

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİTOREMEDİASYON İŞLEMİNDE KULLANILAN SU
SÜMBÜLÜ BİTKİSİNİN BİYOBÜTANOL ÜRETİMİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ

ESRA MEŞE ERDOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2021

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİTOREMEDİASYON İŞLEMİNDE
KULLANILAN SU SÜMBÜLÜ BİTKİSİNİN
BİYOBÜTANOL ÜRETİMİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ

ESRA MEŞE ERDOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. MELEK ÖZKAN

GEBZE
2021

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

USE OF WATER HYACINTH PLANTH
AFTER PHYTOREMEDIATION FOR
BIOBUTANOL PRODUCTION

ESRA MEŞE ERDOĞAN
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. MELEK ÖZKAN

GEBZE
2021

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU
----------------------------------	--------------------------------------

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 25/12/2020 tarih ve 2020/60 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 11/12/2020 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Esra MEŞE ERDOĞAN'ın tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE

: Prof. Dr. Elif İNCE

ÜYE

: Prof. Dr. Güleda ENGİN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Bu tez çalışmasında su sümbülü bitkisinin biyobütanol üretiminde değerlendirilmesi için uygun asit ön arıtımı koşulları belirlenmiş, kesikli sistemde serbest *Clostridium acetobutylicum* DSMZ 1732 bakterisi ile gerçekleştirilen ABE (Aseton-Bütanol-Etanol) fermentasyonu ürün verimleri kıyaslanmıştır. *Clostridium acetobutylicum* DSMZ 1732 hücrelerinin glikoz ve ksiloz kullanım kinetiği belirlenmiş ve bakterinin glikozu öncelikli olarak kullandığı görülmüştür.

Lignin giderimi ve enzimatik hidroliz performansını artırmak için farklı konsantrasyonlarda asit hidrolizi gerçekleştirilmiş ve asit konsantrasyonu arttıkça hidrolizata geçen şeker konsantrasyonunun arttığı görülmüştür. Enzimatik hidroliz ve fermentasyon çalışmalarında %1 sülfürik asit konsantrasyonunda hidrolizi gerçekleştirilen biyokütleler şeker kaynağı olarak kullanılmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında laboratuvar ortamında güneş ışığı floresan lambaları ile fitoremediasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve su sümbülünün krom ve kurşun akümülyasyonunun kök kısmında daha fazla olduğu ve biyokonsantrasyon faktörünün sırasıyla krom (Cr^{+6}) ve kurşun (Pb^{+2}) için 66 ve 2187,5 olduğu bulunmuştur. Fitoremediasyon sonucunda elde edilen biyokütlelerle gerçekleştirilen fermentasyon ile üretilen bütanol ve ABE konsantrasyonlarının kurşun içeren su sümbülü gövdesi için sırasıyla 158,86 mg bütanol/L ve 219,45 mg ABE/L, krom içeren su sümbülü gövdesi için ise sırasıyla 205,3 mg bütanol/L ve 285 mg ABE/L olduğu gözlemlenmiştir.

Kurşun ve krom fitoremediasyonda kullanılan bitki biyokütelleri ile yapılan biyobütanol fermentasyonu sonucunda, ağır metal içermeyen biyokütlelere kıyasla ön işlem ve bütanol üretim verimliliği daha düşük bulunmuştur. *Clostridium acetobutylicum* bakterisinin fermentasyon ara ve ana ürünlerinin asetik asit, bütirik asit, laktik asit, aseton, bütanol ve etanol olduğu görülmüş ve üretilen organik asitler arasında süksinik asit üretimi gerçekleşmediği anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyobütanol, ABE Fermentasyonu, Fitoremediasyon, Su sümbülü.

SUMMARY

In this study, suitable acid pre-treatment conditions were determined for the conversion of water hyacinth plant to biobutanol production, and the fermentation efficiencies of free *Clostridium acetobutylicum* DSMZ 1732 bacterial cells in batch system with different substrates were compared. The glucose and xylose usage kinetics of *Clostridium acetobutylicum* DSMZ 1732 cells were determined and it was observed that the bacteria primarily used glucose.

Acid hydrolysis was performed in different sulphuric acid concentrations to increase lignin removal and enzymatic hydrolysis performance, enzymatic hydrolysis and fermentation studies were carried out with biomass hydrolyzed at 1% acid concentration due to the increase in the sugar concentration in the hydrolysis liquid as the concentration increased.

In the second stage of the study, phytoremediation studies were carried out in the laboratory conditions and it was found that chromium and lead accumulation of water hyacinth was higher in the root part and the bioconcentration factor was 66 and 2187.5 for chromium and lead, respectively. As a result of fermentation performed with biomasses obtained from phytoremediation, the butanol and ABE concentrations were found to be 158.86 mg/L and 219.45 mg/L for lead-containing water hyacinth stem, 205.3 mg butanol/L and 285 mg ABE/L for chromium-containing water hyacinth stem, respectively.

As a result of biobutanol fermentation made with plant biomasses used in lead and chromium phytoremediation, lower pre-treatment and butanol production efficiency was achieved compared to biomasses that do not contain heavy metals. It was observed that the fermentation intermediates and main products of *Clostridium acetobutylicum* bacteria were acetic acid, butyric acid, lactic acid, acetone, butanol and ethanol, and it was understood that no succinic acid production occurred among the organic acids produced.

Key Words: Biobutanol production, ABE fermentation, Phytoremediation, Water Hyacinth.

TEŞEKKÜR

Öncelikle karşılaştığım zorluklarda desteğini esirgemeyip devam etmem için beni motive eden, bana inanan, bilgi ve tecrübeleriyle yüksek lisans eğitimimde bana yol gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Melek ÖZKAN'a,

Tez çalışmalarımındaki desteklerinden dolayı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Salim ÖNCEL'e ve Dr. Emin Ender ÇELEBİ'ye

Bütün çalışmalarım boyunca yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli arkadaşım Hilal YILMAZ'a,

Ve varlığıyla bana güç veren, benimle uykusuz kalan sevgili eşim Fatih ERDOĞAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Biyoyakıtlar	4
2.2. Biyobütanol	5
2.3. Biyobütanol Üretiminin Tarihçesi	6
2.4. Biyobütanol Üretiminin Dünya'daki Durumu	8
2.5. Biyobütanol Üretim Prosesi	8
2.5.1. Karbon Kaynakları	9
2.5.1.1. Birincil Karbon Kaynakları	9
2.5.1.2. İkincil Karbon Kaynakları	10
2.5.1.3. Üçüncül Karbon Kaynakları	10
2.5.2. Ön Arıtım Yöntemleri	11
2.5.2.1. Fiziksel Ön Arıtım Yöntemleri	11
2.5.2.2. Kimyasal Ön Arıtım Yöntemleri	13
2.5.2.3. Fizikokimyasal Ön Arıtım Yöntemleri	17
2.5.2.4. Biyolojik Ön Arıtım	19
2.5.2.5. Birleşik Ön Arıtım Yöntemleri	20
2.5.3. ABE Fermantasyonu	20
2.5.4. Ayırma Prosesleri	21
2.5.5. Bütanol Üretiminin Metabolizması	23
2.5.6. Bütanol Üreten Mikroorganizmalar	25

2.5.7. Proses Geliştirme	27
2.6. Organik Asitler	30
2.6.1. Asetik Asit	30
2.6.2. Bütirik Asit	31
2.7. Fitoremediasyon	31
2.7.1. Su Sümbülü	33
3. MATERYAL ve YÖNTEM	36
3.1. Kullanılan Mikroorganizmalar ve Enzim	36
3.2. Besiyerleri	36
3.3. Hücre Büyümesinin Takibi	36
3.4. Asit Hidrolizi	37
3.5. Enzimatik Hidroliz	37
3.5.1. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	38
3.5. Karbonhidrat Tayini	39
3.7. Şeker, Asitler ve Solventlerin Ölçülmesi	40
3.8. HPLC Standart Eğrileri	40
3.9. ICP ile Metallerin Analizi	43
3.9. ABE Fermantasyonu	44
4. BULGULAR	45
4.1. Su Sümbülünün Karbonhidrat İçeriği	45
4.2. Hidroliz Koşullarının Belirlenmesi	45
4.3. ABE Fermantasyonuna Substrat Etkisi	46
4.4. Su Sümbülü ile Hidroliz ve ABE Fermantasyonu	50
4.4.1. Asit Hidrolizi Çalışmaları	50
4.4.2. Enzimatik Hidroliz Çalışmaları	50
4.4.3. ABE Fermantasyon Çalışmaları	51
4.5. Su Sümbülünün Kurşun ve Krom Fitoremediasyonu	54
4.6. Kurşun ve Krom İçeren Su Sümbülü ile ABE Fermantasyonu	55
6. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	69
EKLER	70

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
rpm	: Dakikada devir sayısı
ϵ	: Spesifik absorplama kapasitesi
g	: Gram
μ g	: Mikrogram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
m	: Metre
nm	: Nanometre
L	: Litre
ATP	: Adenozin Trifosfat
BCF	: Biyokonsantrasyon faktörü
DSMZ	: Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu
FPU	: Filtre Kâğıdı Ünitesi
HPLC	: High pressure liquid chromatography
ICP	: Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectrometry
OD	: Optik yoğunluk
TF	: Translokasyon faktörü
YTG	: Maya özütü-Trypton-Glikoz Besiyeri

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Enerji kaynaklarının toplam tüketimdeki payları.	5
2.2: Lignoselülozik biyokütleden aseton, bütanol ve etanol üretimi.	9
2.3: Lignoselülozik biyokütlenin enzimatik hidrolizi.	20
2.4: <i>Clostridium acetobutylicum</i> ile ABE fermantasyonu metabolik yolu.	24
2.5: <i>Clostridium acetobutylicum</i> bakterisinin gelişim fazları.	26
2.6: ABE fermantasyonu girdi ve ürünleri.	27
2.7: Biyobütanol üretim prosesi geliştirme stratejileri.	30
2.8: Ağır metallerin remediasyonu ile ilgili yaklaşımlar.	33
3.1: Cellic CTEC2 enzim karışımının selülozu parçalama mekanizması.	37
3.2: Cellic CTEC2 enzim aktivitesi grafiği.	39
3.3: HPLC analizinde kullanılan glikoz standart eğrisi.	41
3.4: HPLC analizinde kullanılan ksiloz standart eğrisi.	41
3.5: HPLC analizinde kullanılan bütirik asit standart eğrisi.	41
3.6: HPLC analizinde kullanılan asetik asit standart eğrisi.	42
3.7: HPLC analizinde kullanılan laktik asit standart eğrisi.	42
3.8: HPLC analizinde kullanılan aseton standart eğrisi.	42
3.9: HPLC analizinde kullanılan etanol standart eğrisi.	43
3.10: HPLC analizinde kullanılan bütanol standart eğrisi.	43
3.11: Fitoremediasyon deney düzeneği.	44
4.1: Enzim ve asit konsantrasyonunun glikoz üretimi üzerine etkisi.	46
4.2: Besiyeri içeriğinin <i>C. acetobutylicum</i> büyümesi üzerine etkisi.	47
4.3: Glikoz başlangıç konsantrasyonunun etkisi.	48
4.4: Glikoz konsantrasyonunun hücre büyümesi ve pH üzerine etkisi.	49
4.5: Su sümbülü kökü ile ABE fermantasyonu sonuçları.	52
4.6: Su sümbülü gövdesi ile ABE fermantasyonu sonuçları.	53
4.7: Kurşun konsantrasyonunun bitki kısımlarında ve fitoremediasyon sıvısındaki değişimi.	54
4.8: Krom konsantrasyonunun bitki kısımlarında ve fitoremediasyon sıvısındaki değişimi.	55

4.9:	Su sümbülü ile enzimatik hidroliz ve ABE fermantasyonunda kurşunun etkisi.	56
4.10:	Su sümbülü ile enzimatik hidroliz ve ABE fermantasyonunda kromun etkisi.	57

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Çeşitli yakıtların fizikokimyasal özellikleri.	6
2.2: ABE üretiminin tarihçesi.	7
2.3: Biyobütanol üretimi ile ilgili kurulan tesisler.	8
2.4: Farklı Clostridium suşları ile ilgili çalışmalar.	25
2.5: Bütanol üretim sürecinde karşılaşılan problemler ve çözüm yolları.	28
2.6: Su sümbülünün büyüme şartları.	33
2.7: Su sümbülünün karbonhidrat içeriği hakkında çalışmalar.	35
3.1: Aşı besiyerinin içeriği.	36
3.2: Selüloz enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan enzim solüsyonları.	38
3.3: Selüloz enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan glikoz solüsyonları.	38
4.1: Su sümbülünün karbonhidrat içeriği.	45
4.2: Seyreltik asit hidrolizi uygulanan su sümbülü bitkisinden açığa çıkan şekerler.	50
5.1: Çalışmada elde edilen sonuçlar.	59
5.2: Çeşitli biyokütlelerle ABE fermentasyonunda biyobütanol üretiminin kıyaslanması.	60

1. GİRİŞ

Fosil yakıtların tükenme riski, çevreye verdiği zararlar ve bölgesel gerilimlere sebep olmaları alternatif enerji kaynaklarına olan ilgiyi artmıştır. Fosil yakıtlar petrol, doğalgaz ve kömür gibi çevre dostu olmayan ve yenilenemeyen kaynakları içermektedir. Yenilenebilir alternatif bir enerji kaynağı olan biyoyakıtlar çeşitli mikroorganizmaların metabolik ürünleri olarak üretilmektedir.

Dünya genelinde üretilen ve kullanılan biyoyakıtlar arasında yer alan biyobütanol üstün yakıt özellikleri sebebiyle sıkça araştırılmaktadır. Ancak endüstriyel olarak ABE fermantasyonu ile biyobütanol üretiminin sağlanabilmesi için proses maliyetinin düşürülmesi ve verimliliğinin artırılması gerekmektedir. Birçok biyoyakıt üreticisi biyobütanol üretmek amacıyla arge ve pilot tesis çalışmalarına yoğunlaşmaya başlamıştır ve ülkemizin de gelecek vadeden biyoyakıtlardan biri olan biyobütanol üretimi çalışmalarına başlaması büyük önem taşımaktadır.

Biyoyakıt üretimindeki en temel maliyetlerin başında hiç şüphesiz uygun bir substrat kaynağının kullanılması yer almaktadır. Yüksek şeker içerikleri sebebiyle birincil kaynaklar olan mısır, buğday ve pirincin ürün verimlerinin yüksek olmasına karşın öncelikle gıda olarak kullanılmaları nedeniyle gıda-yakıt çelişkisini ve etik sorunları gündeme getirmektedir. Bu nedenle gıda olarak kullanılmayan bitki ve bitki kısımlarından oluşan lignoselülozik biyokütlelerin biyoyakıt üretimindeki potansiyelleri üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Atıkların doğaya kontrolsüz şekilde salınması nedeniyle su, toprak ve hava ortamında birikmesi canlıların yaşamını olumsuz olarak etkilemektedir. Alıcı ortamlara en fazla deşarj edilen kirleticiler arasında yer alan ağır metaller insanlarda ve diğer canlılarda önemli hastalıklara sebep olmaktadır. Krom, kurşun, kadmiyum, arsenik, nikel, çinko, alüminyum, bakır ve mangan gibi ağır metaller toksik olmalarının yanı sıra biyo-bozunma özelliğine de sahip değildirler. Ayrıca ağır metaller organik maddelerde birikme eğilimi yüksek olması sebebiyle hayvan ve insan vücudunda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmektedir [1].

Bitkilerin ağır metal gibi toksik maddeleri ve besinleri alıcı ortamdan ekstrakte etme özellikleri fitoremediasyon olarak adlandırılmakta ve düşük maliyetli bu yöntem ile karmaşık proseslere gerek duyulmadan geniş alanlarda kirleticilerin giderimi

sağlanabilmektedir. Su sümbülü bazı ağır metaller için hiperakümülatör olma özelliği sebebiyle fitoremediasyon verimi yüksek bir bitkidir. Toksik kimyasallara karşı dirençli olması ve yüksek üretim hızında üremeleri kirleticilerin su ortamından gideriminde avantaj sağlamaktadır. Fitoremediasyonun kirleticilerin giderimindeki avantajları bilinmekle beraber fitoremediasyonda kullanılan bitkilerin nasıl değerlendirileceği ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Fitoremediasyon sonrası kontamine olmuş biyokütlenin yakıt üretimi amacıyla hammadde olarak kullanımı hem yakıt üretiminde substrat kaynağı sağlayacak hem de fitoremediasyon yöntemini ekonomik açıdan cazip hale getirebilecektir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

21. yüzyılda yenilenebilir çevre dostu biyoyakıtların kullanımına olan ihtiyaç artmıştır. Biyoyakıtların yenilenebilir biyokütleden üretilebilmeleri sürdürülebilir enerji üretimini desteklerken, fosil yakıtlara kıyasla biyoyakıt üretim maliyetlerinin yüksek olması proseslerin gelişmesinde ve ticari olarak kullanımında problem oluşturmaktadır. Biyoyakıt üretiminde maliyeti etkileyen ana etmenlerden biri uygun substrat kaynağının seçimidir ve ekonomik ve gıda değeri olmayan lignoselülozik biyokütlelerin kullanımı üzerine çok sayıda araştırma yapılmaktadır.

Biyobütanol fizikokimyasal özellikleri sebebiyle benzinli araçlarda direk yakıt olarak kullanılabilmesi ve yüksek enerji içeriği sebebiyle ilgi görmektedir. Uygun substrat seçimi endüstriyel biyobütanol üretiminin yaygınlaşmasını kolaylaştıracaktır. Bu tez çalışmasının amacı ağır metal gideriminde kullanılan su sümbülü bitkisinin biyobütanol üretiminde hammadde olarak kullanım potansiyelinin araştırılmasıdır. Toksik kimyasalların giderimine yönelik çalışmalarda tercih edilen bitkilerden biri olan su sümbülü fitoremediasyon prosesi sonunda toksik madde içeren bir atık olarak karşımıza çıkmaktadır. Literatürde bu biyokütlenin değerlendirilebileceği alanlar ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında su sümbülü kurşun ve krom gideriminde kullanılmış ve ağır metal içeren su sümbülü biyokütlesinin ABE fermantasyonunda hammadde olarak kullanımının biyobütanol ve diğer yan ürünlerin (aseton ve bütanol) üretimine olan etkisi değerlendirilmiştir.

Bu tez kapsamında, öncelikle ikinci bölümde ABE fermantasyonu ile biyobütanol üretimi prosesi ve fitoremediasyon yöntemi ile ağır metallerin giderimi anlatılmıştır. Üçüncü bölümde, tez çalışmasında kullanılan malzemeler ve çalışmanın yöntemi açıklanmıştır. Dördüncü ve son bölümde ise fitoremediasyonla ağır metallerin giderimi çalışmalarının verimlilikleri Biyokonsantrasyon faktörü (BCF) ve Translokasyon faktörü (TF) eşitlikleri kullanılarak verilmiş, ABE fermantasyonunda substrat kaynağı olarak direk glikoz, su sümbülü ve fitoremediasyon çalışmaları sonucu kurşun ve krom içeren su sümbülü kullanımının etkileri gözlemlenmiştir. Beşinci ve son bölümde ise substrat kaynakları karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlar ile ilgili yorumlar ve gelecek önerileri tartışma ve öneriler konu başlığı altında anlatılmıştır.

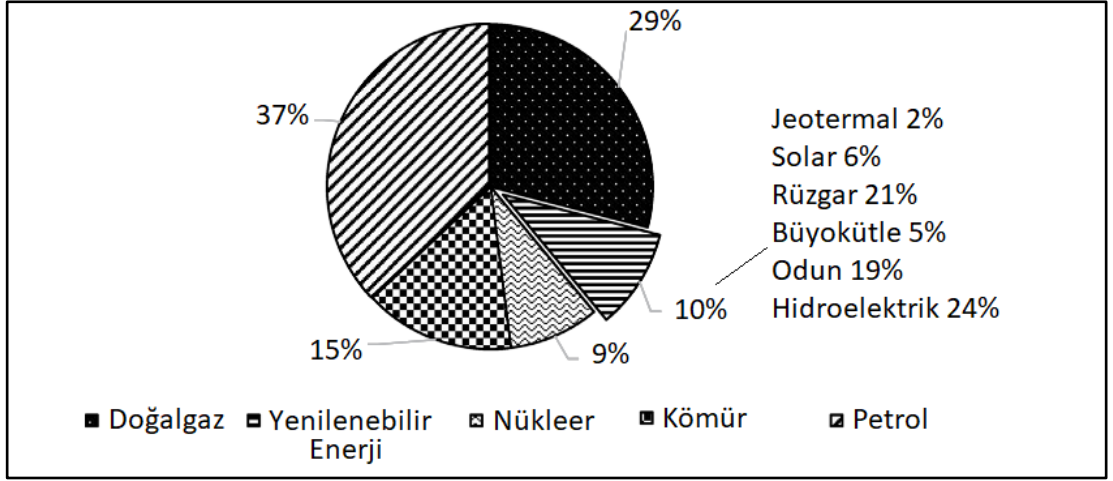
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Biyoyakıtlar

Petrol fiyatlarındaki dalgalanmalar, çevre kirliliği ve küresel ısınma problemleri insanlığı alternatif yollardan enerji üretimine yönlendirmiştir. Biyolojik yollarla yakıt üretimi alternatif enerji kaynakları arasında önemli bir yere sahiptir. Günümüzde en çok üretimi yapılan ve kullanılan biyoyakıt biyoetanoldür. Biyoetanol, başta mayalar olmak üzere çeşitli mikroorganizmaların şekerleri fermente ederek oluşturdukları ve içten yanmalı motorlarda belli oranlarda benzin katkısı olarak kullanılan değerli bir yakıttır 1815'te Gay-Lussac tarafından bulunan şekerlerin fermantasyonu ile teorik olarak 0,51 gr etanol/gr glikoz ürün verimi elde edilmektedir. Brezilya ve Amerika başta olmak üzere birçok ülkede mısır ve buğdaya dayalı biyoetanol üretim tesisleri bulunmakta ve biyobütanol piyasası her geçen gün büyümektedir [2].

Biyoetanölün petrokimyasal yakıtların yerini almasında karşılaşılan kısıtlamalar (sadece yakıt katkısı olarak kullanılabilmesi, içten yanmalı motorlarda modifikasyon gerektirmesi vb.) araştırmacıları ve endüstrileri alternatif yollarla yakıt üretim prosesleri arayışına itmiştir. Fermantasyonda şeker ve nişasta içeriği yüksek gıdaların kullanımının gıda-yakıt çelişkisi nedeniyle biyoyakıt üretiminde geleceğinin olmadığı düşünülmektedir. Biyoyakıt üretiminde hammadde olarak şeker içeriği yüksek bitki atıklarının (lignoselülozik biyokütle) değerlendirilmesine ilişkin çalışmalar bütanol üretimi konusunda da yenilikçi proses ve teknolojiler geliştirilmesine imkân sağlamaktadır. Enerji Bilgi İdaresinin (Energy Information Administration) 2017 yılı raporuna göre enerji ihtiyacının %46'sı yenilenebilir kaynaklardan %4,6'sı ise biyoyakıtlardan karşılanmaktadır. Diğer enerji kaynakları ve tüketim yüzdeleri Şekil 2.1'de görülmektedir [3].

Son yıllarda bütanolün sahip olduğu; yüksek enerji içeriği, düşük korozyon, petrol yakıtlarla yüksek oranda karıştırılarak kullanılabilme ve bu sayede benzinli araç motorlarında hiçbir değişikliğe gerek duyulmadan direk kullanılabilme gibi üstün fizikokimyasal özellikleri nedeniyle yakıt olarak kullanılabilirliği konusu yoğun bir şekilde araştırılmaktadır.



Şekil 2.1: Enerji kaynaklarının toplam tüketimdeki payları.

2.2. Biyobütanol

Bütanol kimyasal veya biyolojik yollarla (ABE fermantasyonu) üretilen ve çeşitli endüstrilerde hammadde olarak kullanılan dört karbonlu bir alkoldür. Bütanol yüksek enerji içeriğine sahip (29,2 MJ/L), renksiz ve organik solventlerle karışabilen bir sıvıdır.

Her yıl yaklaşık 6 milyon galon bütanol petrokimyasal yollarla üretilmektedir. Ancak üretilen bütanolün yaklaşık yarısı ester ve akrilat üretiminde kullanılmaktadır. Ne yazık ki henüz yakıt ve yakıt katkısı olarak ticari kullanımı gerçekleşmemiştir. Araştırmaların büyük çoğunluğunun biyobütanol üretimine yönelik olması biyobütanolü potansiyel bir yakıt olarak ikinci plana itmiştir. Bütanolün etanole kıyasla daha yüksek enerji içeriğine sahip olması, suda çözünürlüğünün düşük olması, düşük korozyon özelliğinin olması, yüksek oktan sayısı ve yüksek parlama noktasına sahip olması gibi üstün özellikleri daha fazla avantaj sağlamaktadır. Bu özellikleri biyobütanolün benzinli araçlarda direk veya gazolin katkısı olarak kullanımını mümkün kılmaktadır. Farklı yakıtların fizikokimyasal özellikleri Tablo 2.1’de verilmiştir [4]. Ketan sayısı yakıtın tutuşabilirliği hakkında bilgi veren bir indekstir ve yakıtlarda yüksek olması tercih edilir. Biyobütanolün ketan sayısının ve ısı değeri etanole göre yüksek olması biyobütanole olan ilginin artmasına sebep olmuştur.

Tablo 2.1: Çeşitli yakıtların fizikokimyasal özellikleri.

Yakıt özelliği	Dizel	Metanol	Etanol	n-Bütanol
Ketan sayısı	40-55	3	8	12
Yoğunluk (g/mL)	0,86	0,80	0,79	0,81
Tutuşma sıcaklığı (°C)	200-220	470	434	385
Düşük ısı değeri (MJ/Kg)	42,5	37,6	19,9	35,1
Kaynama noktası (°C)	180-230	64,5	78,4	117

2.3. Biyobütanol Üretimini Tarihçesi

Mikrobiyal yolla bütanol üretiminin tarihi çok eskidir. Mikrobiyal bütanol üretiminden ilk kez 1861 yılında Louis Pasteur bahsetmiştir. Ancak 20. yy'ın başlarında Chaim Weizmann'ın spor oluşturan anaerobik Clostridium suşlarını keşfine kadar endüstriyel boyutta bütanol üretimi gerçekleştirilmemiştir. 1. Dünya savaşı sırasında aseton üretimi amacıyla aseton-bütanol-etanol (ABE) fermantasyonu prosesi geliştirilmiş ve yan ürünü olarak bütanol üretilmiştir. Daha sonra petrokimya endüstrisindeki gelişmeler ile bütanol üretiminde ABE fermantasyonu kullanılmamaya başlamış ve fermantasyon tesisleri kapatılmıştır. Bu durumun bir diğer sebebi ise gelişen şeker endüstrisi ile atık melas kalitesinin çok düşmesine bağlı olarak fermantasyon verimindeki düşüştür. Ayrıca melasın hayvan yemi olarak kullanımı ham madde fiyatını çok yükseltmiş ve ABE fermantasyon prosesi petrokimyasal bütanol üretimi ile yarışamaz duruma gelmiştir. Güney Afrika tesisinde 1982, Rusya'da 1992 ve Çin'de 2004 yılına kadar ABE fermantasyon tesislerinde üretim devam etmiştir. Hatta Çin'de bulunan tesislerin kapatılmadan önce 0,2 milyon ton üretim kapasitesine ulaştığı hakkında raporlar bulunmaktadır [5].

