

Biyoyakıt Olarak Bütanol ve Fermantasyonla Üretimi

Ayşe Avcı¹, Sedat Dönmez²

Özet

Son yıllarda artan petrol fiyatları, dünyanın petrol çıkarılan bölgelerindeki süregelen kargaşa ortamı ve fosil yakıt rezervlerinin giderek azalması ile birlikte bunların oluşturduğu sera gazı etkileri yenilenebilir yakıtların üretimi ve kullanımı üzerindeki araştırmaları yoğunlaştırmıştır. Biyolojik olarak sadece bazı *Clostridium* türleri tarafından üretilen bütanol, yüksek enerji içeriği ve düşük koroziflik gibi özellikleri ile fosil yakıtlara alternatif olabilecek en önemli yakıtlardandır. 20. Yüzyılın başlarında endüstriyel olarak uygulanmaya başlayan aseton, bütanol, etanol (ABE) prosesi, 1950'li yıllarda petrokimyasal yolla daha ucuz bütanol üretiminin başlamasıyla kesintiye uğramıştır. Günümüzdeki alternatif yakıt arayışları ile birlikte, ABE fermantasyonu ile üretilen bütanol de yeniden araştırma odağı haline gelmiştir. Bu çalışmada, bütanolün biyoyakıt olarak önemi ve ABE fermantasyonu ile *Clostridium* türlerinden bütanol üretimi derlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aseton, Bütanol, Etanol, ABE, Solvent, Biyoyakıt, *Clostridium*

GİRİŞ

Hızla artan sanayileşme ve motorlu araç kullanımı ile birlikte, petrol bazlı yakıtların kullanımı da artmaktadır. Günümüzde dünyada kullanılan enerjinin %80'i fosil yakıtlardan sağlanmakta ve bunun da %58'i taşımacılıkta kullanılmaktadır (7). Artan fosil yakıt kullanımına bağlı olarak petrol rezervleri hızla azalmakta, sera gazı emisyonları artmakta ve bunun sonucunda küresel ısınma, iklim değişiklikleri, buzulların erimesi, deniz seviyesinin yükselmesi ve biyoçeşitliliğin azalması gibi pek çok olumsuz sonuç ortaya çıkmaktadır. Artan petrol talebi ile birlikte petrol fiyatları da giderek artmakta ve bu da küresel ekonomiyi doğrudan etkilemektedir (10). Bunların yanında dünyada petrol rezervlerinin yoğun olarak bulunduğu bölgelerdeki süregelen savaş ve kargaşa ortamı fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltmak için alternatif, yenilenebilir ve atmosfere zarar vermeyen yeni enerji kaynakları arayışına neden olmuştur (1,11).

¹ Yrd. Doç. Dr., Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Esentepe Kampüsü, 54187, Sakarya. ² Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Dışkapı Yerleşkesi, 06110, Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazar Sedat.Donmez@eng.ankara.edu.tr

Alternatif enerji kaynakları içinde en önemlileri biyomas olarak isimlendirilen çeşitli bitki ve organik atıklardan üretilen etanol, bütanol, metanol, hidrojen, biyodizel gibi sıvı, katı veya gaz formdaki biyoyakıtlardır (10, 41). Günümüzde biyoetanol yakıt olarak benzine çeşitli oranlarda karıştırılarak kullanılmaktadır (7). Ancak etanolün korozif olması, enerji içeriğinin düşük olması, kolay buharlaşabilmesi gibi çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. %85 oranında etanol kullanabilmek için araç motorlarının da modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu olumsuz yönlerinden dolayı, alternatif biyoyakıt olarak biyobütanol üretimine olan ilgi son yıllarda artmıştır (8). Mükemmel yakıt özelliklerine sahip bir kimyasal olan bütanol, benzin ve dizel yakıtlarla etanolden daha iyi karışmaktadır. Enerji içeriği etanolden %25 daha yüksektir; buharlaşma oranı da benzin ve etanolden daha düşüktür. Ayrıca etanole göre çok daha az korozif olduğu için güncel sistemdeki borularla taşınabilmekte ve dağıtılabilmektedir. Buna karşın, oldukça korozif özellikte olan etanolün mevcut taşıma sistemlerinde taşınması mümkün değildir (9, 10, 11).

Biyobütanol *Clostridium*'ların aseton, bütanol ve etanol fermantasyonu ile oluşmaktadır. Kısaca ABE veya solvent olarak da isimlendirilen aseton bütanol ve etanol fermantasyonu, bilinen ve endüstriyel olarak uygulanan en eski fermantasyonlardan biridir (12). Solvent üretme yeteneğine sahip olan mikroorganizmalar *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum* ve *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* gibi *Clostridium*'lar ve bunların alt türleridir (9). Solvent üreticisi *Clostridium*'ların en önemli avantajlarından biri, etanol üreticisi mikroorganizmaların kullanmadığı lignoselülozik yenilenebilir tarımsal atıkların parçalanma ürünleri dahil pek çok şekeri karbon kaynağı olarak kullanabilmeleridir. Yüksek amilolitik aktiviteye sahip olduklarından mayaların aksine nişastalı hammaddeleri ön işlem uygulamasına gerek olmaksızın direkt fermente edebilmektedirler. Pirinç, arpa, buğday samanları, mısır kepeği ve koçanları, kepek gibi lignoselülozik maddeler, mısır, patates, kassava gibi nişastalı substratlar ve melas gibi pek çok yenilenebilir tarımsal ürün ve atıkları ABE üretiminde kullanılabilir (12).

