



***Vitreoscilla* Hemoglobini Eksprese Eden *Escherichia coli* Suşları ile Şeker Pancarı Melasından Biyoetanol Üretiminde Ölçek Büyütmenin Etkisi**

Taner Şar , Meltem Yeşilçimen Akbaş  ✉

Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 41400, Kocaeli

Geliş Tarihi (Received): 22.04.2019, Kabul Tarihi (Accepted): 14.07.2020

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): akbas@gtu.edu.tr (M. Yeşilçimen Akbaş)

☎ 0 262 605 25 30 📠 0 262 653 84 90

ÖZ

Bu çalışmada, *Vitreoscilla* hemoglobini eksprese eden *Escherichia coli* TS3 ve TS4 suşlarının şeker pancarı melası hidrolizatı ile hazırlanan besiyerleri (MB2-MB5) kullanılarak biyoetanol üretimleri incelenmiştir. Kullanılan farklı şeker konsantrasyonlu besiyerleri içerisinde en fazla etanol üretimi MB2 besiyeri ortamında (yaklaşık %4 şeker içeren) gerçekleştirilmiştir. MB2 besiyerinde, küçük ölçekten büyük ölçeğe doğru biyoetanol üretiminin %10-17 oranında arttığı saptanmıştır. En fazla biyoetanol üretim miktarları en büyük hacimdeki fermentasyon ortamında TS3 ve TS4 suşları ile sırasıyla %2.49 ve %2.62 (v/v) olarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ölçek büyütmenin VHB ekspresyonu yapan bakterilerle şeker pancarı melasından etanol üretimini olumlu etkilediği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Melas hidrolizatı, Etanol, Bakteriyel hemoglobin, *E. coli*, Sukroz, Ölçek büyütme

Effect of Scaling up on Bioethanol Production from Sugar Beet Molasses by *Vitreoscilla* Hemoglobin Expressing *Escherichia coli* Strains

ABSTRACT

In the present work, bioethanol production through VHB expressing *Escherichia coli* TS3 and TS4 strains from sugar-beet molasses hydrolysate containing media was investigated. The highest growth and ethanol production were obtained in MB2 (contains about 4% sugar) medium. In MB2 medium, bioethanol production was enhanced by *E. coli* TS3 and TS4 strains from small scale to big scale fermentation. The highest ethanol productions by TS3 and TS4 strains were determined as 2.49% and 2.62% (v/v) respectively, with the largest volume of fermentation medium. It was shown that scaling up process had positive effect on bioethanol production from sugar beet molasses through VHB expressing strains.

Keywords: Molasses hydrolysate, Ethanol, Bacterial hemoglobin, *E. coli*, Sucrose, Scale up process

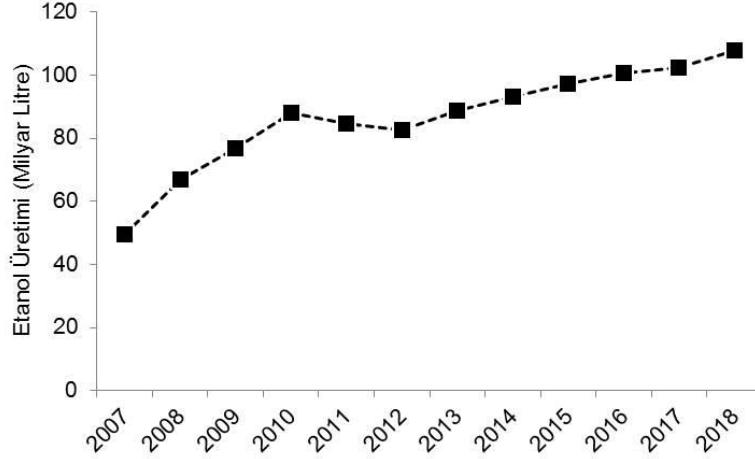
GİRİŞ

Biyoetanol küresel yakıt ihtiyacını karşılamak ve sera gaz emisyonunu azaltmak amacıyla kullanılan alternatif bir yakıttır [1]. Dünya çapında biyoetanol üretimi 2007 yılında 50 milyar litre, 2008 yılında ise 60 milyar litre civarındadır. Küresel biyoetanol üretim miktarı 2013 yılında yıllık 87.2 milyar litreye, 2015 yılında ise 97.2 milyar litreye ulaşmıştır. 2018 yılında 108 milyar litreye