Mikrobiyal bütanol üretimi prosesi üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen proses maliyetinin yüksek olması sebebiyle petrokimyasal prosesler ile rekabet sağlanamamıştır. Ancak 1980li yıllarda petrol fiyatlarında yaşanan yükseliş tekrar aseton-bütanol-etanol fermantasyon sürecinde kullanılan Clostridium suşuna ilgiyi arttırmıştır. ABE fermantasyonunun gelişim süreci Tablo 2.2'de verilmiştir [5].

Tablo 2.2: ABE üretiminin tarihçesi.

Tarih	Gelişme
1861	Mikrobiyal bütanol üretiminden ‘Vibron Butyrique’ adı verilerek ilk kez bahsedildi
1905	Aseton fermantasyonu
1910	Bütanol veya izoamil alkolden izopren veya bütadien üretiminin metabolik yolu açıklandı
1911	Patatesten bütanol fermantasyonu yapabilen mikrobiyal popülasyonun izolasyonu gerçekleştirildi.
1912-1914	Birçok farklı kültürün bütanol fermantasyonu hakkında çalışmalar yapıldı ve nişastalı biyokütleden bütanol ve aseton üreten suş <i>Clostridium acetobutylicum</i> olarak isimlendirildi.
1913	Strange ve Graham Ltd. şirketi fernbach bacillus’u kullanarak gerçekleştirilen proses için patent başvurusu yaptı ve Rainham’da patatesten bütanol ve aseton üretimine başladı
1916	Strange ve Graham Ltd. şirketi İngiliz deniz kuvvetleri tarafından satın alındı ve Weizmann prosesi değiştirilerek mısır ana hammadde olarak kullanılmaya başlandı
1918	Barut yapımı amacıyla aseton üretimi başladı ve kanada’da bütanol üretimi ve depolanması ile ilgili gelişmeler gerçekleştirildi.
1919-1923	Weizmann 1920 de Amerika’da patent aldıktan sonra Terre Cotta fabrikasında bütanol üretimine başladı. Böylece dünya çapında prosesin tüm haklarını kendilerine almış oldu. 1923’te bakteriofaj kontaminasyonu gerçekleşti ve üretim kötü şekilde etkilendi. Weizmann hemen bir araştırma takımı kurarak durumu düzeltmeye çalıştı.
1935	Commercial solvents crop. ve Distillers’s Co birlikte proje başlatarak endüstriyel seviyede alkol, aseton ve bütanol üretmeye başladılar. Fabrikada sadece eğitim görmüş İngilizler çalıştırıldı ve proses J. Hasting tarafından yönetildi. <i>C. Saccharoacetobutylicum</i> suşu kullanıldı.
1936-1960	Yeni aseton- bütanol üretim tesisleri Weizmann’ın patent süresinin 1936’da dolması ile Filedelfiya, Baltimor ve Porte Riko’da kuruldu. Bu yıldan sonra prosesle ilgili 18 patent daha alındı. Publiker Industrial Inc, Commercial Solvents Crop, western condensing Co. ve U.S. Industrial Chemicals Co. gibi büyük üretim tesisleri açıldı. Güney Afrika, Avustralya, Japonya ve Hindistan gibi dünyanın çeşitli bölgelerinde ABE üretim tesisleri açıldı. Bu alanda birçok makale yazıldı ve sürekli kültürde ABE fermantasyon tesisi 1960’ta Dokshukino’da kuruldu. İkinci dünya savaşının etkisiyle aseton-bütanol fermantasyon çalışmaları durma noktasına geldi.
1982	1982’de son tesis olan Güney Afrika fabrikası da kapandı.
1980-şimdi	Proses optimizasyonu, tür geliştirme, uygun substrat arama çalışmaları tekrar yoğun bir şekilde gerçekleştirildi. Rekombinant DNA teknolojileri ve genetik manipülasyon teknikleri ile <i>Clostridia</i> suşlarında elde edilen gelişmeler ile araştırmacılar bu konu üzerine yoğunlaştı ve tekrar endüstriyel boyutta bütanol üretim tesisleri açılmaya başlandı.

2.4. Biyobütanol Üretiminin Dünyadaki Durumu

Suudi Arabistan'da kurulan SaBuCo biyobütanol üretim tesisi 2016 yılından itibaren üretim faaliyetine başlamıştır. 2017 yılında ise İngiltere'de Green Biologics şirketi n-bütanol üretimine başlamıştır. Son yıllarda Amerika, Brezilya ve Çin büyük ölçekli bütanol üretim prosesleri üzerine çalışmaları desteklemektedirler. Gevo, Inc., Butamax Advanced Biofuels LLC, DuPont, Chevron Oronite ve Cobalt Technologies bütanol üretimi yapmak ve ABE fermantasyon prosesini iyileştirmek üzere çalışan diğer fabrikalardır [3]. 2018 biyobütanol üretimi ve Ar&Ge çalışmaları amacıyla kurulan tesisler Tablo 2.3'te listelenmiştir.

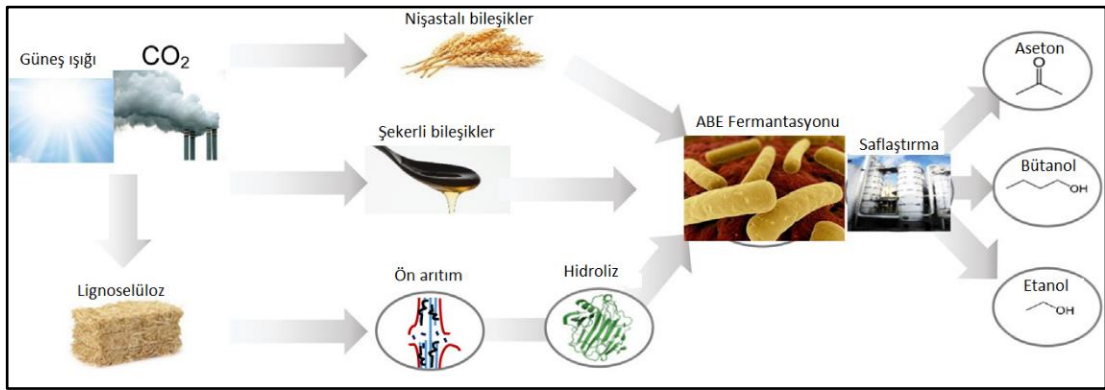
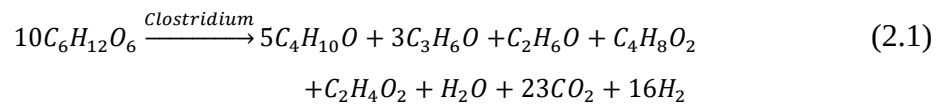
Tablo 2.3: Biyobütanol üretimi ile ilgili kurulan tesisler.

Şirket	Hammadde	Yer	Tarih	Durumu
Butamax	Mısır	Amerika	2009	Arge
Gevo	Mısır, şeker	Amerika	2005	Arge
Butalco GmbH	Tarımsal atık	İsviçre	2007	Pilot tesis
Green Biologics	Şeker ve tarımsal atık	İngiltere	2003	Arge
Cathay Industrial Biotech	Tarımsal atık	Çin	1997	Arge
Energy Request	Petrokimyasal ve tarımsal hammadde	Malezya	2004	Arge
Laxmi Organic Industries Ltd	Şeker kamışı	Hindistan	2005	Arge
SaBuCo	Petrokimyasal hammadde	S. Arabistan	2013	Arge
GS Caltex	Mısır ve manyok	Kore	2007	Pilot tesis

2.5. Biyobütanol Üretim Prosesi

Lignoselülozik biyokütleden biyobütanol üretimi biyokütlenin ön işlemleri ile başlar. Bitki bünyesindeki şekerlerin serbest şekerlere dönüşmesinde fiziksel, kimyasal ve biyoloji işlemler uygulanmaktadır. Daha sonra şekerler uygun reaktörde Clostridium suşları ile muamele edilerek ABE fermantasyonu başlatılmış olur [6]. Lignoselülozik biyokütleler ile ABE fermantasyon proses adımları Şekil 2.2'de gösterilmiştir [6].

ABE fermantasyonu asidojenik ve solventojenik olmak üzere iki fazda gerçekleşir. Asidojenik fazda eksponensiyel büyüme görülürken substratlar asetik asit, bütirik asit, CO₂ ve H₂ üretmek için kullanılır. Durağan fazda ise üretilen asitler kullanılarak aseton, bütanol ve etanolün üretimi görülür. Asidojenik fazdan solventojenik faza geçiş pH'ın etkisiyle gerçekleşmektedir. Ara ürünlerin üretilmesiyle kritik seviyeye (pH≈4,5) kadar düşen pH sonucunda hücre asidojenik fazdan solventojenik faza girer. Solventojenik fazda ise fermantasyon tamamlanana kadar pH 4,5-5 aralığında kalmaktadır. ABE üretiminin genel kimyasal reaksiyonu Eşitlik 2.1'de gösterilmiştir [7].



Şekil 2.2: Lignoselülozik biyokütleden aseton, bütanol ve etanol üretimi.

2.5.1. Karbon Kaynakları

2.5.1.1. Birincil Karbon Kaynakları

20. yüzyılın başlarında şeker kamışı, tahıllar ve gıda endüstrisi atıkları ABE fermantasyonunda karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Gıda ürünlerine olan ihtiyacın artışı ile bu kaynakların kullanımının etik ve ekonomik açıdan uygun olmadığını göstermiştir [8]. Gıda endüstrisinin atıkları ise atık yönetimi sağlaması avantajı ile cazip bir substrat olarak görülmektedir [9]. Peynir altı suyu laktoz içeriği ile [10]-[11],

şeker kamışı melası %50-55 şeker içeriği ile [12]–[14] uygun karbon kaynakları olarak görülmüş ve araştırmacılar tarafından sıkça substrat olarak kullanılmıştır.

2.5.1.2. İkincil Karbon Kaynakları

Yenilemeyen karbon kaynaklarının (tarımsal atıklar, odun talaşı, tahıl artıkları vb.) ABE fermentasyonunda substrat olarak kullanımı gıda bitkilerinin bu proses için kullanımını azaltacak ve üretim maliyetini büyük oranda düşürecek bir yol olarak değerlendirilmektedir. Birleşmiş Milletler Çevre Programı'na (UNEP 2015) göre her yıl 140 milyar ton tarımsal biyokütle üretilmektedir. Bunların içinde tüm dünyada pirinç sapı ve buğday sapı yıllık üretimi sırasıyla 731,3 ve 354,34 milyon ton ile ilk sırayı almaktadır [15]. Ancak zamansal ve mekânsal varyasyonların biyokütle üzerindeki etkilerinin endüstriyel biyobütanol üretimini etkileyebileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Lignoselülozik biyokütlelerin selüloz ve hemiselüloz içeriğinin birbirinden çok farklı olması ve ön arıtım yönteminin etkinliğinin biyokütlenin yapısal kristalinitesine bağlı olması ABE üretim verimleri arasında da değişimlere sebep olmaktadır [16].

2.5.1.3. Üçüncül Karbon Kaynakları

Algler atıksulardan inorganik nütrientleri giderdiği ve CO₂'i özümledikleri için potansiyel yeşil enerji kaynağı olarak görülmektedirler [17]. Yüksek karbonhidrat ve düşük lignin içeriği ile algler biyoyakıt üretiminde sürdürülebilir ve umut vadeden karbon kaynaklarıdır [18]. Clostridial suşlar 1 g/L furfural ve 2 g/L 5-hidroksimetilfurfuralı tolere edebilirler. Alglerde bu toksinlerin çok küçük miktarlarda bulunması detoksifikasyon ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır [19]. Çeşitli alg suşlarının karbonhidrat içeriğinin artırılması üzerine bazı çalışmalar olmasına rağmen bu biyokütlenin biyobütanol üretiminde ticari olarak kullanımı hakkında yeterli bilgi henüz bulunmamaktadır [20].

2.5.2. Ön Arıtım Yöntemleri

Fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal ön arıtım yöntemleri araştırmacılar tarafından biyokütlenin kompozisyonu ve karakteristik özelliklerine göre seçilmektedir. Lignoselülozik biyokütlenin yapısındaki kompleks moleküller olan selüloz, hemiselüloz ve ligninin varlığı kapsamlı ön arıtım yöntemlerinin kullanımını ürün verimliliğini arttırmak için zorunlu hale getirmiştir [21]. Her ön arıtım yönteminin avantaj ve dezavantajları vardır. İdeal ön arıtım yöntemi hemiselüloz ve lignini giderirken kristaliniteyi düşürmeli ve fermantasyonu inhibe eden kimyasal maddeleri üretmemelidir.

Lignoselülozik biyokütlenin ön arıtımında kullanılan yöntemler genel olarak 5 grupta toplanır. Bunlar:

- Fiziksel ön arıtım
- Kimyasal ön arıtım
- Fizikokimyasal ön arıtım
- Biyolojik ön arıtım
- Birleştirilmiş ön arıtım yöntemleri

2.5.2.1. Fiziksel Ön Arıtım Yöntemleri

İşlenmemiş biyokütlenin partikül boyutunu düşürerek yüzey alanını kuru bir prosestir [22]. En yaygın fiziksel ön arıtım yöntemleri öğütme (ıslak ve kuru bilyeli öğütme), ekstrüzyon, mikrodalga irradasyon, piroliz ve gama irradasyondur [23]. Fiziksel ön arıtım yönteminin uygunluğunu etkileyen önemli faktörler biyokütlenin karakteristiği, enerji gerekliliği, nem içeriği, partikül boyutudur[22]. Bu yöntemler ile malzemenin partikül boyutu küçültülür ve yüzey alanı arttırılır. Bu yöntemler tek başına yeterince etkili ön arıtım sağlayamadığı için diğer ön arıtım yöntemleriyle birlikte kullanılmaktadır [24].

Boyut küçültme lignoselülozik biyokütlenin hidrolizinde kullanılan ilk adımdır. Ancak biyokütlenin boyutunun inhibitör kimyasalların oluşmaması için çok küçük

veya çok büyük olmamalıdır. Gereken ön arıtım metodunun seçimi biyoyakıt üretiminde kullanılacak biyokütlenin türü ve içeriğine bağlı olarak yapılmalıdır. Fiziksel ön arıtım yöntemlerinin arasında ekstrüzyon karıştırma, ısıtma ve parçalama işlemlerinin kombinasyonunu içeren yüksek miktarda şekerin açığa çıkarıldığı en iyi yöntem olarak görülmektedir. Mikrodalga yöntemi de biyokütleyle uygun sıcaklıkta uygulandığında konvansiyonel ısıtma yöntemlerinden daha etkilidir [25]. Dondurma yöntemi yüksek maliyeti sebebiyle şimdiye kadar çok tercih edilmemiştir. Piroliz yöntemi ise gaz biyoyakıtların üretiminde etkili olan ancak sıvı biyoyakıtların üretiminde kullanımı sınırlı olan bir yöntemdir [24].

- Öğütme

Öğütme ön arıtımın ilk adımı olarak kullanılmaktadır. Biyoyakıt üretiminde çift merdaneli öğütme, bilyeli öğütme, çekiçli öğütme ve disk öğütme gibi çeşitli öğütme yöntemleri tercih edilmektedir. Malzemenin boyutu talaşlama ile 10-30 mm'ye küçültülürken öğütme yöntemleri ile 0,2-2 mm 'ye kadar küçültülebilmektedir. Islak öğütme yönteminde ise enerji tüketimi daha düşüktür [26]. Genellikle boyut küçültüldüğünde biyoyakıt üretim verimliliği arttığı bilinmektedir ancak yapılan bazı çalışmalarda aşırı boyut küçültmenin inhibitör kimyasalların daha fazla miktarda oluşmasına sebep olduğu bildirilmiştir. Boyut küçültme yöntemleri diğer ön arıtım yöntemleriyle birlikte kullanıldığında daha etkilidir [27].

- Mikrodalga

Mikrodalga ışıınımı ile ön arıtım temel ısıtma proseslerine göre daha fazla hemiselüloz ve lignini daha fazla giderebildiği için avantajlıdır. Ayrıca enzimatik hidroliz verimini basit şekerlerin yüzeyindeki silikatlanmış yapıyı bozması sayesinde arttırmaktadır. Gabhane ve ark tarafından yapılan çalışmada mikrodalga ışıınımı yöntemi ile moleküler çarpışma ile oluşan dielektrik potansiyelinin selülozun parçalanmasına katkı sağladığı görülmüştür [28]. Bu metodun en büyük avantajı ısıtmaya kıyasla kısa sürede düşük enerji tüketerek ön arıtımı gerçekleştirmesidir. Mikrodalga ışıması yönteminde oluşan ısı sebebiyle fenolik bileşikler ve furfural gibi inhibitör etkiye sahip yan ürünler oluşabilmektedir. Bu sebeple lignoselülozik biyokütlenin ön arıtımında tek başına kullanılmayarak asidik ve alkali ön arıtım ile kullanılarak arıtım verimini arttırmada kullanılabilir [29].

- Ekstrüzyon

Ekstrüzyon termo-fiziksel bir ön arıtım yöntemidir ve %15-20 nem içeren lignoselülozik biyokütleyle uygulanır ve karıştırma, ısıtma ve kırma adımlarını içerir. Ekstrüzyon yöntemi yüksek oranda mekanik kırma ile biyokütlenin yapısında fiberleri kısalttığı ve defibrilasyon sağladığı için avantajlıdır. Ekstrüzyon yönteminde malzemenin akışkanlık özelliğinin olması gerekmektedir. Akışkan olmayan malzemelerde ise bazı kimyasallar (karboksi metil selüloz ile NaOH) eklenerek akışkanlık özelliği kazandırılmaktadır. Ekstrüzyon işlemi yüksek basınç altında gerçekleştirildiğinde diğer yöntemlerde de oluşan furfural ve diğer fenolik bileşikler oluşmaktadır [30]–[32].

- Dondurma

Enzimin lignoselülozik biyokütleyi parçalamasında katkı sağlaması sebebiyle tercih edilmeye başlanan dondurma yöntemi yeni geliştirilen fiziksel ön arıtım işlemlerinden biridir. Yöntemin yüksek maliyetli olması sebebiyle çok fazla çalışmada kullanılmamıştır. Ancak tehlikeli kimyasalların kullanımına gerek olmadan ön arıtım yapılması, üretim verimliliği ve çevreye olumsuz etkisinin bulunmaması gibi avantajları da bulunmaktadır [24].

- Piroliz

Piroliz yöntemi 300 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda lignoselülozik biyokütlenin hidrolizinde kullanılan ve az enerji harcayan endotermik bir prostestir. Bu prosteste lignoselülozik biyokütlenin içeriğindeki selüloz çar ve gaz ürünlere (H₂, CO) dönüşümü gerçekleşir. Oluşan çar zayıf asitle hidroliz edilir ve su ile yıkanır. Yıkama suyuna geçer şekerler de biyoyakıt üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılır [24].

2.5.2.2. Kimyasal Ön Arıtım Yöntemleri

Kimyasal ön arıtım yöntemi yüksek lignin içeriğine sahip biyokütlelerde de olumlu sonuçlar elde edilen asidik, alkali, peroksit, ozonlama ve organosolv ön arıtım yöntemleridir. Ön arıtım yöntemlerinin kombinasyonlarının birlikte kullanılması

biyokütlerdeki kompleks yapıların parçalanması ve verimliliğin artırılması yönünde katkı sağlamaktadır [2].

Bütün ön arıtım yöntemleri arasında asit ve alkali ön arıtım yöntemleri selüloz ve hemiselülozun ayrılmasındaki etkinlikleri ve lignin giderim verimleri sebebiyle lignoselülozik biyokütlerin ön arıtımında en sık kullanılan yöntemlerdir. İyonik sıvı ve organosolv ön arıtım yöntemlerinde kullanılan kimyasalların prostesten geri kazanılamaması ve yüksek maliyetleri sebebiyle daha az kullanılmaktadır. Ozonlama ve oksidasyon proseslerinin de yüksek işletme maliyetleri kullanımlarını kısıtlamıştır. Bütün yöntemlerin avantaj ve dezavantajları vardır. Ancak asit ön arıtımı yönteminde yüksek sıcaklıkta seyreltik asitlerin kullanımı en avantajlı yöntem olarak görülmektedir [33].

• Asit Ön Arıtımı

Asit hidrolizi lignoselülozik biyokütlenin ön arıtımında en sık kullanılan yöntemdir. Asit hidrolizi sonucu polisakkaritlerin (özellikle hemiselüloz) çözülmesiyle enzimatik hidroliz verimliliğini artırır. Asit ön arıtımı hemiselülozu parçalayarak ksilanı açığa çıkardığı için lignoselülozik biyokütlerde ön arıtım verimliliğini arttırmaktadır [23]. Seyreltik asit hidrolizinde organik ve inorganik asitler (hidroklorik asit, sülfürik asit, nitrik asit, fosforik asit, maleik asit, formik asit, asetik asit vb.) kullanılmaktadır [80]. Ancak lignoselülozik biyokütlenin hidrolizinde en sık kullanılan sülfürik asittir [48], [59], [69], [88]-[89]. Seyreltik asit ön arıtımı kullanılan asitlerin toksik, korozyon ve tehlikeli olması sebebiyle daha çok tercih edilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda düşük katı oranı (%5-10) veya düşük sıcaklıklarda yüksek katı oranı (%10-40) ile ön arıtım gerçekleştirilmektedir. Bu metot selülozik olmayan veya düşük lignin içeriğine sahip (algler gibi) olan biyokütlerde verimli bir şekilde kullanılmaktadır [34]. Yöntemin en büyük dezavantajı mikroorganizmaların gelişmesini inhibe eden kimyasalların (asetik asit, furfural, 5-HMF vb.) oluşmasıdır. Konsantre asitlerin kullanılması selülozun parçalanmasında çok etkili olmasına rağmen toksisite, korozyon ve reaktör maliyetleri gibi olumsuz tarafları vardır [35].

Alkali Ön Arıtımı

Alkali ön arıtım biyokütlerde ligninsizleştirme ve hemiselülozun çözünmesi işlemlerini verimli bir şekilde gerçekleştiren ancak yüksek miktarda şeker

parçalanması için uzun süre gerektiren bir yöntemdir [36]. Asit ön arıtımı sert odun gibi düşük lignin içeriğine sahip biyokütleler için uygunken, alkali ön arıtımı yumuşak odunlarda daha uygundur [37]. Alkali kimyasallar moleküller arası bağların sabunlaşmasına sebep olarak polimerik yapının parçalanarak poroziteyi arttıırırlar [31]. Bu kimyasallardan en verimli olan NaOH selülozun iç yüzey alanını artırır, yapının polimerizasyon derecesini ve kristalinitesini düşürür.

Alkali ön arıtımı enzimatik hidroliz için selüloz parçalanabilirliğini arttırırken; asetil grupları, lignin ve çeşitli üronik asit türleri gibi inhibitör bileşikler giderir. Lignoselülozik biyokütlenin alkali ön arıtımı selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi polisakkaritleri çözerek hücre duvarını parçalar. Biyokütlenin porozitesinin artmasına sebep olan hemiselüloz ile diğer bileşenler arasındaki çapraz bağları koparan sabunlaşma reaksiyonu ile lifli yapıda selülozun kimyasal şişmesi de gerçekleşir. Bu metodun dezavantajları uzun süre alması ve arıtılmış çamurun nötralizasyonuna gerek duyulmasıdır [38]. NaOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, KOH ve NH_3 sıklıkla kullanılan alkali kimyasallardır.

- Organosolv Ön Arıtımı

Organosolv prosesi organik veya sıvı organik fazı ile inorganik bir katalizör (HCl, H_2 , H_2SO_4 , NaOH) içeren ve ligninsizleştirmeyi sağlayan bir işlemdir. Etanol organosolv ön arıtımında düşük toksisitesi, yüksek kaynama noktası ve düşük yanma potansiyeli gibi özellikleri sebebiyle sıkça kullanılmaktadır. Organosolv ön arıtımı ile toplam proses verimliliği büyük ölçüde artmaktadır. Ancak bu proses solvent ve detoksifikasyon prosesinin yüksek maliyeti sebebiyle ekonomik açıdan uygun değildir [39]. Furan aldehytler, karboksilik asitler ve fenolik moleküller gibi inhibitör bileşikler lignoselülozik biyokütlelerin fizikokimyasal ve kimyasal ön arıtımında oluşarak enzimatik hidroliz ve fermentasyon prosesinin verimliliğini düşürürler [40]. Adsorbentler (aktif karbon), alkali kimyasallar ve indirgeyici maddeler inhibitör bileşiklerin etkilerini minimize etmek için kullanılmaktadırlar [41]-[42]. Bunların içinde ditiyonit ve sülfür oksianyon sülfid gibi indirgeyici maddelerin aromatik inhibitör bileşiklerin etkisini azaltarak enzimatik hidroliz ve fermentasyon verimliliklerini arttırdıkları bulunmuştur [43].

- Oksidasyon Ön Arıtımı

Hidrojen peroksit (H_2O_2) veya perasetik asit gibi oksitleyiciler ön arıtmıda kullanılmaktadır. Perasetik asit ile lignin çözünür parçalar oluşturur. Oksidasyon sırasında yan zincirlerin yerdeğişimi, elektrofilik değişim, aromatik çekirdeğin oksidatif ayrılması veya alkil aril eter bağlarının ayrılması gerçekleşebilir. Hidrojen peroksit ön arıtımı oksidatif delignifikasyona katkı sağlar ve böylece lignin ayrılarak çözünür hale gelir ve enzim hidrolizi verimi artar [44]. Hidrojen peroksit ön arıtımı asit veya alkali ön arıtım ile birlikte de gerçekleştirilebilmektedir [45]. Lignoselülozik biyokütlenin oksidasyonunda ligninin oksidasyonu ile inhibitör etki yaratan çözünür aromatik bileşikler oluşabilmektedir. Hidrojen peroksit yüksek konsantrasyonda ($>4\%$) kullanıldığında fazla miktarda hidroksil iyonunun reaktörde bulunması mikroorganizmalara toksik etki yapabilir [46].

