ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATATESTEN BÜTANOL ÜRETİMİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Aybike BEREKETOĞLU

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2010

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PATATESTEN BÜTANOL ÜRETİMİ
ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Aybike BEREKETOĞLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ

Bu çalışmada, bazı *Clostridium* türleri ile patatesten aseton, bütanol, etanol üretimi araştırılmıştır. Çalışmalarda *C. beijerinckii* DSM 6422, *C.acetobutylicum* DSM 6228, DSM 1731, DSM 792 suşları ve patatesten izole edilerek 16S rRNA dizisine göre *Clostridium* roseum olduğu anlaşılan suşlar kullanılmıştır.

Karbon kaynağı olarak farklı besiyeri oranlarında (50, 100, 200, 300 ve 400 g patates/L), farklı pH değerlerinde (pH 5, 6, 7, 8, 9 ve 10), farklı inkübasyon sıcaklıklarında (30, 33 35, 37 ve 39 °C) ve farklı katkılar eklenerek hazırlanan besiyerinde beş farklı *Clostridium* suşunun bütanol ve toplam solvent üretim miktarları belirlenmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuclarda *C. acetobutylicum* DSM 6228 suşu ile 400g patatesli ortamda ve 37°C sıcaklıkta 15.02 g/L bütanol ve 22.65 g/L toplam solvent ürettiği saptanmıştır. Aynı besiyerine 1 g sistein-HCl ve 2.5 g glikoz ilavesi ile *C. acetobutylicum* DSM 792 suşunun bütanol üretiminde % 74.80' lik artış sağlanarak 8.07 g/L bütanol elde edilmiştir.

Patates besiyerine ilave edilen $(NH_4)_2SO_4$, sistein-HCl, K_2HPO_4 ve maya özütü toplam solvent oluşumunu artırırken, $CaCO_3$ ve $FeSO_4$ ilavesinin toplam solvent oluşumunu azalttığı belirlenmiştir.

Aralık 2010, 66 sayfa

Anahtar Kelimeler: Patates, aseton, bütanol, etanol, anaerobik fermentasyon, solvent

ABSTRACT

Master Thesis

THE STUDY ON BUTANOL PRODUCTION FROM POTATO

Aybike BEREKETOĞLU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ

In this study, butanol (acetone butanol ethanol or ABE) was produced from potato in batch cultures using five different *Clostridium* sp. strains. High butanol production and growth was determined at 400 $g.l^{-1}$ potato concentration and 37°C temperature for *Clostridum* sp. strains. The optimal pH for acetone-butanol-ethanol fermentation were found 7 for *Clostridum acetobutylicum* DSM 1731 and *Clostridium roseum*, 9 for *Clostridium acetobutylicum* DSM 792, DSM 6228 and *Clostridium beijerinckii* DSM 6422 strains.

In a conducted experiment, where potato (75.45 $g.l^{-1}$ total sugar obtained from hydrolysis of 400 $g.l^{-1}$ potato) was used, *C.roseum, C.beijerinckii* DSM 6422, *C.acetobutylicum* DSM 6228, *C.acetobutylicum* DSM 1731 and *C.acetobutylicum* DSM 792 produced 6.18 $g.l^{-1}$ butanol with a productivity 0.14 g/g, 6.32 $g.l^{-1}$ butanol with a productivity 0.17 g/g, produced 10.27 $g.l^{-1}$ butanol with a productivity 0.19 g/g, 7.84 $g.l^{-1}$ butanol with a productivity 0.13 g/g and 8.27 $g.l^{-1}$ butanol with a productivity 0.17 g/g, respectively.

The effect of the component concentrations of a synthetic medium on ABE fermentation by *Clostridium* strains was also investigated. As a result of this study, when 1$g.l^{-1}$ cysteine- HCl and 2.5 $g.l^{-1}$ glucose were added into fermentation medium, growth and ABE production of *Clostridium* sp. strains increased significantly. Butanol production of *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 increased by 74.80% (from 4.62 $g.l^{-1}$ to 8.07 $g.l^{-1}$) as compared to plain medium. The presence of $CaCO_3$ and $FeSO_4$ in fermentation medium total solvent production was inhibited while the presence of $(NH_4)_2SO_4$, cysteine-HCl, K_2HPO_4 and yeast extract induced the total solvent production.

In conclusion, this study demonstrates that *C.acetobutylicum* DSM 6228 strain has excellent capacity to convert biomass derived sugars to solvents and can produce over 15.07 $g.l^{-1}$ (in one case 22.65 $g.l^{-1}$) ABE from potato.

December 2010, 66 pages

Key Words: Potato, acetone, butanol, ethanol, anaerobic fermentation, solvent

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, yakın ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sedat Dönmez'e (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı) ve Yrd. Doç. Dr. Ayşe Avcı'ya (Sakarya Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı) her zaman destekçim olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aybike BEREKETOĞLU

Ankara, Aralık 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **vii**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **3**
2.1 Bütanol Üretimi **3**
2.1.1 Mikroorganizma seçimi **4**
2.1.2 Hammadde seçimi **5**
2.1.3 Biyokimya ve Fizyoloji **8**
2.1.3.1 Solvent üretim iz yolu **8**
2.1.3.2 Şeker taşınımı **12**
2.2 Solvent Üretimini Etkileyen Faktörler **13**
2.2.1 Ortam pH'sı **13**
2.2.2 Sıcaklık **15**
2.2.3 Bütanolün toksik etkisi **16**
2.2.4 Besin kaynağındaki sınırlamalar **17**
2.2.5 Kültür dejenerasyonu **18**
2.2.6 Endospor oluşumu **20**
2.2.7 Hücre içi pH **21**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **22**
3.1 Materyal **22**
3.1.1 Mikroorganizmalar **23**
3.1.2 Kullanılan besiyerleri **23**
3.1.3 Besiyeri sterilizasyonu **24**
3.2 Yöntem **24**
3.2.1 Bütanol üreten anaerobik bakterilerin izolasyonu **25**
3.2.1.1.1 İzolatların tanımlanması **25**
3.2.1.1.2 Koloni morfolojisi **25**
3.2.1.1.3 Basit boyama **25**
3.2.1.1.4 Gram boyama **26**
3.2.1.1.5 Hücre morfolojisi **26**
3.2.1.2 DNA izolasyonu **27**
3.2.2 Kullanılan besiyerleri **27**
3.2.3 ABE tayini **28**
3.2.4 Toplam şeker tayini **29**
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **31**
4.1 Farklı Substrat Konsantrasyonlarında ABE Üretimi **33**
4.2 Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarında ABE Üretimi **35**
4.3 Farklı pH Değerlerine Sahip Besiyerlerinde ABE Üretimi **37**
4.4 Farklı Katkılar ile Hazırlanmış Besiyeri Ortamında ABE Üretimi **40**
4.5 Substrat Tüketimi ve Bütanol Üretimi **52**
5. SONUÇ **55**

KAYNAKLAR 58
EK 1 Glikoz standart eğrisi 65
ÖZGEÇMİŞ 66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *Clostridium*'larda ABE üretim iz yolu 11
Şekil 4.1 *Clostridium* suşlarına ait gelişme eğrileri 31
Şekil 4.2 Farklı patates konsantrasyonlarında *Clostridium* suşlarının ABE üretimi 32
Şekil 4.3 Farklı sıcaklıklarda, 400 g/L patates besiyerinde ABE ve toplam solvent oluşumu 34
Şekil 4.4 400 g/L patates besiyerinde 37° C sıcaklıkta değişen pH' larda ABE ve toplam solvent oluşumu 36
Şekil 4.5 $(NH_4)_2SO_4$ içeren patates besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu 39
Şekil 4.6 Maya Özütü içeren patates besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu 41
Şekil 4.7 K_2HPO_4 içeren patates besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu 43
Şekil 4.8 $CaCO_3$ içeren patates besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu 45
Şekil 4.9 $ZnSO_4$ içeren patates besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu 46
Şekil 4.10 Sistein-HCl içeren patates besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu 48
Şekil 4.11 $FeSO_4$ içeren patates besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu 49
Şekil 4.12 *Clostridium* suşlarına ait glikoz tüketim ve bütanol oluşum eğrileri 52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 ABE fermentasyonunda kullanılan substratlar 6
Çizelge 4.1 *Clostridium* suşlarının 37 °C'deki bütanol ve toplam solvent üretim miktarları 35
Çizelge 4.2 Bazı *Clostridium* suşlarının glikoz ve sistein-HCl ile modifiye edilen besiyerlerinde, ABE ve toplam solvent üretimleri 51
Çizelge 4.3 *Clostridium* suşlarına ait substrat dönüşüm ve bütanol verim değerleri..... 54

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun giderek artması ve gelişen teknoloji, insanların enerjiye gereksinimi arttırmaktadır. Günümüzde fosil yakıtlar gibi klasik enerji kaynakları, artan gereksinim ve gelişen teknoloji karşısında yetersiz kalmaktadır. Klasik enerji kaynaklarının birçoğunun yakın gelecekte tükeneceği uzun yıllardır tartışıla gelmektedir. Bu nedenle, günümüzde alternatif enerji kaynaklarının saptanması zorunludur.

Gelişmiş ülkeler enerji çeşitliliğini artırmakta, yaymakta ve belli enerji kaynaklarına büyük oranlarda bağımlı olmamaya çalışarak alternatif arayışlarını sürdürmektedirler. Öte yandan, yeni veya yenilenebilir enerji kaynaklarının çeşitliliği artmaktadır. Bunların bir kısmı ekonomik alternatiflik açısından değer kazanmakta, ancak bunların hepsinin ortak yönü çevreye olumsuz etkilerinin olmamasıdır. Fosil yakıtlar ise, küresel ısınma yanında çevre için büyük ve geri dönüşümü olmayan tehlikeler oluşturmaktadır (Qureshi ve Blaschek 2006).

Ülkemizde fermentasyon yolu ile nişasta içeren hammaddelerden biyo-alkol elde edilmesi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş.'nin biyoetanol üretimine yönelik 4 tesisi bulunmaktadır, ancak bilimsel araştırmaların eksikliği nedeniyle, şeker endüstrisinin yan ürünü olan melastan etanol üretiminin ekonomik geçerliliği tartışılır durumdadır, bu nedenle, bu 4 fabrikadan sadece bir tanesi çalışır durumdadır (Soyuduru 2007).

Bir diğer alkol olan bütanol, günümüzde alternatif enerji kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bütanol, nişasta içeren hammaddelerden anaerobik fermentasyonla elde edilebilmektedir. Ülkemiz nişasta içeren tarım ürünlerince oldukça zengindir, bu nedenle endüstriyel olarak, fermentasyon yolu ile bütanol eldesi 20. yüzyılın ilk yarısına kadar ihtiyacın % 66'sını karşılayacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Petrokimya endüstrisi ile rekabet edemeyen bütanol üretimine bir dönem ara verilmiş, petrol fiyatlarının artması sonucu 1970'lerde ortaya çıkan petrol krizi nedeniyle biyobütanol üretimi tekrar gündeme gelmiştir (Gholizadeh 2009).

Biyobütanolün, biyoetanole göre oldukça üstün özellikleri bulunmaktadır. Biyobütanol benzin ve dizel yakıtlar ile her oranda karıştırılırak kullanılabilmektedir. Ayrıca, benzine olan kimyasal benzerliği ile araba motorlarında herhangi bir değişikliğe gerek duyulmadan doğrudan kullanımıda olasıdır. Biyobütanolün egzoz emisyonunda bulunan yanmamış hidrokarbonların oranını azaltarak havanın temizlenmesine de yardımcı olabileceği ifade edilmektedir. Biyobütanolün sahip olduğu fiziksel, kimyasal özellikler ve yüksek enerji içeriği plastik, gıda ve aroma endüstrilerinde kullanım alanı bulmasını da sağlamaktadır (Formanek vd. 1997).

Patates, % 20 nişasta içeriğine sahip ve düşük maliyetle üretimi gerçekleştirilen bir tarımsal üründür. Ülkemizde her bölgede yetiştirilebilecek özelliklere sahiptir (Onaran vd. 2000). Türkiye, 6 milyon tonu aşkın patates üretimiyle Çin ve Hindistan'dan sonra Asya'da 3. ülke durumundadır. Patates, domatesten sonra ülkemizde üretimi yapılan 2. tarım ürünüdür (Altun 1996). Dünyanın yenilenebilir enerji arayışı içinde olduğu günümüzde, patates üretiminin ve üretim potansiyelin yüksek olduğu ülkemizde bu hammaddenin kullanılmasıyla biyobütanol eldesinin yaygınlaşması için mevcut araştırmalar yetersiz kalmaktadır.

Bu çalışma ile yenilenebilir enerji arayışına katkı sağlamak için, patatesten fermentasyon yöntemi ile bütanol üretiminin olasılığı ve üretim verimleri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Bütanol Üretimi

Fermentasyon yöntemi ile aseton-bütanol-etanol (ABE) üretimi, 100 yıldan daha uzun bir geçmişi olan bir uygulamadır. 1857'de Louis Pasteur, yaptığı çalışmalarda fermentasyonu, "yaşamsız (cansız) bir fenomen olmaktan uzak, yaşayan bir proses" olarak tanımlamış, buna bağlı olarak, fermentasyonda yer alan ve fermentasyonu gerçekleştiren mikroorganizmaların önemine dikkat çekmiştir. Pasteur süt, şarap ve bira fermentasyonu ile ilgili olarak laktik asit ve etanol fermentasyonları üzerine detaylı çalışmalar yapmış, 1861 yılında, mikrobiyal fermentasyon yolu ile bütanol üretiminin gerçekleşebileceğini göstermiştir. Bunu Schardinger'in fermentasyon yöntemi ile aseton üretimini saptaması izlemiştir (Jones ve Woods 1986). 1900'lü yılların başlarında doğal kauçuğun elde edildiği ağaçların giderek azalması sorunu ile karşı karşıya kalındığından alternatif kaynaklar araştırılmış, bu amaçla, Manchester Üniversitesinde görev yapmakta olan Chaim Weizmann, 1910 yılında sentetik kauçuk üretimi üzerine bir araştırma başlatmıştır. Weizmann, çalışmasında mikrobiyal fermentasyon yolu ile bazı solventlerin üretiminin olasılığını göstermiştir (Jones ve Woods 1986). 1911 yılında Fernbach, sadece patatesten fermentasyon yolu ile bütanol üretebilen bir mikroorganizmayı izole etmiş ve bunu *Clostridium acetobutylicum* olarak tanımlamıştır (Ranjan ve Moholkar 2009). Weizmann'ın izole ettiği bu bakterinin, Ferrnbach'ın izole ettiği bakteriye göre oldukça üstün özelliklere sahip olduğu anlaşılmış ve 1913 yılının ortalarında Strange and Graham Ltd. Rainham'da bulunan bir tesiste bu iki mikroorganizmayı kullanarak patatesten endüstriyel boyutta bütanol üretimi gerçekleştirmiştir. Bunun yanı sıra, bakterilerden aseton üretimi de gerçekleştirmiş, ancak faaliyete başladıktan 1 yıl sonra Rainham'daki tesisi kapatıp King's Lynn'de yeni bir tesise taşınmışlardır (Jones ve Woods 1986).

1. ve 2. Dünya Savaşları sırasında ABE fermentasyon endüstrisinde büyük gelişmeler olmuştur. Avrupa ve Amerika'da dumansız barut (cordit) üretiminde kullanılmak üzere fermentasyon yolu ile aseton üretimine ağırlık verilmiştir (Dürre 1998). O yıllardan

başlayarak Japonya, Sovyetler Birliği, Avustralya ve Güney Afrika'da da fermentasyon yolu ile büyük ölçekte ABE üretimi gerçekleştirilmiştir. Savaş öncesinde kalsiyum asetattan elde edilen aseton, savaş sırasında fermentasyon yolu ile patatesten üretilmiş, ancak artan talebi karşılayamamıştır. Savaş süresince Weizmann'ın desteği ile patlayıcı üretimi için birçok fermentasyon tesisi açılmış, ancak savaş sonunda talep olmadığı için üretim tesisleri kapatılmış ve asetonun yanı sıra üretilen bütanolün bir kısmı metil etil ketonlara dönüştürülürken, aseton uzun süre saklanamamıştır (Jones ve Woods 1986).

2. Dünya Savaşı'ndan sonra fermentasyon yolu ile ABE üretimi, petrokimya endüstrisi ile rekabet edememiştir (Ranjan ve Moholkar 2009). Bu koşullarda, ABE fermentasyon teknolojisinin gelişimi yaklaşık olarak 50 yıl sonrasına ertelenmiştir. Son yıllarda, fosil kaynakların tükenme olasılığı ortaya çıktığından alternatif enerji kaynakları arayışı içine girilmiş ve yenilenebilir enerji kaynaklarından fermentasyon yolu ile aseton, bütanol ve etanol üretimi yeniden önem kazanmıştır.

2.1.1 Mikroorganizma seçimi

Bütanol üretimi için uygun olan bakterinin sakkarolitik ve amilolitik özelliklere sahip *Clostridium* türleri olduğu bilinmektedir. *Clostridium*'lar Gram pozitif, hareketli, zorunlu anaerob, katalaz negatif, spor oluşturabilen çubuk şeklindeki bakterilerdir. Uygun koşullar altında, gelişme süreçlerinin ileri aşamalarında glikozdan önemli oranda solvent oluşturabilmektedirler. Günümüzde 100'den fazla *Clostridium* türü ve alttürünün bulunduğu tespit edilmiştir (Jones ve Woods 1986). Yapılan çalışmalarda, solvent ürettiği belirlenen birçok bakteri için patent alınmış ve bu bakteriler isimlendirilmişlerdir. Ancak, üretim sırasında bakteri dejenere olduğundan üretimde devamlılık sağlanamamıştır (Keis vd. 1995). Bu nedenle, solvent üretim yeteneği bulunan türlerin sınıflandırılması amacı ile birçok çalışma yapılmıştır.

George vd. (1983), *C. beijerinckii*, *C. butylicum* ve *C. aurantibutyricum* bakterilerinin 15 farklı suşunun solvent üretimi ve DNA yapılarını incelediklerinde, solvent üreten ve solvent üretmeyen suşların DNA'ları arasında en az % 78 oranında benzerlik

saptamışlardır. Bu sonucun bakterilerin sınıflandırılmasında, solvent oluşturma yeteneğinin yeterli bir özellik olmadığı şeklinde açıklanmıştır (George vd. 1983).

Keis vd. (1995), 55 farklı *Clostridium* grubunun 16S rRNA özelliklerine göre 4 farklı taksonomik gruptan oluştuklarını belirlemişlerdir.

Birinci taksonomik grup: Weizman suşu olarak bilinen amilolitik *C. acetobutylicum* (ATCC 824,DSM792,NRRL B527) ve nişasta bazlı substrattan izole edilmiş olan *C. acetobutylicum* suşlarından (DSM 1731, 1732, 1733, 1737) oluşmaktadır.

İkinci taksonomik grup: 1945 ve 1983 yılları arasında Güney Afrika'da endüstriyel olarak aseton ve bütanol üretimi için NCP tarafından izole edilen *C. acetobutylicum* NRRL B643, sakkarolitik *C. acetobutylicum* NCP 262 ve *C. saccharo-butyl-acetonicum-liquefaciens* NCP suşlarından oluşmaktadır.

Üçüncü taksonomik grup: 1959 yılında, Japonya'da izole edilmiş bir *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) suşu ve bu suşun faj dirençli bir mutantı olan N1-504 (ATCC 27022) suşlarını içermektedir.

Dördüncü taksonomik grup: Sakkarolitik *C. beijerinckii*, *C. acetobutylicum* (NCIMB 8052, 8049, 6444, 6445, 8653 ve diğerleri), *C. madisonii* ve *C. saccharo-acetobutylicum* suşlarını içermektedir.

2.1.2 Hammadde seçimi

Bütanol, şeker içeren materyallerin bazı bakteriler ile fermentasyonu sonucu oluşmaktadır. Bütanol üretiminde, basit şekerler dışında fermente edilebilir şekerlere dönüştürülebilen bütün maddeler substrat olarak kullanılabilmektedir (Soyuduru 2007).

Şeker içeren hammaddeler (melas, şeker kamışı, şeker pancarı ve çeşitli meyveler), mikroorganizmalar tarafından herhangi bir ön işleme gerek duyulmadan fermente edilebilmektedirler. Nişasta ve selüloz içeren hammaddeler, nişasta ve selülozun mikroorganizmaların kullanılabileceği şekerlere dönüştürülmesi için enzimatik hidroliz ve/veya asit hidrolizi gibi ön işlemlere ihtiyaç duymaktadır (Qureshi ve Blaschek 2006).

Substrat olarak kullanılabilecek hammaddeler; şeker içeren hammaddeler, selüloz içeren hammaddeler ve nişasta içeren hammaddeler olmak üzere üç grup altında toplanmak mümkündür (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 ABE fermentasyonunda kullanılabilen substratlar

Şekerli Hammaddeler	**Selülozlu Hammaddeler**	**Nişastalı Hammaddeler**
Şeker Kamışı Melası	Tarımsal Atıklar	Patates
Şeker Pancarı Melası	Ağaç ve Orman Atıkları	Mısır
Peynir Altı Suyu	Kağıt ve Kentsel Atıklar	Pirinç
Meyve Atıkları	Endüstriyel Atıklar	Kasava

Melas, patates, mısır, saman, yer elması, peynir altı suyu, tarımsal atıklar v.b. birçok hammaddeden fermentasyon yöntemi ile ABE üretildiği bilinmektedir (Qureshi ve Blaschek 2006). Uygun substrat belirlenmesinde en önemli factor ekonomikliğidir. Qureshi ve Blaschek (2000), hiper-bütanol üreten *C. beijerinckii* BA101 suşu ile hammadde olarak mısırı kullanmış, 0.42-0.50 g bütanol/glikoz verim sağlanabileceğini göstermişler ve böyle bir üretim ile bütanol maliyetinde % 14.7'lik azalmanın elde edilebileceğini ifade etmişlerdir.