ulaşan biyoetanol üretiminin 2020 yılında ise yıllık 120 milyar litre olması planlanmaktadır (Şekil 1) [2, 3]. Biyoetanolün çoğu Amerika Bileşik Devletleri'nde mısır ve Brezilya'da şeker kamışı gibi birincil nesil gıda kaynaklarından üretilmektedir. Tarımsal ve endüstriyel atıklar ile lignoselülozik maddeler gibi ikincil üretim süreçleri ile etanol üretiminin maliyeti ise yüksektir [4]. Birincil nesil üretim süreçlerinde kullanılan hammadde kaynaklarının gıda kaynağı olarak kullanılması ve ikincil

nesil üretim süreçlerinin de maliyetli olması nedeniyle biyoetanol üretiminde şeker pancarı melası gibi

potansiyel karbon kaynaklarının araştırılması gerekmektedir.



Şekil 1. Dünyada yıllık biyoetanol üretimi [2, 3].

Melas genel olarak şeker kamışı veya şeker pancarından şeker üretim sürecinde açığa çıkan koyu kahverengi bir gıda işleme atığıdır [5]. Genel olarak şeker pancarı ağırlığının %20'si kadar şeker içermektedir. Kristalize olmayan ve şeker üretimi esnasında yan ürün olarak açığa çıkan şeker pancarı melası ise yaklaşık %50 oranında sukroz içermektedir ve nitrojen bakımından zengindir [6]. Şeker pancarı melası zengin karbon kaynağı içermesinin yanı sıra ferulik asit (%0.5), asetik asit (%1.6) ve metanol (%0.4) de içerebilmektedir [7].

Biyoetanol üretiminde şeker pancarı melasının kullanımı oldukça yaygındır. Avrupa'nın bir bölümü ile Akdeniz ülkeleri biyoetanol üretimini şeker pancarı ve şeker pancarı melasından sağlamaktadır [8]. Türkiye'de üretilen etanolün çoğu Çumra Şeker Fabrikası'nda şeker pancarı ve şeker pancarı melasından sağlanmaktadır [9]. Benzer olarak Tayland'da da melasın ucuz ve bol miktarda olması nedeniyle etanol üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır [10]. Şeker pancarı melasının zengin içeriği ile etanol üretiminin yanı sıra enzim, maya, lipid, hidrojen gibi pek çok metabolit üretiminde de alternatif karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır [11-18].

Biyoetanol üretimi için fermentasyon ortamlarında genellikle *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmasına rağmen bu organizma sadece altı karbonlu şekerleri fermente edebilir. Etanol üreticisi *Escherichia coli* FBR5 ise birçok farklı şekeri fermente edebilmesinden dolayı biyoetanol üretiminde alternatif mikroorganizma olarak ilgi çekmektedir [19-21]. *Vitreoscilla* Hemoglobini (VHb) en iyi karakterize edilmiş bakteriyel hemoglobindir. VHb eksprese eden hücrelerin daha yüksek hücre yoğunluğuna ulaştığı ve metabolit üretiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir [22, 23]. *E. coli* FBR5 suşundan geliştirilen ve VHb ekspresyonu yapan suşların (TS3 ve TS4) [24] farklı ucuz karbon kaynaklarından biyoetanol üretimini arttırdığı görülmüştür [13, 25-30].

Yapılan bu çalışmada, *Vitreoscilla* Hemoglobini eksprese eden *E.coli* TS3 ve TS4 suşları ile karbon

kaynağı olarak şeker pancarı melasından biyoetanol üretiminde ölçek büyütmenin etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bakteri Suşları

Bu çalışmada kullanılan etanol üretebilen ve *Vitreoscilla* (bakteriyel) Hemoglobin geni (*vgb*) içeren *E.coli* TS3 ve TS4 suşları Prof. Dr. Benjamin C. Stark (Illinois Teknoloji Enstitüsü, Şikago, IL, ABD) tarafından hediye edilmiştir [24].