- Ozonlama Ön Arıtımı

Ozon lignin ve hemiselülozu parçalayarak selüloz biyodegradasyonunu arttıran oksitleyici gaz olarak kullanılmaktadır. Ancak yüksek maliyeti ve proseste çok fazla ozon kullanılmasını gerekmesi sebebiyle ozonlama ön arıtımı çok fazla kullanılmamaktadır [47].

- İyonik Sıvı Ön Arıtımı

İyonik sıvılar erime noktası $100^\circ C$ olan çeşitli anyon ve katyonlardan oluşan organik tuzlardır. N-metilmorfolin- N-Oksit monohidrat (NMMO), 1-allil-3-metilimidazolyum klorür (AMICl), 3-metil-Nbütilpridinyum klorür (MBPCL) ve 1-n-butil-3 metilimidazolyum klorür (BMIMCl) gibi iyonik sıvılar lignoselülozik biyokütlenin ön arıtımında kullanıldığında enzimatik hidroliz verimliliği de artmaktadır. İyonik sıvılar klorür, format asetat veya alkil fosfonat anyonlarını içerdiğinde güçlü hidrojen bağları oluşturarak selülozun çözünmesini sağlar. Bu yöntemin dezavantajları ise iyonik sıvıların yüksek maliyeti, iyonik sıvıların geri kazanımının fazla miktarda enerji gerektirmesi ve oluşan sıvının viskoz olması sebebiyle prosesin zorlaşmasıdır [48].

2.5.2.3. Fizikokimyasal Ön Arıtım Yöntemleri

Buhar patlatma, sıcak su, amonyak fiber patlama, süperkritik CO₂ patlaması ve ıslak hava oksidasyonu yöntemleri sıklıkla kullanılan fizikokimyasal ön arıtım yöntemleridir. Buhar patlaması otohroliz ve basınçsızlaştırma adımlarından oluşmaktadır. Otohroliz adımında yüksek sıcaklıkta asetik asit oluşumu gerçekleşirken basınçsızlaştırma adımında kompleks yapıdaki bağlar koparılır [49]. Bu yöntemin dezavantajı ise lignin-karbonhidrat matriksinin tamamlanmamış ayrılması sebebiyle yüksek miktarda inhibitör bileşiklerin oluşmasıdır [16]. Çözünür ligninin absorblanması için aktif karbon kullanımı ön arıtımda inhibitör oluşumunu azaltabilmektedir. Ayrıca buhar patlatma yönteminde asitlerin kullanılması da inhibitör oluşumunu azaltarak ön arıtım verimliliğini arttırmaktadır. Diğer fizikokimyasal ön arıtım yöntemleri lignin ve hemiselüloz çözünürlüğü dezavantajı sebebiyle daha az kullanılmaktadır [50]. Amonyak fiber ve CO₂ patlaması yöntemleri düşük inhibitör oluşturmaları sebebiyle etkilidir. Ancak bu yöntemlerde hemiselüloz çözünürlüğünün az olması, yüksek miktarda lignin içeren biyokütlelerde etkili olmaması ve buhar patlatma yöntemine göre daha düşük verime sahip olması daha az tercih edilme sebepleridir [51].

- Amonyak Fiber Patlaması

Bu yöntemde sıvı amonyak ve su buharı patlaması gerçekleşmektedir. Amonyak fiber patlaması alkali termal ön arıtım yöntemidir ve yöntemin optimizasyonu su oranı, amonyak oranı, reaksiyon sıcaklığı ve süresinin optimize edilmesine bağlıdır [52]. Bu yöntemde fiziksel ön arıtım işlemlerden biri olan öğütme işlemine gerek duyulmaz ve proses boyunca inhibitör bileşiklerin oluşumu görülmemektedir. Ancak yüksek lignin içeriğine sahip (gazete ve yumuşak odunlar gibi) biyokütlelerde düşük verim görülmesi yöntemin dezavantajıdır. Kullanılan amonyak ön arıtım sonrası geri kazanılabilirse yöntem düşük maliyetli olarak uygulanabilmektedir.

- Ultrasonikasyon

Aslında fiziksel bir ön arıtım metodu olan ultrasonikasyon asit veya bazlar ile kullanıldığında fizikokimyasal bir yönteme dönüşmektedir. Ultrasonikasyon ile oluşan

monolitik kaviteasyon sıvı çözeltilerde fiziksel ve kimyasal değişimler oluşturmaktadır. Sonuçta kaviteasyona bağlı olarak hücre duvarı parçalanır, spesifik yüzey alanı artar, polimerizasyon derecesi azalır ve biyokütlenin biyoparçalanabilirliği artmış olur [24].

- Otohidroliz ve Buhar Patlaması

Buhar patlaması ön arıtımı yöntemi termo-mekanik-kimyasal bir metottur. Bu metotta lignoselülozik biyokütlenin yapısal bileşenleri buharla ısıtma (160-270 °C, 20-50 bar), kırma (mekanik) ve glikosidik bağların otohidrolizi(kimyasal) ile enzimatik olarak daha kolay parçalanabilir hale getirilir. Yöntemin avantajı kimyasalların kullanılmaması ve buna bağlı olarak kirlilik oluşturmaması, düşük enerji ihtiyacı ve geri dönüşüm maliyetidir. Ancak inhibitör maddelerin oluşması ve düşük şeker oluşum verimi yöntemin dezavantajlarıdır [35].

- Sıvı Sıcak Su Ön Arıtım

Bu yöntem ile yüksek basınç ve sıcaklıkta (160-220 °C) 15 dakika reaksiyon süresi sonunda ksilozun %80'inin giderimi sağlanır. Ksilozun uzaklaştırılmasına bağlı olarak selülozun parçalanabilirliği de artmış olur. Buhar patlaması yönteminden farklı olarak sıvı sıcak su ön arıtımında hızlı basınç düşüşüne gerek duyulmamaktadır. Asit ve alkali ön arıtım yöntemlerinden farkı ise kimyasallar kullanılmaması sebebiyle maliyeti yüksek korozyona dayanıklı reaktör malzemelerine ihtiyaç duyulmamasıdır [38].

- Islak Oksidasyon Ön Arıtımı

Islak oksidasyon yöntemi lignoselülozik biyokütlenin su ile hava veya oksijen katalizörlüğünde ön arıtımı işlemidir. Bu işlem 120 °C sıcaklığın üzerinde 0,5-2 MPa basınç aralığında 30 dakikadan daha kısa sürede gerçekleşir. Islak oksidasyon yönteminin birçok avantajı olmasına rağmen basınç ekipmanlarının, oksijen ve katalizörün yüksek maliyeti sebebiyle ticari olarak gelişimi sağlanamamıştır [24].

- Karbondioksit Patlaması Ön Arıtımı

CO₂ patlaması yöntemi amonyak fiber patlaması ve buhar patlaması yöntemlerine çok benzerdir. CO₂, su ve amonyak molekülleri benzer düşük boyutlara

sahip olmaları sebebiyle lignoselülozik biyokütlenin küçük porlarından içeri difüze olabilirler. Buhar patlaması yöntemine göre CO₂ patlaması yönteminde inhibitör maddelerin oluşumu ihmal edilebilir düzeyde azdır ve bu sebeple diğer patlama yöntemlerine göre daha çok tercih edilmektedir [24].

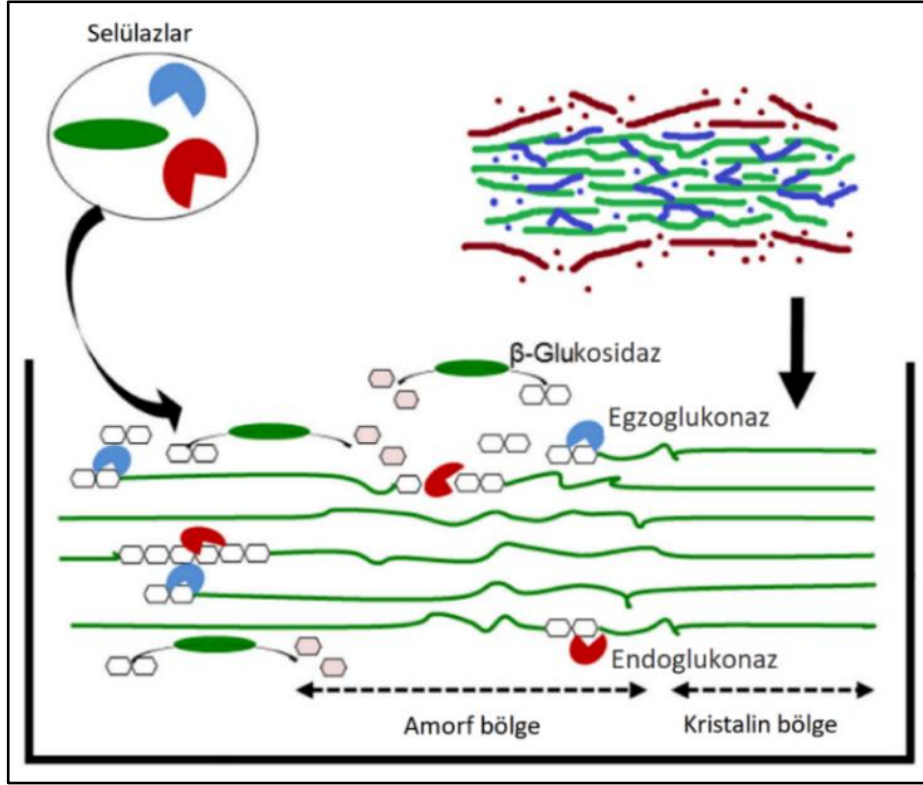
2.5.2.4. Biyolojik Ön Arıtım

Biyolojik ön arıtım yöntemleri güvenli ve çevre dostu yöntemlerdir. En çok kullanılan biyolojik ön arıtım yöntemleri mantar ön arıtımı, Mikrobiyal konsortiyum ve enzimatik ön arıttır.

- Enzimatik Hidroliz

Lignoselülozik biyokütlenin ön arıtımında en çok kullanılan enzimler selüloz ve hemiselülozlardır. Biyolojik arıtma yöntemleri genellikle uzun bekleme süreleri, yüksek maliyetleri ve düşük verimlilikleri gibi sebeplerle kimyasal arıtım yöntemlerine göre daha az tercih edilmektedir.

Enzimatik hidroliz, lignoselülozik biyokütlenin monomer şekerlere dönüştürülmesinde en önde gelen teknolojilerden biri olarak ortaya çıkmıştır. Fermentasyondan önce, lignoselüloz, ham enzim özütü veya ticari selüloz dahil enzimler tarafından hidrolize edilir. Ayrıca, selülozlara ek olarak ksilanaz ilavesi, ön işleme tabi tutulmuş lignoselülozik substratların hidroliz verimini önemli ölçüde artırabilir. Enzimatik hidroliz mekanizması, ksilanaz ve selüloz enzimlerinin sinerjik etkileşiminin, ksilanın bloke edici etkisini ortadan kaldırarak, lif şişmesini ve lif gözenekliliğini artırarak selüloz erişilebilirliğini artırması şeklinde gerçekleşmektedir. Selüloz kristallliği, polimerizasyon derecesi (DP) ve mevcut yüzey alanı dahil olmak üzere birçok faktör enzimatik hidrolizin verimini etkilemektedir. Lignoselülozun biyolojik ön arıttını sağlayabilmek için enzimatik hidrolizden önce çapraz bağlı lignoselüloz matrisini bozmak amacıyla genellikle bir kimyasal ön işlem kombinasyonu gerekmektedir [53]. Selüloz, selülozu selobiyozu hidrolize eder ve ardından glukosidaz (β -G) [6] selobiyozu fermentasyon için glikoza hidrolize eder (Şekil 2.3). Selülozun verimli hidrolizi, endoglukanaz (EG) ve selobiyohidrolazın (CBH) sinerjik etkisini gerektirir [54].



Şekil 2.3: Lignoselülozik biyokütlenin enzimatik hidrolizi.

2.5.2.5. Birleşik Ön Arıtım Yöntemleri

Bütün ön arıtım yöntemlerinin olumsuz yönlerinin kaldırılabilmesi için iki veya daha fazla yöntemin bir arada kullanıldığı ön arıtım prosesleri geliştirilmiştir. Bir arada gerçekleştirilen prosesler ile şeker dönüşüm verimlilikleri artarken, proses süreleri kısaltılıp, inhibitör maddelerin oluşumu önlenabilmektedir [2].

2.5.3. ABE Fermantasyonu

Biyobütanol fermantasyonunda kullanılan fermantasyon metotları; kesikli-beslemeli, iki aşamalı sürekli fermantasyon ve alternatif fermantasyon yöntemleridir. Fermantasyon metotları arasında kesikli sistem geniş bir kullanım alanına sahiptir. Orta ölçekli bir fermantasyon tesisinde 25.000 m³ hacimde 80.000 ton bütanol kesikli sistemde üretilebilirken bu miktardan daha fazlası sürekli sistemde üretilebilmektedir [4].

- Kesikli-Beslemeli Fermantasyon

Kesikli-beslemeli reaktörlere birden fazla substrat veya nütrient beslenir ve reaksiyon bittikten sonra ürünler reaktörden alınır. Reaktördeki hücre miktarı hücre yoğunluğunun zamanla değişiminin takibi ve gerekli nütrientlerin eklenmesi ile sabit tutulmaya çalışılır. Kesikli beslemeli fermantasyonun reaksiyon sonunda kullanılmamış şekerlerin kaybı, düşük verim ve düşük bütanol ürün konsantrasyonu sebepleriyle dezavantajlıdır [4].

- Sürekli Fermantasyon

Sürekli sistemler beslemenin kesintisiz yapılırken ürünlerin de aynı zamanda ayrıldığı sistemlerdir. Bu sistemlerde besiyerinin yarısı kültür tankına alınırken aşı reaktörden geri kazanılır. Bakteri hücrelerinin geri kazanımı fermantasyon veriminin yüksek olmasını sağlamaktadır. Ardından taze besiyeri reaktör beslenerek yüksek verim ve düşük substrat kaybı ile sürekli üretim elde edilir. Yapılan çalışmalarda kesikli beslemeli reaktörde *C. acetobutylicum* üretim verimi sürekli sisteme göre daha yüksek olmasına rağmen sürekli sistemde yüksek stabilite ve düşük sapma sonuçları elde edilebilmektedir. Ekonomik olarak kıyaslandıklarında ise sürekli sistemler kesikli ve kesikli beslemeli sistemlere göre büyük ölçekli bütanol üretiminde yüksek verimlilikleri ile daha ekonomiktir. Ancak sürekli sistemlerde ürün konsantrasyonunun düşük olması ürün kalitesini düşürmektedir [4].

2.5.4. Ayırma Prosesleri

Ürün geri kazanımı için geleneksel olarak kullanılan metod distilasyon metodudur. Bütanolün kaynama noktasının sudan yüksek olması distilasyon prosesinin enerji maliyetini yükseltir. Özellikle ürün bütanol konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda bütanol ayırma proseslerinin toplam maliyeti oldukça yüksektir [55]. Bu sebeple adsorpsiyon, membran ayırma prosesleri, ekstraksiyon, pervaporasyon, ters ozmos veya gaz sıyırma gibi prosesler günümüzde kullanılmaktadır [56].

- Adsorpsiyon

Adsorpsiyon prosesi fermantasyon sıvısından bütanol ayırma işleminde sıkça araştırılmış ancak adsorbentlerin kapasiteleri düşüktür ve endüstriyel-yarı endüstriyel tesislerde kullanılamamaktadır. Silikalit zeolite benzer yapıya sahip, hidrofobik özellikleri olan bir silika formudur ve bütanol geri kazanımında en sık kullanılan adsorbentler arasındadır. Ancak sadece laboratuvar ölçekli çalışmalarda bütanolün fermantasyon sıvısından ayrılmasında adsorpsiyon prosesi kullanılabilir [57].

- Membran Reaktörler

Biyobütanol ayırma metodlarından biri mikroorganizmaların membran üzerine tutturulması veya membran reaktörlerin kullanılmasıdır. Endüstriyel boyutta mikroorganizmaların membran üzerine tutturulduğu sistemler kütle transferine direncin artması gibi sebeplerden dolayı kullanışlı değildir. Ayrıca tutturulmuş hücrelerin sistemden sızması problemi de sıklıkla görülmektedir [57].

- Gaz Sıyırma

ABE fermantasyonu sırasında eş zamanlı uygulanabilir bir yöntem olması sebebiyle gaz sıyırma metodu önemlidir. Basıncın düşürülmesi, sıcaklık uygulanması veya inert gazlar ile muamele etme yöntemlerinin tek başına veya birlikte uygulanması ile uçucu bileşikler ayrılabilir. Kolona ters akışlı inert gazın verilmesi ile spesifik olarak belirli bileşiklerin ayrılması sağlanır. ABE fermantasyonunda bütanol, etanol ve asetonun ayrılması bu yöntemle sağlanabilmektedir.

- Pervaporasyon

Pervaporasyon metodu bazı bileşiklerin membran içerisinden difüzyon ile seçici ayrımı işlemidir. Permeat kısmından uygulanan vakum sonrası düşük basınç bölümünde yoğunlaştırılır. Organik bileşiklerin fermantasyon karışımından ayrılmasında hidrofobik özellikli polidimetil siloksan ve silikon kauçuk levha membranlar pervaporasyon proseslerinde sıklıkla tercih edilir. Yöntemin dezavantajı membranın düşük basınç bölümünde oluşturulan vakumun maliyetidir [57].

2.5.5. Bütanol Üretiminin Metabolizması

Clostridial ABE fermantasyon metabolik yolu çeşitli enzimlerin görev aldığı, ara ürünler bulunan ve sonuçta glikozun bütanole dönüştüğü karmaşık adımlar içerir. ABE fermantasyonunda metabolik yol glikozun EMP yolu (Embden-Meyerhof-Parnas) ile prüvata dönüşmesiyle başlar. Sakkarolitik clostridium suşlarında hegzokinaz (EC 2.7.1.2), glikoz-6-fosfat izomeraz (EC 5.3.1.9) ve prüvat kinaz (EC 2.7.1.40) enzim aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir. Her 1 mol heksozun kullanılmasıyla 2 mol prüvat, 2 mol C ve nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) üretilmektedir. Clostridium fosfoglukonat yolu ile pentozları kullanabilmektedir. Toplamda her 3 mol pentoz kullanılarak prüvat, 5 mol ATP ve 5 mol NADH üretilmektedir. Fermantasyon prosesi 3 oksidoredüktaz aktivitesine bağlı olarak gerçekleşir. Bunlar; [FeFe] hidrojenaz, NADH-ferredoksin redüktaz ve NADPH-ferredoksin redüktazdır. İndirgenmiş elektron taşıyıcısı –ferrodoksin fermantasyon prosesinde kilit rol oynamaktadır. Hidrojenaz ile hidrojene veya ferrodoksin-NAD(P) redüktaz ile pridin nükleotidine elektron vermektedir. Prüvat-ferrodoksin oksidoredüktaz asetil-CoA'nın üretilmesinde rol oynar. Asetil CoA daha sonra kullanılarak aseton, asetat, CO₂ (oksidlenmiş ürünler), etanol, bütanol veya bütirat üretilir.

Metabolik proses glikozun parçalanmasıyla üretilen asetat ve bütiratin asetil CoA ve bütiril CoA yolu ile reasimilasyonu sonucu etanol ve bütanol üretilmesini içerir. Reasimile olan her bir mol asit için 1 mol asetoasetat üretilir ve bunun sonucunda bütanol üretim verimi düşerek aseton ve CO₂ oluşur. Araştırmacılar bu yolu soğuk kanal olarak isimlendirirken asetil CoA'nın bütiril CoA ve bütanole dönüşümünü sıcak kanal olarak isimlendirmektedir. Sıcak kanal ile asit reasimilasyonu ve aseton ve CO₂ oluşumundan kaynaklı verim kaybı önlenmiş olur. ABE fermantasyonunun metabolik yolu ayrıntılı olarak Şekil 2.4'te gösterilmiştir [58].

Araştırmacılar aseton üretiminden sorumlu genleri düzenleyerek aseton üretimini azaltmaya yönelik çalışmalar yapmaktadırlar. ctfB ve adc geni sırasıyla antisens RNA (asRNA) ve mobil grup II intron ile düzenlenmeye çalışılmış ancak başarılı sonuçlar henüz elde edilememiştir. Başka bir çalışmada ise tiyolaz enziminin ekspresyonu ile bütanol konsantrasyonunu arttırmaya çalışılmış ancak bütanol üretiminde olumlu etki gözlenmezken etanol konsantrasyonunun arttığı görülmüştür.

2.5.6. Bütanol Üreten Mikroorganizmalar

ABE fermantasyonu ile biyobütanol üretme özelliğine sahip olduğu bilinen birçok mikroorganizma Clostridia suşlarıdır. Bunlar arasında en çok kullanılan *Clostridium acetobutylicum* ve *Clostridium beijerinckii* suşları olmakla beraber *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. saccharobutylicum* suşları da kullanılmaktadır. Literatürde biyobütanol üretimi amacıyla kullanılan suşlar Tablo 2.4'te gösterilmiştir [61]. Clostridium olmayan *Escherichia coli*, *Lactobacillus brevis*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus buchneri* ve *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmaları da biyobütanol üretiminde araştırılan türlerdir [6]. Etanol üreten mikroorganizmalardan farklı olarak bütanol üreten mikroorganizmaların hem heksozları hem de pentozları fermente edebilmesi kullanılacak hammaddenin seçiminde daha fazla seçenek sağlar. Ancak şekerlerin bütanole dönüşüm verimliliği heksozlara göre pentozlarda daha düşük olduğu bilinmektedir. Raganati ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bütanole dönüşüm verimliliği sırasıyla en çok glikoz daha sonra mannoz, arabinoz ve ksilozda olduğu görülmüştür [59]. Sentetik biyoloji kullanılarak clostridial olmayan suşlardan biyobütanol üretimi çalışmaları da yapılmıştır. *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* biyobütanol üretimi amacıyla en çok çalışılmış konakçı suşlardır. Ancak bütanol inhibisyonu ve düşük bütanol konsantrasyonu gibi engeller aşıldığında clostridial olmayan suşlardan endüstriyel biyobütanol üretimi mümkün olacaktır [60].

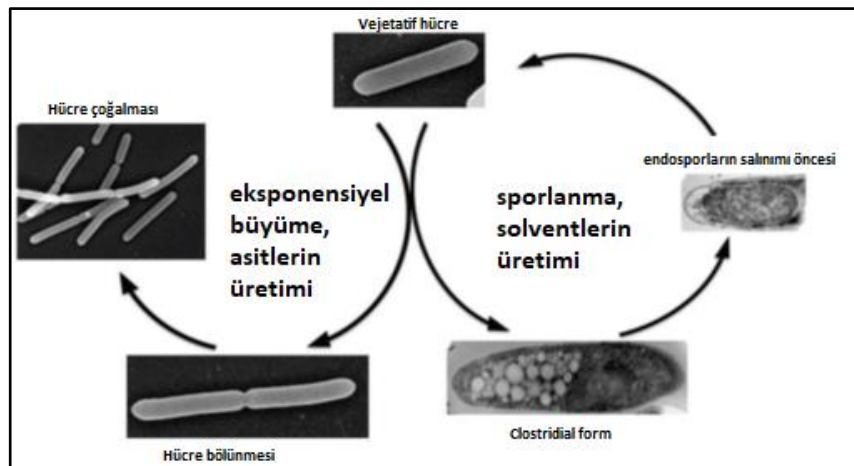
Tablo 2.4: Farklı Clostridium suşları ile ilgili çalışmalar.

Suş	Karbon kaynağı	Bütanol (g/L)
<i>C. beijerinckii</i>	Soya fasulyesi melası	8
<i>C. acetobutylicum</i>	Sago nişastası	16
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>	Manyok nişastası	16,9
<i>C. beijerinckii</i> ATCC 55025	Buğday kepeği	8,8
<i>C. beijerinckii</i>	Buğday sapı	12
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>	Pirinç kepeği	7,7
<i>C. acetobutylicum</i> YM1	Aritılmış yağı alınmış pirinç kepeği	6,48
<i>C. acetobutylicum</i>	Evsel atık	3
<i>C. pasteurianum</i>	Mikroalg ve gliserol	14-16
<i>C. acetobutylicum</i> DSM 792	Sebze atıkları	9,96-10,65

- *Clostridium acetobutylicum*

Clostridia; katabolik sülfat indirgeme özelliği bulunmayan ve endospor oluşturabilen anaerobik bir mikroorganizmadır. Spor oluşumu esnasında hücreler polisakkaritler veya polihidroksibütiratlar gibi komponentleri depolar. Yaklaşık 180 türü keşfedilmiş olan clostridialar bilinen en geniş bakteri cinsleri arasındadır. Bir kısmı patojeniktir ve hatta çok tehlikeli toksinler üretirler. Clostridia'ların ayrıca enzim, biyoyakıt üretimi ve kanser terapileri gibi çeşitli biyoteknolojik uygulama alanlarında etkinliği test edilmektedir. Biyobütanol üretebildiği keşfedilmiş olan türlerin tamamı *Clostridium* suşlarıdır. *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. Pasteurianum* ve *C. Sporogenes* gibi endüstriyelleşmemiş suşlarla yüksek miktarda biyobütanol üretilebilirken en bilindik endüstriyel *Clostridium* suşları ise *C. acetobutylicum* ve *C. beijerinckii*'dir. Weizmann tarafından keşfedilen *Clostridium acetobutylicum* muhtemelen en çok bilinen biyobütanol üreten bakteridir. Mikrobiyal mühendislik alanında gerçekleştirilen son gelişmeler ve biyobütanol üretim prosesine artan ilgi ile yeni suşlar izole edilmiş ve metabolik mühendislik çalışmaları ile tanımlanmış bakterilerin metabolik biyobütanol üretim potansiyeli arttırılmıştır.

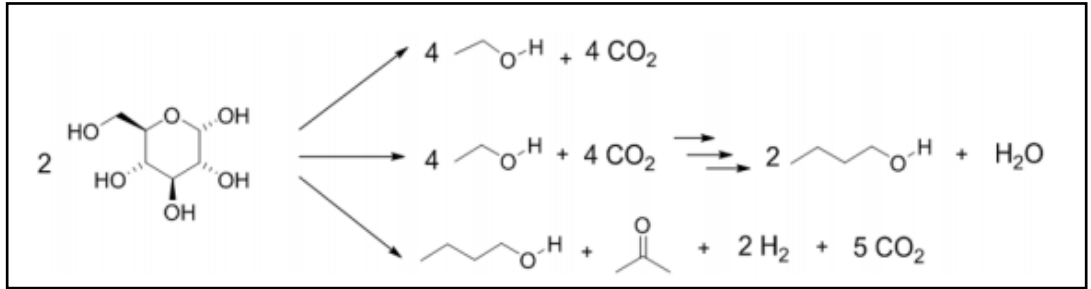
Clostridium suşları birçok karbonhidratı kullanarak organik asitler, asitler, alkoller ve diğer solventleri üretebilen bir bakteri türüdür. Ancak clostridium suşlarının çok azı yüksek verim ile bütanol üretebilmektedir. Bunlar; *Clostridium acetobutylicum*, *C. aurantibutylicum*, *C. Beijerinckii* ve *C. tetanomorphum* vb. *Clostridium acetobutylicum* bakterisinin asidojeniz ve solventojenez döngülerinde içinde gelişim fazları Şekil 2.5'te gösterilmiştir [62].