Mısırın bileşiminde % 71 oranında, bütanol üreten *Clostridium'* lar tarafından kolayca hidrolize edilebilen bir hammadde olan nişasta bulunmaktadır. Bununla birlikte, % 9.5 oranında pentozanlar ve selüloz da bulunmaktadır. Ancak pentozanlar ve selülozun *C. acetobutylicum* ve *C. beijerinckii* gibi amilolitik bakteriler tarafından hidroliz işleminden sonra kullanılabildiği anlaşılmıştır (Qureshi ve Blaschek 2006). Bunun yanı sıra, selülozlu hammaddelerin mikroorganizma tarafından kullanılabilmesi için uygulanan işlemler sırasında asetik asit, ferulik asit, gliküronik asit, ρ-kumarik asit, tuzlar, furfural ve hidroksimetil furfural (HMF) gibi bazı toksik bileşiklerin oluştuğu saptanmıştır. Ezeji vd. (2007), substrat olarak mısır lifi hidrolizatının kullanıldığı bir çalışmada *C. beijerinckii* BA 101 suşunun HMF ve furfural varlığında fermentasyonun engellenmediğini, aksine teşvik edici yönde etki ettiğini, fumarik asit ve ρ-kumarik asit varlığında ise solvent üretiminin engellendiğini bildirmişlerdir.

Günümüzde yapılan çalışmalarda patates ve patates türevlerinin uygun mikroorganizma ile ekonomik olarak bütanol üretiminde kullanılabildiği sonucuna varılmıştır. Ancak, patatesin içerdiği yüksek orandaki nişasta, viskoz yapı oluşturmakta ve bu yapı uygulamada sorun çıkarmaktadır. Bazı *Clostridium*'lar patatesi hiçbir ön işlem uygulamadan kullanabilirken bazı *Clostridium'*lar ön işlem uyguladıktan sonra kullanabilmektedir (Qureshi ve Blaschek, 2006). Nimcevic vd. (1998), farklı patates besiyerlerinde *C. beijerinckii* NRRL B592 suşunun gelişimini ve bütanol üretimini incelediklerinde, kesikli fermentasyonda, en yüksek verimliliği özgün amilolitik enzimlerinin yeterli olduğu, herhangi bir ön işlem görmemiş patates kullanılan besiyerinde saptamışlardır. Gutierrez vd. (1997) tarafından yapılan çalışmada ise benzer sonuçlar, *C. acetobutylicum* DSM 1731 ve *C. acetobutylicum* ATCC 824 suşları ile amilolitik enzimlerle hidrolize uğratılmış patatesin substrat olarak kullanıldığı fermentasyonda, hidrolize uğratılmamış patatese göre ABE üretkenliğinde bir artış meydana gelmediğini bu çalışma ile desteklemişlerdir.

Qureshi vd. (2001), püskürtme (sprey) yöntemiyle kurutulmuş soya melası (SDSM) ile gerçekleştirdikleri çalışmada, *C. beijerinckii* BA 101 suşu ile 80 g/L SDSM konsantrasyonunda 10 g/L ABE ürettiklerini bildirmişlerdir. SDSM' nin 57,4 g/kg kül ve % 2 oranında trikalsiyum fosfat içermesi sebebi ile mineral maddelerin fermentasyon üzerine olumsuz etkisini yüksek SDSM konsantrasyonuna rağmen elde edilen düşük solvent konsantrasyonu ile açıklamışlardır.

Bütanol fermentasyonunda en çok kullanılan hammaddelerden mısır, patates ve melasın yanı sıra, yer elması ve peynir altı suyu gibi farklı hammaddeler üzerine yapılan çalışmalar da vardır. Yer elması inülin içeren bir tarım ürünüdür ve inülin bir früktoz polimeridir bu nedenle fermentasyon öncesinde monomerlerine ayrışması gerekmektedir. İnülinin hidrolizi için ya seyreltik asitler ya da inülinaz enzimi kullanılmaktadır. Hidrolize uğratılmış yer elmasından *C. acetobutylicum* ile 36 saatte 23-24 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirilmiştir (Marchal vd. 1985). Peynir altı suyu (PAS), içerisindeki kazeinin çöktürülmesi ve ayrılması ile bütanol fermentasyonunda kullanılabilir hale gelmektedir. Filtrasyon sonucunda PAS'ta % 4-5 oranında laktoz bulunmakta, ancak laktozun fermentasyonu sırasında, ortam pH'nın

düşük olması kültür dejenerasyonunu hızlandırmakta ve solvent üretimi tamamlanmış olmasına karşın bir kısım substratın tüketilmeden ortamda kalmasına neden olmaktadır (Hunter 1995).

2.1.3 Biyokimya ve fizyoloji

2.1.3.1 Solvent üretim iz yolu

Nişastadan solvent üretiminde, solvent oluşumunun başlayabilmesi için makromoleküler yapıda bulunan nişastanın glikoza parçalanması gerekmektedir. *C. acetobutylicum* gibi amilolitik bakteriler α-amilaz ve glukoamilaz enzimleri ile nişastayı kullanılabilir duruma getirmektedir (Madihah vd. 2001). Glikoliz sırasında *C. acetobutylicum* ve *C. beijerinckii* biyosentez ve gelişmeleri için, ihtiyaç duyduklarından daha az ATP ve daha fazla NADPH sentezi gerçekleştirirler. Bu reaksiyon dizini ancak enzimlerin yardımıyla ve ortamda yeterli enerji olduğunda başlayabilmektedir. Söz konusu enerji, aktivasyon enerjisi olarak kullanılan enerjidir. Glikozun parçalanmaya başlaması, yani glikoliz reaksiyonlarının başlaması için 2 ATP'ın harcanması gerekir. Glikoz ile başlanan glikoliz işleminde ATP molekülleri enzimlerin etkisi ile son fosfatlarını glikoza vererek tepkimeden ADP olarak ayrılır. Bu işlemler sırasında, glikoz früktoza dönüşmekte ve aktifleşmiş molekül olan früktoz bifosfat, ikiye ayrılan 6 C'lu 2 P'lı molekülden 2 tane gliseraldehit-3-fosfat (GAP) oluşmaktadır. Bundan sonra reaksiyon, iki GAP üzerinden yani iki koldan devam eder. GAP ortamda bulunan NAD (Nikotin amid dinükleotid) ile reaksiyona girerek bir çift hidrojenini NAD'e verir ve $NADH_2$ oluşur. Bu sırada GAP'ın bağlarında bir boşluk meydana gelir. Bu boşluk, ortamda bulunan fosfat ile doldurulur ve 3 C'lu 2 P'lı bir molekül oluşur. Bu molekül, ortamda bulunan ADP'lar ile reaksiyona girerek 2 ATP oluşturur. Geriye kalan molekül ise prüvat olarak adlandırılır. Diğer GAP'da da aynı gelişmeler olacağı için toplam 4 ATP meydana gelir (Soyuduru 2007). Bu iz yolunda ilk aşama olan asit üretimi sırasında sentezlenen ATP ihtiyacı karşılayabilmektedir. Çoğu heterofermantatif anaerobik bakterilerde olduğu gibi *Clostridium*'lar da hidrojen oluşturmaktadırlar ve oluşan hidrojen iyonları, hücrede elektron ve protonların gereken düzeni takip etmesini sağlamaktadır. Hidrogenaz enzimi terminal enzim olarak hücrenin solvent üretimi için

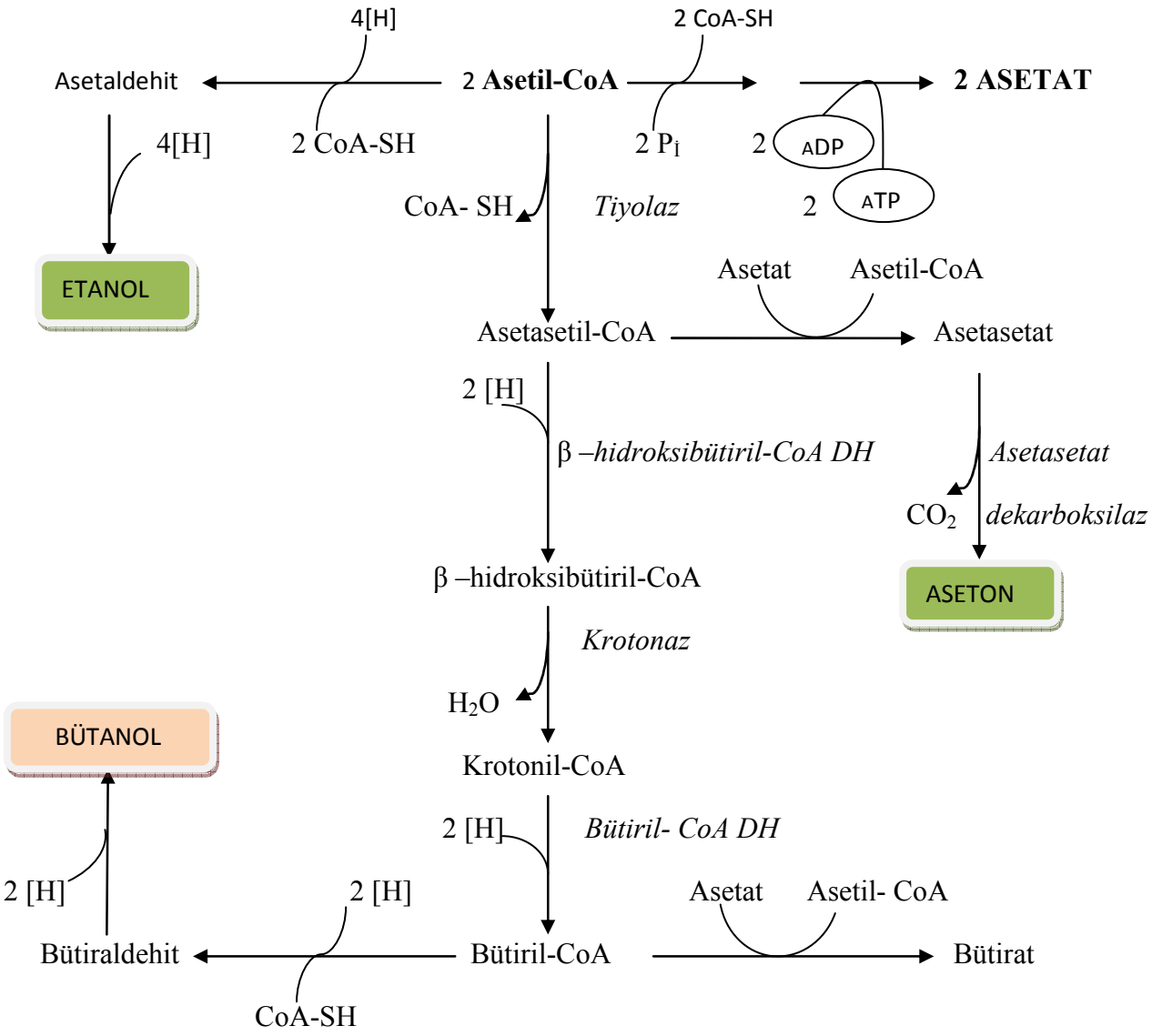
protonların en son elektron alıcısı olarak kullanabilmesini sağlamaktadır. Hücre içindeki hidrogenaz aktivitesi solvent üretim yolunun yön bulmasında oldukça önemlidir. Glikoliz sonucunda oluşan prüvat, prüvat ferrodoksin oksidoreduktaz enzimi ile asetil-CoA'ya yükseltgenir. Bu sırada, ortamda bulunan serbest elektronlar, elektron taşıma bileşiği olarak bilinen ferrodoksinler tarafından yakalanır. Elektron alarak indirgenmiş taşıyıcı molekül, (Fd red) elektronları moleküler hidrojeni oluşturmak üzere H^+ iyonlarına verir ve yeniden yükseltgenir. Prüvatın dekarboksilasyonu ve aynı anda CoA'nın katılımı ile şekillenmiş olan Asetil-CoA, elektron transferi ile eşleşen bir izyolunda, ortamda bulunan inorganik fosfatı (Pi) fosfoasetil transferaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla Asetil-fosfat'a dönüştürür ve bu yolla serbest kalan CoA, yeniden prüvatın Asetil-CoA'ya yeniden oksidasyonuna katılır. Önemli bir ara bileşik olan Asetil-P, aynı glikolizde olduğu gibi substrat düzeyindeki fosforilasyonla ADP'tan ATP ve asetat oluşumunu sağlar. Bu reaksiyonu katalizleyen enzim ise asetat kinazdır (Göçmen 2003).

ABE fermentasyonu iki aşamalı bir fermentasyondur, asit oluşumu ve solvent oluşumu arasında iz yolu üzerinde ortak nokta asetil-CoA, bütiril-CoA ve asetasetil-CoA'dır. Asidik fazda asetat ve bütürat, asetil-CoA ve bütiril-CoA'dan birbirini izleyen iki reaksiyonla oluşurlar. Asetil-CoA'dan bütiril-CoA'nın oluşumunda 4 farklı enzim görev yapar. Bunlar tiyolaz, β-hidroksibütiril-CoA dehidrogenaz, krotonaz ve bütiril-CoA dehidrogenaz enzimleridir. Asetil-CoA'dan ve bütiril-Co'dan asetat ve bütirat oluşumu sırasında birer molekül ATP sentezi gerçekleşmektedir (Jones ve Woods 1986).

Thompson ve Chen (1989), tarafından sadece *C. beijerinckii'*den izole edilmiş olan fosfotransasetilaz enzimi dışında, asit oluşumundan sorumlu enzimler (fosfotransbütirilaz, asetat kinaz ve bütirat kinaz) *C. acetobutylicum* ve *C. beijerinckii*' den izole edilmiştir. Bu enzimlerin bazı karakteristik özellikleri ilgi çekmektedir, örneğin, bütiril fosfatın oluşumunu katalizleyen enzim olan fosfotransbütirilaz enzimi pH 6-8 aralığında aktiftir. Asetik ve bütürik asitlerin oluşumuyla tamamlanmış olan asit üretim fazından solvent üretim fazına geçilebilmesi için karbon akışında değişime ihtiyaç duyulmaktadır. Solvent üretimine geçilmesi sırasında asitlerin geri alımı gerekmektedir. Solvent üretiminin başladığı sırada ortamda bulunan asetat fosfo-

transasetilaz, asetat kinaz ve fosfo-bütiriltransferaz enzimlerinin konsantrasyonlarının giderek düştüğü görülmektedir. Bu da asitlerin geri alımında, sentezleri sırasında izledikleri yolun dışında bir yol izlediğini göstermektedir. Asitlerin geri alınımı ve aktivasyonundan sorumlu olan tek enzim (asetat, bütirat) CoA-transferazdır (Hartmanis vd. 1984). Asetasetil-CoA'nın asetasetata dönüşümü sırasında, asetasetil-CoA transferaz enzimi CoA alıcısı olarak asetat ve bütiratı kullanmaktadır. Oluşan asetasetatın dekarboksilasyonu ile geri dönüşümsüz aseton oluşumu gerçekleşmektedir. Solvent üretimi sırasında etanol ve bütanol üretimi için asetil-CoA ve bütiril-CoA ara noktaları oluşturmaktadır. Asetil-CoA'dan asetilaldehit ve bütiril-CoA'dan bütiraldehit üretiminde gereken indirgenme reaksiyonları için dehidrogenaz aktivitesine ihtiyaç duyulmaktadır (Jones ve Woods 1986).

Bütiril-CoA'dan bütanol üretimi için gereken indirgenme bütiraldehit dehidrogenaz ve bütanol dehidrogenaz enzimleri ile asetil-CoA'dan etanol üretiminde ise asetaldehit dehidrogenaz ve etanol dehidrogenaz enzimleri ile gerçekleşmektedir (Jones ve Woods 1986).



Şekil 2.1 *Clostridium*'larda ABE üretim iz yolu (Tunail 2009)

2.1.3.2 Şeker taşınımı

Solventojenik *Clostridium*'lar çoğalmaları ve bütanol üretimleri için çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilmektedirler. Çeşitli substratları kullanırken salgıladıkları birçok enzimle polimer yapıdaki karbonhidratları kullanabilecekleri şeker monomerlerine parçalayabilmektedirler. Bu enzimlerden α-amilaz, α-glukozidaz, β-amilaz, β-glukozidaz, glukoamilaz, pullulanaz ve amilopullulanaz önemli olanları oluşturmaktadır (Ezeji vd. 2007).

Üretilen monosakkaritler hücre içine spesifik membrana bağlı taşıma sistemleriyle taşınmaktadır. 40 yıldan fazla bir zamandan beri karbohidratların *Clostridium*' larda hücre içine taşınımında fosfoenol prüvat-şeker transferaz sisteminin (PEP-PTS) önemi bilinmektedir (Togney ve Mitchell 2007). Bu sistem PEP'ın, fosfat grubunun şekere taşınımında rol almaktadır (Lee ve Blaschek 2001).

Mitchell (1998), glikoz ve früktoz fosforilasyonunun PEP tarafından desteklenmesi, şekerin hücre içine alınımında PTS sisteminin varlığını gösterirken galaktozun kullanımı ise PTS'nin olmadığı bir taşıma sisteminin varlığını gösterdiğini, galaktozun hücre içine alınmasının PEP'nin yerine ATP tarafından desteklenen bir taşıma sisteminin varlığında gerçekleştiğini bildirmiştir. Bazı *Clostridium*'larda bu iki sistem de aynı anda bulunmaktadır. Bunu Lee ve Blaschek (2001), yaptıkları bir çalışmayla saptamışlardır, *C. beijerinckii* BA 101 ve *C. beijerinckii* 8052 glikozun hücre içine taşınımı, iki sistemi de içerirken, ATP bağımlı sistem solventojenik fazda baskın hale gelmekte ve PTS baskılanmaktadır. Glikoz taşınımı sırasında solventojenik fazda HPr proteininin ve Enzim I'in düşük aktivite göstermesi, PTS'nin baskılanmasına neden olabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca asidojenik fazdan solventojenik faza geçilmesinde birçok faktör rol oynamaktadır (Long vd. 1984).

2.2 Solvent Üretimini Etkileyen Faktörler

2.2.1 Ortam pH'ı

Bütanol fermentasyonun sürdürülebilirliği için pH önemli faktörlerden biridir. ABE fermentasyonu asidojenik ve solventojenik olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir (Jones ve Wood 1986). Asidojenik faz önce gerçekleşmekte ve bu aşamada organik asit üretimi (asetik asit ve bütirik asit) gerçekleşmektedir. Oluşan asetik ve bütirik asitler besiyerine geçerek ortam pH'nın düşmesine neden olmaktadır. pH' daki düşme kritik bir değere ulaştığında solventojenik faz olarak bilinen ikinci aşama başlamaktadır. Solventojenik fazda, ilk aşamada oluşan organik asitlerin aseton ve bütanole dönüşümü gerçekleşmektedir (Wall vd. 2008). Bununla birlikte, solventojenik fazın başlamasını kültürel ve makroskopik gibi parametreler de etkilemektedir (Girbal ve Soucaille 1998). Long vd. (1984), *C. acetobutylicum* P262 ile gerçekleştirilen bütanol fermentasyonunda 4 g/L'yi aşan asit konsantrasyonunun hücre bölünmesini ve solvent oluşumunu inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Solvent oluşumu çoğunlukla ortamdaki dissosiye olmamış bütirik asit konsantrasyonunun 1.6-1.9 g/L arasında olduğunda başlamaktadır (Monot vd. 1984).

Endüstriyel AB fermentasyonunda da pH önemli bir parametredir. Yapılan bir çalışmada P2 besiyerinde *C. beijerinckii* BA101 ile gerçekleştirilen AB fermentasyonunda, mikroorganizma çoğalması için ortam pH'ı yaklaşık olarak nötr (pH 6.8) düzeydeyken fermentasyon başlatılmış, organik asit oluşumuna bağlı olarak pH'ın optimum değere (pH 5.0-5.5) düşmesi solventojenik fazın başlamasını tetiklemiştir. Kesikli kültürde *C. beijerinckii* BA101 tarafından P2 besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonda ise besiyeri pH optimum olduğundan, pH'a dışarıdan müdahaleye gerek duyulmadan solventojenik faz başlamıştır, ancak kemostat besiyerlerinde pH'nın optimum değere ayarlanması gerekmektedir (Ezeji vd. 2003).

Glikoz limitli sürekli kültürde *C. acetobutylicum* ile gerçekleştirilen fermentasyonda pH nötr olarak başlatıldığında ortamda asetat, bütirat, karbondioksit ve hidrojen fermentasyon ürünleri olarak meydana gelmiştir. Fermentasyon ortamına 20-80 mM

düzeyinde bütirik asit ilavesi yapılarak ortam pH'ı 5 değerinin altına düşürülmüş, sonuç olarak aseton ve bütanol oluşumunun başladığı görülmüştür. Fermentasyon sürecinde *C. acetobutylicum* için glikoz limitli sürekli kültürleme sisteminde optimum pH 4.3 olarak belirlenmiştir (Bahl vd. 1982a).

- Asidojenik aşama ürünleri;

Asidojenik fazda üretilen organik maddeler fermentasyonda ihtiyaç duyulan ATP'ın üretimi için elektron alıcısı olarak rol oynarlar. Dissosiye olmamış bütirat ve asetat gibi organik asitler hücre membranında boşluklar açarak ortamda bulunan protonun hücre içine alınmasını sağlamaktadırlar (Kell vd. 1981). Protonların hücre içine alınması sitoplazmanın pH'nı düşürmekte, asidojenik fazdan solventojenik faza geçilebilmesi için dissosiye olmamış organik asitlerin (asetik asit, bütirik asit) hücre içindeki konsantrasyonu 42 mM'dan daha yüksek olması gerekitiği, bütirik asitin konsantrasyonu en az 13 mM olması gerektiği bildirilmiştir (Terracciano ve Kashket 1986).

