

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ZİRAİ ATIKLARIN VE MİKROALGAL BİYOKÜTLENİN BİYOBÜTANOL
ÜRETİMİNDE KULLANIM KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Nazlıhan TEKİN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

ZİRAİ ATIKLARIN VE MİKROALGAL BİYOKÜTLENİN BİYOBÜTANOL ÜRETİMİNDE KULLANIM KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Nazlıhan TEKİN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

Bu tez çalışmasında yenilenebilir ve sürdürülebilir biyobütanol üretimi için ikinci nesil ham madde olarak endüstriyel çay atıklarının (EÇAT) ve üçüncü nesil ham madde olarak *Dunaliella salina* biyokütlesinin kullanımının araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, ilk olarak başlangıç EÇAT şekeri konsantrasyonu, azot kaynağı çeşidi ve konsantrasyonu ve Mg^{2+} , Fe^{2+} ve Zn^{2+} mineral tuzlarının konsantrasyonları incelenerek besiyeri optimizasyonu yapılmıştır. Ayrıca fermantasyon zamanının biyobütanol üretimine etkisi araştırılmıştır. Besiyeri optimizasyonu çalışmaları sonucunda, en yüksek toplam ABE, biyobütanol konsantrasyonu, biyobütanol verimi (g/g) ve biyobütanol üretkenliği (g/L/h), 40 g/L EÇAT şekeri, 0.1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 0.001 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ varlığında 96 saat sonunda sırasıyla 9.73 g/L, 6.21 g/L, 0.258 g/g ve 0.065 g/L/h olarak elde edilmiştir. Ayrıca, *D. salina* biyokütlesi ile yapılan çalışmalarda, mikroalg kültürasyon koşulları, başlangıç mikсотrofik mikroalg biyokütle konsantrasyonu ve fermantasyon süresi gibi parametreler biyobütanol üretimi için optimize edilmiştir. Çalışma sonucunda, 200 g/L mikroalg biyokütlesi ve 60 g/L glukoz içeren P2 ortamında en yüksek biyobütanol, toplam ABE, biyobütanol verimi (g/g) ve biyobütanol üretkenliği (g/L/h) 72 saat sonunda sırasıyla 11.88 g/L, 13.89 g/L, 0.331 g/g ve 0.165 g/L/h olarak belirlenmiştir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar EÇAT'ın ve *D. salina* biyokütlesinin *Clostridium beijerinckii* DSMZ 6422 tarafından biyobütanol üretimi için umut vadeden ham maddeler olduğunu göstermektedir. Ayrıca EÇAT, gerçekleştirilen tez çalışması ile biyobütanol üretiminde literatürde ilk defa kullanılmıştır. Bunun yanında tez çalışması, *D. salina*'nın mikсотrofik olarak mermer atığı varlığında geliştirildiği ilk çalışmadır.

Eylül 2023, 138 sayfa

Anahtar kelimeler: *Clostridium beijerinckii*, biyobütanol, endüstriyel çay atığı, mermer atığı, *Dunaliella salina*, ABE fermantasyonu, mikсотrofik kültürasyon

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF AGRICULTURAL WASTE AND MICROALGAE BIOMASS USAGE CAPACITIES FOR BIOBUTANOL PRODUCTION

Nazlıhan TEKİN

Ankara University
Graduate School of Natural Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

In this thesis, it was aimed to investigate the use of industrial tea wastes (ITW) as second generation raw material and *Dunaliella salina* biomass as third generation raw material for renewable and sustainable biobutanol production. In this context, initially, the medium was optimized by examining initial ITW sugar concentration, nitrogen source type and concentration, and concentrations of Mg^{2+} , Fe^{2+} and Zn^{2+} mineral salts. Additionally, the effect of fermentation time on biobutanol production was investigated. As a result of optimization studies, the highest total ABE, biobutanol concentration, biobutanol yield (g/g) and biobutanol productivity (g/L/h) obtained as 9.73 g/L, 6.21 g/L, 0.258 g/g and 0.065 g/L/h using 40 g/L ITW sugar, 0.1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.001 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ after 96 hours, respectively. Additionally, in studies with *D. salina* biomass, parameters such as microalgae cultivation conditions, initial mixotrophic microalgal biomass concentration and fermentation time were optimized for biobutanol production. As a result of the study, the highest total ABE, biobutanol, biobutanol yield (g/g) and biobutanol productivity (g/L/h) in P2 medium containing 200 g/L microalgae biomass and 60 g/L glucose were determined as 13.89 g/L, 11.88 g/L, 0.331 g/g and 0.165 g/L/h after 72 hours, respectively.

The results obtained from the study show that both ITW and *D. salina* biomass are promising raw materials for biobutanol production by *Clostridium beijerinckii* DSMZ 6422. Furthermore, ITW was evaluated in the literature on biobutanol production for the first time. The thesis is the first study in which *D. salina* was grown mixotrophically using marble waste.

September 2023, 138 pages

Keywords: *Clostridium beijerinckii*, biobutanol, industrial tea waste, marble waste, *Dunaliella salina*, ABE fermentation, mixotrophic cultivation

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimim boyunca desteklerini benden esirgemeyen, gerçekleştiren tez çalışmasında ve yaptığım tüm araştırmalarda her zaman yol gösterici olan ve yoluma ışık tutan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) teşekkürlerimi bir borç bilirim. Tez çalışmasının her aşamasında beni bilgi ve tecrübeleri ile aydınlatan değerli hocalarım Prof. Dr. Gönül Dönmez'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı) ve Öğr. Gör. Doç. Dr. Ekin Demiray'a (Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu) desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora tezi TÜBİTAK 2211-A genel yurt içi doktora burs programı tarafından desteklenmiş olup, TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlar Burs Programı kapsamındaki desteklerinden dolayı YÖK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca 1002-A Hızlı Destek Programı 122Y242 no'lu proje kapsamında 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı desteğiyle TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora tezi kapsamındaki çalışmalar, Ankara Üniversitesi tarafından desteklenmiş olup, FDK-2022-2400 no'lu ve "Zirai Atıkların ve Mikroalgal Biyokütlenin Biyobütanol Üretiminde Kullanım Kapasitelerinin Belirlenmesi" başlıklı proje ile Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu tez, araştırmaların tamamlanmasında 1002-A Hızlı Destek Programı kapsamında 122Y242 no'lu ve "*Clostridium beijerinckii* Tarafından Biyorafineri Yaklaşımı ile Biyobütanol Üretimi ve Boya Giderimi" başlıklı proje ile katkılarından dolayı TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli lisansüstü arkadaşım Sayın Aybüke KUT'a doktora eğitimim boyunca bana sağladığı her türlü yardım ve desteklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca desteklerinden dolayı her zaman yanımda hissettiğim Sayın Eda AÇIKEL'e ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca, bana eşsiz bir gelecek sağlamak için canla başla çalışan, beni cesaretlendiren, her seçimimde arkamda duran ve maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım babam Kazım YILDIRIM'a ve annem Fatime YILDIRIM'a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca neşesiyle hayatımı renklendiren yeğenlerim Ceylin İMREK ve Hira İMREK'e teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan sevgili eşim Doç. Dr. Bilgehan TEKİN'e (Çankırı Karatekin Üniversitesi, Muhasebe ve Finansman Anabilim Dalı) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bizlere gösterdiği yol ve aktardığı düşünceler ile yolumuzu aydınlatan Ulu Önder Mustafa Kemal Atatürk'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nazlıhan TEKİN
Ankara, Eylül 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1 Bütanolün Genel Özellikleri.....	6
2.2 Tarihte Bütanol Üretimi	8
2.2.1 Bütanolün petrokimyasal üretim mekanizmaları	10
2.2.1.1 Oxo sentezi	10
2.2.1.2 Krotonaldehit hidrojenasyonu.....	10
2.2.1.3 Reppe sentezi	11
2.2.2 Bütanolün biyolojik üretim mekanizmaları	11
2.2.2.1 Glikoliz (EMP).....	12
2.2.2.2 Pentoz fosfat yolu (PPP)	13
2.2.3 Farklı karbon kaynaklarına göre metabolik yollar	13
2.2.3.1 Selüloz metabolizması.....	14
2.2.3.2 Sukroz metabolizması.....	15
2.2.3.3 Gliserol metabolizması.....	15
2.2.3.4 Singaz metabolizması.....	16
2.3 Biyobütanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar	17
2.4 Biyobütanolün Üretim Aşamaları	18
2.4.1 Ham maddeler	19
2.4.1.1 Birinci nesil biyobütanol üretimi	20
2.4.1.2 İkinci nesil biyobütanol üretimi.....	20
2.4.1.3 Üçüncü nesil biyobütanol üretimi.....	22
2.4.1.4 Dördüncü nesil biyobütanol üretimi	25
2.4.2 Ham maddelerde uygulanan ön işlem yöntemleri	26
2.4.2.1 Fiziksel ön işlemler	28

2.4.2.2 Fiziko-kimyasal ön işlemler	29
2.4.2.3 Kimyasal ön işlemler	30
2.4.2.4 Biyolojik ön işlemler	33
2.4.3 Fermantasyon stratejileri	35
2.5 Biyobütanol Üretimine İlişkin Literatürde Yer Alan Çalışmalar	36
2.5.1 Birinci nesil biyobütanol üretimi	37
2.5.2 İkinci nesil biyobütanol üretimi	38
2.5.3 Üçüncü nesil biyobütanol üretimi	41
2.5.4 Dördüncü nesil biyobütanol üretimi	44
3. GEREÇ ve YÖNTEM	47
3.1 Gereç	47
3.1.1 Mikroorganizmalar ve inkübasyon koşulları	47
3.1.1.1 Mikroalg	47
3.1.1.2 Fermentatif mikroorganizma	47
3.1.1.3 Ham maddeler	48
3.2 Yöntem	49
3.2.1 Ön işlem yöntemleri	49
3.2.1.1 İkinci nesil ham madde olarak kullanılan endüstriyel çay atıklarının hidrolizi	49
3.2.1.2 Üçüncü nesil ham madde olarak kullanılan <i>D. salina</i> biyokütlesi	49
3.2.2 Mikroalglerin mermer atıkları ile mikсотrofik kültürasyonu	50
3.2.3 Fermantasyon deneyleri	50
3.2.3.1 Endüstriyel çay atıklarının ABE fermantasyonuna etkisi	50
3.2.4 Analitik yöntemler	52
4. BULGULAR	55
4.1 İkinci Nesil Ham Madde Olan Endüstriyel Çay Atığı ile Yapılan Çalışmalar ..	55
4.1.1 Endüstriyel çay atığının fiziksel, yapısal ve kimyasal içeriği	55
4.1.2 Farklı endüstriyel çay atığı şeker konsantrasyonlarının biyobütanol üretimine etkisi	56
4.1.3 Farklı azot kaynaklarının biyobütanol üretimine etkisi	62
4.1.4 Mineral tuzlarının (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) biyobütanol üretimine etkisi	63
4.1.5 Fermantasyon ortamlarında elde edilen kinetik parametreler ve istatistiksel analiz	76
4.2 Üçüncü Nesil Ham Madde Olan <i>D. salina</i> Biyokütlesi ile Yapılan Çalışmalar ..	78
4.2.1 <i>D. salina</i> 'nın yapısal ve kimyasal özellikleri	78
4.2.2 Mikroalgal biyokütlenin biyobütanol üretimindeki etkisi	79

4.2.3 Farklı kùltivasyon koşullarının mikroalg gelişimine etkisi.....	80
4.2.4 Miksotrofik mikroalg kùltivasyonunun biyobütanol üretimine etkisi.....	82
4.2.5 Miksotrofik mikroalg biyokùtle konsantrasyonunun ve fermantasyon süresinin biyobütanol üretimine etkisi	83
4.2.6 Fermantasyon ortamlarında elde edilen kinetik parametreler	86
5. TARTIŞMA	88
5.1 İkinci Nesil Ham Madde Olan Endüstriyel Çağ Atığı ile Yapılan Çalışmalar	88
5.1.1 Endüstriyel çağ atığının fiziksel, yapısal ve kimyasal içeriğı	88
5.1.2 Farklı endüstriyel çağ atığı şeker konsantrasyonlarının biyobütanol üretimine etkisi.....	90
5.1.3 Farklı azot kaynaklarının biyobütanol üretimine etkisi	94
5.1.4 Mineral tuzlarının (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) biyobütanol üretimine etkisi.....	95
5.1.5 Fermantasyon ortamlarında elde edilen kinetik parametreler	100
5.2 Üçüncü Nesil Ham Madde Olan <i>D. salina</i> Biyokütlesi ile Yapılan Çalışmalar	101
5.2.1 <i>D. salina</i> 'nın yapısal ve kimyasal içeriğı	101
5.2.2 Fotoototrofik olarak yetiştirilen <i>D. salina</i> biyokütlesinin biyobütanol üretimi üzerindeki etkisi	102
5.2.3 Farklı yetiştirme koşullarının mikroalg gelişimine etkisi	104
5.2.4 Miksotrofik mikroalg kùltivasyonunun biyobütanol üretimine etkisi.....	105
5.2.5 Miksotrofik mikroalg biyokùtle konsantrasyonunun ve fermantasyon süresinin biyobütanol üretimine etkisi	107
5.2.6 Kinetik parametreler	108
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	110
KAYNAKLAR	113
ÖZGEÇMİŞ.....	136

SİMGELER DİZİNİ

°C	Derece
%	Yüzde
$\geq$	Büyük eşit
$\leq$	Küçük eşit
$\Sigma(xi - x)^2$	Kareler toplamı
μM	Mikromolar
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μmol	Mikromol
5C	5 karbonlu
6C	6 karbonlu
C	Karbon
C ₄	4 karbonlu bileşikler
C ₁₂	12 karbonlu bileşikler
C ₂₅	25 karbonlu bileşikler
C ₂ H ₄	Etilen
C ₃ H ₆	Propilen
C ₂ H ₅ OH	Etanol
C ₄ H ₉ OH	Bütanol
Ca ²⁺	Kalsiyum
CaCO ₃	Kalsiyum karbonat
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
Cl ⁻	Klor
CO	Karbon monoksit
CO ₂	Karbondioksit
Cu ²⁺	Bakır
<i>df</i>	Serbestlik derecesi
Fe ²⁺	Demir
FeSO ₄	Demir sülfat
FeSO ₄ .7H ₂ O	Demir sülfat 7 sulu
g	Gram
h	Saat
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	Sülfirik asit
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HCl	Hidroklorik asit
kg	Kilogram
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat

kPa	Kilopaskal
L	Litre
m	Metre
mg	Miligram
M	Molar
Mg ²⁺	Magnezyum
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat 7 sulu
MJ	Megajul
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MnSO ₄	Mangan sülfat
Mpa	Megapaskal
N	Nitrojen
NaOH	Sodyum hidroksit
NH ₄ NO ₃	Amonyum nitrat
nm	Nanometre
OH	Hidroksil
p	İstatistiksel anlamlılık düzeyi
rpm	Dakikadaki devir
v	Hacim
Zn ²⁺	Çinko
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Çinko sülfat 7 sulu
w	Ağırlık
X ²	Ortalama kare
α	Alfa
β	Beta

Kısaltmalar

ABE	Aseton-Bütanol-Etanol
ACS	Asetil-CoA sentaz
ADH	Alkol dehidrojenaz
AFEX	Amonyak lifi patlaması
ATP	Adenozin trifosfat
BBM	Bold basal ortam
CAGR	Bileşik yıllık büyüme oranı
CBP	Konsolide biyoişlem
CimA	Sitramalat sentaz
CoA	Koenzim A
CODH	Karbon monoksit dehidrojenaz

ÇAY-KUR	Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü
DMC	Doğrudan mikrobiyal dönüşüm
DNS	Dinitrosalisilik asit
EÇAT	Endüstriyel çay atığı
FID	Alev iyonlaşma detektörü
FPU	Filtre Kağıdı Birimi (Filter Paper Units)
GC	Gaz Kromatografisi
HMF	Hidroksimetilfurfural
HPLC	Yüksek performanslı sıvı Kromatografisi
KDC	Keto-asit dekarboksilaz
LCDW	Seyreltilmiş sıvı kristal ekran atık suyu
MA	Mermer atıkları
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
RID	Kırılma indisi detektörü
RSM	Yanıt yüzey metodolojisi (Response surface methodology)
SHF	Ayrılmış hidroliz ve fermentasyon
SSF	Eş zamanlı hidroliz ve fermentasyon
SSCF	Eş zamanlı sakkarifikasyon ve ortak fermentasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bütanolün tarihsel gelişimi (Niemistö vd. 2013)	9
Şekil 2.2 Bütanolün oxo sentezi ile üretimi (Kazemi vd. 2019).....	10
Şekil 2.3 Bütanolün krotonaldehit hidrojenasyonu ile üretimi (Kazemi vd. 2019)	11
Şekil 2.4 Bütanolün reppe sentezi ile üretimi (Kazemi vd. 2019)	11
Şekil 2.5 ABE fermantasyonu sırasında asetojenik ve solventojenik faz reaksiyonları (Abo vd. 2019).....	12
Şekil 2.6 Biyobütanol üretiminde glikoliz ve pentoz fosfat yolu (Ranjan ve Moholkar 2012)	13
Şekil 2.7 Selülozun mikrobiyel parçalanma yolu	14
Şekil 2.8 Sukrozun mikrobiyel parçalanma yolu (Zhang vd. 2017)	15
Şekil 2.9 Gliserolün mikrobiyel parçalanma yolu	16
Şekil 2.10 Singazın mikrobiyel parçalanma yolu (Abubackar vd. 2015)	17
Şekil 2.11 Biyobütanol üretim aşamaları	19
Şekil 2.12 Lignoselülozik biyokütle yapısı (Khan vd. 2022).....	22
Şekil 2.13 Lignoselülozik ham maddenin ön işlemleri (Akhtar vd. 2016).....	27
Şekil 2.14 Mikroalgal biyokütlenin ön işlemleri (Bhatia vd. 2022).....	27
Şekil 4.1 Farklı EÇAT fermantasyon ortamlarında en yüksek toplam ABE, biyobütanol ve başlangıç şeker konsantrasyonları.....	57
Şekil 4.2 İki farklı fermantasyon ortamında fermantasyon sürecinde ortamda kalan şeker ve toplam ABE grafikleri. A; 40 g/L EÇAT şekeri içeren P2 ortamı: 40 g/L EÇAT şekeri, 1 g/L maya özütü, P2 solüsyonları. B; Standart P2 ortamı: 60 g/L glukoz, 1 g/L maya özütü, P2 solüsyonları.....	58
Şekil 4.3 Farklı fermantasyon ortamlarında en yüksek biyobütanol konsantrasyon değerleri	62
Şekil 4.4 Nitrojen kaynağı olarak peyniraltı suyu tozu ve maya özütü varlığında en yüksek biyobütanol konsantrasyonları	63
Şekil 4.5 Farklı konsantrasyonlardaki $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ varlığında en yüksek toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonları.....	64
Şekil 4.6 40 g/L EÇAT şekeri varlığında farklı $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonlarında biyobütanol üretiminin zamana bağlı değişimi.....	65
Şekil 4.7 P2 ortamı ve EÇAT şekeri ve 0.1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ içeren ortamda en yüksek biyobütanol üretiminin gerçekleştiği fermantasyon zamanındaki aseton, bütanol ve etanol karşılaştırması	66
Şekil 4.8 40 g/L EÇAT şekeri varlığında farklı $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonlarında biyobütanol üretkenliğinin zamana bağlı değişimi.....	68
Şekil 4.9 Farklı $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonları varlığında en yüksek toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonları	69
Şekil 4.10 Artan $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonları varlığında en yüksek toplam ABE ve biyobütanol değerleri.....	72
Şekil 4.11 40 g/L EÇAT şekeri ve 0.001 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ varlığında fermantasyon ortamındaki solvent ve şeker konsantrasyonundaki değişim.....	73
Şekil 4.12 Tüm ortamlarda elde edilen en yüksek toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonları	74
Şekil 4.13 Tüm ortamlarda zamana bağlı mikrobiyel gelişim	75

Şekil 4.14 Farklı fermantasyon ortamlarının biyobütanol üretimine etkisi.....	80
Şekil 4.15 Johnson ortamında artan CaCl_2 ve MA konsantrasyonları varlığında fotoototrofik ve miksotrofik kültürasyon koşullarının <i>D. salina</i> 'nın gelişimi üzerindeki etkisi	81
Şekil 4.16 Fermantasyon ortamına farklı MA ve CaCl_2 konsantrasyonlarında (0.4 – 2 g/L) yetiştirilen mikroalg biyokütle eklenmesinin biyobütanol ve toplam ABE üretimi üzerindeki etkisi	83
Şekil 4.17 1 g/L MA ile yetiştirilen mikroalg biyokütlesinin artan konsantrasyonlarının biyobütanol ve toplam ABE üretimi üzerindeki etkisi.....	85
Şekil 4.18 Optimize edilmiş koşullarda <i>C. beijerinckii</i> DSMZ 6422 tarafından biyobütanol üretimi üzerinde zamanın etkisi	86



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Fosil yakıtların ve biyoyakıtların fizikokimyasal özellikleri (Jin vd. 2011, Obergruber vd. 2021)	7
Çizelge 4.1 Endüstriyel çag atığının fiziksel, yapısal ve kimyasal içeriği	56
Çizelge 4.2 Farklı EÇAT şekeri konsantrasyonlarında ve kontrol gruplarında zamana bağlı ABE konsantrasyonlarındaki değişim	60
Çizelge 4.3 Farklı $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonu içeren fermantasyon ortamlarında elde edilen kinetik parametre değerleri	67
Çizelge 4.4 Farklı $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonlarında elde edilen kinetik parametre değerleri	70
Çizelge 4.5 Farklı $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonlarında elde edilen biyobütanol verimi değerlerinin zamana bağlı değişimi.....	71
Çizelge 4.6 Farklı fermantasyon ortamlarında 96. saat sonunda elde edilen kinetik parametreler	77
Çizelge 4.7 Farklı fermantasyon ortamlarında biobütanol konsantrasyonunun ANOVA analizi	78
Çizelge 4.8 <i>D. salina</i> 'nın yapısal ve kimyasal özellikleri	79
Çizelge 4.9 72 saatlik fermantasyon sonunda elde edilen kinetik parametre değerleri.....	87

1. GİRİŞ

Günümüzde insan popülasyonunun ve sanayileşmenin hızla artması enerji talebi artışını da beraberinde getirmektedir. Ancak dünyada söz konusu enerji talebini karşılayacak enerji kaynakları yetersizdir (Sharma ve Singh 2009). Son dönemlerde, enerji ihtiyacını karşılamak için fosil kaynak rezervlerinin yoğun bir şekilde kullanılması, rezervlerin hızla tükenmesine, petrol fiyatının artmasına ve yandıklarında açığa çıkan zararlı gazlar ile canlıları tehdit etmesine sebep olmaktadır. Yenilenemeyen kaynakların bu olumsuz etkilerini azaltmak hatta ortadan kaldırmak amacıyla son zamanlarda araştırmacılar güneş, hidrojen ve biyokütle gibi yenilenebilir kaynaklardan enerji ihtiyacını karşılama fikrine yönelmişlerdir (Panwar vd. 2011, York ve Bell 2019). Bunların arasında biyokütle enerjisi son yıllarda özellikle biyoyakıt üretiminde büyük önem arz etmektedir. Biyokütle enerjisi, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyel olan her türlü biyolojik materyalden üretilen enerji türüdür. Biyokütle enerjisi ile üretilen biyoyakıtlar (biyoetanol, biyobütanol, biyodizel, biyogaz vb.) sürdürülebilir ve çevre dostu olmaları sebebiyle taşımacılık alanında kullanılan petrol kökenli yakıtların yerini alabilecek potansiyelindedir. Bu nedenle Çin, Amerika ve Avrupa ülkelerinde biyoetanol, biyodizel ve biyobütanol üretiminin yapıldığı tesisler kurulmuş ve günümüzde faaliyetlerine aktif olarak devam etmektedirler (Wang vd. 2017a). Birçok ülkede üretimlerinde büyük ölçekli boyutlara geçilmesi, biyoyakıtların önemli avantajlara sahip olduğunun bir göstergesidir.