BÜTANOL VE BİYOYAKIT OLARAK ÖNEMİ

Bütanol (bütil alkol, 1-bütanol) molekül formülü $C_4H_{10}OH$ ve molekül ağırlığı 74.14 olan, 4 C'lu, düşük viskoziteli, renksiz, yanıcı ve muz-benzeri kokusu olan primer bir alkoldür (9, 38). Yaygın olarak kullanılan pek çok organik çözücü ile tamamen, ancak su (suda çözünürlüğü 70 g/L) ile daha az karışabilmektedir (9). Önemli bir kimyasal olan bütanolün yıllık üretiminin yaklaşık olarak 5-10 milyon ton olduğu ve önümüzdeki 5 yıl boyunca yıllık üretiminin % 3 dolayında artacağı bildirilmiştir (15).

Bütanol günümüzde, daha çok petrokimyasal hammaddelerden kimyasal yöntemler ile üretilmekte ve üretilen bütanolün çoğu bütilakrilat gibi ester türevlerine dönüştürülerek kullanılmaktadır (38). Endüstride daha çok plastik, asit dayanıklı vernik ve çabuk kuruyan otomobil boyalarının üretiminde kullanılmaktadır. Bütanol ve türevleri ayrıca boya inceltici ve çözücüsü, fren sıvıları, ilaç ve antibiyotik, hormon, vitamin gibi doğal maddelerin üretiminde ekstrakte edici olarak kullanılmaktadır. Bütanolün son yıllarda gündeme gelen yeni ve önemli bir uygulaması, içten yanmalı motorlarda doğrudan veya benzinle çeşitli oranlarda karıştırılarak yakıt olarak kullanılmasıdır (15).

Biyobütanol olarak bilinen bu yakıtın sürdürülebilir enerji probleminin çözümünde yeni nesil biyoyakıt olarak önemli rol oynayacağı düşünülmektedir (38).

Bütanol yenilenebilir enerji kaynağı olarak etanol ile karşılaştırıldığında çok önemli fizikokimyasal avantajlara sahiptir (15). Yakıt olarak düşünüldüğünde bütanol, etanolden daha yüksek enerji değerine sahiptir. Bütanolün enerji içeriği (105.000 BTU/galon) benzinin enerji içeriğine (114.000 BTU/galon) yakındır. Etanolün enerji içeriği (84.000 BTU/galon) ise bütanol ve benzine göre oldukça düşüktür (41).

Bütanolün önemli bir özelliği de benzin ile yüksek oranlarda karışabilmesidir. Buna karşın, etanol benzin ile %10 oranında karıştırılabilmekte; benzine daha yüksek konsantrasyonlarda etanol karıştırabilmek için araç motorlarının modifiye edilmesi gerekmektedir. Günümüzde yapılan çalışmalarda, içten yanmalı motorlar hiç değişiklik yapılmadan sadece bütanol ile çalışabilmektedir. Alternatif yakıt olarak bütanolün tercih edilmesinin diğer bir nedeni de korozyon özelliğinin etanolden çok daha düşük olmasıdır. Etanolün taşınması için özel araçların kullanılması gerekirken, bütanol kurulu boru sistemleriyle taşınabilme özelliğindedir. Ayrıca etanol, bütanolden daha patlayıcı özellikte olduğu için özgün önlemler alınması gerekmektedir (15, 42).

ASETON BÜTANOL ETANOL (ABE) FERMANTASYONU

Tarihçesi

Mikroorganizmalarla bütanol üretimi ilk kez 1861'de Pasteur tarafından keşfedilmiştir. 1912'de Chaim Weizmann *Clostridium acetobutylicum* olarak isimlendirilen ve nişastadan aseton, bütanol ve etanol üreten mikroorganizmayı bulmuştur. Birinci Dünya Savaşı sırasında, İngiltere ABE ile üretilen bütanolden çok asetonla ilgilenmiş ve bu yolla üretilen aseton kordit (dumansız barut) yapımında kullanılmıştır. Potansiyel tarım ürünlerinin fazla olması nedeniyle 1916'da solvent üretim prosesi Kanada'ya transfer edilmiş ve ilk ticari ABE fermantasyon işletmesi Terra Haute, Indiana'da kurulmuştur. Burada üretilen bütanol, bütanol asetata dönüştürülerek vernik yapımında kullanılmıştır (13,14). Birinci Dünya Savaşı sırasında, aseton solvent üretiminde istenen ürün iken, savaş sonrası otomobil endüstrisinin hızla gelişmesiyle bütanol otomobil boyalarında kolay kurumayı sağlayan vernik üretiminde kullanılmaya başlamış ve solvent üretimindeki temel ürün haline almıştır (15). 1936'da Weizmann'ın patent tarihinin sona ermesiyle ABD'de çeşitli ABE fermantasyon işletmeleri kurulmuş ve bu proses etanolden sonra ikinci büyük endüstriyel fermantasyon prosesi olmuştur (14, 38, 39).

1960'ların başında petrokimyasal bütanol üretimi ile rekabet edemediğinden fermantasyon yolu ile bütanol üretimi durmuştur. 1970'lerde ise yaşanan enerji krizi ile birlikte petrokimyasalların fiyatı artmış ve bu da ABE fermantasyonunu yeniden gündeme getirmiştir. 1980 ve 1990'larda genetik sistemlerdeki gelişmeler ile solvent üreticisi *Clostridium*'larda da yeni suşlar geliştirilerek fermantasyon karakterlerinin iyileştirilmesi yönünde önemli gelişmeler kaydedilmiştir (39, 40).

