

TEKNOFEST
HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ
FESTİVALİ
BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

TAKIM ADI

MİKRONANT

PROJE ADI

Mikrobiyal endoglukanazın rekombinant olarak ifadesi karakterizasyonu ve lignoselülozik hammadde kaynaklarının hidrolizi üzerine etkisinin araştırılması

BAŞVURU ID

55272

KATEGORİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON

İÇİNDEKİLER

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)	3
2. Problem/Sorun:	4
3. Çözüm.....	5
4. Yöntem	7
4.1. Mikroorganizma temini ve çoğaltılması	7
4.2. Vektör seçimi ve ligasyon	8
4.3. Kompetan hücre, transformasyon ve restriksiyon kesim	9
4.4. Protein ekspresyonu.....	10
4.5. Selülazın saflaştırılması.....	10
4.6. Enzim aktivitesinin belirlenmesi	10
4.7. Toplam protein miktarının tayini	11
4.8. Selülaz enziminin karakterizasyonu	11
4.8.1. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	11
4.8.2. Sıcaklığın enzim kararlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi	11
4.8.3. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	11
4.8.4. pH'nın enzim kararlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi.....	11
4.8.5. Deterjanlar, inhibitörler ve NaCl'nin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi	12
4.8.6. Deterjanlar, inhibitörler ve NaCl'nin enzim kararlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi	12
4.8.4.Selülaz enziminin Km ve Vmax değerlerinin hesaplanması	12
4.9. Enzimatik hidroliz	12
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü	13
6. Uygulanabilirlik.....	13
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.....	14
8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):	15
9. Riskler	16
10. Proje Ekibi.....	16
11. Kaynaklar	16

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

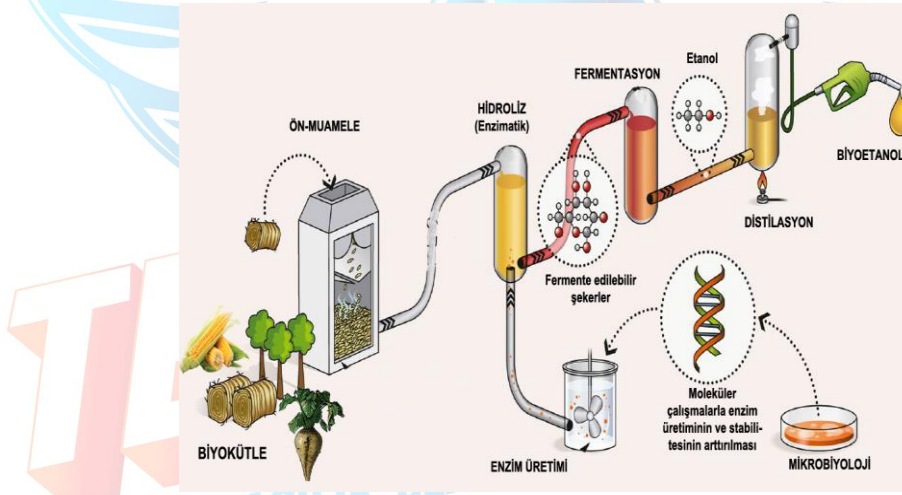
Dünya nüfusundaki hızlı artışa ve artan endüstriyel faaliyetlere bağlı olarak enerji tüketimi artmaktadır ve günümüzde kullanılan enerji kaynakları büyük oranda fosil yakıtlara bağımlıdır. Fosil yakıt kullanımının sera gazı emisyonu, küresel ısınma, hava kirliliği, asit yağmurları gibi etmenler üzerinde olan ekolojik dezavantajlarından dolayı yenilenebilir enerji kaynaklarına ilgi artmaktadır. Kullanılmakta olan enerji kaynaklarının rezervlerinin sınırlı olması da yenilenebilir bir enerji kaynağına ihtiyaç duyulma sebebidir. Alternatif enerji kaynağı olarak biyoetanol kullanılmaya başlamıştır. Biyoetanol, tahıl alkolü veya etil alkol isimleriyle ya da kimyasal olarak C₂H₅OH ve EtOH formülleriyle tanımlanabilir ve 1894 yılından bu yana çeşitli taşıt türlerinde yakıt olarak kullanılmaktadır. Brezilya ve Amerika Birleşik Devletleri üretilen biyoetanolün %62'lik kısmının üreticisi konumundadır ve bu alanda lider konumundadır. Bu nedenle biyoetanol üretimi ve kullanımı için ülkeler yarışır konuma gelmiştir (M. Karadayı, 2016). Biyoetanol üretimi; fosil yakıt üretim ve işleme maliyetleri ile kıyaslandığında daha pahalı olmamakla birlikte daha çevreci bir yaklaşımdır. Ayrıca üretimi ve muhafazası diğer yakıtlara göre daha kolaydır. Biyoetanol üretimi için şeker pancarı, mısır ve pirinç gibi sukroz ve nişasta içeren çeşitli hammaddeler kullanılabilir. (Adıgüzel A.O.,2013). Fakat bu hammadde kaynaklarının hem insan hem de hayvan beslenmesinde gerekli gıda maddeleri olmaları, bunların biyoetanol üretiminde kullanılabilirliği üzerine tartışmalara yol açmaktadır. Bu sorunun çözümü ise biyoetanol üretiminde hammadde olarak tarım ürünlerinin hasat sonrası geriye kalan artıklar, çimen ve ot türleri, marangozluk ve kerestecilik artıkları (talaş) ve kağıt endüstrisinden elde edilen atıklar gibi gıda olarak tüketilmeyen konumda olan lignoselülozik biyokütlenin kullanılmasında aranmaktadır (M.Karadayı,2016). Lignoselülozik atıkların kullanılması CO₂ emisyonunu da büyük oranda düşürerek, atmosfere salınan net CO₂ miktarını azaltmaktadır (Ö.Yıldırım,2020). Endüstriyel olarak lignoselülozik biyokütleden etanol üretimi temel olarak ön-muamele, hidroliz, fermantasyon, ürünlerin ayrıştırılması ve saflaştırılması olmak üzere dört ana bölümden oluşan “ayrı sakkarifikasyon ve fermentasyon” (SHF: seperate hydrolysis and fermentation) prosesi ile gerçekleştirilmektedir (Melikoğlu M. ve Albostan A., 2011). Bununla birlikte, maliyetin düşürülmesi ve ürün verimliliğinin artırılması için hidroliz ve fermentasyon basamaklarının aynı anda gerçekleştirildiği “birlikte sakkarifikasyon ve fermentasyon (SSF: Simultaneous saccharification and fermentation)” ve tüm basamakların tek bir mikroorganizma tarafından gerçekleştirildiği “birleştirilmiş biyoproses (CBP: consolidated bioprocessing)” prosesi de biyoetanol üretiminde kullanılabilir. Biyoetanol üretiminde kullanılan bu üç proste ürün verimliliğine etki eden en önemli etmen lignoselülozik biyokütle içerisindeki selülozun selülaz enzimleri ile fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmesidir.

Biyoetanol üretimde kullanılacak selülazların ise başta lignoselülozik biyokütlenin ön-muamelesi sonucunda açığa çıkan organik asitler, furfural, 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF), vanilin, şringaldehit, and 4-hidroksibenzaldehit gibi bileşiklerin varlığında kararlı kalabilmeleri arzu edilmektedir. Bununla birlikte; bu enzimlerde sürfektan varlığında aktivitelerini yitirmemeleri, geniş sıcaklık ve pH aralıklarında kararlılıklarını koruyabilmeleri ve substrata ilgisinin yüksek olması gibi özellikler de aranmaktadır. Mevcutta kullanılan fungal kaynaklı selülazlar bu özelliklerin birçoğunu karşılayamamaktadır.

Biyoetanol üretimi her ne kadar çevreci ve yenilenebilir olsa da üretim aşamalarında tonlarca su kullanılmaktadır. Her 1 litre biyoetanol üretimi için 1,388- 9,812 litre su kullanıldığı rapor edilmektedir (Atıf: The establishment of a marine focused biorefinery for bioethanol production using seawater and a novel marine yeast strain). Biyoetanol üretiminde su ayak izini azaltmak için

lignoselülozik biyokütlenin ön-muamelesinin deniz suyu temelli iyonik sıvılarla gerçekleştirilmesi, hidroliz ve fermantasyon süreçlerinde tatlı suyun deniz suyu ile değiştirilmesi dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar son yıllarda oldukça popüler hale gelmiştir. Deniz suyu temelli biyoetanol üretim süreçlerinde kullanılacak selülozların ise halotolerant özellikle olması beklenmektedir.