Literatüre bakıldığında alternatif enerji kaynağı olarak biyoetanol üretimi ile ilgili çalışmaların sayısının oldukça fazla olduğu görülmekle birlikte son dönemlerde biyobütanol, yüksek enerji yoğunluğu, düşük nem çekme gibi üstün özelliklerinden dolayı araştırmacıların yeni ilgi odağı haline gelmiştir (Seifollahi ve Amiri 2020). Bütanol yapısal olarak 4 karbonlu uzun zincirli primer bir alkoldür. Literatürde *n*-butanol, *iso*-butanol, *sec*-butanol ve *tert*-butanol türevleri bulunmaktadır. Bütanolün türevlerinin yapısal farklılıklarından dolayı, alternatif enerji kaynağı olarak kullanılmaları da farklılık göstermektedir. Örneğin, *iso*-bütanol ve *n*-bütanol, benzine yakın oktan sayısı ve otoalevlenme sıcaklığı gibi özelliklere sahip olması nedeniyle fosil kaynaklı yakıtlar ile kolayca karıştırılarak kullanılabilir (Mack vd. 2016). Bütanolün üstün özelliklerinin yanında biyobütanol üreten mikroorganizmalarda mikrobiyel gelişimin ve

verimin düşük olması, mikroorganizmaların bütanole duyarlı olması ve toksik etkisi gibi olumsuz özellikler araştırmacıları bu sorunlara çözüm bulmaya yöneltmiştir (García vd. 2011, Yeong vd. 2018). Bu bağlamda yapılması planlanan projede biyobütanol üretimi için verimin yükseltilmesi amaçlanmaktadır.

Bütanol dünyada kimyasal yol ile fosil yakıtlardan sentetik olarak üretilebilirken, mikrobiyel olarak *Clostridium* türleri tarafından Glikoliz veya Pentoz Fosfat yolu ile aseton-bütanol-etanol (ABE) fermantasyonu sonucu gerçekleştirilmektedir (Lütke-Eversloh ve Bahl 2011). *Clostridium* türleri çoğunlukla anaerobik mikroorganizmalar olup, çok fazla enzim çeşidi üretebilme kapasiteleri sayesinde bütanol üretimi için büyük avantaj sağlamaktadır (Ezeji vd. 2007). Bu mikroorganizmalar bütanol üretimi için çoğunlukla karbon, azot, çeşitli mineral tuzları ve vitamin içeren sentetik besiyerlerinde geliştirilmektedir (Parekh vd. 1998). Ancak bu besiyerleri ekonomik olarak maliyetlidir ve her türe özel bir içeriğe sahip olmadıklarından mikrobiyel gelişim sınırlanabilmektedir. Bu durum bütanol üretimindeki verimi de etkilemektedir. Bu anlamda hem ekonomik hem de mikrobiyel gelişimi destekleyici besiyeri olarak yenilenebilir ham maddelerin kullanımıyla ilgili çalışmalar literatürde yer almaya başlamıştır (Farmanbordar vd. 2018). Biyobütanol üretiminde kullanılan yenilenebilir ham maddeler birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü nesil olmak üzere 4'e ayrılmaktadır (Alalwan vd. 2019). Birinci nesil ham maddeler, yüksek şeker ve lipid içeriğine sahip buğday, mısır gibi gıda olarak tüketilen ürünleri içermektedir. Ancak, son yıllarda gıda üretimi açısından rekabete sebep olması ve üretimleri için geniş alanlara ihtiyaç duyulması nedeniyle literatürde yeni ham madde arayışlarına gidilmiştir. Bu anlamda, belirtilen olumsuzlukları ortadan kaldırmak için, gıda ve ekonomik değeri olmayan, yüksek besin değerine sahip atık maddeleri içeren ikinci nesil ham maddeler literatürde yer bulmaya başlamıştır. Endüstriyel, zirai, belediye ve evsel atıklar ikinci nesil ham madde kapsamındadır. Bunlar arasında zirai atıklar yüksek oranda fermente edilebilir şeker içermeleri sebebiyle biyoyakıt üretiminde uzun yıllardır tercih edilmektedir (Naik vd. 2010). Ülkemizde de endüstriyel ve zirai atık olarak açığa çıkan birçok ham madde bulunmaktadır. Bunlar arasından çay atıkları ülkemizde yaklaşık olarak yıllık 30-50 bin ton olarak açığa çıkmakta olup, ham madde üretim miktarları açısından ilk sıralarda yer almaktadır (Germec ve Turhan, 2018). Bunların yanında yüksek oranda selülozik ve

hemiselülozik içeriğe sahip olmalarından dolayı, çay atıklarının biyobütanol üretiminde alternatif bir ham madde kaynağı olarak değerlendirilebileceği öngörülmektedir (Germec vd., 2020). Bu anlamda yapılması planlanan tez çalışmasında daha önce literatürde denenmemiş endüstriyel çay atıklarının (EÇAT) biyobütanol üretimine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda farklı azot kaynaklarının ve mineral tuzlarının, çay atığı şekeri varlığında biyobütanol üretimine etkisi belirlenecektir.

Fotosentetik mikroorganizmaların kullanıldığı üçüncü nesil ham maddeler ise, birinci ve ikinci nesil ham maddelere göre bazı avantajlara sahiptir. Hızlı büyüme ve küçük alanda üretim, iklim koşullarına dayanıklı olma, CO₂ emisyonunu azaltma gibi avantajlarından dolayı son yıllarda literatürde biyoyakıt üretiminde kullanılmaya başlanmıştır (Cheng vd. 2015, Wang vd. 2016). Özellikle *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus*, *Spirulina platensis*, *D. tertiolecta* gibi mikroalgler hücre içerisinde yüksek oranda şeker ve lipid içeren yapıları sayesinde biyoyakıt üretiminde sıkça kullanılmaktadır (Dickinson vd. 2017, Wang vd. 2017a). Bunların yanında *D. salina* mikroalgi, diğer mikroalglerin yanında yüksek oranda β -karoten, protein (~%57) ve önemli vitamin (E, C, B₁₂) içeriğine sahip olması sayesinde sağlık ve hayvan yemi gibi alanlarda fazlaca kullanılmaktadır (Dai vd. 2010, Kumudha ve Sarada 2016, Sui ve Vlaeminck 2019). Böylelikle, önemli besin içeriği sayesinde mikrobiyel gelişimi olumlu yönde etkileyeceği öngörülebilmektedir. Bu anlamda tez çalışmasında, *D. salina* biyokütlesinin tamamının (karbonhidrat, lipid, protein, vitamin, mineral) biyobütanol üretiminde etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yukarıda belirtilen tüm ham maddeler sadece biyoyakıt üretimi için değil mikrobiyel gelişimi desteklemek amacıyla da literatürde kullanılmaktadır. Örneğin, ürünlerin işlenmesi sırasında açığa çıkan yan ürünler yüksek oranda karbon içerebilmektedir. Özellikle kağıt ve mermer sanayisinde açığa çıkan endüstriyel atıkların %90'ında karbonca zengin bileşikler bulunmaktadır (Hebhoub vd. 2011). Bu anlamda fotoototrofik gelişim gösteren mikroalglerin, karbon içeriği zengin ortamlarda yetiştirildiklerinde mikrobiyel gelişimlerinin önemli oranda arttığı literatürde belirtilmektedir (Patel vd. 2019). Belirtilenler ışığında projede biyobütanol üretiminde mikroalgal ham madde kaynağının miktarını artırmak için, *D. salina* mikroalginin fotoototrofik ve miksotrofik

gelişiminin incelenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla mikсотrofik gelişim, daha önce literatürde kullanılmamış mermer atıklarının (MA) kullanılması ile gerçekleştirilmiştir.

Genel kapsamda bakıldığında, yapılan tez çalışmasında, ikinci ve üçüncü nesil ham maddelerden elde edilecek biyokütle ve şekerlerin *Clostridium* türleri tarafında fermente edilerek, biyobütanol üretiminin gerçekleştirilmesi ve endüstriyel atıkların mikroalgal gelişime etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Belirtilen amaçlar doğrultusunda,

- Çay atığı seyreltik asit ön işlem yöntemiyle hidroliz edilerek içeriğindeki fermente edilebilir şekerler açığa çıkarılmış ve farklı konsantrasyonlarında biyobütanol üretimi değerlendirilmiştir.
- Optimize edilmiş çay atığı şekeri konsantrasyonunda, biyobütanol üretiminde farklı azot kaynakları ve mineral tuzlarının (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) etkisi belirlenmiştir.
- Halofilik *D. salina* mikroalginin fotoototrofik ve MA varlığında mikсотrofik gelişimi incelenmiştir.
- Elde edilen algal biyokütle bakteriyel büyümeyi destekleyici ve metabolik aktiviteyi artırıcı kaynak olarak değerlendirilmiştir.
- Mikсотrofik gelişimde karbon kaynağı olarak MA kullanılmış ve belirtilen atığın hem mikroalgal gelişime hem de biyobütanol üretimine etkisi belirlenmiştir.
- Gelişme takibi ile en yüksek biyokütle miktarının elde edildiğı MA konsantrasyonu belirlenmiştir. Ayrıca tüm MA konsantrasyonlarından elde edilen yaş biyokütleler, ABE fermantasyonunda kullanılmak üzere tüm biyokütle (karbonhidrat, protein, vitamin, mineral içeriğı) olarak değerlendirilmiştir. Yaş ham biyokütle *C. beijerinckii* DSMZ 6422 bakterisinin standart besiyeri içerisine destekleyici materyal olarak eklenmiştir.
- *C. beijerinckii* DSMZ 6422 tarafından en yüksek biyobütanol üretiminin gerçekleştiğı MA konsantrasyonu belirlenerek, bir sonraki aşamada belirlenen MA konsantrasyonunda geliştirilmiş farklı mikroalgal biyokütle konsantrasyonlarının ABE fermantasyonunda etkisi belirlenmiştir.

Planlanan çalışmada ulaşılmak istenen nihai hedefler doğrultusunda;

- Literatürde ilk kez çay atıklarının biyobütanol üretiminde ucuz bir ham madde olarak kullanım etkinliği belirlenmiştir.
- Literatürde ilk kez endüstriyel MA'nın *D. salina* mikroalginin gelişimi üzerine etkisi belirlenmiştir.
- Mikroalg ham maddesi ile katkılanmış fermantasyon ortamında mikroalgal biyokütledeki besin içeriğinin ABE üretiminde etkinliği tespit edilmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Bütanolün Genel Özellikleri

Bütanol 4 karbonlu uzun zincirli ve farklı kimyasal yapılara sahip (*n*-bütanol, *sec*-bütanol, *tert*-bütanol, and *iso*-bütanol) primer bir alkoldür (Mack vd. 2016). Bu formlar arasında *n*-bütanol benzine yakın oktan sayısı ve kendiliğinden tutuşma sıcaklığı nedeniyle tercih edilmekte ve biyobütanol olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca *n*-bütanol uzun yıllardır ilaç ve kimya endüstrisinde kullanılan önemli bir ürün ve yan ürün olmuştur. Potansiyel bir biyoyakıt olmasının yanında eterler, asetatlar, esterler ve plastikleştiriciler gibi kimyasal ürünlerin sentezi için değerli bir ham madde ve çözücüdür (Ranjan ve Moholkar 2012). Bu nedenle bütanolün birçok sektörde kullanımı yüksek düzeyde *n*-bütanol üretimini zorunlu kılmış ve üretim yolları ile ilgili çalışmalar tarih boyunca literatürde yer almıştır.

Biyobütanol yüksek enerji yoğunluğu, benzine yakın oktan sayısı, suda düşük çözünürlük, düşük buharlaşma ısısı, yüksek yoğunluk, benzin ve dizele yakın stokiyometrik oran ve benzin ve dizel ile kolay karışabilme gibi özelliklerine sahiptir (Siwale vd. 2013). Özellikle benzin ile benzer moleküler yapıya sahip olmasından dolayı dizel ve benzin ile kolayca yüksek oranlarda karışabilmektedir. Böylelikle yakıt olarak kullanımında araç motorlarında modifikasyona gerek kalmamaktadır. Biyobütanolün uzun zincirli bir alkol olması yüksek enerji yoğunluğuna sahip olmasını ve yakıt performansının daha yüksek olmasını sağlamaktadır. Bunların yanında düşük buhar basıncı sayesinde ulaşım ve depolama aşamalarında güvenlidir. Düşük uçuculuk özelliği ile değişken sıcaklık aralıklarında kavitasyonu azaltmaktadır (Zhen vd., 2020). Petrol kökenli benzin ve dizele yakın stokiyometrik orana sahip olması, biyobütanolün yüksek oranda yanarak enerjiye dönüşümünü kolaylaştırmaktadır. Sudaki düşük çözünürlüğü ile taşınma esnasında boru hatlarında düşük korozyon görülmektedir (Zhen vd., 2020). Bu kapsamda dünyada üretim potansiyeli her geçen gün artan biyobütanolün küresel pazar büyüklüğü 2020 yılında 3.000 milyon galon olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca Mordor Intelligence verilerine göre biyobütanolün 2021-2026 tahmini yıllarında %8.5'in üzerinde bileşik yıllık büyüme oranı (CAGR) kaydetmesi beklenmektedir (Anonymous 2021). Özellikle

dünyada biyobütanol üretimine hakim olan Çin'de 15 milyon tonun üzerinde biyobütanolün (küresel biyobütanol üretiminin %60'ı) üretileceği tahmin edilmektedir (Mohapatra vd. 2020). Büyük ölçekli üretimlerine bakıldığında ilk olarak 2005 yılında Amerika merkezli DuPont ve British Petroleum şirketleri biyobütanolün üretimi için önemli yatırımlar yapmış ve 2007 yılında üretimlerine başlamıştır. Bu gelişmeden sonraki süreçte farklı ülkelerde de büyük ölçekli biyobütanol üretimi için önemli adımlar atılmıştır (Veza vd. 2021).

Biyobütanol, dünyada yüksek oranda üretim potansiyeli bulunan dizel ve etanole göre daha avantajlı özelliklere sahiptir. Biyodizel için en önemli problem, fiziksel ve kimyasal yapılarından dolayı araç motorlarında modifikasyon yapılmadan direkt olarak kullanımları mümkün değildir. Etanol ise düşük enerjili ve suda çözünürlüğü yüksek bir yapıya sahiptir. Bu dezavantajlar göz önüne alındığında biyobütanol, değerli özellikleri sayesinde bu problemlerin üstesinden gelebilmektedir. Çizelge 2.1'de diğer yakıtlar ile biyobütanolün karşılaştırması verilmiştir.

Çizelge 2.1 Fosil yakıtların ve biyoyakıtların fizikokimyasal özellikleri (Jin vd. 2011, Obergruber vd. 2021)

Özellik	Dizel	Benzin	Etanol	n-bütanol
Molekül formülü	C ₁₂ –C ₂₅	C ₄ –C ₁₂	C ₂ H ₅ OH	C ₄ H ₉ OH
Moleküler ağırlık	198.4	111.19	46.07	74.11
Enerji yoğunluğu (MJ/L)	35.86	32	25	29.2
Setan sayısı	40–55	0–10	5–8	12.0
Oktan sayısı	20-30	80-99	108	96
Yoğunluk	0.82–0.86	0.72–0.78	0.789	0.808
Suda çözünübilirlik (25 °C (g/L))	0.01–0.06	0.046–0.077	∞	73
Kaynama noktası (°C)	180–370	25–215	78.5	117.7
Stokiyometrik hava:yakıt oranı	14.3	14.7	9.02	11.21
Viskozite (mm²/s (25 °C))	1.9–4.1	0.4–0.8	1.07	2.63

Çizelge 2.1 Fosil yakıtların ve biyoyakıtların fizikokimyasal özellikleri (Jin vd. 2011, Obergruber vd. 2021) (devam)

Yanıcılık (%(v/v))	1.5–7.6	0.6–8	3.3–19	1.4–11.2
Alevlenme noktası (°C)	65–88	–45 to –38	14	35
Buhar basıncı (kPa)	0.2–0.7	75	16.5	6
Otoalevlenme sıcaklığı (°C)	~210	~300	434	385
Oksijen içeriği (%)	-	-	34.8	21.6

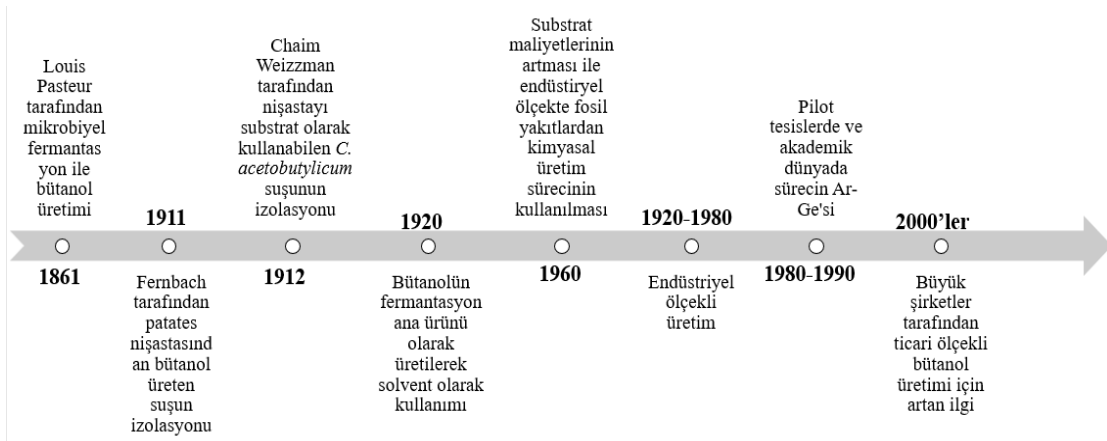
Çizelgeye göre, diğer yakıtlara göre daha üstün özelliklere sahip olması, onun kullanım potansiyelinin yükselmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca biyobütanol yandığında kükürt ve nitrojen oksit gazı açığa çıkarmamaktadır. Bu anlamda biyobütanolün yakıt olarak kullanımı bir çok çevresel probleminde çözümünü kolaylaştıracaktır.

Bütanol üretimi, kimyasal veya biyolojik olarak gerçekleştirilebilmektedir. Tarihin belirli dönemlerinde biyokütle tabanlı biyobütanol üretiminde karşılaşılan maddi problemler çeşitli sektörlerde kullanılan bütanolün üretimini petrokimyasal yollarla gerçekleştirmeyi zorunlu kılmıştır. Bu anlamda biyobütanol olarakta tanımlanan *n*-bütanolün endüstriyel olarak çoğunlukla propilen oxo sentezi ile üretilmesinin yanında, Reppe sentezi ve etanolden bütanol üretimi yolları da kullanılmaktadır (Huzir vd. 2018). Bu yollar kullanılarak çeşitli alanlarda ham madde olarak kullanılan bütanolün tedariği sağlanmıştır.