Günümüzde fermantasyon yöntemi ile bütanol üretimi sadece Çin'de yapılmaktadır. Halen çalışmakta olan 11 ABE işletmesinin yıllık toplam üretiminin 210.000 ton olduğu; bunlara ek olarak yıllık 800.000 ton kapasiteli yeni işletmelerin de yapımının

sürdüğü ve birkaç yıl içinde yıllık toplam bütanol üretiminin 1.000.000 ton olacağı bildirilmiştir (14, 15).

Çin'in dışında, çeşitli şirketler de yenilenebilir biyomastan bütanol üretimi için projeler yapmışlardır. Biyoyakıt üretimindeki en büyük iki şirket olan BP ve DuPont 2006'da biyobütanol prosesi geliştirmek ve üretmek amacı ile ortaklık kurduklarını açıklamış ve İngiltere'de British Sugar'a ait bir etanol fabrikasını modifiye ederek yılda 30.000 ton bütanol üreteceklerini bildirmişlerdir. BP ve DuPont 2008'deki test sonuçlarında, bütanolün benzinle %10'un üzerinde karıştırılabileceğini ve bunun araçların performansını etkilemediğini bildirmişlerdir. Ticari müşteriler için kültür ve proses geliştirme hizmeti veren ButylFuel, Cathay, Industrial Biotech, Cobalt Biofuels, Green Biologics, Metabolic Explorer, Tetravite Bioscience gibi çeşitli şirketler bulunmaktadır (15, 39).

ABE üreten mikroorganizmalar

Bilinen bütün mikroorganizmalar içinde ABE fermantasyonu yapan tek canlılar *Clostridium*'lardır (12, 38, 39). *Clostridium*'lar fizyolojik ve genetik olarak çok farklı türleri (hem patojen hem de patojen olmayan) içeren, çoğunlukla Gram pozitif, uzun çubuk şeklinde, terminal endosporlar oluşturan zorunlu anaerobik mikroorganizmalardır. Patojen olmayan türler ABE üreticisi oldukları için endüstriyel öneme sahiptirler (16). Genellikle toprak ve insan ve hayvanların barsak sistemlerinde bulunan *Clostridium*'lar çok çeşitli ekstraselüler enzimler de üretebilmektedirler (17).

Pentozlar ve hegzosların yanında nişasta, selüloz ve hemiselüloz gibi polisakkaritleri de fermente edebilme yeteneğinde olan *Clostridium*'ların fermantasyon ürünleri isopropanol, bütirik asit, asetik asit, bütanol, aseton, etanol'dür (9, 17). ABE fermantasyonu yapan bakteriler solventojenik *Clostridium*'lar olarak isimlendirilmektedir. Solventojenik olduğu bilinen 5 *Clostridium* türü bulunmaktadır. Bunlar, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. saccharobutylicum* ve *C. ljungdahlii*'dir (18). *Clostridium*'lar gelişmek ve solvent üretmek için maya özütü gibi kompleks azotlu bileşiklere gereksinim duyarlar. Ayrıca bütanol ve etanol üretebilmek için yüksek redoks potansiyeline de ihtiyaçları vardır (9).

20. yüzyılın başında ABE fermantasyonun keşfedilmesi ve endüstriyel olarak üretilmesiyle çeşitli solventojenik *Clostridium*'lar izole edilmiş ve patentleri alınarak; solvent üretme özelliklerine göre *C. acetobutylicum* ve *C. beijerinckii* adı altında sınıflandırılmıştır. Ancak son 30 yılda solvent üretimine ilginin artmasıyla bu mikroorganizmaların biyotiplendirme, DNA parmakizi, piroliziz kütle spektroskopisi, 16S rRNA dizi analizi, DNA-DNA hibridizasyonu gibi filogenetik yöntemlerle sınıflandırılması üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır (19).

Keis ve ark. (20), 17 endüstriyel suş ve çeşitli kültür koleksiyonlarından (ATCC-American Type Culture Collection, DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, NCIMB-National Collection of Industrial and Marine Bacteria, NRRL-Northern Utilization Research and Development Division) sağladıkları 38 farklı solventojenik *Clostridium* türünü biyotiplendirme ve DNA parmak izlerine göre sınıflandırarak 9 gruba ayırmışlardır. Daha sonra aynı mikroorganizmaları 16S rRNA

dizilimlerine sınıflandırarak bunların 4 farklı taksonomik grup adı altında sınıflandırılabilceğini belirtmişlerdir.

1.grup: Biyotiplendirme ve DNA parmakizi analizlerine göre amilolitik *C. acetobutylicum* suşları birinci taksonomik grubu oluşturmaktadır. Bu gruptaki *Clostridium*'lar Weizman endüstriyel prosesinde kullanılan ve nişasta bazlı substratlardan solvent üreten mikroorganizmalardır. *C. acetobutylicum* ATCC 824 (DSM 792;NRRL B527), *C. acetobutylicum* ATCC 4259 (DSM 1731;NCIMB 619;NRRL B530), *C. acetobutylicum* DSM 1732, *C. acetobutylicum* NCIMB 2951, *C. acetobutylicum* ATCC 3625(DSM 1737; RRL B529), *C. acetobutylicum* ATCC 862, *C. acetobutylicum* ATCC 43084 ve mutant *C. acetobutylicum* ATCC 39326 bu grubu oluşturmaktadır.

2.grup: Bu grupta sakkarolitik *C. acetobutylicum*'lar bulunur. *C. acetobutylicum* NCP 262 ve 1945-1983 yılları arasında Güney Afrika'da solvent üretiminde kullanılan diğer NCP türleri bu gruptadır. Ayrıca 1946'da solvent üreten bir Amerikan firması tarafından *C. saccharo-butyl-acetonicum-liquefaciens* olarak isimlendirilen ve NRRL kültür koleksiyonunda *C. acetobutylicum* NRRL B643 olarak bulundurulmuş ve o yıllarda ABD, İngiltere ve Güney Afrika'da pek çok işletmede üretimde kullanılan *Clostridium*'lar bu gruba dahil edilmiştir. Sonuç olarak, 2. Taksonomik grup orijinal endüstriyel sakkarolitik solvent üreticisi suşlardan oluşmaktadır.