Şeker Pancarı Melası Hidrolizi

Çalışmada kullanılan şeker pancarı melası Kocaeli Pakmaya Fabrikası'ndan (Kocaeli, Türkiye) temin edilmiştir. Şeker pancarı melası ağırlığının beş katı olacak şekilde distile su ile sulandırılarak pH değeri 3.0 olacak şekilde 2M H₂SO₄ (%96 saflıkta, Merck, Darmstadt, Almanya) ile ayarlanmıştır. Sulandırılan melas bir gece oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve daha sonra 121°C'de 20 dakika süre ile bir otoklavda (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) ısıtılarak hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hidrolizatın steril koşullar altında pH değeri 7.0 olacak şekilde 10N NaOH ile ayarlanmıştır. Melas hidrolizatı +4°C sıcaklıkta 6000 g hızda 15 dakika süre ile santrifüj edilerek safsızlıklardan arındırılarak besiyeri bileşeni olarak kullanılmıştır [13].

Besi Ortamlarının Hazırlanması

Şeker pancarı melas hidrolizatı farklı oranlarda steril distile su ile sulandırılarak farklı şeker yoğunluğu içerecek şekilde besi ortamları hazırlanmıştır. Bu besi ortamlarından MB2 melas hidrolizatının 2 kat sulandırılması ile (%4.10 şeker içerecek şekilde), MB3 melas hidrolizatının 3 kat sulandırılması ile (%2.69 şeker içerecek şekilde), MB4 melas hidrolizatının 4 kat sulandırılması ile (%2.10 şeker içerecek şekilde) ve MB5 melas hidrolizatının ise 5 kat sulandırılması ile (%1.61 şeker içerecek şekilde) hazırlanmıştır. Her bir

besi ortamına 5g/L olacak şekilde maya özütü ilave edilmiştir [28-31]. Farklı besi ortamlarının şeker içerikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Biyotanol üretimi

Ön kültürler için, 5 mL farklı besi ortamları içeren 50 mL Erlenler içerisinde *E.coli* TS3 ve TS4 suşları ayrı ayrı olacak şekilde inoküle edilmiş ve çalkalamalı bir inkübatörde (Edmund Bühler GmbH, TH15, Hechingen, Almanya) bir gece boyunca (18 saat) 37°C sıcaklıkta ve 180 devir/dakika hızında inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyon denemelerinde biyotanol üretimi için 50 mL, 250 mL, 500 mL ve 1000 mL Erlenler kullanılarak Erlen hacminin %80'i besiyeri içerecek şekilde (40-800 mL) farklı fermentasyon ortamları hazırlanmıştır. Fermentasyon ortamları başlangıç OD_{600nm} değeri 0.06 olacak şekilde, bir gecelik bakteri kültürleri ile ayrı ayrı inoküle edilmiş [32] ve çalkalamalı bir inkübatörde (Edmund Bühler GmbH, TH15, Hechingen, Almanya) 48 saat süre ile 37°C sıcaklıkta ve 180 devir/dakika hızında inkübe edilmiştir.

Analiz Yöntemleri

Fermentasyon sonrasında, kültürlerin üremeleri, OD_{600nm}'deki optik yoğunlukları 0.6 değerini

$$\begin{aligned} \text{Etanol Miktarı (\% w/v)} &= \text{Etanol miktarı (\% v/v)} \times 0.78924 & (1) \\ \text{Etanol Verimi} &= \frac{\text{Üretilen etanol miktarı (\% w/v)}}{\text{Tüketilen şeker miktarı (\% w/v)}} & (2) \\ \text{Teorik Etanol Verimi (\%)} &= (\text{Etanol verimi} / 0.512) \times 100 & (3) \end{aligned}$$