2.2 Tarihte Bütanol Üretimi

Bütanol üretiminde petrokimyasal üretime olan ilginin artmasından önce 1861'de Louis Pasteur tarafından Aseton-Bütanol-Etanol (ABE) fermantasyonunun keşfedilmesiyle biyobütanol üretimi gerçekleştirilmiştir (Panahi vd. 2023). Ardından Fernbach patates gibi biyokütleleri kullanarak kendi izole ettiği mikroorganizmanın fermantasyon yolu ile biyobütanol üretmiş (Bhattacharyya vd. 2023) ve sentetik kauçuk endüstrisinde bu üretim yolu farklı öncü ürünlerin eldesi için kullanılmıştır. Daha sonra bu fermantasyon

yönteminin kullanımı Pasteur'ün bir öğrencisi olan Chaim Weizmann'ın 1912'da *Clostridium acetobutylicum*'u (daha yüksek verimli biyobütanol üretimi) izole etmesiyle temelde aseton üretmek amacıyla başlamış ve I. ve II. Dünya Savaşı sırasında cephane üretiminde popülaritesi yükselmiştir (Mehmood vd. 2023). Bunun yanında fermantasyon aşamasında 1 mol asetonun yanında 2 mol bütanolün açığa çıkması, ABE fermantasyonunun ilerleyen yıllarda otomobil endüstrisinde önemli bir ürün olan biyobütanolün üretimi (hızlı kuruyan cila olarak) için kullanılmasında önemli bir adım olmuştur. 1960 yılının sonuna kadar, farklı biyokütleler kullanılarak fermantasyon yolu ile Amerika Birleşik Devletleri, Sovyet Sosyalist Cumhuriyetler Birliği, Çin, Avustralya, Japonya ve Güney Afrika gibi ülkeler yüksek miktarda büyük ölçekli biyobütanol üretimi gerçekleştirmiştir. Ancak II. Dünya Savaşı sonrası, daha ucuz bir yol olan petrokimyasal üretim şekli popüler olmaya başlamış ve ABE fermantasyonu daha yüksek maliyetten dolayı geri plana düşmüştür (Ranjan ve Moholkar 2012). 1980-1990 yıllarında solvent olarak kullanımlarının yoğun olmasından kaynaklı olarak biyobütanol üretiminin maliyetini azaltmak amacıyla akademik alanda çeşitli araştırmalar yapılmaya başlamış ve pilot üretim tesisleri için önemli adımlar atılmıştır. Ayrıca son dönemlerde farklı biyokütlelerin kullanımı ve genetik mühendisliğindeki gelişmeler, yine Dünya'yı biyobütanol üretiminde ABE fermantasyonunun kullanımına yöneltmiştir. Bu bağlamda günümüz 2000 yıllarına bakıldığında ise akademik alanlarda çalışmalara devam edilmesinin yanında büyük ölçekli biyobütanol üretimine ilişkin tesisler kurulmuş ve üretimlerine devam edilmektedir. Bütanolün tarihte üretimi ve kullanımına ilişkin zaman akış şeması şekil 2.1'de görülmektedir.



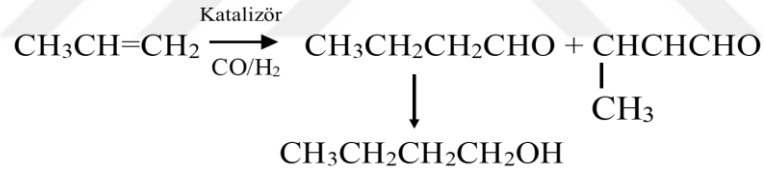
Şekil 2.1 Bütanolün tarihsel gelişimi (Niemistö vd. 2013)

2.2.1 Bütanolün petrokimyasal üretim mekanizmaları

Bütanol kimyasal olarak temelde oxo sentezi, reppe sentezi ve krotonaldehit hidrojenasyonu yolu ile üretilmektedir (Kazemi vd. 2019).

2.2.1.1 Oxo sentezi

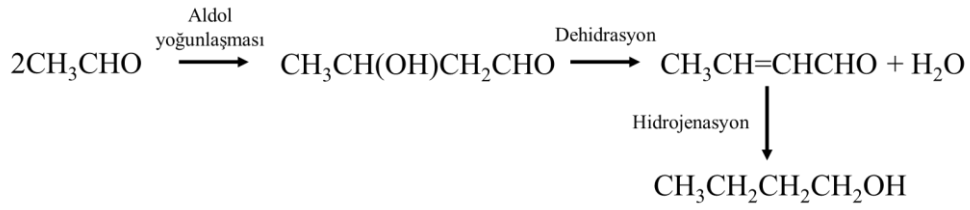
Bu üretim yöntemi, oldukça ucuz, etkili ve verimlidir. Üretim sürecinin ilk aşamasında, bir katalizör varlığında (rodyum veya rutenyum) uygun sıcaklık ve basınç koşullarında singaz (karbon monoksit+hidrojen) ve petrol türevi olefinler (C_2H_4 ve propilen (C_3H_6)) arasındaki bir reaksiyon ile aldehitler üretilir. Üretilen aldehitler ikinci aşamada, bütanol izomerlerini üretmek için hidrojenlenir. Süreç sonunda yaklaşık %98 verimle *n*-bütanol üretimi gerçekleştirilir. Şekil 2.2 de oxo sentezi reaksiyonları gösterilmiştir (Chaudhari ve Meshram 2021).



Şekil 2.2 Bütanolün oxo sentezi ile üretimi (Kazemi vd. 2019)

2.2.1.2 Krotonaldehit hidrojenasyonu

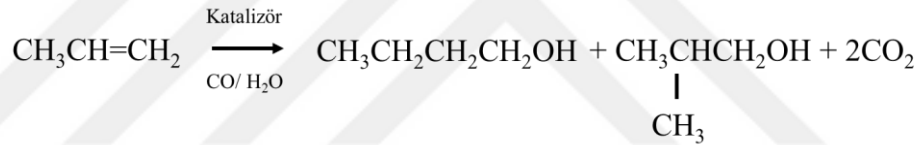
Krotonaldehit hidrojenasyon işleminde, bir alkalın katalizör varlığında asetaldehitten uygun sıcaklık ve basınçta aldol yoğunlaşması gerçekleşir. Daha sonra asetik asit veya H_3PO_4 ile asitleştirme sonucu dehidrasyon meydana gelir. Oluşan son ürün krotonaldehit damıtılır ve bir Cu (bakır) katalizörü varlığında gaz veya sıvı fazlarda hidrojenasyon yapılır (Lee vd. 2022) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Bütanolün krotonaldehit hidrojenasyonu ile üretimi (Kazemi vd. 2019)

2.2.1.3 Reppe sentezi

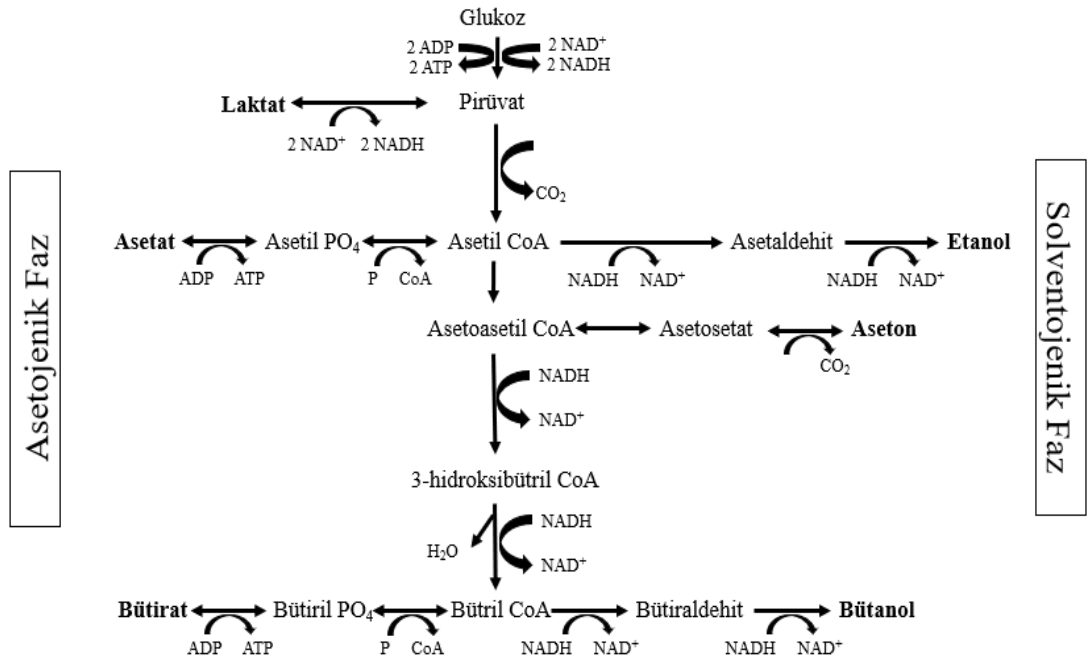
Reppe sentezinde 1-bütanol üretimi için, 100 °C ve 0.5-2 MPa basınçta bir katalizör varlığında CO ve H₂O kullanılarak C₃H₆'nın karbonilasyonunu gerçekleştir. Süreç sonunda 86:14 oranında 1-Bütanol ve 2-metil-1-propanol üretilir (Uyttebroek vd. 2015) (Şekil 2.4). Ancak bu metod maliyet avantajlı olmadığı için tercih edilmemektedir.



Şekil 2.4 Bütanolün reppe sentezi ile üretimi (Kazemi vd. 2019)

2.2.2 Bütanolün biyolojik üretim mekanizmaları

Bütanolün biyolojik üretimi mikrobiyel olarak doğal üreticiler olan bazı *Clostridium* türleri tarafından gerçekleştirilmektedir. *Clostridium* türleri çoğunlukla zorunlu anaerob, endospor oluşturabilen, gram pozitif, çubuk şeklinde mikroorganizmalardır (Cheawchanlertfa vd. 2020). Bu mikroorganizmalar ABE fermantasyonu yolu ile biyobütanol üretimini gerçekleştirmektedir. ABE fermantasyonu asetojenik ve solventojenik olarak iki fazda meydana gelmektedir. Asetojenik fazda, mikrobiyel hücreler büyüyerek asetik asit, bütirik asit, karbondioksit ve hidrojen üretilirken, solventojenik fazda asitler, aseton, bütanol ve etanole dönüştürülmektedir. Şekil 2.5 fermantasyon sırasında oluşan fazları göstermektedir.



Şekil 2.5 ABE fermantasyonu sırasında asetojenik ve solventojenik faz reaksiyonları (Abo vd. 2019)

Clostridium sp. türleri kendi gelişimleri için ihtiyaç duydukları karbonu anaerobik ortamda polimer formdaki şeker kaynaklarını enzimler yardımıyla parçalayarak ve monomer hale dönüştürerek karşılamaktadır. Monomer forma dönüştürülmüş şekerler ise enerji ihtiyacını karşılamak amacıyla temel olarak Glikoliz (6C'lu şekerler için) veya Pentoz Fosfat yolu (5C'lu şekerler için) ile Pirüvat'a daha sonra ise yine enzimler yardımıyla son ürün olan aseton, etanol ve bütanole dönüştürülmektedir (Lütke-Eversloh ve Bahl 2011, Raganati vd. 2015).

2.2.2.1 Glikoliz (EMP)

Glikoliz yolu, ABE fermantasyonunda mikroorganizmanın en sık tercih ettiği yoldur. Burada 1 mol glukoz, önce glukoz-6-fosfata fosforile edilir ve 2 mol pirüvata dönüştürülür. Oluşan pirüvat mikroorganizmanın metabolik ihtiyacına uygun enzimler aracılığıyla farklı fermantasyon ürünlerine dönüşür (Şekil 2.6). Enerji ATP ve NADH olarak depolanır.

biyokütlelerin fizikokimyasal olarak gazlaştırılması ile elde edilen singazı ise, Asetil CoA (Wood-Ljungdahl) Yolu'nu kullanarak biyobütanole çevrilmektedir (Jang vd. 2012).

Belirtilen temel ve alternatif yollar kullanılırken, monomerlerin çeşitli enzimler eşliğinde izlediği mekanizmalar bulunmaktadır. Selüloz ve sukroz gibi polimerik şekerlerin, gliserol ve singaz gibi monomerik maddelerin metabolizması üzerinde literatürde oldukça durulmaktadır.

2.2.3.1 Selüloz metabolizması

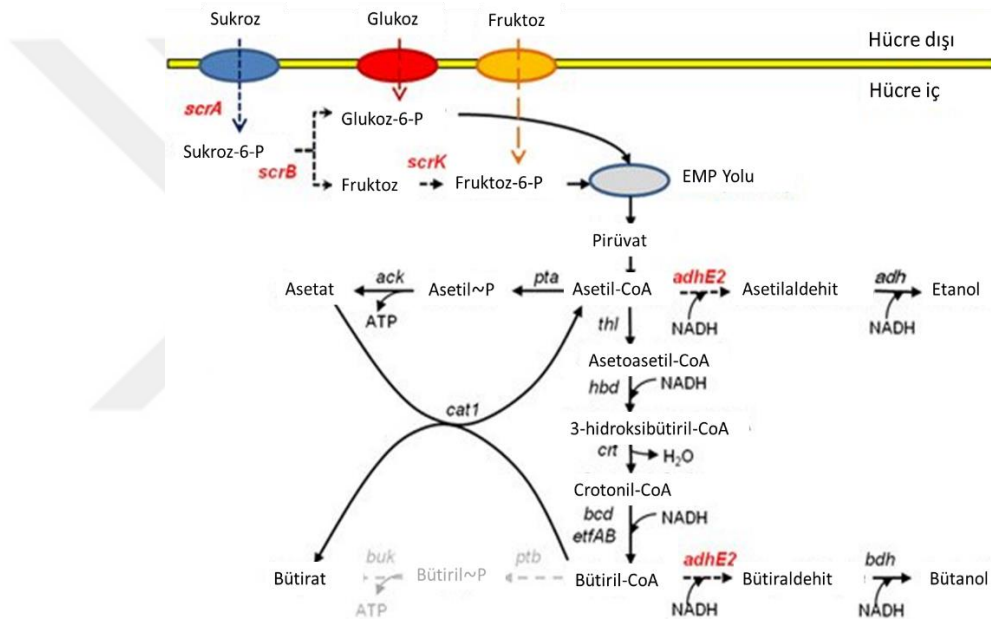
Selülozik ve hemiselülozik ham maddelerin (arpa, buğday, meyve kabukları vb.) metabolize edilebilmesi için öncelikle monomer yapılara parçalanması gerekmektedir. Bu amaçla, *Clostridium sp.* türleri sellodekstrin ve sellotetraoz varlığında endoglukonaz enzimini kullanarak selülozu selooligosakkaritlere parçalamaktadır. Oluşan bu maddeler ise β -glukosidaz enzimi ile 6C'lu veya 5C'lu şekerlere dönüştürülerek Glikoliz veya Pentoz Fosfat yoluyla metabolize edilmektedir (Virunanon vd. 2008) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Selülozun mikrobiyel parçalanma yolu

2.2.3.2 Sukroz metabolizması

Şeker kamışı ve melas (şeker kamışı atığı) sukroz içeriği yönünden zengin ham maddelerdir. Mikroorganizmalar, sukrozu monomerleri olan glukoz ve fruktoza parçalamak için öncelikle hücre zarındaki EII sukroz transferaz ve sukroz permeaz enzimleri ile sukroz-6-fosfat'a, daha sonra fruktoz-6-fosfat ve glukoz-6-fosfat'a dönüştürerek Glikoliz yolu ile metabolize etmektedir (Tangney ve Mitchell 2000) (Şekil 2.8).

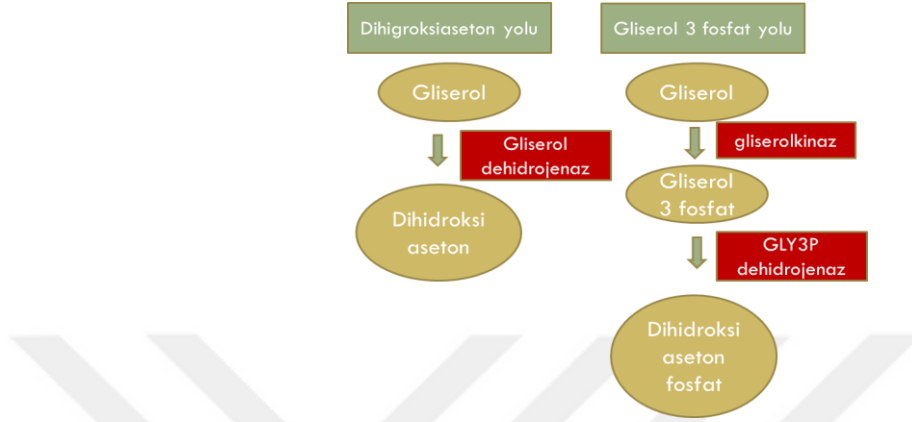


Şekil 2.8 Sukrozun mikrobiyel parçalanma yolu (Zhang vd. 2017)

2.2.3.3 Gliserol metabolizması

Özellikle biyodizel endüstrisinde açığa çıkan gliserol *Clostridium sp.* türleri tarafından metabolize edilerek biyobütanol üretiminde kullanılabilir. Gliserol temel olarak Dihidroksiaseton yolu ya da Gliserol-3-Fosfat Yolu ile metabolize edilmektedir. Dihidroksiaseton yolunda gliserol, Gliserol dehidrojenaz enzimi ile Dihidroksiaseton'a dönüştürüldükten sonra Ketoasit yolunu izleyerek bütiraldehit'e ve daha sonra bütanole dönüştürülmüştür. Gliserol-3-Fosfat yolunda ise gliserol, gliserol kinaz enzimi ile

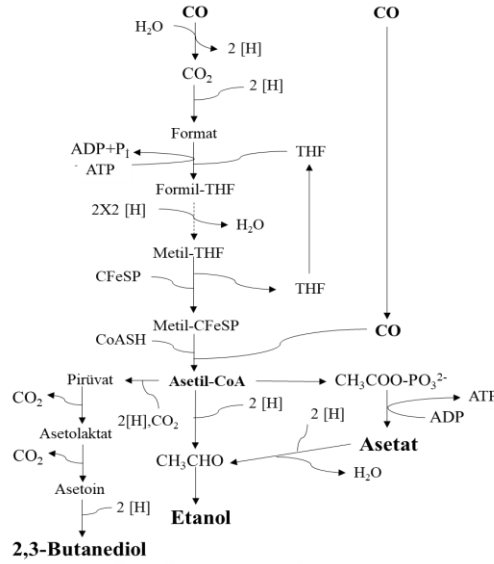
Gliserol-3-Fosfat'a, bu ürün ise Gliserol-3-Fosfat dehidrojenaz ile Dihidroksiaseton fosfata çevrilerek aynı ketoasit yolu ile biyobütanole dönüştürülmektedir (Yazdani ve Gonzalez 2007) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Gliserolün mikrobiyel parçalanma yolu

2.2.3.4 Singaz metabolizması

Singaz metabolizmasında *Clostridium sp.* türleri Asetil CoA (Wood-Ljungdahl) yolunu kullanmaktadır. Çeşitli ham maddelerin biyokütlelerinin fizikokimyasal olarak gazlaştırılması ile oluşan CO'i, karbon monoksit dehidrojenaz (CODH) enzimi ile CO₂'e katalize ederek, tetrahidrofolat bağımlı enzimler ile bir metil grubuna indirgemektedir. Bu reaksiyon sonucu oluşan metil, karbonil ve CoA grupları, asetil-CoA sentaz (ACS) ve CODH'den oluşan enzim kompleksi ile birleşerek Asetil-CoA üretimi gerçekleştirmektedir. Asetil-CoA, fermentatif yolu izleyerek biyobütanole dönüştürebilmektedir (Köpke vd. 2010) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Singazın mikrobiyel parçalanma yolu (Abubackar vd. 2015)

2.3 Biyobütanol Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Biyobütanol üretimi doğal süreçler ile sadece bazı *Clostridium sp.* türleri tarafından gerçekleştirilmektedir. *Clostridium sp.* türleri Gram pozitif, endospor oluşturan çoğunlukla anaerobik bakterilerdir (Lee vd. 2008). Pentoz, heksoz, nişasta, selüloz, hemiselüloz gibi polisakkaritleri fermente edebilirler. Fermantasyon ürünleri, bütirik asit, asetik asit, bütanol, aseton, etanoldür. Çoğu türü doğal olarak çeşitli polimerik şeker yapılarını parçalayabilen amilazlar, glukosidazlar, hemiselülaz, ksilanaz ve selülaz gibi enzimleri sentezleyebildiği için biyoyakıt üretiminde önemli bir potansiyele sahiptir (Ezeji vd. 2007, Kiyoshi vd. 2015, Ou vd. 2017). Bu nedenle, *Clostridium* türleri, çoğu etanol üreten mikroorganizmadan (yalnızca heksozları fermente edebilenler) farklı olarak lignoselülozik ham maddelerden hem hemiselüloz kaynaklı pentozları hem de selüloz kaynaklı heksozları fermente etmek için avantajlıdır (Amiri ve Karimi 2018). Bu özellikleri mikrobiyel gelişim ve biyobütanol üretimi için kullanılan karbon kaynaklarında seçici davranmamayı sağlamaktadır.

C. acetobutylicum ve *C. beijerinckii* biyobütanolün mikrobiyel üretiminde en çok kullanılan türlerdir. Literatürde özellikle farklı karbon kaynakları kullanılarak biyobütanol üretimi ile alakalı yapılan çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedirler.