Aktinomisetler, bakteriler ve mantarlar arasında bir geçiş grubu olduğu düşünülen aerobik, Gram pozitif, filamentli bakterilerdir. Toprağın primer saprofitleridir ve toprakta lignoselüloz, hemiselüloz, pektin, keratin ve kitin gibi kompleks biyopolimerlerin dönüşümüne önemli ölçüde katkıda bulunurlar. Bununla birlikte; yüksek / düşük sıcaklık, pH ve tuzluluk gibi farklı özelliklere sahip habitatlarda geniş dağılım gösterirler ve sert koşullarda kararlı kalabilen enzimler sentezleyebilmektedirler. Literatür çalışması neticesinde sert koşullara dayanıklı enzimlerin keşfine yönelik çalışmaların daha çok *Streptomyces*, *Thermomonospora* ve *Actinomadura* genusunda sınıflandırılan türlerle gerçekleştirildiği görülmektedir. Bilgimiz dahilinde; şimdiye kadar *Jiangella* genusundaki türlerden elde edilmiş herhangi bir enzimin karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanım potansiyelinin açığa çıkarılması yönünde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. *Jiangella* genusu hiper tuzlu ortamlardan izole edilen *Haloactinopolyspora* ile aynı filogenetik daldan türemiş olup yüksek tuzlu habitatları da tolere edebilmektedirler. Bununla birlikte gelişim sıcaklıkları ve pH'ları *Haloactinopolyspora*'ya göre de daha geniş aralıklardadır. Ayrıca *Jiangella alba* gibi bitki istilalarına karşı direnç oluşturmak için selülozlar, proteinazlar, lipazlar ve esterazlar gibi hücre dışı hidrolizazları etkili şekilde sentezleyebilen endofitik bakteri türlerini de kapsamaktadır.



Şekil.1.1. Biyoetanol Üretim Basamakları (Adiguzel A.O.,2013)

Proje kapsamında, *Jiangella alba*'nın selüloz geni *Escherichia coli* Dh5 α kompetan hücresine aktarılarak klonlanacak ve *E.coli* BL21(DE3)'de ifade edilecektir. İfade edilen protein saflaştırıldıktan sonra biyokimyasal olarak karakterize edilecektir. Daha sonra, tampon içinde ve deniz suyu varlığında lignoselülozik biyokütle üzerindeki hidrolitik etkisi belirlenecektir.

2. Problem/Sorun:

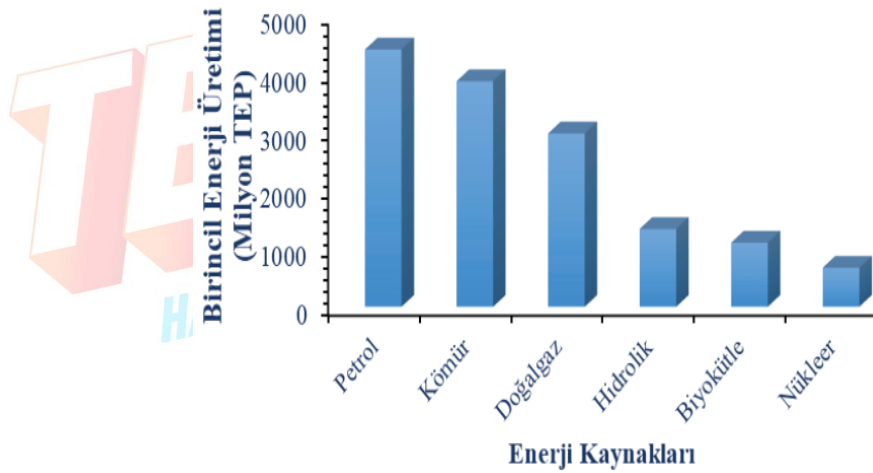
Artan fosil yakıt kullanımıyla beraber çevreye salınan CO₂ miktarında artış meydana gelmektedir. Küresel ısınma, asit yağmurları, sera gazı etkisi gibi çevreye zarar veren durumlar oluşturmaktadır. Bu durum alternatif ve yenilenebilir bir enerji kaynağını zorunlu hale getirmektedir. Biyoetanol üretiminde tarım ürünleri yaygın kullanılmakta olup bu durum ileride oluşacak besin kıtlığının önünü açmaktadır. Alternatif olarak lignoselülozik atıklar (hasat sonrası

tarımsal atıklar, talaş, odun parçaları, otsu atıklar vb.) da biyoetanol üretiminde yaygın olmasa da kullanılabilir. Ancak lignoselülozların ön muamelesi NaOH, H₂SO₄ gibi kimyasallarla yapılmakta ve hidroliz aşaması öncesinde pH'nın nötralizasyonu için su ile yıkama yapılmaktadır. Hidroliz ve fermentasyon süreci de göz önünde bulundurulduğunda 1 kg lignoselülozik biyokütleden biyoetanol eldesi için ortalama 30 litre su kullanılmaktadır (Melikoğlu M. ve Albostan A., 2011). Bu yüzden kuraklığa bağlı artan su kıtlığı nedeniyle alternatif deniz suyu kullanımına yönelim gösterilmiştir. Alternatif metotlarda ise (buhar patlama, AFEX ...vb) yüksek sıcaklık ve basınç gerekliliği sürecin hem maliyetini arttırmakta hem de sürdürülebilirliğini sınırlamaktadır

Hidroliz ve fermentasyon süreçlerinde verimlilik üzerine olumsuz etkisi olan diğer bir etmen ise lignoselülozik biyokütlenin ön-muamelesi sonrasında hidroksimetil furfural gibi sektörde kullanılan mevcut fungal enzimlerin aktivitesi üzerinde inhibe edici etki gösteren yan ürünlerin açığa çıkmasıdır. Diğer bir sorun da fungus kaynaklı üretilen selülozun yüksek sıcaklık ve yüksek basınç koşullarına ve tuza dayanıklı olmamasıdır. Önerilen projede bu sorunlara çözüm bulabilmek için endofitik, halotolerant ve termotolerant *J. alba*'nın selüloz geni genetik mühendisliği ile yüksek seviyede ifade edilmesi ve lignoselülozik biyokütlenin farklı ön-muameleler sonrasındaki hidroliz süreçlerinde kullanım potansiyeli araştırılacaktır.

3. Çözüm

Fosil yakıtların geçmiş ve günümüzde göze çarpan zararları ülkeleri alternatif olarak kullanılabilir enerji kaynaklarına yöneltmektedir. Bunun yanı sıra Türkiye'de petrol üretimi 2016 yılında 2,5 milyon ton iken ithal olarak alınan ham petrol 25,1 milyon tondur (**Tablo.3.1**). Bu değerler göstermektedir ki ülkemiz enerji ihtiyacı konusunda dışa bağımlı bir ülkedir. Petrolün çevreye verdiği zararları, ithal ediliyor olması ve alternatiflerinin mevcut olmasından dolayı bilim insanları yenilenebilir enerji kaynaklarını daha verimli kullanabilmek için güneş pilleri, rüzgar değirmenleri ve biyoenerji üretimi gibi projeler geliştirmektedirler.



Şekil 3.1. Dünyada Genelde 2015 Yılına Ait Kaynak Bazında Birincil Enerji Üretim Miktarları (milyon ton eşdeğer petrol) (IEA, 2017)

Tabloda 3.1.'de görüldüğü üzere Türkiye'de petrolden sonra en çok tercih edilen enerji kaynağı hidroliktir. Hava kirliliği, radyoaktif atık sorunu olmaması, yakıt maliyetinin olmaması gibi avantajları olsa da hidroelektrik santrallerinin maliyeti fazla ve inşaat süresi uzunluğundan dolayı kullanıma elverişli değildir. (Selami Y., 2012)

Hidrolik enerji kaynağından sonra en çok kullanılan enerji çeşidi rüzgar enerjisidir ve Türkiye'deki rüzgar hızı genellikle 1,5-7,4 m/s arasındadır bundan dolayı elektrik enerjisi üretmek, biyoetanol üretiminden daha zorlayıcı olmaktadır (Önder Ö.,2002).