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler, Microsoft Office, Excel 2007 programı ile yapılmıştır. *P* değerleri, tek kuyruklu t-testi ile VHB eksprese eden *E. coli* suşları ile melas hidrolizatından etanol üretiminin ölçek büyütme ile arttırılabileceği hipotezine dayanılarak belirlenmiştir. *P*<0.05 seviyesinde bulunan denemelerin sonuçları istatistiksel açıdan "önemli" olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Farklı oranlarda sulandırılan melas hidrolizatı besiyerlerinin toplam şeker içerikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. En fazla şeker içeriği melas hidrolizatının 2 kat sulandırılması ile elde edilen MB2 besiyerinde olmuştur. Ayrıca 50 mL'lik Erlenlerde, *E. coli* TS4 suşu ile gerçekleşen ön denemelerde, dört farklı besiyeri içerisinde en fazla üremenin MB2 besiyerinde olduğu

aşmayacak şekilde steril özgün besi ortamı ile seyreltilerek bir spektrofotometre cihazı (Shimadzu, UV-1800 UV-VIS, Kyoto, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Optik yoğunluğun belirlenmesinde kör olarak kültüre özgün steril besi ortamı kullanılmıştır.

Melas hidrolizatlarının fermantasyonlar öncesi var olan ve sonrası kalan şeker miktarları (% w/v) ile üretilen biyotanol miktarları (% v/v) HPLC analiz cihazı vasıtasıyla belirlenmiştir [28]. HPLC analizi için, örnekler +4°C'de 10000 rpm hızda ve 10 dakika süre ile santrifüj edilerek safsızlıklardan arındırılmıştır. Elde edilen üst sıvı, 0.22 µm por çaplı selüloz filtreden geçirilerek HPLC viallerine aktarılmıştır. Yürütücü faz olarak Asetoritril (%60 v/v) solüsyonu kullanılmış ve akış hızı 1 mL/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. 20 µL örnek enjeksiyonu ile toplamda 10 dakika süre boyunca, 25°C kolon sıcaklığında ve NH₂ kolonu (Interstil, 5 µm, 4.6 x 250 mm, GL Sciences Inc., Shinjuku, Tokyo, Japonya) kullanılarak HPLC analizi gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyon sonrası şeker tüketimi ve etanol üretim miktarlarına göre etanol verimi ve teorik etanol verimi aşağıda belirtilen formüllere göre belirlenmiştir [33].

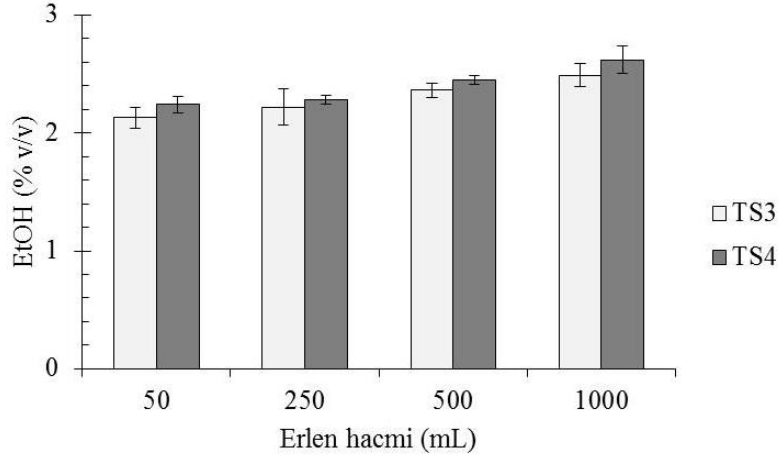
belirlenmiştir (*p*<0.05). Biyotanol üretiminin ise yine 4 farklı besiyeri içerisinde en fazla yine MB2 besiyerinde %2.24 (v/v) olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Aynı koşullarda, TS3 suşu ile etanol üretiminin %2.13 (v/v) olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). Diğer besiyerlerinde melas hidrolizatının sulandırılma oranları arttığından üremenin ve etanol üretiminin azaldığı görülmüştür.