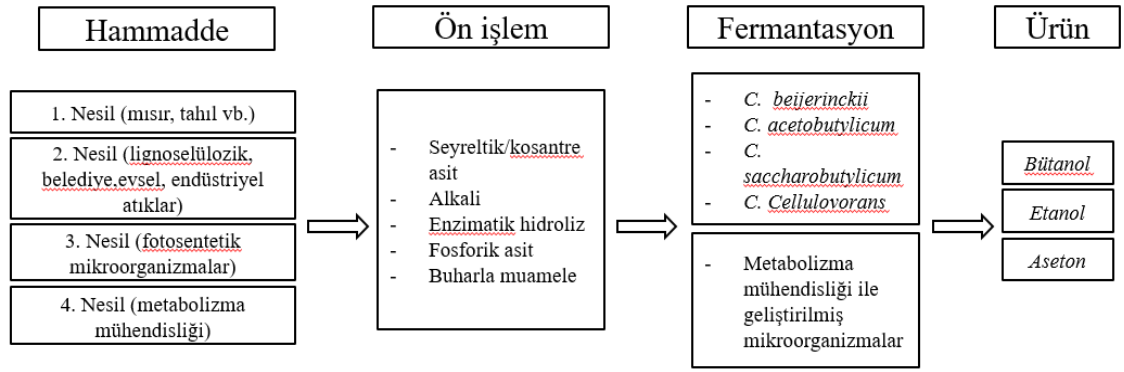
C. saccharobutylicum, *C. saccharoperbutylacetonium* ve *C. pasteurianum* literatürde sık olmasa da yüksek biyobütanol üretim kapasitelerinden dolayı dikkat çekmektedir.

C. ljungdahlii ve *C. butyricum* gibi *Clostridium* türleri, aseton ve butanol üretimi için sırasıyla singazı ve hemiselüloz kullanma kapasitesine sahiptir (Richter vd. 2016, Patra vd. 2008).

ABE fermentasyonu, bilinen en eski fermentasyon türlerinden biridir. Ancak, fermentasyonda üretilen biyobütanolün *Clostridium* türlerinde yüksek toksisiteye sebep olması, bu fermentasyon şeklinin geniş ölçüde kullanımı etkilemektedir. Ayrıca, fermentasyonda kullanılan yüksek substrat ve şeker konsantrasyonu da yine bütanol üretimini etkilemektedir (Visioli vd. 2014). Bu anlamda, bu problemlerin üstesinden gelmek için solventojenik *Clostridium* türlerinde genetik modifikasyon uygulamaları (heterojen gen ekleme, yok etme, yüksek ekspresyon gibi) son zamanlarda dikkat çekmektedir. Ayrıca bu türlerin üretim zorluklarından kaynaklı olarak *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* gibi iyi bilinen mikroorganizmaların genetik manipülasyonları ile endüstriyel biyobütanol üretimindeki sorunlar giderilebilmektedir (Pugazhendhi vd. 2019).

2.4 Biyobütanolün Üretim Aşamaları

Mikroorganizmalar tarafından biyobütanolün eldesi etkin ve önemli bir süreci kapsamaktadır. Bu süreç, ham madde, ön işlem, fermentasyon ve ürün eldesi aşamalarından oluşmaktadır. Şekil 2.11’de biyobütanol üretim aşamaları gösterilmektedir.



Şekil 2.11 Biyobütanol üretim aşamaları

Üretim sürecinde her bir basamağın önemi büyüktür. Çünkü fermantasyon için kullanılacak karbon kaynağı, bu karbon kaynağının etkin bir şekilde kullanılabilmesi için fermente edilebilir forma dönüşmesi ve üretimi gerçekleştirecek olan mikroorganizmanın etkinliği üretim sürecinde dikkat edilmesi gereken noktalardır.

2.4.1 Ham maddeler

Tarihte ABE fermantasyonunun keşfinden 1980 yılına kadar biyobütanolün mikrobiyel üretimi, patates, mısır, buğday, çavdar ve melas gibi ham maddeler ile gerçekleştirilmiştir. Ancak petrokimyasal üretimin çok daha maliyet avantajlı bir süreç olmasından dolayı bir süre, biyokütle tabanlı biyobütanol üretimine ara verilmiştir. Bununla birlikte, her geçen gün azalan petrol rezervleri ve oldukça değişken bir ham petrol fiyatı nedeniyle akademik ve endüstriyel dünya tekrar mikrobiyel biyobütanol üretimine yön vermiştir. Böylece literatürde alternatif daha ucuz fermantasyon substratları, geliştirilmiş kültürasyon teknikleri, genetiği değiştirilmiş suşlar ve daha verimli ürün saflaştırma yöntemleri üzerine araştırmalar yerini almaya başlamıştır (Ranjan ve Moholkar 2012). Bu anlamda, biyobütanol üretimini oldukça ucuz ve verimli hale getirmek için yeni ham madde arayışları üzerine yapılan çalışmalar yapılmakta ve bu çalışmalarda dört farklı biyobütanol üretim nesili değerlendirilmektedir.

2.4.1.1 Birinci nesil biyobütanol üretimi

Birinci nesil ham maddeler yüksek nişasta ve sukroz içeriğine sahip gıda olarak tüketilen mısır, buğday, şeker kamışı gibi biyokütlelerdir. Biyoyakıt üretimi için bu biyokütlelerin karbon kaynağını içeren tohum, kök ve gövde gibi kısımları kullanılmaktadır. Bu ham maddeler nişasta bitkileri ve şeker (sukroz) bitkileri olmak üzere 2'ye ayrılabilir. Mısır, patates, manyok, buğday gibi bitkiler yüksek nişasta içeriğine sahiptir. Bu bitkiler özellikle biyobütanol tarhinin ilk yıllarında fermentasyonda sıklıkla kullanılmaktaydı. Bununla birlikte mısır biyoyakıt üretiminde tarih boyunca sıklıkla kullanılmasına karşın, buğday pirinç gibi gıda olarak tüketilen bitkilerin yakıt üretiminde kullanımı kısıtlı kalmıştır. Şeker kamışı, şeker pancarı, tatlı sorgum gibi ürünler ise yüksek sukroz içeriklerinden dolayı şeker bitkileri olarak kabul edilmektedir. Yine bu bitkilerde biyobütanol üretim için oldukça sık kullanılmaktadır. Birinci nesil biyokütle kullanılarak üretilen biyobütanol yüksek verimli olmasına ve basit ön işlem metodları kullanılmasına karşın, bu ham maddelerin yenilebilir olmaları gıda kıtlığına ve rekabetine sebep olmaktadır. Rekabet ise, bu mahsullerin fiyatlarında önemli artışlara neden olmaktadır. Ayrıca üretimleri için çok büyük alanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle biyoyakıtlara olan talebin artması, bu ham maddeleri üretim şeması açısından sürdürülemez hale getirmektedir.

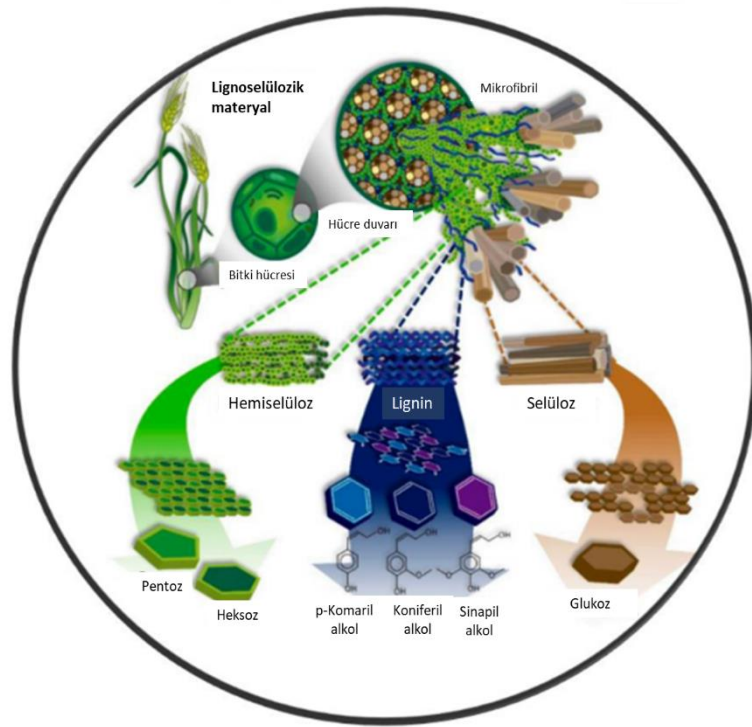
2.4.1.2 İkinci nesil biyobütanol üretimi

İkinci nesil ham maddeler yenilebilir olmayan, lignoselülozik biyokütleleri ve farklı alanlardan kaynaklanan atıkları (zirai, endüstriyel, belediye vb.) içermektedir. Pirinç samanı, talaş, meyve atıkları, gıda endüstrisinden açığa çıkan atıklar, evsel atıklar bu grup içerisinde yer almaktadır. İkinci nesil ham maddelerin büyük çoğunluğunu lignoselülozik karakterli biyokütleler oluşturmaktadır. Bu ham maddeler bol miktarda bulunan ve sıvı ve gaz biyoyakıtların sürdürülebilir üretimini destekleme kabiliyetine sahip ekonomik kaynaklardır (Nanda vd. 2015). Lignoselülozik ham maddeler lignin, hemiselüloz ve selüloz olmak üzere farklı bileşenlerden oluşmaktadır. Bu yapı onu karmaşık ve dirençli hale getirmektedir.

Selüloz, β -1,4 bağı ile birbirine bağlanan glukoz moleküllerinin meydana getirdiği alt birimlerden oluşan polimerdir (Şekil 2.12). Bu yapı, oluşan şeker omurgasından ayrılan -OH gruplarının diğer selüloz yapıları ile hidrojen bağları oluşturmasını kolaylaştırmakta ve böylelikle etkili bir şekilde yapıştırma ve gerilme mukavemeti oluşturmaktadır (Aldred 2008). Böylelikle özellikle bitki hücre duvarları sert bir forma kavuşmaktadır. Ayrıca, Selüloz polimerleri hemiselüloz ve ligninle meydana gelen matriks ile sık bir şekilde tutulmaktadır. Yine bir karbonhidrat monomerlerinden oluşan hemiselüloz yapısı ise, selülozdan farklı olarak arabinoz, mannoz, galaktoz, glukoz ve ksiloz gibi şekerlerden oluşmaktadır (Benaïmeche vd. 2020) (Şekil 2.12). Hemiselülozlarda glukoz birimlerinin polimerizasyon derecesi, selülozdan çok daha düşük olan 100-200 birim aralığındadır. Genel olarak, amorf yapıda, yumuşak ve seyreltik asit, baz veya hemiselülaz enzimleri tarafından hidrolize edilebilir (Kumar ve Dixit 2021, Barton ve Meth-Cohn 1999). Lignoselülozik biyokütleyi oluşturan bir diğer ana yapı olan lignin, selülozdan sonra dünyada en yaygın bulunan biyopolimerdir (Ko vd. 2016). Lignin, polifenolik bir malzemedir ve bitki hücre duvarındaki ana bileşenlerden biridir. Biosentezi, üç fenilpropanoid monomerin, (p-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkol) polimerizasyonu yoluyla gerçekleşir (Azadi vd. 2013) (Şekil 2.12). Ligninin yapısı, monolignoller üç boyutlu ağda birkaç bağlantı yoluyla bağlandığından son derece karmaşıktır ve hidroksisinnamik asitler ve flavonoidler gibi ek lignin bileşenleri yapıyı daha da karmaşık hale getirmektedir (Katahira vd. 2018). Lignin yapısının arasındaki bağlantılar incelendiğinde temel olarak β -O-4, β - β , β -5 ve 5-5' birimleri, dibenzodioksosin, spirodienon ve benzodioksan yapıları bulunmaktadır (Pu vd. 2008). Ayrıca nadir olarak α -O-4 ve β -1, 4-O-5 difenil gibi diğer bağlantılar vardır. Her bağlantının göreceli bolluğu, biyokütlenin türüne, lignin tipine ve izolasyon yöntemine bağlıdır.

Selüloz ve hemiselüloz yapılarını saran lignin, oldukça dayanıklıdır ve yer aldığı yapıyı fiziksel ve biyolojik saldırılara karşı korumaktadır. Bu inatçı yapının parçalanması için çok daha karmaşık ve sofistike işlemlerin uygulanması gerekmektedir. Üretim sürecinin maliyetinin %40'ından fazlasını ön işlem süreçleri oluşturmaktadır (Salehi Jouzani ve Taherzadeh 2015). Bu durum lignoselülozik ham maddelerin biyoyakıt üretiminde kullanımını kısıtlayan en önemli problemdir. Tüm bunların yanında lignoselülozik ham

maddelerin gıda olarak tüketilmemeleri, birinci nesilde olduğu gibi gıda rekabetini ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca lignoselülozik biyokütlelerin ve atık oluşturabilecek stokların kullanımı çok yönlüdür ve bu nedenle oldukça yüksek miktarlarda üretilmektedir. Böylelikle yakıt üretiminde stok sınırlamasının önüne geçilmektedir. Bununla birlikte, çeşitli faaliyetler sonucu açığa çıkan atıkların, biyoyakıt üretiminde etkili bir şekilde kullanımı, çevre açısından problem oluşturabilecek bu kalıntıların ortadan kaldırılmasına yardımcı olacaktır. İkinci nesil biyokütlelerden lignoselülozik ham maddeler besin içeriği yüksek (karbonhidrat, protein, lipid, mineral, vitamin vb.) yapılardan oluşmaktadır.



Şekil 2.12 Lignoselülozik biyokütle yapısı (Khan vd. 2022)

2.4.1.3 Üçüncü nesil biyobütanol üretimi

Fotosentetik bakteriler ve mikroalgler, biyoyakıt üretiminde yüksek lipid, karbonhidrat veya protein içeriklerinden dolayı eşsiz bir ham madde kaynağı olarak kabul edilmektedir. Ayrıca birinci ve ikinci nesil ham madde kaynaklarını oluşturan karasal bitkilerin aksine, daha yüksek fotosentez aktivitesi ve hızlı büyüme gibi nedenlerden

dolayı alternatif biyoyakıt ham maddesi olarak son dönemlerde önemli bir ilgi görmektedir. Özellikle ikinci nesil ham maddelerin en büyük dezavantajını oluşturan lignin içeriği ve bu yapının parçalanması sonucu açığa çıkan inhibitör maddeler, algal biyokütle yapısında ya hiç bulunmamakta ya da oldukça düşük miktardadır (Huzir vd. 2018). Karasal bitkiler gibi, büyümeleri için büyük kültivasyon arazilerine ve tarım ürünlerine ihtiyaç duyulmadan, reaktörler aracılığıyla yüksek oranda üretilmektedir.

Algler dünyanın en eski yaşam formları olarak kabul edilen ve böylelikle çok çeşitli ekosistemlerde yaşamaya adapte olabilme yetenekleri olan organizmalardır. Çeşitli çevresel (atık sular, acı, tuzlu, kıyı suları) (Gouveia 2011) ve mevsimsel değişikliklere uyum sağlayabilmektedir. Mikroalgler doğal koşullarda, havadaki CO₂ kullanarak, yüksek oranda CO₂ seviyelerini (150.000 ppmv'ye kadar) tolere ederek kullanabilmektedir (Brown 1996). Bu durum sera gazı emisyonunun temel kaynağı olan CO₂'in emisyonunu etkili bir şekilde azaltmaktadır. Ayrıca yüksek CO₂ fikse etme yetenekleri, onları karasal bitkilerden daha verimli fotosentetik organizmalar yapmaktadır (Nigam ve Singh 2011). Mikroalgler fotosentetik olarak fotoototrofik gelişim göstermelerinin yanında heterotrofik, fotoheterotrofik ve miksotrofik olarakta kültive edilebilmektedir (Patel vd. 2020).

Fotoototrofik gelişim, büyüme metabolizması için enerji olarak ışığın ve kimyasal enerji oluşturmak için karbon kaynağı olarak CO₂ gibi inorganik maddelerin kullanıldığı kültivasyon koşuludur. Bu koşulda mikroalglerin biyoyakıt üretimi için lipid içeriklerini artırmak amacıyla nitrojen ve besin sınırlaması yoluyla araştırmaların yapıldığı çalışmalar mevcuttur. Diğer gelişim koşullarına göre, fotoototrofik gelişim koşulunda, kontaminasyon riski daha düşük olduğu için açık havuzlarda üretim sistemlerinde çoğunlukla bu gelişim koşulu tercih edilmektedir. Ancak biyokütle üretkenlikleri düşük ve üretim süreleri uzundur (Abreu vd. 2012)..

Heterotrofik gelişimde, enerji ve karbon kaynağı olarak organik bileşikler büyüme metabolizmasında kullanılmaktadır. Buna göre bu koşulda herhangi bir ışık kaynağı mevcut değildir. Bazı mikroalg türleri hem fotoototorofik hem de heterotorofik

koşullarda gelişebilmektedir. Bu durum özellikle, mikroalgal biyokütlenin büyük ölçekli üretimi sırasında kullanılan fotobiyorektörlerde ışığın yetersiz kalması durumlarında, tercih edilebilir bir üretim şeklidir. Ayrıca bu gelişim şekli ile bazı mikroalglerde daha yüksek biyokütle ve lipid birikiminin elde edildiği gösterilmiştir (Xu vd. 2006). Ancak hem ışık hemde karbon kaynağı olarak kullanılan organik maddenin açık üretim sistemlerinde kontaminasyona sebep olması heterotrofik koşulun en büyük problemidir.

Miksotrofik gelişim için mikroalgler enerji kaynağı olarak ışık veya organik bileşikleri, büyüme için karbon kaynağı olarak hem inorganik hem de organik bileşikleri kullanmaktadır. Bu gelişim şeklinde fotosentetik ve solunum metabolizması aktiftir. Işık kaynağına ihtiyaç duymadan ortamdaki karbon kaynaklarını kullanarak enerji ihtiyacını karşılamaktadır. Bu durum, mikroalgi fotosentetik kapasiteye daha az bağımlı hale getirmektedir (Pang vd. 2019). Öte yandan, miksotrofik kültürlerde heterotrofik büyümeden farklı olarak fotoototrofik kültürlerde olduğu gibi ışık kaynaklı metabolitlerin üretilmesi mümkündür (Castillo vd. 2021). Miksotrofik koşulun avantajları, hem fotosentez hem de büyüme substratlarından bağımsız olmasıdır. Miksotrofik gelişim, canlı bir sistemin homeostatik yapısının ve işlevinin, ekolojik durumu dengeleyen biyotanın kimyasal, fiziksel ve organik aktivitesi ile desteklendiği ekolojik su kütlelerinde sıklıkla görülmektedir (Mohan vd. 2015). Bununla birlikte miksotrofik gelişim koşulu, tüm türlerde görülmemekle birlikte, *D. salina*, *Chlorella sp.*, *C. protothecoides*, *C. vulgaris*, *Nannochloropsis salina*, *N. oleoabundans*, *N. gaditana*, *Haematococcus sp.*, *Botryococcus braunii*, *Asterarcys sp.* gibi türlerde biyokütle üretimi miksotrofik koşulda iyileştirilmektedir (Castillo vd. 2021).

Alglerde, metabolik yollarlarda gerçekleşen taşıma işlemleri sırasında yüksek oranda enerji tüketilmektedir. Buna göre, fotoototrofik ve heterotrofik kültürlerde ışık veya bir karbon kaynağı olmak üzere tek bir enerji kaynağı vardır. Ancak, miksotrofik kültürde ATP üretimi için hem ışık hem de karbon kaynağı kullanılmaktadır. Burada ışık, gelişmenin erken evresinde ana kaynağı oluşturmaktadır (Mohan vd. 2015).

Bu gelişim şeklinde yüksek oranda biyokütle ve çeşitli bileşikler elde edilebilmesine rağmen, üretim esnasında kontaminasyon riskini en aza indirmek için kapalı biyoreaktörlerin kullanılması veya kontaminasyonu engelleyici önlemlerin alınması gerekmektedir. Bu durum maliyet açısından dezavantaj oluşturmaktadır. Ancak, *D. salina* gibi halofilik özellikteki mikroalglerin üretimleri sırasında yüksek tuz oranına sahip ortamların kullanılmasının kontaminasyon riskini azaltabileceği ve ek maliyetleri ortadan kaldıracabileceği düşünülmektedir.

Fotoheterotrofik gelişim, foto-asimilasyon, foto-organotrofi veya foto-metabolizma olarak da bilinmektedir (Mata vd. 2010) ve bu koşulda mikroalgler bir ışık varlığında karbon kaynağı olarak organik bileşikleri kullanmaktadır. Fotoheterotrofik ve mikсотrofik yetiştirme arasındaki en büyük fark, fotoheterotrofik büyüme sırasında enerji amacıyla ışığın mevcut olması gerekirken, mikсотrofik yetiştirmede bu amaca hizmet etmek için organik bileşikler kullanılabilir. Bu nedenle, fotoheterotrofik yetiştirme aynı anda hem şekere hem de bir ışık kaynağına ihtiyaç duyar.

Üçüncü nesil biyobütanol üretiminde düşük üretkenlik, üretim sürecindeki maliyetler ve zorluklar (enerji geri kazanımı, hasat, karbon kaynağı, altyapı ve karıştırma) hakkında henüz yeterli bilgiye sahip olunmaması ve araştırılmaya gerek duyulması bu ham maddelerin dezavantajlarını oluşturmaktadır (Huzir vd. 2018, Dutta vd. 2014).

2.4.1.4 Dördüncü nesil biyobütanol üretimi

Dördüncü nesil biyoyakıt üretimi, biyoyakıt üretiminde kullanılacak olan organizmaların (mikroorganizma, ham madde vb.) istenen özelliklerini artırmak için genetik mühendisliğin kullanımını kapsamaktadır. Fazla miktarda şeker çeşidi içermek, daha fazla lipid üretme, fotosentez oranını artırma, inhibe edici maddelere toleransı artırma, metabolik akışı biyoyakıt üretimine yönlendirilme gibi çeşitli özelliklerin geliştirilmesinde bu üretim şekli kullanılmaktadır (Cavelius vd. 2023).

