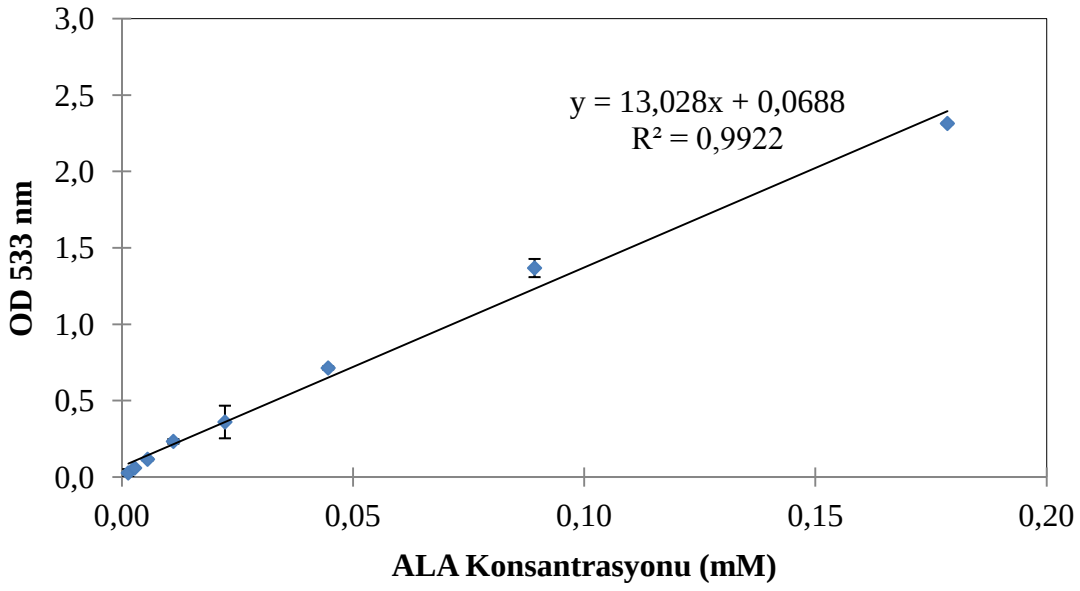
Melas besiyerinde farklı şeker konsantrasyonlardaki üretilen toplam biyohidrojen mikarları Çizelge 4.8'de verildiği gibi %91-92 oranında bulundu. Analiz süresi (8dk) içerisinde 1.293 dk'da hidrojen, 2.238 dk'da hava ve 7.346 dk'da ise karbondioksit oranları ortaya çıktı. Hidrojen üretimi gaz kromotografisi sonuçları ise ekler kısmında verilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı şeker konsantrasyonlardaki melas besiyerinde *R.sphaeroides* ile toplam üretilen biyohidrojen miktarları (%)

Şeker Konsantrasyonları	Gaz Çeşidi		
	H_2 (%)	Hava (%)	CO_2 (%)
2.5 gr şeker/L	92.47029	6.59764	0.93207
3.1 gr şeker/L	91.43256	7.82604	0.74140
3.76 gr şeker/L	91.26252	8.14214	0.59534
4.38 gr şeker/L	91.07665	8.14984	0.50351
5 gr şeker/L	91.37368	8.12924	0.49708

4.4. 5-ALA miktar tayini

Bakterilerin hücre dışı salgıladıkları 5-ALA miktarını spektrofotometrik yöntemle OD533nm'de ölçülerek ALA miktarı belirlendi. İlk önce 5-ALA miktarının ölçümü için gerekli olan standart eğrisi oluşturuldu (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. 5-Aminolevülinik asitin (5-ALA) standart eğrisi

ALA standart eğrisindeki denklem [y:13.028x + 0.0688 (R^2: 0.9922)] ile ALA konsantrasyonu (mM) hesaplandı. Örnekler OD_{533nm}'de ölçülüp değerleri kaydedildi ve denkleme [y:$0D_{533nm}$, x: ALA konsantrasyonu (mM)] göre hesaplandı.

Öncelikle hidrojen üretim için kurulan düzeneğin ALA miktarları için spektrofotometrik yöntemle 533 nm'de ölçüldü ve miktarları Çizelge 4.9'da verilmiştir. Konsantrasyonlar içerisinden sadece 5 gr şeker/L'de ALA miktarı bulundu. OD_{533nm}'de ölçüldüğünde 0.074 olarak bulunmuştur. Denklemde bulunan OD_{533nm} değeri (y) yerine koyulduğu zaman ALA konsantrasyonu (x) 3.991 olarak hesaplandı. Örnek analizinde tüpteki toplam hacim 6 mL (0.5 mL örnek + 2 mL asetat tamponu + 3.5 mL Ehrlih's reaktifi) olduğundan örnekler 12 kat (6 mL/0.5 mL) seyretilmiştir. Bu nedenle ALA konsantrasyonun sonucu 0.005mM olarak hesaplandı.

Daha sonra B12 vitamin ve levülinik asit çözeltisinin eklendiği melas besiyerinin ALA miktarlarıda spektrofotometrik yöntemle $0D_{533nm}$'de ölçüldü. Bulunan değerler ile konsantrasyonlar belirlendi. Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi B12 vitamin ve levülinik asit eklenen besiyerindeki ALA miktarları 2.5 gr şeker/L'de hariç diğer konsantrasyonlarda bulundu. En yüksek ALA miktarı 5 gr şeker/L'de 0.188 mM olarak belirlendi. 2.5 gr şeker/L'de ALA miktarı belirlenemedi. Bu konsantrasyonlarda karbon kaynağının ALA üretimi için yeterli olmadığı sonucuna varıldı. Konsantrasyonların arttırılması gerektiği tespit edildi. Bu sonuca parelel olarak 2.5 gr şeker/L hem *R.sphaeroides*'in üremesinde hem de hidrojen üretiminde en düşük performansı göstermiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada bakterinin üremesi, hidrojen ve ALA üretimi için en uygun şeker konsantrasyonunun 5 gr şeker/L olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. Hidrojen miktarı için kurulan düzeneğin melas besiyerindeki 5-Aminolevülinik asit miktarı (mM)