Ortamdaki organik asitler sadece membran geçirgenliğine ve pH üzerine etki etmesi sonucu solventojenik fazın başlamasını sağlamanın yanı sıra ortamdaki bütirat ve asetat konsantrasyonunun artması sonucunda bütiril CoA, bütiri fosfat, asetil CoA ve asetil fosfat konsantrasyonunun artmasını sağladığı saptanmıştır (Gottwald ve Gottschalk 1985). Bunun sonucunda ortamda azalan fosfat ve Co A solventojenik faz için gereken enzimleri tetiklemesi sonucu solventojenik fazın başladığı belirlenmiştir (Terracciano ve Kashket 1986).

2.2.2 Sıcaklık

Solvent üreten Clostrdiumlarda bütanol üretimi için gereken optimum sıcaklık 30 °C ile 37 °C arasında değişmektedir. *C. acetobutylicum* NCIB 8052 için optimum gelişme sıcaklığının 35 °C olduğu belirtilmiştir. Kesikli kültür sisteminde 25 °C ile 40 °C sıcaklık dereceleri arasında *C. acetobutylicum* NCIB 8052 suşunun gelişmesi incelendiğinde; sıcaklık arttıkça solvent üretiminin azaldığı görülmüştür. Sıcaklık değişiminin, bütanol üretim miktarını değiştirmemesine karşın, toplam solvent miktarında azalmaya neden olduğu, toplam solvent miktarındaki azalmanın, aseton miktarındaki azalma ile açıklanabildiği belirtilmiştir (McNeil ve Kristiansen 1985).

Mikroorganizmalar düşük ve yüksek sıcaklıklara karşı hücre membranında, lipid kompozisyonunda değişiklile adapte olmaktadırlar. Mikroorganizma, düşük sıcaklıklarda hücre membranındaki lipidlerin doymamış yapıyı değiştirerek tepki gösterir (Laczkó-Dobos ve Szalontai 2009). *C. acetobutylicum* ATCC 824 suşunun, 22 °C, 37 °C ve 42 °C sıcaklıklarında ve % 0-1.5 aralığında değişen bütanol konsantrasyonlarındaki hücre gelişimi incelendiğinde, 22 °C sıcaklık değerinden 37 °C sıcaklık değerine doğru gidildikçe bütanolün, hücre membranında sebep olduğu sıvılaştırma etkisi ile hücre gelişimi inhibisyonunun önüne geçildiği saptanmıştır. 37 °C sıcaklık değerinden 42 °C sıcaklık değerine doğru gidildiğinde ise bütanolün, hücre gelişimi üzerindeki olumsuz etkisinin arttığı tespit edilmiştir. Düşük sıcaklıklarda hücre membranının yapısındaki doymuş yağ asidi bileşiminin doymamış yağ asidi bileşimine oranının artmasından dolayı bütanolün, hücre membranını sıvılaştırarak hücre gelişiminin engellenmesinin önüne geçilebilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda ise sıcaklığın doymuş yağ asitleri üzerindeki etkisinden dolayı bütanolün olumsuz etkisi tetiklenmektedir (Baer vd. 1987).

2.2.3 Bütanolün toksik etkisi

Solvent üretiminde ekonomik üretimi engelleyen en önemli sınırlayıcı faktör, fermentasyon sonucu oluşan solventtir. Ortamda bütanolün birikmesi sonucu membrandan ATP'ın, protonların, elektronların, RNA ve protein gibi makromoleküllerin geçişi etkilenmektedir (Tomas vd. 2003). Solvent birikimi sonucu membrandaki bu olumsuz etkilerden dolayı, solvent üretimi için gerekli enzimlerin aktivasyonu, hücre içine glikozun alınımı ve hücre içi pH'nın olumsuz etkilenmesi sonucu solvent üretimi sınırlandırılmaktadır.

Bütanolün toksik etkisi, hidrofobik yapısı ile ilişkilendirilmektedir. Bütanol, uzun zincirli alifatik alkollerle birlikte hücre membranında bulunan fosfolipidlerin yapısını bozabilmektedirler. En fazla dört karbonlu olan kısa zincirli alkoller, açil zincirinin arasına girerek veya hareketlerini sınırlandırarak membranın donmasına ya da katılaşmasına sebep olurken uzun zincirli alkoller (4 karbondan 9 karbona kadar) fosfolipid gruplarına bağlanarak ve açil grupları arasındaki uzaklığı arttırarak membranın sıvılaşmasına sebep olmaktadırlar (Baer vd. 1987). Düşük konsantrasyonlardaki bütanolün (<5 g/L), *C. acetobutylicum* bakterilerinde membranın akışkanlığına etkisinin olmadığı, ancak yüksek konsantrasyonlardaki bütanolün (10 g/litre) membranın lipid yapısının akışkanlığını % 20'den % 30'a yükseldiği bildirilmiştir (Vollherbst vd. 1984).

Birçok mikroorganizmada olduğu gibi *Clostridium*'larda da hücre dışında meydana gelen toksik etkilerden korunabilmek için hücre membranı bir adaptasyon süreci geçirmektedir. Bu adaptasyon süresince membran bileşimi değişmekte, membrandaki doymuş/doymamış yağ asidi oranı artmaktadır (Tomas vd. 2003). Hücre membranının bütanole karşı göstermiş olduğu bu savunma mekanizması ortamda sıcaklık artışı sonucu görülen değişimle aynı olmaktadır (Jones ve Woods 1986).

Bütanolün toksik etkisi sadece membranda meydana getirdiği olumsuz etkilerle sınırlandırılmamaktadır. Tomas vd. (2003), hücre membranının bütanol toksisitesine

karşı gösterdiği tepki sıcaklığa karşı gösterdiği tepkiyle benzerlik göstermesinden dolayı ısı şok proteinleri (IŞP) olarak bilinen stres proteinlerinin de solvent üretimini engellediğini savunmuşlardır.

2.2.4 Besin kaynağındaki sınırlamalar

Fermentasyonla solvent üretimi için en substrat glikozdur. Ortamdaki glikoz miktarı fermentasyonun asidojenik ya da solventojenik olmasını belirleyen önemli bir faktördür. Düşük konsantrasyonlardaki glikoz (% 0.5-1) asidojenik fazı tamamlamaya yetmekte, bu nedenle, fermentasyon sonunda sadece asetik asit ve bütirik asit üretilmektedir. Asetik asit ve bütirik asit üretilirken, ATP kullanılırken, oluşan asitlerden solvent üretimini gerçekleştirecek enzimlerin aktivasyou için gereken ATP ortamda karşılanamadığından, glikoz limitli bir ortamda *C. acetobutylicum* tarafından sadece asidojenik bir fermentasyon gerçekleştirilebildiği açıklanmıştır (Monot vd. 1982).

ABE fermentasyonu için önemli diğer bir besin ise azottur. Sürekli kültürde *C. acetobutylicum* glikoz veya nitrojen limitli ortamda solvent üretimini gerçekleştirememekte, bu ortamda kültür solvent üretebilme ve sporlanma yeteneğini kaybetmektedir (Gottschalk ve Morris 1981). Kesikli kültürde ise, *C. acetobutylicum* P262 ile gerçekleştirilen fermentasyonda ortamda bulunan azotun giderek azaltılması ile üretilen solventin ve harcanan glikoz miktarının azaldığı anlaşılmıştır. Ortamdaki azot miktarı 9.0 mM'dan daha az konsantrasyona düştüğünde ortamda bulunan glikozun üçte biri tüketilmektedir ve bu tüketim ile gerçekleşen fermentasyon sonucunda solventojenik faza geçilememektedir (Long vd. 1984).

Demir-sınırlı bir ortamda kesikli ve sürekli kültürlerde, ortamdaki demir konsantrasyonu 10 μM'ın üzerine çıktığında *C. pasteurianum*'un gelişiminin engellendiği, 5.7-8.7 μM demir iyonu bulunan besiyerinde gelişebildikleri anlaşılmıştır. Demir konsantrasyonun 5.7 μM olması durumunda ise daha çok laktat oluştuğu (77 mol/100 mol glikoz) ve bu koşullarda solvent üretimi oluşamadığı saptanmıştır (Dabrock vd. 1992).

Fosfat-sınırlı bir ortamda, 0.74 mM fosfatlı koşuldak sürekli kültürde, *C. acetobutylicum* fermentasyonda ana ürün olarak aseton, bütanol ve etanol üretimini oluşturduğu, 300 mM glikoz içeren ortamda ise 130 mM bütanol ve 74 mM aseton oluşturduğu belirtilmiştir ve çoğalmanın sınırlandırılabilmesi için en uygun bileşiğin fosfat olduğu belirlenmiştir (Bahl vd. 1982b).

Lai ve Traxler (1994), fosfat ve azot sınırlı ortamda *C. acetobutylicum*'un gelişmesini incelemişlerdir. Bu çalışmada *C. acetobutylicum'* un solvent oluşturmadığı, ancak, iki aşamalı sürekli kültürde, ilk aşamada sadece azot sınırlandırmasına gidildiğinde, daha çok asit oluştuğu, ikinci aşamada ise birinci aşamadan gelen yeterli miktardaki glikoz ve azotun yanı sıra fosfat sınırlandırmasına gidildiğinde solvent üretiminin arttığı görülmüştür.

Magnezyum, bakterinin hücre duvarında yer almasının yanı sıra ribozomlarda bulunması gereken ve bir çok enzimin kofaktörü olmasından dolayı fermentasyon için sınırlayıcı niteliktedir (Alshiyab vd. 2008). Yapılan bir sürekli kültür çalışmasında, düşük dilüsyon hızında (D: 0,06) magnezyum sınırlı ortamda *C. acetobutylicum* NCIMB 8052 suşunun gerçekleştirdiği fermentasyon sonucunda, yüksek hücre yoğunluğu ve solvent üretimine ulaşıldığı belirtilmiştir (Stephens vd. 1984).

2.2.5 Kültür Dejenerasyonu

Dejenerasyon, solventojenik *Clostridium*'larda sporlanma veya AB üretim yeteneklerini kaybetmeleriyle sonuçlanmaktadır. Vejetatif formda bulunan hücreler ve ısı şoku uygulanmış sporlar kıyaslandığında vejetatif formda bulunan *Clostridium*' larla başlatılan fermentasyonda hücrelerin dejenerasyona uğradığı anlaşılmıştır (Ezeji ve Blaschek 2008). Kashket ve Cao (1995) de, dejenerasyon ile ilgili durumları maddeler halinde açıklamışlar ve dejenerasyonun, logaritmikçoğalma sırasında ortamın aşırı asitlenmesinden dolayı ortaya çıkabildiğini bildirmişlerdir.

C. beijerinckiii NCIMB 8052 suşunun, glikozu asetik asit ve bütirik asite fermentasyonu sırasında, hızlı gelişme nedeniyle oluşan yüksek asit konsantrasyonu nedeni ile solvent üretimi için gereken enzimlerin inhibe olduğu anlaşılmıştır. Bunun sonucunda, ortam pH'nın bakterisidal etkiyi artırması ile hücre solvent oluşumunu ve spor oluşumunu başlatamamıştır. *C. beijerinckiii* NCIMB 8052 suşu, solventojenik genleri içeren plazmidlere sahip olmadığından solventojenik gen kayıplarına uğradığı belirtilmiştir. *C. beijerinckiii* NCIMB 8052 suşunun transpozon mutantının dejenerasyona dayanıklı olması ve kromozal DNA' da düzenleyici bir genin olduğunu göstermiş,bu düzenleyici genin etkisigenin alınmasıyla, *C. beijerinckiii* NCIMB 8052 kemostat çoğalmada geri dönüşümsüz olarak dejenere olması ile anlaşılmıştır (Chen ve Blaschek 1999).

Yapılan çalışmalarda, dejenerasyonun farklı suşlarda farklı sonuçlar verdiği, örneğin; *C. beijerinckii* NCIMB 8052 suşu dejenere olduğunda spor oluşturabilme ve solvent üretim yeteneğini kaybederken, *C. acetobutylicum* ATTC 824 suşunun, uzun bir gelişme süreci sonucunda solvent üretim yeteneğini kaybettiği açıklanmıştır (Ezeji ve Blaschek 2008).

Kesikli kültürde, dejenere olmayan hücrelerin hızlı değişmelerine karşın dejenere olan hücreler daha baskındır. Bunun sebebi ise dejenere olmayan hücrelerin değişimin başlamasıyla bölünmeyi bırakmasıdır. Ancak, dejenere hücreler bölünmeye devam etmektedir. Sürekli kültürde ise dejenere hücreler kültürün bitmesi durumuna karşın birikim eğilimi göstererek kesikli kültürde de olduğu gibi dejenere olmayan hücrelere göre baskın duruma gelirler (Kashket ve Cao 1995).

Ortama sodyum asetat ilavesi ile dejenerasyonun engellenebildiği, sodyum asetat ilavesiyle hücrelerin asetatın solvente dönüşümünü gerçekleştirebildiği ve dejenere hücrelerin ortamdaki yoğunluklarını azaltabilmesi sonucunda yüksek konsantrasyonlarda solvent üretimi sağlanabildiği açıklanmıştır (Chen ve Blaschek 1999).

2.2.6 Endospor oluşumu

*Clostridium'*larda asidojenik fazda görülen baskın morfolojik yapı, çubuk şekilli vejetatif formdur. Asidojenik fazda, asit üretimi arttıkça ve pH dönüm noktasına yaklaşıldıkça ortamda bulunan hareketli vejetatif hücrelerin hareketinde azalma başladığı anlaşılmıştır. Hareketliliğin azalması ile hücre granüloz biriktiği, bu aşamayı endospor oluşumu için ana hücrenin içinde boğumlanmasının izlediği belirtilmiştir (Schuster vd. 1998).

Spor oluşumunun, asidojenik fazdan solventojenik faza geçiş sırasında başladığı, solventojenik fazın başlatılmasında spor oluşumu için gerekli olan Spo0A geninin aktivasyonu ile solvent üretimi için gerekli genlerin indüklenmesi arasında bir ilişki bulunduğu, spor oluşumu için gerekli olan *Spo0A* geninin ilk olarak *Bacillus substitilis'*ten izole edildiği, *Clostridium'*larda ise bu genin mevcut olması Spo0A ve solventojenik genler arasındaki ilişkinin tespit edilmesinde önemli rol oynadığı saptanmıştır (Ezeji ve Blaschek 2008). *Spo0A* geninin *Clostridium'* larda solvent üretimi üzerine etkisi incelendiği bir araştırmada, *Spo0A* geninin inaktivasyonu ile *C. acetobutylicum* ATCC 824 suşunun spor oluşumunun engellenmesinin yanı sıra, aseton ve bütanol üretiminde anaç suşa göre % 94 azalma görülmüştür. *Spo0A* geninin, solvent üretim genlerinin ve spor oluşumu için gerekli genlerin transkripsiyonunda gerekli olan düzenleyici protein olduğu belirtilmiştir (Harris vd. 2002).

C. beijerinckii NCIMB 8052'nin *Spo0A* geninin inaktivasyonu ile spor oluşumunun yanı sıra solvent oluşumu da engellendiği, solvent üretiminden sorumlu *adc* ve *ptp* genlerinin doğrudan *Spo0A* geni ile kontrol edildiği açıklanmıştır (Ravagnani vd. 2000).

Clostridium'larda spor oluşumunun başlaması için *Spo0A* geninin aktif hale getirilmesi gerektiği, *Spo0A*'nın *Clostridium'*lardaki aktivasyon mekanizmasının ise henüz bilinmediği açıklanmıştır. Ancak, *Bacillus subtilis* suşunda sporlanmayı başlatan gen ile benzer gen dizilimini gösterdiğinden, *Bacillus subtilis'*deki gibi *Spo0A* geninin aktivasyonu için bütirilfosfat ve kinaz fosforilasyonuna ihtiyaç duyulduğu açıklanmıştır.

*B. subtilis'*te spor oluşumunun başlaması için gerekli olan kinaz fosforilasyonunda, hücre içi ve hücre dışı sinyallerin algılanmasında beş farklı algılayıcı histidin- kinaz bulunduğu anlaşılmıştır (Piggot ve Hilbert 2004). Ancak, kinazların bağlandığı gruplar, belli olmadığından orfan kinaz olarak adlandırılmaktadır ve bu enzimin *C. acetobutylicum*'da da altı farklı tipinin bulunduğu anlaşılmıştır. Bunların dört tanesinin *Spo0A*'nın aktivasyonunda görev yaptığı açıklanmıştır (Paredes vd. 2005). *Clostridium*' larda bütirat kinaz, bütiril fosfatı bütirata çevirerek, Spo0A'nın aktif hale gelmesini önlediği, bütirat kinaz geni (buk) inaktif duruma getirilmiş *C. acetobutylicum* mutantında, bütirat oluşumunda azalma ve buna paralel olarak spor oluşumunun daha erken başlamasıyla solvent konsantrasyonunda artma olduğu görülmüştür (Harris vd. 2000).

C. acetobutylicum P262 suşunun, erken spor oluşturan (granüloz oluşturmayan) SpoA2 mutantı, geç spor oluşturan (granüloz oluşturan ve endospor oluşumundan önce boğumlanma aşaması uzun süren) SpoB mutantının ve anaç suş ile gerçekleştirilen kesikli kültürde, ABE fermentasyonunda SpoA2 mutantının 7.89 g/L solvent üretimi ile en fazla üretimi gerçekleştirdiği anlaşılmıştır. Erken spor oluşturan mutantın daha fazla substrat tüketirken, solvent üretiminin de daha fazla olduğu belirlenmiştir (Largier vd. 1985).

2.2.7 Hücre içi pH

Birçok mikroorganizma hücre içi pH hücre dışı pH'a göre belirli bir aralıkta sabit tutulabilmektedir. Solvent üretimini gerçekleştiren *Clostridium'*lar asidojenik fazda zayıf asitler olan bütirik ve asetik asit oluşturmakta, bu zayıf asitlerin dissosiye olmamış formları hücre membranından rahatlıkla geçebilmekte ve hücre dışı pH ile hücre içi pH arasında bir denge oluşmaktadır. Hücrede hücre içi ve dışı pH arasındaki pH aralığı (ΔpH) yaklaşık olarak 1'dir. *Clostridium*'larda asit üretiminin artması sonucu, ortam < pH 5 olduğunda, hücre içi pH'ın 5,5'in altına düşmediği anlaşılmıştır (Gottwald ve Gottschalk 1985).

Hücre içi pH ATPaz enzimi ile control edilebilmektedir. Bu enzim ATP kullanarak ortamda bulunan H^+ iyonlarının hücre dışına aktararak hücre içi pH'ını dengelemekte, eğer *C. acetobutylicum* bakterileri protonların hücre dışına gönderebilmesi için gerekli ATP'yi üretemezlerse, hücre içi pH' nın beklenmedik şekilde düşebildiği anlaşılmıştır (Bowles ve Elefson 1985).

ATPaz aktivitesinin hücre içi pH'ı kontrolündeki rolünü göstermek için yapılan bir çalışmada, ATPaz inhibitörleri kullanılmıştır (Huang vd. 1986). ATPaz inhibitörleri kullanıldığında hücre içi pH düşük düzeylere gerilediği, ancak pH çok fazla düştüğünde devreye, başka mekanizmalar ile rubredoksinin düşük pH'da proton taşınımını gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Marczak vd. 1984).

Yapılan bir araştırma ile asidojenik fazın sonunda ortam pH'ı en düşük düzeye geldiğinde *C. acetobutylicum* ΔpH değerinin 0.9-1.5 arasında olduğu, ortam pH'nın düşmesine karşın ΔpH 1.2 düzeyinde kaldığı, hücre dışı pH'ın düşmesi sonucu hücre içi pH, ΔpH değerine göre değişim gösterdiği bildirilmiştir. ATCC 4259, ATCC 842, DSM 1731 suşları için sırasıyla hücre içi pH değerleri 6.2, 6.0 ve 5.6 değerlerinin belirlendiği bu çalışmada, değerlerin farklı olması mikroorganizmalar için solvent üretiminde farklı optimum pH değerlerinin bulunduğu saptanmıştır (Gottwald ve Gottschalk 1985).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan patatesler, bölgesel pazarlardan sağlanmıştır.

3.1.1 Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan *Clostridium beijerinckii* DSM 6422, *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731, *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ve *Clostridium acetobutylicum* DSM 6228 suşları Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü koleksiyonundan sağlanmıştır. *Clostridium roseum* suşu ise tez çalışmasında kullanılan patateslerden izole edilerek tanımlanmıştır.

3.1.2 Kullanılan Besiyerleri

TGY -Broth

Bileşimi aşağıda verilen besiyeri damıtık su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

-30 g tripton
-20 g glikoz
-10 g maya özütü
-1 g sistein- HCL
-1 g resazurin

C. acetobutylicum DSM 6228 suşu için bu besiyerine 0.5 g/10 mL Cooked Meat besiyeri (Merck, Germany) ilave edilmiştir.

PDA (Potato Dextrose Agar)

PDA (Oxoid, England) katı besiyeri anaerobik indikatör olarak kullanılan resazurin çözeltisinden litrelik çözeltiye 1mL ilave edilerek hazırlanmıştır.

Fermentasyon Besiyeri

Patatesten ABE üretmek için, değişen oranlarda patates kullanılmıştır. 1 L besiyerinde 100g, 200g, 300g ve 400 g patates kullanılmıştır.