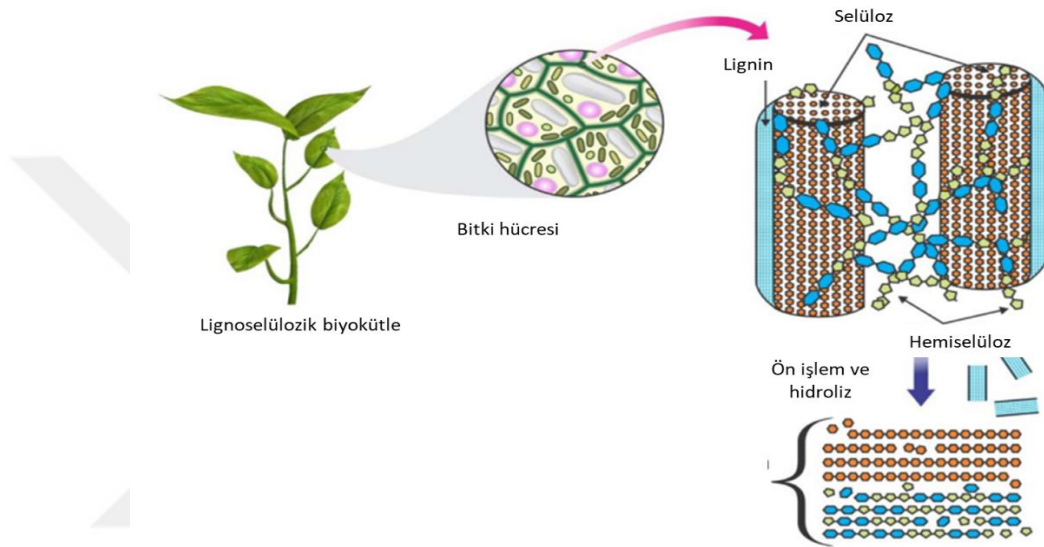
Biyobütanol üretiminde *Clostridium* türleri doğal üreticiler olarak literatürde yer almaktadır. Ancak bu türlerin genellikle daha yavaş büyüme oranlarına, daha düşük üretim titrelerine ve verime sahip olması, bu türlerin genetik mühendisliği ile yeniden yapılandırılmasını teşvik etmektedir. Ancak, bu türler için yeterli genetik mühendisliği araçlarının olmaması, yolların bilinmeyen endojen düzenlemesi, etkisiz genetik elementler, çeşitli karbon kaynaklarının kullanılamaması, metabolik aktivitelerin evrimsel kaybı, inhibitörlerin varlığı, redoks potansiyeli, bütanolün neden olduğu hücrel toksisiteye karşı toleranssızlık bu yerli üreticilerin mühendisliğinin yapılmasını zorlaştırmaktadır (Lee vd. 2008). Bununla birlikte metabolik yol mühendisliği ile dördüncü nesil biyoyakıt üretimi için genetik olarak izlenebilir model organizmalarda (*E. coli*, *S. cerevisiae* vb.) biyoyakıt sentez yollarının yeniden yapılandırılması sağlanmıştır (Malik vd. 2021). Böylelikle, doğal üreticilerde karşılaşılan problemlerin en aza indirilerek biyobütanol üretiminde belirgin derecede iyileştirilme sağlanabilmektedir.

Dördüncü nesil biyobütanol üretimi yüksek verimli ve etkili bir yöntem olmasının yanında, biyoyakıt üretimi için henüz yeni olması negatif özelliğini oluşturmaktadır (Karthick ve Nanthagopal 2021).

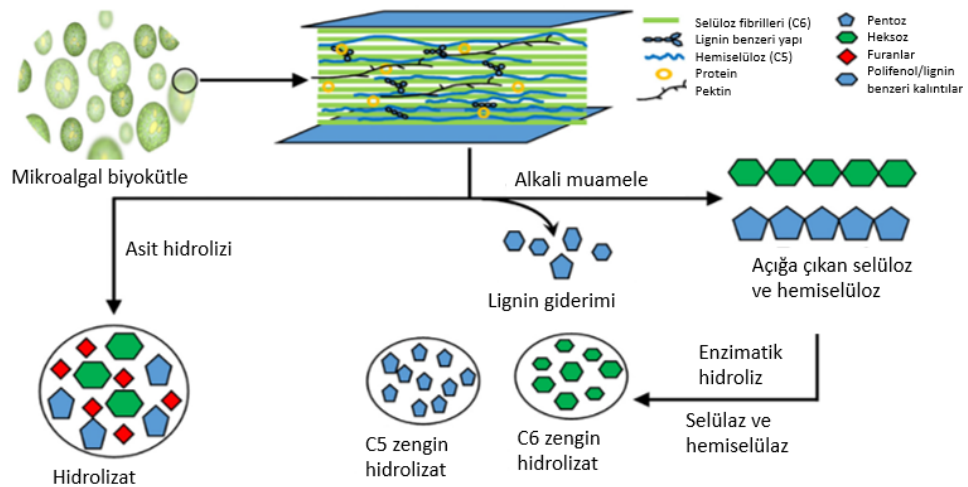
2.4.2 Ham maddelerde uygulanan ön işlem yöntemleri

Biyoyakıt üretiminde mikroorganizmalar fermantasyon sürecinde ham maddeleri etkili bir şekilde kullanılabilmeleri için, yapılarındaki monomerik şekerlerin açığa çıkarılması gerekmektedir. Ön işlem maliyeti kullanılan yöntemle göre değişmekle birlikte, biyoyakıt üretim sürecinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Ham maddenin maliyeti, biyoyakıtların satış fiyatlarının %40-%70'ni oluşturmaktadır (Srirangan vd. 2012). Bu nedenle kullanılacak tekniğin uygun maliyetli olması ve etkili sonuçlar elde edilmesi beklenmektedir. Ön işlemler fiziksel, kimyasal, fiziko-kimyasal ve biyolojik yöntemler olarak 4'e ayrılabilir. Şekil 2.13 ve 2.14'de lignoselülozik ve üçüncü nesil ham maddelerin ön işlem örneğini gösterilmektedir. Lignoselülozik ham maddelerde, selüloz ve hemiselüloz yapısının saran dirençli lignin yapısının parçalanması fermantasyon sürecinde oldukça önem arz etmektedir. Bu nedenle seçilen yöntemin selüloz ve

hemiselüloz yapısını yüksek oranda ortaya çıkartan özellikte olması gerekir. Bununla birlikte, algal hücreler çoğunlukla sert hücre duvarı yapısına sahip olmayan ve çoğu lignin içermeyen organizmalar oldukları için şeker formlarının açığa çıkarılması daha kolay bir süreci oluşturmaktadır. Bunlar ışığında, seçilen ön işlem yöntemi her zaman kullanılan ham maddenin yapısal özelliklerine göre değişebilir ve hatta kombine ön işlem yöntemleri (kimyasal+biyolojik, fiziksel+kimyasal gibi) kullanılabilir.



Şekil 2.13 Lignoselülozik ham maddenin ön işlemi (Akhtar vd. 2016)



Şekil 2.14 Mikroalgal biyokütlenin ön işlemi (Bhatia vd. 2022)

2.4.2.1 Fiziksel ön işlemler

Bu yöntem, genel olarak ham maddenin boyutunun ve yüzeyinin küçültülmesi amacıyla çeşitli mekanik ve el aletleriyle kesme, yontma, öğütme işlemlerini kapsamaktadır. Öğütme, dondurma, piroliz, sıkma (ekstrüzyon) ve radyasyon fiziksel ön işlem yöntemlerinden bazılarıdır (Cheah vd. 2020). Bu yöntemlerin seçimi ham maddenin boyutuna, nem içeriğine, fiziksel özelliklerine ve enerji gereksinimine göre yapılmaktadır. Bununla birlikte, fiziksel ön işlemler yüksek spesifik enerji talebine sahip olduklarından çok avantajlı değildir (Karthick ve Nanthagopal 2021).

Boyut küçültme (öğütme), çeşitli mekanik yöntemleri içeren (bilyeli öğütme, merdaneli öğütme ve ezme gibi), ham maddede bulunan selüloz yapısının kırılmasını sağlayan bir yöntemdir (Yuan vd. 2014). Hem lignoselülozik hem de algal biyokütlelerin küçültülmesinde bu yöntem tercih edilebilmektedir (Sankaran vd. 2020). Bu yöntemle reaksiyon verimlerinin belirgin derecede arttığı literatürde belirtmektedir. Bunun yanında, öğütme işleminde yüksek enerji tüketimi önemli dezavantajlarından biridir.

Piroliz, lignoselülozik biyokütlenin yüksek sıcaklıklarda ($\geq 300^{\circ}\text{C}$) gaz halindeki bileşenlere ve odun kömürüne dönüştürülmesi ve daha sonra seyreltik asit muamelesi ile odun kömürü haline getirildiği bir işlemdir. İşlem sonrası süzülen su, yüksek oranda glukoz içermektedir (Shafizadeh ve Bradbury 1979).

Sıkma ön işleminde lignoselülozik biyokütlenin lifleri 300°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda kesme ve karıştırma kombinasyonu ile termo-fiziksel olarak çıkarılmaktadır. Sıkma makinesinde biyokütle sıcaklık ve basınç artışına neden olarak vida ve kovan arasında büyük bir kesme kuvveti oluşturmaktadır (Maurya vd. 2015). Böylelikle, çeşitli biyokütle türlerinden şeker geri kazanımını önemli ölçüde artırmaktadır (Sankaran vd. 2020). Ancak, yüksek miktarda enerji ve işletme maliyeti gerektirdiği için, ticari olarak ölçeklendirilmesi zordur.

Radyasyon ön işleminde lignoselülozik veya algal ham madde içerisindeki kimyasal bağlar yüksek enerjili radyasyonlar ile kırılmaktadır. Bu radyasyonlar, ligninin parçalanmasında, selülozun kristal yapısının bozulmasında ve hemiselülozların hidrolizinde önemli değişimlere sebep olmaktadır (Chaturvedi ve Verma 2013). Genellikle mikrodalga, elektron ışını, gama ışınları ve ultra sonikasyon olmak üzere dört farklı radyasyon yöntemi bulunmaktadır. Burada mikrodalga radyasyonu, ısınma sonucu ham maddenin selülozik bileşenlerinde basınç oluşturmaktadır (Nandhini vd. 2023). Bu yöntem, yüksek verim, düşük maruz kalma süresi, çevre dostu, az inhibitör üretimi gibi avantajlara sahiptir. Ultrasonikasyon ise, lignoselüloz yapısına saldıran ve lignin kimyasal bağlarını kıran oksitleyici radikaller üretmektedir. Daha sonrasında, yüksek sıcaklık ve basınca sahip baloncuklar bu dirençli yapıya zarar vererek önemli bir kırılma sağlamaktadır (Shirkavand vd. 2016). Bu nedenle yüksek lignin içeren yapılarda bu yöntem kullanımı etkilidir.

Dondurma ön işleminde ise, hücre içine difüze olmuş suyun düşük sıcaklıklarda sıvı formdan katı forma geçerken hacminin artması ve böylelikle hücre duvarlarını parçalaması temeline dayanmaktadır (Rooni vd. 2017). Oldukça ucuz, çevre dostu ve inhibitör madde oluşumuna sebep olmayan bir yöntem olması onun en büyük avantajlarındadır.

2.4.2.2 Fiziko-kimyasal ön işlemler

Fiziksel ve kimyasal yöntemlerin kombinasyonu, lignoselülozik ve algal biyokütlenin parçalanması için ön işlem olarak kullanılmaktadır. Örneğin, öğütme ve asit ön işleminin birlikte kullanımı, fizikokimyasal ön işlem yöntemini oluşturmaktadır. Literatürde, buhar patlaması, amonyak lifi patlaması, CO₂ patlaması, gibi ön işlemler fizikokimyasal yöntemler arasında kullanılmaktadır.

Buhar patlaması ön işlemi, ham madde olarak kullanılacak olan biyokütlerin 150 °C ile 260 °C gibi yüksek sıcaklık aralıklarında, yüksek basınçlı doymuş buhara maruz bırakılması olarak tanımlanabilir. Biyokütle bu yüksek sıcaklık ve basınca bir dakika

boyunca maruz bırakılır ve aniden basıncın düşürülmesiyle dekomprasyona uğratılır. Bu işlem sonucunda, lignin ve hemiselüloz parçalanır ve selülozun hidroliz olması olasılığı artar. Ayrıca, işlem sırasında açığa çıkan asetik asit ve diğer asitler hemiselülozun daha fazla parçalanmasını sağlamaktadır (Singh ve Kalia 2017). Buhar patlaması ön işlemi, düşük maliyetli, yüksek verimli ve çoğunlukla kimyasal kullanımı olmadığı için oldukça avantajlıdır (Pielhop vd. 2016).

Amonyak lifi patlaması (AFEX), buhar patlamasına benzer olarak, sıvı amonyak varlığında biyokütlenin yüksek sıcaklık (90-100 °C) ve basınçta, 5-30 dakika boyunca maruz bırakılmasını içermektedir. Daha sonrasında basınç aniden düşürülerek biyokütlenin depolimerizasyonuna yol açmaktadır. Burada amonyaklı ön işlem biyokütlenin, karbonhidrat-lignin ester bağlarını kırarak nano boyutta yapılar oluşturur ve selüloz ve hemiselüloz yapısı bozulmaya başlar. Bu ön işlem yöntemi algal biyokütle için net olarak belirlenmemiştir ancak serbest amonyağın kullanıldığı çalışmalara literatürde rastlanmaktadır (Bhatia vd. 2022). AFEX ön işlemi, inhibitör üretilmemesi, yüksek şeker geri kazanımı, işlem sonrası suyla yıkama gibi ek adımlara ihtiyaç duyulmaması açısından avantajlıdır (Kim 2018).

Bir diğer fizikokimyasal yöntem olan CO₂ patlamasında, AFEX ön işlem yönteminin prensibine benzer olarak CO₂ molekülleri biyokütlenin küçük boyutlu molekülleri üzerinde yayılarak istenilen yapıların açığa çıkması sağlanmaktadır. Yüksek basınç ile boşaltılan CO₂, biyokütle yapısının parçalanmasına neden olmaktadır (Huisheng vd. 2013). Bu yöntem ile yüksek hemiselüloz giderimi ve selüloz dekrizalizasyonu, daha az inhibitör bileşiklerin üretimi sağlanmaktadır (Menon ve Rao 2012).

2.4.2.3 Kimyasal ön işlemler

Lignoselülozik ve algal biyokütle yapısının parçalanmasında kimyasal maddeler yaygın olarak kullanılabilir. Bu ön işlem yöntemiyle yüksek oranda lignin ve hemiselüloz yapısında bozulma sağlanabilirken, selüloz yapısının kristalliliğini de daha az bir dereceye kadar azaltarak selülozun biyobozunurluğunu iyileştirmektedir.

Kimyasal ön işlemler arasında oldukça tercih edilen asidik yöntemde, kullanılacak biyokütle çeşitli asit karakterli kimyasal maddeler (H_2SO_4 , HCl, fosforik asit, nitrik asit gibi) ile muamele edilmektedir. Burada asit, hemiselüloz ve selüloz arasındaki glukozidik bağların kırılmasına sebep olan hidrojen iyonları sağlamaktadır (Lloyd ve Wyman 2005). Bu yöntemde özellikle, hemiselüloz yapısı etkili bir şekilde degrede olarak selüloza ulaşım kolaylaşmaktadır (Mosier vd. 2005). Asit ön işlemi, sert lignoselüloz yapısını kırmak için seyreltik ve konsantre olarak uygulanabilmektedir. Asit maddelerin seyreltik olarak kullanımı yüksek sıcaklık varlığında gerçekleştirilirken, konsantre asit kullanımı düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir (Sen vd. 2016). Konsantre asit ön işlemi ile yüksek şeker geri kazanımı sağlanmasına rağmen, yüksek toksisite, yüksek korozyon, asitin geri elde edilmesi gibi dezavantajlara sahiptir. Seyreltik asit ön işlemi ise, endüstriyel ölçekli kullanımda şeker dönüşümlerini ekonomik ve çevre dostu bir şekilde sağladıkları için daha uygundur. Asit ön işlemi lignin ve hemiselüloz yapısının yüksek oranda parçalanmasını sağlarken, bunun yanında mikrobiyal inhibitörler olarak işlev gören furfural, 5-hidroksimetilfurfural ve fenolik asitler şeker ve lignin türevlerini üretmektedir. Bu asit hidrolizinin en büyük dezavantajıdır (Baruah vd. 2018). Bu maddelerin ortamdan uzaklaştırılması yani detoksifikasyon işlemi, mikrobiyel gelişimi ve biyoyakıt üretimini desteklemek için son yıllarda sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Asit ön işlemi sonrası su ile yıkama, membran ayırma, aktif kömür, iyon değiştirici reçineler, nötralizasyon ve sıvı-sıvı ekstraksiyonu olarak uygulanan detoksifikasyon teknikleridir (Ebrahimian vd. 2022).

Alkali ön işlem yöntemi, biyoyakıt üretiminde kullanılan ham maddeler için sıklıkla tercih edilen kimyasal yöntemler arasındadır. Özellikle yüksek lignin içeriğine sahip ham maddelerin parçalanması için bu yöntem kullanılmaktadır (Karthick ve Nanthagopal 2021). Bazı kimyasalların kullanımı, hemiselüloz ve lignin arasındaki ester bağlarının kırılmasını sağlar. Ayrıca, selüloz yapısının şişmesi ile lignoselüloz yapısı bozulur, kristallik ve polimerizasyon derecesinde azalma görülür, böylece iç yüzey alanı artar (Behera vd. 2014). Bazı ön işlem sırasında sodyum hidroksit ($NaOH$) sıklıkla kullanılan bir ajandır ve biyokütlenin lignin ve kristal yapısını bozarak, selülozun yüzey alanını artırmakta ve enzimlerin erişilebilirliğini kolaylaştırmaktadır (Park ve Kim 2012). Alkali

ön işlemin önemli avantajlarının yanında, yüksek konsantrasyonlarının korozyona sebep olması, alkali ajanın geri kazanımının olmaması ve biyomoleküllerin yüksek pH değerlerinde dekarbonsilasyona uğraması gibi sınırlamalar bu yöntemin kullanımını sınırlamaktadır (Bhatia vd. 2020).

Bir diğer kimyasal ön işlem tekniği, organik asit katalizörü varlığında etanol, metanol, etilen glikol, aseton ve fenol gibi organik çözücülerin kullanılarak lignin ve hemiselüloz arasındaki bağların parçalanmasını sağlayan organik çözücü ön işlemidir (Karthick ve Nanthagopal 2021). Bu ön işlem sayesinde kükürt içermeyen lignin fraksiyonu, yüksek saflıkta selüloz ve hemiselüloz fraksiyonu üretilmektedir (Mupondwa vd. 2017). Bu ön işlem yönteminde en çok tercih edilen çözücü, yüksek delignifikasyon ve selüloz dönüşümü, düşük toksisite, yüksek kaynama noktası gibi özelliklerinden dolayı etanoldür (Salapa vd. 2017). Organasolvent ön işlemi sonrası solventin ve izole edilen ligninin geri kazanımı en önemli avantajlarından. Ancak, kullanılan solventlerin pahalı olması, yüksek yanıcılık ve uçuculuk özellikleri bu yöntemin dezavantajlarını oluşturmaktadır (Borand ve Karaosmanoğlu 2018).

Ozonolizis, lignoselülozik ve algal biyokütlenin parçalanması için kullanılan bir diğer kimyasal ön işlem yöntemlerinden biridir. Ön işlem aşamasında ozon, lignin içeren biyokütle üzerinde oksitleyici bir madde olarak hareket ederek lignini parçalar. Ancak yüksek nem içeriğine sahip biyokütlelerde, ozonun suda çözünme özelliğinden dolayı lignin oksidasyonu azalmaktadır (Travaini vd. 2015). Ozonolizis yönteminde lignin etkin bir şekilde bozulurken, hemiselüloz kısmen bozulmaktadır. Ayrıca ön işlem sonrasında, inhibitör maddelerin açığa çıkmaması en önemli avantajdır. Bu yöntem şeker geri kazanımı için etkili bir yöntem olsa da, işlem sırasında yüksek miktarda gaz gerektiğinden oldukça maliyetlidir (Kumari ve Singh 2018).

Son dönemlerde etkili bir ön işlem için iyonik sıvılar veya yeşil çözücüler olarak adlandırılan yeni bir çözücü sınıfı kullanılarak ham maddelerin maruz bırakılması dikkat çekmektedir. Kullanılan iyonik sıvılar, morfolinyum⁺, piridinyum⁺ veya amonyum⁺ bazlı katyonlardan ve selülozun hidrosil grubu ile hidrojen bağı oluşturabilen anyonlardan

oluşmaktadır (Hou vd. 2017). Ön işlem sırasında iyonik sıvılar, biyokütlenin doğal yapısını hidrojen bağı için rekabet ederek bozar ve normal yapıyı manipüle eder (Aftab vd. 2019). Ayrıca bu sıvılar, 100 °C'nin altında veya oda sıcaklığında daha yüksek termal kararlılığa, daha yüksek polariteye ve çok düşük buhar basıncına sahiptir ve toksik madde salmadıkları için “yeşil çözücüler” olarak da adlandırılmaktadır (Zavrel vd. 2009). Ayrıca inhibitör oluşumunun azaltılmasına da yardımcı olmaktadır (Fu ve Mazza 2011). Bu olumlu etkilerinin yanında, ön işlem sonrası metabolitlerin uzaklaştırılması için ek yöntemlere ihtiyaç duyulması, maliyetli ve mikroorganizmalar için toksik olması olumsuz yönlerini oluşturmaktadır (Baruah vd. 2018, Nandhini vd. 2023).