Şekil 2.5: *Clostridium acetobutylicum* bakterisinin gelişim fazları.

2.5.7. Proses Geliştirme

ABE fermantasyonu şekerlerin bütanol, etanol ve asetona dönüştürüldüğü bir prosestir (Şekil 2.6). Bu prosesin geliştirilebilmesi için ürün bütanol konsantrasyonunun attırılması gerekmektedir. Lignoselülozik biyokütlenin fermantasyonunda bütanol üretimini düşüren en etkili inhibitörler tuzlar, hidroksimetil furfural, asetik, ferulik, glukuronik, kumarik asit ve çeşitli fenolik bileşiklerdir. Kumarik ve ferulik asitin 0,3 g/L konsantrasyonu bile inhibitör etki yapmaktadır. Bu yüzden lignoselülozik biyokütleden bütanol üretimini arttırmak için hidrolizatın delignifikasyonunun yapılması gerekmektedir. Ancak az miktarda furfural ve HMF'nin ise bakteriyel büyümeye katkı sağladığı bilinmektedir. İnhibitörler hidrolizat içerisinde kalsiyum hidroksit veya diğer hidroksitlerin ilavesiyle giderilebilmektedirler. Qureshi ve arkadaşları alkali peroksit ile hidroliz edilen buğday sapından fermantasyonla bütanol üretim veriminin önemli ölçüde arttırdığını belirlemiştir [63].



Şekil 2.6: ABE fermantasyonu girdi ve ürünleri.

Ürünlerin inhibitör etki yapmasından başka bütanol fermantasyonunu etkileyen faktörler de vardır. Bunlar; substrat inhibisyonu, tuz konsantrasyonu inhibisyonu, ölü hücrelerin varlığı, makromoleküllerin (polisakkaritler) birikmesi, nütrient yetersizliği ve reaktöre nütrient ilavesi sırasında O₂ kaçağı vb. yapılan bir çalışmada bütanol fermantasyonunda peynir altı suyu(laktoz) konsantrasyonu 200 g/L iken substrat kaynaklı inhibisyon gerçekleşmezken glikoz konsantrasyonu 161 g/L üzerinde olduğu besiyerinde inhibisyon gerçekleştiği bulunmuştur [64]. Bütanol üretim sürecinde karşılaşılan problemler ve çözüm yolları Tablo 2.5'te verilmiştir [65].

Tablo 2.5: Bütanol üretim sürecinde karşılaşılan problemler ve çözüm yolları.

Sorunlar	Çözüm yolu
Yüksek hammadde maliyeti sebebiyle işletme maliyetinin yüksek olması	Daha ucuz ve sürdürülebilir hammaddelerin seçimi (örneğin lignoselülozik biyokütle)
Düşük verimlilik ve kısıtlı şeker yüklemesi sebebiyle bütanol ayırma maliyetinin yükselmesi	Mikroorganizmaların geliştirilmesi ile verimlilik ve bütanol seçiciliğinin artırılması, yenilikçi ayırma proseslerinin geliştirilmesi
Düşük hacimsel verimlilik	Sürekli fermantasyon prosesi ile reaksiyon süresinin kısaltılması
Ürün geri kazanımının konvensiyonel distilasyon prosesiyle pahalı olması ve yüksek miktarda enerji gerektirmesi	Düşük maliyetli ve enerji verimliliği yüksek metodlar ile solventin geri kazanımı
Yüksek miktarda su kullanımının çıkış suyunun arıtım maliyetini arttırması	Proses suyunun fermantasyon sistemine geri beslenmesi
İstenmeyen, değeri düşük yan ürünlerin oluşumu	Yan ürün oluşumuna sebep olan metabolik yolların elimine edilmesi
Kültür dejenerasyonu	Kültürün fazla asidik ortamda olmaması için dikkat edilmesi
Kontaminasyon	Faja dayanıklı suşların kullanılması, sterilizasyon

Kesikli ve beslemeli-kesikli fermantasyon proseslerinin verimi sadece inhibitörlerin varlığından etkilenmez biyoreaktörün sterilizasyonu veya tekrar inokülasyonu gibi zaman alan adımlardan da etkilenmektedir. Bu durum sürekli sistemde görülmemektedir [66]. Sürekli sistemde serbest hücre yerine tutuklanmış (immobilize) hücreli proseslerin kullanılması reaktörden hücre geri kazanımı için yapılmaktadır. Hücre geri kazanımlı sistemde mikrobiyal hücreler ve nütrientler süspansiyonda tutularak kütle transferi kontrol altına alınır. Ancak tutuklanmış hücreli sistemin serbest hücreli sisteme göre bazı avantajları vardır. Bunlar, geri kazanım, akış maliyetlerini düşürmesi ve fermantasyon verimini iyileştirmesi vb. tutuklama işlemi ile aklımasyon fazı elimine edilir ve böylece inokülasyon tekrarı olmadan sürekli verimli sistemde çalışma sağlanabilmektedir. Tutuklama genetik stabiliteyi sağlayabilmekte ve hücreleri dış etkilere karşı korumaktadır [6].

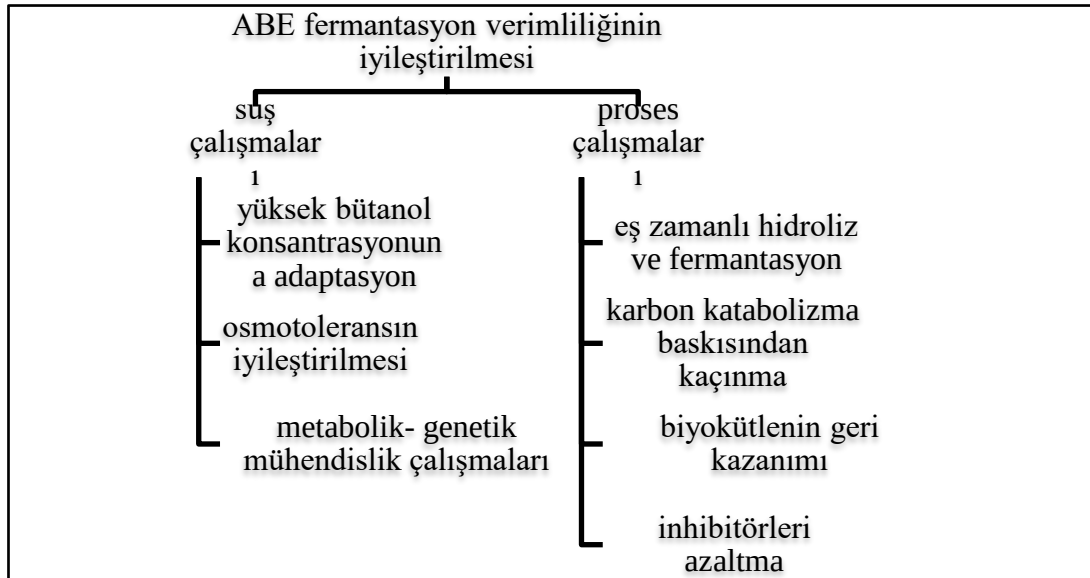
Bütirik asitin ko-substrat olarak kullanılması asidojeniz fazını kısaltarak solventojenez fazını uzamasına sebep olmaktadır. Qureshi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada nütrient miktarının fazla olmasının aşırı hücre büyümesine sebep olduğunu ve bunun önlenmesi için nütrientlerin miktarının sınırlı miktarda olması gerektiğini

gözlemlemişlerdir [67]. Hücreleri geri kazanabilmek için biyoreaktöre membran modülü eklenebilmektedir. Endüstriyel boyutta sürekli sistemde biyobütanol üretim verimliliğini arttırmak için daha çok araştırma yapılması gerekmektedir. Ayrıca araştırmacılar fermantasyon prosesi sonrası üretilen biyobütanolün reaktörden saflaştırılarak alınması için çalışmalar yapmaktadır. Errico ve arkadaşları buhar sıyırma distilasyon ve sıvı-sıvı ekstraksiyonlu distilasyon yöntemlerinin ayırma verimliliğini kıyaslamış ve sıvı-sıvı ekstraksiyonlu distilasyon yönteminin daha verimli olduğunu göstermiştir [68]. Bütanolün ayrılmasında geliştirilen diğer teknolojiler; sıvı-sıvı ekstraksiyonu, gaz sıyırma, adsorpsiyon, ters osmoz ve pervaporasyondur.

Metabolik mühendislik için ilk olarak metabolik faaliyetlerin ve hücre içi enzimatik reaksiyonların analiz edilmesi gerekmektedir. Daha sonra seçilen mikroorganizmanın genetik modifikasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Sadece protein içeriği değil enzimatik profilin de değiştirilmesi gerekmektedir. Bütanol üretim verimliliğini arttırmak için metabolik olarak tasarlanmış suşların geliştirilmesinde ilk adım ana enzimatik reaksiyonların tanımlanması ve modellenmesidir.

20. yy'ın başlarında iki clostridia suşunun (*C. acetobutylicum* ATCC 824 ve *C. beijerinckii* NCIMB 8052) tüm genom dizilimi bulunmuştur. Bütanol ve aseton üretiminden sorumlu genler belirlendiği için genetik modifikasyonlar yapılarak aseton üretimi azaltılmaya veya durdurulmaya çalışılmıştır. TargeTron teknolojisi ile asetoasetat dekarboksilaz (adc) geni bozularak aseton üretimi durdurulmaya çalışılmıştır. Sonuçla bütanol üretimi %70'ten %80'e çıkarılmış ve aseton üretimi 0,21 g/L'ye düşürülmüştür. Bütanol fermantasyon prosesini geliştirmek için hiper-bütanol üreten bakterilerin genom dizilimi çalışmaları yapılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi solvent üretim verimliliğini arttırmada kullanılabilecek önemli bir araçtır. Bu teknik ilk defa *C. acetobutylicum* ATCC 824 suşu üzerinde denenmiş ancak solvent üretiminden sorumlu genlerin (ctfA, ctfB, adc, aad) bozulması sebebiyle modifiye edilmiş suşta aseton ve bütanol üretimi gerçekleşmemiştir. Bakterilere bu genleri içeren pSOLI plazmidi eklenmiş ancak ne yazık ki eklenen plazmidin de bozulması sebebiyle solvent üretimi sağlanamamıştır. Clostridia'nın genetik karmaşıklığı ve uygun genetik araçların olmaması sebebiyle bu çalışmalar başarısız olmuştur. Bütanol üretiminden sorumlu genler uygun başka konak hücrelere (*E. coli*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* ve *Saccharomyces cerevisiae*) de eklenmiştir. 33 doğal gen

silinerek ve 5 heterolog gen eklenerek *E. coli* EB243 suşu ile bütanol üretimi çalışmalarında maksimum 20 g/L bütanol üretimi elde edilebilmiştir. Bu suş kesikli sistemde %34 bütanol verimi ile endüstriyel boyutta bütanol fermantasyonu için gelecek vadeden suşlar arasındadır. Konvansiyonel clostridial fermantasyon prosesinde doğal suşlarla 16–17 g/L bütanol üretim verimine kadar ulaşılabilir. Bu yüzden araştırmacıların ana amacı bütanol verimliliğini yükseltecek suşları geliştirmektir. Araştırmaların genel olarak odaklandıkları konular Şekil 2.7’de gösterildiği gibi; bakteri suşunun seçimi, bütanol üretiminde daha az maliyetli karbon kaynaklarının kullanımı, metabolizma mühendisliği stratejileri, proses geliştirme, biyobütanol geri kazanım tekniklerinin geliştirilmesidir [65].



Şekil 2.7: Biyobütanol üretim prosesi geliştirme stratejileri.

2.6. Organik Asitler

2.6.1. Asetik Asit

Asetik asit, kimya ve gıda endüstrisinde yılda yaklaşık 15 milyon ton küresel talebi olan ticari bir kimyasaldır. Asetik asit, yaygın olarak kimyasal proseslerle üretilmekte olup fermentatif yollarla da gerçekleştirilebilir. Asetik asit; kimya, ilaç, tekstil, polimer ve boyalar, yiyecek ve içecekler gibi birçok endüstriyel sektörde

kullanılmaktadır. Asetik asidin gıda endüstrisinde çeşitli uygulamaları vardır ve geleneksel olarak sirke olarak bilinir. Ayrıca gıdaya karakteristik bir aroma profili vermek için kullanılan bir asitleştiricidir. Etin mikrobiyal dekontaminasyonu için ve gıda endüstrisinde hafif bir kireç çözücü olarak kullanılabilir. Daha yakın zamanlarda, asetik asidin bir antimikrobiyal yenilebilir gıda kaplama maddesi olarak kullanıldığı bildirilmiştir.

Kimyasal üretim süreçleri; Cavita işlemi (metanolün karbonilasyonu), aldehitin oksidasyonu ve etilenin oksidasyonudur. Başlıca üreticiler, karbonilasyon yolunu izleyen BP kimyasalları ve BASF'dir.

Fermantasyon yoluyla üretilen asetik asit, ağırlıklı olarak sirke şeklinde gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Ticari sirke üretimi, AAB kullanılarak oksidatif fermantasyon yoluyla yapılır. Birçok bakteri ve maya hücresi tarafından fermantasyon ara ve yan ürünü olarak üretilen asetik asit üretiminde en çok kullanılan türler *Asetobakter* ve *Glukonasetobakter*'dir [69].

2.6.2. Bütirik Asit

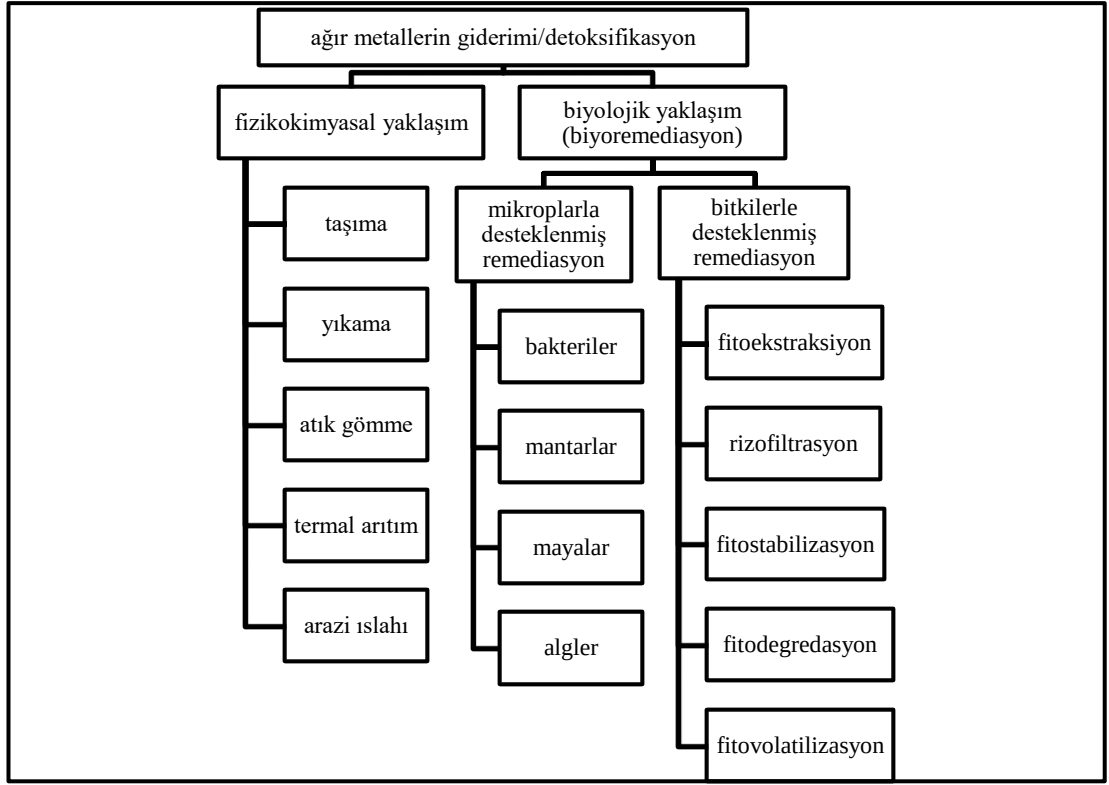
Bütirik asit, dünya çapında yıllık 80.000 metrik tondan fazla pazarı olan kimya, gıda, hayvan yemi ve ilaç endüstrilerinde geniş uygulamaları olan dört karbonlu uçucu bir yağ asididir. Petrol hammaddelerinden bütirik asit üretimi sürdürülemez ve çevresel kaygılara neden olmaktadır. Fermantasyon yoluyla bütirik asit üretmek için hammadde olarak yenilenebilir biyokütlenin kullanılması ideal bir alternatif olabilir ve fosil yakıtların gelecekteki kıtlığı ve çevresel etkileri ile ilgili endişeleri gidermek için gereklidir. Bununla birlikte, geleneksel bütirik asit fermentasyonunda yan ürün olarak oluşan asetik asit ve ürün bütirik asitin bakteri üzerine inhibisyon etkisi ürün verimliliğinin düşmesine sebep olmaktadır [70].

2.7. Fitoremediasyon

Ağır metaller antropojenik faaliyetler sonucu su, toprak ve havaya karışmaktadır. Bitkiler birçok ağır metalleri kullanmamalarına rağmen bünyelerine almaktadır ve bunun sonucunda kontamine olmuş alanlarda yetişen bitkilerin tüketimi yoluyla insan hayatı olumsuz etkilenmektedir. Örneğin; demir, nikel, bakır, mangan

ve çinko bitkiler için gerekli olan metallerdir ama yüksek miktarda alındığında bitki üzerinde toksik etki oluşturmaktadır [71]. Fitoremediasyon kelimesinin kökenine baktığımızda fito eski Yunanca bitki anlamına gelen ‘φυτό’ kelimesinden, remediasyon ise latince giderim-arıtım anlamına gelen iki kelimenin biraraya gelmesiyle oluşmaktadır. Fitoremediasyon terimi ilk kez 1980’li yıllarda kontamine olmuş alanların bitkiler ile temizlenmesi anlamında kullanılmıştır. Hiperakümülatör kelimesi ise genel olarak bitkinin kuru ağırlığı başına ne kadar metal biriktirebildiği ile ilgilidir. Van der Ent ve arkadaşları tarafından krom ve kurşun ağır metalleri için sırasıyla hiperakümülatör bitkilerle giderilebilecek minimum miktarlar 300 mg/kg kuru ağırlık ve 1000 mg/kg kuru ağırlık olarak belirtilmiştir [72]. Alaboudi ve Ahmed tarafından yapılan fitoremediasyon çalışmasında topraktan kurşun gideriminde ayçiçeğinin performansı incelenmiştir [73].

Biyosorpsiyon mekanizması; hücre dışında biriktirme/çöktürme, hücre yüzeyine sorpsiyon/çöktürme ve hücre içinde biriktirme şeklinde gerçekleşmektedir. Su sümbülleri kullanılarak gerçekleştirilen fitoremediasyon hem çevre dostudur hem de ekonomiktir. Son yıllarda doğada kirliliğin kendi kendine temizlenmesi üzerine kurulu fitoremediasyon teknolojilerine ilgi artmaktadır. Bu teknolojilerde kullanılan bitkilerin yeniden değerlendirilmesi ise başlı başına büyük bir araştırma konusudur. Bu bitkilerin enerji üretimi için kullanılması hakkında çalışmalar literatürde mevcuttur [74]. Ağır metallerin gideriminde kullanılan çeşitli yöntemler Şekil 2.8’de listelenmiştir.



Şekil 2.8: Ağır metallerin remediasyonu ile ilgili yaklaşımlar.

2.6.1. Su Sümbülü

Su sümbülü su yüzeyinde serbestçe yüzen, uzun ömürlü sucul bir bitki türüdür. Amazon nehri kaynağı olan bu bitki buradan dünyanın çeşitli bölgelerine yayılmıştır. Son zamanlarda Asi Nehri'nin yüzeyini kapladığı ve temizleme çalışmaları yapıldığı bilinmektedir. Çok hızlı çoğalan ve su yollarını kaplayan su sümbülü ekosisteme zarar veren, sulama problemlerine yol açan ve böcek nüfusunun artmasına yol açan bir tür olduğu bilinmektedir. Dünya üzerindeki en hızlı büyüyen bitki türlerinden biri olarak bilinen su sümbülünün büyüme şartları Tablo 2.6'da gösterilmiştir [75].

Tablo 2.6: Su sümbülünün büyüme şartları.

Faktör	Değer
Kuru ağırlık bakımından büyüme hızı	0,4-0.08 kg kuru ağırlık/m ² .gün
Yüzey alanı bakımından büyüme hızı	1.012-1.077 m ² /gün
Suyun Ph'ı	6-8
Suyun tuzluluğu	5 mg/L'den daha düşük
Su sıcaklığı	10-40°C (Optimum 25-27,5 °C)

Su sümbülü kullanılarak çeşitli değerli ürünler üretilebilmektedir. Bunlar; çeşitli enzimler, selüloz ksantojenat, levülinik asit, şikimik asit, biyogaz, bioetanol, biyohidrojen, biyopolimer, biyobütanol, kompozitler, biyogübre, balık yemi, yüksek kalorifik değerli yakıt, yakıt briket, süper absorban polimer ve ksilitol. Ayrıca su sümbülü mantar yetiştiriciliğinde substrat olarak ve çeşitli endüstriyel atıksuların arıtımında ağır metal gidermek amacıyla kullanılabilir.

Su sümbülünün doğal ortamlarda kontrolsüz çoğalması su yüzeyinin kaplanarak fotosentetik diğer türlerin güneş ışığı almasını engellediğinden bu bitki istilacı bir tür olarak kabul edildiğinden satışı birçok ülkede yasaklanmıştır.

Çeşitli enzimlerin üretiminde su sümbülü kalıntıları kullanılmaktadır. Bu enzimler genel olarak selülaz, β -glikosidaz ve ksilanazdır. Su sümbülü bolca bulunan çoğunlukla selüloz ve hemiselülozdan oluşan lignoselülozik biyokütle olduğundan dolayı selülaz üretiminde ekonomik bir kaynak olarak görülmektedir. Üretim amacıyla su sümbülünün kullanılması sosyoekonomik problemlerin çözümüne de katkı sağlayabilmektedir. β -glikosidaz ise selüloz hidrolizinin son adımında görev yapan sellobiyozu glikoza dönüştüren önemli bir enzimdir. Ksilanaz enzimi ise ksilanı parçalayarak ksilooligosakkaritler, ksilobiyoz ve ksiloz oluşturur. Ksilanlar ticari enzimlerin içinde büyük bir grubu oluşturur. Sonuç olarak enzim üretiminde düşük maliyeti sebebiyle su sümbülü önemli bir kaynaktır.

Su sümbülü yaklaşık olarak %20 selüloz, %48 hemiselüloz ve %3,5 lignin içermektedir. Su sümbülünün karbonhidrat içeriği hakkında literatürde bulunan çalışmalar Tablo 2.7’de gösterilmektedir. Yüksek selüloz ve hemiselüloz içeriği zararlı olarak görülen su sümbülünü birçok değerli ürün ve biyoyakıtların üretiminde önemli bir konuma taşımaktadır. Üretim hızının çok yüksek olması sebebiyle su sümbülü biyoyakıt üretiminde hammadde olarak kullanılabilir ve toprakta yetişmemesi sebebiyle tarım alanlarında üretilen biyoyakıt hammaddelerden daha avantajlıdır. Ayrıca kimyasallara karşı dayanımı yüksek olması sebebiyle kontamine olmuş sulak alanlarda yetiştirilebilmekte ve bu alanların temizlenmesinde büyük katkı sağlamaktadır. Su sümbülünden bioetanol ve biyogaz üretimi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Su sümbülünden bioetanol üretiminde kullanılan en yaygın türler *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Zymomonas mobilis*’tir.

Tablo 2.7: Su sümbülünün karbonhidrat içeriği hakkında çalışmalar.

Selüloz	Hemiselüloz	Lignin	Kül	Referans
24,5	34,1	8,6	1,5	[76]
18,2	29,3	2,8	1,2	[77]
17,3	24,7	1,1	-	[78]
32,5	38,1	11	-	[79]
31,6	27,3	3,9	-	[80]
34,19	17,66	12,22	-	[81]
18,4	49,2	3,6	-	[50]

Su sümbülünün fitoremediasyon performansı birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Gong ve ark. formaldehit gideriminde su sümbülü kullanarak %95,6 verim elde etmiştir [82]. Elias ve ark. ise su sümbülünü seramik endüstrisi atıksularından ağır metallerin giderimi ile ilgili yaptıkları çalışmada bu bitkinin yüksek Fe, Zn, Cd, Cu, Cr ve B giderim potansiyeli olduğunu göstermişlerdir [83].

Su sümbülü yüksek adaptasyon kabiliyeti, bol bulunan ve çok hızlı büyüme hızına sahip olan sucul bir bitkidir. Bulunduğu su ortamından fiziksel, kimyasal veya biyolojik yöntemlerle giderilmesi için büyük miktarda para harcanmaktadır. Ancak buna rağmen tamamen kontrol altına alınması için bir teknoloji henüz geliştirilememiştir. Bunun yanında sıvı ve gaz biyoyakıt üretiminde kullanılabilirliği araştırılmış 60-100 ton/hektar.yıl hızla büyümesi sebebiyle hammadde ihtiyacını karşılayabileceği düşünülmüştür [84].