400g patates/L olan besiyerinde:
-1.5 g K_2HPO_4
-0.5 g $FeSO_4$
-0.5 g $ZnSO_4$
-0.5 g $CaCO_3$ (Merck, Germany)
-5 g Maya Özütü (Merck, Germany)
-1 g $(NH_4)_2SO_4$ (merck, Germany)
-1 g Sistein-HCl (Merck, Germany)
-1 g Sistein-HCl + 2.5 g Glikoz (Merck, Germany)

Patates besiyerlerinde farklı pH değerlerinde denemeler yapılmış ve pH ayarlamaları için 1 N NaOH ve 1 N HCl çözeltileri kullanılmıştır

3.1.3 Besiyeri Sterilizasyonu

Çalışma boyunca steril olarak kullanılması gereken tüm malzemeler, besiyerleri, çözeltiler ve kimyasallar otoklavda (CL-40M Alp, Japain) 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

3.2 Yöntem

Çalışmada kullanılacak olan patates, uygulanacak kimyasal ve mikrobiyolojik analizlere kadar 4 ^{0}C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1 Bütanol üreten bakterilerin izolasyonu

Bütanol üreten *Clostridium*'ların izolasyonu için toprak,su, patates vb. kaynaklardan alınan örnekler azot gazı altında anaerobik koşullarda vida kapaklı sızdırmaz tüplerde bulunan TGY sıvı besiyerine ekilmiş ve 72 saat süreyle 37 °C sıcaklıkta inkübatörde (Shellab, USA) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonda gaz oluşumu gözlenen tüplerden Petri'lerdeki PDA katı besiyerine anaerobik ortamda sürme yöntemi ile ekim yapılıp, anaerobik jar içinde 37 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat süresince Petri'lerde oluşan koloniler 10 mL'lik TGY sıvı besiyerlerine alınarak aynı koşullarda inkübe edilmiştir. Gelişme gösteren izolatlar basit boyama ve Gram boyama yapılarak, hücre morfolojisi incelenmiş, hücre morfolojisine göre *Clostridium*'lar ile benzer yapı gösteren izolatlar TGY sıvı besiyerine alınarak çoğalmaları sağlanmış ve bu işlem en az iki kez tekrarlanmıştır.

3.2.1.1 İzolatların tanımlanması

3.2.1.1.1 Koloni morfolojisi

PDA katı besiyerinde izolatların, sürme plak yöntemine göre ekimleri gerçekleştirilerek 37 °C'de anaerobik jar içerisinde 3 gün süreyle inkübasyonu sonucu oluşturdukları tek koloniler incelenmiş, koloniler opaklık, boyut, şekil, profil ve renk açısından değerlendirilerek koloni morfolojileri tayin edilmiştir.

3.2.1.1.2 Basit boyama

Elde edilen izolatların hücre şekillerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak basit boyamaları yapılmıştır. Bu amaçla, lam üzerine yayılan bakteri kültürleri açık havada kurutulduktan sonra alevden geçilmek suretiyle tespit edilmiştir. Tespit işleminden sonra lam üzerine Coomassie Brilliant Blue boya solüsyonu ilave edilip, 3-4 dakika beklendikten sonra boya damıtık su ile yıkanmıştır. Lam açık havada kurutularak üzerine immersiyon yağı (Merck, Germany) damlatılarak 1000X büyütme güçlü ışık mikroskobunda (CME Leica, USA) incelenmiştir (Temiz 2000).

3.2.1.1.3 Gram boyama

Gram boyama, 18 saatlik inkübasyon sürecinin ardından bakteri kültürlerinden öze yardımıyla bir miktar alınarak lam üzerine yayılmış ve açık havada kuruması beklendikten sonra alevden geçirilerek tespit edilmiştir. 60 saniye kristal viyole ile muamele edildikten sonra lugol çözeltisi ile yıkanmış ve 60 saniye beklendikten sonra 5-10 saniye süresince alkol ile oluşan renk kompleksi giderilmiştir. Lam tekrar damıtık su ile yıkanmış ve üzerine karşıt boya olarak safranin eklenmiştir. 60 saniye safranin ile muamele edildikten sonra boya damıtık su ile yıkanıp lamın kuruması beklenmiştir. Kurumuş olan preparat, mikroskop altında immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifle incelenmiştir. Gram boyama sonucunda mavi-mor renkli bakteriler Gram pozitif, pembe-kırmızı renkli bakteriler ise Gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Aydın 2004).

3.2.1.1.4 Hücre morfolojisi

Gram boyama aşamasında mikroorganizmaların morfolojik durumu da incelenmiştir. İzole edilen bakterilerin şekilleri (kok ya da basil) belirlenmiş, bakteri dışındaki mikroorganizmalar ise farklı morfolojileri ile ayırt edilerek çalışma kapsamından çıkartılmıştır.

3.2.1.2 DNA izolasyonu

Seçilen izolatların DNA' ları izolasyon kiti (Macherey-Nagel, NucleoSpin Tissue® Kit) ile elde edilmiştir.

3.2.2 Kullanılan besiyerleri

3.2.2.1 TGY sıvı besiyeri

Hazırlanan sıvı besiyeri 10 ml olacak şekilde sızdırmaz ve vida kapaklı cam tüplere alınmıştır. İçerisinde besiyer bulunan tüpler 5 dakika süre ile azot altında soğurulduktan sonra kapatılmış ve 121 °C'de 15' süre ile sterilize edilmiştir.

3.2.2.2 Patates besiyeri

Patates besiyeri hazırlanmadan önce besiyerinde kullanılacak patatesler yıkandıktan sonra parçalayıcıda 5 dakika süreyle püre haline getirilmiştir. Püre haline gelmiş olan patates, hazırlanan farklı besiyerleri 100 mL'lik kahverengi şişelere azot gazı altında 50 mL'lik hacimlerde alınmıştır. Cam şişelere alınan besiyeri 5 dakika süre ile azot gazı atmosferine tutulduktan sonra lastik tıpa ve alüminyum kapak kullanılarak kapatılmış ve 121 °C'de 15' süre ile sterilize edilmiştir.

3.2.2.3 PDA besiyeri

PDA (Oxoid, England) katı besiyerinden hazırlanan besiyeri sterilize edildikten sonra steril Petri'lere ortalama 15 mL olacak şekilde dökülmüştür.

3.2.3 Aseton-Bütanol-Etanol (ABE) tayini

ABE tayini berraklaştırma işleminden sonra, gaz kromatografisinde (Schimadzu GC-14B, Japan) yapılmıştır. Gaz kromatografisinde 2 m uzunluğunda, iç çapı 1/8 inch olan, Chromosorb 101 (80/100 mesh) ile doldurulmuş cam kolon kullanılmıştır.

Örneklerin hazırlanması:

Alınan örnekler, gaz kromatografisinde analizden önce berraklaştırılmıştır ve bu amaçla aşağıdaki yöntem kullanılmıştır.

Carrez I Çözeltisi: 15 g potasyum ferrosiyanür ($K_4Fe(CN)_6.3H_2O$) damıtık suda çözülür ve 100 mL'ye tamamlanır.

Carez II Çözeltisi: 30 g çinkosülfat ($ZnSO_4.7H_2O$) damıtık suda çözülüp 100 mL'ye tamamlanır.

İşlem:

Santrifüj edilmiş örneğin berrak kısmından 1 mL 1.5 mL'lik Eppendorf tüpüne alınmıştır. Berraklaştırma amacıyla örnek üzerine 0.1 mL Carrez I ve 0.1 mL Carrez II çözeltileri ilave edilip her aşamada dikkatlice karıştırılmıştır. Santrifüjde (Mikro 22R Hettich Zentrifugen, Germany) 6.000 rpm'de örnekler 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Üstteki berrak kısımdan bir enjektör yardımıyla (Hamilton, Reno, Nevada, A.B.D.) 1 μL alınarak kolona enjekte edilmiştir (Gapes vd. 1996). Değerlendirmede kromatografik saflıktaki aseton, etanol ve bütanolden (Merck, Germany) hazırlanan standart çözeltilerden her ölçüm öncesi kolona verilerek elde edilen sonuçlardan yaralanılmıştır

Gaz kromatografisi çalışma koşulları:

Kolon sıcaklığı: 160°C
Enjeksiyon sıcaklığı: 220°C
Dedektör sıcaklığı: 250°C
Taşıyıcı gaz: Azot
Örnek miktarı: 1 µL

3.2.4 Toplam şeker tayini

Toplam şeker tayininde, örneklerin hazırlanmasında 1 mL örneğe 9 mL saf su ilave edilerek örnekler seyreltilmiştir. Örneklere 1µL α-amilaz enzimi (Sigma, E.C.3.2.1.1) ilave edilerek laboratavuar sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Örneklere 5 µL amiloglikozidaz enzimi (Sigma, E.C.3.2.1.3) ilave edilerek 55 °C'lik örnekler su banyosunda 4 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda laboratuvar sıcaklığına gelmesi beklenen örneklerin, toplam şeker tayini, modifiye edilmiş Miller yöntemi'ne göre (Forouhi ve Gunn, 1983) glikoz eşdeğeri indirgen şeker olarak DNS (3,5-Dinitrosalisilik asit) kullanılarak yapılmış ve absorbans değerleri spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700 Japan) belirlenmiştir.

Çözeltilerin hazırlanışı:

DNS çözeltisi: 10 g DNS, 10 g NaOH ve 1.6 g fenol önce bir miktar damıtık su içerisinde çözülerek 1 L'ye litreye tamamlanır. Kullanılmadan önce, çözeltinin her 100 mL'si için % 0.1'lik sodyum sülfit çözeltisinden 1 mL eklenmiştir.

Rachelle çözeltisi: 40 g sodyum-potasyum tartarat damıtık suyla 100 mL'ye tamamlanır.

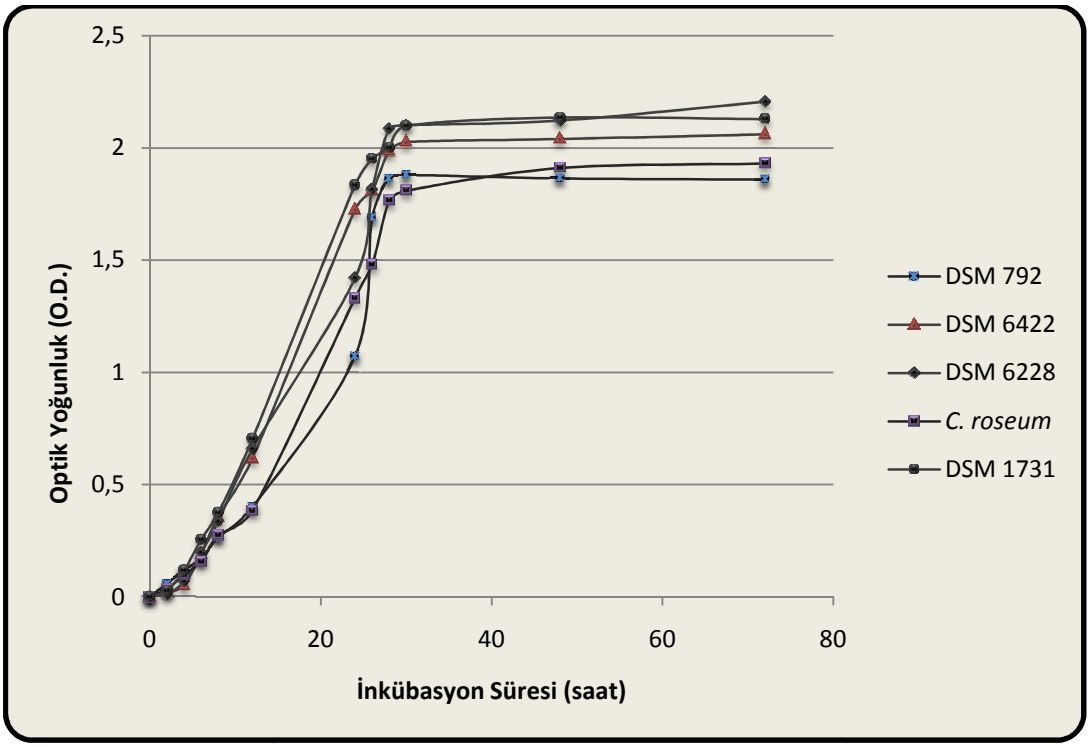
İşlem:

Hazırlanan örnekler damıtık su ile yeterli oranda seyreltilir. Seyreltilmiş örneklerden 1 mL alınıp üzerine 2 mL DNS çözeltisi ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Sıcak su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra, oluşan sarı-kahve rengin stabilizasyonu için gerekli oranda seyreltilmiş örnek üzerine 1 mL Rachelle tuzu ilave edilip tekrar karıştırılmıştır. Laboratuvar sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra üzerine 5 mL damıtık su ilave edilip tekrar karıştırılmış ve spektrofotometrede 575 nm dalga boyunda ve ışıkta saf suya karşı absorbans değerleri ölçülmüştür.

0-10 g/L glikoz içeren çözeltiler yardımıyla önceden çizilen standart eğri kullanılarak yapılmıştır. (EK 1)

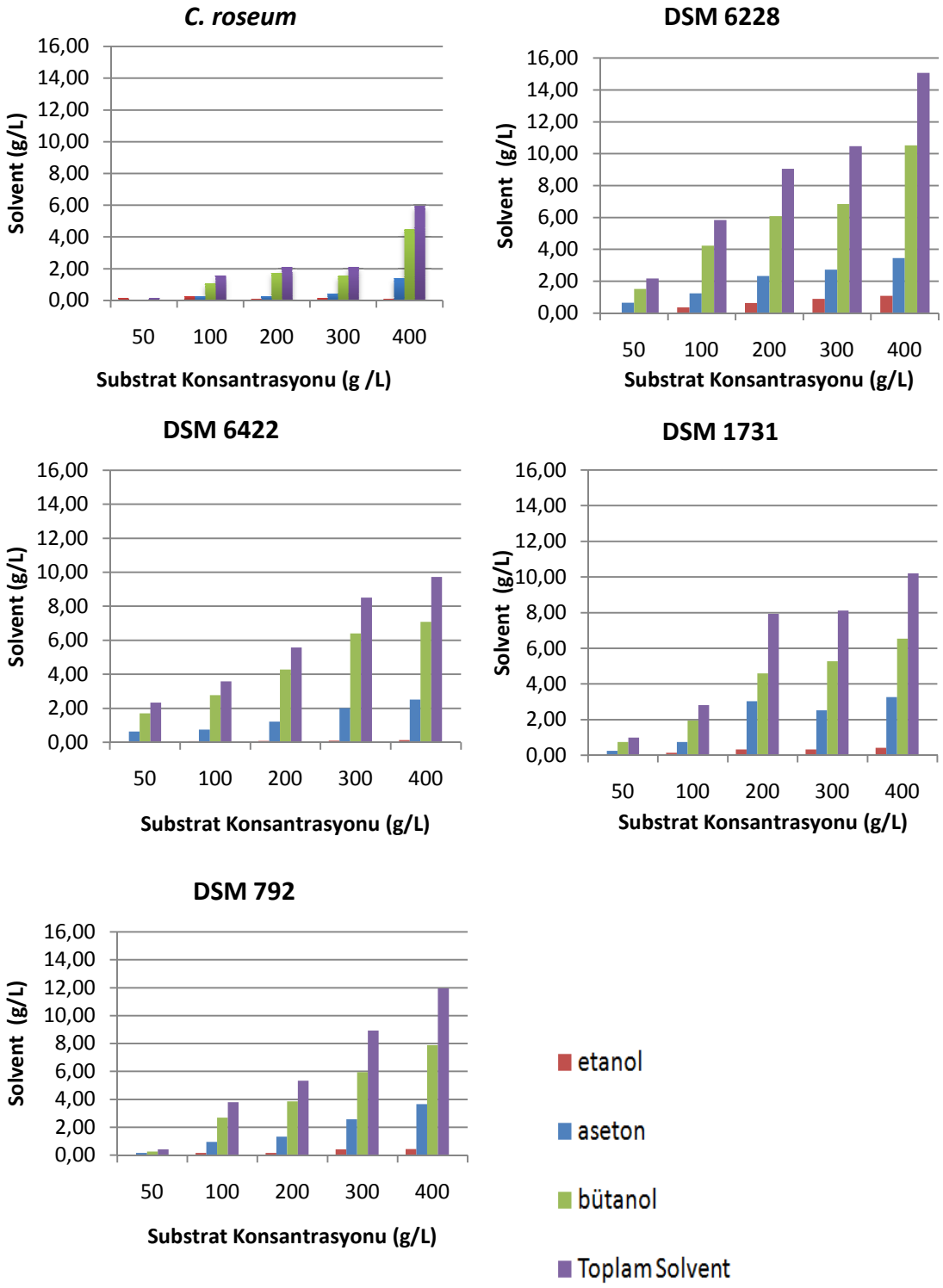
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Patatesten izole edilen ve bütanol üretim yeteneğine sahip mikroorganizmaların tanıla testleri yapılmış ve izolatın gram boyama testi sonucunda mavi-mor renkli hücreler nedeni ile Gram pozitif olduğu belirlenmiştir. Koloni morfolojisi incelendiğinde ABE üreten izolatın PDA katı besiyerinde koyu merkezli, 4-5 mm çapında sarı renkli koloniler oluşturduğu belirlenmiştir. Hücre morfolojisi incelendiğinde izolatın çubuk şekilli ve spor oluşturma yeteneğine sahip hücreler olduğu belirlenmiştir. Tanımlama testlerinin ardından gerçekleştirilen DNA izolasyonu sonucunda, DNA 16S rRNA gen diziliminin % 95 benzerlik ile *C. roseum* suşu olduğu tanımlanmıştır. Anaerobik fermentasyon koşullarında *C. acetobutylicum* DSM 6228, DSM 1731, DSM 792, *C.beijerinckii* DSM 6422 ve *C. roseum* suşlarına ait 37°C inkübasyon sıcaklığında oluşturulan gelişme eğrileri şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 *Clostridium* suşlarına ait gelişme eğrileri

4.1 Farklı Substrat Konsantrasyonlarında ABE Üretimi

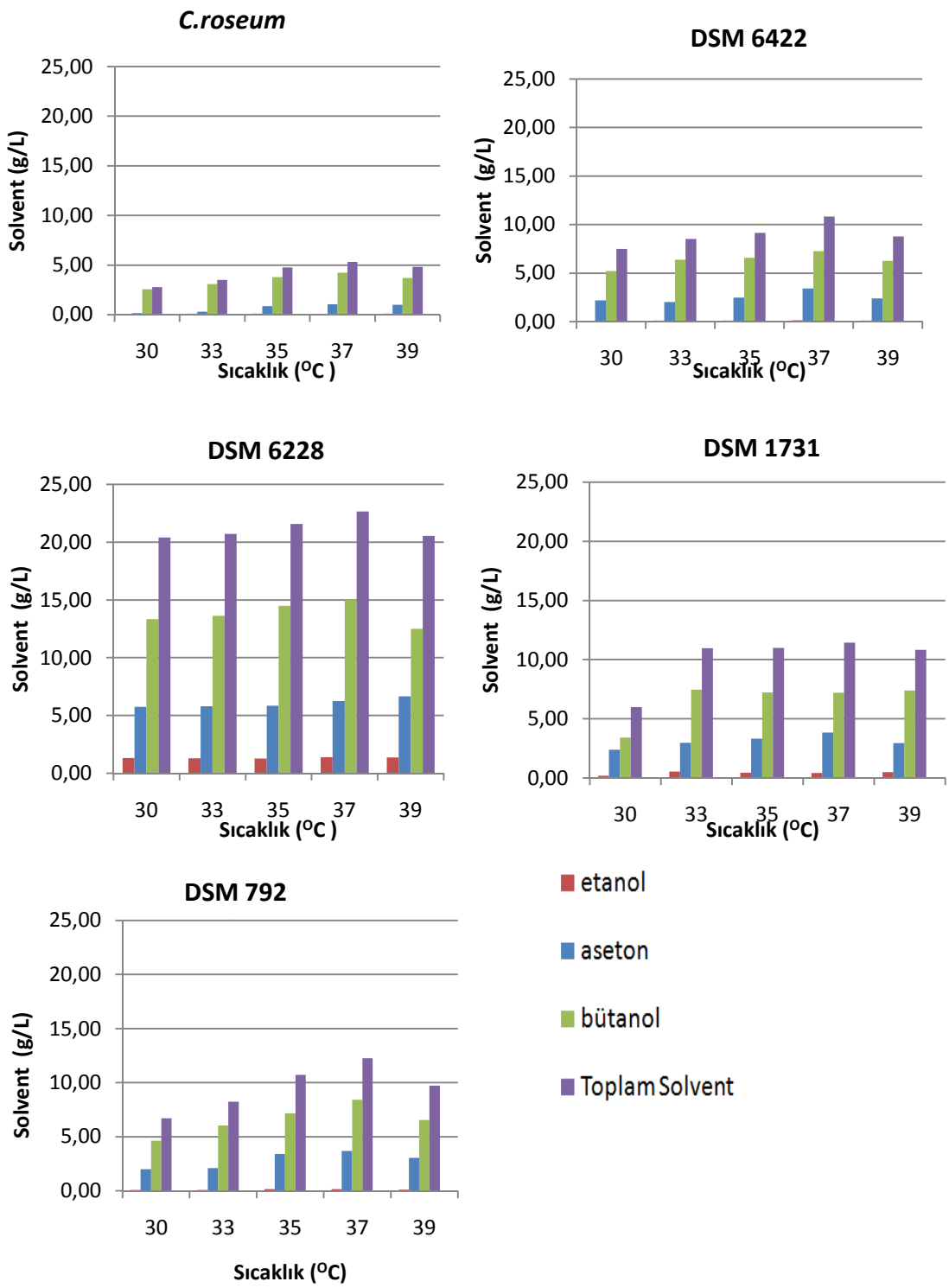


Şekil 4.2 Farklı patates konsantrasyonlarında, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu

Değişen substrat konsantrasyonunun ABE oluşumuna etkisinin belirlendiği çalışmada, litrede 50 g, 100 g, 200 g ve 400 g patates içeren besiyerinde en yüksek bütanol ve toplam solvent üretiminin, bütün bakteriler için 400 g patates içeren besiyerinde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1).