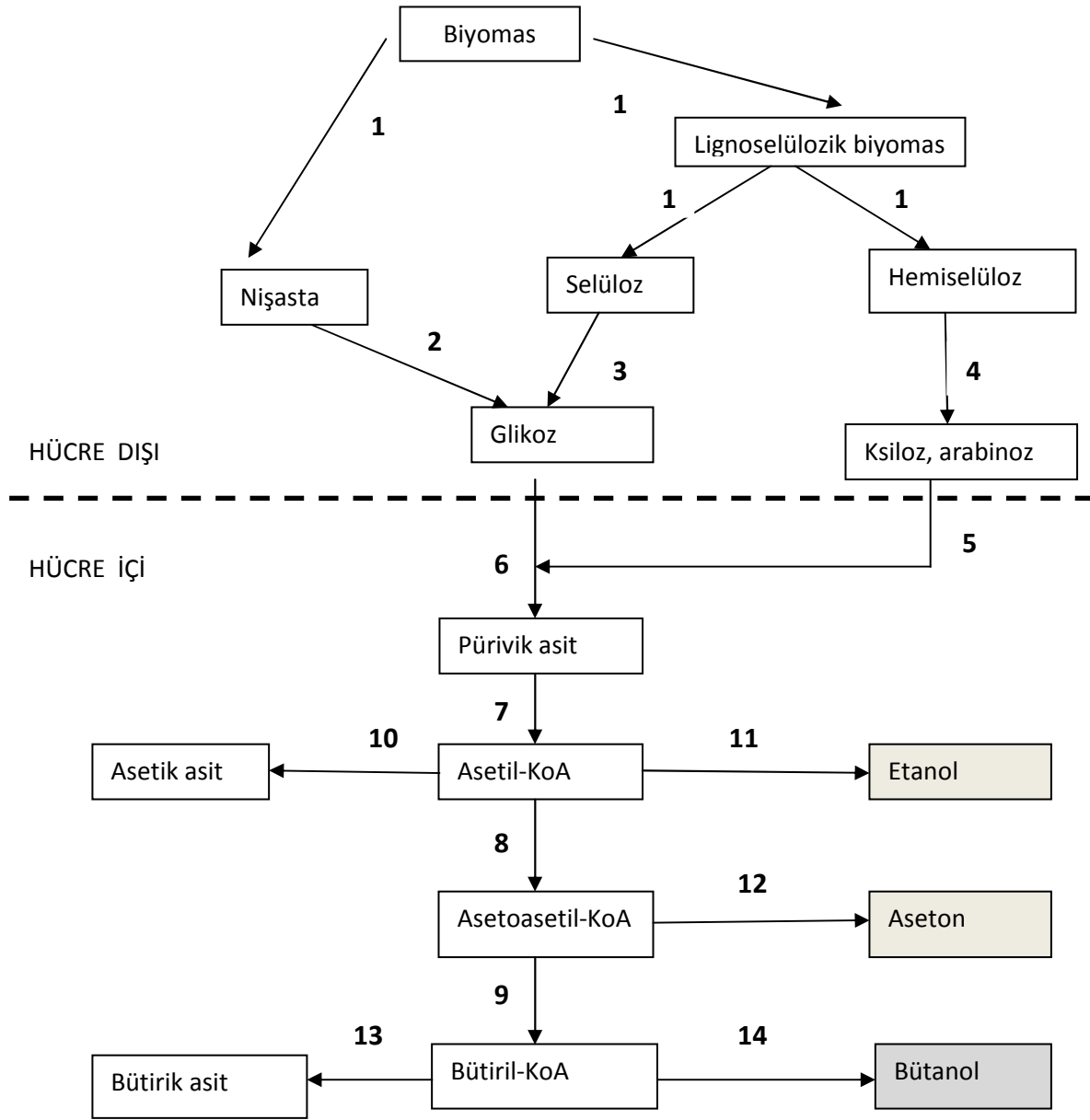
3.grup: Biyotiplendirme ve DNA parmakizi analizlerine göre yapılan sınıflandırmada *Clostridium saccharoperbutylaceticum* suşları bu gruba dahil edilmişlerdir. 1959 yılında, Japonya'da izole edilmiş bir *Clostridium saccharoperbutylaceticum* N1-4 (ATCC 13564) suşu ve bu suşun faj dirençli bir mutanlığı olan N1-504 (ATCC 27022) suşları da bu grup içerisindedir.

4.grup: Bu grup 4 taksonomik grup içindeki en geniş gruptur. Bazı endüstriyel NCP suşları, *C. acetobutylicum* (NCIMB 8052, NCIMB 6444, NCIMB 6445, NRRL B597, NRRL B596), *C. acetobutylicum* NCIMB 8049 (DSM 1738; ATCC 101132; NRRL B594), *C. acetobutylicum* ATCC 39058 ve bunun mutanlığı suşu *C. acetobutylicum* ATCC 39057, *C. beijerinckii* (NRRL B593, NRRL B592, NRRL B466) bu grubun üyeleridir. Bunların yanında *C. propyl-butylicum*, *C. viscifaciens*, *C. amylo-saccharobutyl-propylicum* adı altında patenti alınmış olan suşların da *C. beijerinckii*'ye benzediği bildirilmiştir (20).