Yöntem	Şeker Miktarına Göre Konsantrasyonlar	OD533nm (y)	ALA Konsantrasyonu (x)	Dilusyon Faktörü	Sonuç (mM)
Kolorimetrik	**2.5 gr şeker/L**	-0.225	-0,012	12	**0.000**
Kolorimetrik	**3.1 gr şeker/L**	-0.08	-0.011	12	**0.000**
Kolorimetrik	**3.76 gr şeker/L**	-0.086	-0.012	12	**0.000**
Kolorimetrik	**4.38 gr şeker/L**	0.029	0.003	12	**0.000**
Kolorimetrik	**5 gr şeker/L**	0.074	3.991	12	**0.005**

Çizelge 4.10. Levülinik asit ve B12 vitamin eklenen melas besiyerindeki 5-Aminolevülinik asit miktarı (mM)

Yöntem	Şeker Miktarına Göre Konsantrasyonlar	OD533nm (y)	ALA Konsantrasyonu (x)	Dilusyon Faktörü	Sonuç (mM)
Kolorimetrik	**2.5 gr şeker/L**	0.004	-0.005	12	**0.000**
Kolorimetrik	**3.1 gr şeker/L**	0.093	0.002	12	**0.022**
Kolorimetrik	**3.76 gr şeker/L**	0.108	0.003	12	**0.036**
Kolorimetrik	**4.38 gr şeker/L**	0.126	0.004	12	**0.053**
Kolorimetrik	**5 gr şeker/L**	0.273	0.016	12	**0.188**

B12 vitamin ve levülinik asit eklenen melas besiyerindeki ALA miktarları hidrojen için kurulan melas besiyerinden daha fazla miktarda olduğu belirlendi. Bu sonuca göre de levülinik asit ve B12 vitaminin ALA üretimindeki etkisini görülmektedir.

Sasaki ve ark. (1991)'nın çalışmalarında besiyeri ortamına 20-60mM aralığında süksinat ve glisin eklemesiyle *Rhodobacter sphaeroides* IFO 12203 ile ALA miktarları 0.002-0.003 mM olarak belirlenmiştir. Fakat melas besiyerinde üretilen *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 ile hücre dışı ALA miktarı en yüksek 0.188 mM olarak bulunmuştur. Bunun sebebi melasta %48-50 oranında şeker olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca besiyerine eklenen levülinik asit ve B12 vitaminin etkisinden kaynaklanmış olabilir. Yine Sasaki ve ark. (2002)'nın çalışmalarında üretilen en iyi ALA üretiminin *R.sphaeroides* tarafından gerçekleştiği tespit edilmiştir.

BP besiyerinde üretilen *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 ile hidrojen üretiminden sonra aynı zamanda ALA miktarına spektrofotometreyle yöntemle bakıldığında 0.446 mM olarak bulundu. Melas besiyerinde bulunan ALA miktarından (0.188 mM) yüksek oranda bulunmuştur. Farklı karbon kaynağı kullanıldığından, bakterin ilk aktifleştirilmesi BP besiyerinde yapılıp tekrar BP besiyerine ekim yapıldığında ortam değişikliği yaşamadığında alışma süresini kısa sürede geçirmesinden ve BP besiyerinde sentetik glutamat (2mM) ve malat (15mM) kullanıldığından dolayı yüksek miktarlarda ALA üretilmesi gerçekleşmiş olabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Sürüdürülebilir bir işlemle biyokütleden çeşitli ürün ve enerji elde edilmesi biyorafineri anlayışı olarak belirtilmektedir. Bu anlayışa göre uygun maliyetli sürdürülebilir substrat oldukça önemlidir. Substratın seçimi biyohidrojen üretiminde doğrudan verimi etkileyecek bir faktördür. Bu nedenle bol miktarda, kolay bulunabilen, düşük maliyetli, işlemler sırasında kolayca parçalanabilen atık materyal seçimine dikkat edilmelidir. Bu çalışmada Konya şeker fabrikasından elde edilen değerli bir hayvan yemi olan şeker pancarı melas atık materyal olarak seçilerek *Rhodobacter sphareoides* O.U.001 tarafından biyohidrojen üretimi ile aynı zamanda ALA üretimi gerçekleştirilmiştir.

Şeker pancarı melasının besiyeri olarak uygun olup olmadığını araştırmak amacıyla bazı ön işlemlerden sonra analizler yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre de uygunluğu tespit edilmiştir. Melas %48-50 oranında sükroz içermesinden dolayı substrat olarak uygun görülmüştür. Fotosentetik bakteri olan *Rhodobacter sphaeroides*'in üremesi, biyohidrojen ve 5-ALA üretimi için melas besiyeri yeterlidir. *Rhodobacter sphaeroides* çeşitli metabolik aktivitelere sahip olduğundan dolayı tercih edilmiştir. Melas besiyerinde diğer bakterilerle de hidrojen ve ALA üretimi gerçekleşebilir. Substrat olarak atıkların kullanılması çevre düzenine, doğaya katkıda bulunur ve aynı zamanda sentetik besiyerlerin yerine çeşitli atıkların kullanıması uygun maliyetli proses geliştirilmesini sağlar.