2.4.2.4 Biyolojik ön işlemler

Biyoyakıt üretiminde kullanılan ham maddelerin ön işlemi için yararlanılan geleneksel yöntemler çeşitli cihazların ihtiyacı, kimyasalların maliyeti ve inhibitör oluşturma gibi sınırlamalara sahiptir. Bu nedenle, süreçte daha az enerjiye ihtiyaç duyulması, kimyasal kullanımının olmaması gibi özellikleri ile biyolojik yöntemler bir çok avantaja sahiptir. Biyolojik ön işlemlerde çoğunlukla bakteri, maya ve enzim gibi organizma ve materyaller kullanılmaktadır.

Bakteriyel ön işlem yönteminde, ligninin parçalanması ve selülozu hidrolize etmek için çeşitli bakteri türleri kullanılmaktadır. Kullanılan bakterilerin salgıladığı enzimler ile delignifikasyon, hemiselüloz ve selüloz kristallerinin sindirimi gerçekleşmektedir. Örneğin, *Bacillus substilis* ve *Azospirillum lipoferum* gibi bakterilerin salgıladıkları lakkaz enzimi ile ligninin depolimerizasyonu sağlanmıştır. Benzer olarak, selülozik materyallerin hidrolizinde *Firmicutes*, *Rahnella*, *Buttiauxella* ve *Pseudomonas* gibi bakteri suşları yüksek selülaz aktiviteleri ile kullanılmıştır (Sharma vd. 2019). Son dönemlerde bakteriyel lignin bozunmasına ilişkin çalışmalara da literatürde yer verilmektedir. Ayrıca, algal biyokütlenin hidrolizi için de yine bakteriyel ön işlem yönteminin kullanıldığı ve etkili sonuçların elde edildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır (He vd. 2016, Kim vd. 2006).

Fungal ön işlem yöntemi, bakteriyel ajanlara nazaran lignin depolimerizasyonunda oldukça iyi çalışmıştır. Bir çok mantar türü selüloolitik, hemiselülozik ve ligninolitik enzimler üreten bir yapıya sahiptir (Rouches vd. 2016). Örneğin, *Phanerochaete chrysosporium*, lignoselüloz malzemede lignini depolimerize etme yeteneğine sahip hücre dışı enzimler üretir (Baruah vd. 2018). Yine bir çalışmada farklı fungal türler kullanılarak, *C. vulgaris* biyokütlesinin sakkarifikasyonunda etkinlikleri belirlenmiştir (Monjed vd. 2021).

Bakteri ve mantar türlerinden elde edilen peroksidaz, lakkaz gibi enzimler biyokütledeki dirençli ve sert yapıya sahip lignini ve kristal selüloz formunu parçalamak için sıklıkla kullanılmaktadır. Peroksitler, lignin birimlerini oluşturan fenolik bileşik yapısını bozarken, lakkazlar, fenolik ve fenolik olmayan birimlerin bozunmasını katalize eder. Böylelikle bu enzimlerin doğal üreticileri (*Ceriporia lacerata*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporous cinnabarinus*) tarafından üretilmesi daha uygun maliyetlidir ve ekstrakte edilen enzimler, inhibitörlerin yan üretimi olmaksızın lignin ve selülozu parçalama potansiyeline sahiptir (Baruah vd. 2018).

Bakteri ve mantar türlerinin yanında, böcekler, solucanlar ve gastropodlar gibi çeşitli organizmalar yine biyokütlenin biyolojik ön arıtımı için kullanılabilir (Varelas ve Langton 2017, Devi vd. 2020, Trincone 2018). Bu organizmaların fiziksel işlevleri ve enzimatik bileşenleri selülozun sindirilmesinde önemli etkilere sahiptir. Örneğin, selüloz, karbonhidratlar, kitin, lignin, nişasta gibi bileşenler solucan bağırsağından salgılanan enzim ve mikrobiyal flora aktiviteleri ile kolaylık parçalanabilir. Bu nedenle, biyolojik ön arıtma için bir seçenek olarak solucan çayı (yani solucan gübresi sıvı sızıntı suyu) kullanılmaktadır (Sharma vd. 2019).

Yukarıda belirtilenlerin ışığında, biyolojik ön işlemler az miktarda enerji kullanımı, kimyasal kullanılmaması gibi avantajlara sahipken, sürecin uzun olması ve kullanılan mikroorganizmaların aynı zamanda selüloz ve hemiselülozu tüketmeleri biyolojik ön işlemin dezavantajlarını oluşturmaktadır (Cheah vd. 2020).

2.4.3 Fermantasyon stratejileri

Biyobütanol üretimi için lignoselülozik ve algal biyokütledeki şekerlerin elde edilmesi için yukarıda belirtildiği için çok çeşitli ön işlem yöntemleri uygulanmaktadır. Ancak uygulanan ön işlem yöntemlerinin her biri ham maddenin lignin, hemiselüloz ve selüloz gibi farklı birimlerine farklı oranlarda etki etmektedir. Şöyleki, kullanılan bir yöntem hemiselülozu yüksek oranda parçalayabilirken, selülozun kristal yapısını kısmen çözebilmektedir. Bu anlamda, kullanılan ham maddeden yüksek oranda şeker geri kazanımı olması için ön işlem yöntemlerinin ardından enzim hidrolizi yapılması çok sık gerçekleştirilen bir uygulamadır.

Enzim hidrolizi sonrası şeker geri kazanımını yüksek oranda tutmak ve biyobütanol üretimi için ABE fermantasyonunda kullanımlarını herhangi bir kayıp olmadan sağlamak için SHF (ayrılmış hidroliz ve fermentasyon), SSF (eş zamanlı hidroliz ve fermentasyon), SSCF (eş zamanlı sakkarifikasyon ve ortak fermentasyon) ve CBP (konsolide biyoişlem) gibi farklı fermantasyon stratejileri kullanılmaktadır (Nagarajan vd. 2019).

SHF stratejisi, hidroliz ve fermentasyon işlemlerinin ayrı olarak gerçekleştirildiği ve enzim ve fermantatif mikroorganizma için ayrı ayrı optimum koşullarının sağlanabildiği bir yöntemdir. Böylelikle yüksek enzim aktivitesi ve biyoürün eldesi hedeflenmektedir. Bununla birlikte, iki farklı işlemin sebep olduğu yüksek maliyet, kullanılan enzimlerin son ürünler tarafından inhibisyonu, uzun süren hidrolizden dolayı kontaminasyon riski gibi SHF için bazı önemli dezavantajlar vardır (Rodionova vd. 2022). Özellikle enzimatik hidroliz sırasında kullanılan selülaz, β -glukosidaz gibi enzimler, hidroliz sırasında oluşan sellobiyoz ve glukoz miktarındaki artış ile inhibe olabilmektedir (Tomás-Pejó vd. 2008, Alfani vd. 2000). Bu nedenle enzim aktivitesi istenilen yüksek verimle gerçekleşmemektedir.

SSF yaklaşımında ise, hidroliz ve fermentasyon süreci aynı ortamda gerçekleştirilmektedir. Böylelikle kullanılan malzeme maliyeti ve zamandan tasarruf sağlanmaktadır. Bununla birlikte, ilk SSF patent çalışmasında (1976) vurgulandığı gibi, ham maddenin katı ve sıvı

kısının ayrılmadan tüm bulamacın kullanılması, bu ayırma ile ilişkili şeker kaybını en aza indirmektedir (Ask vd. 2012, Gauss vd. 1976). Ayrıca SHF’de karşılaşılan enzim inhibisyonu problemi, bu süreçte ortaya çıkan şekerlerin mikroorganizma tarafından eş zamanlı fermente edilmesi ile ortadan kaldırılmakta ve tüm sürecin verimliliği artmaktadır. Ayrıca süreç sırasında üretilen biyoalkol olası kontaminasyon riskini de oldukça azaltmaktadır. Belirtilen avantajlarının yanında, bu yöntemin dezavantajı çoğunlukla farklı optimum koşullara (sıcaklık, pH gibi) sahip enzimatik hidroliz ve fermantasyon aşamalarının aynı ortamda gerçekleşmesidir. Bu nedenle, şeker veya biyoürün verimi etkilenebilmektedir.

SSCF, pentoz ve heksoz şekerlerin birlikte fermente edildiği ve SSF stratejisinin modifiye edilmiş bir yöntemidir. Böylelikle lignoselülozik ham maddenin yüksek oranda kullanımı desteklenmektedir. SSF yönteminde heksoz ve pentoz şekerler farklı mikroorganizmalar ile farklı reaktörlerde fermente edilebilirken, SSCF yönteminde beş ve altı karbonlu şekerler tek bir reaktörde ve tek bir mikroorganizma ile kullanılabilir (Taherzadeh ve Karimi 2007).

Bir diğer fermantasyon yöntemi ise, hem enzim üretiminin hem de fermantasyonun aynı ortamda gerçekleştiği CBP’dir. CBP’yi yürütmek için, tek ve gelişmiş bir mikroorganizma sakarifikasyon için enzimlerin üretilmesinde ve sakkarifikasyonun gerçekleşmesinde ve şekerin fermantasyonunda kullanılmaktadır (Sakuragi vd. 2011). Bu nedenle süreç doğrudan mikrobiyal dönüşüm (DMC) olarak bilinmektedir. Bu yöntemin kullanılması için, özellikle biyoetanol üretiminde ya etkili alkol üreten mikroorganizmalar sakkarifikasyon yeteneği kazandırılır ya da sakkarifikasyon yeteneğine sahip mikroorganizmalar etanol üretici olarak modifiye edilmektedir (Lynd vd. 2005).

2.5 Biyobütanol Üretimine İlişkin Literatürde Yer Alan Çalışmalar

Biyobütanol üretiminin tarihsel gelişimine bakıldığında farklı ham maddelerin kullanımına literatürde yer verildiği görülmektedir. Özellikle ilk solventojenik

Clostridium türünün ve ABE fermantasyonunun keşfi ile biyobütanol üretimine ilişkin çalışmalar gıda olarak tüketilen mahsullerin kullanımı ile birinci nesil biyobütanol üretimi olarak gerçekleştirilmiştir. Öyle ki bu ham maddelerin kullanımı ile uzunca bir süre biyobütanolün bir çok alanda değerlendirilmesine katkı sağlamıştır. İlerleyen dönemlerde gıda rekabeti ve üretim alanı yetersizliğinden dolayı, biyobütanol üretimi artık daha bol, ucuz, çevreyle dost, gıda olarak tüketilmeyen atıksal ürünler, fotosentetik organizmalar gibi ham maddeler ile gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Bu anlamda aşağıda biyobütanol üretimi için farklı ham maddelerin kullanımına ilişkin çalışmalara yer verilmiştir.

2.5.1 Birinci nesil biyobütanol üretimi

Mısır, patates, soya fasulyesi, buğday, manyok, çavdar gibi gıda mahsülleri geçmiş dönemlerde biyobütanol üretiminde oldukça sık kullanılmış ve özellikle büyük ölçekli üretimlerinde yüksek şeker oranlarından dolayı tercih edilmiştir. Belirtilen gıda mahsullerinden elde edilen nişasta yüksek bitkilerde başlıca karbonhidrat maddesidir. İçeriğindeki yüksek şeker miktarı fermantasyonu oldukça iyi derecede etkilemektedir. Bu nedenle, farklı gıda nişastalarının kullanımına ilişkin çalışmalar literatürde görülmektedir. Örneğin bir çalışmada farklı nişasta tiplerinin (sago, patates, mısır ve tapyoka) biyobütanol üretimi için *C. acetobutylicum* P262 tarafından direkt fermantasyonu gösterilmiş ve kontrol grubu olarak glukoz kullanılmıştır. 30 g/L sago nişastası ile toplam aseton, bütanol ve etanol üretimi 11.03 g/L olurken, bu değer mısır nişastası ile benzerdir ve patates veya tapyoka nişastasından 2 kat daha yüksektir. Ayrıca jelatinleştirilmiş sago nişastasının farklı konsantrasyonları (10–80 g/L) incelenmiş ve en yüksek toplam ABE miktarı 50 g/L sago nişastası varlığında 18.82 g/L olarak elde edilmiştir (Madiah vd. 2001).

Yine bir başka çalışmada Yen vd. (2011), immobilize ettikleri *C. acetobutylicum* BCRC 10639 ile tatlı patates nişastasının biyobütanol üretiminde kullanımı incelemişlerdir. Çalışmada, fermantasyon ortamı olarak 60 g/L glukoz veya tatlı patates nişastası kullanılmıştır. Çalışma sonucunda maksimum biyobütanol miktarı 10.8 g/L olarak 60. saatte elde edilmiştir.

Bir başka çalışmada, ham madde olarak tarımsal ürün olan patates ve mısır ve atık olarak şeker pancarı pekmezi dokuz farklı *Clostridium* suşu tarafından biyobütanol üretiminde kullanılmıştır. Çalışma sonucunda en yüksek toplam ABE mısır (%71 nişasta içeren 80 g/L mısır) ile 15.23 g/L olarak belirlenirken, patates (%50 nişasta içeren 220 g/L patates) kullanıldığında 7.69 g/L olarak elde edilmiştir (Patáková vd. 2009).

Ezeji vd. (2007) ise yine etkili bir ABE üretimi için potansiyel bir endüstriyel substrat olarak sıvılaştırılmış mısır nişastasını kullanmıştır. 60 g/L substrat varlığında %92 şeker kullanımı ile 18.4 g/L biyobütanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca sakkarifikasyona bırakılmış sıvılaştırılmış mısır nişastası varlığında inhibisyonu engellemek için gaz sıyırma tekniği kullanılarak toksik etkisi bulunan biyobütanol ortamdan uzaklaştırılmış ve kesikli beslemeli reaktörde 81.3 g/L biyobütanol miktarı elde edilmiştir.

Li vd. (2015) manyok ununun doğrudan fermantasyonu ile biyobütanol üretimini gerçekleştirmiştir. Manyok ununun hidroliz kapasitesini ve biyobütanol üretkenliğini artırmak için CaCO_2 ve L-triptofan takviyesinin etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda, CaCO_3 ve L-triptofan varlığında, sadece manyok içeren ortama göre %88 hidrolitik kapasite ile 17.8 g/L biyobütanol elde edilmiştir.

2.5.2 İkinci nesil biyobütanol üretimi

Bu üretim şeklinde gıda olarak tüketilmeyen atık karakterli çoğunlukla lignoselülozik yapılardan oluşan ham maddeler kullanılmaktadır. Bu ham maddeler ucuz ve endüstriyel, tarımsal olarak bol miktarda çıktıkları için biyobütanol üretiminde önemli bir potansiyele sahiptir. Ayrıca yine yapılarındaki 5 ve 6 karbonlu şekerleri barındırmaları fermantasyon için oldukça kullanışlı bir ham madde özelliği kazandırmaktadır. Atık olarak değerlendirilmesi ve bolca açığa çıkması kapsamında literatürde biyobütanol üretimine ilişkin çalışmalarda kullanılmıştır. Bu çalışmalara ait bilgiler aşağıda belirtilmiştir.

Zetty-Arenas vd. (2019) yaptıkları çalışmada şeker kamışını lignoselülozik biyokütle olarak biyobütanol üretimi için kullanmışlardır. Çalışmada öncelikle dört farklı

biyobütanol üretici suştan en etkili olanı seçilmiştir. Daha sonra şeker kamışı etkisini değerlendirmek için, biyokütle 160 °C'de 60 dakika 1:10 katı:sıvı oranı ile hidrotermal ön işleme maruz bırakılmıştır. Ön işlem sonrası elde edilen materyal %0.4 H₂SO₄ ile 130 °C'de ve 200 rpm'de 30 dakika bir reaktörde muamele edilmiştir. 13.12 g/L ksiloz içeren hidrolizat, kisloz miktarı 30 g/L olacak şekilde sentetik ksiloz ile ve P2 ortamı ile desteklenmiştir. Bu hemiselülozik şeker kamışı küspesi hidrolizatı içeren ortamın seçilen *C. sacharoperbutylaceticum* DSM 14923 suşu ile fermentasyonu sonucu 5.85 g/L biyobütanol üretimi gerçekleştirilmiştir.

Yine şeker kamışının saman kısmının lignoselülozik ham madde olarak kullanıldığı çalışmada, optimize edilmiş koşullarda (P2 ortamı kullanılmadan, 5 g/L maya özütü ve 10 g/L CaCO₃) *C. saccharobutylicum* DSM 13864 tarafından 5.22 g/L biyobütanol üretimi gerçekleşmiştir (Magalhães vd. 2018).

Plaza vd. (2021) agroendüstriyel bir atık olarak bira üreticilerinin kullanılmış tahılını kullanmış ve biyobütanol üretiminde etkisini incelemiştir. Atık öncelikle seyreltik asit ön işlemi ile muamele edilmiş ve sonrasında katı ve sıvı kısımları ayrılarak katı kısım enzimatik hidroliz için kullanılmıştır. Çalışmada ayrıca en iyi biyobütanol üretimini elde etmek için optimum enzim ve katı yük konsantrasyonu araştırılmıştır. Çalışma sonucunda %28.1 (w/w) katı yük ve 15.4 FPU/g kuru materyal enzim kullanılarak 47.0 g/L glukoz, 16.8 g/L ksiloz ve 1.2 g/L fenolik bileşik elde edilmiştir. Bu koşullarda *C. beijerinckii* DSM 6422 ile fermentasyon sonucu 31.0 g/kg biyobütanol verimi belirlenmiştir.

Qi vd. (2019) tarımsal bir yan ürün olan buğday samanını biyobütanol üretiminde değerlendirmiştir. Ham madde öncelikle amonyum sülfid ile ön işleme tabi tutulmuştur. Sonrasında enzimatik hidrolize maruz bırakılarak SHF ve SSF fermentasyon stratejileri açısından incelenmiştir. Çalışma sonucunda, SSF ile daha yüksek biyobütanol konsantrasyonu elde edilmiş olup, %9 biyokütle konsantrasyonunun SSF ile incelenmesi sonucu 12.64 g/L biyobütanol üretimi gerçekleştirilmiştir.

Düzenli depo alanlarının veya yakma fırınlarının bir son ürünü olan pamuk biyobütanolün ticari ölçekli üretiminde uygun maliyetli bir ham madde olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu anlamda, Seifollahi ve Amiri 2018 yılında yaptıkları çalışmada atık pamuk fibrillerini kullanarak biyobütanol üretimi gerçekleştirmiştir. Biyokütle fosforik asit ön işlemine maruz bırakılarak selülozun açığa çıkarılması sağlanmıştır. Daha sonra enzimatik hidroliz uygulanmış ve *C. acetobutylicum* ile fermentasyon sonucu 5.4 g/L ABE üretimi sağlanmıştır. Ayrıca enzim konsantrasyonunun 25 FPU/g'ye artırılması biyobütanol üretiminde %79 bir artışla sonuçlanmıştır.

Meyve atıkları da yine şeker oranı yüksek ham maddeler olarak bilinmektedir. Bu nedenle biyobütanol üretiminde kullanımlarına literatürde yer verilmiştir. Örneğin, mango kabuğu meyvenin %30-50'sini oluşturmaktadır ve böylelikle bu meyvenin kullanımı oldukça atık madde üretimine sebep olmaktadır. Bu anlamda kurutulmuş mango kabuğunun kullanıldığı bir çalışmada, optimize edilmiş koşullarda (%0.3 sığır özü, 5 günlük inkübasyon, 3 L biyoreaktör kullanımı), *C. acetobutylicum* 2878 15.42 ± 1.3 g/L biyobütanol üretmiştir (Avula vd. 2015).

Beyaz üzüm bir çok ülkede özellikle beyaz şarap yapımında kullanılarak yüksek oranda atık oluşumuna sebep olmaktadır. Dünya çapında artan şarap üretimi, üzüm posasının atılmasıyla ilgili çevresel sorunlara yol açmıştır (Ruberto vd. 2008). Law ve Gutierrez (2013) yaptıkları çalışmada, *C. saccharobutylicum* P262 kullanarak beyaz üzüm posasını, daldırılmış fermentasyon yoluyla biyobütanol üretimi için bir substrat olarak değerlendirmiştir. $MgSO_4$ (0.4 g/L), $FeSO_4$ (0.01 g/L), $MnSO_4$ (0.01 g/L) and K_2PO_4 (1.5 g/L) tuzları ilave materyal olarak kullanıldığında %95 oranında şeker tüketimi gözlenmiş ve 6 g/L biyobütanol üretimi gerçekleştirilmiştir.

Narenciye atıkları yine gıda olarak tüketilmeyen, kabuk, segment zarı ve diğer yan ürünlerden oluşan ve yüksek oranda karbonhidrat içeren ham maddeler olarak bilinmektedir. Dünyadaki üretimi oldukça yüksek olan portakalın kabuğu, diğer narenciye ürünlerinden daha yüksek bir karbonhidrat içeriğine sahiptir. Bu nedenle biyoyakıt üretiminde potansiyel ham madde olarak tercih edilebilir. Buna göre, Joshi vd.

(2015) portakal kabuğunu biyobütanol üretiminde incelemiştir. Öncelikle ön işlem için kullanılan buhar patlama yönteminde çeşitli parametreler optimize edilmiştir. Buna göre, optimize koşullar %1 v/v asit konsantrasyonu, 10 dakika kalma süresi ve %15 w/v substrat konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, besin takviyesi yapılmadan *C. acetobutylicum* NCIM 2877 suşu kullanılarak 19.5 g/L biyobütanol üretimi gerçekleştirilmiştir (Joshi vd. 2015).