***Clostridium*'LARIN ABE FERMANTASYONU**

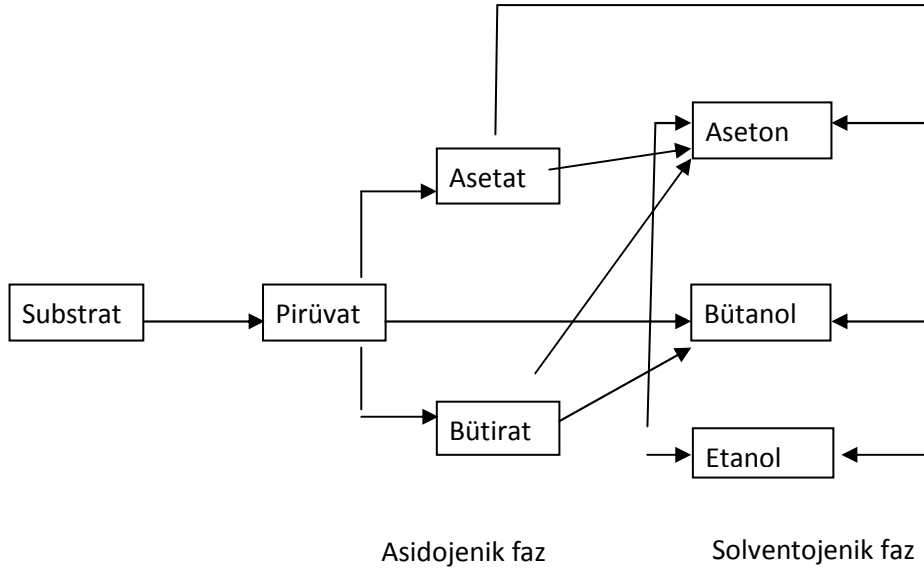
Clostridium'lar polimerik karbonhidratları monomerlerine parçalayan α -amilaz, β -amilaz, β -glukozidaz, glikoamilaz, pullulanaz ve amilopullulanaz gibi pek çok enzim üretebilirler. Bu enzimler ile üretilen monosakkaritler hücrenin membran transport sistemi tarafından hücre içine alınır ve glikoliz veya pentoz fosfat yolu ile metabolize edilirler (21). Şekil 1'de Solventojenik *Clostridium*'ların izyolları ve görev alan enzimler gösterilmiştir. Hegsozlar, EMP (Embden Meyerhof Parnas) izyolu ile parçalanarak 2 mol pürivik asit, 2 mol ATP ve 2 mol NADH oluşur. Pentozlar ise PP (pentoz fosfat) yolu ile parçalanarak fruktoz -6-fosfat ve gliseraldehit-3-fosfata dönüştürülür; oluşan bu ürünler EMP yoluna girerek pirüvata dönüştürülür. Bu yolda, 3 mol pentozdan 5 mol ATP ve 5 mol NADH oluşur. Oluşan pirüvat, Koenzim A (KoA) varlığında, ferrodoksin oksidoredüktaz enzimi ile reaksiyona girerek CO₂, aseti-KoA

ve indirgenmiş ferrodoksin oluşur (13). Burada oluşan asetil KoA, solvent (aseton, bütanol, etanol) ve asit (asetik asit, bütirik asit) üretimindeki temel ara üründür (12).



Şekil 1. Solvent üreticisi *Clostridium*'ların metabolik yollarının basit gösterimi. 1, Nişastalı ve lignoselülozik biyomasın ön işlemleri; 2, nişasta hidrolizi (α -amilaz, β -amilaz, pululanaz, glikoamilaz, α -glikozidaz); 3, selülozun hidrolizi (selülaz, β -glikozidaz); 4, hemiselülozun hidrolizi (arabinofuranose, ksilopiranoz, galaktopiranoz); 5, Ksiloz/arabinozun hücreye alımı ve pentoz fosfat yolu ile fruktoz -6 fosfat ve glisetaldehit-3-fosfat üretimi ve sonrasında Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolu ile pirüvat oluşumu; 6, Glikozun fosfotransferaz sistemi ile hücre içine alımı ve EMP yolu ile glikoza dönüşümü; 7, pürivat-ferrodoksin oksidoredüktaz; 8, tiyolaz; 9, 3-hidroksibütiril-KoA dehidrogenaz, krotonaz ve bütiril-KoA dehidrogenaz; 10, fosfat asetiltransferaz ve asetat kinaz; 11, asetaldehit dehidrogenaz ve alkol dehidrogenaz; 12, asetoasetil KoA:asetat/bütirat:KoA transferaz ve asetoasetat dekarboksilaz; 13, fosfat bütiriltransferaz ve bütirat kinaz; 14, bütiraldehit dehidrogenaz ve bütanol dehidrogenaz. Qureshi ve ark.(21)'dan derlenmiştir.