Uygun melas besiyeri ayarlandıktan sonra *Rhodobacter sphaeroides*'in üremesi, biyohidrojen ve 5-ALA üretimi gerçekleştirilmiştir. 5-ALA üretimi kimyasal yollarla olmaktadır ve maliyeti yüksektir. Bu nedenle melas gibi yenilenebilir ve sürdürülebilir substratlardan 5-ALA elde edilmesi oldukça önemlidir. Melas substrat olarak değerlendirilerek çeşitli ön işlemlerden geçirilip başarılı bir şekilde besiyeri hazırlanmıştır ve aynı zamanda çevre dostu hidrojen ve aynı anda tıp, tarım, biyoteknoloji gibi alanlarda kullanılan 5-ALA üretimide başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Maliyet etkin bir prosesle bundan sonraki çalışmalarda 5-ALA ve hidrojen üretimi geliştirilebilir.

5.2 Öneriler

Fosil yakıtların zararları özellikle çevreye olan zararları göz önüne alındığında birçok bilim insanı bu alanlarda çevreci olan alternatif enerji kaynakları üzerine çalışmaları yoğunlaştırmıştır ve bu çalışmalar halen devam etmektedir. Bu çalışma laboratuar ölçekli olup öncü bir çalışmadır. Bu çalışma geliştirildiğinde laboratuar ölçekli olmaktan çıkıp ticari olarak üretime geçildiğinde çeşitli atıklardan elde edilen biyohidrojen Türkiye'nin hatta dünyanın enerji ihtiyacını karşılayabilecektir. Böylece çevreye zararlı olan fosil yakıtların tüketimi azalacaktır.

Hidrojen üretimiyle birlikte yüksek katma değerli yan ürünlerin (B12 vitamini, biyoplastik polihidroksi bütirat (PHB), 5-ALA) üretimide sağlanacaktır. Ayrıca bu çalışma geliştirildiğinde kimyasal yollarla üretilen ALA uygun maliyetle elde edilip ticari boyuta ulaşılabilecektir ve elde edilmesi kolay bir madde olacaktır. Üretilen ALA kanser tedavisinde, herbisit, pestisit, bitkilerin büyümesini teşvik edici bir madde gibi çeşitli alanlarda kullanıldığı için bu araştırmalar geliştirilecek ve ALA'nın daha fazla kullanma alanı ortaya çıkacaktır.

İleriki çalışmalar hem teknolojinin ileri taşınmasına hemde ekonomiye katkı sağlayacağından toplam hayat kalitesi artacak ve biyosferin korunması sağlanacaktır.

KAYNAKLAR

Alnıak M.O., Bayramoğlu F.M., 2009, "Hidrojen Enerjisi ve Ekonomisi", IV. Ulusal Hidrojen Enerjisi Kongresi ve Sergisi, Kocaeli, 279-285.

Akay P., 2005, Enerji Kaynakları ve Yenilenebilir Enerji, www.eie.gov.tr/turkce/en_tasarrufu/en_tas_etkinlik/2005_bildiriler/oturum7/Pinar Akay.doc

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.

Anonymous, 1998. Annual Energy Review 1997. Rep. DOE/EIA-0384(97). Washington, DC: Energy Inf. Admin., US Dep. Energy.

Argun H., Kargı F., Kapdan I.K., Oztekin R., 2007, "Nişasta İçeren Zirai Atıklardan Fermantasyon ile Biyolojik Hidrojen Gazı Üretimi". 7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, İzmir, 24-27 Ekim, 435-442.

Arıkbıyıklı T., 2007, "Biyohidrojen, YeşiL Enerji", http://www.bilimvegelecek.com.tr/?goster=935.

Bahadır T., 2009, "Yenilenebilir Enerji Kaynakları Kapsamında Biyolojik Hidrojen Üretimi" Doktora Semineri, Fen Bilimleri Enstitüsü, O.M.Ü.

Beale S.I., 2006, Biosynthesis of 5-Aminolevulinic Acid, Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications, eds: Grimm B., Porra R.J., Rüdiger W., Scheer H., Springer, The Netherlands, 147–158.

Biebl, H., and Pfenning, N. 1981, "Isolation of Members of the Family Rhodospirallaceae" The Prokaryotes, New York: Sringer-Verlag, 267-273.

Bilim ve Teknik dergisi, 2009, "Kanser Tedavisinde Fotodinamik Terapi", yıl 42., sayı 498., Mayıs.

Bilim ve Teknik Dergisi, 2006, Yeni UFUKLARA, Hidrojenli GELECEK.

Birol A., Kundakçı N., 2002, Fotodinamik Tedavi, Türkiye Klinikleri Dermatol, 10, 222-8.

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

Boztepe, Mutlu, 2009, İzmir ve Çevresinde Yenilenebilir Enerji Kaynakları Potansiyeli ve Kullanımı, TMMOB İKK İzmir Kent Sempozyumu, İzmir.

Caumette. P., 1984, "Distribution and Characterization of Phototrophic Bacteria Isolated from the Water of Bietri Bay (Ebrie Lagoon, Ivory- Coast) Canadian Journal of Microbiology. 30: 273.

Chaikritsadakam A., Prasertsan P., Boonsawang P., 2004, Production of 5-Aminolevulinic Acid from Monosodium Glutamate Effluent by Halotolerant Photosynthetic Bacterium (*Rhodobacter capsulatus SS3*), The Joint International Conference on Sustainable Energy and Environment (SEE), Hua Hin, Thailand, 980-8.

Cherubini F., Jungmeier G., 2010, LCA of A Biorefinery Concept Producing Bioethanol, Bioenergy, and Chemicals From Switchgrass, Int J Life Cycle Assess, 15, 53–66.

Çakar M., Caner B.,Ümmühan F., Mehmet K., 2009, Yenilenebilir Enerji Kaynakları ve Ulaşım Sistemlerinde Kullanım Uygula-ması, V. Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu, Diyarbakır.

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

Das, D., Khanna, N., Veziroğlu, T.N., 2008, Recent Developments in Biological Hydrogen Production Processes, Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly, 14, 57-67.

Demirbaş A., 2009, "Biohydrogen for Future Engine Fuel Demands", Springer-Verlag London Limited, 275.

Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q., 1998, Photodynamic Therapy, J Natl Cancer Inst, 90, 889-905.

Enerji Tabii ve Kaynaklar Bakanlığı, 2012, "2011 Yılı Enerji Dengesi," http://www.enerji.gov.tr/EKLENTI_VIEW/index.php, son erişim tarihi: 19.12.2012.

Ensign S.A., Ludden P.W., 1991, "Characterization of the CO oxidation/H2 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.

Erdoğan, Dilek, Jeotermal Enerji, Yenilenebilir Enerji Kaynakları, http://kongreikt.ege.edu.tr/cd/pdf/26.pdf

Eroğlu E., Gündüz U., Yücel M., Türker L., Eroğlu İ., 2004, Photobiological Hydrogen Production by Using Olive Mill Wastewater as a Sole Substrate Source, International Journal of Hydrogen Energy, 29, 163-71.

Fascetti, E., D'Addario, E., Todini, O. ve Robertiello, A., 1998, "Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acid derived from the fermentation of source selected municipal wastes", Inter J of Hydrog Energ, 23, 753-760.

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

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

Hatti-Kaul R., Törnvall U., Gustafsson L., Börjesson P., 2007, Industrial Biotechnology for the Production of Bio-Based Chemicals–A Cradle-To-Grave Perspective, TRENDS in Biotechnology, 25(3), 119-24.

Holladay J.D., Hu J., King D.L., Wang Y., 2009, "An Overview of Hydrogen Production Technologies", Catalysis Today, 139, 244-260.

Holt, J. G., Stanley, J. T., Bryant, M. P. And Pfenning, M. P. (Editors).,1984, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.3, Williams and Wilkins, Baltimore.

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.

İDER, S. Kemal, Hidrojen Enerji Sistemi, TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası Dergisi, Sayı 134, İstanbul.

Joshi M.H., Tabita, F.R., 1996, A Global Two Component Signal Transduction System That Integrates the Control of Photosynthesis, Carbon Dioxide Assimilation, and Nitrogen Fixation, *Proceedings of the National Academy of Sciences Biochemistry*, 93,14515-20.

Kalinci Y., Hepbasli A., Dincer I., 2009, "Biomass-Based Hydrogen Production: A Review and Analysis", International Journal of Hydrogen Energy, 34, 8799-8817.

Kaparaju K., Serrano M., Thomsen A.B., Kongjan P., Angelidaki I., 2009, Bioethanol, Biohydrogen and Biogas Production from Wheat Straw in a Biorefinery Concept, Bioresource Technology, 100(9), 2562-68.

Kapdan I.K., Kargi F., 2006, "Bio-hydrogen Production from Waste Materials", Enzyme and Microbial Tecnology, 38, 569-582.

Kars G., Gündüz U., 2010, Towards a Super H_2 Producer: Improvements in Photofermentative Biohydrogen Production by Genetic Manipulations, International Journal of Hydrogen Energy, 35, 6646-56.

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.

Kaygusuz K. ve Sarı A., 2003, "Türkiye'nin Mevcut Enerji Durumu, Sürdürülebilir,Kalkınma ve Yenilenebilir Enerji Kaynakları" Yeni ve Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu, TMMOB, Kayseri, (3-4 Ekim 2003), 347-356.

Keleş R. ve Hamamcı C., 2002, "Çevrebilim", İmge Kitabevi, Ankara.

Koku, H., Eroglu, I., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L., 2002, "Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*", International Journal of Hydrogen Energy, 27(11-12): 1325-1329.

Kotay S.M., Das D., 2008, "Biohydrogen as a Renewable Energy Resource- Prospects and Potentials", International Journal of Hydrogen Energy, 33, 258-263.

Kovács K.L., Maróti G., Rákhely, G., 2006, "A novel Approach for Biohydrogen Production", International Journal of Hydrogen Energy, 31, 1460-1468.

Külekçi, Ö.C., 2009, Yenilenebilir enerji Kaynakları Arasında Jeotermal Enerjinin Yeri ve Türkiye Açısından Önemi, Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi, Cilt:1, Sayı:2, Ankara.

Lee, C.M., Chen, P.C., Wang, C.C. ve Tung, Y.C. 2002, "Photohydrogen production using purple nonsulfur bacteria with hydrogen fermentation reactor effluent", Inter J of Hydrog Energy, (27), 1309- 1313.

Levin B.D., Chahine R., 2010, "Challenges for Renewable Hydrogen Production from Biomass", International Journal of Hydrogen Energy, 35, 4962-4969.

Levin D.B., Pitt L., Love M., 2004, "Biohydrogen Production: Prospects and Limitations to Practical Application", International Journal of Hydrogen Energy, 29, 173-185.

Li J.M., Brathwaite O., Cosloy S. D., Russell C. S., 1989, 5-Aminolevulinic Acid Synthesis in *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology, 171(5), 2547-52.

Lindquist, J. A. 1999 "A Summary of Photosynthetic Bacteria" General Microbiology: A Laboratory Manual. McGraw-Hill.

Mackenzie C., Eraso J.M., Choudhary M., Roh J.H., Zeng X., Bruscella P., Puskas A., Kaplan S., 2007, Postgenomic Adventures with *Rhodobacter sphaeroides*, Annual Review of Microbiology, 61, 283-307.

Mackenzie C., Choudhary M., Larimer W. F., Predki F. P., Stilwagen S., Armitage P. J., Barber D. R., Donohue J. T., Hosler P. J., Newman E. L., Shapleigh P. J., Socket E. R., Zeilstra-Ryalls J., Kaplan S., 2001, The Home Stretch, A First Analysis of the Nearly Completed Genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1., Photosynthesis Research, 70, 19-41.

Mathews, J., Wan,g G., 2009, Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production, International Journal of Hydrogen Energy, 34, 7404-7416.