Tablo 3.2. Ülkelerin 2017 Yılı sonu Yenilenebilir Elektrik Kurulu güç Kapasitesi (GW) (REN21,2017)

Enerji kaynakları	Çin	ABD	Hindistan	Almanya	Türkiye	Avrupa	Dünya
Hidrolik	313	80	47	5,6	27,2	127	1114
Rüzgar	188	89	33	56	6,8	169	539
Biyoenerji	15	16,7	9,5	8	0,63	40	122
Güneş PV	131	51	18,3	42	3,42	108	442
Güneş Termal	0	1,7	0,2	0	0	2,3	4,9
Jeotermal	0	3,6	0	0	1,06	0,9	13,5
Toplam	647	242	108	111,6	39,11	447,2	2235,4

Fosil yakıtların oluşturduğu tahribatı azaltması, ülkeyi enerjide dışa bağımlılıktan kurtarması, küresel ısınmayı azaltması, içten yanmalı motorlar üzerinde sağladığı avantajlar göz önünde bulundurulduğunda bir biyoenerji türü olan biyoetanol, petrole alternatif olarak diğer enerji türlerine göre daha ön plandadır (REN21,2017).

Türkiye'de biyoetanol üretimi TARKİM, TEZKİM ve Konya Şeker Sanayi ve Ticaret A.Ş. 'de yapılmaktadır. Nişasta bazlı hammaddenin gıda endüstrisinde kullanılması, miktarı yeterli olmayan mısır, buğday, şeker kamışı gibi hammaddelerin gıda endüstrisindeki fiyatlarını yükselteceğinden ya bu tarım ürünlerinin biyoetanolle özgün üretimi yapılmalı ya da biyoetanol üretiminde hammadde kaynağı olarak odun parçaları, hasat sonrası tarlada kalan atıklar ve talaş gibi lignoselülozik hammaddeler kullanılmalıdır. Tarımsal üretim süreçlerinde karşılaşılan alan bulma ve suya erişim soruluklarına ek olarak artan işçilik, gübre ve ilaç maliyetleri göz önünde bulundurulduğunda biyoetanol üretimi için en uygun hammadde kaynağı lignoselülozik atıklardır. Ancak, hidroliz sürecinde karşılaşılan en önemli problem enzimin lignin ve ön-muamele kaynaklı inhibitörlerin varlığındaki aktivitesinin azalması ya da tamamen kaybolmasıdır. Bu problem gerçekleştirilecek çalışma neticesinde 5-HMF, vanilin, şiringaldehit ve 4-hidroksibenzaldehit gibi inhibitörler karşısında aktivitesini koruyabilecek bir selülaz enziminin üretimi ile çözülecektir.

Biyoetanol üretiminde hammadde kaynağı olarak besin maddelerinin (nişasta, şeker kamışı, buğday, mısır...) kullanılması maliyeti arttırmaktadır. Çalışma kapsamında sorunun çözümü sert koşullara dayaklı bir selülaz enziminin üretimi ve böylece lignoselülozik hammaddenin hidroliz verimini arttırmakla gerçekleştirilecektir.

Tatlı su kullanımı ve ek mineral ilavesi maliyetlerinin çözümü ise deniz suyu temelli biyoetanol üretiminde yatmaktadır. Bunun gerçekleştirilebilmesi için ise deniz sulu ortamlarda yüksek hidrolitik aktivite gösteren selülazlara ihtiyaç vardır. Gerçekleştirilecek çalışma kapsamında üretilecek selülaz enziminin yüksek yoğunluktaki tuzlu ortamlarda dahi kararlılığını koruyacağı öngörülmektedir. Böylece hidroliz basamağı deniz suyu kullanılarak gerçekleştirilebilecektir. Ayrıca, hidroliz ve fermentasyonda deniz suyunun kullanılmasıyla Na, Cl, ve Mg gibi mikroorganizmanın ihtiyacı olan iyonların fermentasyon ortamına eklenmesinden kaynaklı ortaya

çıkan maliyet te azaltılmış olacaktır. Gerçekleştirdiğimiz literatür taraması neticesinde halotolerant enzimlerin organik çözücülerin ve deterjanların varlığında aktivitelerini yitirmedikleri görülmektedir. Literatür taramasından açığa çıkan diğer bir husus ise hidroliz aşamasında deterjan varlığı ile enzimin selüloza daha kolay ulaşabilmesidir. Bu doğrultudan bakıldığında, elde edeceğimiz enzim deterjanlar varlığında da aktif olma potansiyeline sahiptir. Böylelikle hidroliz basamağında deterjan kullanılabilir.

Hidroliz safhasında genellikle aktinomisetler, bakteriler ve mantarlar dahil çeşitli mikroorganizmalar tarafından selülaz enzimi üretilmektedir. Funguslardan *Scomyces*, *Agaricomycetes* ve *Deuteromycetes* taksonlarında sınıflandırılan çok sayıda tür mevcuttur.

Üretimde verimi arttırmak için hem lignoselülozik hammaddeyi hidroliz edebilmesinden hem de deniz suyundaki tuzluluk ve mineralizasyona dirençli olmasından dolayı *Jiangella alba* bakterisine ait selülaz enzimini tercih ettik. 15-45 °C, pH 6.5-9.0 ve %10 tuz konsantrasyonuna dayanıklı bir bakteri olmasının yanı sıra şimdiki kadar hem selülaz enzimi hem de biyoetanol kullanım potansiyeli üzerine literatürde bir araştırma bulunmamaktadır. Ancak *Jiangella alba* 7-14 gibi uzun inkübasyon süresine ve yüksek maliyete sahip olduğu için selülaz enziminin rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilmesi hem süreci hem de maliyeti ciddi oranlarda düşürecektir.

Gerçekleştirilecek proje kapsamında, küresel ölçekte yaşanan enerji ve çevre sorunlarına karşın biyoetanol üretiminde hem lignoselülozik biyokütlenin maksimum verimlilikle kullanımı hem de tatlı suya alternatif olarak deniz suyunun kullanımı amaçlanarak rekombinant DNA teknolojisi ile sert koşullara dayanıklı, -halo ve -termo tolerant selülaz enzimi üretimi sağlanacaktır (Mutlu E., 2013).

4. Yöntem

Önerilen çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yürütülecektir. Proje;

- (i) *Jiangella alba* selülaz geni rekombinant olarak klonlanması, ifade edilmesi ve saflaştırılması
- (ii) Sıcaklık, pH, metal iyonları, tuz konsantrasyonu, çözücü, inhibitörler ve deterjanların enzim üzerine etkisinin araştırılması, kinetik özelliklerinin açığa çıkarılması
- (iii) Selülaz enziminin lignoselülozik biyokütlenin deniz suyu ile gerçekleştirilmiş ön-muamelesi sonrasında yine deniz sulu ortamda hidrolizi üzerine etkisi belirlenerek deniz suyunun lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretim süreçlerinde alternatif kullanımının sağlanması olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır.

4.1. Mikroorganizma temini ve çoğaltılması

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden temin edilen saf *Jiangella alba* DSM 45237 pasajlanarak taze bir şekilde elde edilecektir. Mikroorganizmanın gelişiminde uygun ortamın sağlanabilmesi için 1 g/L oranında CaCO₃ ile desteklenmiş ISP2 besiyeri 4 g maya özütü, 10 g malt özütü, 4 g dextrose, 20 g agar 1 litre distile saf suda çözdürülecek, 1 M HCl ya da 1 M NaOH çözeltisi ile pH= 7.0 ± 0.2 hazırlanacaktır. Selülaz enzimine ait nükleotid dizi verileri (Accession number: NZ_FNUC01000003.1) NCBI veri tabanından tespit edilmiştir (Şekil 4.1.)