Asetil KoA vasıtasıyla gerçekleşen karbon akışı ile Şekil 1'de görüldüğü gibi, asit veya solventlerin oluştuğu farklı biyokimyasal reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Buna göre, solvent üretim izyolu asidojenik ve solventojenik faz olarak ikiye ayrılmıştır (9). Asetil KoA ile birlikte asetoasetil KoA ve bütiril KoA'nın da, asit veya solvent üretiminin gerçekleşmesinde rol oynayan anahtar ara ürünler olduğu belirlenmiştir (13). Asidojenik faz, birinci fazdır ve gelişmenin logaritmik fazında gerçekleşir. Burada, asetik asit ve bütirik asitin yanında yüksek oranlarda CO₂ ve H₂ üretilir (9). Bu fazda, mikroorganizmalar yüksek oranda ATP üretimi nedeniyle logaritmik olarak çoğalmakta ve asit oluşumu ile ortamın pH'sı 5.0'in altına düşmektedir. Asitliğin artması ile birlikte, mikroorganizmaların metabolizması değişir ve asidojenik fazda oluşan asitler asimile edilerek solvent üretiminin gerçekleştiği solventojenik faz başlar (Şekil 2) (12, 22). Son 20 yıldır, çok çeşitli çalışmalar yapılmasına karşın, *Clostridium*'ların, asidojenik fazdan solventojenik faza geçiş mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır (12). Ancak, asidojenik fazın sonunda solventojenik enzimlerinin indüklendiği ve asidojenik enzimlerinin aktivitesinde ise azalma oluştuğu belirlenmiştir (12, 23). Asidojenik fazdan solventojenik faza geçişte gen ekspresyon motifinin önemli oranda değiştiği belirtilmiştir (9, 24).



Şekil 2. *Clostridium*'ların ABE fermantasyonunda asidojenik ve solventojenik fazlarda ara metabolitlerin dönüşümünün şematik gösterimi. Qureshi ve Ezeji (12)'den derlenmiştir.

Solventojenik fazda ortamın pH'sı tekrar yükselmekte, ortamdaki solvent miktarı arttıkça mikroorganizmalar solvent üretme yeteneklerini kaybederek endospor oluşturmaya başlamaktadır. Solventojenik mikroorganizmaları endüstriyel üretimler için sürekli olarak 70 °C sıcaklık uygulanan spor süspansiyonlarından hazırlanan taze kültürlerle çalışmak gerekmektedir (23).

ENDÜSTRİYEL SOLVENT ÜRETİM KOŞULLARI

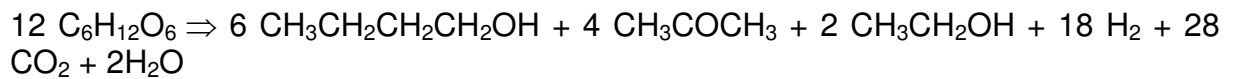
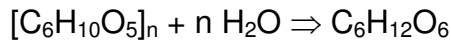
Bütanol, genellikle kesikli fermantasyonla üretilmekte ve oluşan ürün distilasyon yolu ile kazanılmaktadır. Tipik bir kesikli sistem 60 g/L substrat konsantrasyonu ile başlatılmakta ve substrat olarak genellikle melas, mısır nişastası ve glikoz

kullanılmaktadır. Uygun substrat ve diğer besin maddelerinin ilavesi ile hazırlanan besiyeri 121 °C'de sterilize edildikten sonra azot ve CO₂ gazı atmosferinde fermantasyon sıcaklığına kadar soğutulup aktif kültür ile inoküle edilerek fermantasyon başlatılır (12). Kesikli fermantasyonun tamamlanması fermantasyon koşullarına ve kullanılan substratın çeşidine bağlı olarak 2-6 gün sürmekte; fermantasyon sonunda 12-20 g/L solvent oluşmaktadır. Oluşan ürün genellikle distilasyonla alınmaktadır (9, 12).

ABE fermantasyonundaki en önemli sorunlardan biri ortamda biriken bütanolün mikroorganizmalara toksik etki yapmasıdır. Bütanol konsantrasyonu 5-10 g/L'ye ulaştığında başlayan bu durum, fermantasyonda kullanılacak substrat konsantrasyonunu ve üretilecek solvent miktarını sınırlamaktadır (9). Bütanolün toksik etkisinden dolayı kesikli fermantasyonlarda verimliliğinin düşük olduğu ve hücre konsantrasyonunun 3-4 g/L'nin üzerine çıkamadığı belirlenmiştir (12,25). Günümüzde genetik modifikasyonlarla *Clostridium*'ların bütanol toleransının arttırmak mümkündür. *C. beijerinckii* 8051'in kimyasal mutajenlerle yüksek bütanol konsantrasyonlarına toleranslı *C. beijerinckii* BA101 olarak isimlendirilen mutant suşu ile kesikli fermantasyonla 23 g/L bütanol konsantrasyonuna ulaşılacağı saptanmıştır (8).

Çin'de faaliyet gösteren ve mısırdan sürekli fermantasyonla ABE üreten bir işletmenin yıllık solventin tonu başına hammadde ve enerji tüketimi şu şekilde açıklanmıştır: 4-4.5 ton mısır, 13-25 ton buhar, 20-30 ton su, ve 700-1000 kwh elektrik. 100 kg mısırdan 11 kg aseton, 22.5 kg bütanol ve 2.7 kg etanol, ayrıca 36 m³ CO₂ ve 24 m³ H₂ ve yan ürün olarak da mısır embriyosu, fuzel yağlar vb oluşmaktadır. Fermantasyon sırasında oluşan CO₂ ve H₂ gazları ortamdaki ayrılıp sıkıştırılarak çeşitli endüstriyel amaçlarla kullanılmak üzere satılabilmektedir. Distilasyon sonrasında kalan atık maddeler şekerler, protein, vitamin, organik asitler gibi önemli oranda besin maddeleri içerdiklerinden hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir (15).

Endüstriyel ABE fermantasyonlarında asıl ürünler yanında isopropanol, isopentanol, asetik asit, bütirik asitler gibi yan ürünler de oluşmaktadır. Bu ürünlerin oranları büyük ölçüde kullanılan hammadde ve mikroorganizmaya bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Çin'de teknik hesaplamalarda kolaylık sağlaması için, mısırdan ABE fermantasyonu ile ürün oluşumunda aşağıdaki stokiyometrik eşitlikten yararlanılmaktadır (15).