Daha yüksek patates konsantrasyonlarında ise yüksek substratın neden olduğu viskoziteden dolayı çalışmak mümkün olmamıştır. 400 g/L'ye kadar olan patates konsantrasyonunda ABE üretim miktarları patates olarak artmıştır. En düşük substrat konsantrasyonunun olduğu 50 g/L patates olarak hazırlanan besiyerinde bakterilerin ABE üretim konsantrasyonları incelendiğinde *C. acetobutylicum* DSM 6228, *C. acetobutylicum* DSM 1731, *C. acetobutylicum* 792 ve *C. beijerinckii* DSM 6422 suşlarının bu konsantrasyonda etanol üretemedikleri saptanmıştır. Elde edilen bu sonuç için substrat limitli bir ortamda bu suşların karbon kaynağı olarak kullandıkları patatesten öncelik olarak aseton ve bütanol üretim yoluna yöneldikleri söylenebilir. *C. roseum* suşu ise 50 g patates/L olarak hazırlanmış olan besiyeri ortamında etanol üretimi gerçekleştirirken bütanol ve aseton üretimi gerçekleştirmediği saptanmıştır. Aseton ve bütanol üretimi için öncelikle asidojenik fazda asetik ve bütirik asit gibi organik asitlerin oluşumlarının ardından kritik pH değerine gelindiğinde aseton ve bütanol çevrimi başlamaktadır. Etanol üretimi, bütanol ve aseton üretiminden bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Etanol üretimi ve bütanol üretimini birbirinden ayıran iki önemli enzim söz konusudur. Asetaldehit dehidrogenaz enziminin aktif hale gelmesi ile etanol üretimi başlatılırken bütiraldehit dehidrogenaz enziminin aktif hale gelmesiyle bütanol üretimi başlatılmaktadır (Jones ve Woods 1986). *C. roseum* suşunun 50 g patates/L besiyerinde sadece etanol üretimi, substratın bütanol üretimi için yetersiz kaldığını göstermektedir.

4.2 Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarında ABE Üretimi



Şekil 4.3 Farklı sıcaklıklarda 400 g/L patates besiyerinde ABE ve toplam solvent oluşumu

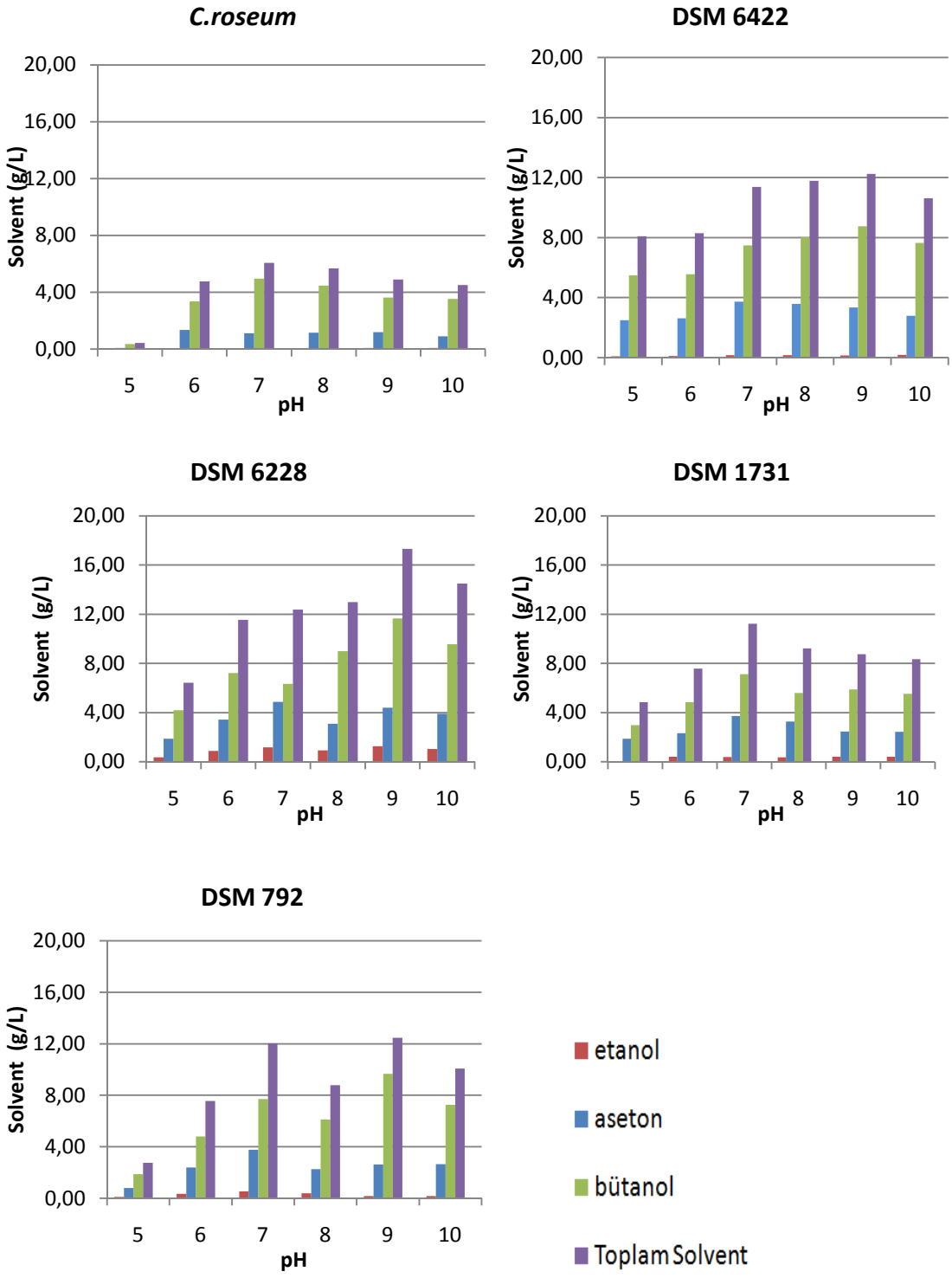
Sıcaklığın solvent oluşumuna etkisinin belirlendiği çalışmada, patates besiyerinde 5 farklı *Clostridium* suşunun 30 °C, 33 °C, 35 °C, 37 °C ve 39 °C olmak üzere 5 farklı sıcaklık derecesinde 3 gün inkübasyon sonunda oluşturduğu solvent oranları belirlenmiştir. Şekil 4.3' de görüldüğü gibi denenen tüm inkübasyon sıcaklıklarında beş suşun da gelişebildiği görülmüştür. *Clostridium'* ların optimum gelişme sıcaklıkları 35 °C ile 37 °C arasında olduğu bilinmektedir (McNeil ve Kristiansen 1985). Tüm suşlar toplam solvent ve bütanol konsantrasyon yeteneklerine göre değerlendirildiğinde, en yüksek 37 °C'de toplam solvent oluşumu saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 *Clostridium* suşlarının 37 °C'deki bütanol ve toplam solvent üretim miktarları

Bakteri Adları	Bütanol Miktarı (g/L)	Toplam Solvent Miktarı (g/L)
C. roseum	4.23	5.32
C. acetobutylicum DSM 6228	15.02	22.65
C. beijerinckii DSM 6422	7.27	10.80
C. acetobutylicum DSM 792	8.41	12.25
C. acetobutylicum DSM 1731	7.20	11.44

Fermentasyon sıcaklığı 37 °C'den 39 °C'ye yükseltildiğinde ABE üretiminin azaldığı görülmüştür. McNeil ve Kristiansen (1985), yüksek sıcaklığın etkisi ile hücre membranının lipid yapısındaki doymamış yağ asitlerinin doymuş yağ asitlerine oranının artmasını, ortamda artan bütanol konsantrasyonunun hücre membranının yapısını bozması ve hücre gelişimini engellemesini solvent üretim miktarındaki azalmanın nedenleri olarak göstermiştir.

4.3 Farklı pH Değerlerine Sahip Besiyerilerinde ABE Üretimi



Şekil 4.4 400 g/L patates besiyerinde 37° C sıcaklıkta değişen pH' larda ABE ve toplam solvent oluşumu

Ortam pH' sının solvent oluşumuna etkisinin belirlendiği çalışmada, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olmak üzere farklı pH değerlerinde *Clostridium* suşlarına ait ABE üretim grafikleri belirlenmiştir.Bu çalışmada izole edilip tanımlanan, *C. roseum* suşu ve *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşu, başlangıç pH değeri 7 olan besiyerinde en yüksek bütanol ve toplam solvent oranına ulaşmışlardır. Soni vd. (1992), *C. acetobutylicum* DSM 792 suşunun 35 °C inkübasyon sıcaklığında, substrat olarak nişastanın kullanıldığı bir çalışmada optimal gelişmenin görüldüğü ve toplam solvent üretimin gerçekleştiği pH değerinin 4.4 olduğunu bildirmişlerdir. *C. acetobutylicum* bakterilerinin solvent üretimi için amilolitik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Substrat olarak nişasta kullanılan bir besiyerinde α-amilaz ve glukoamilaz enzimi salgılamaktadırlar. α-amilaz ve glukoamilaz enzim üretimin en yüksek olduğu pH olan 4.4'te enzim aktivitesi sebebiyle substrat kullanımı ve solvent üretiminin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. *C. acetobutylicum* DSM 1731 ve *C. roseum* suşları nötral pH'da gelişme gösterebilmektedir. Başlangıç pH'nın 7 olduğu besiyerinde mikroorganizma düşük düzeyde de olsa α-amilaz ve glukoamilaz sentezi gerçekleştirip ortamda makromoleküler yapıdaki şekeri monomerlerine ayrıştırıp solvent üretimi için gereken asidojenik fazı başlatabildiği saptanmıştır. Asidojenik fazın başlamasıyla, başlangıçta 7 olan pH daha düşük seviyelere inmektedir. Asidojenik fazdan solventojenik faza geçilebilmesi için ortam pH'nın optimal değerleri 5.0-5.5 arasında olması gerektiği bildirilmiştir (Bahl vd. 1982a, Ezeji *vd*. 2003). *C. acetobutylicum* DSM 6228, *C. acetobutylicum* DSM 792 ve *C. beijerinckii* DSM 6422 suşları ise farklı başlangıç pH'larındaki ortamlardaki gelişme ve solvent üretim oranları incelendiğinde pH 9'da en yüksek bütanol ve toplam solvent üretiminin oluştuğu anlaşılmıştır. Yan ve Chen (1990), *C. beijerinckii* NRRL B592 (*C. beijerinckii* DSM 6422) ile gerçekleştirdiği çalışmada, optimal ABE gelişme yeteneğinin pH 7'de olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, pH 9'da inkübasyon sonundaki *C. beijerinckii* DSM 6422'nin ABE değerlerine bakıldığında 3.34 g/L aseton, 0.15 g/L etanol ve 8.76 g/L bütanol üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir. pH 7'de gerçekleştirilen üretim sonucunda ise aseton 3.73 g/L, etanol 0.17 g/L ve bütanol 7.48 g/L olarak ölçülmüştür ve pH 9'da gerçekleştirilen fermentasyon sonucu sadece elde edilen bütanol miktarının daha yüksek olduğu görülmektedir.

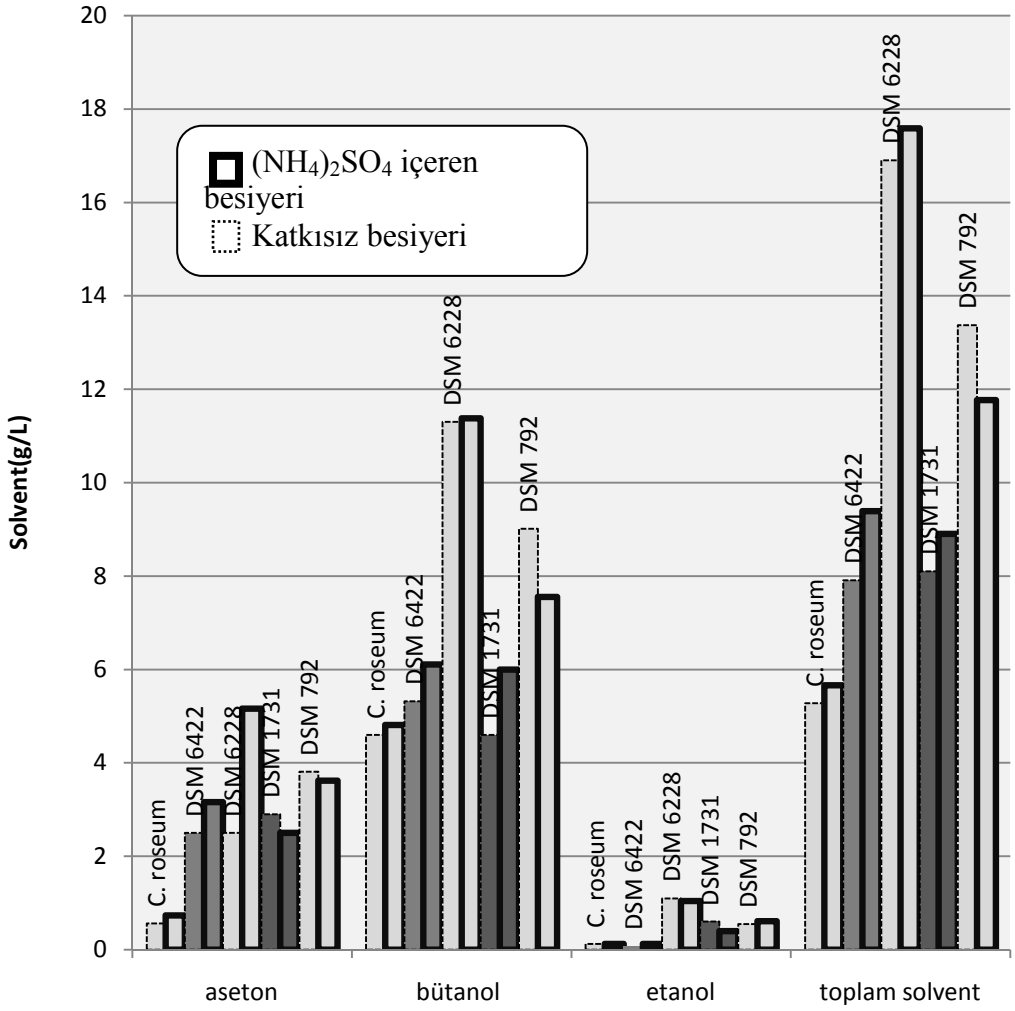
Yan ve Chen (1990), *C. beijerinckii* NRRL B592 ile gerçekleştirdikleri çalışmada asetil-CoA'dan aldehit ve CoA'nın oluşumunu katalizleyen aldehit dehidrogenaz (ALDH) enziminin aktivitesinin pH 7'de en fazla olduğunu, ters reaksiyonunun yani aldehitlerden asetil-CoA oluşumunun ise pH 6.5'ten pH 9.5'a gidildikçe enzim aktivitesinin arttığını ifade etmişlerdir. Beklenen miktarlarda aseton ve etanol oluşumu için gerekli aldehitlerin pH 9'da daha aktif olan ALDH enziminin geri reaksiyonu sebebiyle etanol ve aseton oluşumunu engellemesinin ve geri reaksiyonla elde edilen asetil-Co A'nın bütanol üretimi için kullanılmasının, aseton ve etanol üretiminin pH 9'da, pH 7'ye göre daha düşük olmasına yol açabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

C. acetobutylicum DSM 792 suşunun optimal solvent üretimi gerçekleştirdiği pH değerinin 4.4 olduğu bildirilmiştir (Soni vd. 1992). Başlangıçta fermentasyon pH 9'da başlatılmış ancak, fermentasyon sürecinde asit oluşumunun pH'ı düşürmesi ile bu değerin optimal pH değerine ulaştığı söylenebilir.

Beş farklı *Clostridium* suşu için oluşturulan farklı pH değerlerindeki ABE üretiminde elde edilen sonuçlarının verildiği grafikte (Şekil 4.4), ortamın başlangıç pH değerlerinin 5 ve 6 olduğu fermentasyonlarda 72 saat sonunda elde edilen ABE konsantrasyonlarında, pH 7'de elde edilen değerlere göre oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Başlangıç pH'nın asidik olması nedeniyle asidojenik faz sırasında oluşan asitlerin ortam pH'nı daha da asidik duruma getirdiği, asidojenik fazdan solventojenik faza geçilmesi için gereken kritik pH değerinin 5.0-5.5 arasında olması gerektiği belirtilmiştir (Ezeji vd. 2003). Bu kritik pH değerine gelindiğinde ortamda asidojenik faz sırasında oluşmuş olan organik asitlerin aseton, bütanol ve etanole çevrimi başlamaktadır. Bu nedenle, ortam pH'nın 7'den düşük olduğu ortamlarda başlatılan fermentasyonlarda asidojenik fazın kısa sürmesi nedeniyle, ortamda bulunan asidojenik faz ürünlerinin konsantrasyonunun düşük olması sonucu oluşan solvent miktarının da düşük değerlerde olduğu söylenebilir.

4.4 Farklı Katkılar ile Hazırlanmış Besiyeri Ortamında ABE Üretimi

ABE üretimin optimal olduğuna karar verilen 400 g/L patates içeren besiyerine1.5 g/L K_2HPO_4, 0.5 g/L $FeSO_4$, 0.5 g/L $ZnSO_4$, 0.5 g/L $CaCO_3$, 5 g/L maya özütü, 1 g/L $(NH_4)_2SO_4$ ve 1 g/L sistein-HCl eklenerek her bir katkının ABE üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. $(NH_4)_2SO_4$ eklenen besiyerinde bakterilerin ABE üretim miktarları incelenmiş ve şekil 4.5'de verilmiştir.



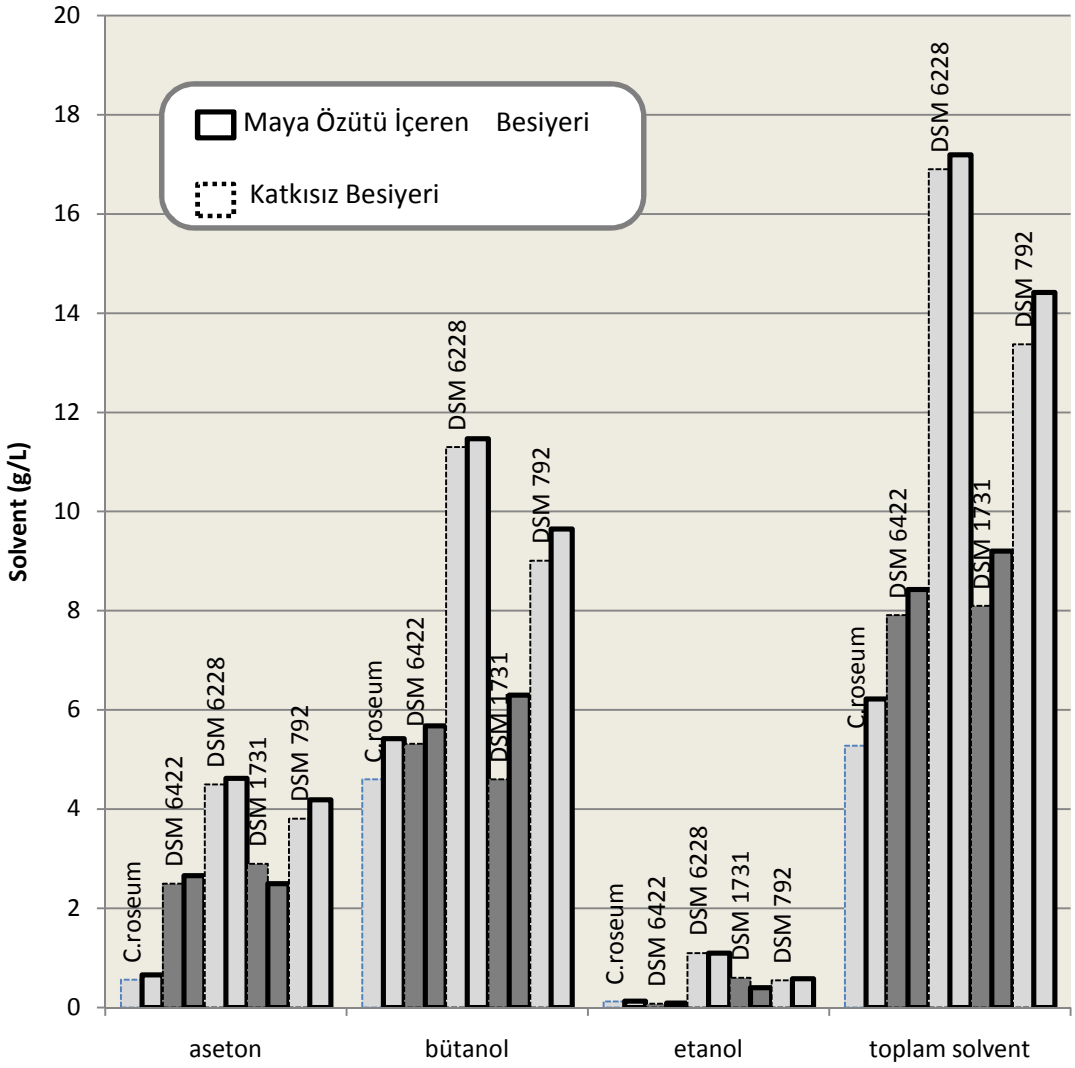
Şekil 4.5 $(NH_4)_2SO_4$ içeren patates besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu

C. roseum suşu katkısız besiyeri ortamında 4.60 g/L bütanol ve 5.28 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirirken, amonyum sülfat içeren besiyeri ortamında 4.81 g/L bütanol ve

5.66 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Amonyum sülfat içeren besiyerinde bütanol üretiminin % 4.50 ve toplam solvent üretiminin ise % 7.20 artış gösterdiği ve çok önemli bir atış olmadığı görülmüştür. *C. beijerinckii* DSM 6422 suşunun katkısız besiyeri ortamında 5.32 g/L bütanol ve 7.91 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirirken amonyum sülfat içeren besiyeri ortamında 6.11 g/L bütanol ve 9.39 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Amonyum sülfat içeren besiyerinde bütanol üretiminin % 14.80 ve toplam solvent üretiminin ise % 18.70 artmış olduğu saptanmıştır. *C. acetobutylicum* DSM 6228 suşunun katkısız besiyeri ortamında 11.30 g/L bütanol ve 16.90 g/L toplam solvent üretmiş, amonyum sülfat içeren besiyeri ortamında ise 11.38 g/L bütanol ve 17.59 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirmiştir. Amonyum sülfat içeren besiyerinde bütanol üretiminin % 1 ve toplam solvent üretiminin ise % 4.10 artmış olduğu belirlenmiştir. *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşunun katkısız besiyeri ortamında 4.60 g/L bütanol ve 8.10 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirirken, amonyum sülfat içeren besiyeri ortamında 6.00 g/L bütanol ve 8.90 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Amonyum sülfat içeren besiyerinde bütanol üretiminin % 35 ve toplam solvent üretiminin ise % 9.90 artmış olduğu görülmüştür. *C. acetobutylicum* DSM 792 suşunun katkısız besiyeri ortamında 9.01 g/L bütanol ve 13.37 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirirken, amonyum sülfat içeren besiyerinde 7.55 g/L bütanol ve 11.77 g/L toplam solvent ürettiği görülmüştür. Amonyum sülfat içeren besiyerinde bütanol üretiminin % 16.20 ve toplam solvent üretiminin ise % 12.10 azalmış olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen bulgulara gore, amonyum sülfatı azot kaynağı olarak kullanan C. *roseum*, C. *acetobutylicum* DSM 6228, C. *beijerinckii* DSM 6422 ve *C. acetobutylicum* DSM 1731 bakterilerinin amonyum sülfat bulunan ortamda, katkısız besiyeri ortamına göre daha yüksek bütanol ve toplam solvent üretimi gerçekleştirdikleri belirlenmiştir. Wiesborn ve *vd*. (1988), *C. acetobutylicum* ATCC 824 suşunde izole ettikleri CoA transferaz enziminin stabilitesini amonyum sülfat varlığında koruduğunu bildirmişlerdir. CoA transferaz enzimi, gelişme ortamında oluşan organik asitlerin solventlere dönüştürülmesi işlemini başlatmada yer alan önemli bir enzim olduğundan, enzim stabilitesinin sağlanmasının bütanol ve toplam solvent üretim miktarını arttırdığı yönünde değerlendirmek olasıdır. *C. acetobutylicum* DSM 792 suşunun amonyum sülfat

içeren besiyeri ortamında, bütanol ve toplam solvent üretim miktarında azalma belirlenmiştir. Maya özütü ilave edilen besiyeri ortamında bakterilerin ABE üretim miktarları incelenmiş ve sonuçlar şekil 4.6'da verilmiştir.