MB2 besi ortamında, *E. coli* TS3 ve TS4 suşları ile ölçek büyütme (40 mL'den 800 mL'ye) ile biyotanol üretiminin kademeli olarak arttığı (%10-17 arasında) saptanmıştır (Şekil 2). Biyotanol üretim miktarlarının TS3 suşu ile 400 mL besiyeri içeren 500 mL'lik Erlenlerde %2.36 (v/v), 800 mL besiyeri içeren 1000 mL'lik Erlenlerde ise %2.49 (v/v) olduğu belirlenmiştir. TS4 suşu ile ise etanol üretiminin ise 500 ve 1000 mL'lik erlenlerde sırasıyla %2.45 ve %2.62 (v/v) olduğu belirlenmiştir (Şekil 2).

Tablo 1. 50 mL hacimli erlenlerde *E.coli* TS4 suşunun farklı besi ortamlarında (40 mL, MB2-MB5) üreme (OD_{600nm}) ve biyotanol üretim (EtOH) değerleri (% v/v) ile besiyerlerinin toplam şeker içerikleri (%w/v)*

Besiyeri	Suş	Toplam Şeker (%w/v)	OD _{600nm}	EtOH (%v/v)
MB2	TS4	4.04±0.23	4.87±0.18	2.24±0.07
MB3	TS4	2.69±0.15	4.20±0.09	1.78±0.06
MB4	TS4	2.02±0.13	3.50±0.17	1.30±0.02
MB5	TS4	1.61±0.07	3.08±0.13	0.97±0.11

*Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (±) simgesi ile gösterilmiştir.



Şekil 2. Farklı hacimlerdeki Erlenlerde (50-1000 mL) farklı miktarlarda MB2 besi ortamlarında (40-800 mL) *E.coli* TS3 ve TS4 suşlarının etanol üretim değerleri (% v/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ifade etmektedir.

Ölçek büyütme ile (40 mL'den 800 mL'ye), hem *E. coli* TS3 suşu ile hem de *E. coli* TS4 suşu ile biyoetanol üretiminin %17 oranında arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Ölçek büyütmenin etanol üretimini olumlu yönde

etkilemesinin yanı sıra şeker tüketimini, etanol verimini ve teorik etanol verimini de arttırdığı ($p < 0.05$) belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. *E. coli* TS3 ve TS4 suşlarının farklı hacimlerdeki erlenlerde (50-1000 mL) farklı miktarlarda MB2 besi ortamında (40-800 mL) kalan toplam şeker (%w/v), üreme (OD_{600nm}), etanol verimi ($g_{EtOH}/g_{tükenen\ şeker}$) ve teorik etanol verimi (%) değerleri*

Erlen (mL)	Suş	Kalan Toplam Şeker (%w/v)	OD_{600nm}	Etanol Verimi ($g_{EtOH}/g_{tükenen\ şeker}$)	Teorik Etanol Verimi (%)
50	TS3	0.43±0.02	4.56±0.14	0.47±0.02	91.8±0.52
	TS4	0.37±0.08	4.87±0.18	0.48±0.02	93.8±0.46
250	TS3	0.24±0.09	4.95±0.10	0.46±0.07	89.8±1.02
	TS4	0.31±0.11	4.72±0.21	0.48±0.03	93.8±1.39
500	TS3	0.15±0.01	4.26±0.10	0.48±0.01	93.8±2.14
	TS4	0.13±0.01	4.64±0.15	0.49±0.01	95.7±1.33
1000	TS3	0.12±0.03	4.34±0.02	0.50±0.02	97.7±1.16
	TS4	0.08±0.01	4.21±0.18	0.52±0.01	101.6±1.24

*Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Standart sapmalar (\pm) simgesi ile gösterilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan bu çalışmada biyoetanol üretiminde karbon kaynağı olarak şeker pancarı melas hidrolizatı (glukoz ve fruktoz) kullanılarak etanol üretiminin artırılmasında *Vitreoscilla* hemoglobini ekspresyonu ve hacim artışının etkisi incelenmiştir. Bunun için farklı şeker konsantrasyonlarında (%1.61-4.04) ve farklı hacimlerde üretim ortamları (50-1000mL'lik Erlenlerde 40-800 mL besiyerleri içeren) kullanılmış ve suşların etanol üretimleri incelenmiştir.