Jiangella alba strain DSM 45237, whole genome shotgun sequence

NCBI Reference Sequence: NZ_FNUC01000003.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>NZ_FNUC01000003.1:355162-357303 Jiangella alba strain DSM 45237, whole genome shotgun
sequence
TCAGCGCTGGCCGTCGCGCCACGGGTGCGGGCCACAGCAGCCACCGCGCCAGCAGCAGGACCGG
CCGAGCAGCACCCGGCGCCGGGGCCACCGGTGTCGGGCAAGTCTCGCCGCTGCCGTCAACGGCCGCGC
CGCGCTCGCTGCGCCGCGGGACTCGCCGCCCAGCTCGCGGACCGCCGAGGCGTCCCCTGCCCGCC
GTCCGCGCGTGTCCGAGGACTCGAGGTTGACGGTACGGAGGCGTCCGAGCCGAGCAGTTCCGGGTGCG
CCGCGCTCGCCGCGCGAGGCGGTGCGCCGTAGGGGTGATGTCGCGGCGCCAGCTCGTCCGCGCGGGTGA
ACGTCAGTCGCGCGTGTGTCGCGGTCAGCGAGCCCTCGATGGCGGCGCCGCGCGGCGTCCGCGCTCAA
GGTCACCTCCAGTTCCGCGGACGGGTACGAGCCGCGCGGCAAGGACTGCGCCGCGTCCCGGACGGCTCG
TCGATCGTCACGCGCCGCGCGGGGACGCGCCAGGTCCGCGACGACGACGTCCTGGTAGTCGAGGCGGACCA
CCTGGGTGAGCAGCGCTCGAAGCGGAGCCGACCGGAGGTCGCGGTCGCGGCGGAGCGACCGCGCCG
GTCGTCGCGGACGGTGGCGGAGCCGAGCGCCCTGTCGTCGACGGTGGGGTGGAGGTCGCGGCGCGGGCTGG
CCGCTCCCGGCAACTCGACGTCGCGCGTGTGGCGTCTCGGGTACTCGGCGTCCAGCCGCGGCGCGGACGA
CCGGGCGCTGTGAGGCAAGCGGTGCGGGCGGTTGACGGGGAGAGCTGCGGTCGATGACGCGCGCGTCC
GTGTTGCGCGGAAAGAACAGCGCTGAGACGTCGTCCTGTCGGTGTCCACGTCGAGAACAGCAGCCG
TGAGCTCGAACGCGCAGCTTCGACTGTTGGGCGCGCATCGCTCGCGGCGCGGCGATGTCGTCGCG
GTGAGCGTCCGCGCGGCGGCAACTCGCGGTTGATCAGCAGCCCTCGACTGCGGCGCACTCGACGCA
GTTACGCGACTCTCGAGGGTGTACTGCGGCGTGGGTAGGTGTGGATGTCGAGAAAGTCGAGCGGGAC
TCGCGGTCAGCGTACGACCCCGGGCGGGTAGCGGAAGTCGCGCTCGAGGCGTCCGCGGCAAGTGGC
TGGGAAAGCGTGTGAGCGGGCTTGCCACCGCGCGTGTGGTGAACGCGCCATCGTCAACATGAGTGG
GGGTCGACCTCTTGGCGGCGCGGTCGGCGCGTACGCGAGCATGTTGTCGCGCGGCGGCG
CGTGGTGTGTCGGGCAAGGACATGTCGAGGTGGTGGCGTCCGCGCGGGTGAAGTCCCGGCGCGG
CGAACGGCGCTCGTCCGCGGCGGAGCGGCTGCTGTTGTCGAGTGGAGCGCGAGGAACTGCTCATCAG
CGGGCGAGCCGCTCCGTATCTCGTGGTGAAGTTGGCGAGGTACGCGCTCTTCCGCGGACGAAAGCC
TCGTACATGATGTTGTTGCGGCGCGAGACTCTCTGGCGGCGCGCTCGCGCACAGTGTGCGAAAGT
AGTGGCGGTTCTGCGGGAACGCGTCCAGCGACGGCAGCAGTACATGCGGTTGGCGGCGCGCCGCGGAC
GAAAGTCGCGGAGGTTGTCCAGGACTCCGCGTTCGCGGTCGTTGGTGTGTCGTCGCGCGTCAACGCGG
TCCGCGTGGCGGTTGAGGTTGTCCTGGCGGCGGGGTCGAGGAAACCGGAGCGGTTGTGATGCGG
CGGCGTCTGTCGCGGCAAGCGCGGCGCGGCGCGCTCGCGGTCGATGTCGCGGCTCGAAGGTCGAGTGG
GTAGGGCTCTCGGGTTCCACGGCTGTGGCGGAGGCGGACGATGTTGATGCGCGGCGGATGAGCGG
CGGCGGCTCGGTCGAGCAGGTCAGGTCGTCGCGGCGGCGGATGCGCGGCGGCGGCTCGGCGGGT
CCTCCCGGCTCGGCGCGGCGGACGAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
ACCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
```

Şekil.4.1. Jiangella alba NZ_FNUC01000003.1 no'lu selülaöz nükleotit dizisi

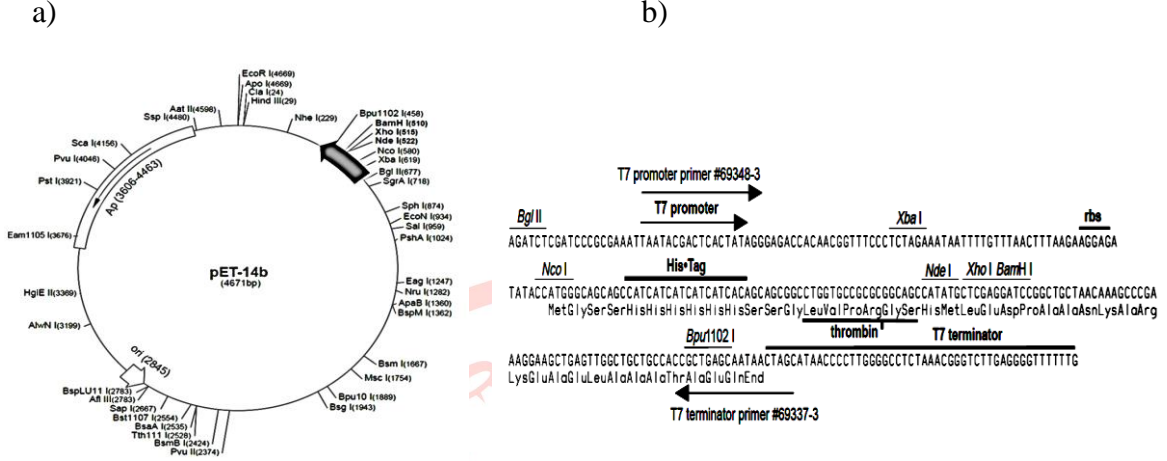
J. alba CaCO₃ ile desteklenmiş ISP2 besiyerinde (pH 7.5) 28±2°C'de 15 gün boyunca inkübe edilecektir. İnkübasyon sonrasında ise genomik DNA izolasyonunda kullanmak amacıyla hücreler santrifüj (13 000 x g) ile geri kazanılacaktır. Genomik DNA izolasyonu ticari Kit (Invitrogen PureLink Genomic DNA) kullanılarak gerçekleştirilecektir. *J. alba*'da ilgili gen bölgesi olan NCBI veri tabanından NZ_FNUC01000003.1 kodlu dizi kullanılarak primerler tasarlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu karışımı 45 µL ultra distile su (udH₂O), 20 µL Q5 Polimeraz tamponu, 20 µL GC (enhancer) 2 µL ≅ 40 ng kalıp DNA, 5 µL F primer (5'ACGGGATCCGGTGATACGGAAAAGCCTGCG3'), 5 µL R primer (5' AACGCTCGAGTTAATTTAGTTTACCCGCGC3'), 2 µL dNTP, 1 µL Q5 polimeraz enzimi ile hazırlanacaktır. Termal döngüleyicide her bir döngüde (i) 98 °C'de 30 sn, (ii) 98 °C'de 10 sn, (iii) 55 °C'de 30 sn, (iv) 72 °C'de 60 sn, (v) 72 °C'de 120 sn ve 35 döngü olacak şekilde ayarlanacaktır. Reaksiyon sonucu ortamda bulunan primerler ve agaroz jelden kurtulmak için (MACHEREY-NAGEL Nucleospin®) kit kullanılarak örnek, jelden izole edilip, saflaştırılacaktır. Ligasyon reaksiyonu için hazır hale getirilecektir.

4.2. Vektör seçimi ve ligasyon

Yüksek kopya sayısı, 100 mg/mL Amfisinilin dirençliliği, düşük hata payına sahip T7 promotörü ve bakteriyel protein ifade çalışmaları için uygunluğu sebebiyle moleküler klonlama çalışmalarımız için pET-14b plasmidi kullanılacaktır. pET-14b plasmidi içeren bakteri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi -80 °C stoklarından, amfisinilinli sıvı besiyerine ekimi yapılarak bir gece 37 °C'de 175 rpm'de inkübasyona bırakılacaktır. İnkübasyon sonrasında alınacak kültür eppendorf tüplere bölüştürülerek, 10000 rpm'de 5 dakika santrifüje edilecektir. Pellet 250 µL "Solüsyon I" (Solüsyon I: 50mM glukoz, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA) ile çözdürüldükten sonra üzerine 250 µL "Solüsyon II" (Solüsyon II: 9,1 mL udH₂O, 0,2 N NaOH ve %20 SDS) eklenecek ve 10 dakika buzda bekletilecektir. 300 µL "Solüsyon III" (Solüsyon III: 3 M potasyum asetat, 2 M glasiyal asetik asit) eklenecek ve 15-20 dakika buzda bekletilecek, daha sonra 11000 x rpm'de 15 dakika +4 °C'de santifüje edilecektir. Süpernatant yeni eppendorf tüplere alınarak izopropanol eklenecek 20 dakika oda koşullarında bekletilecektir. Oda sıcaklığında 11000 rpm'de 15 dakika santrifüje edilecektir. Pellet 65 °C'de kurutulacak, pellet distile suda çözdürülüp tek eppendorfta toplanacaktır. Eppendorfta bulunan madde miktarına bağlı olarak 1/10 oranında 20 µg/mL RNaz eklenerek 37

°C’de 15 dakika bekletilecektir. Saf plazmit DNA’sı eldesi için nucleospin® PCR-cleanup metodu kullanılacak ve sonuç agaroz jel elektroforezinde gözlemlenecektir.

Ligasyon reaksiyonu (10 µL) için; 1:1 oranında ya da 5:1 oranında hedef DNA, 20-100 ng linear vektör DNA, 1 µL 10X Thermo T4 DNA ligaz tamponu, 1 µL 5 U T4 DNA ligaz şeklinde kurulacak, bir gece 25 °C’de inkübasyona bırakılacaktır.



Şekil 4.2.1. a) pEt14b vektörü

b) Vektöre ait çoklu klonlama bölgesi

4.3. Kompetan hücre, transformasyon ve restriksiyon kesim