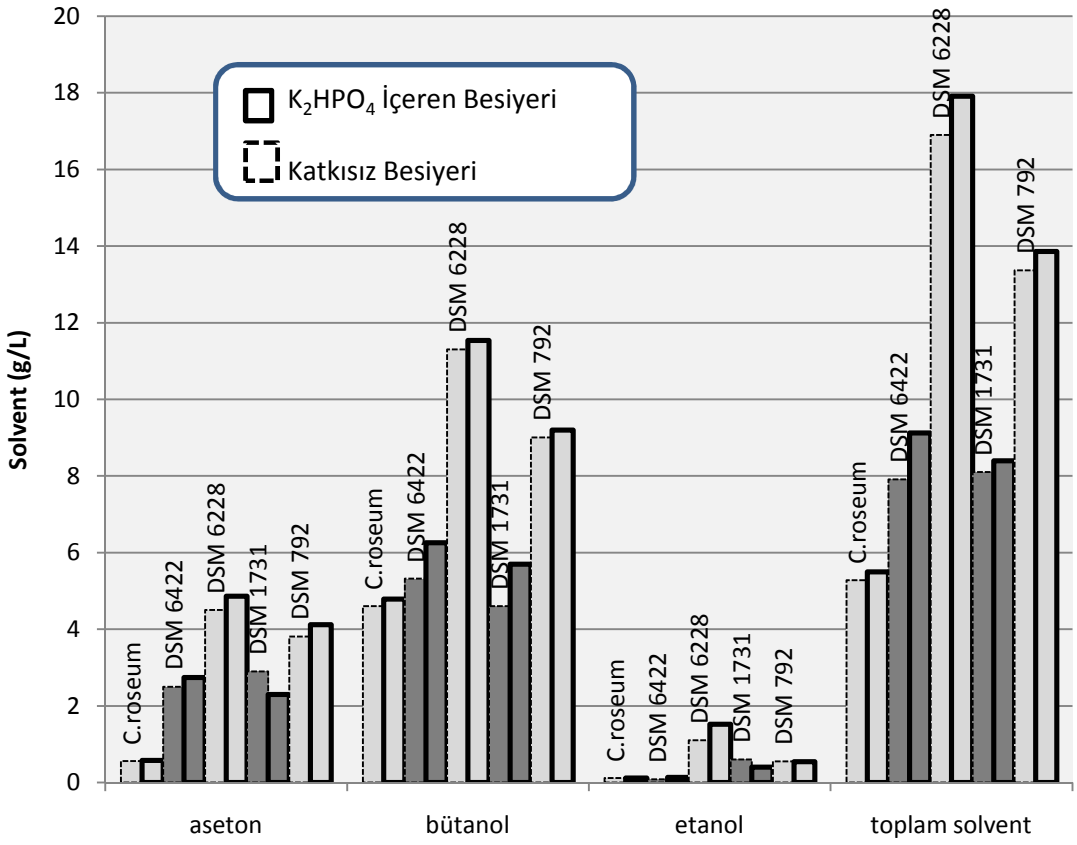
Şekil 4.6 Maya Özütü içeren patates besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu

C. roseum suşu katkısız besiyerinde 4.60 g/L bütanol ve 5.28 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirirken, maya özütü içeren besiyeri ortamında 4.46 g/L bütanol ve 5.20 g/L toplam solvent oluşmuştur. Buna göre maya özütü içeren besiyerinde *C. roseum* suşu bütanol üretimini % 3 ve toplam solvent üretimini ise % 1.50 oranında azalttığı anlaşılmıştır. *C. beijerinckii* DSM 6422 suşunun katkısız besiyeri ortamında 5.32 g/L bütanol ve 7.91 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirirken, maya özütü içeren besiyeri

ortamında 5.68 g/L bütanol ve 8.43 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Bu suş ile yapılan çalışmada amonyum sülfat ilavesi ile bütanol üretiminin % 6.80 ve toplam solvent üretiminin ise % 6.70 artmış olduğu görülmüştür. *C. acetobutylicum* DSM 6228 suşunun katkısız ortamda 11.30 g/L bütanol ve 16.90 g/L toplam solvent oluştururken, maya özütü içeren ortamda 11.47 g/L bütanol ve 17.19 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirdiği görülmüştür. Maya özütü ilavesi ile bütanol üretiminde % 1.50 ve toplam solvent üretiminin ise % 1.70 oranında bir artış olduğu anlaşılmıştır. *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşunun katkısız ortamda 4.60 g/L bütanol ve 8.10 g/L toplam solvent oluştururken, maya özütü ilavesi ile 6.30 g/L bütanol ve 9.20 g/L toplam solvent oluşturduğu belirlenmiştir. Maya özütü içeren besiyerinde bütanol üretiminin % 37 ve toplam solvent üretiminin ise % 13.60 artmış olduğu saptanmış ve bu farkın ilave edilen maya özütünın aseton ve etanol üretiminin değil de bütanol üretimini teşvik ettiği sonucuna varılmıştır. *C. acetobutylicum* DSM 792 suşunun katkısız ortamda 9.01 g/L bütanol ve 13.37 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirirken, maya özütü içeren besiyeri ortamında 9.65 g/L bütanol ve 14.42 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Yapılan hesaplamaya gore maya özütü ilave edilen ortamda bütanol üretiminde % 7.10 ve toplam solvent üretiminde ise % 7.90 azalma olduğu anlaşılmıştır.

Maya özütü sülfür içeren aminoasitlerce fakir olmasına rağmen metionin hariç temel aminoasitleri içermekte, ayrıca tiamin (B1), riboflavin (B2), niasin, pridoksin (B6), pantotenik asit, biotin ve folik asit gibi vitaminlerce de zengin bir katkıdır (Stone 1998). Maya özütünın içeriğine bakıldığında *C. roseum* suşunun gelişimi için gerekli birçok bileşiği içerdiği ve bu nedenle ABE üretim miktarını arttırdığı söylenebilir. Kasap (2002), *C. beijerinckii* NRRL B593 suşunun çoğalma sırasında ortama ilave edilen maya özütünün, bakteri için önemli bir azot kaynağı olduğunu ve solvent üretim miktarını da arttırdığını bildirmiştir.*C. acetobutylicum* DSM 792, DSM 1731 ve DSM 6228 ve *C. beijerinckii* DSM 6422 suşlarının maya özütü bulunan ortamda bütanol ve toplam solvent üretim miktarlarında artış olduğu belirlenmiştir. *C. roseum* suşu ise maya özütü bulunan besiyeri ortamında katkısız besiyerine göre daha az bütanol ve toplam solvent oluşturmuştur ve nedeni anlaşılmamıştır.

K_2HPO_4 ilave edilen besiyeri ile ABE üretimindeki değişim incelenmiş ve sonuçlar şekil 4.7'de verilmiştir.



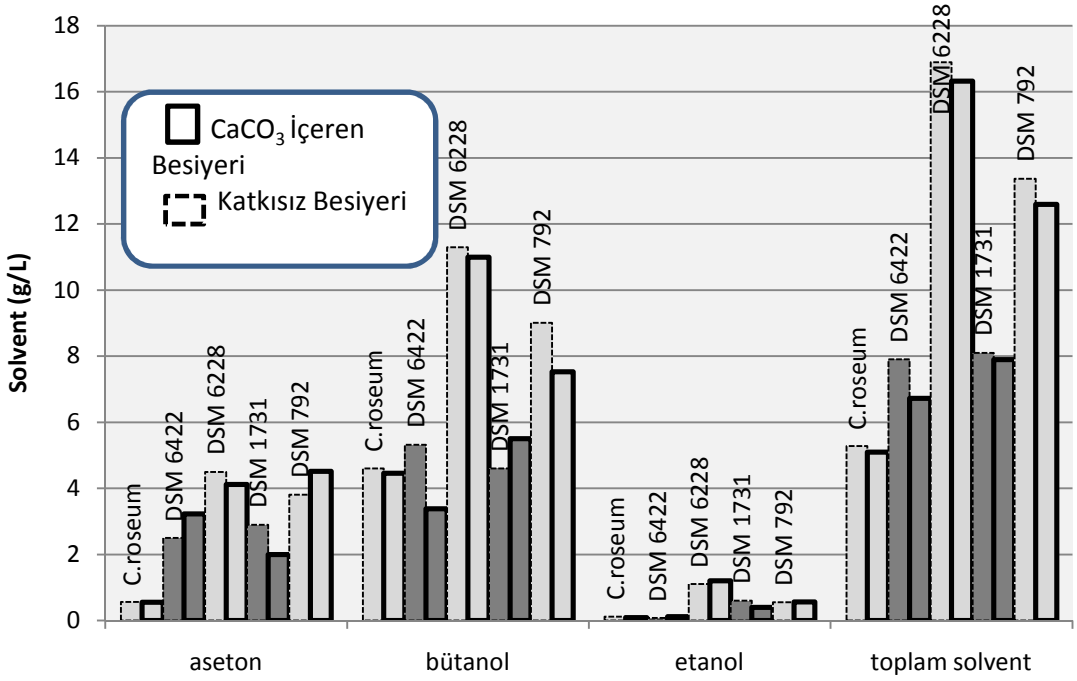
Şekil 4.7 K_2HPO_4 içeren patates besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu

C. roseum suşunun katkısız ortamda 4.60 g/L bütanol ve 5.28 g/L toplam solvent oluştururken, K_2HPO_4 içeren ortamda ise 4.79 g/L bütanol ve 5.50 g/L toplam solvent oluşturduğu belirlenmiştir. Anlaşıldığı gibi K_2HPO_4 içeren besiyerinde bütanol üretiminde % 4.10 ve toplam solvent üretiminin ise % 4.20 artmış olduğu belirlenmiştir.Aynı koşullarda *C. beijerinckii* DSM 6422 suşunun katkısız ortamda 5.32 g/L bütanol ve 7.91 g/L toplam solvent oluşturmuş, K_2HPO_4 içeren ortamda ise 6.26 g/L bütanol ve 9.12 g/L toplam solvent düzeyine ulaşmış ve bütanol üretiminde % 17.70 ve toplam solvent üretiminde ise % 15.30 oranında artış sağlamıştır. *C. acetobutylicum* DSM 6228 suşu ise katkısız ortamda 11.30 g/L bütanol ve 16.90 g/L toplam solvent, K_2HPO_4 içeren ortamda ise 11.54 g/L bütanol ve 17.91 g/L toplam solvent

oluşturmuştur. Buna bağlı olarak, K_2HPO_4 içeren ortamda bütanol üretiminde % 2.10 ve toplam solvent üretiminde ise % 6 artış olmuştur. Sonuçlara göre K_2HPO_4 içeren ortamda bütanol üretiminin yanı sıra etanol üretiminin teşvik edildiği söylenebilir. Şekil 4.6' dan anlaşıldığı gibi *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşunun katkısız ortamda 4.60 g/L bütanol ve 8.10 g/L toplam solvent oluşturduğu, bu oran K_2HPO_4 içeren besiyerinde 5.70 g/L bütanol ve 8.40 g/L toplam solvent oranına ulaşmıştır. Bu koşulda K_2HPO_4 ilavesi ile bütanol üretiminde % 23.90 ve toplam solvent üretiminde %3.70 artış belirlenmiştir. Toplam solvent üretiminin artış yüzdesi ve bütanol üretimi artış yüzdesi arasındaki farkın yüksek olmasının sebebinin, K_2HPO_4 içeren besiyerinde aseton ve etanol üretimine kıyasla bütanol üretiminin teşvik edilmesi olarak yorumlanmıştır. *C. acetobutylicum* DSM 792 suşunun katkısız ortamda 9.01 g/L bütanol ve 13.37 g/L toplam solvent düzeyine ulaşmış, K_2HPO_4 içeren besiyeri ortamında 9.20 g/L bütanol ve 13.86 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirmiştir. Burada K_2HPO_4 içeren besiyerinde bütanol üretiminin % 2.10 ve toplam solvent üretiminin ise % 3.70 artmış olduğu hesaplanmıştır.

Monot vd. (1982), *C. acetobutylicum* bakterisinin K^+ kaynağı olarak KCl kullanılan bir çalışmada 0.6-8 g/L oranında KCl ialve edilen ortamda toplam solvent ve bütanol üretimini teşvik ettiğini, 12 g/L oranında ise inhibe edici özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Ezeji vd. (2003)*, C.beijerinckii BA 101* suşunun sürekli fermentasyon ile mineral ilaveli ortamda, substrat tüketimini arttırdığını bildirmişlerdir. Buna gore *C. roseum* suşu, *C. acetobutylicum* DSM 6228, 1731, 792 ve *C. beijerinckii* DSM 6422 suşlarının ABE üretimlerinin 1.50 g/L K_2HPO_4 içeren ortamda indüklendiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada, $CaCO_3$ ilavesinin ABE üretimine etkileri de araştırılmıştır ve elde edilen sonuçlar şekil 4.8'de verilmiştir.



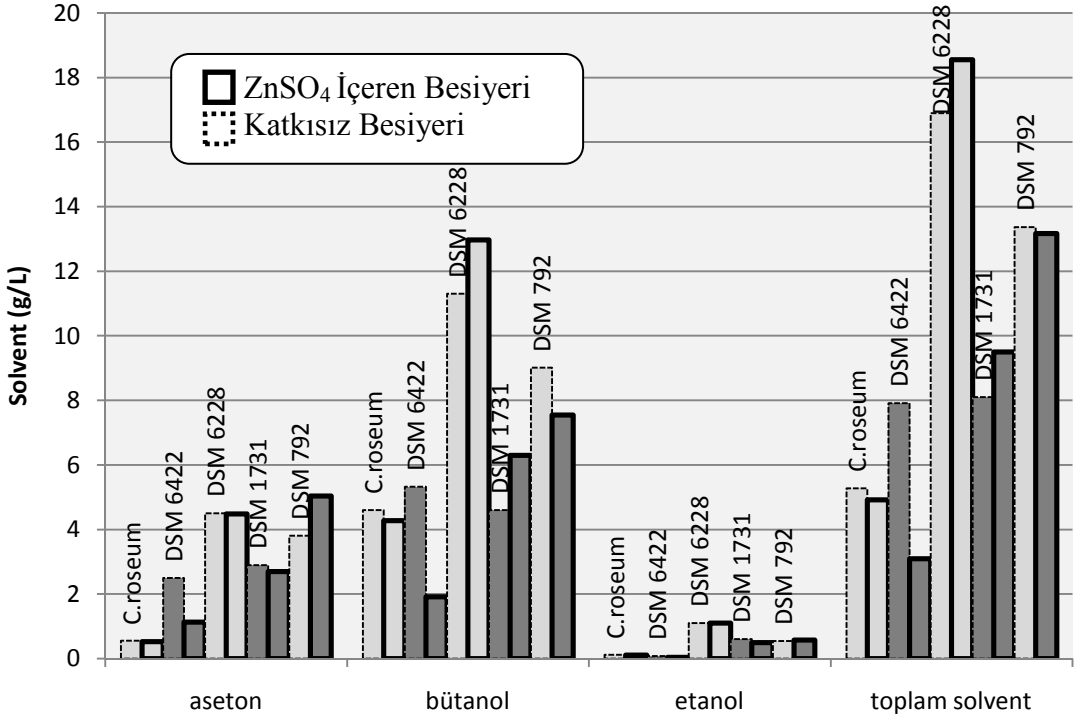
Şekil 4.8 $CaCO_3$ içeren patates besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu

Bu koşulda, *C. roseum* suşunun katkısız besiyeri ortamında 4.60 g/L bütanol ve 5.28 g/L toplam solvent oluştururken, kalsiyum içeren ortamda 4.46 g/L bütanol ve 5.10 g/L toplam solvent oluşturduğu belirlenmiştir ve buna göre Kalsiyum ilavesininABE oluşumuna önemli bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Aynı koşullarda *C. beijerinckii* DSM 6422 suşu ile yapılan çalışmada bütanol üretiminde % 36 ve toplam solvent üretiminin ise % 15 azalma olduğu belirlenmiştir.

C. acetobutylicum DSM 6228 suşu da katkısız ortamda 11.30 g/L bütanol ve 16.90 g/L toplam solvent, kalsiyum içeren ortamda 11.00 g/L bütanol ve 16.32 g/L toplam solvent oluşturduğu belirlenmiştir. Kalsiyum ilavesi ile toplam solvent üretiminde önemli bir değişim olmadığı anlaşılmıştır.

Kalsiyum ilavesi ile *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşu ile yapılan çalışmada bütanol üretiminde % 19.60 artış ve toplam solvent üretiminde ise % 2.50 azalma olduğu belirlenmiştir. *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile yapılan çalışmada ise benzer sonuçlar elde edilmiş bütanol oranında % 16.40 ve toplam solvent oranında ise % 5.80' lik azalma olduğu belirlenmiştir. Kanouni vd. (1998), *C. acetobutylicum* ATCC 824 suşu ile yapılan çalışmada organik asitler ile reaksiyona girerek ortam pH'nın 4.80'in altına düşmesine engel olmak için gelişme ortamına CO_3^+ kaynağı olarak ekledikleri 10 g/L $CaCO_3$'ın organik asitler ile tepkimeye girerek substrat kullanımını ve bütanol üretimini arttırdığını bildirmişlerdir. Buna göre bu çalışmada elde edilen sonuçlar literatürle uyum göstermemektedir. İlave edilen 0.50 g/L $CaCO_3$'ın yetersiz olduğu ve yüksek miktarlarda etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Şekil 4.9'daki grafikten anlaşıldığı gibi , *C. roseum* suşu katkısız besiyerinde 4.60 g/L bütanol ve 5.28 g/L toplam solvent oluştururken, $ZnSO_4$ ilaveli besiyeri ortamında 4.27 g/L bütanol ve 4.92 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirdiği saptanmıştır. Bütanol üretim miktarı % 7.10 ve toplam solvent miktarının ise % 6.80 azalmış olduğu belirlenmiştir.



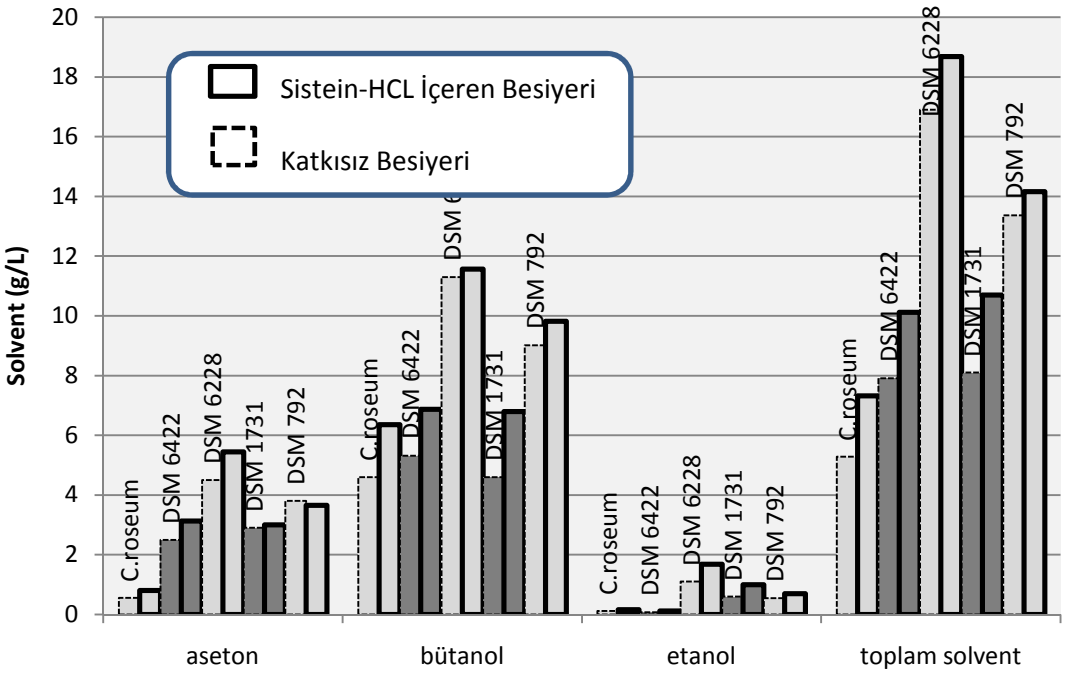
Şekil 4.9 $ZnSO_4$ içeren patates besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu

Aynı koşullarda, *C. beijerinckii* DSM 6422 suşu katkısız besiyerinde 5.32 g/L bütanol ve 7.91 g/L toplam solvent üretirken, $ZnSO_4$ içeren besiyeri ortamında 1.91 g/L bütanol ve 3.09 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirmiştir. Bütanol üretim miktarının % 64 ve toplam solvent üretim miktarının % 61 oranında azalmış olduğu saptanmıştır. *C. acetobutylicum* DSM 6228 suşunda ise katkısız besiyeri ortamında 11.30 g/L bütanol ve 16.90 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirirken, $ZnSO_4$ içeren besiyeri ortamında 12.97 g/L bütanol ve 18.55 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirdiği görülmüştür. Bütanol üretim miktarının % 15 ve toplam solvent üretim miktarının % 9.70 artmış olduğu görülmüştür. Aynı oluşum, *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşundada saptanmış, katkısız besiyeri ortamında 4.60 g/L bütanol ve 8.10 g/L toplam solvent üretmiş, $ZnSO_4$ içeren besiyeri ortamında ise 6.30 g/L bütanol ve 9.50 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirmiştir. Bütanol üretim miktarının % 36.90 ve toplam solvent üretim miktarının ise % 17.30 artmış olduğu belirlenmiştir. *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu katkısız besiyeri ortamında 9.10 g/L bütanol ve 13.37 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirirken, $ZnSO_4$ içeren besiyeri ortamında 7.55 g /L bütanol ve 13.17 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirdiği saptanmıştır. Bütanol üretim miktarının % 17 ve toplam solvent miktarının ise % 1.50 azalmış olduğu gözlenmiştir.