Gıda atıklarının kullanıldığı bir başka çalışmada, 56.7 g/L glukoz içeren kontrol grubunda 14.2 g/L ABE üretilirken, substrat olarak 81 g/L gıda atığı (60.1 g/L'lik eşdeğer glukoz içeren) kullanıldığında 18.9 g/L ABE üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca gıda atıklarının daha yüksek konsantrasyonlarda (129, 181 ve 228 g/L) kullanımı, ABE üretimini önemli ölçüde artırmamış ve mikroorganizma inhibisyona uğrayarak yüksek oranda glukoz ortamda kalmıştır (Huang vd. 2015).

2.5.3 Üçüncü nesil biyobütanol üretimi

Alglerin ve siyanobakterilerin yüksek karbonhidrat ve lipid içeriğine sahip olması biyoyakıt üretiminde kullanım potansiyelini göstermektedir. Ayrıca yapılarındaki karotenoid bileşikler, vitaminler ve mineraller mikrobiyel gelişimi destekler nitelikte olduğu için biyobütanol üretiminde fermantatif mikroorganizmaların aktivitelerini olumlu yönde etkileyebilmektedir. Bu anlamda son dönemlerde üçüncü nesil ham maddelerin biyobütanol üretiminde kullanımlarına ilişkin literatür çalışmalarına aşağıda yer verilmiştir.

Mikroalglerin biyorafineri tabanlı kullanımını inceleyen çalışmada, yüzey tepki analizi yöntemi ile asetik asit ve bütirik asit optimize edilmiş mikroalgal ortamlarda (ham ve hidrolize edilmiş biyokütle) ABE fermantasyonu gerçekleştirilmiştir. *C. acetobutylicum* DSM 792 tarafından fermantasyon sonunda ham biyokütleden %10.31 (g/g glukoz) biyobütanol verimi elde edilirken, hidrolize edilmiş ortamda %10.07 (g/g glukoz) biyobütanol verimi gözlenmiştir (Figuerola-Torres vd. 2020).

Wang vd. (2016) çalışmalarında, alkali (%1 NaOH) ve asitle (%3 H₂SO₄) önceden işlenmiş *C. vulgaris* JSC-6 biyokütlesini kullanarak biyobütanol üretimi gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda biyobütanol konsantrasyonu 13.1 g/L iken, üretkenlik ve verim sırasıyla 0.66 g/L/h ve 0.58 mol/mol şeker olarak belirlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar glukoz tüketim verimliliğini %97.5 olarak belirlemiş ve ön işleme tabi tutulmuş hidrolizatta fermantasyon inhibitörleri içermediğini göstermiştir.

Bir başka çalışmada, domuz atık suyunda farklı yetiştirme koşullarının optimize edilmesiyle karbonhidrat açısından zengin bir mikroalg olan *Neochloris Aquatica* CL-M1 gelişiminin sağlanması ve üretilen biyokütleden biyobütanol üretimi amaçlanmıştır. Çalışmada, elde edilen biyokütle alkali (%1 NaOH) ve ardından asitle (%3 H₂SO₄) ön işleme tabi tutularak 48.7 g/L glukoz ve 3.4 g/L ksiloz konsantrasyonu üretilmiştir. *C. acetobutylicum* ATCC 824 tarafından açığa çıkan mikroalgal şekerler fermente edilerek 12.0 g/L biyobütanol elde edilmiştir (Wang vd. 2017b).

Wang vd. (2014) izole ettikleri *C. vulgaris* ile ABE fermantasyonunu amaçlamıştır. Bu amaç doğrultusunda, biyokütle asit ön işlemine tabi tutulmuştur. 111 g ön işlenmiş mikroalgal hidrolizat *C. acetobutylicum* suşu ile fermente edilerek 3.37 g/L biyobütanol üretilmiştir.

Atık su arıtım tesislerinden elde edilen algal türler biyoyakıt üretimi için önemli bir potansiyele sahiptir. Bu bağlamda, New York'taki Rockaway Atıksu Arıtma Tesisi'nden elde edilen algler biyoyakıt üretimi açısından incelenmiştir. Toplanan algal biyokütleler farklı parametrelerin (asit konsantrasyonu, yaş-kuru form, sıcaklık, alg konsantrasyonu gibi) optimizasyonu sonrası *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021 tarafından %75 şeker tüketimi ile 0.1-0.13 g bütanol/g şeker aralığında verim elde edilmiştir (Jernigan vd. 2013).

Ayrıca, makroalglerde kolayca deniz kenarı boyunca yayılabilmeleri ve hızlı üremeleri, besin kompozisyonları bakımından zengin olmaları gibi özelliklerinden dolayı biyoyakıt üretiminde umut verici bir seçenektir. Bu nedenle, Ventura vd. (2016) yaptıkları

Çalışmada, dört kahverengi makroalg türü (*Undaria pinnatifida*, *Laminaria japonica*, *Ecklonia stolonifera*, *Hizikia fusiforme* ve *Sargassum fulvellum*) ve iki kırmızı makroalg türü (*Porphyra tenera* ve *Gelidium amansii*) *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 tarafından biyotanol üretimi açısından araştırmıştır. Bunun için algal biyokütleler 0.15 M H₂SO₄ ile seyreltik asit n işlemine ardından 121 C’de 1 saat termal n işlemine maruz bırakılmıştır. En yüksek biyotanol üretimi 100 g/L hidrolize *L. japonica* kullanılarak, 5.51 g/L olarak elde edilmiştir. Ayrıca, n işlenmiş *L. Japonica* hidrolizatının aktif karbon ve kireçleme yöntemi ile detoksifikasyonu sonrası, biyobütanol üretimi sırasıyla %24.14 ve %12.16 oranında artmıştır.

Bir çalışmada ise yeşil makroalg olarak bilinen *Ulva lactuca*, ABE fermentasyonu için öncelikle sıcak su işlemine daha sonra ticari selülazlar ile enzimatik hidrolize tabi tutulmuştur. İşlem sonrasında %90 üzerinde şeker çözünmesi sağlanmıştır. n işlenmiş hidrolizat ABE retimi için *C. acetobutylicum* ATCC 824 ve *C. beijerinckii* NCIMB 8052 tarafından kullanılmış ve en yüksek biyobütanol glukoz ve ksilozla desteklenmiş hidrolizatta *C. acetobutylicum* ATCC 824 18.1 g/L toplam ABE ve 11.4 g/L biyobütanol üretmiştir (Van der Wal vd. 2013).

Yine makroalg olarak *U. lactuca*’nın kullanıldığı çalışmada asit hidrolizi sonrası 15.2 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu elde edilmiştir. Elde edilen şeker kompozisyonu ise %27 glukoz, %57 arabinoz ve %16 ksiloz olarak belirlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar, hidrolizattan katı fraksiyonun ayrılmasının şeker verimini %75 oranında arttırdığını belirtmiştir. *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021 suşu ile belirtilen hidrolizattan yaklaşık 4 g/L biyobütanol elde edilmiştir (Potts vd. 2012).

Biyobütanol retiminde siyanobakterilerin kullanımına ilişkin çalışma sayısı literatürde oldukça azdır. Bununla birlikte, yine bu mikroorganizmalardan biyobütanol üretiminin elde edildiği görülmektedir. Örneğin; Efremenko vd. (2012) eşitli mikroalg ve siyanobakteri türlerini biyobütanol üretiminde bir substrat olarak incelemiştir. Bu türler arasında bir siyanobakteri olan *Arthrospira (spirulina) platensis* termal ve asidik ön işleme maruz bırakıldıktan sonra, immobilize edilmiş *C. acetobutylicum* B-1787 hücreleri

tarafından fermente edilerek 430 ± 20 mg/L biyobütanol üretimi gerçekleştirilmiştir (Efremenko vd. 2012).

2.5.4 Dördüncü nesil biyobütanol üretimi

Son yıllarda metabolizma mühendisliği ile farklı mikroorganizmalar veya biyokütlelerde genetik modifikasyonların gerçekleştirilmesiyle biyobütanol üretiminin gerçekleştirilmesi ya da artırılması sağlanmaktadır. Yapılan değişiklikler çoğunlukla biyobütanol üretim metabolizma yollarlarında yer alan genlerin üzerinde yapılmaktadır. Çoğunlukla biyobütanolün doğal üreticileri veya literatürde oldukça iyi araştırılmış ve genotipik özellikleri bilinen mikroorganizmalar üzerinde araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Biyobütanol üretimi amacıyla hedeflenen canlılar bakteri, maya, siyanobakteri veya sık rastlanmasa da arke olabilmektedir. Bu anlamda literatürde yapılan bazı çalışmalara aşağıda yer verilmiştir.

C. cellulovorans DSM 743B suşu CBP yoluyla biyokütlenin sakkarifikasyonu için önemli bir suş olarak kullanım potansiyeline sahiptir. Bu anlamda, Wen vd. (2019) çalışmalarında, belirtilen suşun literatürde daha önce lignoselülozik biyokütleden biyobütanol üretimine ilişkin çalışma olmadığını vurgulamış ve metabolizma mühendisliği ile bu üretimi gerçekleştirmeyi hedeflemiştir. Bu amaçla, *C. acetobutylicum* ATCC 824'te bulunan *adhE1* ve *ctfA-ctfB-adc* genlerini *C. cellulovorans*'a tanıtarak, bu suşta bir koenzim A (CoA) bağımlı ABE yolunun yapımını araştırmıştır. Ayrıca ham madde olarak mısır koçanı tarımsal atığını kullanmıştır. Bununla birlikte *C. cellulovorans*'ın bütanol toleransını artırmak için yeni bir uyarlanabilir laboratuvar evrimi yaklaşımı ile bakteri dahada geliştirilerek biyobütanol üretimi 0.025 g/L'den 3.47 g/L'ye yükseltilmiştir (Wen vd. 2019).

C. acetobutylicum'un endüstriyel ABE üretiminde kullanımı, stres koşullarında spor formuna geçmesinden dolayı sınırlanmaktadır. Sporlanma düzenleyicisi olan Spo0A'nın fosforilasyonunda yer alan dört histidin kinazın sporlanmayı, hücre büyümesini ve metabolizmayı kontrol ettiği, Du vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir.

Çalışma sonucunda *cac3319* ve *cac0323*'in çift devredışı haline sahip bir mutant kullanılarak, buhar sıyırma yoluyla lifli yataklı bir biyoreaktörde tekrarlanan parti fermantasyonu ile 20 g/L'nin üzerinde gelişmiş biyobütanol üretimi gerçekleştirilmiştir (Du vd. 2021).

E. coli literatürde sıklıkla metabolizma mühendisliğinde kullanılan model organizmalar arasındadır. Böylelikle, *E. coli*'nin biyobütanol üretiminde kullanımı da literatürde yerini almıştır. Ohtake vd. (2017) çalışmalarında, *E. coli* üzerinde piruvat, bütanoat ve diğer CoA türevli bileşiklerin istenmeyen birikimine neden olan bir *pta* delesyonundan kaynaklanan bir CoA dengesizliğini ortaya çıkarmak için metabolomik güdümlü bir yaklaşım kullanmışlardır. Metabolomik kullanılarak, alkol dehidrogenaz *AdhE2* tarafından katalize edilen bütanoil-CoA'nın bütanol'a indirgenmesi, hız sınırlayıcı bir adım olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda aktivitenin iyileştirilmesi ve ardından CoA'nın serbest bırakılması, sistein takviyesi kullanılarak toplam serbest CoA seviyelerinin iyileştirilmesi üzerine 18.3 g/L'lik bir biyobütanol titresi elde edilmiştir (Ohtake vd. 2017).

Dörüncü nesil biyobütanol üretiminde kullanılan bir diğer mikroorganizma çeşidi olan mayalar arasında *S. cerevisiae* dikkat çekmektedir. Shi vd. (2016) çalışmalarında *S. cerevisiae*'in metabolizma mühendisliği ile endojen treonin yolu ve tanıtilan sitramalat yolunun sinerjistik etkisini düzenleyerek *n*-butanol üretimini gerçekleştirmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla, endojen treonin yolu optimize edilmiş daha sonra sitramalat sentaz (CimA) aracılı yol tanıtilmiştir. Keto-asit dekarboksilazların (KDC) ve alkol dehidrogenazın (ADH) aşırı ekspresyonu *n*-butanol üretimini geliştirmiştir. Daha sonrasında, kurulan yaklaşımı *LEU1*, *LEU4*, *LEU2*, *LEU5*, *CimA*, *NFS1*, *ADH7* ve *ARO10**'un birlikte ifadesi ile birleştirdikten sonra, son tasarımda 835 mg/L'lik bir *n*-bütanol üretimi elde edilmiştir (Shi vd. 2016).

Nielsen vd. (2009), biyobütanol üretimi için çeşitli mikroorganizmaları biyokatalizör olarak genetik mühendisliği ile tasarlamış ve biyobütanol sentez yollarını modifiye etmiştir. Biyobütanol üretiminde *S. cerevisiae* format dehidrogenaz ko-ekspresyonu ile

iyileştirme gerçekleştirilirken ayrıca *E. coli* gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenazın glikolitik akışı iyileştiren titreleri aşırı ekspresyon ile edilmiştir. Ayrıca *Pseudomonas putida* ve *Bacillus subtilis*'de, butanol biyosentetik genlerinin polisistronik ifadesi ile sırasıyla 120 ve 24 mg/L biyobütanol konsantrasyonları elde edilmiştir. (Nielsen vd. 2009)

Siyanobakteriler fotosentetik özellikleri olan mikroorganizmalardır ve genetik mühendisliğinin sağladığı avantajlar ile CO₂'ten biyobütanol üretimi gerçekleştirebilirler. Liu vd. (2019), *Synechocystis* PCC 6803 siyanobakterisini kullanarak, 1-bütanol'ün biyosentezini araştırmıştır. Metabolizma sürecinde gen ve enzim seviyeleri tanıtılmış, karbon akışı ve fotosentetik merkezi karbon metabolizması yeniden düzenlenmiştir. Araştırma sonucunda 4.8 g/L 1-bütanol konsantrasyonu elde edilmiştir (Liu vd. 2019).

Belirtilen çalışmalarla birlikte, literatürde sürdürülebilir biyobütanol üretimi için, farklı ham maddelerin kullanımı ile etkili sonuçların elde edildiği çalışmaların olduğu görülmektedir. Mevcut tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile literatüre alternatif ham maddelerin değerlendirilmesi sunulmuştur.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Mikroorganizmalar ve inkübasyon koşulları

3.1.1.1 Mikroalg

Gerçekleştirilen çalışmada, *D. salina* mikroalgi biyobütanol üretiminde üçüncü nesil ham madde olarak kullanılmak üzere Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. *D. salina* kültürasyonu için %15 NaCl içeren Johnson besiyeri hazırlanmış (Johnson vd. 1968) ve 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Johnson besiyeri 150 g/L NaCl, 1.5 g/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.2 g/L $CaCl_2$, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g/L KCl, 1.0 g/L KNO_3 , 2.45 g Tris aminometan, 1.89 mg/L etilendiamin tetraasetik asit, 0.035 g/L KH_2PO_4 , 2.44 mg/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.043 g/L $NaHCO_3$, 0.041 mg/L $ZnCl_2$, 0.015 mg/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.61 mg/L H_3BO_3 , 0.41 mg/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.041 mg/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.38 mg/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ içermektedir. Besiyerleri 250 mL’lik erlenlere 100 mL çalışma hacmi olacak şekilde aktarılmıştır. %10 inokulasyon oranı ile mikroalgal hücreler besiyerine eklenerek 15 gün boyunca 25 °C’de 2400 lux ışık altında geliştirilmiştir (Çelekli vd., 2014). Mikroalg kültürü 15 günlük inkübasyon sonrasında 5000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiş ve yaş biyokütle deneylerde kullanılabilecek kadar +4 °C’de saklanmıştır. *D. salina* mikroalginin şeker profilini belirlemek için kullanılacak kuru biyokütle ise, yaş biyokütlenin 80°C’de bir gece kurutulmasıyla elde edilmiştir.

3.1.1.2 Fermentatif mikroorganizma

ABE fermantasyonu yoluyla biyobütanol üretimini gerçekleştiren *C. beijerinckii* DSMZ 6422 suşu Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Mikroorganizma stok kültürleri P2 ortamında

geliştirilmiş ve hücreler +4 °C’de saklanmıştır. Standart P2 ortamı 60 g/L glukoz, 1 g/L maya özütü, 0.5 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L K₂HPO₄, 2.2 g/L amonyum asetat, 0.001 g/L para-amino-benzoik asit, 0.001 g/L tiamin, 0.00001 g/L biotin, 0.2 g/L, MgSO₄·7H₂O, 0.01 g/L MnSO₄·7H₂O, 0.01 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.01 g/L NaCl içermektedir (Qureshi ve Blaschek 1999). Ayrıca anaerobik koşulların bir indikatörü olarak resazurin kullanılmıştır (Guo vd. 2012). Mikroorganizmalar fermantasyon deneylerinde kullanılmadan önce, yine P2 ortamında 24 saat boyunca 37 °C’de inkübe edilmiş ve aktifleştirilmiş pre-kültür deney ortamına inoküle edilmiştir.

3.1.1.3 Ham maddeler

İkinci nesil lignoselülozik ham maddelerin biyobütanol üretiminde etkisini belirlemek için literatürde ilk kez kullanılan çay atığı ÇAY-KUR A.Ş.’den sağlanmıştır. Elde edilen ham EÇAT 0.2 cm boyutta olacak şekilde değirmende (Miprolab, Türkiye) öğütülmüş ve vidalı kapaklı şişelerde saklanmıştır.

Miksotrofik koşullarda *D. salina* mikroalginin gelişimini desteklemek için değerlendirilen endüstriyel MA, HP Mermer İnşaat Enerji A.Ş.’den sağlanmıştır. Atıklar deneyde kullanılmadan önce 50°C’de bir gece boyunca kurutulmuş ve vidalı kapaklı şişelerde saklanmıştır.

EÇAT’nın biyobütanol üretiminde etkisini belirlemek için azot kaynağının optimizasyonu çalışmalarında kullanılan peyniraltı suyu tozu SÜTAŞ’tan temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Ön işlem yöntemleri

3.2.1.1 İkinci nesil ham madde olarak kullanılan endüstriyel çay atıklarının hidrolizi

EÇAT içerisindeki indirgen şekerler en etkili, kısa süreli, kullanılabilir ve ucuz yöntem olan seyreltik asit ön işlemi ile elde edilmiştir (Zhang 2021, Rajan ve Carrier 2014). Ön işlem sürecinde öğütülmüş EÇAT (300 g/L), %1 H₂SO₄ (v/v) ile otoklavda 121 °C'de 15 dakika hidroliz edilmiştir (Germec ve Turhan 2018). Hidrolizat, Whatman No:1 filtre kağıdı ile süzölmüş ve fermantasyon deneyleri için +4 °C'de saklanmıştır. Bu çalışmada yapılan tüm deneylerde ABE üretimi için glukoz miktarına karşılık gelen EÇAT şeker konsantrasyonları kullanılmış ve EÇAT şeker konsantrasyonları 300 g/L stok hidrolizat solüsyonu seyreltilerek ayarlanmıştır.

3.2.1.2 Üçüncü nesil ham madde olarak kullanılan *D. salina* biyokütlesi

ABE fermantasyonu deneylerinde kullanılmak üzere fotoototrofik ve mikсотotrofik olarak üretilen *D. salina* yaş biyokütlesi herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan direkt olarak P2 ortamına (60 g/L glukoz içermeyen veya içeren) eklenmiş ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır.

Ayrıca, *D. salina* mikroalginin içerisindeki şeker profili ve inhibitör maddelerin açığa çıkarılması için, kuru biyokütle, %1 H₂SO₄ (v/v) ile otoklavda 121 °C'de 15 dakika hidroliz edilmiştir. Hidrolizat, Whatman No:1 filtre kağıdı ile süzöldükten sonra yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazında analiz edilmiştir.

3.2.2 Mikroalglerin mermer atıkları ile miksotrofik kùltivasyonu

Miksotrofik mikroalgal gelişim deneyleri standart besiyerinde (Johnson besiyeri) kullanılan CaCl_2 yerine endüstriyel atık olarak MA'nın 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1, 1.5 ve 2 g/L konsantrasyonları eklenerek aynı koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak aynı konsantrasyonlarda CaCl_2 içeren Johnson besiyeri kullanılmıştır. Hazırlanan steril besiyeri ortamına %10 (v/v) oranında *D. salina* mikroalgi inoküle edilmiş ve 15 gün boyunca 2400 lux ışık altında 25 °C'de inkübe edilmiştir. Mikroalg kùltürü 15 günlük inkübasyon sonrasında 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve yaş biyokütle deneylerde kullanılabilecek kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.3 Fermantasyon deneyleri

3.2.3.1 Endüstriyel çay atıklarının ABE fermantasyonuna etkisi

Farklı endüstriyel çay atığı şeker konsantrasyonlarının biyobütanol üretimine etkisi

ABE fermantasyonu deneylerinde, EÇAT hidrolizatından elde edilen 20, 40, 60 ve 80 g/L glukozla eşdeğer farklı şeker konsantrasyonları *C. beijerinckii* DSMZ 6422 kullanılarak P2 ortamında incelenmiştir. Seyreltik ön işlem yöntemi ile hidrolize edilmiş stok EÇAT (300 g/L) solüsyonunun indirgen şeker içeriği DNS metodu ile 82 g/L olarak belirlenmiştir. Buna göre belirtilen şeker konsantrasyonları stok çözelti seyreltilmesiyle elde edilmiştir. Seyreltilmiş asit ön işlemi sonrası asidik pH değerine sahip olan EÇAT ortamının başlangıç pH'ı 0.2 M NaOH ilave edilerek 6.8 ±0.2'ye ayarlanmıştır. Fermantasyon ortamları, flanş tipi bütül kauçuk tıpalı ve vidalı kapaklı, 15 mL çalışma hacmine sahip, anaerobik Hungate tüplerde (16 x 125 mm) hazırlanmıştır (Narayanasamy vd. 2020). Hazırlanan fermantasyon ortamları anaerobik koşulları sağlamak için %99.9 nitrojen gazından geçirilmiş ve oksijensiz ortam 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Sterilize edilen ve soğutulan fermantasyon ortamına P2 solüsyonları (asetat tamponu, mineraller ve vitaminler) 1 mL tek kullanımlık steril enjektör ile eklenmiştir. Daha sonra bir gece önceden inkübe edilen *C. beijerinckii* DSMZ 6422 kùltürü %10 oranında ortama eklenmiş ve bir inkübatörde (Mettler/600/Almanya) 37°C'de 96-120 saat süreyle

inkübe edilmiştir (Kushwaha vd. 2020). Örnekler, tek kullanımlık steril enjektör aracılığıyla fermantasyon tüplerinden ABE üretimi ve şeker tüketimini analiz etmek için periyodik olarak alınmıştır. Kontrol ortamı olarak 60 g/L glukoz içeren standart P2 ortamı ve herhangi bir katkı içermeyen EÇAT şekerli ortamı kullanılmıştır.