Transformasyon için çeşitli teknikler olsa da kolay ve ucuz olması sebebiyle ısı şoku tekniği kullanılacaktır. Bu teknikte **vektör** kimyasal metodla (CaCl_2) kompetan hale getirilmiş *E. coli* DH5 α hücrelerine transforme edilecektir. Hücreleri kompetan hale getirmek için LB Broth besiyerine DH5alfa ekimi yapılacaktır. Bir sonraki gün bu kültürden 1 ml alınarak 50 ml LB besiyerine aşılama yapılır. OD değeri 0.4’e ulaşıncaya kadar 37°C 180 rpm’de inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda örnek eppendorf tüplere 1’er ml olacak şekilde bölüştürülecektir. Hücreler 2 dk 8000 rpm’de santrifüjlenerek, süpernatant dökülecektir. Eppendorf tüpleri buzda bekletilecektir. Her tüp 250 µL CaCl_2 Solüsyonu (CaCl_2 , Gliserol ve PIPES) ile yavaşça çözülecektir. Bu işlem 2 kez tekrarlanacaktır. Son olarak, pellet 30 µL CaCl_2 solüsyonu ile çözülerek kompetan hücre hazır hale getirilecektir. Kullanılincaya kadar -80°C’de bekletilecektir.

Transformasyon için sırasıyla kompetan hücreye 3 µL ligasyon ürünü aktarılacak, hücreler +4 °C’de 20 dakika bekletilecek, ardından 42 °C de 45 saniye bekletilip +4 °C’de 2 dk inkübe edilecektir. Böylelikle ısı şoku ile hücrenin kompetan, geçirgen yapısında görevli porların önce açılıp sonra kapanması sağlanacaktır. Bu sırada ilgili geni taşıyan ya da taşımayan plazmidler hücre içine alınacaktır. Son olarak; hücreler 700 µL Luria Bertani besiyerinde (10 g/L tripton, 5 g/L maya özütü, 10 g/L NaCl, pH: 7.0 ± 0.2) homojen hale getilecektir ve 1 saat süresince 37°C, 180 rpm’de inkübasyona bırakılacaktır. İnkübasyon sonunda kültürün 100 µL’si amfisilin içeren LB agar besiyerine cam öze kullanılarak yayılacaktır. Kalan kısmı ise 3 dk 3000 rpm’de santrifüjlenip, pellet halinde başka bir amfisilinli LB agar besiyerine yayılacaktır. Böylelikle elde edilecek koloni sayısı arttırılacaktır. Petriler 16-18 saat 37 °C inkübasyona bırakılacaktır. Antibiyotiğin parçalanarak satellik olarak adlandırılan yapıların oluşmasını engellemek için inkübasyonun 18 saat ile sınırlandırılacaktır. Transformasyon verimliliğine bağlı olarak petrilerde morfolojik olarak aynı görünümde yüzlerce koloni oluşacağından rastgele seçim yapılarak koloni tarama yapılacaktır. Seçilen kolonilerin ilgili gen bölgesini taşıyıp taşımadığını anlamak için bu koloniler sıvı besiyerine

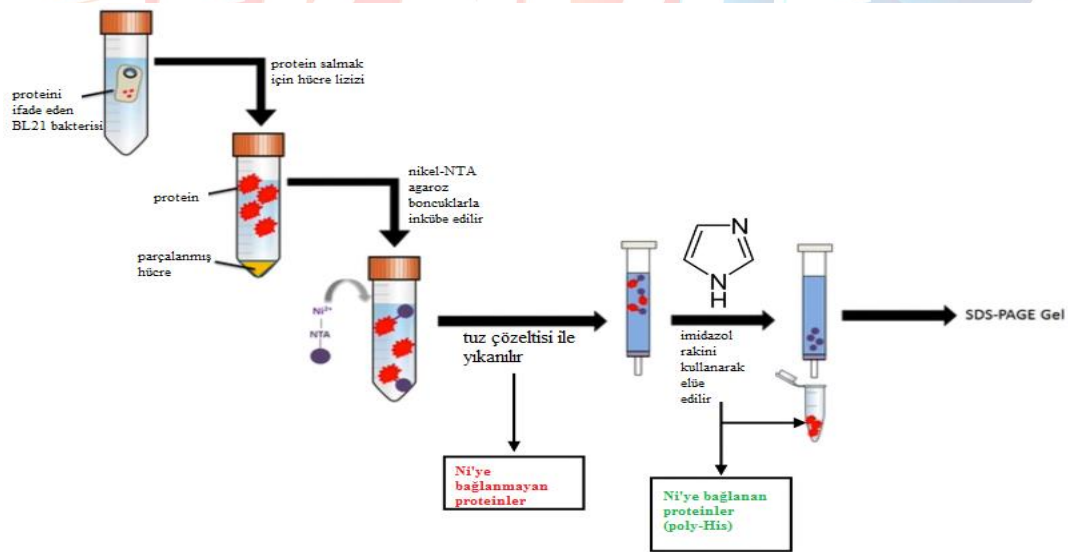
ekilecek ve plazmid izolasyonu yapılacaktır. Örnekler agaroz jelde yürütüldüğünde selülaz geni 2000-3000 baz çifti (bç) uzunluğunda görülürken, pET-14b ise 5000-6000 bç uzunluğundaki DNA bandı şeklinde görülecektir. Plasmidin istenilen gen bölgesini taşıdığı doğrulandıktan sonra genin plasmidin promotor bölgesinden itibaren okunma yönünde olup olmadığı da enzim kesimleri yardımıyla incelenecektir. DNA Star EditSeq programı ve NEBCutter V2.0 kullanılarak enzim belirlenecek, gen dizisi içeren plasmidin restriksiyon kesimi modellenerek genin vektör içerisindeki konumu belirlenecektir.

4.4. Protein ekspresyonu

Elde edilecek protein ifade ettirmek üzere *E.coli* BL21(DE3) kompetanına aktarılacaktır. IPTG derişimi, sıcaklık, büyüme süresi ve besiyeri gibi farklı parametrelerin protein ifadesi üzerine olan etkilerinin çalışmaları gerçekleştirilecektir. 1., 3., 5. ve 7. saatler arasında OD₆₆₀ = 0,4 değerine ulaşana kadar ölçüm yapılacaktır. İfadesi gerçekleşecek proteinler SDS-PAGE jel elektroforezinde gözlemlenecektir. Klonlanan genin selülaz olduğunun teyit edilmesi için Sanger dizileme hizmeti alınacaktır.

4.5. Selülazın saflaştırılması

Bakteriyel sıvı 10 kDa boyutundaki membrandan ultrafiltrasyon yapılarak yoğunlaştırılacaktır. Ardından, yoğunlaştırılmış ham enzim preparatı saflaştırma amacı ile nikel afinite kromatografisine yüklenecektir. Kolondan kolon dolgu materyalinin hacminin iki katı kadar 50 mM Tris-HCl (pH 6,5) geçirilerek histidin etiketli proteinlerin kolon dolgu materyaline bağlanması, öte yandan diğer proteinlerin ise kolondan uzaklaştırılması sağlanacaktır. Daha sonra, kolona kolon dolgu materyalinin beş katı hacminde 300 mM'lık imidazol çözeltisi (pH 7-8) eklenerek bağlanan proteinler 3 mL'lik fraksiyonlar halinde geri kazanılacaktır. Fraksiyonlar içerisindeki protein miktarı ve enzim aktivitesi tespit edildikten sonra selülaz aktivitesinin tespit ettiği fraksiyonlar birleştirilecek ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere yoğunlaştırılacaktır.



Şekil 4.6.1. Nikel- Afinite kromatografisi basamakları.

4.6. Enzim aktivitesinin belirlenmesi

Öncelikle belirlenen saatlerde kültür ortamından 1.5 ml örnek alınarak 15 dakika süre ile +4°C'de santrifüj edilecek, pellet uzaklaştırılacaktır. Süpernatant ise ham enzim olarak

kullanılacaktır. Selüloz aktivitesinin belirlenmesi için substrat olarak karboksi metil selüloz (CMC) kullanılacaktır. Enzim aktivitesi dinitro salisilik asit (DNS) metodu ile belirlenecektir (Miller vd.,1959).

Aktivite tayini için 0,5 mL ham enzim preparatı üzerine 0,5 mL substrat çözeltisi 50 mM'lık fosfat tamponu (pH: 6,5) içerisinde hazırlanmış %1'lik CMC çözeltisi) ilave edilecek ve 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılacaktır. İnkübasyon sonrasında reaksiyonun durdurmak için enzim substrat karışımına 400 µL dinitroasalisilik asit (DNS) eklenecek ve 100 °C'de 5 dakika bekletilecektir. Ardından 5 sn +4 °C'de bekletilecek 540 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılacaktır (Garriga ve ark.2017). İndirgenmiş şeker miktarı aynı metot ile hazırlanacak olan glukoz standart grafiği yardımı ile belirlenecektir ve 1 ünite (1U) enzim aktivitesi belirlenen koşullarda substrattan dakikada 1 µmol ürün salınımına sebep olan enzim miktarı olarak ifade edilecektir.

4.7. Toplam protein miktarının tayini