Ismaiel vd. (1993), *C. beijerinckii* bakterisinden izole edilen, etanol ve bütanol oluşumu için gerekli olan alkol dehidrogenaz enziminin aktif kısmında Zn^{+2} iyonlarının bulunduğunu bildirmişlerdir. Welch *vd*. (1989), *C. acetobutylicum* bakterisinin $NADH^{+}$ iyonuna bağımlı bütanol dehidrogenaz enziminin aktif kısmında Zn^{+2} iyonlarının bulunduğunu bildirmişlerdir. Literartürden yola çıkarak bu enzimlerin aktif kısmındaki Zn^{+2} iyonlarının bulunduğu ortamda başlatılan bir fermentasyonda enzim akvitesinin artmasına bağlı olarak toplam solvent ve bütanol üretiminin artması beklenmiştir. $ZnSO_4$ bulunan ortamda *C. acetobutylicum* DSM 6228 ve *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşlarının bütanol ve toplam solvent üretiminde gözlenen artış literaturü desteklerken, *C. acetobutylicum* DSM 792, *C. beijerinckii* DSM 6422 ve *C. roseum* suşlarının bütanol ve toplam solvent üretim miktarındaki azalma literatürü desteklememektedir.

Tez çalışmasında besiyerine ilave edilen Sistein-HCl'nin ABE fermentasyonuna etkisi araştırılmış ve elde edilen sonuçlar şekil 4.10'da verilmiştir. *C. roseum* suşu katkısız

besiyerinde 4.60 g/L bütanol ve 5.28 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirirken sistein içeren besiyeri ortamında 6.36 g/L bütanol ve 7.32 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiş, buna göre bütanol üretiminde % 38.30 oranında ve toplam solvent üretiminde ise % 38.60 oranında artış olduğu belirlenmiştir. *C. beijerinckii* DSM 6422 suşunda Sistein içeren ortamda bütanol üretiminde % 29.10 ve toplam solvent üretiminde ise % 27.90 artış olmuştur. *C. acetobutylicum* DSM 6228 suşunda bütanol oluşumunda % 2.30 ve toplam solvent oluşumunda ise % 10.50 artış olmuştur.



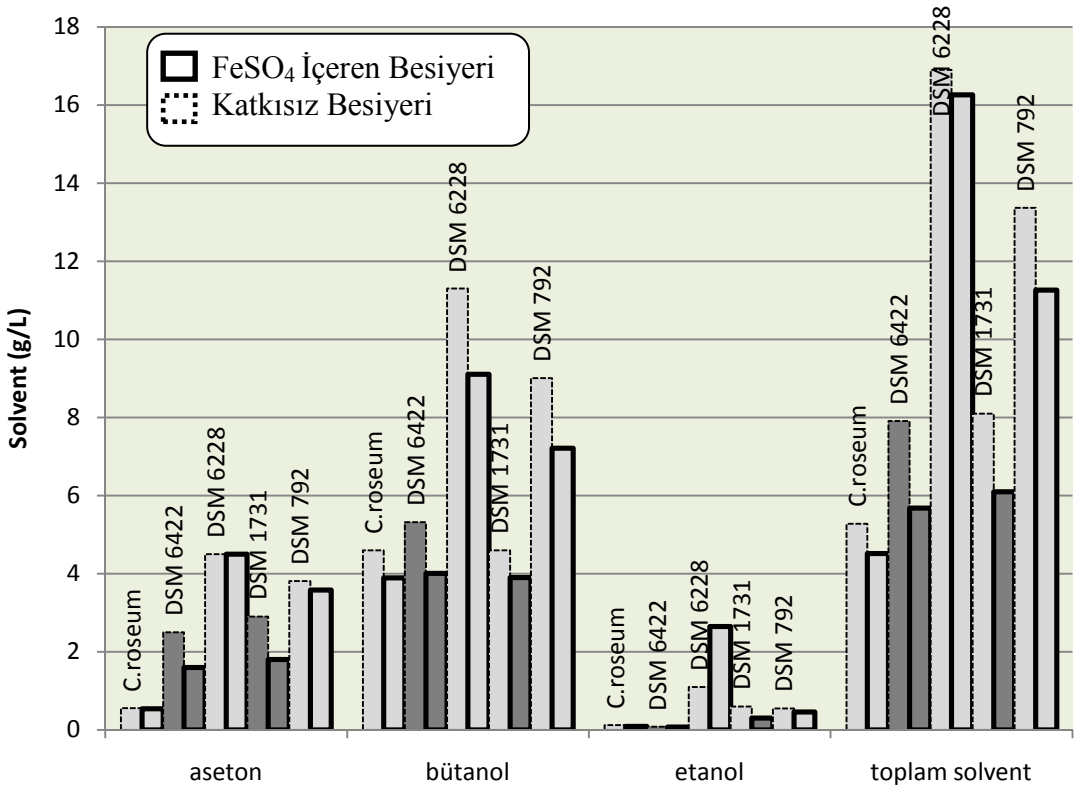
Şekil 4.10 Sistein- HCl içeren patates besiyerinde, 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu

C. acetobutylicum DSM 1731 suşunda ise katkısız ortamda 4.60 g/L bütanol ve 8.10 g/L toplam solvent olan oranlar, sistein ortamda bütanolde % 47.80 ve toplam solvent üretiminde ise % 32.10 azalma ile sonuçlanmıştır. *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ise bütanolde % 9 ve toplam solventte % 5.90 artış ile sonuçlanmıştır.

Sistein SH içeren bir aminoasittir ve anaerobik gelişme ortama indirgen ajan olarak ilave edilmektedir. Ortamda bulunan oksijeni indirgeyerek gelişme ortamının mikroorganizma için daha uygun olmasına katkıda bulunmaktadır (Rao ve Mutharasan

1988). *Clostridium*'ların α-amilaz (Paquet vd. 1991) ve bütirat kinaz enzimlerinin aktif kısımlarında sistein rezidülerinin olduğu bilinmektedir (Hartmanis 1987). Ayrıca, Masion *vd*. (1987), aminoasitlerin rekabetçi birer azot kaynağı olabileceğini ve solvent üretiminde gerekli olan enzimlerin aktiviteleri üzerine olumlu etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan tez çalışmasında elde edilen sonuca göre, enzimlerin aktif kısmında mevcut olan aminoasitlerin ortamda bulunmasının enzim aktivitesini arttırdığı ve buna bağlı olarak ABE üretim miktarını da arttırmış olabileceği sonucuna varılmıştır.

Tez çalışması içerisinde $FeSO_4$ ilavesinin ABE üretim miktarları üzerine etkisi incelenmiştir ve elde edilen sonuçlar şekil 4.11'de verilmiştir. *C. roseum* suşu katkısız besiyeri ortamında 4.60 g/L bütanol ve 5.28 g/L toplam solvent üretirken, demir içeren besiyeri ortamında 3.89 g/L bütanol ve 4.52 g/L toplam solvent oluşturmuş, buna göre bütanol üretiminde % 15.40 ve toplam solvent üretiminde ise % 14.40 azalmaya neden olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.11 $FeSO_4$ içeren patates besiyerinde , 37 °C sıcaklıkta ABE ve toplam solvent oluşumu

Aynı koşullarda *C. beijerinckii* DSM 6422 suşunun katkısız besiyerinde 5.32 g/L bütanol ve 7.91 g/L toplam solvent oluşturup, demir içeren ortamda ise 4.01 g/L bütanol ve 5.68 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Buna göre besiyerine $FeSO_4$ ilavesi ile bütanol üretiminde % 24.60 ve toplam solvent üretiminde ise % 28.20 azalma olmuştur. *C. acetobutylicum* DSM 6228 suşunun katkısız ortamda 11.30 g/L bütanol ve 16.90 g/L toplam solvent oluşturmuş, demir içeren besiyeri ortamında 9.11 g/L bütanol ve 16.26 g/L toplam solvent oluşmuştur. Buna göre demir içeren besiyerinde bütanol üretiminde % 19.40 ve toplam solvent üretiminde ise % 3.80 azalma olmuştur. Ayrıca, bütanol üretim miktarındaki değişimle toplam solvent üretim miktarındaki değişim değerlendirildiğinde demir içeren besiyeri ortamında bütanol üretiminin yanı sıra az miktarda da olsa etanol teşvik edildiği saptanmıştır. *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşunda ise katkısız ortamda 4.60 g/L bütanol ve 8.10 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirirken demir içeren besiyeri ortamında 3.90 g/L bütanol ve 6.10 g/L toplam solvent oluşmuş ve bu sonuçlara göre, bütanol üretiminde % 15.20 ve toplam solvent üretiminde ise %24.70 azalma olduğu hesaplanmıştır. *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu katkısız ortamda 9.01 g/L bütanol ve 13.37 g/L toplam solvent oluşturmuş, demir içeren besiyerinde 7.21 g/L bütanol ve 11.26 g/L toplam solvent oranına ulaşmıştır, buradan anlaşıldığı gibi demir içeren besiyerinde bütanol üretiminde % 20 ve toplam solvent üretiminde % 15.80 azalma olmuştur.

Yaptıkları çalışmada, Ismaiel vd. (1993), *C. beijerinckii* NRRL B593 suşundan izole etmiş oldukları alkol dehidrogenaz enziminin aktif kısmında demir iyonlarının bulunduğunu bildirmişlerdir. Alshiyab vd. (2008), fermentasyon ortamına 5 mg/L oranında ilave edilen $FeSO_4$'ın bütanol oluşumunu % 20-30 oranında arttırdığını bildirmişlerdir. Yapılan tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre ortama ilave edilen $FeSO_4$ miktarının fazla olması, bu çalışmada $FeSO_4$'ün üretimi inhibe edici özellik gösterdiği söylenebilir.

400 g patates/L olarak hazırlanmış katkısız besiyeri ve 1 g/L sistein-HCL ile 2.5 g/L glikoz ilave edilerek hazırlanmış besiyerinde, *Clostridium* suşları ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Bazı *Clostridium* suşlarının glikoz ve sistein-HCl ile modifiye edilen besiyerlerinde, ABE ve toplam solvent üretimleri

Bakteri	Substrat	Etanol (g/L)	Aseton (g/L)	Bütanol (g/L)	Toplam solvent (g/L)
C. roseum	patates+glikoz+ sistein HCl	0,19	2,84	6,52	9,56
	katkısız	0,05	1,05	4,23	5,32
C. beijerinckii DSM 6422	patates+glikoz+ sistein HCl	0,20	3,31	8,42	11,9
	katkısız	0,12	2,51	7,09	9,70
C. acetobutylicum DSM 6228	patates+glikoz+ sistein HCl	1,56	5,65	13,33	20,53
	katkısız	1,24	4,99	11,39	17,62
C. acetobutylicum DSM 1731	patates+glikoz+ sistein HCl	0,75	3,47	7,92	12,14
	katkısız	0,54	2,97	7,45	10,96
C. acetobutylicum DSM 792	patates+glikoz+ sistein HCl	0,37	3,35	8,07	11,79
	katkısız	0,64	2,88	4,62	8,13

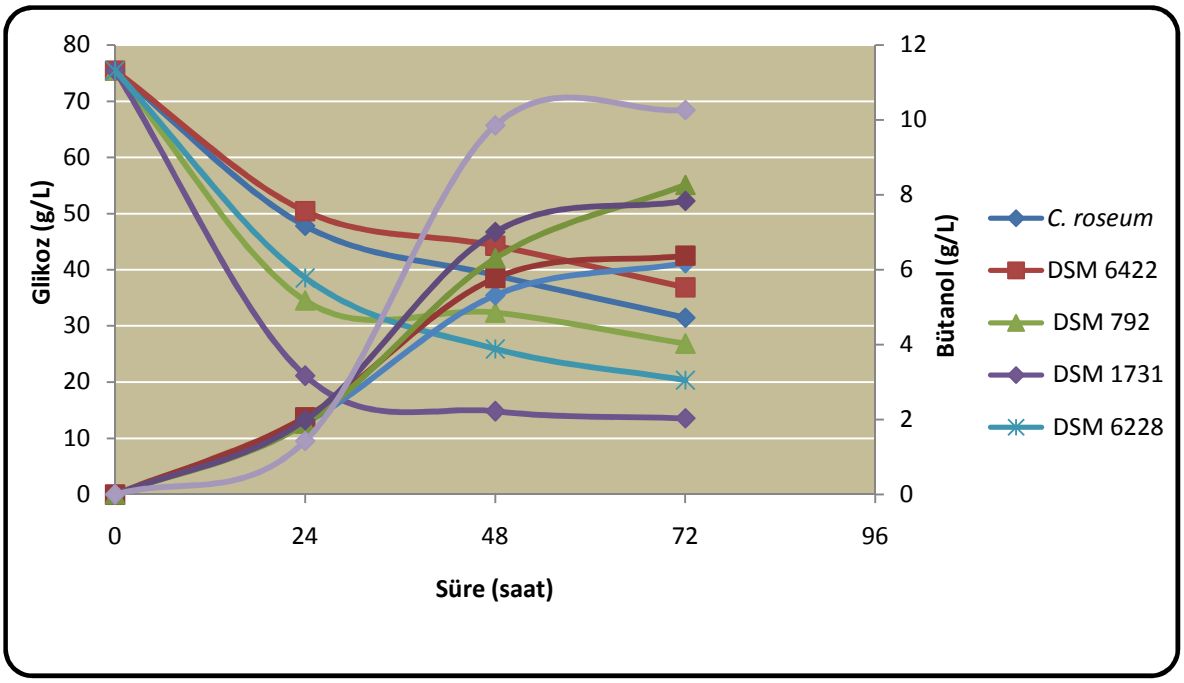
Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi katkısız besiyerinde, glikoz ve sistein-HCl içeren besiyerinde *C. roseum* suşu bütanol üretiminde % 54.10 ve toplam solvent üretiminde ise % 79.70' luk bir artış olmuştur. *C. beijerinckii* DSM 6422 suşunda bütanol üretiminde %18.80 ve toplam solvent üretiminde % 22.7, *C. acetobutylicum* DSM 6228 suşunda bütanol üretiminde % 17 ve toplam solvent üretiminde % 16.50, *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşunda bütanol üretiminde % 6.30 ve toplam solvent üretiminde % 10.80 , *C. acetobutylicum* DSM 792 suşunda ise bütanol üretiminde % 74.80 ve toplam solvent üretiminde % 45'lik artış oranları belirlenmiştir.

Gelişme ortamına ilave edilen glikoz ile bakterilerin enzimatik hidrolize ihtiyaç duymadan gelişmeye başlamalarının daha kısa sürede gerçekleştirmek ve fermentasyon sonucu üretim miktarını arttırmak hedeflenmiştir. Glikoz ve sistein-HCl bulunan ortamda katkısız besiyerine göre bakterilerin bütanol ve toplam solvent üretim miktarlarının artmış olduğu belirlenmiştir.

4.5 Substrat Tüketimi ve Bütanol Oluşumu

Fermentasyon ortamında substrat tüketimi, toplam karbonhidrat miktarına gore belirlenmiştir**.** 72 saat inkübasyon süresince beş farklı suşa ait substrat tüketim eğrileri oluşturulmuş ve sonuçlar şekil 4.12'de verilmiştir. Substrat tüketim eğrileri incelendiğinde toplam şekerin önemli kısmının ilk 24 saatlik sürede tüketilmiş olduğu gözlemlenmiştir.

Glikoz tüketim ve bütanol oluşum oranları (Şekil 4.12) incelendiğinde substrat tüketimine paralel olarak ilk 24 saat sonunda bütanol ve toplam solvent üretiminin en düşük oranda gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu sonuç, 24 saat sonunda bütanol ve solvent üretiminin yeni başlamış olduğunu göstermektedir. Terracciano ve Kashket (1986) solvent ve bütanol üretiminin, inkübasyonun 22. ve 24. saatleri arasında başladığını bildirmişlerdir.



Şekil 4.12 *Clostridium* suşlarına ait glikoz tüketim ve bütanol oluşum eğrileri

Bu çalışmada kullanılan beş *Clostridium* suşu ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçların verildiği çizelge 4.3'den görüldüğü gibi 72. saat sonunda gelişme ortamında

kalan substratın (glikoz) ortamda en yüksek miktarda olan bakterinin *C. beijerinckii* DSM 6422 suşu olduğu anlaşılmıştır. Buna gore substrat dönüşüm oranının % 51, tüketilen substrata karşılık, üretilen bütanole göre verimin 0.17 g/g olduğu belirlenmiştir. Substrat dönüşümü en yüksek olan suşun, % 82 substrat dönüşümü ile *C. acetobutylicum* DSM 1731, bütanol veriminin ise 0.13 g/g olduğu belirlenmiştir. Bütanol veriminin düşük olmasına karşın substrat tüketiminin yüksek olmasının, bakterinin glikozu gelişmesi için kullanmasının neden olduğu düşünülmektedir. Çizelge 4.3'e göre bütanol verimi en yüksek olan suşun *C. acetobutylicum* DSM 6228 olduğu görülmektedir.

Monot ve Engasser (1983), kesikli ve sürekli kültürde uygun gelişme koşulları azot limitli bir kültürde sağlandığında glikoza göre bütanol veriminin 0.30 g/g, Formanek vd. (1997) ise, substrat tüketiminin % 88 olarak belirlendiği *C. beijerinckii* NCIMB 8052 suşu ile verimin 0.17 g/g ve 0.28 g/g toplam solvent verimi elde edildiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.3 *Clostridium* suşlarına ait substrat dönüşüm ve bütanol verim değerleri

Bakteri	0	24 saat			48 saat			72 saat			Substrat dönüşümü %	Butanol/Glikoz (g/g)
	Glikoz (g/L)	Glikoz (g/L)	Bütanol (g/L)	Toplam Solvent (g/L)	Glikoz (g/L)	Bütanol (g/L)	Toplam Solvent (g/L)	Glikoz (g/L)	Bütanol (g/L)	Toplam Solvent (g/L)		
C.roseum	75.45	47.83	1.91	2.45	39.04	5.32	6.17	31.48	6.18	7.23	58.3	0.14
C. beijerinckii DSM 6422	75.45	50.46	2.06	4.04	44.28	5.78	8.39	36.88	6.38	9.11	51.1	0.17
C.acetobutylicum DSM 6228	75.45	38.57	1.43	6.56	25.92	9.86	15.53	20.37	10.27	16.30	73.0	0.19
C.acetobutylicum DSM 1731	75.45	21.14	1.99	3.01	14.81	7.01	9.56	13.58	7.84	11.14	82.0	0.13
C.acetobutylicum DSM 792	75.45	34.56	1.89	5.77	32.40	6.31	10.66	26.85	8.27	12.91	64.4	0.17

5. SONUÇLAR

1. *C. roseum*, *C. acetobutylicum* DSM 6228, DSM 1731, DSM 792 ve *C. beijerinckii* DSM 6422 suşlarının farklı sıcaklık, substrat konsantrasyonu, pH değerlerinde ve modifiye besiyerlerinde ABE üretimleri incelenmiş ve bu koşullarda altında aseton, bütanol, etanol ve toplam solvent üretiminin en yüksek olduğu değerler belirlenmiştir. Ayrıca substrat tüketimine bağlı olarak bütanol üretim oranları incelenmiş ve bütanol üretiminin, gelişimin hangi aşamasında başladığı belirlenmiştir.

2. Litrede 50 g, 100 g, 200 g ve 400 g patates içerecek şekilde hazırlanan besiyeri ortamında 5 farklı *Clostridium* suşunun en yüksek bütanol ve toplam solvent üretimini 400 g/L patatesli besiyerinde gerçekleştirdikleri belirlenmiştir. Bu besiyerinde *C. roseum* suşunun 4.47 bütanol ve 5.94 g/L toplam solvent, *C. acetobutylicum* DSM 6228 suşunun 10.53 g/L bütanol ve 15.07 g/L toplam solvent, *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşunun 6.53 g/L bütanol ve 10.21 g/L toplam solvent, *C. acetobutylicum* DSM 792 suşunun 7.88 g/L bütanol ve 11.96 g/L toplam solvent, *C. beijerinckii* DSM 6422 suşunun 7.09 g/L bütanol ve 9.70 g/L toplam solvent oluşturduğu saptanmıştır.Elde edilen bu değerler dikkate alındığında en yüksek üretim *C.acetobutylicum* DSM 6228 suşu ile sağlanırken en düşük üretim düzeyinin *C.roseum* suşu ile elde eildiği belirlenmiştir.