Kirlenmiş alanların meyve ve sebze yetiştirmede kullanımı söz konusu değildir. Bu sebeple hem bu alanların temizlenerek çevrenin korunması hem de bu alanlardan bu süreçte fayda sağlanabilmesi için kirlenmiş su ve toprakta enerji bitkilerinin yetiştirilmesi konusuna gün geçtikçe ilgi artmaktadır. Bu alanda yetiştirilecek bitkinin seçimi de önemli bir konudur. Selüloz oranı, üretim verimi, toksik kimyasallara karşı direnci yüksek olan ve yenilebilir olmayan bitkiler seçilmelidir. Su sümbülü bu olumlu özelliklerin hepsine sahip olan bir bitkidir ve su ortamında kirliliklerin gideriminde önemli performans sağlamakla kalmayıp yüksek selüloz içeriği sebebiyle biyoalkol üretiminde kullanımının katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca literatür incelendiğinde ağır metallerin çoğunlukla kökte birikim yaptığı görülmüştür. Bu sebeple gövde kısmında ağır metal konsantrasyonunun düşük olacağı tahmin edilmektedir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Mikroorganizma ve Enzim

Tez çalışması kapsamında bütanol üretimi amacıyla DSMZ (Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu)’ndan temin edilen *Clostridium acetobutylicum* DSM 1732 suşu kullanılmıştır. Biyokütlenin enzimatik hidrolizinde kullanılan Cellic CTEC2 enzimi ve diğer kimyasal maddeler Sigma Aldrich’ten temin edilmiştir.

3.2. Besiyerleri

Clostridium acetobutylicum freeze dry formdan ilk etapta canlandırmak için süt, patates besiyerlerine ekilmiş ve büyümenin en iyi gözlemlendiği patates ile hazırlanan besiyerinden alınan kültür eksponensiyel fazda (0,8-1 nm optik yoğunlukta) aşılama amacıyla kullanılmıştır. Aşı besiyeri içeriği Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Aşı besiyerinin içeriği.

Glikoz	25g/L
Maya özütü	1g/L
P2 Stok solüsyonu (%1)	K ₂ HPO ₄ :50g/L KH ₂ PO ₄ :50g/L PABA:0,1g/L Tiamin:0,1g/L Biotin:0,001g/L C ₂ H ₇ NO ₂ :220g/L MgSO ₄ .7H ₂ O:20g/L MnSO ₄ .H ₂ O:1g/L FeSO ₄ .7H ₂ O:1g/L NaCl:1g/L

3.3. Hücre Büyümesinin Takibi

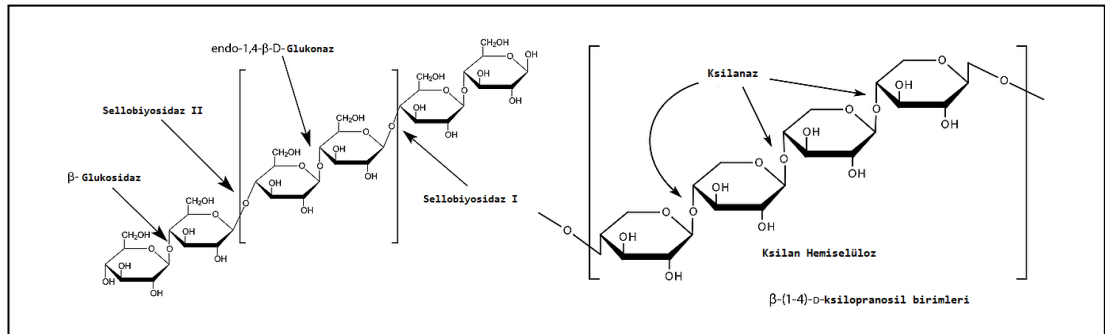
Aşıdaki ve reaktördeki hücre üremelerini takip etmek için GBC-Cintra-20 marka UV-Vis Spektrofotometre cihazı ile 600 nm’de optik yoğunluk ölçümleri yapılmıştır.

3.4. Asit Hidrolizi

Su sümbülü bitkisinin kök ve gövde kısımları enzimatik hidroliz öncesinde karbonhidratların parçalanması amacıyla farklı konsantrasyonlarda H_2SO_4 ile muamele edilerek optimum asit konsantrasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Asit hidrolizi işlemi öncesi ön arıtımın etkili bir şekilde gerçekleşmesi için $105^{\circ}C$ 'de kurutulmuş bitki kök ve gövdesi öğütülerek parçacık boyutu küçültülmüştür. Tüm deneylerde %10 katı yüklemesi oranı sabit tutulmuştur. %1, %2 ve %3 H_2SO_4 içeren kapaklı şişeler $121^{\circ}C$ 'de 60 dakika otoklavlanmış ve işlem biter bitmez hidrolizat süzme seti ile filtre edilerek katı ve sıvı fazlara ayrılmıştır. Katı faz asit hidrolizinde oluşan inhibitörlerin yıkanması ve katının pH'ının 6-7'ye ayarlanması amacıyla distile su ile yıkanmıştır. Sıvı fazdaki şekerlerin miktarının belirlenmesi için Lab Alliance Essence marka HPLC cihazı kullanılmıştır.

3.5. Enzimatik Hidroliz

Asit hidrolizinden alınan biyokütle pH=7 olana kadar saf su ile yıkandıktan sonra cam şişeye konulup sitrat tamponu ile pH=4,8'e ayarlanmıştır. %10 katı oranı, $50^{\circ}C$ ve 150 rpm karıştırma hızı koşullarında 50 FPU/gr biyokütle Cellic CTEC2 (Şekil 3.1) enzimi eklenerek 2 gün tutulan karışımdan gün aşırı alınan numunelerin glikoz içeriğindeki değişimler HPLC ile ölçülerek kaydedilmiştir.



Şekil 3.1: Cellic CTEC2 enzim karışımının selülozu parçalama mekanizması.

3.5.1. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzimatik hidroliz adımıyla kullanılacak enzim miktarının saptanması amacıyla ilk olarak Cellic CTEC2 selüloz enzim karışımının filtre kâğıdı birimi (FPU) belirlenmelidir. Bu amaçla NREL tarafından yayımlanan selüloz aktivitesinin ölçümü protokolü kullanılmıştır. Bu protokole göre enzim karışımı 1/20 oranında seyreltildikten sonra Tablo 3.2'ye göre sitrat tamponu (pH=4,8) ile karıştırılarak enzim kontrolü numuneleri hazırlanmıştır. 10 mg/ml glikoz standart çözeltisi hazırlandıktan sonra Tablo 3.3 'teki oranlarda sitrat tamponu ile karıştırılır.

Tablo 3.2: Selüloz enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan enzim solüsyonları.

Örnek no	Sitrat tamponu (ml)	Enzim(ml)	Enzim Seyreltme oranı*10 ⁵ (ml/ml)
E1	1,65	0,350	875
E2	1,7	0,300	750
E3	1,8	0,200	500
E4	1,85	0,150	375
E5	1,9	0,100	250

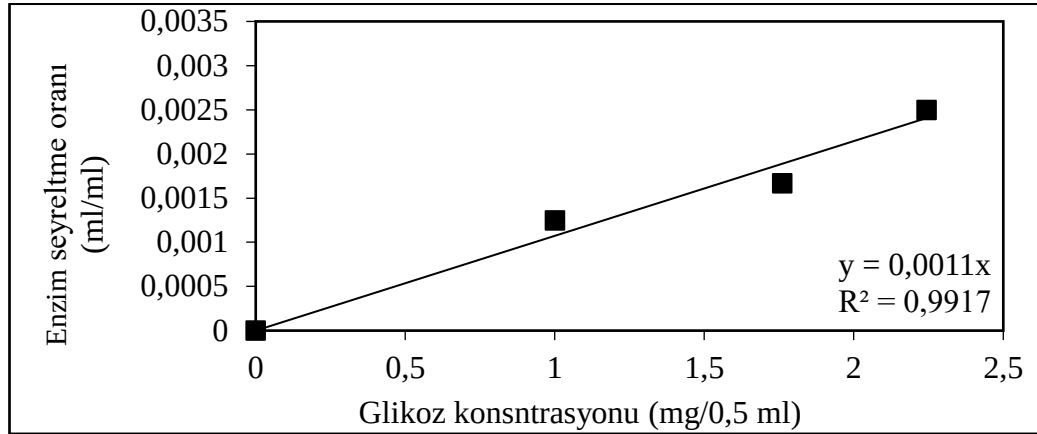
Tablo 3.3: Selüloz enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan glikoz solüsyonları.

Örnek no	Glikoz miktarı (ml)	Sitrat tamponu (ml)	Glikoz Konsantrasyonu (mg/ml)
G1	1	0,5	6,7
G2	1	1	5
G3	1	2	3,3
G4	1	4	2

Enzim aktivitesi belirlenecek numuneler içerisinde 50 mg selülozik filtre kâğıdı tamamen ıslanacak şekilde katlanarak konulur. Üzerine 1 ml sitrat tamponu ve Tablo 3.2 ile aynı oranlarda enzim eklenir. Substrat kontrolü için 1,5 ml sitrat tamponu ve filtre kâğıdı, reaktan kontrolü için ise 1,5 ml sitrat tamponu ayrı ayrı cam tüplere ilave edilir. Tüm örnekler 50°C'de 60 dakika tutulur. Enzim aktivitesinin durdurulması için 5 dakika kaynayan suda ve ardından buz banyosunda tutulur. Örnekler 0,45 µm filtreden geçirildikten sonra HPLC ile şeker miktarı ölçülür. Enzim miktarına karşı glikoz konsantrasyonu grafiği çizilir ve selülozun parçalanarak 2 mg glikoz üretmesi için gerekli enzim miktarı Şekil 3.2'deki grafiğe göre belirlenir. Bulunan enzim

miktarı eşitlik kullanılarak enzimin filtre kâğıdı birimi (FPU) Eşitlik 4.1'deki formülle hesaplanır. Buradan enzim aktivitesi 168,18 FPU/ml olarak bulunmuştur.

$$FPU/ml = \frac{0,37}{enzim\ miktarı} = \frac{0,37}{0,0022} = 168,18\ FPU/ml \quad (4.1)$$



Şekil 3.2: Cellic CTEC2 enzim aktivitesi grafiği.

3.6. Karbonhidrat Tayini

Su sümbülünün selüloz, hemiselüloz, lignin (asitte çözünür lignin ve asitte çözünmeyen lignin) ve kül içeriğinin belirlenmesi Sluiter metoduna göre yapılmıştır. 300 mg kuru biyokütle üzerine 3 ml %72'lik H_2SO_4 çözeltisi eklenen kapalı cam şişeler $30^\circ C$ 'deki su banyosunda sık sık çalkalanarak 1 saat boyunca tutulmuştur. H_2SO_4 konsantrasyonu 84 ml distile su ilave edilerek %4'e düşürülmüş ve şişeler $121^\circ C$ 'de 1 saat otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan örnekler filtreden geçirilerek katı ve sıvı fazları ayrılmıştır. Katı faz kül miktarı tayini yapılmak üzere $105^\circ C$ 'de etüvde kurutulup kuru ağırlığı not edildikten sonra kül fırınında $575^\circ C$ 'de 5 saat yakılmış ve kül miktarı not edilmiş ve denkleme göre kül ve asitte çözünmeyen lignin içeriği hesaplanmıştır (Eşitlik 4.2 ve 4.3).

$$kül\ miktarı, \% = \frac{oluşan\ kül(g)}{0,3\ g\ biyokütle} * 100 \quad (4.2)$$

$$\text{asitte çözünmeyen lignin, \%} = \frac{\text{katı fazın kuru ağırlığı(g)} - \text{oluşan kül(g)}}{0,3 \text{ g biyokütle}} * 100 \quad (4.3)$$

Sıvı faz ise biyokütledaki asitte çözünen lignin ve şekerlerin belirlenmesi için kullanılır. Asitte çözünen lignin miktarı 280 nm’de spektrofotometrede absorbansın ölçüldükten sonra eşitlik 4.4’e göre hesaplanır. Absorbans ölçümlerinde değerin 0,7-1,0 aralığına getirilmesi için ve blank olarak %4’lük H₂SO₄ çözeltisi kullanılmaktadır. Karbonhidrat içeriği (selüloz ve hemiselüloz) ise CaCO₃ ile pH 5-7,5 aralığına getirildikten sonra HPLC cihazında ölçülmüştür.

$$\text{asitte çözünür lignin, \%} = \frac{\text{Abs}_{280} * \text{filtrat hacmi} * \text{seyreltme faktörü}}{0,3 \text{ g biyokütle} * \text{UV yol uzunluğu} * \epsilon} \quad (4.4)$$

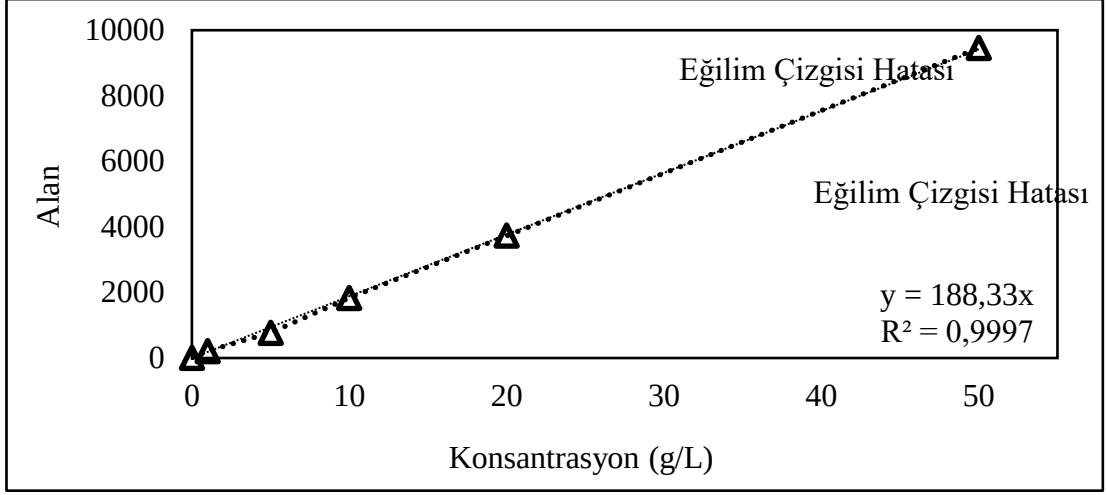
ϵ : Spesifik absorplama kapasitesi

3.7. Şeker, Asitler ve Solventlerin Ölçülmesi

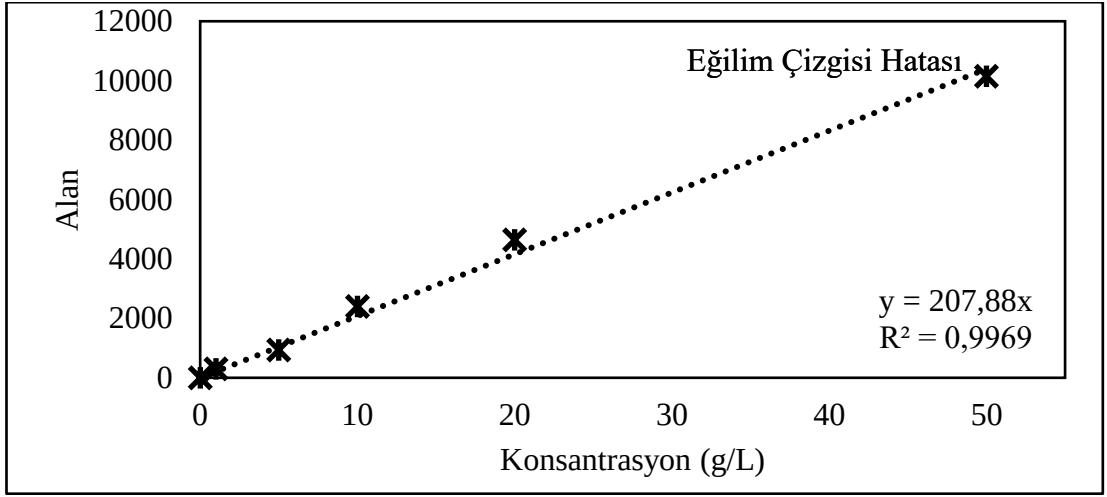
Karbonhidrat tayini, asit hidrolizi, enzimatik hidroliz ve fermentasyon çalışmaları sırasında şekerler, organik asitler ve son ürün olan solventlerin ölçülmesi için Essence System Lab Alliance marka HPLC (High Pressure Liquid Chromotography) cihazı kullanılmıştır. Tüm numuneler analiz öncesi HPLC kolonunda tıkanıklıklara sebep olmamak için 0,45 µm gözenekli filtreden geçirilmiştir. Numuneler ultrasonikatörde gazları uzaklaştırılmış 1 ml/dk akış hızında 9mM sülfürik asit mobil fazı kullanılarak 45 °C’deki şeker kolonu (8 µm polimer IEXH form) ve refraktif indeks dedektörü kullanılarak analiz edilmiştir.

3.6.1 HPLC standart eğrileri

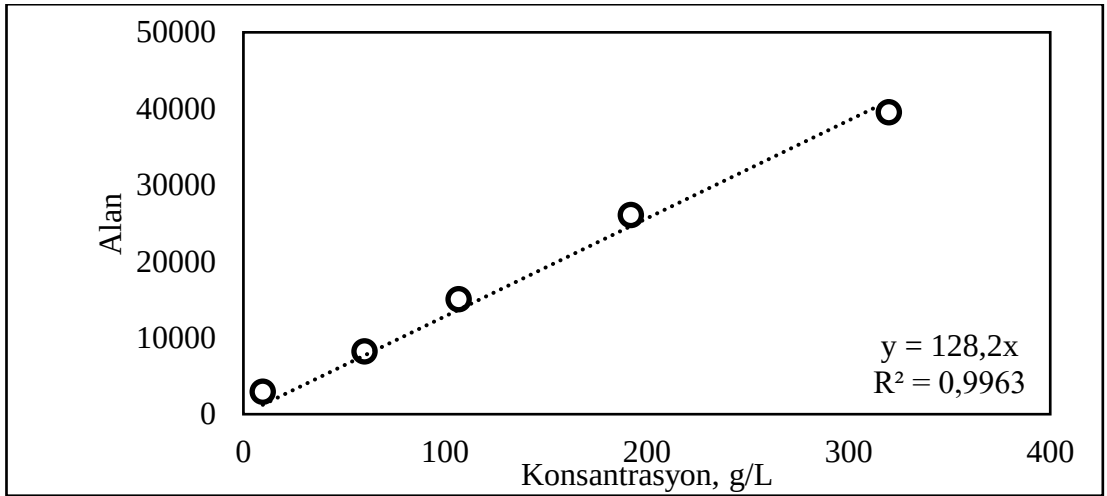
Şeker, organik asitler ve solventlerin analizi için HPLC cihazıyla yapılan analizlerde kullanılmak üzere oluşturulan standart eğrileri Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9 ve Şekil 3.10’da görülmektedir.



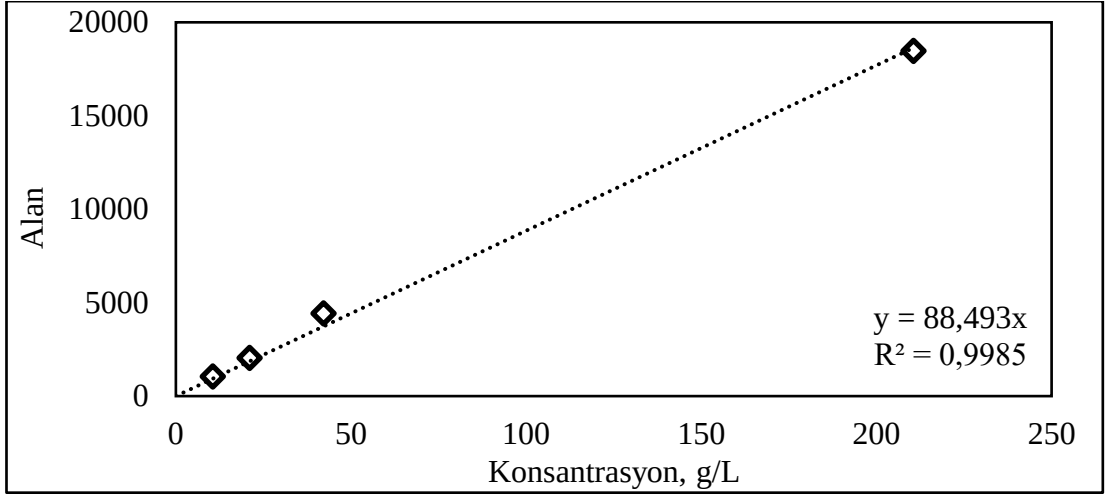
Şekil 3.3: HPLC analizinde kullanılan glikoz standart eğrisi.



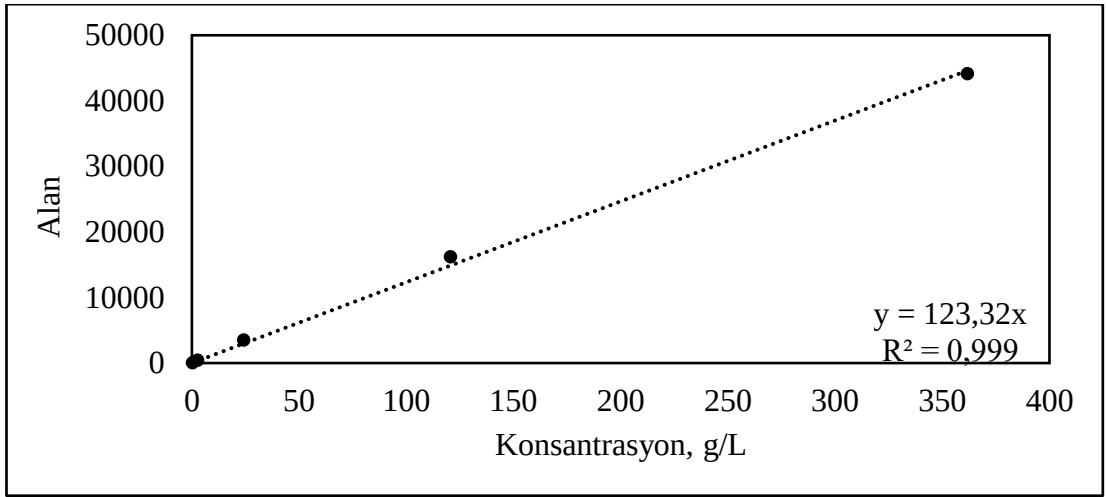
Şekil 3.4: HPLC analizinde kullanılan ksiloz standart eğrisi.



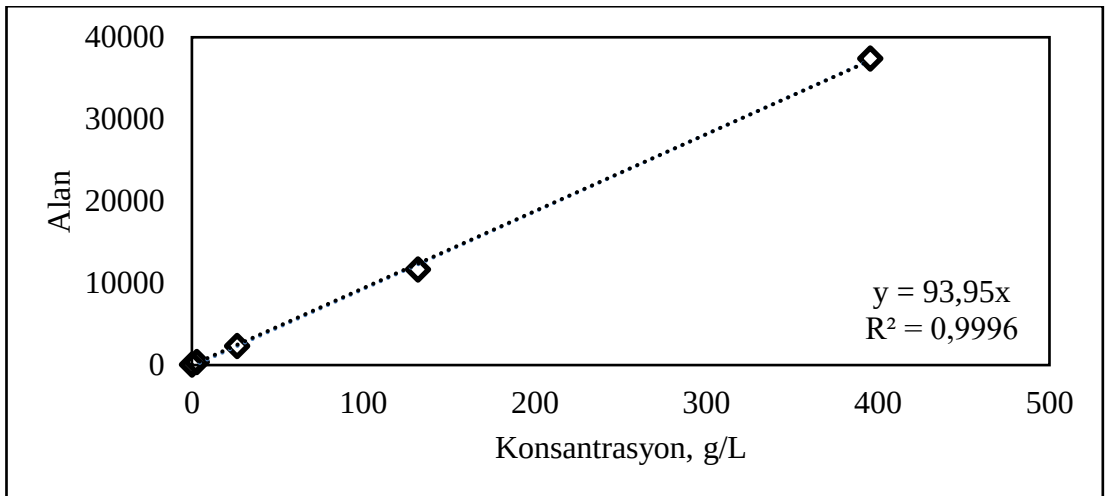
Şekil 3.5: HPLC analizinde kullanılan bütirik asit standart eğrisi.



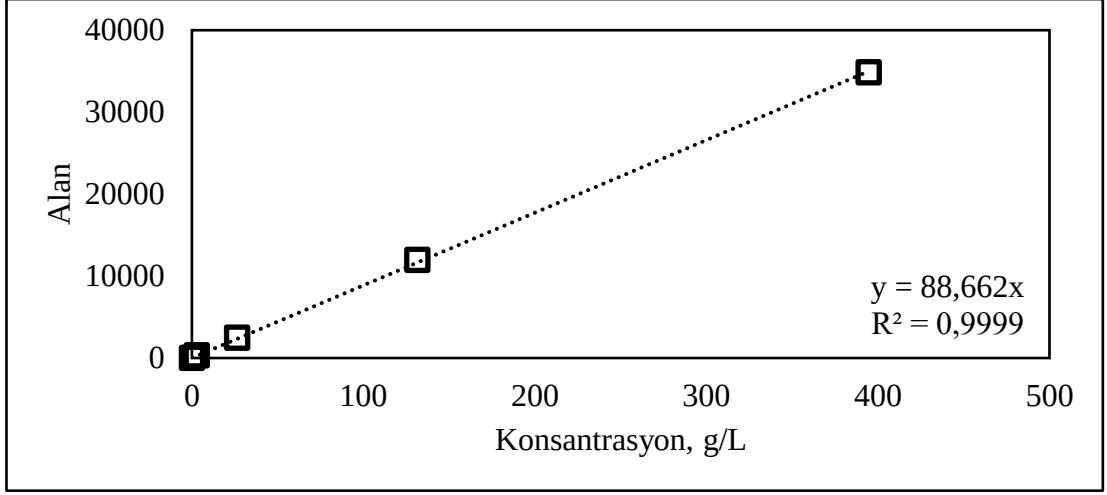
Şekil 3.6: HPLC analizinde kullanılan asetik asit standart eğrisi.



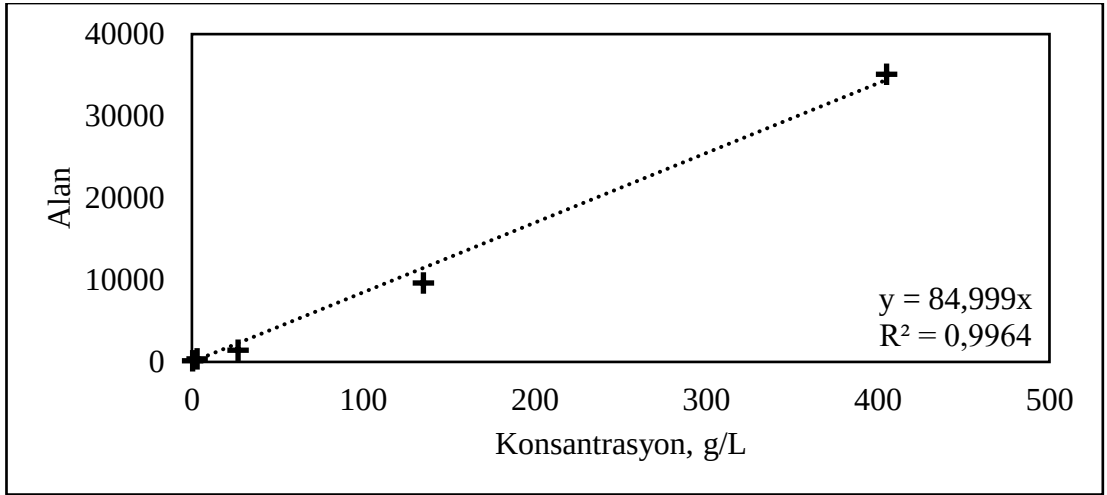
Şekil 3.7: HPLC analizinde kullanılan laktik asit standart eğrisi.