Çalışılacak protein ya da enzim çözeltisinin 100 µL'si üzerine 1 mL Bradford çözeltisi (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95 etanol, 100 ml %85 fosforik asit) eklenecek ve vortekslenecektir. Karışım 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra karışımın 595 nm'de absorpsiyonu spektrofotometrik olarak belirlenecektir. Çözelti içerisindeki protein miktarı dana serum albümini (BSA) standardı yardımı ile hesaplanacaktır.

4.8. Selüloz enziminin karakterizasyonu

4.8.1. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Enzim aktivitesi farklı sıcaklıklarda (20-80 °C) bölüm 4.6.'da tarif edildiği gibi belirlenecektir. En yüksek aktivitenin görüldüğü sıcaklık enzimin optimum çalışma sıcaklığı olarak değerlendirilecektir. Enzimin optimum sıcaklıkta sergilediği aktivite %100 olarak kabul edilecek olup diğer sıcaklıklardaki aktivitesi görece aktivite şeklinde hesaplanacaktır.

4.8.2. Sıcaklığın enzim kararlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi

Farklı sıcaklıklarda (20-80 °C) farklı sürelerde (0-12 saat) ön-inkübasyona bırakılan enzim çözeltilerinin aktiviteleri optimum sıcaklıkta standart olarak belirlenecektir. Ön-inkübasyona bırakılmamış enzim çözeltisinin aynı koşullardaki aktivitesi %100 olarak kabul edilerek, sonuçlar % kalan aktivite şeklinde sunulacaktır.

4.8.3. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Enzim aktivitesi farklı pH'lardaki (4-10) 50 mM'lık tamponlar içerisinde hazırlanmış enzim ve substrat çözeltileri kullanılarak bölüm 4.6.'da tarif edildiği gibi belirlenecektir. Çalışma sırasında pH 4-6, 6-8 ve 7-10 aralıkları için sırasıyla sitrat, fosfat ve Tris-HCl tamponları kullanılacaktır.

4.8.4. pH'nın enzim kararlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi

Farklı pH'larda (4-10) 1 saat süresince oda sıcaklığında ön-inkübasyona bırakılan enzim çözeltilerinin aktiviteleri optimum koşullar altında standart olarak belirlenecektir. Ön-inkübasyona bırakılmamış enzim çözeltisinin aynı koşullardaki aktivitesi %100 olarak kabul edilerek, sonuçlar % kalan aktivite şeklinde sunulacaktır.

4.8.5. Deterjanlar, inhibitörler ve NaCl'nin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda deterjan (Triton X-100, SDS, Tween-20 ve Tween80; %0,1-2), inhibitör (furfural, 5HMF, vanilin, şiringaldehit, 4-hidroksibenzoaldehit, şiringik asit, vanilik asit, salisilik asit, guaikol, kateşol, 4-hidroksi benzoik asit, sinamik asit, p-toluik asit, o-toluik asit, ve 2,6-dimetoksibenzoquinon; 0,1-10 mM) ya da NaCl (%0-25) içerecek şekilde hazırlanan reaksiyon karışımlarındaki selüloz enzimlerinin aktiviteleri optimum koşullar altında belirlenecektir. En yüksek aktivitenin tespit edildiği reaksiyon karışımındaki NaCl konsantrasyonu enzim aktivitesi için gerekli optimum NaCl konsantrasyonu olarak belirlenecektir. En yüksek enzim aktivitesi %100'lük görece aktivite olarak kabul edilecektir.

4.8.6. Deterjanlar, inhibitörler ve NaCl'nin enzim kararlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda deterjan (%0,1-2), inhibitör (0,1-10 mM) ya da NaCl (%0-25) içeren enzim çözeltileri oda sıcaklığında 1 saat ön-inkübasyona bırakılacaktır. Daha sonra, enzim aktiviteleri optimum şartlar altında belirlenecektir. Elde edilen aktivite değerleri NaCl içermeyen enzim çözeltinin aktivitesi ile karşılaştırılacak ve % kalan aktivite olarak sunulacaktır.

4.8.4. Selüloz enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması

Saflaştırılmış selüloz enzimine ait kinetik parametreleri (K_m ve V_{max}) Hyper 32 programı ile çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanacaktır. Optimum koşullarda gerçekleştirilen enzim analizler için selülozda 0.5 ile 10 mg/mL konsantrasyonlarında grafik çizilecektir (Chiliveri vd.,2013).

4.9. Enzimatik hidroliz

Hidroliz deneylerinde lignoselülozik materyal olarak sadece fiziksel (F) ve hem fiziksel hem de alkali ön-muamele görmüş (FA) iri kavak talaşı, mısır sapı ve ayçiçeği sapı kullanılacaktır. Hidroliz deneyleri tampon hem tampon içerisinde hem de deniz suyunda gerçekleştirilecektir. Fiziksel ön-muamele için kurutulmuş iri kavak talaşı (İKT), mısır sapı (MS) ve ayçiçeği sapı (AS) laboratuvar tipi bıçaklı değirmende küçük parçalara ayrılacak ve 50 mesh'lik eleklerden geçirilecektir. Hem fiziksel hem de alkali ön-muamele için Fiziksel ön muamele sonrasında elde edilen lignoselülozik materyalin her 1 g'ı 10 mL %0,5'lik NaOH çözeltisi içerisinde 40 °C'de 12 saat süresince bekletilecektir. Daha sonra materyal santrifüjleme ile geri kazanılacaktır ve 60 °C sıcaklıkta 48 saat bekletmek suretiyle kurutulacaktır.

Hidroliz reaksiyonları için her 1 g lignoselülozik materyal üzerine 10 mL tampon çözelti (50 mM) ya da deniz suyu ilave edilecektir. Daha sonra, karışım enzimin en kararlı olduğu sıcaklıkta 120 rpm'lik çalkalamalı koşullar altında 3, 6,12 ve 24 saat inkübe edilecektir. İnkübasyon sonunda açığa çıkan indirgen şeker miktarı DNS metoduyla tespit edilecektir. Ayrıca, enzimin lignoselülozik materyaller üzerine olan hidrolitik etkisi SEM ve FTIR analizleri ile desteklenecektir. SEM analizi için dondurularak kurutulacak olan materyal altın ile kaplandıktan sonra taramalı elektron mikroskopunda 1 µm-10 µm boyutlarında görüntülenecektir. Böylece hidroliz öncesi ve sonrasında materyallerin yapısal ve morfolojik özelliklerindeki değişiklikler belirlenecektir. Materyallerdeki kimyasal değişimin belirlenmesini sağlayacak FTIR analizi ise 4cm^{-1} çözünürlükte örnek başına 32 tarama ile gerçekleştirilecektir.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Ülkemizde enerji ihtiyacının %76'lık kısmı ithal edildiğinden alternatif ve yerli enerji kaynaklarına yönelim artmaktadır. Dünyada üretimi hızla artan biyoyakıtların ülkelerin sahip olduğu tarımsal kaynaklara göre biçimlendiği görülmektedir (Akalin, B., ve Seyrekbasan, A. M., 2015). Biyoetanolün %95 'i tarımsal ürünlerden karşılanmaktadır. Ülkemizde biyoetanol üretimi ancak patates, mısır ve şeker pancarından sağlanmaktadır. Kullanılan hammaddeye bağlı olarak da bu üretim sonucu oluşan (Canan S., ve Ceyhan V., 2017; Özdemir Z. Ö., ve Kayı Z., 2019). Yapılan bir çalışma sonucunda şeker pancarından biyoetanol üretiminde, üretim maliyetine göre fiyat değişimi en fazla olduğu tespit edilmiştir (Canan S., ve Ceyhan V., 2017). Hidroliz sürecindeki zorluk ve maliyetten kaynaklı olarak lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimi ülkemizde yaygın olmamaktadır. Lignoselülozik materyaller yenilenebilir özelliğe sahip olmasının yanı sıra dünyanın her yerinde bulunabilmesi sayesinde biyoetanol üretimi üzerine yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır (Karadayı M., 2016).