Mazza, Patrick., 2004, "Farm Groups Pushing for Renewable Energy Standarts", Harvesting Clean Energy Issue Brief, August, 5.

Melnicki, M. R., Bianchi, L., Philippis, R. D. ve Melis, A., 2008, Hydrogen production during stationary phase in purple photosynthetic bacteria, International Journal of Hydrogen Energy, 33, 6525-6534.

Miyake J., Matsunaga T., Pietro A.S., 2001, "Biohydrogen II An Approach to Environmentally Acceptable Technology", PERGAMON, 41-49.

MMO, 2012. Türkiye'nin Enerji Görünümü, Yayın No: MMO/588, TMMOB Makina Mühendisleri Odası, Ankara.

Mutlu A., 2002, "Nükleer Demodelik mi, Sürdürülebilir Enerji mi", Standart, Temmuz, 66.

Nath, K. ve Das, D., 2009, Effect of light intensity and initial pH during hydrogen production by an integrated dark and photofermentation process, International Journal of Hydrogen Energy, doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.11.065.

Nath K., Das D., 2004, "Improvement of Fermentative Hydrogen Production: Various Approaches", *Applied Microbiology* and Biotechnology, 65, 520-529.

Ni M., Leung D.Y.C., Leung M.K.H., Sumathy K., 2006, "An Overview of Hydrogen Production from Biomass", Fuel Processing Technology, 87, 461-472.

Özemre A.Y., 1996, "Stratejik Meta Olarak Enerji", 1. Uluslararası Nükleer Enerji ve Çevre Sorunları Sempozyumu, Edirne, 70-81.

Özgür E., Astrid M.E., Peksel B., Louwerse A., Yücel M., Gündüz U., Claassen P.A.M., Eroğlu İ., 2010, Biohydrogen production from beet molasses by sequential dark and photofermentation, International Journal of Hydrogen Energy, 35, 511-8.

Pellerin N. B. and Gest H., 1983, "Diagnostic Features of the Photosynthetic Bacterium *Rhodopseudomonas sphaeroides*" Current Microbiology. 9: 339-344.

Potts L.W., 1998, Chester Progressive, Sept. 16. Chester, CA, p. 9B.

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.

Uyar B, Eroğlu İ, Yücel M, Gündüz U, Türker L. 2007, Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors. Int J Hydrogen Energy, 32(18):4670e7.

Şahin M., 2006, "Hidrojen Enerjisi Teknolojileri", UHK Özel Baskısı.

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.

Sasaki K., Watanabe M., Tanaka T., Tanaka T., Biosynthesis, 2002, Biotechnological Production and Applications of 5-Aminolevulinic Acid, Appl. Microbiol. Biotechnol., 58, 23–29.

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.

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.

Savin J., 2003, "Enerji İçin Yeni Bir Gelecek Yaratmak", Dünyanın Durumu, Çev. Şehnaz Tahir Gürçağlar, TEMA Vakfı Yayınları, İstanbul, 103-135.

Sørensen B., 2005, "Hydrogen and Fuel Cells Emerging Technologies and Applications", Elsevier Academic Press, New York, 450.

Tangprasittipap A., Prasertsan P., 2002, 5-Aminolevulinic Acid from Photosynthetic Bacteria and Its Applications, Songklanakarin J. Sci. Technol., 24(4), 717-25.

Tangprasittipap A., Prasertsan P., Choorit W., Sasaki K., 2007, Biosynthesis of Intracellular 5-Aminolevulinic Acid by a Newly Identified Halotolerant *Rhodobacter sphaeroides*, Biotechnology Letters 29, 773–78.

Taylor G., 2008, Biofuels and the Biorefinery Concept, Energy Policy, 36, 4406–09.

Troshina O., Serebryakova L., Sheremetieva M., Lindblad P., 2002, "Production of H2 by the Unicellular Cyanobacterium Gloeocapsa Alpicola CALU 743 during Fermentation", International Journal of Hydrogen Energy, 27, 1283-1289.

Uyar B., Eroğlu İ., Yücel M., Gündüz U., 2009, Photofermentative Hydrogen Production from Volatile Fatty Acids Present in Dark Fermentation Effluents, International Journal of Hydrogen Energy, 34, 4517-23.

Ün T. Ü., 2007, Hidrojen Enerjisi, http://www.genbilim.com/ index.php?option=com_content&task=view&id=1893

Ünalan S., 2002, Alternatif Enerji Kaynakları, Ders Notları.

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.

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.

Wyman C.E., 1999, Biomass ethanol: Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges. Annu. Rev. Energy Environ. 24:189 - 226.

www.bbc.co.uk/turkish/indepth/stroy/2006/02/060216_energy_renewables.sthml

www.energyquest.ca.gov/story/chapter20.html

www.enerjienstitusu.com/2011/05/23/dunya-enerji-kaynaklarinin-100-yillik-omrukaldi/

www. hydrogen.cankaya.edu.tr/sunum/sunum4.ppt.

www.hydrogen.energy.gov/pdfs/review04/hpd_p7_evans.pdf

www.konyaseker.com.tr/yenilenebilir_enerji_urunleri

www.meliksahtekin.com/?pnum=15&pt=Hidrojen%20Enerjisi

www.obitet.gazi.edu.tr/obitet/alternatif_enerji/

www.obited.gazi.edu.tr/onitet/alternatif_enerji/Hidrojen_Enerjisi.htm

www.tusiad.org/turkish/rapor/enerji/pdf/sec16.pdf

Yetiş M., Gündüz U., Eroglu 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(11), 1035-41.

Yılmaz İ., Mustafa İ., Şükrü S., 2003, "Türkiye Rüzgar Enerjisi Potansiyelinin Değerlendirilmesi", Yeni ve Yenilenebilir Enerji Kaynakları Sempozyumu, TMMOB, 3-4 Ekim 2003, Kayseri, 399-401.

Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S. ve Takasaki, Y. 1998, "H2 production from starch by mixed culture of *Clostridium buytricum* and *Enterobacter aerogenes",* Biotechnol. Letters. (20), 143-7.

Yokoi, H., Maki, R., Hirose, J. ve Hayashi, S. 2002, "Microbial production of hydrogen from starch manufacturing wastes", Biomass Bioener. (22), 89-395.

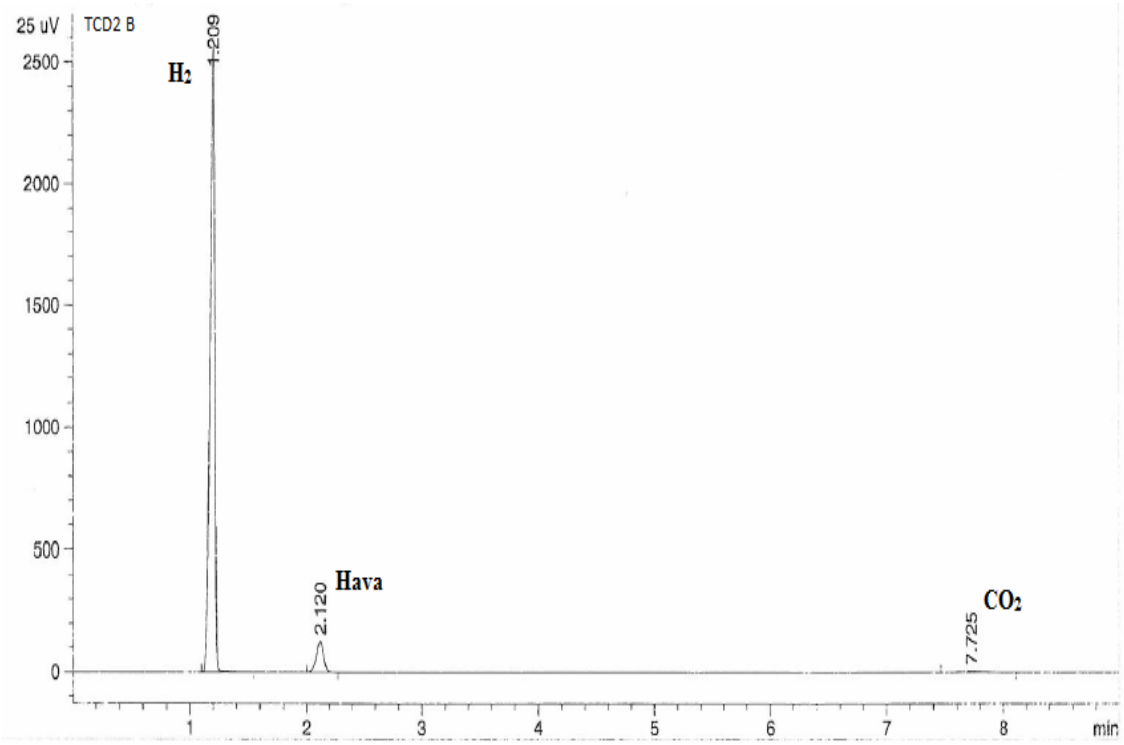
Yumurtacı Z., Bekiroğlu N., Akaryıldız E., 2002, Hidrojen Enerjisi Kullanımında Temel Kriterler, Tesisat Mühendisliği Dergisi, Sayı:72, İstanbul.

Yumurtacı Z., ve Öztürk R., 2007, Hidroelektrik Enerji, http://www.genbilim.com/content/view/1473/84/

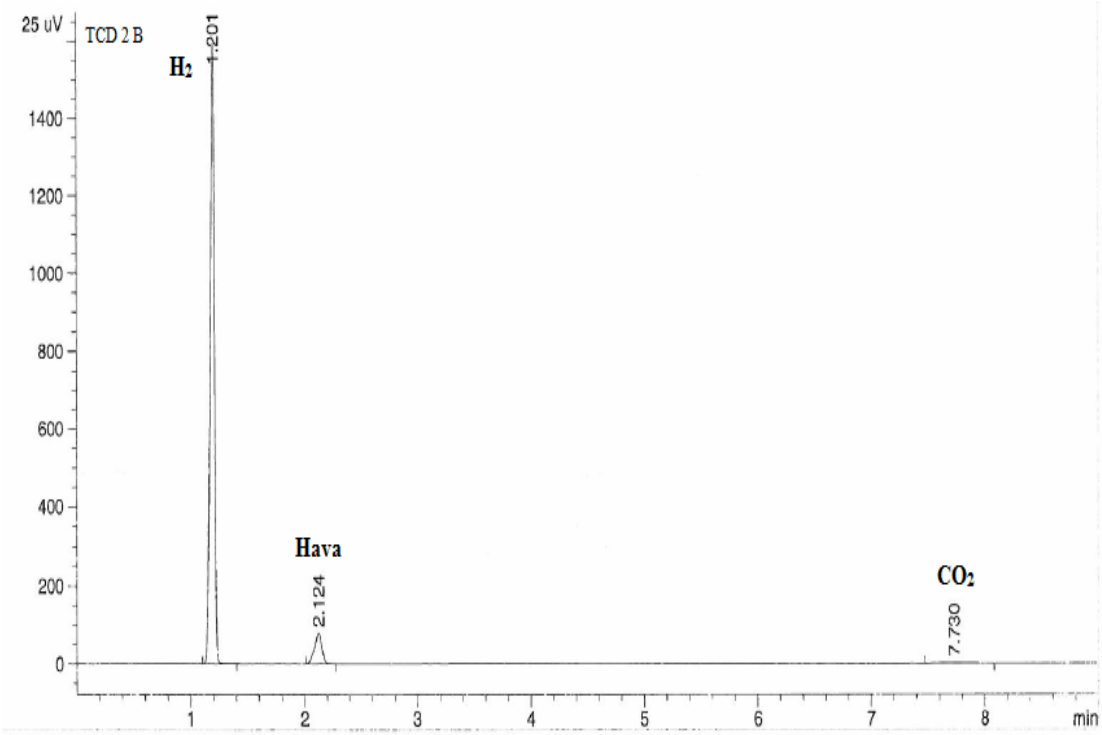
Zhu H., Suzuki T., Tsygankov A.A., Asada Y., Miyake J., 1999, "Hydrogen Production from Tofu Wastewater by Rhodobacter sphaeroides İmmobilized in Agar Gels", International Journal of Hydrogen Energy, 24, 305-310.