Şekil 3.8: HPLC analizinde kullanılan aseton standart eğrisi.



Şekil 3.9: HPLC analizinde kullanılan etanol standart eğrisi.



Şekil 3.10: HPLC analizinde kullanılan bütanol standart eğrisi.

3.9. ICP ile Metallerin Analizi

Su sümbülü bitkisi 10 mg/L Pb^{+2} ve Cr^{+6} çözeltisi içerisinde 15 gün süreyle floresan ışık altında tutularak (Şekil 3.11) sudaki ve bitki kısımlarındaki Pb^{+2} konsantrasyonu 5 gün arayla numune alınmıştır. Analiz öncesi $+4^{\circ}C$ 'de buzdolabında saklanan metal çözeltileri ve asitte parçalanmış biyokütleler Perkin Elmer marka Prima 4300 DV model ICP-OES (Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectrometry) cihazı ile ölçülmüştür. Çözeltiler gaz-sıvı ayırıcısına pompalandıktan sonra %0,3 w/v $NaBH_4$ ile reaksiyona sokularak $\mu g/L$ hassasiyetle sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.11: Fitoremediasyon deney düzeneği.

ICP cihazında elde edilen sonuçlar ile biyokonsantrasyon (Eşitlik 4.5) ve translokasyon faktörleri (eşitlik 4.6) belirlenmiştir.

$$BCF = \frac{\text{Elementin bitkideki konsantrasyonu } (\frac{mg}{kg})}{\text{elementin sudaki başlangıç konsantrasyonu } (\frac{mg}{L})} \quad (4.5)$$

$$TF = \frac{\text{Elementin kökteki konsantrasyonu } (\frac{mg}{kg})}{\text{Elementin gövdedeki konsantrasyonu } (\frac{mg}{kg})} \quad (4.6)$$

3.8 ABE Fermantasyonu

Enzimatik hidroliz sonrası enzimatik hidroliz karışımı 0,45 µm gözenekli filtreden geçirilmiştir. Enzimatik hidroliz karışımına 1 g/L maya özütü eklenmiş ve sıvının pH'ı HCl ve NaOH ile 6,5'e ayarlandıktan sonra sızdırmaz serum şişesindeki numuneler 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklavdan alınan numunelere oda sıcaklığında P2 stok solüsyonu eklenmiş ve N₂ geçirilen serum şişelerinde anaerobik şartlar oluştuktan sonra, %10 aşı eklenerek 37°C, 150 rpm karıştırma hızında fermantasyon başlatılmıştır. Gün aşırı örnek alınarak şekerler, ara ürünler ve solventler HPLC cihazında ölçülmüştür.

4. BULGULAR

4.1 Su sümbülünün karbonhidrat içeriği

Ülkemize Suriye sınırlarından girerek Asi Nehri üzerinde yaşam alanı oluşturan su sümbülü bitkisinin biyobütanol üretiminde kullanılabilmesi için öncelikle biyokütle içerisinde bulunan selüloz, hemiselüloz ve lignin oranları belirlenmiştir. Sluiter metoduna göre gerçekleştirilen analiz sonucunda elde edilen biyokütle kompozisyonuna ait veriler Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1: Su sümbülünün karbonhidrat içeriği.

İçerik	%, g/g
Selüloz	38%
Hemiselüloz	11,6%
Asitte çözünür lignin	2,22%
Asitte çözünmeyen lignin	18,2%
Kül	2,23%

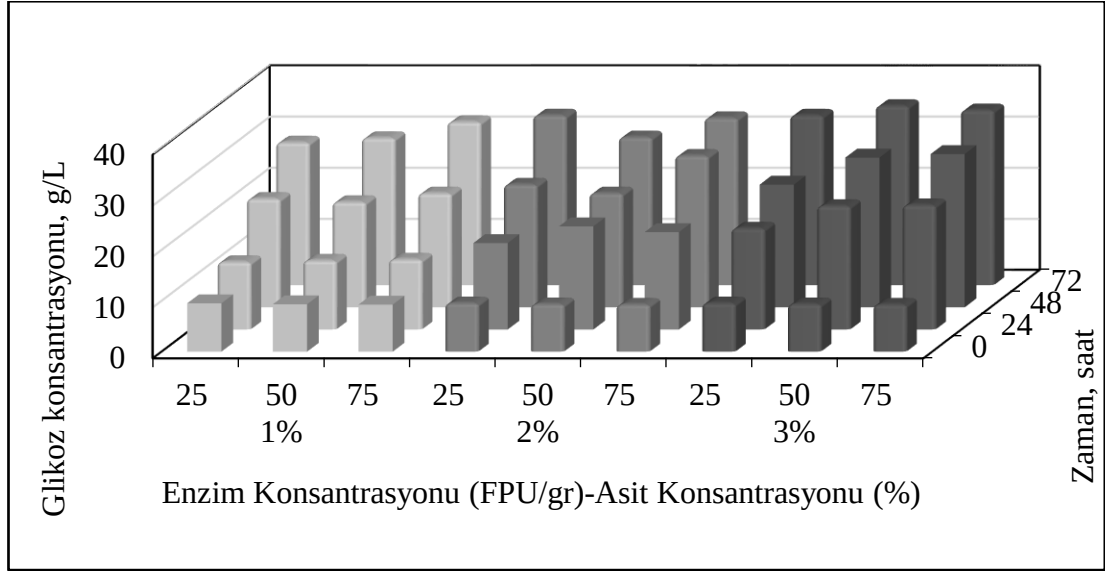
Tespit edilen biyokütle içeriği benzer çalışmalarla kıyaslandığında (Tablo 2.7) literatür ile uyumlu sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir. Biyokütle içeriğindeki değerler bölge, iklim ve zamana bağlı değişimler gösterebilmektedir. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi çalışmalarda kullanılan su sümbülü bitkisi toplam %50 selüloz ve hemiselüloz içeriği ile lignoselülozik biyobütanol üretimi için uygun olduğu düşünülmektedir.

4.2. Hidroliz Koşullarının Belirlenmesi

Asit hidrolizinin ardından farklı asit konsantrasyonlarında elde edilen örneklerin tamamına enzimatik hidroliz uygulanmış ve enzim aktivitesinin en yüksek olduğu bilinen sıcaklık ve pH (50°C ve pH=4,8) şartlarında çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

72 saatlik enzimatik hidroliz çalışmalarında %3 asit konsantrasyonu ve 50 FPU/g enzim yüklemesi şartlarında en yüksek şeker salımı gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.1). Asit hidrolizi çalışmalarında hidroliz sıvısında kaybedilen glikoz ve ksiloz

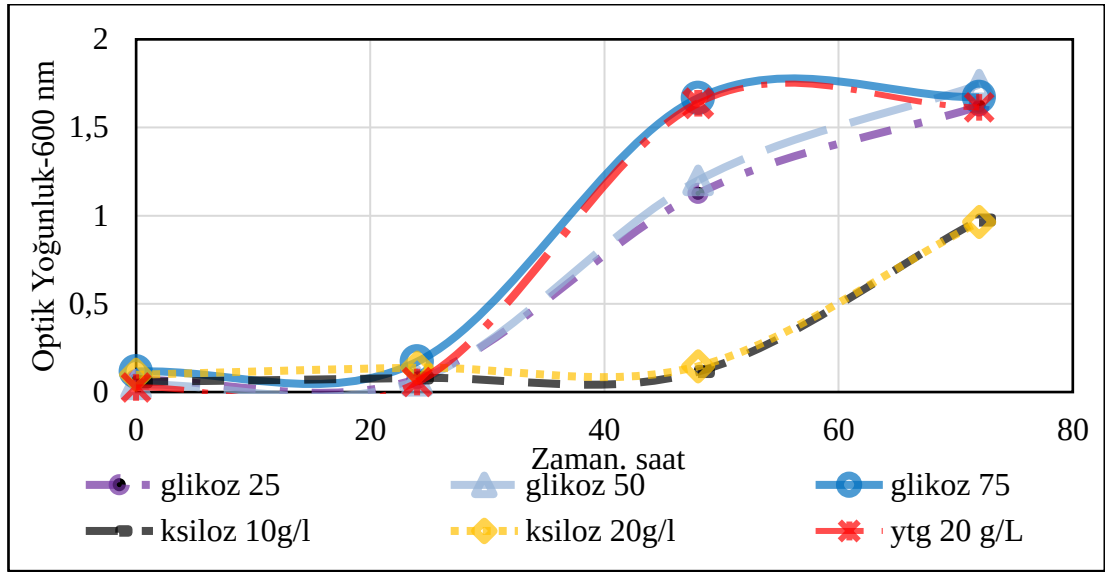
miktarının fazla olması (Tablo 4.2) ve enzimatik hidrolizde şeker salım verimleri arasında fark olmaması (Şekil 4.1) sebebiyle fermantasyon çalışmalarına %1 asit konsantrasyonu ve 50 FPU/g enzim yüklemesi ile elde edilen enzimatik hidroliz sıvısı ile devam edilmiştir.



Şekil 4.1: Enzim ve asit konsantrasyonunun glukoz üretimi üzerine etkisi.

4.3. ABE Fermantasyonuna Substrat Etkisi

ABE fermantasyonunda *C. acetobutylicum* bakterisinin hem pentozları hem de hegzozları kullanabildiği bilinmektedir. Farklı besiyeri şartlarında hücre büyümesini gözlemlemek için yapılan çalışmalarda 25, 50 ve 75 g/L glukoz, 10 ve 20 g/L ksiloz ve 20 g/L YTG içeren besiyerlerinde hücre büyümeleri incelendiğinde optik yoğunluğun glukozlu besiyerlerinde 24. saatten sonra artmaya başladığı ve 48. saatten sonra durağan faza girdiği görülmüştür (Şekil 4.2). Ksiloz içeren besiyerinde ise 48. saatten sonra hücre yoğunluğu artmaya başlamış ve 72 saatlik deney süresinde durağan faza ulaşmamıştır. Daha zengin içeriğe sahip olan 20 g/L glukoz içeren YTG besiyerinde hücre büyümesi 75 g/L glukoz içeren besiyerine benzer şekilde gerçekleşmiştir. Sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde bakterinin glukoza öncelikli olarak kullandığı ve glukoz içeriği arttıkça hücre büyümesinin hızlandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2: Besiyeri içeriğinin *C. acetobutylicum* büyümesi üzerine etkisi.

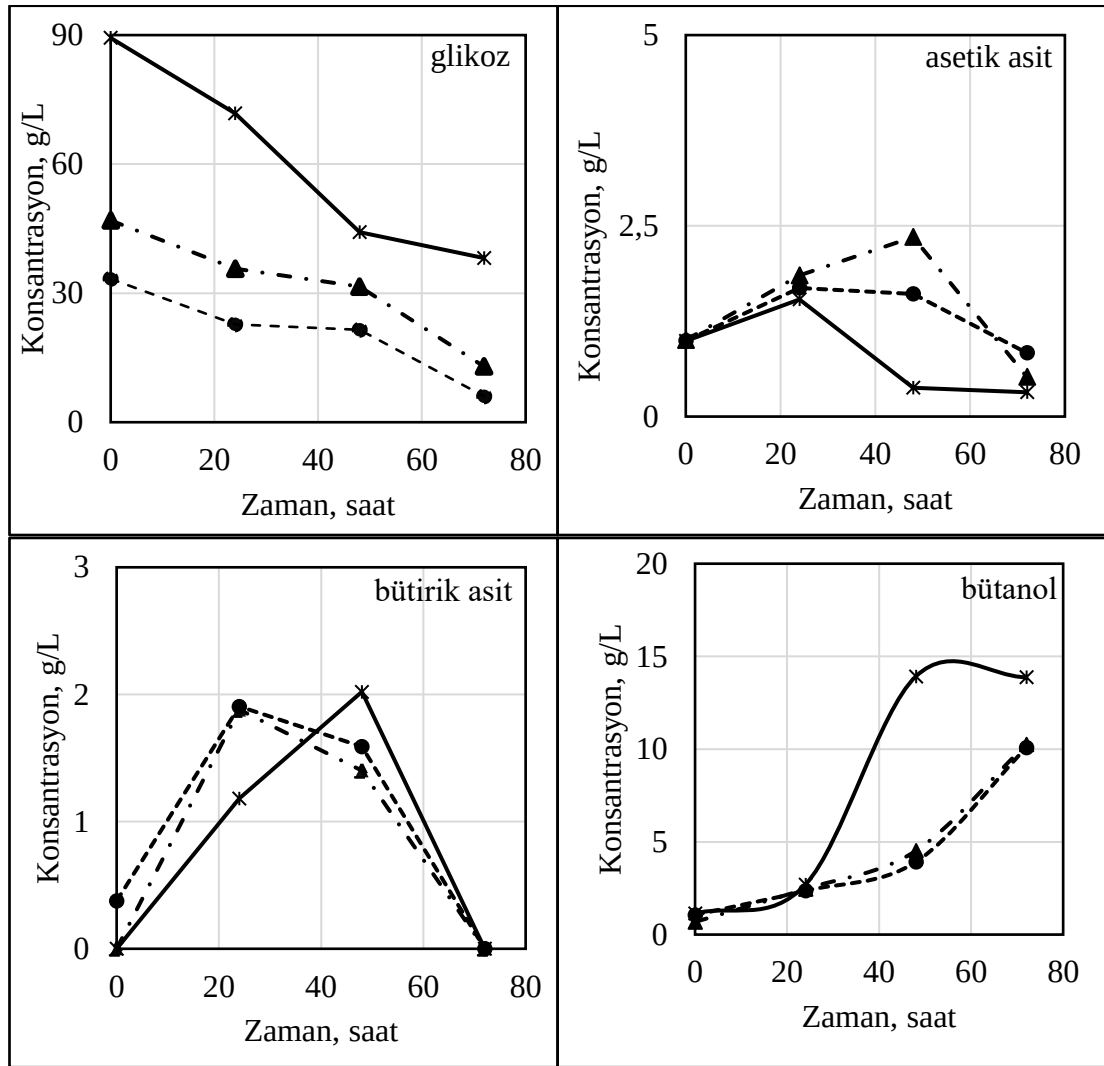
Farklı glikoz içeriğine sahip reaktörlerde fermentasyon boyunca glikozun konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi Şekil 4.3'te görülmektedir. Besiyeri başlangıç glikoz konsantrasyonu arttıkça glikoz tüketim hızının arttığı, 75 g/L başlangıç glikoz konsantrasyonuna sahip besiyerinde 48 saatte glikozun yarısının tüketildiği görülmektedir.

C. acetobutylicum metabolizmasında ilk olarak hücre büyümesi ve organik asitlerin üretiminin gerçekleştiği asidojenez evresi gerçekleşmektedir. Asitlerin üretimine bağlı olarak pH düşmekte ve bunun sonucunda hücre solvent üretim fazı olan solventojenez fazına geçmektedir. 75 g/L glikoz içeren besiyerinde asetik asit ve bütirik asit konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimi incelendiğinde asetik asit miktarının 24. saatten itibaren solventojenez fazına geçişe bağlı olarak daha hızlı düştüğü görülmektedir. Bütirik asit üretimi ise 48. saate kadar devam etmiştir.

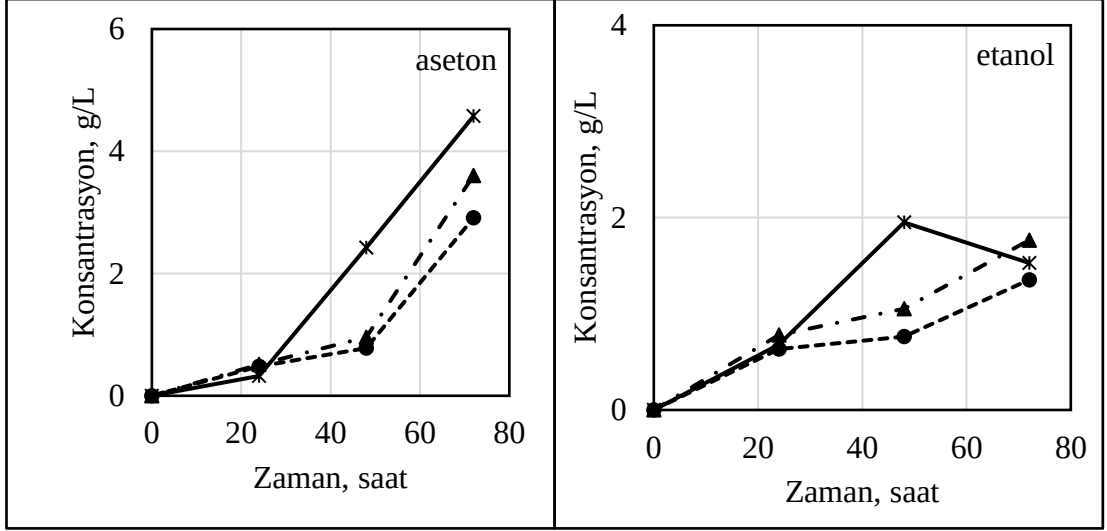
Besiyeri içeriğindeki şeker konsantrasyonu arttıkça bütanol konsantrasyonun arttığı gözlemlenmiştir. 25 ve 50 g/L glikoz içeren reaktörlerde 72 saatte bütanol üretimleri incelendiğinde sırasıyla 10,08 ve 10,26 g/L bütanol konsantrasyonları elde edilirken en yüksek bütanol konsantrasyonunun 75 g/L glikoz içeren reaktörde 48 saat sonunda 13,92 g/L bütanol konsantrasyonu elde edilmiştir.

ABE fermentasyonunda genellikle 6:3:1 oranında bütanol:aseton:etanol üretimi gerçekleşmektedir [85]. Bu çalışmada ise benzer şekilde *Clostridium acetobutylicum* DSM 1732 suşu ile 75 g/L glikoz başlangıç konsantrasyonuna sahip reaktörde 14:2,3:1

oranında bütanol:aseton:etanol üretimi gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Toplam ABE ürün konsantrasyonunu 72 saat fermentasyon sonunda 25, 50 ve 75 g/L glikoz içeren reaktörlerde sırasıyla 14,34, 15,63 ve 20,44 g/L ve fermentasyon verimleri 0,57, 0,31 ve 0,27 g ABE/g glikoz olduğu Şekil 4.3’de görülmektedir. Reaktöre başlangıçta eklenen şeker konsantrasyonunun artırılması ürün konsantrasyonunun artmasına sebep olmasına rağmen fermentasyon veriminin düşmesine sebep olmaktadır. Ürün ayırma proses maliyetleri açısından bakıldığında ise bütanol konsantrasyonunun düşük olması ayırma maliyetini arttırmakta ve ticari olarak ABE fermentasyon prosesi ile bütanol üretiminin gelişmemesine sebep olmaktadır. Bu sebeple fermentasyon prosesi ile birlikte çalışan ve sürekli ürün ayırma işlemi ile işletilen teknolojiler üzerindeki çalışmalar devam etmektedir.

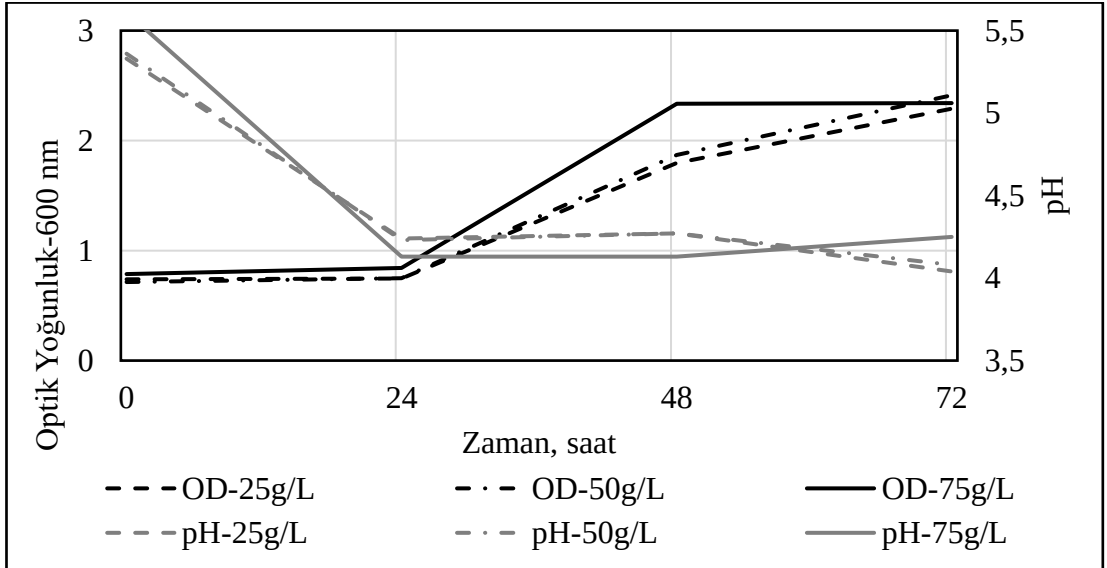


Şekil 4.3: Glikoz başlangıç konsantrasyonunun etkisi.



Şekil 4.3: Devamı.

Hücre büyümesi ve pH değişimi incelendiğinde (Şekil 4.4) 48 saat sonunda 75 g/L glikozlu besiyerinde logaritmik büyüme fazın tamamlandığı ve bakterinin durağan faza geçtiği görülmektedir. 25 ve 50 g/L glikoz içeren besiyerlerinde ise 72 saatte durağan faza geçiş görülmemiştir. pH genel olarak 5,5-4 aralığında kalmış ve asidojenez fazında asitlerin üretimine bağlı olarak pH düşmüştür.



Şekil 4.4: Glikoz konsantrasyonunun hücre büyümesi ve pH üzerine etkisi.

4.4. Su Sümbülü ile Hidroliz ve ABE Fermantasyonu

4.4.1. Asit Hidrolizi Çalışmaları

Teorik olarak 1 g glikozdan 0,411 g bütanol üretilebildiği bilinmektedir. Biyokütle içeriğindeki selüloz ve hemiselülozun tamamen glikoz ve ksiloza parçalanabildiği varsayımı ile 1 kg su sümbülünden optimum koşullarda maksimum 245 g bütanol üretilebilmektedir. Bu amaçla optimum koşullar bulunmaya çalışılarak en yüksek biyobütanol verimi elde edilmeye çalışılmıştır. Asit hidrolizi çalışmaları sabit katı oranında (%10) gerçekleştirilmiş ve optimum asit konsantrasyonu değeri bulunmaya çalışılmıştır. Artan asit konsantrasyonuna bağlı olarak biyokütleden sıvıya geçen şeker miktarının arttığı görülmüştür. Fermantasyon enzimatik hidroliz çalışmalarının sadece katı üzerinde gerçekleştirilmesi sebebiyle sıvıya geçen şeker miktarının yüksek olmaması istenmektedir. Bu sebeple %1 asit konsantrasyonunda gerçekleştirilen asit hidrolizi optimum koşul olarak seçilerek fermantasyon çalışmaları bu koşullarda elde edilen biyokütle ile devam ettirilmiştir. Farklı sülfürik asit konsantrasyonlarında gerçekleştirilen asit hidrolizi işlemlerinde elde edilen glikoz ve ksiloz salım verimleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar, su sümbülünün hemiselülozunun asitler için daha erişilebilir olduğunu gösterir ve önemli miktarda glikoz ve ksilozun %0,5-2,0 H₂SO₄ ile açığa çıktığı literatürdeki çalışmalarla tutarlıdır [87]-[88].

Tablo 4.2: Seyreltik asit hidrolizi uygulanan su sümbülünden açığa çıkan şekerler.