Bu çalışmada besiyeri maliyetinin azaltılması için şeker pancarı melası ile hazırlanan fermentasyon ortamlarına sadece maya özütü ilavesi yapılmıştır [28-31]. Toplam %2.4 (w/v) oranında şeker içerecek şekilde şeker pancarı melas hidrolizatı ve zengin besiyeri (pepton, sodyum asetat, fosfat tamponu gibi) bileşenleri içeren 800 mL besi ortamı içeren 1000 mL erlenler kullanılarak etanol üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada, *E. coli* TS4 suşu ile etanol üretiminin %2.09 (v/v) olduğu belirlenmiştir [13]. Bu çalışmada da, farklı olarak, zengin besiyeri yerine şeker pancarı melas hidrolizatı içeren

aynı şeker oranına sahip 800 mL minimal besiyerinde TS4 suşu ile 48 saat sonunda %2.62 oranında etanol üretilmesi besiyerinin maya özütü hariç zenginleştirilmesine ihtiyaç duyulmadan şeker pancarı melası ile minimal ortamda benzer oranda etanol üretiminin gerçekleşebildiği gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada VHB ekspres eden *E. coli* TS4 suşunun, VHB ekspres etmeyen FBR5 suşuna göre %118 daha fazla etanol ürettiği belirlenerek VHB'nin etkinliği gösterilmiştir. Silva ve arkadaşlarının [34] yapmış oldukları bir diğer çalışmada ise, %4 sukroz (w/v) içeren 200 mL minimal besiyerinde 96 saatlik inkübasyon sonunda *E. coli* KO11 ve *Klebsiella oxytoca* P2 suşlarının, etanol üretimlerinin sırasıyla 15.8 g/L ve 11.3 g/L, %4 sukroz (w/v) ile zenginleştirilmiş 200 mL LB besiyerinde ise her iki suşun etanol üretiminin 20.3 g/L olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise toplam yaklaşık %4 (w/v) oranında şeker içerecek şekilde melas hidrolizatı ile hazırlanan 200 mL ve 800 mL minimal besi ortamları ile etanol üretimlerinin sırasıyla %2.28 (v/v) (17.99 g/L) ve %2.62 (v/v) (20.67 g/L) olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, yapılan bu çalışma ile kullanılan TS4 suşu ile biyoetanol üretiminde düşük maliyetli olabilecek melas hidrolizatını

içeren MB2 besiyerinin etkin olarak kullanılabilmesi için geliştirilmiştir.

Bu çalışmada, ölçek büyütme ile teorik etanol veriminin %100 seviyesine ulaştığı belirlenmiştir. Melas hidrolizatı ile yapılan bu çalışmada, biyoetanol üretimi için en etkin şeker miktarının belirlenmesinin yanı sıra fermentasyonda ölçek büyütmenin de önemli bir faktör olabileceği belirlenmiştir. Benzer şekilde VHB ekspresyonu yapan rekombinant *E. coli* suşları ile yapılan önceki çalışmalarda da, ölçek büyütmenin farklı karbon kaynakları ile de biyoetanol üretimini arttırdığı raporlanmıştır [13, 25, 27]. Abanoz ve arkadaşlarının [25] yapmış oldukları çalışmada, patates işleme atıkları kullanılarak *E. coli* TS4 suşu ile etanol üretiminde fermentasyon besiyeri miktarının 100 mL'den 800 mL'ye artırılması ile etanol üretiminin %43 oranda arttığı belirlenmiştir. Patates ile mısır işleme atık suları ve peynir altı suyu kullanılarak yapılan diğer etanol üretim çalışmalarında da ölçek büyütme ile (80 mL'den 800 mL'ye) etanol üretiminin %100'ün üzerinde arttığı belirlenmiştir [13, 27]. Yapılan bu çalışmada şeker pancarı melası ile ölçek büyütmenin VHB ekspresyonu yapan bakterilerle etanol üretimini %17 arttırdığı belirlenmiştir. Bunun nedeni ölçek büyümesine bağlı olarak meydana gelen oksijen transferi kısıtlamaları, pH değişimleri, oksijen oranının azalması gibi faktörlerin artmasına karşın VHB'nin hücre canlılığını korumasından ve etanol üretimini arttırmasındandır [35,36].