3. Beş farklı suş için 30 °C, 33 °C, 35 °C, 37 °C ve 39 °C sıcaklıklarında 400 g/L patatesli besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda *C. roseum*, *C. acetobutylicum* DSM 6228, *C. acetobutylicum* DSM 1731, *C. acetobutylicum* DSM 792 ve *C. beijerinckii* DSM 6422 suşları 37 °C sıcaklıkla optimum gelişme ve solvent üretimi gerçekleştirildiği belirlenmiştir. 37 °C sıcaklıkta patatesten izole edilmiş olan *C. roseum* suşu 4.23 g/L bütanol ve 5.53 g/L toplam solvent, *C. acetobutylicum* DSM 6228 suşu 15.02 g/l bütanol ve 22.65 g/L toplam solvent, *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşu 7.20 g/L bütanol ve 11.44 g/L toplam solvent, *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu 8.41 g/L bütanol ve 12.45 toplam solvent ve *C. beijerinckii* DSM 6422 suşunun ise 7.27 g/L bütanol ve 10.80 g/L toplam solvent üretimi sağlanmıştır (Şekil 4.3).

4. Beş farklı suş için oluşturulan 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olmak üzere farklı pH değerlerinde 400 g/L besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda *C. roseum* ve *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşları en yüksek bütanol ve toplam solvent üretimini pH 7'de gerçekleştirirken, *C. acetobutylicum* DSM 792, *C. acetobutylicum* DSM 6228 ve *C. beijerinckii* DSM 6422 suşları en yüksek bütanol ve toplam solvent üretimini pH 9' da gerçekleştirmişlerdir. pH 7'de *C. roseum* suşunun 4.96 g/L bütanol ve 6.02 g/L toplam solvent ve *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşunun 7.13 g/L bütanol ve 11. 22 g/L toplam solvent üretimi gerçekleştirdikleri belirlenmiştir. pH 9'da *C. acetobutylicum* DSM 792 suşunun 9.66 g/L bütanol ve 12.46 g/L toplam solvent, *C. acetobutylicum* DSM 6228 suşunun 11.65 g/L bütanol ve 17.32 g/L toplam solvent , *C. beijerinckii* DSM 6422 suşunun ise 8.76 g/L butanol ve 12.25 g/L toplam solvent üretimi elde edilmiştir (Şekil 4.4).

5. Farklı katkılar ilavesi ile hazırlanan 400 g/L patates olacak şekilde hazırlanan besiyerinde, 1 g/L olarak eklenen sistein-HCl içeren besiyerinde *C. roseum* (6.36 g/L), *C. beijerinckii* DSM 6422 (6.87 g/L) , *C. acetobutylicum* DSM 1731 (6.80 g/L), *C. acetobutylicum* DSM 792 (9.82 g/L) suşları en yüksek bütanol üretimini gerçekleştirirken, *C. acetobutylicum* DSM 6228 (12.97 g/L) suşu ise 0.50 g/L oranında ZnSO4 ilave edilen besiyerinde en yüksek bütanol üretimini gerçekleştirmiştir. En yüksek toplam solvent üretimini ise *C. roseum* (7.32 g/L), *C. acetobutylicum* DSM 6228 (18.68 g/L), DSM 1731 (10.70 g/L) ve *C. beijerinckii* DSM 6422 (10.12 g/L) suşları 1 g/L sistein-HCl içeren besiyerinde gerçekleştirdiği ve *C. acetobutylicum* DSM 792(14.42 g/L) suşu ise 5 g/L maya özütü içeren besiyerinde gerçekleştirdiği belirlenmiştir.

6. Beş farklı suşun substrat dönüşümleri ve bütanol verimleri incelendiğinde en yüksek substrat dönüşümünü gerçekleştiren bakterinin % 82 substrat dönüşümüyle *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşu ve bütanol verimi en yüksek bakterinin ise 0.19 g bütanol/g glikoz bütanol verimiyle *C. acetobutylicum* DSM 6228 suşu olduğu belirlenmiştir.

7. Beş farklı suş için 3 gün boyunca bütanol üretimleri incelendiğinde bütanol oluşumunun 24. saat sonunda başlamış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12).

8. Beş farklı suş için 400 g patates/L besiyeri ve 1 g/L sistein HCl ile 2.50 g/L glikoz ilave edilen besiyerinde bütanol ve toplam solvent üretimleri incelendiğinde sistein- HCl ve glikoz ilave edilen ortamda, katkısız besiyerine göre bütanol üretiminin *C. roseum* suşu ile % 54.10, *C. beijerinckii* DSM 6422 suşu ile % 18.80, *C. acetobutylicum* DSM 6228 bakterisi ile % 17, *C. acetobutylicum* DSM 1731 suşu ile % 6.3 ve *C. acetobutylicum* DSM 792 suşu ile % 74.80 oranlarında artmış olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2).

KAYNAKLAR

Alshiyab, H., Kall, M. S., Hamid, A. A. and Yusoff, W. 2008. Trace metal effect on hydrogen production using *Clostridium acetobutylicum*. Online Journal of Biological Sciences, 8 (1).

Altun, M. 1996. Depolama sıcaklığının patatesin nişasta ve C vitamini düzeyleri üzerine etkisinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı. 61.

Aydın, M. 2004. Bakteri identifikasyonunda kullanılan standart biyokimyasal ve fizyolojik testler. Ed: Cengiz, Mısırlıgil, Aydın., Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji, 11, 91-110. Güneş Yayınevi, Ankara.

Baer, S. H., Blaschek, H. P. and Smith, T. L. 1987. Effect of butanol challenge and Temperature on lipid composition and membrane fluidity of butanol- tolerant *Clostridium acetobutylicum*. Applied and Enviromental Microbiology, 53(12); 2854-2861.

Bahl, H., Andersch, W., Braun, K. and Gottschalk, G. 1982a. Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14; 17-20.

Bahl, H., Andersch, W. and Gottschalk, G. 1982b. Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. European J. Appl. Microbial. Biotech., 15; 201-205.

Bowles, L. K. and Ellefson, W. L. 1985. Effect of butanol on *Clostridium acetobutylicum* Appl. Environ. Microbiol., 50 (5); 1165-1170.

Chen, C. K. and Blaschek, H. P. 1999. Effect of acetate on moleculer and physiological aspects of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 solvent production and strain degenaration. Appl. Environ. Microbiol., 65 (2); 499-505

Dabrock, B., Bahl, H. and Gottschalk, G. 1992. Parameters affecting solvent production by C*lostridium pasteurianum*.

Monot, F., Martin, J. R., Petitdemange, H. and Gay, R. 1982. Acetone and butanol production bye *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. Appl. Environ. Microbiol., 58 (4); 1233-1239.

Dürre, P. 1998. New insights and novel developments in clostridial acetone/ butanol/ isopropanol fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 49 (6); 639-648.

Ezeji T.C. and Blaschek, H.P. 2008. Practical aspects of butanol production. In *Bioenergy*. Edited by Wall J, Harwood CS, and A Demain. Washington DC, Washington DC, USA: American Society for Microbiology Press. 335-346.

Ezeji, T.C., Qureshi, N. and Blaschek, H.P. 2007 Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors, Current opinion in biotechnology, 18; 220-227.

Ezeji, T. C., Qureshi, N. and Blaschek, H. P. 2003. Production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA 101 and insitu recovery by gas stripping. World J. Microbiol., 19; 595-603.

Formanek, J., Mackie, R. and Blaschek, H. P. 1997. Enhanced butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA 101 grown in semidefined P2 medium containing 6 percent maltodextrin or glucose. Applied and Environmental Microbiology, 63 (6); 2306-2310.

Forouhi, F. and Gunn, D. I. 1983. Some effects of metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media. Biotechnology and Bioengineering, 25 (6); 1905- 1911.

Gapes, J.R., Nimcevic, D. and Friedl, A. 1996. Long-term continuous cultivation of *Clostridium beijerinckii* in a two-stage chemostat with on-line product removal.Appl. Environ Microbiol 62; 3210-3219

George, H. A., Johnson, J. L., Moore, W. E. C., Holdeman, L. U. and Chen, J. S. 1983. Acetone, isopropanol and butanol production by *Clostridium beijerinckii*(syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. Applied and Environmental Microbiology, 45 (3); 1160-1163.

Gholizadeh, L. 2009. Enhanced bütanol production by free and immobilized *Clostridium* sp. Cells using butyric acid as co-substrate.University of Boras. 95.

Girbal, L. and Soucaille, P. 1998.Regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. Trans in Biotechnology, 16 (1); 11-16.

Girbal, L. and Soucaille, P. 1994. Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed- substrate steady-state continuous culture: Role of NADH/NAD ratio and ATP pool. Journal of Bacteriology, 176 (21); 6433-6438.

Gottschalk, J. C. and Morris, J. G. 1981. Non-production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* during glucose- and ammonium- limitation in continuous culture. Biotechnology Letters, 3 (9); 525-530.

Gottwald, M. and Gottschalk, G. 1985. The internal pH of C. *acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. Arch. Microbiol., 143; 42-46.

Göçmen, B. 2003. Anaerobik portozoonlarda (protista) solunum ve detoksifikasyon organeli; hidrogenozom. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 27 (2); 152-160.

Guerrini, O., Burlat, B. Leger, C., Guicliarelli, B. Soucaille, P. and Girbal, L. 2008. Characterisation of Two 2[4Fe4S] Ferrodoxins from *C. acetobutylicum*. Curr. Microbial., 56; 261-267.

Grupe, H. and Gottschalk, G. 1992. Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. Applied and Environmental Microbiology, 58 (12); 3896-3902.

Gutierrez, N. A., Maddox, I. S., Schuster, K. C., Swoboda, H. and Gapes, J. R. 1997. Strain comparision and medium preparation for he ABE fermentation process using a substrate of potato. Bioresource Technology, 66 (3); 263-265

Harris, M. L., Welker, N. E. and Papoutsakis, E. T. 2002. Northern, morphological and fermentation analysis of spo0A inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Journal of Bacteriology, 184 (10); 3586-3597.

Harris, L. M., Desai, R. P., Welker, N. E. and Papoutsakis, E. T. 2000. Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inavtivation mutant: Need for neww phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition. Inc. Biotechnology Bioeng., 67; 1-11.

Hartmanis, M. G. N. 1987. Butyrate kinase from *Clostridium acetobutylicum*. The Journal of Biological Chemistry, 262 (2); 617-621.

Hartmanis, M. G. N., Klason, T., Gatenbeck, S. 1984. Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20; 66-71.

Huang, L., Forsberg, C. W. and Gibbins, L. N. 1986. Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermentation products. Appl. Environ. Microbiol., 51 (6); 1230-1234.

Hunter, J. B. 1995. Integrated process for microbial solvent production from whey permeate. Energy Research and Development Authority, 37, Newyork.

Ismaiel, A. A., Zhu, C. X., Colby, G. and Chen, J. S. 1993. Purification and characterization of primary- secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*. Journal of Bacteriology, 175 (16); 5097-5105.

Jones, T. D. And Woods, D. R. 1986. Acetone-Butanol Fermentation Revisited. Microbial Reviews, 50 (4) ; 484-524.

Kanouni, A. E., Zerdani, I. Z., Zoafa, S., Znassni, M., Loutfi, M. and Boudauma, M. 1998. The improvement of glucose/ xylose fermentation by *Clostridium acetobutylicum* using calcium carbonate. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14; 431-435.

Kasap, M. 2002. Nitrogen metabolism and solvent production in *Clostridium beijerinckii*i NRRL B593. Faculty of Virginia Polytechnic Institue and State University, 181, Blacksburg, Virginia.

Kashket, E. R. and Cao, Z.Y. 1995. Clostridial strain degeneration. Fems Microbiology Reviews, 17 (3); 307-315.

Keis, S., Bennett, C. F., Ward, V. K. and Jones, D. T. 1995. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent- producing Clostridia. International Journal of Systematic Bacteriology, 45 (4); 693-705.

Kell, D. B., Peck, M. W. and Morris, J. G.1981. On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. Biochemical and Biophysical Research Comminications, 99 (1); 81-88.

Laczkó-Dobos, H. and Szalontai, B.2009. Lipids, proteins, and their interplay in the dynamics of temperature-stressed membranes of a cyanobacterium, Synechocystis PCC 6803. Biochemistry, 48 (42); 10120-8.

Lai, M. C. and Traxler, R. W. 1994. A coupled two-stage continuous fermentation for solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. Enzyme and Microbial technology, 16(12); 1021-1025.

Largier, S. T., Long, S., Santangelo, J. D., Jones, D. T. and Woods, D. R. 1985. Immobilized *Clostridium acetobutylicum* P 262 mutants for solvent production. Appl. Environ. Microbiol., 50 (2); 477-481.

Lee, J. and Blaschek, H.P. 2001. Glucose uptake in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 and The solvent-hyperproducing mutant BA 101. Applied and enviromental microbiology, 67 (11); 5025-5031.

Long, S., Jones, D. T. and Woods, D. R. 1984. Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P 262. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20; 256-261.

Lovenberg, W. and Sobel, B.E. 1965. Rubredoxin: A new electron transfer protein from *Clostridium pasteurianum*. Biochemistry, 54; 193-199.

Madihah, M. S., Ariff, A. B., Khalil, M. S., Suraini, A. A. and Karim, M. I. A. 2001. Anaerobic fermentation of gelatinized sago starch-derived sugars to aceton-1-butanol-ethanol solvent by *Clostridium acetobutylicum*. Folia Microbiol., 46 (3); 197-204.

Marchal, P., Blanchet, D. and Vandeecateele, J. P. 1985. Industrial optimization of acetone-butanol fermentation: a study of the utilization of jerusalem artichokes. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23 (2); 92-98.

Marczak, R., Ballangue, J., Petitdemange, H. and Gay, R. 1984. Regulation of the biosynthesis of NADH-Rubredoxin Oxidoreductase in *Clostridium acetobutylicum*. Current Microbiology, 10; 165-168.

Masion, E., Amine, J. and Marczak, R. 1987. Influence of aminoacid supplements on the metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. FEMS Microbiology Letters, 43 (3); 269-274.

McNeil, B. and Kristiansen, B. 1985. Effect of temperature upon growth rate and solvent production in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnology Letters, 7 (7); 499-502.

Mitchell, W. J. 1998. Physiology of carbonhydrates to solvent conversion by clostridia. Adv. Microb. Physiol., 39; 31-130.

Monot, F., Engasser, J. M. and Petitdemange, H. 1984. Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 19; 422-426.

Monot, F. and Engasser, J. M. 1983. Production of acetone and butanol by batch and continuous culture of *Clostridium acetobutylicum* under nitrogen limitation. Biotechnology Letters, 5 (4); 213-218.

Monot, F., Martin, J. R., Petitdemange, H. and Gay, R. 1982. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. Appl. Environ. Microbiol., 44 (6); 1318-1324.

Nimcevic, D., Schuster, N. and Gapes, J. R. 1998. Solvent production of *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 growing on different potato media. Applied Microbiol. Biotechnol., 50; 426-428.

Onaran, N., Ünlenen, L. A. ve Doğan, A. 2000. Patates tarımı, sorunları ve çözüm yolları. Niğde Patates Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 87, Niğde.

Paquet, V., Croux, C., Goma, G. and Soucaille, P. 1991. Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Appl. Environmental Microbiology, 57 (1); 212-218.

Paredes, C. J., Alsaker, K. V. and Papotsakis, E. T. 2005. A comperative genome view of clostridial sporulation physiology. Nature Reviews Microbiology, 3 (12); 967-978.

Petitdemange, H., Cherrier, C., Roval, G. and Gay, R. 1976. Regulation of the NADH and NADPH-ferrodoxin oxidoreductases in clostridia of the butyric group. Biochimica et biophysica acta, 421(2); 334-347.

Piggot, P. J. and Hilbert, D. W. 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. Current Opinion in Microbiology, 7; 579-586.

Qureshi, N. and Blaschek, H. P. 2006. Butanol production from agricultural mass. Food Biotechnology, 2th edition; 526-549.

Qureshi, N., Lolas, A. and Blaschek, H. P. 2001. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA 101. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 26; 290-295.

Qureshi, N. and Blaschek, H. P. 2000. Butanol production using *Clostridium beijerinckii* BA 101 hyper-butanol producing mutant strain and recovery by pervaporation. Applied Biochemistry and Biotechnology, 84-86; 225-235.

Rao, G. and Mutharason, R. 1988. Altered electron flow in a reducing environments in *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnology Letters, 10 (2); 129-132.

Ranjan, A. and Moholkar, V. S. 2009. Biobutanol; a viable Gasoline Substitue through ABE fermentation, Proceedings of International conference on energy and environment.

Ravagnani, A., Jennert, K. C. B., Steiner, E., Grunberg, R., Jefferies, J. R., Wilkinson, S. R., Young, D. I., Tidswell, E. C., Brown, D. P., Youngman, P., Morris, J. G. and Young, M. 2000. *Spo0A* directly controls the switch from acid to solvent production in solvent- forming Clostridia. Molecular Microbiology, 37 (5); 1172-1185.

Schuster, K. C., Heuvel, R., Gutierrez, N. A. and Maddox, I. S. 1998. Development of markers for product formation and cell cycle in batch cultivation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Appl. Microbiol. Biotechnol., 49; 669-676.

Soni, B. K., Kopp, C., Goma, G. and Soucaille, B. 1991. Solvent production from starch: effect of pH on α-amylase and glucoamylase localization and synthesis in synthetic medium. Appl. Microb. Biotech., 37: 539-543.

Soyuduru, D. 2007. Fermentasyonla etanol üretiminde etanol veriminin arttırılması. Gazi Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, 119, Ankara

Stephens, G., Holt, R. A., Gottschalk, J. C. and Morris, J. G. 1984. Studies on the stabilty of solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. Journal of Applied Microbiology, 58 (6); 597-605.

Stone, C. W., 1998. Yeast products in the feed industry. A practical guide for feed professionals.

Temiz, A., 2000. Genel Mikrobioloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, 291, Ankara.

Terraciano, J. S. and Kashket, E. R. 1986. Intracellular conditions required for limitation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. Appl. Environ. Microbiol., 52(1); 86-91.

Thompson, D. K. and Chen, J. S. 1990. Purification and properties of an acetoacetyl coenzyme A-reacting phosphotransbutyrylase from *Clostridium beijerinckii* (*Clostridium butylicum*) NRRL B593. Applied and Environmental Microbiology, 56 (3); 607-613.

Tomas, C. A., Welker, N. E. and Papoutsakis, E. T. 2003. Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism and changes in the cell's transcriptional program. Applied and Enviromental Microbiology, 69(8); 4951-4965.

Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji. Pelin Ofset Tipo Matbaacılık, 446, Ankara.

Vollherbst- Schneck, K., Sands, J. A. and Montenecourt, B. S. 1984. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Applied and Enviromental Microbiology, 47 (1); 193-194.

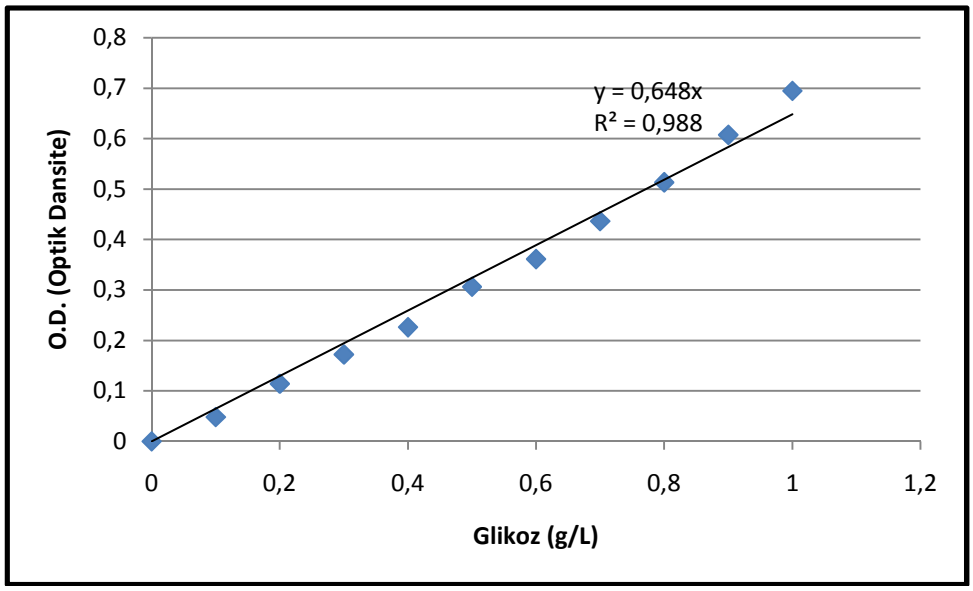
Wall, J.D., Harwood, C.S., Demain, A.L. 2008. ASM Press, 437, ABD.

Welch, W. R., Rudolph, F. B. and Papoutsakis, E. T. 1989. Prufication and characterization of the NADH- dependent butanol dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Archieves of Biochemistry and Biophysics, 273 (2); 309-318.

Yan, R. T. and Chen, J. S. 1990. Coenzyme A- acylating aldehyde dehydrogenase from *Clostridium beijerinckii* NRRL B592. Applied and Environmental Microbiology, 56 (9); 2591-2599.

EKLER

EK 1. Glikoz Standart Eğrisi



Şekil 1. Glikoz standart eğrisi

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aybike BEREKETOĞLU

Doğum Yeri : Trabzon

Doğum Tarihi : 1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu:

Lise : Trabzon Kanuni Anadolu Lisesi (1996-2003)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2003-2007)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (Eylül 2007-Aralık 2010)

Çalıştığı Kurum

Bayburt Tarım İl Müdürlüğü (Kasım 2009- Aralık 2010)
Bayburt Üniversitesi (Aralık 2010-)