Asit konsantrasyonu %	Katı		Sıvı	
	Glikoz, g/g	Ksiloz, g/g	Glikoz, g/g	Ksiloz, g/g
1%	99,03	72,61	0,97	27,39
2%	92,20	43,01	7,80	56,99
3%	80,80	37,16	19,20	62,84
1% (krom içeren)	89,2	58,7	10,8	41,3
1% (kurşun içeren)	69,1	33,1	30,9	66,9

4.4.2. Enzimatik Hidroliz Çalışmaları

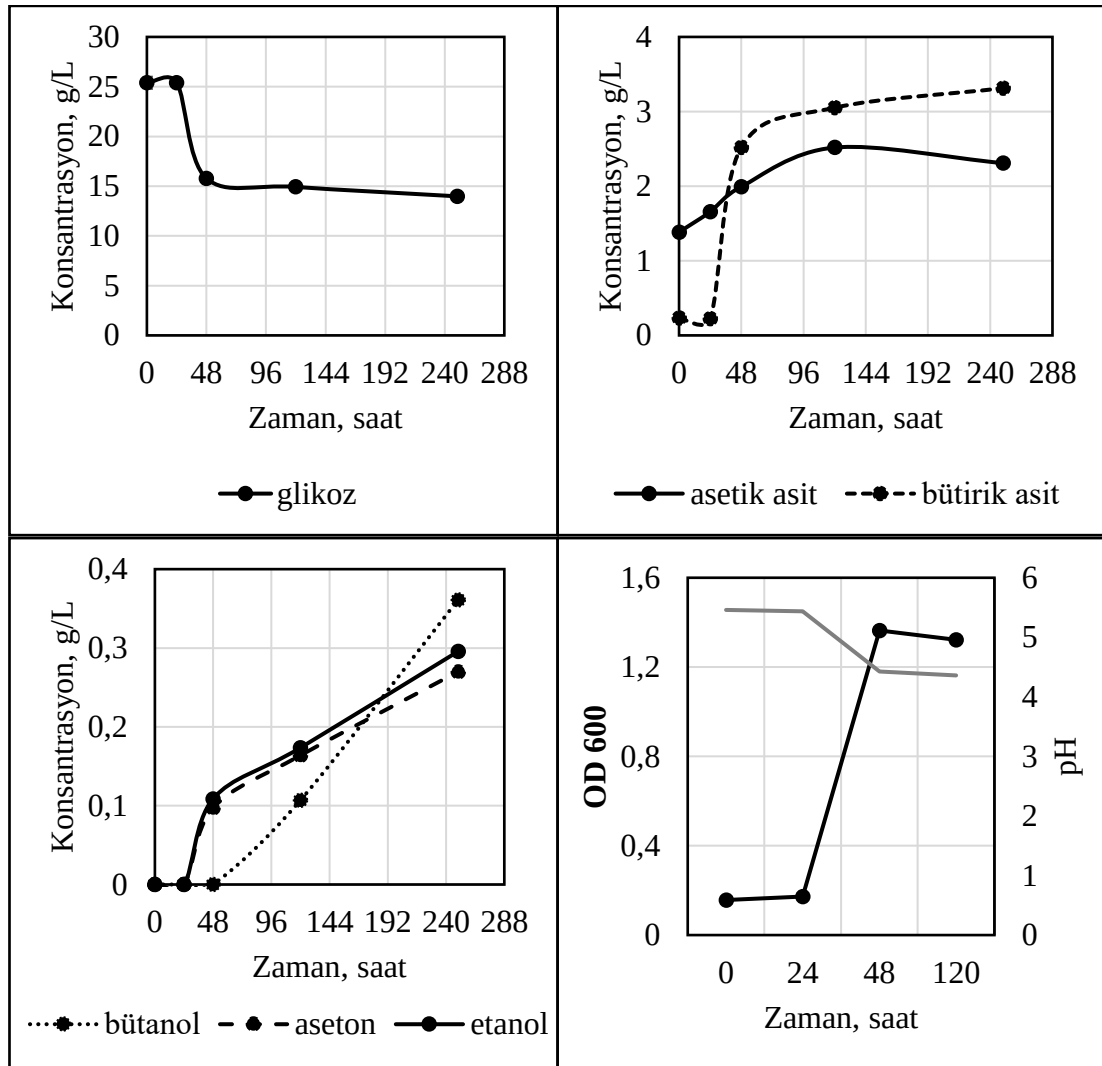
Cellic CTEC2 enzimi; β -glukosidaz, hemiselülozlar, karboksimetil selüloz, sellobiyohidrolaz ve ksilosidaz enzimlerini içeren ve β -1,4 glikosidik bağları parçalayan etkili bir karışımdır. Bu enzimin tercih edilmesinin sebebi lignoselülozik biyokütlenin içeriğindeki selüloz ve hemiselülozların parçalanmasında etkili enzimleri içermesidir. Enzimatik hidroliz çalışmalarına glikoz ve ksiloz kaybının en düşük olduğu %1 H_2SO_4 ile devam edilmiş, hidrolizi gerçekleştirilmiş su sümbülü kök ve gövdesi ayrı ayrı tüm işlemlere tabi tutulmuştur. Ağır metal içeren örneklerde ise krom ve kurşun konsantrasyonunun bitkinin gövde kısmında daha düşük olması sebebiyle sadece gövde kısımları enzimatik hidroliz işleminde kullanılmıştır. 48 saatlik enzimatik hidroliz sonucunda bitki kök ve gövdesinden sırasıyla başlangıç şeker içeriğinin %67,9 ve %72,5'i kazanılmıştır. Asit hidrolizi ve enzimatik hidroliz sonucu bitkide parçalanamadan kalan şeker miktarı ise kök ve gövde için sırasıyla %24,9 ve %20,4 olduğu görülmüştür.

Krom içeren su sümbülünün asit hidrolizi sonucunda krom içeriğinin %87,5'inin asitte giderilmesi enzimatik hidroliz veriminde krom kaynaklı düşüşün olmamasına sebep olmuştur. Kurşun içeren su sümbülünde ise asit hidrolizi ile kurşun gideriminin çok düşük (<%1) olmasına bağlı olarak enzimatik hidroliz sıvısında 425 mg/L kurşun konsantrasyonu gözlemlenmiştir ve enzimatik hidroliz ile şeker salımı %56,7 olduğu görülmüştür. Asit hidrolizi ve enzimatik hidroliz sonucunda krom ve kurşun içeren su sümbülü için sırasıyla şekerlerin toplam %2,7 ve %26,2'si açığa çıkmıştır.

4.4.3. ABE Fermantasyon Çalışmaları

Enzimatik hidroliz sonucu su sümbülü kök ve gövdesinden açığa çıkarılan şekerler ABE fermantasyonunda kullanılmak üzere reaktörde başlangıç şeker konsantrasyonu 25 g/L olacak şekilde hazırlanmış ve *Clostridium acetobutylicum* içeren %10 aş eklenmiştir. Ön işlemi gerçekleştirilmiş su sümbülü kökü ile hazırlanan besiyerinde ilk 24 saatte glikoz konsantrasyonunda değişim görülmezken 24-48 saatleri arasında glikoz kullanımı gözlemlenmiş ve ardından sabit kalmıştır. Besiyeri içerisindeki glikozun yalnızca %42'si tüketildiği görülmüştür (Şekil 4.5). Reaktörde

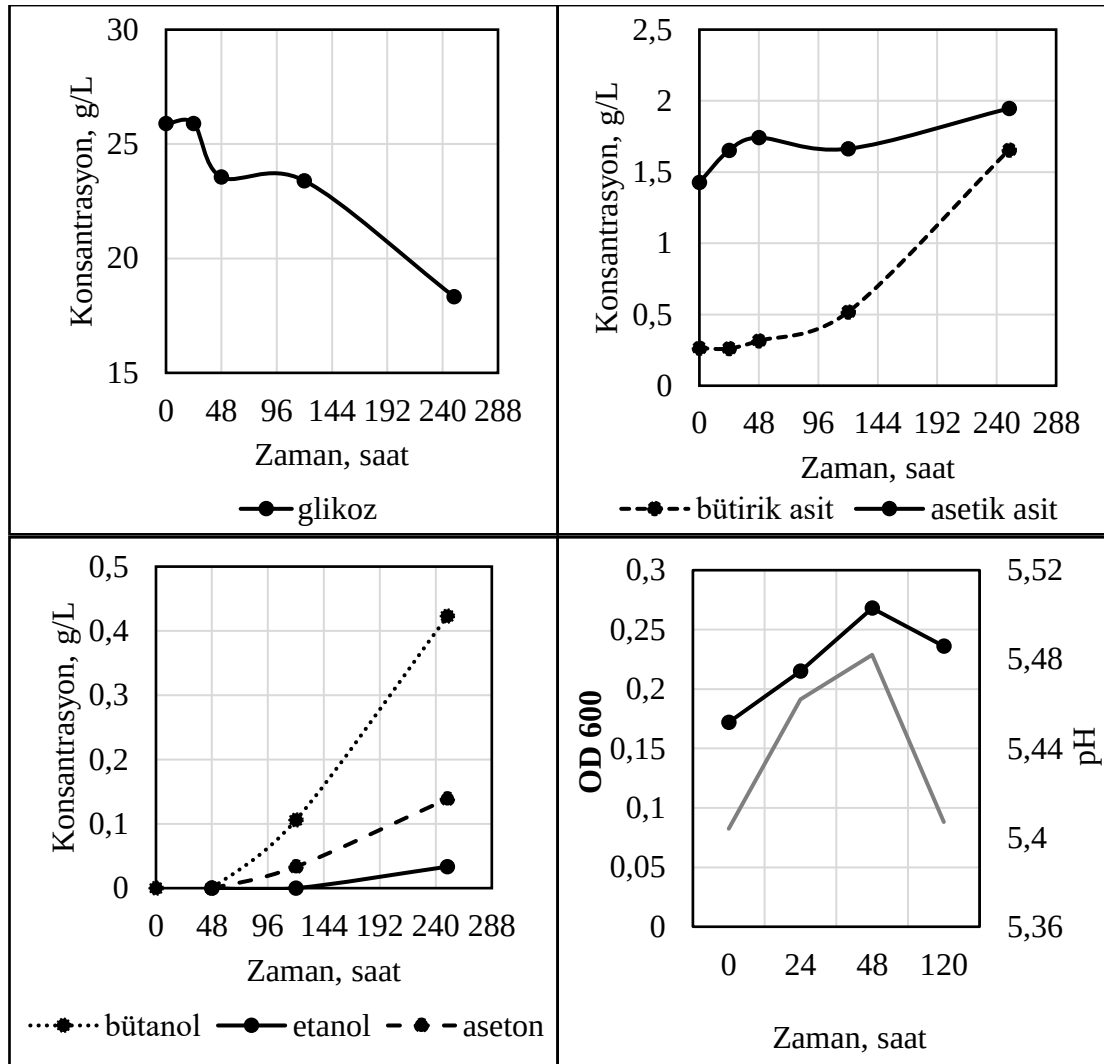
2,55 g/L asetik asit ve 3,14 bütirik asit üretimi gerçekleşmiştir. Asit konsantrasyonlarının hızlı yükselmesine bağlı olarak glikoz tüketiminin tamamlanamadığı düşünülmektedir. 120 saatlik fermantasyon çalışmaları sonucunda su sümbülü kökünden yalnız 0,1 g/L bütanol, 0,15 g/L aseton ve 0,16 g/L etanol üretilmiştir. Ürün konsantrasyonlarının düşük olması organik asitlerin inhibitör etki yapması ve sistemde hidroliz aşamalarında oluşan inhibitör maddelerin bulunması gibi sebeplere bağlı olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.5: Su sümbülü kökü ile ABE fermantasyonu sonuçları.

Ön işlemleri gerçekleştirilmiş su sümbülü gövde kısmı ile hazırlanan besiyerinde kök ile yapılan çalışmalara benzer şekilde ilk 24 saatte glikoz konsantrasyonunda değişim görülmezken 24-48 saatleri arasında glikoz kullanımı gözlemlenmiş ve

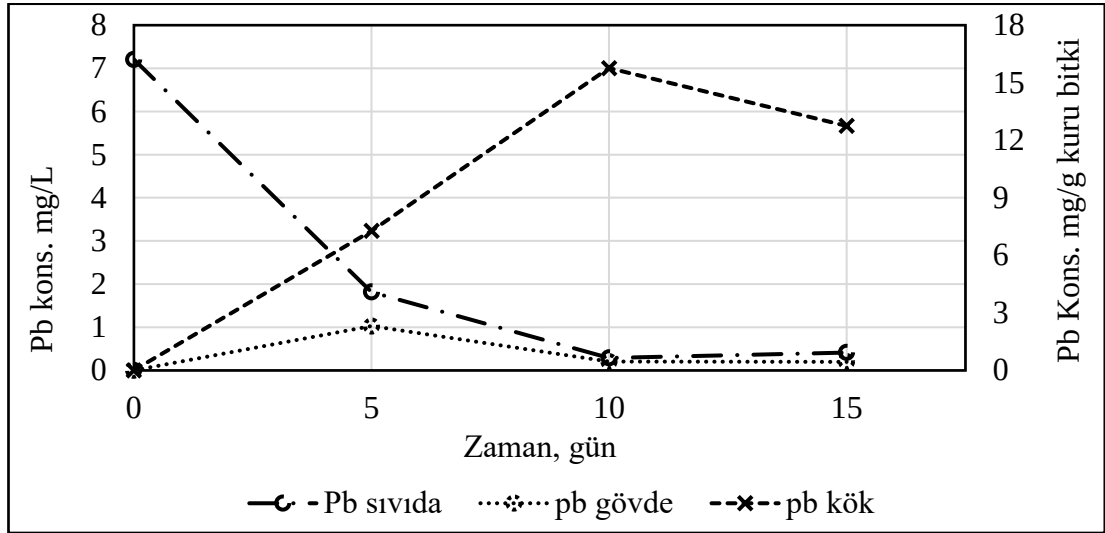
ardından sabit kalmıştır. Ancak glikoz tüketim miktarı çok düşüktür ve sadece 2.34 g/L glikoz konsantrasyon düşüşü gerçekleşmiştir (Şekil 4.6). Reaktörde oluşan asetik asit ve bütirik asit üretimi de glikoz tüketimine bağlı olarak az miktarda gerçekleşmiştir. 120 saatlik fermentasyon çalışmaları sonucunda su sümbülü gövde kısmından yalnız 0,10 g/L bütanol ve 0,03 g/l aseton üretimi gerçekleşmiş yani toplam solvent konsantrasyonu 0,14 g/L ABE elde edilmiştir. Ürün konsantrasyonlarının düşük olmasının sistemde hidroliz aşamalarında oluşan inhibitör maddelerin bulunmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.6: Su sümbülü gövdesi ile ABE fermentasyonu sonuçları.

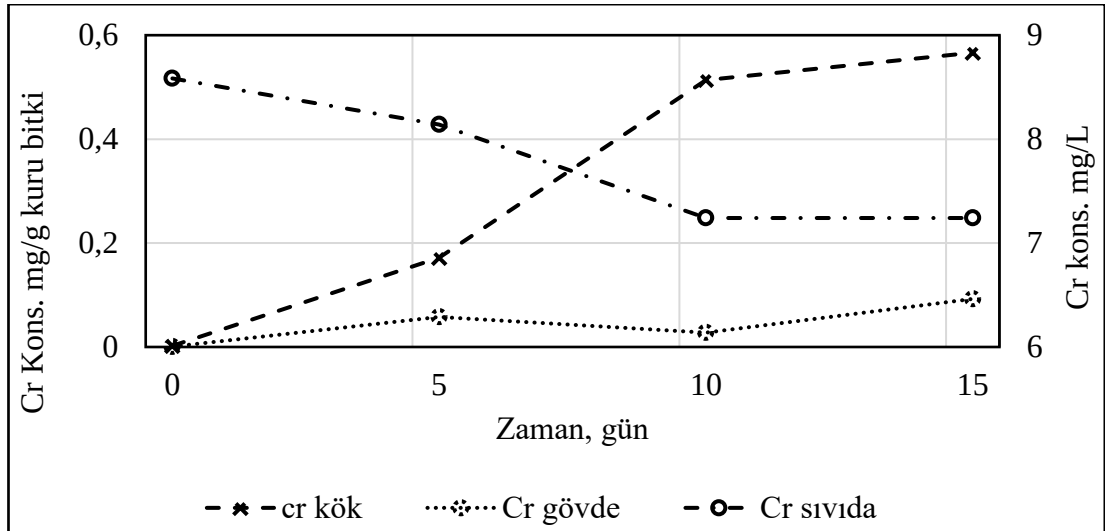
4.5. Su Sümbülünün Kurşun ve Krom Fitoremediasyonu

Su sümbülü bitkisinin kök ve gövde kısımlarında kurşun konsantrasyonunun zamanla değişimi incelendiğinde gövde kısmında ilk 5 günde kurşun konsantrasyonunun arttığı ancak 5. günden sonra konsantrasyonun düştüğü görülmüştür (Şekil 4.7). Kök kısmında ise 10. güne kadar konsantrasyon hızla artmış ve 15. günde ise 94% kurşun giderim verimi edilmiştir. Ayrıca biyokonsantrasyon faktörü 2187,53 (kök kısmında) ve 63,55 (gövde kısmında) ve translokasyon faktörü ise 34,42 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.7: Kurşun konsantrasyonunun bitki kısımlarında ve fitoremediasyon sıvısındaki değişimi.

Su sümbülü bitkisinin kök ve gövde kısımlarında krom konsantrasyonunun zamanla değişimi incelendiğinde gövde kısmında 15 günde 92,5 $\mu\text{g/g}$ krom toplandığı, sıvıdaki krom konsantrasyonunun fitoremediasyona bağlı olarak düştüğü Şekil 4.8'de görülmektedir. Ayrıca biyokonsantrasyon faktörü 66 (kök kısmında) ve 10,8 (gövde kısmında) ve translokasyon faktörü ise 18,44 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.8: Krom konsantrasyonunun bitki kısımlarında ve fitoremediasyon sıvısındaki değişimi.

4.6. Kurşun ve Krom İçeren Su Sümbülü ile ABE Fermantasyonu

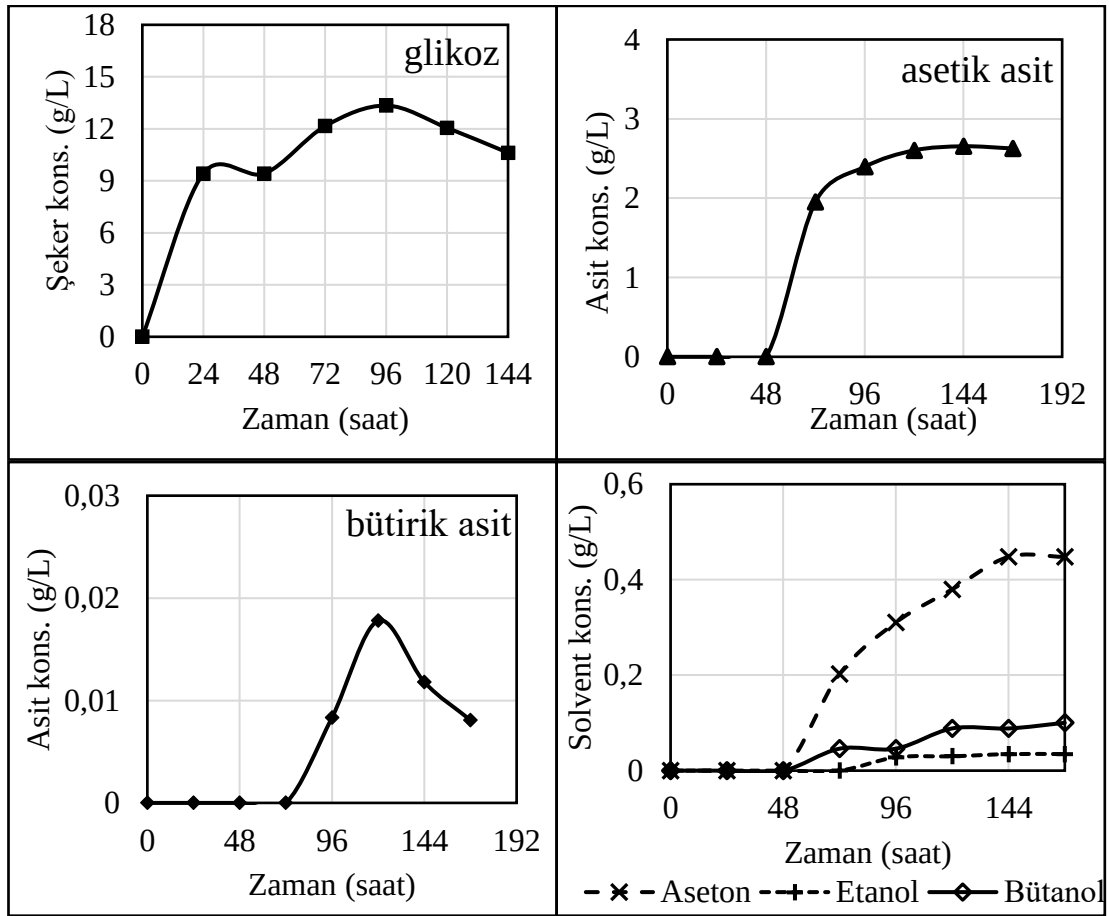
Asit hidrolizi ve enzimatik hidroliz sonucunda toplam selüloz ve hemiselüloz parçalanarak 80% şeker verimliliği elde edilmiştir. Asit hidrolizi ile su sümbülü içerisinde birikmiş olan krom ve kurşunun sırasıyla %87,5 ve %0,9'u sıvı faza geçmiş ve fermantasyon reaktörüne katı fazdan gelen ağır metal konsantrasyonları 0,386 mg krom/L ve 421,8 g/L olduğu hesaplanmıştır.

Enzimatik hidroliz ve ABE fermantasyonu çalışmalarında glikoz, ksiloz, asetik asit, bütirik asit, aseton, bütanol ve etanol konsantrasyonlarındaki değişimler şekilde görülmektedir. Glikoz ve ksilozun 70%'i 24 saat içerisinde üretilmiş olup fermantasyon sırasında enzimatik hidrolizin devam ettiği görülmüştür. Ksilozun önemli bir kısmının (73,6%) ise asit hidrolizinde ayrılması sebebiyle ksiloz üretiminin düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9).

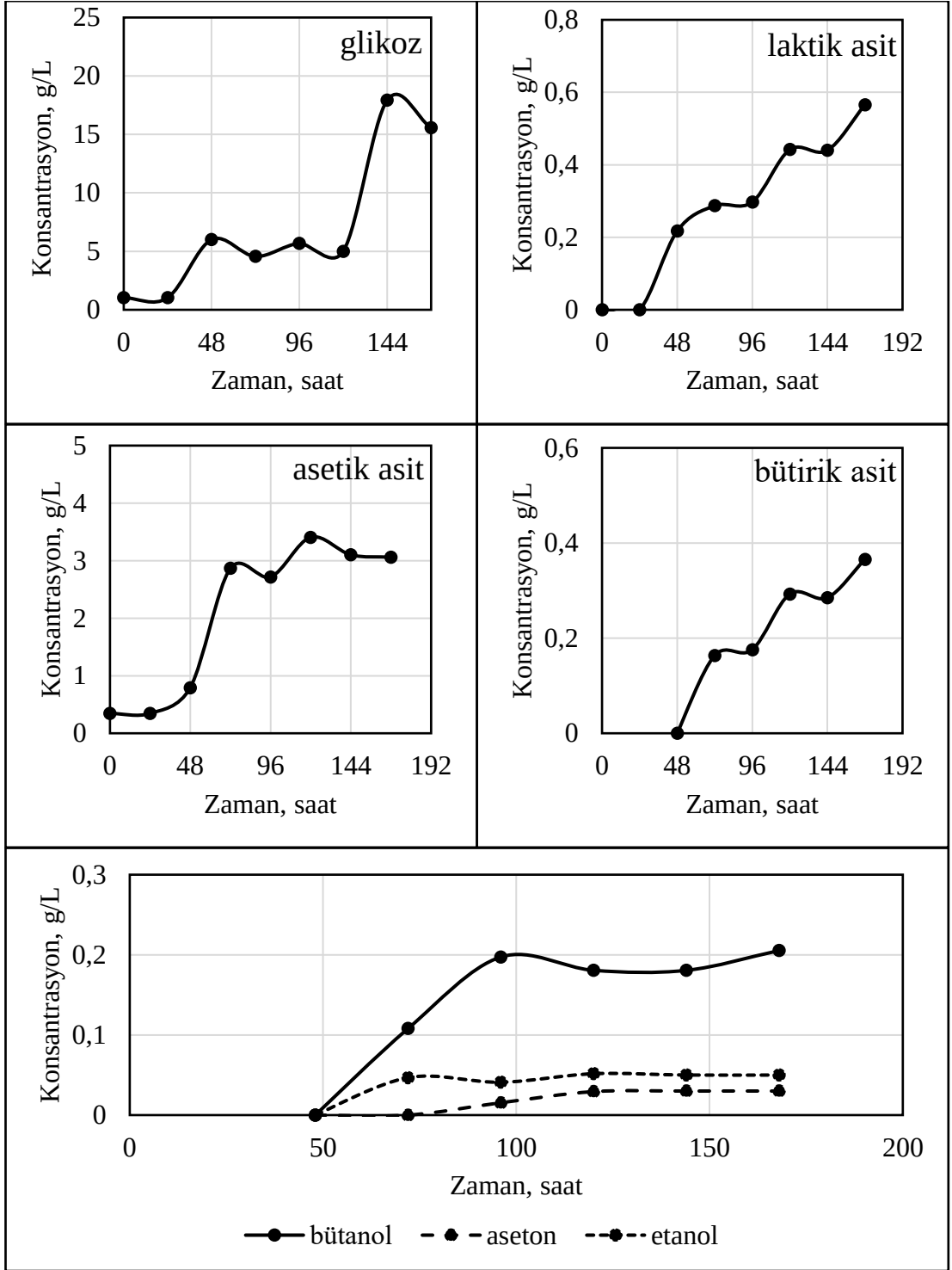
Reaktöre aş 48. saatte eklenerek fermantasyon başlatılmış ve enzim aktivitesi de fermantasyon boyunca devam etmiştir. Ara ürünler olan asetik asit ve bütirik asit aşılardan itibaren sırasıyla 48 ve 72. saatten itibaren üretilmeye başladığı görülmüştür. Fermantasyon verimi 4,75 g bütanol.kg⁻¹ kuru su sümbülü ve 9 g ABE.kg⁻¹ kuru su sümbülü olarak tespit edilmiş, bütanol konsantrasyonu ise 0,24 g.l⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Krom içeren su sümbülü gövdesiyle yapılan ABE

fermantasyon çalışmasında glikoz üretiminin enzim aktivitesinin devam etmesine bağlı olarak 144. saate kadar devam ettiği ve bütanol konsantrasyonunun kurşun içeren su sümbülü gövdesine göre daha yüksek olduğu (Şekil 4.10) görülmüştür.

Su sümbülü lignoselülozik bir biyokütle olup yüksek oranda selüloz ve hemiselüloz (%49,6) içeriği sebebiyle biyoyakıt üretiminde kullanılabilir önemli bir biyokütledir. Ancak fitoremediasyon sonrası biyokütle içerisinde kalan kurşunun fermentasyon verimliliğini önemli oranda düşürdüğü görülmektedir.



Şekil 4.9: Su sümbülü ile enzimatik hidroliz ve ABE fermentasyonunda kurşunun etkisi.



Şekil 4.10: Su sümbülü ile enzimatik hidroliz ve ABE fermentasyonunda kromun etkisi.

5. TARTISMA ve ÖNERİLER

Literatürde *Clostridium acetobutylicum* ile biyobütanol üretmek amacıyla birçok çalışma bulunmaktadır. Biyobütanol sahip olduğu yüksek enerji içeriği sebebiyle biyoyakıtlar içinde umut vadeden bir yakıt alternatifi olmasına rağmen endüstriyel ölçekte biyobütanol üretiminin önünde birçok problem bulunmaktadır. Bu problemlerin çözümünde substrat seçimi, suş çalışmaları ve hidroliz ve fermantasyon koşullarının geliştirilmesi anahtar roller oynamaktadır. Uygun karbon kaynağının seçimi proses maliyetini önemli ölçüde düşürecektir. İkincil kaynaklar olarak sınıflandırılan lignoselülozik biyokütleler gıda bitkilerinin enerji temini için üretilmesi ile oluşan açlık krizine alternatif çözüm olması ve düşük maliyetleri sebebiyle tercih edilmektedir.

Biyobütanol üretiminde uygun olabilecek lignoselülozik biyokütlenin üretim hızının yüksek olması, hemiselüloz ve selüloz içeriğinin yüksek, lignin içeriğinin düşük, yetiştirilmesinin kolay, iklim seçiciliğinin az olması proses verimliliğinin ve uygulanabilirliğinin yüksek olmasını sağlayacak parametrelerdir. Su sümbülü bitkisi bütün bu özelliklere sahip dünya genelinde üretim hızı en yüksek olduğu bilinen ve her yıl üreme ortamlarında istilacı olmaları sebebiyle mücadele edilmeye çalışılan sucul bir bitki türüdür.