Deniz suyu, içerdiği mineraller, kimyasal maddeler ve yoğun tuz nedeniyle kullanılabilirliği sınırlıdır. Sunulan projede iyonik sızılarda ve deniz suyu gibi ortamda yaşamını sürdürebilecek hem de deniz suyunun hidroliz ve ön muamele aşamalarında aktif olarak kullanılmasını sağlayan selülaz genine sahip olan *J. alba* bakterisinin rekombinant teknikler kullanılarak üretimi gerçekleştirilecektir. Şimdiye kadar, *J. alba*'dan üretilmiş bir selülaz enzimine yönelik literatürde herhangi bir çalışma olmaması, arzu edilen niteliklerdeki selülaz enziminin rekombinant tekniklerle üretimi ve deniz suyu temelli biyoetanol süreçlerinde kullanımı çalışmanın yenilikçi yönünü oluşturmaktadır.

6. Uygulanabilirlik

Dünya nüfusunun giderek artmasıyla enerjiye olan talep her geçen gün artmaktadır. Fosil yakıtlarının hızla tükenmesine bağlı olarak dünya genelinde biyoetanol üretimi başta olmak üzere yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelim artmıştır.

Günümüzde etanol sanayide solvent olarak kullanılmanın yanında hastanede, gıda sektöründe olmak üzere geniş kullanım alanına sahiptir (Gizlenci, Ş., ve Acar, M., 2008). Yüksek verim ve düşük maliyetle lignoselülozik hammaddelerden biyoetanol üretiminin ülke ekonomisine önemli bir katkı sağlayacağı açıkça görülmektedir.

Ülkemizin sahip olduğu coğrafi koşullar ve toprak yapısı, tarımsal ürünlerin yaygın şekilde üretilmesine olanak sağlamaktadır. Tarımsal faaliyetler sonucunda ise biyoetanol üretiminde değerlendirilebilecek tonlarca lignoselülozik hammadde kaynağına kolayca erişim potansiyeli yüksektir (Özdemir Z. Ö., ve Kayı Z., 2019). Öte yandan, ülkemizde ormansal ürünlerin işlenmesi sonucunda yüksek miktarda talaş benzeri atık çıkmakta olup bunların biyoetanol üretiminde hammadde kaynağı olarak kullanılma potansiyeli yüksektir.

Lignoselülozdan biyoetanol üretimi sırasında harcanan fazla miktarlardaki tatlı su kaynakları yerine deniz suyu temelli iyonik sızılarda, lignoselülozik hammadde kaynaklarının ön-muamelesi için kullanımına yönelik olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Mevcut tatlı su kaynaklarının yerine, biyoetanol üretiminde deniz suyunun kullanılabilir hale getirilmesi ülkemizin üç tarafının denizlerle çevrili olması dolayısıyla oldukça önemlidir. Ayrıca tarımsal ve ormansal atıkların kolay temin edileceği bölgeler daha çok deniz kenarlarında bulunmaktadır. Bu durum, deniz suyunun prosesin gerçekleştirileceği yere iletilmesi açısından önemli bir avantaj yaratmaktadır.

Ön-muamele ve hidroliz uygulamaları genellikle çok hassas otomasyon gerektirmeyen tanklarda basitçe gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca, etanol fermentasyonu biyolojik prosesler arasından en iyi bilinenidir. Gerçekleştirilecek proje ile elde edilecek “inhibitörler karışında önemli derecede kararlılığa sahip ve deniz suyunda yüksek hidrolitik aktivite sergileyen bir selüloz enziminin” üretilmesi mevcut su kaynaklarının korunmasını sağlamakla birlikte biyoetanol üretim maliyetini düşürecek ve ürün verimliliğini arttıracığından projenin uygulanabilirliği yüksektir.

Laboratuvarda yapılacak çalışma sonucunda endüstriyel şartlarda üretimi için ön hazırlık oluşturacaktır. Aynı zamanda oluşacak proje çıktıları etki değeri yüksek ve prestijli dergilerde araştırma makalesi olarak yayımlanabilecektir. İleriye yönelik yapılacak çalışmalarda yeni proje fikirlerine de altyapı oluşturacaktır.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Tahmini maliyet ve proje zamanlaması aşağıdaki tablolarda belirtilmiştir

Tablo 7.1. Proje Zaman Planlaması

İP	İş paketlerinin adı ve hedefleri	Kim(ler) Tarafından Gerçekleştirileceği	Zaman Aralığı (...-... Ay)	Başarı Ölçütü ve Projenin Başarısına Katkısı
1	Mikroorganizmanın temini, saklanması ve hedef genin klonlanması	Çağrı Seda KUL Nurayan AYDIN	3 ay	%30
2	Pet14b'ye klonlanan selüloz protein ifadesinin incelenmesi ve sekans ile doğrulanması	Çağrı Seda KUL Nurayan AYDIN	3 ay	%30
3	Selüloz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu	Sümeyye CİLMELİ Zeynep Gül AYTAŞ	3 ay	%20
4	Enzimin endüstriyel olarak kullanımı ve sonuçların analizi	Sümeyye CİLMELİ Zeynep Gül AYTAŞ	2 ay	%20

Tablo 7.2. Tahmini Maliyet

Projede Kullanılması Planlanan Sarfiyat Listesi				
Malzeme adı	Birim Fiyatı	Adet	Toplam Fiyatı (KDV dahil)	Kullanım nedeni
Agaroz 100 gr	621.00	1	621.00	Ürünleri yürütmek için kullanılacaktır.
Maya Özütü 500 gr	733.00	1	733.00	Gelişme ortamı
Malt Özütü 250 gr	419.00	1	419.00	Besiyeri ortamı
Dekstroz 250 gr	398.00	1	398.00	Besiyeri ortamı
CaCO ₃ 250 gr	700.00	1	700.00	Besiyeri ortamı
DNA marker 100-10000 bç	259.00	1	259.00	Hedef genin boyutu
Primer Sentezi 50 nmol	4.40	50	220.00	PCR aşaması
Thermo Taq DNA polimeraz	259.00	1	259.00	PCR aşaması
Machery-Nagel Kit 250 örnek	900.00	1	900.00	Saflaştırmada
Q5 polimeraz 500 U	7.717	1	7.717.00	Gen klonlanmasında
Sanger Dizileme Hizmet Alımı	80	3	240.00	Gen klonlanmasında
BamHI restriksiyon enzimi 500 U	518.00	1	518.00	Gen klonlanmasında
EcoRI restriksiyon enzimi 500 U	642.00	1	642.00	Klon Doğrulama