Solvent üretiminde kullanılan substratlar

Fermantasyon endüstrisinde genellikle ucuz ve kolay bulunabildiğinden nişastalı hammaddeler kullanılmaktadır (11). Güney Afrika'da ABE üretiminde 1980'lere kadar şeker kamışı melası kullanılmıştır. Mısır, darı, buğday, pirinç, tapyoka, soya melası ve patates de bütanol üretiminde substrat olarak kullanılmıştır. *Clostridium*'lar güçlü

amilolitik etkiye sahip oldukları için ABE üretiminde nişastalı substratlar herhangi bir ön işleme gerek olmaksızın başarı ile kullanılabilir (12, 38, 39).

Mısır ıslatma şurubu, mısırın yaş öğütmesi sırasında açığa çıkan yan üründür. Endüstriyel boyutlarda bu yan ürün evaporasyonla %50 oranında kuru maddeye kadar çıkarılarak hayvan yemi olarak satılmaktadır. Mısır ıslatma suyu, ABE fermantasyonunun yanında mayalarla etanol üretiminde de mikroorganizmalar için azot kaynağı olarak kullanılmaktadır (26, 27).

Kassava, özellikle Afrika, Asya ve Latin Amerika'nın tropik bölgelerinde yaygın olarak yetişen nişasta içeriği yüksek bir bitkidir. Kassava kalitesiz topraklarda ve zor iklim koşullarında yetişebilmekte, düşük maliyetli üretimi ve yüksek nişasta içeriğinden dolayı ABE üretiminde kullanılabilir potansiyel substratlardan biri olarak değerlendirilmektedir (28).

Lignoselülozik tarımsal ürünler yeryüzünde en bol bulunan maddelerden olup tarımsal atıklar (tahıl samanları, pirinç samanları, mısır koçanı, sapları ve kepeği) ve orman atıkları (odun atıkları, kağıt endüstrisi atıkları) gibi çeşitli hammadde gruplarını içermektedir (29,30,31). Lignoselülozik ürünler yaklaşık olarak % 40-50 selüloz, %25-30 hemiselüloz, %15-20 lignin içerirler. Ayrıca iz miktarlarda çeşitli mineraller, yağ, çözünen şekerler ve diğer maddeler bulunmaktadır (32).

Lignoselülozik maddelerden mısır yaprağı, buğday ve arpa samanı, odun, tek yıllık üretilen çeşitli bitkilerin atıkları ve atık kâğıtlar gibi yan ürünlerden biyoyakıt üretimi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (33). Lignoselülozik hammaddeler ekonomik olmakla birlikte mikroorganizmalar tarafından fermente edilebilmesi için önce asit veya baz uygulaması ve sonra da enzimlerle fermente edilebilir şekerlere parçalanması gerekmektedir. Önce, lignoselülozik maddeler yüksek sıcaklıkta seyreltik asit veya baz içeren ortamlarda bekletilerek lignin-karbonhidrat tabakasının kırılması sağlanır. Bu uygulamadan sonra enzimlerle fermente edilebilir şekerlere parçalanır (33, 34, 35). Asitlerle ön işlem uygulaması genellikle seyreltik sülfürik asit (50-300 mM) varlığında 100-200 °C sıcaklıklarda yapılmaktadır (34). Bu işlem sırasında genellikle furfural, hidrosimetil furfural (HMF), asetik asit, ferulik asit, glukronik asit, p-kumarik asit, çeşitli fenolik bileşikler ve tuzlar gibi kimyasal yan ürünler oluşmakta ve hücre gelişmesi ve fermantasyonu olumsuz etkilemektedirler (33,35). İnhibitör maddelerin uzaklaştırılmasında iyon değiştirici reçineler, kalsiyum karbonat ve peroksidad enzimleri kullanılabilir. Ayrıca inhibitör maddelere dirençli rekombinant suşların kullanımı ile de bu sorunun çözülebileceği bildirilmiştir (43).

SONUÇ

Biyoyakıt olarak kullanılabilir en önemli alternatif kimyasallardan olan bütanol, *Clostridium*'lar ile nişastalı ve lignoselülozik maddeler dahil pek çok yenilenebilir tarımsal hammaddelerden üretilmektedir. Ancak, verimliliği düşürerek maliyeti arttıran en büyük dezavantaj olan bütanolün mikroorganizmaya toksik etkisi gibi dezavantajları günümüzde endüstriyel üretimini kısıtlamaktadır. Genetik mühendisliği yöntemleri ile sorunların önemli oranda giderilebileceği belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu derleme çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen 107 O 428 no'lu proje çalışması kapsamında hazırlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Naik, S.N., Goud, V.V., Rout P.K., Dalai A.K. 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:578-597.
2. Zah R., Ruddy T.F. 2009. International trade in biofuels: an introduction to the special issue. *Journal of Cleaner Production* 17: S1-S3.
3. Ponton, J.W. 2009. Biofuels: Thermodynamic sense and nonsense. *Journal of Cleaner production* 17:896-899.
4. Kretschmer, B., Narita D., Peterson S. 2009. The economic effect of the EU biofuel target. *Energy Economics* 31:S285-S294.
5. Chen, H., Qiu, W. 2010. Key Technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnology Advances* 28:556-562.
6. Qureshi, N., Saha B.C., Hector, R.E., Hughes, S.R., Cotta, M.A. 2008. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I-batch fermentation. *Biomass and Bioenergy* 32:168-175.
7. Escobar, J. C., Lora, E.S., Venturini, O.J., Yanez E.E., Castillo E.F., Almazan. 2009. Biofuels: Environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 13:1275-1287.
8. Qureshi, N., Blaschek, H.P. 2000. Economics of butanol fermentation using hyperbutanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. *Trans IChemE* 78(Part C)139-144.
9. Lee, S.Y., Park J.H., Jang, S.H., Nielsen, L.K., Kim, J., Jung, K.S. 2008. Fermentative Butanol Production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*. 101(2)209-228..
10. Nigam, P.S., Singh, A. 2010. Production of biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science* 37(11)52-68.
11. Thang, V.H., Kanda, K., Kobayashi, G. 2010. Production of acetone-butanol-ethanol (ABE) in direct fermentation of cassava by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 161:157-170.
12. Qureshi, N., Ezeji, T.C. 2008. Butanol, “a superior biofuel” production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefinery* 2:319-330.
13. Jones, T.D., Woods, D.R. 1986. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbial Reviews*. 50(4) 484-524.
14. Ezeji, T., Qureshi, N., Blaschek, H. P. 2004. Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations. *The chemical Record* 4:305-314.