Bu tez çalışması kapsamında öncelikle su sümbülünün karbonhidrat içeriği belirlenmiş %50 selüloz ve hemiselüloz içeriğine sahip olması sebebiyle biyoyakıt üretiminde uygun bir kaynak olarak düşünülmüştür. Asit hidrolizi ve enzimatik hidroliz ön işlemleri uygulanmış su sümbülü bitkisinin kök ve gövdesinden sırasıyla toplam %75,1 ve %79,6 şeker geri kazanımı sağlanmış, *Clostridium acetobutylicum* ile muamele edilen ön işlem yapılmış kökten 0,42 g/L bütanol ve 0,927 g/L ABE üretimi gözlemlenmiştir (Tablo 5.1). Aynı koşullarda ön işlem yapılmış gövde kısmından ise 0,36 g/L bütanol ve 0,595 g/L ABE üretildiği bulunmuştur.

Saf glikoz ile yapılan çalışmalarda 75 g/L glikoz içeren reaktörde teorik biyobütanol üretimine (0,411 g bütanol. g⁻¹ şeker) göre %46,2 daha az bütanol üretildiği gözlemlenmiştir. Bütanol üretim verimlilikleri kıyaslandığında ise kök ve gövde kısımlarında sırasıyla 1,36 ve 1,51 mg/L sa bütanol verimi elde edilmiştir.

Verim düşüklüğünün sebebi ise reaktördeki asitlerin ve ürünlerin inhibitör etki yapmış olabileceği olarak düşünülmüştür.

Fitoremediasyon çalışmalarının sonucunda %15,6 krom ve %94 kurşun giderimi gerçekleştiği ICP analizleri ile belirlenmiştir. Kurşun ve kromun çoğunlukla bitkinin kök kısmında adsorplandığı gözlemlenmiş ve translokasyon faktörü kurşun ve krom için 34,4 ve 18,4 olduğu hesaplanmıştır. Bitki kök kısmında ağır metallerin yüksek konsantrasyonda birikmesi sebebiyle ABE fermentasyon çalışmalarında daha düşük konsantrasyonda ağır metal içeren gövde kısımları kullanılmıştır. Asit hidrolizi sonucunda kurşun ve kromun %43 ve %4'ü asitte çözünerek uzaklaşmış ve böylece enzimatik hidroliz ve fermentasyon reaktöründe 8,6 mg/L kurşun ve 3 mg/L krom olduğu görülmüştür.

Tablo 5.1: Çalışmada elde edilen sonuçlar.

	Ticari glikoz			Su sümbülü		Fitoremediasyon yapılmış su sümbülü	
				Kök	Gövde	Kurşun	Krom
Fermentör başlangıç şeker kons., g/L	25	50	75	25,9	25,4	9,41	6,0
Fermentasyon sonrası kalan glikoz kons., g/L	6,0	12,9	38,2	13,98	18,32	10,61	15,6
Bütanol kons., g/L	10,1	10,3	13,9	0,42	0,36	0,1	0,21
ABE kons., g/L	14,3	15,6	20,4	0,93	0,60	0,58	0,29
Bütanol verimi, gBütanol/kg biyokütle	-	-	-	10,5	9	3	6,3
Bütanol verimi, gBütanol/kg şeker	404	206	185	16,2	14,2	7,5	11,4
Bütanol üretim verimi, g/L.sa	0,140	0,143	0,290	0,001	0,002	0,001	0,004

Biyobütanol üretim verimleri karşılaştırıldığında kurşun ve krom içeriğinin sırasıyla %65 ve %30 verim kaybına sebep olduğu görülmüştür. Ürün ABE konsantrasyonları kıyaslandığında ise kurşun içeren su sümbülünde ABE konsantrasyonunda fark olmamasına karşın krom içeren su sümbülünde ise ABE konsantrasyonu %50 düşmüştür. Detoksifikasyon amacıyla hiçbir ek işlem uygulanmayarak enzimatik hidroliz ve ABE fermentasyonu üzerine ağır metallerin

etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Kurşun ve krom içeren su sümbülünün enzimatik hidrolizinde şeker üretimi sırasıyla %34,4 ve %79,3 olduğu görülmüş ve kurşunun enzim üzerinde olumsuz etki yaptığı belirlenmiştir. Kromun ise ağır metal içermeyen su sümbülü örnekleri ile karşılaştırıldıklarında enzimatik hidroliz performansı üzerine olumsuz etkisi olmamıştır. Krom konsantrasyonunun çok düşük olması sebebiyle verimlilikte düşüş yaşanmadığı düşünülmektedir. Saf glikoz ile yapılan çalışmalarla kıyaslandığında su sümbülü bitkisinin fermantasyon sonucu bütanol konsantrasyonunun düşük olduğu gözlemlenmiştir. Ürün konsantrasyonunun düşük olmasının sebebi sistemde ara ürün olarak oluşan asetik asit ve laktik asit gibi inhibitör maddeler olabilir. Bu sebeple bütanol konsantrasyonunun arttırılabilmesi için detoksifikasyon işleminin asit hidrolizi ardından uygulanması önerilmiştir.

Literatürdeki diğer çalışmalar incelendiğinde birçok lignoselülozik biyokütlenin biyobütanol üretimi amacıyla kullanıldığı görülmüştür. Manyok bitkisinin atıkları ile gerçekleştirilen çalışmalarda 16,4 g/L bütanol [88], fil otunun alkali hidrolizi ve Cellic CTEC2 enzimi ile enzimatik hidrolizi ve fermantasyonu çalışmasında 9,5 g/L bütanol [89] üretilbildiği bildirilmiştir. Yapılmış diğer çalışmalar Tablo 5.2’de listelenmiştir.

Tablo 5.2: Çeşitli biyokütlelerle ABE fermantasyonunda biyobütanol üretiminin kıyaslanması.

Substrat	Mikroorganizma	Bütanol Kons. g/L	Bütanol Verimi g/g şeker	Ref
Fil otu	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	9,5	0,22	[89]
Sago nişastası	<i>C. acetobutylicum</i> P626	8,38	0,36	[88]
Manyok cipsi	<i>C. acetobutylicum</i> NI-4	16,4	0,26	[88]
Mısır koçanı	<i>C. saccharobutylicum</i> DSM13864	10,2	0,12	[6]
Glikoz	<i>C. acetobutylicum</i> DSM 1732	13,9	0,19	Bu çalışma
Su sümbülü	<i>C. acetobutylicum</i> DSM 1732	0,11	0,004	Bu çalışma
Su sümbülü-Pb	<i>C. acetobutylicum</i> DSM 1732	0,09	0,004	Bu çalışma
Su sümbülü-Cr	<i>C. acetobutylicum</i> DSM 1732	0,1	0,01	Bu çalışma

KAYNAKLAR

- [1] Saravanan A., Jayasree R., Hemavathy R.V., Jeevanantham S., Hamsini S., Kumar P.S., Yaashikaa P.R., Manivasagan V., Yuvaraj D., (2019), “Phytoremediation of Cr(VI) ion contaminated soil using Black gram (*Vigna mungo*): Assessment of removal capacity”, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7 (3), 103052.
- [2] Haghighi Mood S., Hossein Golfeshan A., Tabatabaei M., Salehi Jouzani G., Najafi G.H., Gholami M., Ardjmand M., (2013), “Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77–93.
- [3] Huzir N.M., Aziz M.M.A., Ismail S.B., Abdullah B., Mahmood N.A.N., Umor N.A., Syed Muhammad S.A.F., (2018), “Agro-industrial waste to biobutanol production: Eco-friendly biofuels for next generation”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94, 476–485.
- [4] Pugazhendhi A., Mathimani T., Varjani S., Rene E.R., Kumar G., Kim S.H., Ponnusamy V.K., Yoon J.J., (2019), “Biobutanol as a promising liquid fuel for the future- recent updates and perspectives”, *Fuel*, 253, 637–646.
- [5] Zhang J., Wang S., Wang Y., (2016), “Biobutanol Production From Renewable Resources”, *Advances in Bioenergy*, 1, 1–68.
- [6] Ibrahim M.F., Ramli N., Kamal Bahrin E., Abd-Aziz S., (2017), “Cellulosic biobutanol by Clostridia: Challenges and improvements”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 1241–1254.
- [7] Nimbalkar P.R., Khedkar M.A., Kulkarni R.K., Chavan P. V., Bankar S.B., (2019), “Strategic intensification in butanol production by exogenous amino acid supplementation: Fermentation kinetics and thermodynamic studies”, *Bioresource Technology*, 288, 121521.
- [8] Zhang Z., Lohr L., Escalante C.L., Wetzstein M., Zhang Z., Lohr L., Escalante C., Wetzstein M., (2010), “Food versus fuel: What do prices tell us?”, *Energy Policy*, 38 (1), 445–451.
- [9] Stoeberl M., Werkmeister R., Faulstich M., Russ W., (2011), “Biobutanol from food wastes – fermentative production, use as biofuel an the influence on the emissions”, *Procedia Food Science*, 1, 1867–1874.
- [10] Foda M.I., Joun H., Li Y., (2010), “Study the Suitability of Cheese Whey for Bio-Butanol Production by Clostridia”, *Journal of American Science*, 6 (8), 39–46.
- [11] Becerra M., Cerdán M.E., González-Siso M.I., (2015), “Biobutanol from cheese whey”, *Microbial Cell Factories*, 14 (1), 27.

- [12] Jiang L., Wang J., Liang S., Wang X., Cen P., Xu Z., (2009), “Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses”, *Bioresource Technology*, 100 (13), 3403–3409.
- [13] Van Der Merwe A.B., Cheng H., Görgens J.F., Knoetze J.H., (2013), “Comparison of energy efficiency and economics of process designs for biobutanol production from sugarcane molasses”, *Fuel*, 105, 451–458.
- [14] Ni Y., Wang Y., Sun Z., (2012), “Butanol production from cane molasses by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864: Batch and semicontinuous fermentation”, *Applied Biochemical Biotechnology*, 166 (8), 1896–1907.
- [15] Sarkar N., Ghosh S.K., Bannerjee S., Aikat K., (2012), “Bioethanol production from agricultural wastes: An overview”, *Renewable Energy*, 37 (1), 19–27.
- [16] Sun Y., Cheng J., (2002), “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review”, *Bioresource Technology*, 83 (1), 1–11.
- [17] Oswald W.J., (2003), “My sixty years in applied algology”, *Journal of Applied Phycology*, 15, 99–106.
- [18] Suutari M., Leskinen E., Fagerstedt K., Kuparinen J., Kuuppo P., Blomster J., (2015), “Macroalgae in biofuel production”, *Phycological Research*, 63 (1), 1–18.
- [19] Wang Y., Guo W., Chen B.Y., Cheng C.L., Lo Y.C., Ho S.H., Chang J.S., Ren N., (2015), “Exploring the inhibitory characteristics of acid hydrolysates upon butanol fermentation: A toxicological assessment”, *Bioresource Technology*, 198, 571–576.
- [20] Depraetere O., Deschoenmaeker F., Badri H., Monsieurs P., Foubert I., Leys N., Wattiez R., Muylaert K., (2015), “Trade-Off between Growth and Carbohydrate Accumulation in Nutrient-Limited *Arthrospira* sp. PCC 8005 Studied by Integrating Transcriptomic and Proteomic Approaches”, *PLoS One*, 10 (7), e0132461.
- [21] Moxley G., Zhu Z., Zhang Y.H.P., (2008), “Efficient sugar release by the cellulose solvent-based lignocellulose fractionation technology and enzymatic cellulose hydrolysis”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (17), 7885–7890.
- [22] Barakat A., Monlau F., Solhy A., Carrere H., (2015), “Mechanical dissociation and fragmentation of lignocellulosic biomass: Effect of initial moisture, biochemical and structural proprieties on energy requirement”, *Applied Energy*, 142, 240–246.

- [23] Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M., (2005), “Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass”, *Bioresource Technology*, 96 (6), 673–686.
- [24] Kumari D., Singh R., (2018), “Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 877–891.
- [25] Li L., Kong X., Yang F., Li D., Yuan Z., Sun Y., (2012), “Biogas production potential and kinetics of microwave and conventional thermal pretreatment of grass”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166 (5), 1183–1191.
- [26] Nakagawa H., Sakai M., Harada T., Ichinose T., Takeno K., Matsumoto S., Kobayashi M., Matsumoto K., Yakushido K., (2011), “Biomethanol Production from Forage Grasses, Trees, and Crop Residues”, In: Dos-Santos Bernardes, M.A., Vertiy, Editor, “Biofuel’s Engineering Process Technology”, Intechopen.
- [27] De la Rubia M.A., Fernández-Cegri V., Raposo F., Borja R., (2011), “Influence of particle size and chemical composition on the performance and kinetics of anaerobic digestion process of sunflower oil cake in batch mode”, *Biochemical Engineering Journal*, 58–59 (1), 162–167.
- [28] Gabhane J., Prince William S.P.M., Vaidya A.N., Mahapatra K., Chakrabarti T., (2011), “Influence of heating source on the efficacy of lignocellulosic pretreatment- A cellulosic ethanol perspective”, *Biomass and Bioenergy*, 35 (1), 96–102.
- [29] Singhal Y., Singh R., (2015), “Energy recovery from petha industrial wastewater by anaerobic digestion”, *International Journal of Science and Engineering*, 3 (2).
- [30] Abraham A., Mathew A.K., Park H., Choi O., Sindhu R., Parameswaran B., Pandey A., Park J.H., Sang B.I., (2020), “Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass”, *Bioresource Technology*, 301, 122725.
- [31] Zheng J., Rehmann L., (2014), “Extrusion pretreatment of lignocellulosic biomass: A review”, *International Journal of Molecular Sciences*, 15 (10), 18967–18984.
- [32] Zheng Y., Zhao J., Xu F., Li Y., (2014), “Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production”, *Progress in Energy and Combustion Science*, 42 (1), 35–53.
- [33] Bai X., Lant P.A., Jensen P.D., Astals S., Pratt S., (2016), “Enhanced methane production from algal digestion using free nitrous acid pre-treatment”, *Renewable Energy*, 88, 383–390.

- [34] Karimi K., Tabatabaei M., Horváth I.S., Kumar R., (2015), “Recent trends in acetone, butanol, and ethanol (ABE) production”, *Biofuel Research Journal*, 2 (4), 301–308.
- [35] Taherzadeh M., Karimi K., (2008), “Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review”, *International Journal of Molecular Sciences*, 9 (9), 1621–1651.
- [36] Zhao Y., Wang Y., Zhu J.Y., Ragauskas A., Deng Y., (2008), “Enhanced enzymatic hydrolysis of spruce by alkaline pretreatment at low temperature”, *Biotechnology and Bioengineering*, 99 (6), 1320–1328.
- [37] Zhu J.Y., Pan X.J., (2010), “Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation”, *Bioresource Technology*, 101 (13), 4992–5002.
- [38] Wan C., Zhou Y., Li Y., (2011), “Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility”, *Bioresource Technology*, 102 (10), 6254–6259.
- [39] Chen H., Zhao J., Hu T., Zhao X., Liu D., (2015), “A comparison of several organosolv pretreatments for improving the enzymatic hydrolysis of wheat straw: Substrate digestibility, fermentability and structural features”, *Applied Energy*, 150, 224–232.
- [40] Morone A., Pandey R.A., (2014), “Lignocellulosic biobutanol production: Gridlocks and potential remedies”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 37, 21–35.
- [41] Alriksson B., Cavka A., Jönsson L.J., (2011), “Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents”, *Bioresource Technology*, 102 (2), 1254–1263.
- [42] Jönsson L.J., Alriksson B., Nilvebrant N.O., (2013), “Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification”, *Biotechnology for Biofuels*, 6 (1), 16.
- [43] Jönsson L.J., Martín C., (2016), “Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects”, *Bioresource Technology*, 199, 103–112.
- [44] Sheikh M.M.I., Kim C.H., Park H.H., Nam H.G., Lee G.S., Jo H.S., Lee J.Y., Kim J.W., (2015), “A synergistic effect of pretreatment on cell wall structural changes in barley straw (*Hordeum vulgare* L.) for efficient bioethanol production”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (4), 843–850.

- [45] Song Y., Wi S.G., Kim H.M., Bae H.J., (2016), “Cellulosic bioethanol production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) using hydrogen peroxide-acetic acid (HPAC) pretreatment”, *Bioresource Technology*, 214, 30–36.
- [46] Song Z., Yang G., Guo Y., Zhang T., (2012), “Comparison of two chemical pretreatments of rice straw for biogas production by anaerobic digestion”, *BioResources*, 3223–3236.
- [47] Appels L., Impe J. Van Dewil R., (2012), “Oxidizing Agents and Organic Solvents as Pretreatment for Anaerobic Digestion, in *Biogas Production*”, Mudhoo, A., Editor “*Biogas Production: Pretreatment Methods in Anaerobic Digestion*”, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 199–214.
- [48] Jackowiak D., Bassard D., Pauss A., Ribeiro T., (2011), “Optimisation of a microwave pretreatment of wheat straw for methane production”, *Bioresource Technology*, 102 (12), 6750–6756.
- [49] Liu C.G., Xue C., Lin Y.H., Bai F.W., (2013), “Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations”, *Biotechnology Advances*, 31 (2), 257–265.
- [50] Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., Stroeve P., (2009), “Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production”, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48 (8), 3713–3729.
- [51] Hendriks A.T.W.M., Zeeman G., (2009), “Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass”, *Bioresource Technology*, 100 (1), 10–18.
- [52] Bals B., Wedding C., Balan V., Sendich E., Dale B., (2011), “Evaluating the impact of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment conditions on the cost of ethanol production”, *Bioresource Technology*, 102 (2), 1277–1283.
- [53] Jiang Y., Lv Y., Wu R., Sui Y., Chen C., Xin F., Zhou J., Dong W., Jiang M., (2019), “Current status and perspectives on biobutanol production using lignocellulosic feedstocks”, *Bioresour. Technol. Reports*, 7.
- [54] Nan Y., Yang M., Xin D., Li K., Kuittinen S., Pappinen A., Zhang J., (2019), “Acetone-butanol-ethanol solvents improved enzymatic hydrolysis of pretreated energy grass”, *Fuel*, 245, 406–412.
- [55] Evans P.J., Wang H.Y., (1988), “Enhancement of Butanol Formation by *Clostridium acetobutylicum* in the Presence of Decanol-Oleyl Alcohol Mixed Extractants”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (7).
- [56] Oudshoorn A., Van Der Wielen L.A.M., Straathof A.J.J., (2009), “Assessment of options for selective 1-butanol recovery from aqueous solution”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48 (15), 7325–7336.

- [57] Kamiński W., Tomczak E., Górak A., (2011), “Biobutanol-production and purification methods biobutanol”, *Ecological Chemistry and Engineering*, 18 (1).
- [58] Li Y., Tang W., Chen Y., Liu J., Lee C.F.F., (2019), “Potential of acetone-butanol-ethanol (ABE) as a biofuel”, *Fuel*, 242, 673–686.
- [59] Raganati F., Olivieri G., Procentese A., Russo M.E., Salatino P., Marzocchella A., (2013), “Butanol production by bioconversion of cheese whey in a continuous packed bed reactor”, *Bioresource Technology*, 138, 259–265.
- [60] Gottumukkala L.D., Haigh K., Görgens J., (2017), “Trends and advances in conversion of lignocellulosic biomass to biobutanol: Microbes, bioprocesses and industrial viability”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 963–973.
- [61] Kolesinska B., Fraczyk J., Binczarski M., Modelska M., Berlowska J., Dziugan P., Antolak H., Kaminski Z.J., Witonska I.A., Kregiel D., (2019), “Butanol synthesis routes for biofuel production: Trends and perspectives”, *Materials*, 12 (3).
- [62] Dürre P., (2014), “Physiology and Sporulation in *Clostridium*”, *Microbiology Spectrum*, 2 (4), 315–329.
- [63] Qureshi N., Saha B.C., Hector R.E., Cotta M.A., (2008), “Removal of fermentation inhibitors from alkaline peroxide pretreated and enzymatically hydrolyzed wheat straw: Production of butanol from hydrolysate using *Clostridium beijerinckii* in batch reactors”, *Biomass and Bioenergy*, 32 (12), 1353–1358.
- [64] Ezeji T.C., Qureshi N., Blaschek H.P., (2004), “Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: Reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63 (6), 653–658.
- [65] Prakash A., Dhabhai R., Sharma V., (2015), “A Review on Fermentative Production of Biobutanol From Biomass”, *Current Biochemical Engineering*, 3 (1), 37–46.
- [66] Qureshi N., Blaschek H.P., (2001), “Recent advances in ABE fermentation: Hyper-butanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27 (5), 287–291.
- [67] Qureshi N., Ezeji T.C., Ebener J., Dien B.S., Cotta M.A., Blaschek H.P., (2008), “Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber”, *Bioresource Technology*, 99 (13), 5915–5922.
- [68] Errico M., Sanchez-Ramirez E., Quiroz-Ramírez J.J., Rong B.G., Segovia-Hernandez J.G., (2017), “Multiobjective Optimal Acetone-Butanol-Ethanol Separation Systems Using Liquid-Liquid Extraction-Assisted Divided Wall Columns”, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56 (40), 11575–11583.

- [69] Deshmukh G., Manyar H., (2020), “Production Pathways of Acetic Acid and Its Versatile Applications in the Food Industry, in Acetic Acid-Production and Applications in the Food Industry”, Biomass, 1-11
- [70] Xiao Z., Cheng C., Bao T., Liu L., Wang B., Tao W., Pei X., Yang S.T., Wang M., (2018), “Production of butyric acid from acid hydrolysate of corn husk in fermentation by *Clostridium tyrobutyricum*: Kinetics and process economic analysis”, Biotechnology for Biofuels, 11 (1), 164.
- [71] Manzoor J., Sharma M., Khursheed Wani A., (2018), “Heavy metals in vegetables and their impact on the nutrient quality of vegetables: A review”, Journal of Plant Nutrition, 41 (13), 1744-1763.
- [72] Ozyigit I.I., Dogan I., (2015), “Chapter 9- Plant–Microbe Interactions in Phytoremediation”, Soil Remediation and Plants, 255-285.
- [73] Khalid A.A., Berhan Ahmed G.B., (2018), “Phytoremediation of Pb and Cd contaminated soils by using sunflower (*Helianthus annuus*) plant”, Annals of Agricultural Sciences, 63, 123–127.
- [74] Shrinkhal R., (2018), “Economics, Technology, and Environmental Protection”, Phytomanagement of Polluted Sites, 569-580.
- [75] Rezanian S., Ponraj M., Talaiekhosani A., Mohamad S.E., Md-Din M.F., Taib S.M., Sabbagh F., Sairan F.M., (2015), “Perspectives of phytoremediation using water hyacinth for removal of heavy metals, organic and inorganic pollutants in wastewater”, Journal of Environmental Management, 163, 125–133.
- [76] Ruan T., Zeng R., Yin X.-Y., Zhang S.-X., Yang Z.H., (2016), “Water hyacinth as biofuel feedstock”, BioResources, 11 (1).
- [77] Ma F., Yang N., Xu C., Yu H., Wu J., Zhang X., (2010), “Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth”, Bioresource Technology, 101 (24), 9600–9604.
- [78] Lay C.H., Sen B., Chen C.C., Wu J.H., Lee S.C., Lin C.Y., (2013), “Co-fermentation of water hyacinth and beverage wastewater in powder and pellet form for hydrogen production”, Bioresource Technology, 135, 610–615.
- [79] Bhattacharya A., Sadhukhan A.K., Ganguly A., Chatterjee P.K., (2016), “Dilute acid induced changes on microscopic and tomographic structure of Water Hyacinth [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms] biomass during bioconversion process to xylitol”, Indian Journal of Science and Technology, 9 (6), 1–9.
- [80] Reales-Alfaro J., Ciencia L.T.-D., (2013), “Acid hydrolysis of water hyacinth to obtain fermentable sugars”, Ciencia, Tecnologia y Futuro, 5(2):101-111.

- [81] Ahn D.J., Kim S.K., Yun H.S., (2012), “Optimization of pretreatment and saccharification for the production of bioethanol from water hyacinth by *Saccharomyces cerevisiae*”, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35 (1–2), 35–41.
- [82] Gong Y., Zhou X., Ma X., Chen J., (2018), “Sustainable removal of formaldehyde using controllable water hyacinth”, *Journal of Cleaner Production*, 181, 1–7.
- [83] Keladi Bunting B., Air I., Seramik S., Perawatan A., Rizoturasan S., (2014), “Water Hyacinth Bioremediation for Ceramic Industry Wastewater Treatment-Application of Rhizofiltration System”, *Sains Malaysiana*, 43 (9), 1397–1403.
- [84] Kaur M., Kumar M., Sachdeva S., Puri S.K., (2018), “Aquatic weeds as the next generation feedstock for sustainable bioenergy production”, *Bioresource Technology*, 251, 390–402.
- [85] Baral N.R., Slutzky L., Shah A., Ezeji T.C., Cornish K., Christy A., (2016), “Acetone-butanol-ethanol fermentation of corn stover: Current production methods, economic viability and commercial use”, *FEMS Microbiology Letters*, 363 (6), 1–11.
- [86] Chen M., Zhao J., Xia L., (2009), “Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility”, *Biomass and Bioenergy*, 33 (10), 1381–1385.
- [87] Kootstra A.M.J., Beeftink H.H., Scott E.L., Sanders J.P.M., (2009), “Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw”, *Biochemical Engineering Journal*, 46 (2), 126–131.
- [88] Mukherjee M., Goswami G., Mondal P.K., Das D., (2020), “Biobutanol as a potential alternative to petroleum fuel: Sustainable bioprocess and cost analysis”, *Fuel*, 278, 118403.
- [89] He C.R., Kuo Y.Y., Li S.Y., (2017), “Lignocellulosic butanol production from Napier grass using semi-simultaneous saccharification fermentation”, *Bioresource Technology*, 231, 101–108.

ÖZGEÇMİŞ

Esra MEŞE ERDOĞAN 1990 yılında İstanbul'da doğdu. Kocaeli Üniversitesi'nde Kimya Mühendisliği (2012) ve Çevre Mühendisliği (ÇAP-2014) lisans programlarını başarıyla tamamladıktan sonra Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisansını bitirdi. 2017 yılından bu yana Gebze Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Meşe Erdoğan E., Özkan M., (2020), “Use of Lead Contaminated Water Hyacinth Plant in Biobutanol Fermentation by *Clostridium acetobutylicum* DSM 1732”, ISPEC 9nd International Conference on Engineering & Natural Sciences, 298-303, Ankara, Türkiye, 13-15 Kasım.

Ek B: Besiyeri

Tablo B1.1: Patates besiyeri.

Bileşen	Miktar
Taze patates (yıkayıp püre hale getirilmiş)	200 g
CaCO ₃	2 g
Na-resazurin çözeltisi (%0,1)	0,5 ml
D-glikoz	6 g
L- sistein-HCl.H ₂ O	0,5 g
Distile su	1000 ml