Elde edilen sonuçlar, biyoetanol üretiminde şeker pancarı melasının alternatif bir karbon kaynağı olabileceğini göstermektedir. Biyoetanol üretiminde, melas hidrolizatı içeriğindeki glukozun yanı sıra fruktoz şekerinin de etkili olabileceği düşünülmektedir. Bundan dolayı etanol üretimi çalışmalarında fruktoz içeren meyve suyu işleme atıkları da değerlendirilebilir. VHB ekspresyonu ile şeker pancarı melası kullanılarak pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen miktarı gibi faktörlerin kontrollü olduğu bir fermentör ortamında yapılacak denemelerle daha yüksek etanol konsantrasyonları elde edilebilecektir. Ayrıca elde edilen sonuçlar ile, biyoetanol üretiminde vgb/VHB sisteminin sanayide çok daha büyük ölçekli fermentasyon uygulamalarında potansiyel olarak kullanılabilmesini ve avantajlı olabileceğini göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gebze Teknik Üniversitesi (2013-A02, 2016-A-13 ve 2017-A102-19) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Demirbas, A. (2007). Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33(1), 1-18.
- [2] U.S Department of Energy (US DOE). (2016). Global Ethanol Production by Country/Region, Renewable Fuels Association, Washington, USA.
- [3] RFA. (2019). Renewable Fuels Association, Washington, USA.

- [4] Regassa, T.H., Wortmann, C.S. (2014). Sweet sorghum as a bioenergy crop: literature review. *Biomass and Bioenergy*, 64, 348-355.
- [5] Arimi, M.M., Zhang, Y., Götz, G., Kiriamiti, K., Geißen, S.U. (2014). Antimicrobial colorants in molasses distillery wastewater and their removal technologies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 87, 34-43.
- [6] Broughton, N.W., Dalton, C.C., Jones, G.C., Williams, E.L. (1995). Adding value to sugar beet pulp. *International Sugar Journal* (United Kingdom).
- [7] Kühnel, S., Schols, H.A., Gruppen, H. (2011). Aiming for the complete utilization of sugar-beet pulp: examination of the effects of mild acid and hydrothermal pretreatment followed by enzymatic digestion. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 1-14.
- [8] Fukuda, H., Kondo, A., Tamalampudi, S. (2009). Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 2-12.
- [9] Ozdingis, A.G.B., Kocar, G. (2018). Current and future aspects of bioethanol production and utilization in Turkey. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81, 2196-2203.
- [10] Pattanakittivorakul, S., Lertwattanasakul, N., Yamada, M., Limtong, S. (2019). Selection of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* for high temperature ethanol production from molasses and increasing ethanol production by strain improvement. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1-16.
- [11] Veana, F., Martínez-Hernández, J.L., Aguilar, C.N., Rodríguez-Herrera, R., Michelena, G. (2014). Utilization of molasses and sugar cane bagasse for production of fungal invertase in solid state fermentation using *Aspergillus niger* GH1. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 373-377.
- [12] Suksawang, S., Cheirsilp, B., Yeesang, J. (2016). Production of kefiran from molasses and spent yeast cells by *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 21(2), 59-67.
- [13] Akbas, M.Y., Sar, T., Ozcelik, B. (2014). Improved ethanol production from cheese whey, whey powder, and sugar beet molasses by "Vitreoscilla hemoglobin expressing" *Escherichia coli*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 78(4), 687-694.
- [14] Taskin, M., Ortucu, S., Aydogan, M.N., Arslan, N.P. (2016). Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29. *Renewable energy*, 99, 198-204.
- [15] Urbaniec, K., Grabarczyk, R. (2014). Hydrogen production from sugar beet molasses—a techno-economic study. *Journal of Cleaner Production*, 65, 324-329.
- [16] Oehmen, A., Pinto, F.V., Silva, V., Albuquerque, M.G., Reis, M.A. (2014). The impact of pH control on the volumetric productivity of mixed culture PHA production from fermented molasses. *Engineering in Life Sciences*, 14(2), 143-152.
- [17] Jung, M.Y., Jung, H.M., Lee, J., Oh, M.K. (2015). Alleviation of carbon catabolite repression in *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of