15. Ni, Y., Sun, Z. 2009. Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83:415-423.
16. Ezeji, T., Blaschek, H.P. 2008. Fermentation of dried distillers grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value added products by solventogenic clostridia. *Bioresource Technology* 99:5232-5242.
17. Virunanon, C., Chantaropamai, S., Denduangbaripant, J. Chulalaksananukul, W. 2007. Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal track. *Anaerobe* 14(2)109-117.
18. Berezina, O.V., Sineoky, S.P., Velikodvorskaya, G.A., Schwarz, W., Zverlou, V.V. 2008. Extracellular glycosyl hydrolase activity of the *Clostridium* strains producing acetone, butanol and ethanol. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 44(1)42-47.
19. Keis, S., Shaheen, R., Jones, D.T. 2001. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp.nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:2095-2103.
20. Keis, S S., Bennett, C.F., Ward, V.K., Jones D.T. 1995. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing Clostridia. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45(4)693-705.
21. Ezeji, T., Qureshi, N., Blaschek, H.P. 2007. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology* 18:220-227.
22. Hipolito, C.N., Crabbe, E., Badillo, C.M., Zarrabal, O.C., Mora, M.A.M., Flores, G. P., Cortazar, M.A.H., Ishizaki, A. 2008. Bioconversion of industrial wastewater from palm oil processing to butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). *Journal of cleaner production* 16:632-638.
23. Kashket, E.R., Cao, Z.Y. 1993. Isolation of a degeneration resistant mutant of *Clostridium acetobutylicum* NCIMB 8052. *Applied and Environmental Microbiology* 59(12)4298-4202.
24. Dürre, P. 1987. New insights and novel developments in clostridial acetone/ butanol/ isopropanol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49(6) 639-648.
25. Kharkwal, S., Karimi, I.A., Chang, M.W., Lee, D.Y. 2009. Strain Improvement and Process Development for Biobutanol Production. *Recent Patents on Biotechnology* 3:202-210.
26. Parekh, M., Formanek, J., Blaschek, H.P. 1999. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low-cost fermentation medium based on corn steep water. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51:152-157.
27. Kadam, K.L., Newman, M.N. 1997. Development of a low-cost fermentation medium for ethanol production from biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47:625-629.
28. Gu, Y., Hu, S., Chen, J., Shao, L., He, H., Yang, S., Jiang, W. 2009. Ammonium acetate enhances solvent production by *Clostridium acetobutylicum* EA 2018 using cassava as fermentation medium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36:1225-1232.

29. Del Compo, I., Alegr, I., Zazpe, M., Echeverr, M., Echeverr, I. 2006. Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for bioethanol production. *Industrial Crops and Products* 24: 214–221.
30. Liu, J., Wu, M., Wang, M. 2009. Simulation of the process for producing butanol from corn fermentation. *Industrial Engineering and Chemical Research* 48:5551-5557.
31. Liu, Z., Ying, Y., Li, F., Ma, C., Xu, P. 2010. Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37:495–501.
32. Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment Technologies. *Bioresource Technology* 96:1959–1966.
33. Ezeji, T., Qureshi, N., Blaschek, H. P. 2007. Butanol production from agricultured residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 97(6)1460-1469.
34. Kootsra, A.M., 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* 46:126-131.
35. Qureshi, N., Saha, B.C., Dien, B., Hector, R.E., Cotta, M.A. 2010. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I: use of barley straw hydrolysate. *Biomass and Bioenergy* 34:559-565.
36. Huang, H., Liu, H. and Gan, YR. 2010. Genetic modification of critical enzymes and involved genes in butanol biosynthesis from biomass. *Biotechnology Advances*, 28:651-657.
37. Pfromm, P.H., Amanor-Boadu, V., Nelson, R. and Vadlani, P. 2010. Bio-butanol vs. bio-ethanol: A technical and economical assessment for corn and switchgrass fermented by yeast or *Clostridium*. *Biomass and Bioenergy*, 34:515-524.
38. Dürre, P. 2008. Fermentative butanol production. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125:353-362.
39. Kumar, M. and Gayen, K. 2011. Developments in biobutanol production: New Insights. *Applied Energy*. 88:1999-2012.
40. Demain, A.L. 2009. Biosolutions to the energy problems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36:319-332.
41. Demirbaş, A. 2008. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management* 49: 2106-2116.
42. Formanek, J., Mackie, R., and Blaschek H.P. 1997. Enhanced butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 grown in semidefined P2 medium containing 6 percent maltodextrin or glucose. *Applied and Environmental Microbiology* 63(6) 2306-2310.
43. García, V., Pääkilä, J., Ojamo, H., Muurinen, E., Keiski, R.L. 2011. Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency? *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15:964-980.