EKLER

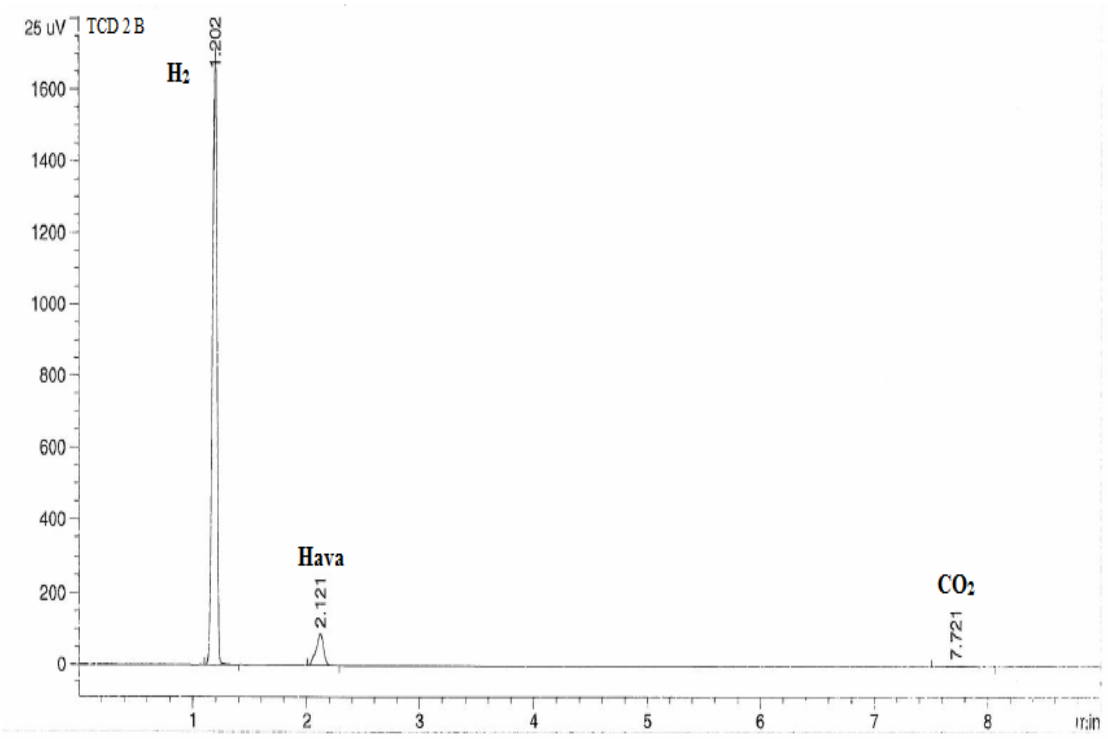
EK-1 2.5 gr/L konsantrasyondaki melas besiyerinin gaz kromotografisi sonucu



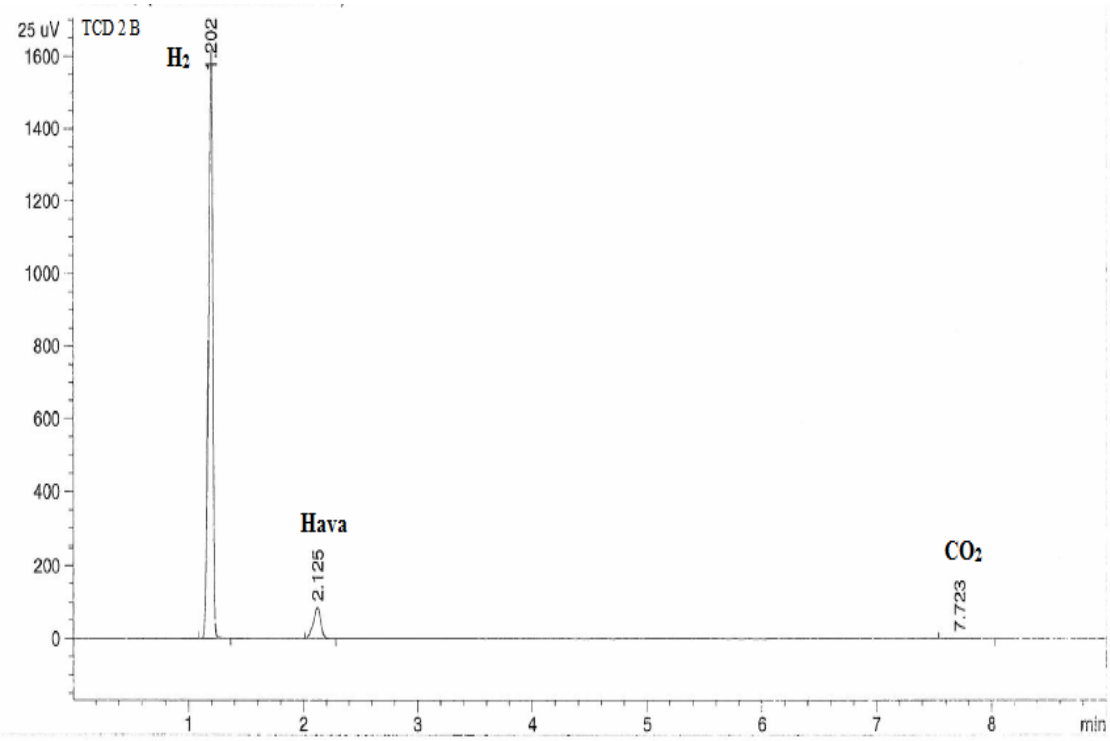
EK-2 3.1 gr/L konsantrasyondaki melas besiyerinin gaz kromotografisi sonucu