- sugarcane molasses for 2, 3-butanediol production. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 106.
- [18] Xu, K., Xu, P. (2014). Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. *Bioresource Technology*, 153, 23-29.
- [19] Ingram, L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G.W., Preston, J.F. (1987). Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(10), 2420-2425.
- [20] Ingram, L.O., Conway, T. (1988). Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 397-404.
- [21] Dien, B.S., Nichols, N.N., O'bryan, P.J., Bothast, R.J. (2000). Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84-86, 181-196.
- [22] Khosla, C., Bailey, J.E. (1988). Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*. *Nature*, 331(6157), 633.
- [23] Frey, A.D., Kallio, P.T. (2003). Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(4), 525-545.
- [24] Sanny, T., Arnaldos, M., Kunkel, S.A., Pagilla, K.R., Stark, B.C. (2010). Engineering of ethanolic *E. coli* with the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhances ethanol production from both glucose and xylose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(5), 1103-1112.
- [25] Abanoz, K., Stark, B.C., Akbas, M.Y. (2012). Enhancement of ethanol production from potato-processing wastewater by engineering *Escherichia coli* using *Vitreoscilla* haemoglobin. *Letters Applied Microbiology*, 55(6), 436-443.
- [26] Arnaldos, M., Kunkel, S.A., Wang, J., Pagilla, K.R., Stark, B.C. (2012). *Vitreoscilla* hemoglobin enhances ethanol production by *Escherichia coli* in a variety of growth media. *Biomass Bioenergy*, 37, 1-8.
- [27] Sumer, F., Stark, B.C., Akbas, M.Y. (2015). Efficient ethanol production from potato and corn processing industry waste using *E. coli* engineered to express *Vitreoscilla* haemoglobin. *Environmental Technology*, 36(18), 2319-2327.
- [28] Sar, T., Stark, B.C., Akbas, M.Y. (2017). Effective ethanol production from whey powder through immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin. *Bioengineered*, 8(2), 171-181.
- [29] Sar, T., Seker, G., Erman, A.G., Stark, B.C., Akbas, M.Y. (2017). Repeated batch fermentation of immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for long-term use. *Bioengineered*, 8(5), 651-660.
- [30] Sar, T., Stark, B.C., Akbas, M.Y. (2019). Bioethanol production from whey powder by immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin: optimization of sugar concentration and inoculum size. *Biofuels*, 1-6.
- [31] Sar, T., Akbas, M.Y. (2019). Investigation of effective immobilization method for ethanol producing *E. coli* strain. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 15(2), 217-220.
- [32] Şar, T., Akbaş, M.Y. (2016). Biyoetanol üretimi için gıda işleme atıklarının asit hidrolizi. *Akademik Gıda*, 14(1), 15-20.
- [33] Jayus, Nurhayati, Mayzuhroh, A., Arindhani, S., Caroenchai, C. (2016). Studies on bioethanol production of commercial baker's and alcohol yeast under aerated culture using sugarcane molasses as the media. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 493-499.
- [34] Silva, G.P.D, Araújo, E.F.D, Silva, D.O., Guimarães, W.V. (2005). Ethanolic fermentation of sucrose, sugarcane juice and molasses by *Escherichia coli* strain KO11 and *Klebsiella oxytoca* strain P2. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(4), 395-404.
- [35] Anand, A., Duk, B.T., Singh, S., Akbas, M.Y., Webster, D.A., Stark B.C., Dikshit, K.L. (2010). Redox-mediated interactions of VHb (*Vitreoscilla* haemoglobin) with OxyR: novel regulation of VHb biosynthesis under oxidative stress. *Biochemical Journal*, 426(3), 271-280.
- [36] Akbas, M.Y., Doruk, T., Ozdemir, S., Stark, B.C. (2011). Further investigation of the mechanism of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) protection from oxidative stress in *Escherichia coli*. *Biologia*, 66(5), 735-740.