Amfisilin 25 gr	496.00	1	496.00	Gen klonlanmasında
LB broth 500 gr	1.258	1	1.258.00	Gen aktarımında
T4 DNA Ligaz	1.139	1	1.139.00	Gen aktarımında
CMC 500 gr	1.605	1	1.605.00	Karakterizasyonda
SEPHADEX G-100	10.952	1	10.952.00	Kolon materyalinin kullanılmasında
Coomasie Brilliant Blue R-250 25 gr	531.00	1	531.00	SDS-PAGE proteinlerin görüntülenmesi
TOPLAM			32.556,00 Türk Lirası (TL)	

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):

Projenin hedef kitlesi biyokütle ve biyoenerji üretici firmalardır. Ayrıca, elde edilecek ürün etanol üretim verimini arttıracığı için ülkemizdeki araçlarda etanol kullanımını da yaygınlaştırabileceğinden tüm benzimli araç sahipleri de dolaylı olarak hedef kitlesi olacaktır. Tahminlere göre, 2030 yılında Türkiye'nin 100 milyon kişi sayısına ulaşacağı, bununla birlikte kişi başına düşen su miktarında azalma olacağı düşünülmektedir (Baran vd., 2017). Önerilen projede ön muamelede kullanılan suyun dönüşümlü hale getirilmesi ile birlikte su sorununun azaltılması, fosil yakıt kullanımının azaltılması ve lignoselülozik materyallerin biyoetanol üretiminde kullanılmasıyla çevreye verilen zarar azaltılacaktır. Bundan dolayı projenin hedef kitlesi ülkemizde yaşayan herkesi kapsamaktadır.

9. Riskler

Risk raporu aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

İP No	En önemli Riskler	Risk Yönetimi(B Planı)	Risk Skoru
1	Hedef genin çoğaltılmaması, DNA ve plazmid ekstraksiyonu veriminin düşük olması.	PCR reaksiyonunun gerçekleşmemesi durumunda primerler yeniden dizayn edilecek, DNA ve plazmid ekstraksiyonunun olmaması durumunda ise ticari kitler kullanılacaktır.	%10
2	Selülazın transformasyonu sırasında vektör-vektör veya insert-insert katlanmaları gerçekleşebilir.	pet14b restriksiyon enzimleri kesimi esnasında alkalın fosfataz uygulanılarak, fosfat bağı uzaklaştırılır, böylelikle kendi üzerine katlanması önlenmiş olacaktır.	%20
3	İstatistiksel optimizasyon için deney tasarımının anlamlılık derecesinin düşük olması risk olarak ön görülmektedir.	Bu koşullarda RSM-CCD tasarımı denenecektir.	%10

10. Proje Ekibi

Takım Lideri: Sümeyye CİLMELİ

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi
Sümeyye CİLMELİ	Araştırmacı	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans
Çağrı Seda KUL	Araştırmacı	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans
Nurayan AYDIN	Araştırmacı	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans
Zeynep Gül AYTAŞ	Araştırmacı	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans

11. Kaynaklar

Adıgüzel, A. O. (2013). Biyoetanölün genel özellikleri ve üretimi için gerekli hammadde kaynakları. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(2), 204-220.

Adıgüzel, A. O. (2013). Lignoselülozik materyallerden biyoetanöl üretimi için kullanılan ön-muamele ve hidroliz yöntemleri. *Sakarya University Journal of Science*, 17(3), 381-397.

AKALİN, B., & Seyrekbasan, A. M. (2015). Dünyadaki biyoetanol politikalarının Türkiye koşulları ile karşılaştırmalı incelenmesi ve Türkiye şartlarına uygunluk açısından biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddelerin değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 29(1), 157-168.

Bano, A., Chen, X., Prasongsuk, S., Akbar, A., Lotrakul, P., Punnapayak, H., & Ali, I. (2019). Purification and characterization of cellulase from obligate halophilic *Aspergillus flavus* (TISTR 3637) and its prospects for bioethanol production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 189(4), 1327-1337.

Canan, S., & Ceyhan, V. (2017). Türkiye’de biyokütle fiyatındaki değişimin biyoetanol maliyeti üzerine etkileri. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 32(1), 16-22.

Chiliveri, S. R., & Linga, V. R. (2014). A novel thermostable, alkaline pectate lyase from *Bacillus tequilensis* SV11 with potential in textile industry. *Carbohydrate polymers*, 111, 264-272.

Deka, D., Bhargavi, P., Sharma, A., Goyal, D., Jawed, M., & Goyal, A. (2011). Enhancement of cellulase activity from a new strain of *Bacillus subtilis* by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates. *Enzyme research*, 2011, 95-99.

Gizlenci, Ş., & Acar, M. (2008). Enerji Bitkileri Tarımı ve Biyoyakıtlar (Biyomotorin, Biyoetanol, Biyomas). *Enerji Bitkileri ve Biyoyakıtlar Sektörel Rapor*, (s 15). GÜNDÜZ, G., Nejla, A. Ş. I. K., AYDEMİR, D., & KILIÇ, A. (2015). Bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu. *Düzce Üniversitesi Orman Fakültesi Ormancılık Dergisi*, 10(2), 1-10.

International Energy Agency (2017), IEA statistics: Key World Energy Statistics 2017. www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld2017.pdf, son erişim tarihi 19.03.2018.)

Karadayı Mehmet. Yenilenebilir Enerji Kaynağı Olarak Biyoetanol Üretimi İçin Kullanılabilecek Verimli Mikroorganizmaların Bölgesel Ekosistemde Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, 2016.

Kuk, S., & Erensoy, A. (2008). Gen klonlama, plazmit seçimi ve fasciolahepaticacathepsinL1 uygulamaları. *Türkiye Patoloji Dergisi*, 32(1), 16-22.

Yıldırım Öznur. Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass. M.Sc. thesis, Istanbul Technical University, 2020.

ÖZDEMİR, Z. Ö., & Ziya, K. A. Y. I. (2019). Buğdayın Biyoetanol Üretimindeki Önemi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(2), 725-730. Renewables 2018 Global Status Report, Renewables Energy Policy Network for the 21st Century (REN21), Paris: REN21 Secretariat, www.ren21.net/wpcontent/uploads/2018/06/17-8652_GSR2018_FullReport_web_1.pdf, son erişim tarihi: 04.07.2017.)

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.

MELİKOĞLU, M., & ALBOSTAN, A. (2011). Türkiye’de biyoetanol üretimi ve potansiyeli. *Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 26(1).