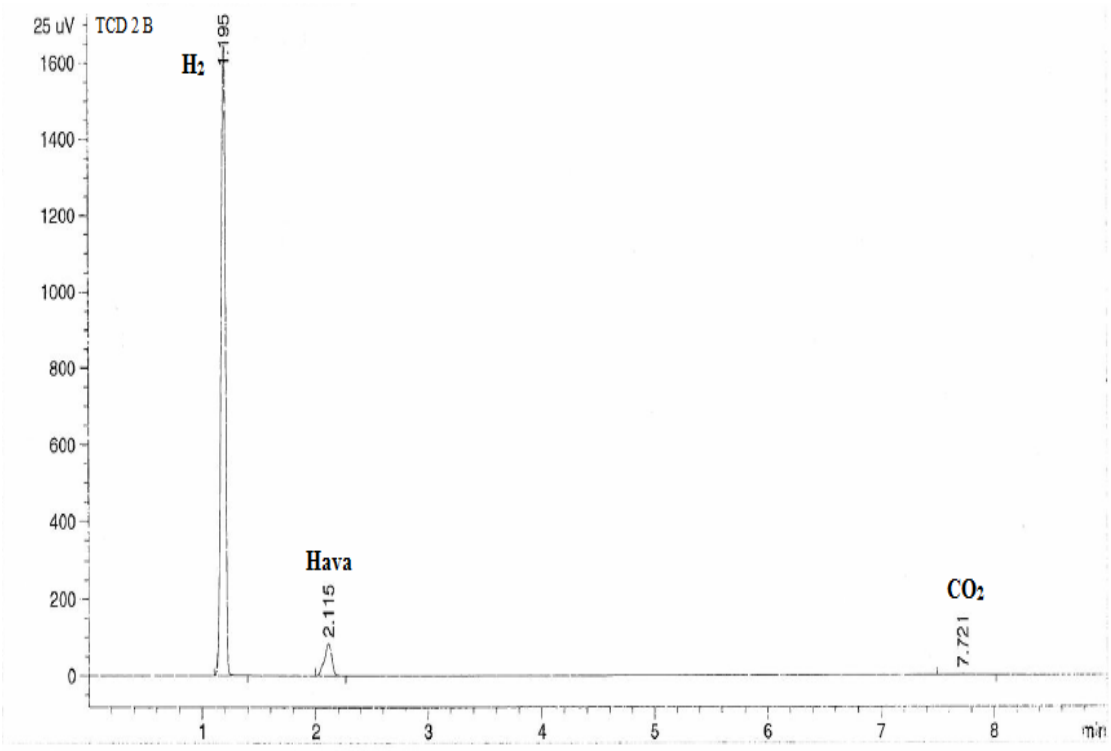
EK-3 3.76 gr/L konsantrasyondaki melas besiyerinin gaz kromotografisi sonucu



EK-4 4.38 gr/L konsantrasyondaki melas besiyerinin gaz kromotografisi sonucu



EK-5 5 gr/L sonsantrasyondaki melas besiyerinin gaz kromotografisi sonucu



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ümmühan ALPARSLAN
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : KONYA, 15.03.1987
Telefon : 05547301013
Faks : -
e-mail : u.alparslan@windowslive.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Özel Başak Koleji, Meram, Konya	2005
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Selçuklu, KONYA	2011
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi Biyoloji A.B.D., Selçuklu, KONYA	2014
Doktora	:		

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

Kars G. ve Alparslan Ü., 2013, Valorization of sugar beet molasses for the production of biohydrogen and 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in a biorefinery concept, 38, 13 kasım, 14488-14494.

Kars G. ve Alparslan Ü., 2012, Photofermentative biohydrogen production from sugar beet molasses, New biotecnology, 15TH European congress on biotecnology, İstanbul, poster 1.1.28, 29, 23-26 eylül, 46 (Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır).

Kars G. ve Alparslan Ü., 2012, Fotofermentasyon ile melastan biyohidrojen üretimi, 17. Ulusal biyoteknoloji kongresi, 15TH European congress on biotecnology, İstanbul, sözlü sunum, 23-16, 94-97 (Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır).

Kars G., Alparslan Ü. ve Ceylan A., 2012, Biyorafineri anlayışı ile melastan 5-Aminolevülinik asit (5-ALA) ve biyohidrojen üretimi, 2.Ulusal moleküler biyoloji ve biyoteknoloji kongresi, Antalya, sözlü sunum, 15-18 kasım (Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır).

Kars G., Alparslan Ü. ve Ceylan A., 2013, Aminolevülinic acid and biohydrogen production from agrondustrial by-products in a biorefinery concept, Biorefinery for food, fuel and materials, Hollanda, sözlü sunum, 7-10 nisan, 75 (Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır).

Kars G. ve Alparslan Ü., 2013, Enhanced biohydrogen and 5-ALA productions with the optimization of culture conditions, The sixth international exergy, energy and enviroment symposium, Rize, sözlü sunum, 1-4 temmuz, 38.

Kars G. ve Alparslan Ü., 2013, Biyorafineri kapsamında biyohidrojen ve 5-ALA üretimi, 9.Ulusal temiz enerji sempozyumu, Konya, sözlü sunum, 25-28 aralık, 467-472.