Farklı azot kaynaklarının biyobütanol üretimine etkisi

Azot kaynağının biyobütanol üretimine etkisini belirlemek için fermantasyon ortamına 1, 2, 4 ve 8 g/L konsantrasyonlarında peyniraltı suyu tozu ve maya özütü ilave edilmiştir.

Mineral tuzların (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) biyobütanol üretimine etkisi

Tez çalışmasında $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 g/L), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.005, 0.01, 0.02 ve 0.04 g/L) ve $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.001, 0.01 ve 0.02 g/L)'nin farklı konsantrasyonları, biyobütanol üretimi için değerlendirilmiştir. Bu kapsamda standart P2 ortamındaki mineral solüsyon konsantrasyonları bu mineral tuzların farklı konsantrasyonları ile modifiye edilmiş ve optimum EÇAT şekerli içeren modifiye P2 ortamına eklenmiştir.

3.2.3.2 Mikroalgal biyokütlenin ABE fermantasyonuna etkisi

Karbon kaynağı olarak sadece fotoototrofik mikroalgal biyokütlenin etkisi

Standart Johnson besiyerinde geliştirilen ön işleme tabi tutulmamış 50 ve 100 g/L mikroalgal biyokütle, glukoz içermeyen P2 ortamına eklenmiştir. Deneylerden önce, mikroalgal biyokütle içeren vidalı kapaklı Hungate fermantasyon tüpleri, oksijensiz koşullar için nitrojen gazı ile muamele edilmiş ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra, steril ve anaerobik fermantasyon ortamına 1 mL'lik tek kullanımlık steril enjektör ile P2 solüsyonları (asetat tamponu, mineral ve vitamin) eklenmiştir. Hazırlanan ortamlara %10 oranında bir gece önceden geliştirilmiş *C. beijerinckii* DSMZ kültürü inoküle edilmiş ve 37°C'de 96 saat süreyle inkübe edilmiştir. Fermantasyon sonunda alınan örnekler, aseton, bütanol ve etanol konsantrasyonu için Gaz kromatografisi cihazı (GC) ile analiz edilmiştir. Ayrıca 60 g/L glukoz içeren standart P2 ortamı, kontrol ortamı olarak kullanılmıştır.

Destekleyici materyal olarak fotoototrofik ve mikсотrofik mikroalgal biyokütlenin etkisi

Çalışmanın bu bölümünde fermantasyon ortamı olarak artan MA konsantrasyonlarının varlığında mikсотrofik olarak yetiştirilen 50 g/L mikroalgal biyokütlenin tamamını ve 60 g/L glukozu içeren P2 ortamı kullanılmıştır. Hungate tüplerinde hazırlanan ortamlar öncelikle azot gazından geçirilerek anaerobik koşul sağlanmış ve ardından 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Steril ve oksijensiz ortama P2 solüsyonları (asetat tamponu, mineral ve vitamin) eklenmiştir. Kontrol grupları olarak standart P2 ortamı ve aynı konsantrasyonlarda CaCl₂ içeren ortamda yetiştirilen mikroalg biyokütlesi ve 60 g/L glukoz içeren ortam kullanılmıştır. Hazırlanan ortamlara %10 oranında bir gece önceden aktifleştirilmiş *C. beijerinckii* DSMZ kültürü inoküle edilmiş ve 37°C'de 96 saat süreyle inkübe edilmiştir. Fermantasyon sonunda alınan örnekler, aseton, bütanol ve etanol konsantrasyonu için GC ile analiz edilmiştir. Ayrıca 60 g/L glukoz içeren standart P2 ortamı, kontrol ortamı olarak kullanılmıştır.

Mikroalgal biyokütle konsantrasyonunun ABE fermantasyonuna etkisi

Optimum MA konsantrasyonu varlığında mikсотrofik olarak yetiştirilen mikroalgal biyokütlenin farklı konsantrasyonları (100, 200 ve 300 g/L) biyobütanol üretiminde destekleyici materyal olarak incelenmiştir. Bu amaçla hasat edilmiş ve ön işlem görmemiş yaş biyokütle, 60 g/L glukoz içeren P2 ortamına eklenmiştir.

3.2.4 Analitik yöntemler

Mikroalgal ve mikrobiyel büyümenin takibi, besiyerlerinden belirli aralıklarla alınan örneklerin spektrofotometrik olarak 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu) analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Ayrıca çay atığındaki ve yapılan tüm fermantasyon deney ortamlarındaki indirgenmiş şeker miktarı tayini için dinitrosalisilik asit (DNS) (Miller 1959) yöntemi kullanılmış ve spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda analiz edilmiştir.

EÇAT ve *D. salina* mikroalginin indirgen şeker profili, asetik asit, formik asit ve 5-hidroksimetilfurfural (HMF) konsantrasyonları, kırılma indisi detektörü (RID 10-A) ve Coregel 87H3 (Transgenomic) kolonu ile oluşturulmuş HPLC (Shimadzu, 2010) sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz için seyreltik asit ön işlemi sonrası elde edilen 1.5 mL hidrolizat örnekleri 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant 0.20 µm membran filtre ile süzölmüştür. Örnekler, 25 dakika boyunca mobil faz olarak 5 mM H₂SO₄ kullanılarak analiz edilmiştir (Motoda vd. 2019). Kolon sıcaklığı ve toplam akış sırasıyla 70 °C'de ve 0.6 mL/dakika'da tutulmuştur. Şekerler (glukoz, arabinoz, galaktoz, ksiloz ve mannoz) ve inhibitörler (asetik asit, formik asit ve HMF) için standart eğriler oluşturulmuş ve her bir şeker ve inhibitörün alıkonma süresi belirlenmiştir.

Fermantasyon ortamlarındaki aseton, bütanol ve etanol konsantrasyonu, bir alev iyonlaşma detektörü (FID) ve bir RESTEK RTX-Wax kolon (60 m uzunluk ve 0.25 mm iç çap) ile oluşturulmuş GC cihazında (Shimadzu 2010) analiz edilmiştir (Rochón, 2018). Analizden önce 1 mL örnek 9.500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant 0.22 µm membran filtre kullanılarak filtrelenmiştir. Daha sonrasında 1 µL örnek, enjeksiyon portundan enjekte edilmiştir. Kolon sıcaklığı başlangıçta 50 °C'ye ayarlanmış ve daha sonra 150 °C'ye yükseltilmiştir. Enjeksiyon portu ve FID sıcaklıkları sırasıyla 150°C ve 160°C'de tutulmuştur. Kolon basıncı 200 kPa'dır. Kolon ve toplam akış hızı sırasıyla 1.85 mL/dakika ve 190.4 mL/dakika'dır. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı ve alev iyonizasyon gazı olarak hidrojen gazı kullanılmıştır.

EÇAT'nın selüloz içeriği standart ISO protokolü 5498–1981'e (Śmiechowska ve Dmowski 2006) göre hesaplanmış ve selüloz ölçümü harici bir laboratuvar (Düzen Norwest/Ankara) tarafından yapılmıştır. EÇAT'nın hemiselüloz içeriği NREL protokolüne göre belirlenmiştir. Nem içeriği ise Nielsen'e (2017) göre belirlenmiş ve aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır (Nielsen 2017).

$$Nem (\%) = \frac{(yaş \ örnek \ ağırlığı + petri \ kabı \ ağırlığı) - (kuru \ örnek \ ağırlığı + petri \ kabı \ ağırlığı)}{(yaş \ örnek \ ağırlığı + petri \ kabı) - (petri \ kabı \ ağırlığı)} \times 100$$

Su tutma kapasitesini belirlemek için Ibrahim vd. (2019)'nin uyguladığı yöntem kullanılmış ve aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Ibrahim vd. 2019).

$$\text{Su tutma kapasitesi (\%)} = ((M_{\text{son}} - M_{\text{ilk}})/M_{\text{ilk}}) \times 100$$

EÇAT ve *D. salina*'nın toplam protein içeriğini belirlemek için Lowry yöntemi (Lowry vd. 1951) kullanılmıştır.

İkinci ve üçüncü nesil ham maddeler ile gerçekleştirilen biyobütanol üretimi deneylerinde, biyobütanol verimi, üretkenliği ve şeker tüketim oranı gibi kinetik parametreler aşağıda belirtilen formüllere göre belirlenmiştir.

$$\text{Biyobütanol verimi (g/g)} = \text{Biyobütanol konsantrasyonu (g/L)} / \text{Tüketilen şeker (g/L)} \quad (1) \quad (\text{Valles vd. 2020})$$

$$\text{Biyobütanol üretkenliği (g/L/h)} = \text{Biyobütanol konsantrasyonu (g/L)} / \text{Fermantasyon zamanı (h)} \quad (2) \quad (\text{Valles vd. 2020})$$

$$\text{Şeker tüketim oranı (\%)} = [(\text{Başlangıç şeker (g/L)} - \text{Kalan şeker (g/L)}) / \text{Başlangıç şeker (g/L)}] \times 100 \quad (3) \quad (\text{Avcı vd. 2023})$$

İkinci nesil ve üçüncü nesil ham maddeler ile yapılan çalışmalarda kinetik parametreler için istatistiksel analiz sırasıyla, $p \leq 0.01$ ve $p \leq 0.05$ anlamlılık düzeyinde varyans analizi (ANOVA) testi ve SPSS yazılımı (sürüm 25) kullanılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 İkinci Nesil Ham Madde Olan Endüstriyel Çığ Atığı ile Yapılan Çalışmalar

4.1.1 Endüstriyel çığ atığının fiziksel, yapısal ve kimyasal içeriği

Biyobütanol üretiminin gerçekleştirilmesi için *Clostridium* türlerinin gelişim ortamı olarak çoğunlukla P2 ortamı kullanılmaktadır. P2 ortamı mikroorganizmanın gelişimini desteklemek amacıyla mineral vitamin gibi maddelerin sentetik formlarını barındırmaktadır. Ancak bunlar yüksek maliyetli ürünler olduklarından kullanımları çok avantajlı değildir. Bu nedenle tez çalışmasında P2 ortamında glukozu alternatif olarak EÇAT şekerinin kullanımı araştırılmıştır.

Değerlendirilen EÇAT'nın fiziksel, kimyasal ve yapısal özellikleri çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre selüloz (%), hemiselüloz (%), nem (%) (Demiray vd. 2022), toplam protein (g/kg), su tutma kapasitesi (%) asetik asit (g/L), formik asit (g/L) ve HMF (g/L) sırasıyla %33.8, %18.9, %7.8, 201 g/kg, %20.73, 1.092 g/L, 0.083 g/L ve 0.016 g/L olarak belirlenmiştir. Ayrıca, seyreltik asit ön işlemi sonrası elde edilen EÇAT hidrolizatında glukoz, arabinoz ve diğer şekerler sırasıyla 3.60 g/L, 2.45 g/L ve 3.70 g/L olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1 Endüstriyel çay atığının fiziksel, yapısal ve kimyasal içeriği

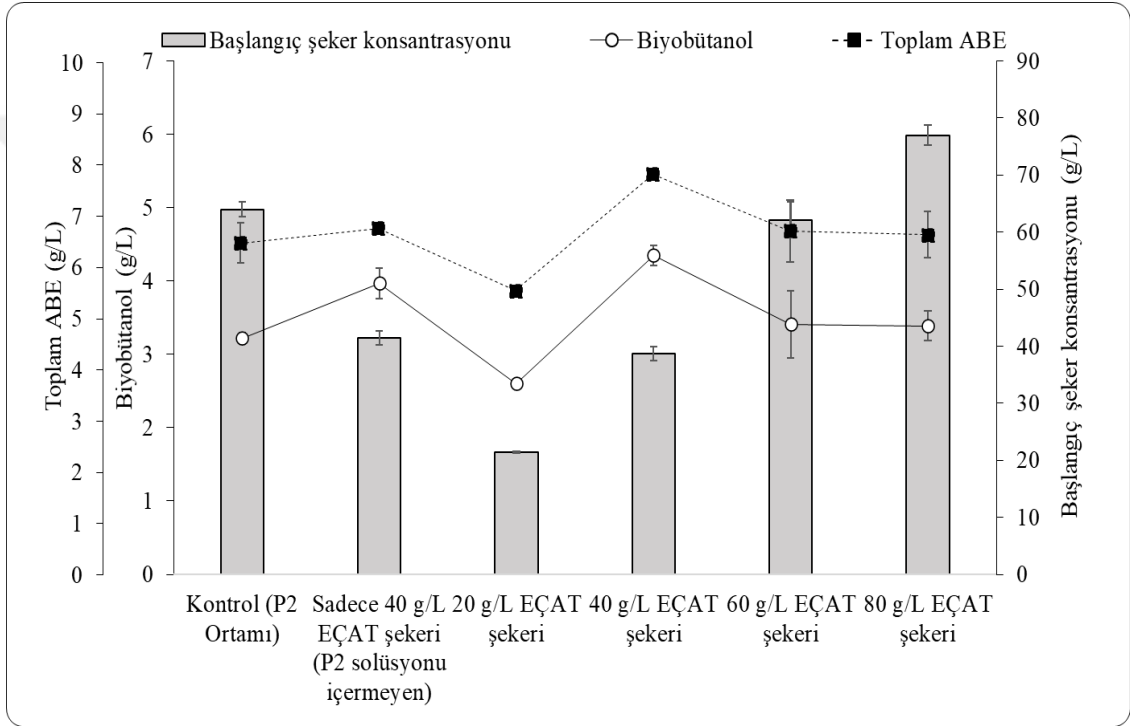
Özellik	İçerik
Selüloz (%)	33.8
Hemiselüloz (%)	18.9
Glukoz (g/L)	3.60
Arabinoz (g/L)	2.45
Diğer şekerler (g/L)	3.70
Toplam protein (g/kg)	201
Asetik asit (g/L)	1.092
Formik asit (g/L)	0.083
HMF (g/L)	0.016
Su tutma kapasitesi (%)	20.73
Nem (%)	7.8

4.1.2 Farklı endüstriyel çay atığı şeker konsantrasyonlarının biyobütanol üretimine etkisi

Karbon kaynağı olarak kullanılan ham maddelerin başlangıç şeker konsantrasyonunun, biyobütanol fermantasyonu üzerinde önemli bir parametre olduğu literatürde belirtilmektedir. Bu amaçla, glukozu karşılık gelen farklı başlangıç EÇAT şekeri konsantrasyonları test edilmiştir. Bu kapsamda biyobütanol üretimi için *C. beijerinckii* DSMZ 6422, 20-80 g/L EÇAT şekeri konsantrasyonu içeren P2 ortamlarında inkübe edilmiştir. Şekil 4.1'deki veriler, her ortam ve şeker konsantrasyonu için farklı fermantasyon sürelerinde biyobütanol konsantrasyonlarını göstermektedir. 20, 40, 60 ve 80 g/L EÇAT şekeri konsantrasyonu için en yüksek biyobütanol konsantrasyonlarının fermantasyon süreleri sırasıyla 24, 48, 72 ve 96. saattir.

Şekil 4.1'e göre *C. beijerinckii* DSMZ 6422, modifiye P2 ortamında başlangıç EÇAT şekeri konsantrasyonu 40 g/L olduğunda, 7.82 g/L olarak en yüksek toplam ABE ve 4.35 g/L olarak biyobütanol üretmiştir. Standart P2 ortamında ise bu konsantrasyonlar

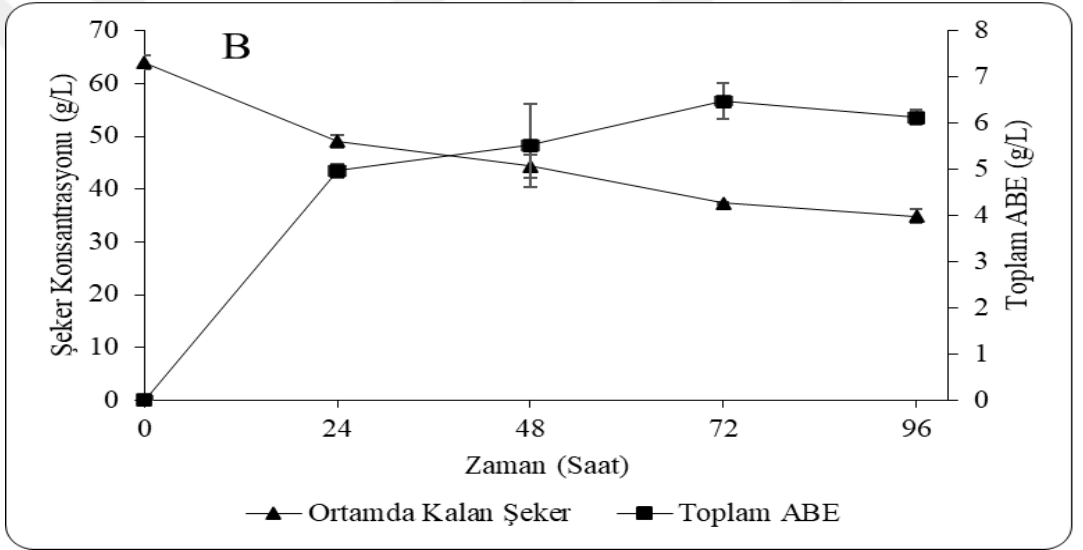
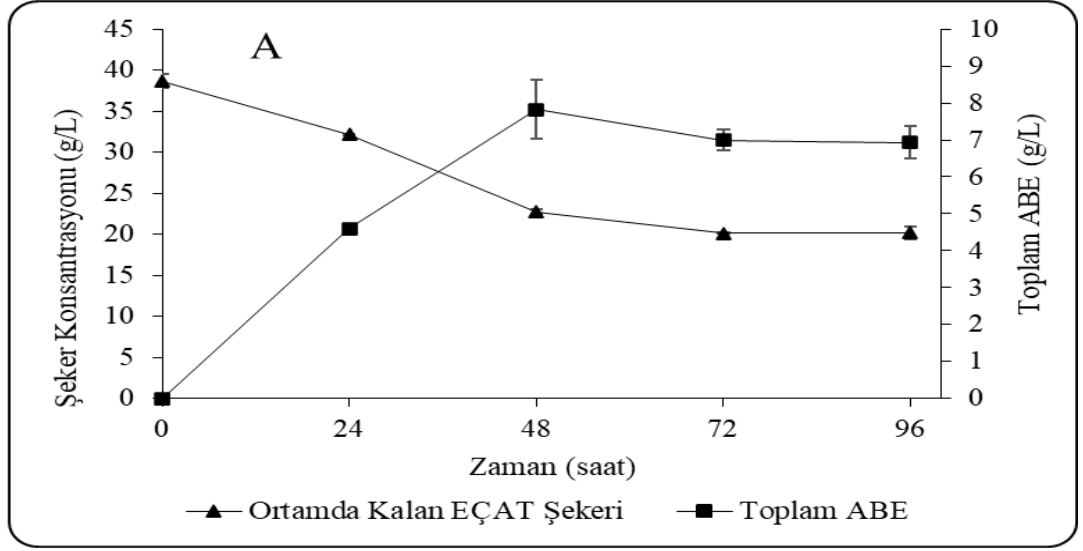
3.22 g/L ve 6.48 g/L olarak belirlenmiştir. Buna göre toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonu, 40 g/L EÇAT şekeri kullanıldığında 60 g/L glukoz içeren standart P2 besiyerine göre 1.206 ve 1.350 kat artmıştır. Ayrıca bu önemli artış gözlemlendikten sonra, herhangi bir katkı içermeyen sadece 40 g/L EÇAT şekeri içeren ortamda P2 ortamına (modifiye P2 ortamı) göre daha yüksek biyobütanol konsantrasyonu elde edilmiş ve 3.97 g/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). Bununla birlikte bu değer, P2 solüsyonları içeren 60 ve 80 g/L EÇAT şekeri içeren besiyerinden elde edilen değerden de yüksektir.



Şekil 4.1 Farklı EÇAT fermentasyon ortamlarında en yüksek toplam ABE, biyobütanol ve başlangıç şeker konsantrasyonları

37 °C; fermentasyon süresi: P2 Ortamı için 72. saat, sadece 40 g/L EÇAT şekeri için 48. saat, 20 g/L EÇAT şekeri için 24. saat, 40 g/L EÇAT şekeri 48. saat, 60 g/L EÇAT şekeri için 72. saat ve 80 g/L EÇAT şekeri için 96. saat). P2 Ortamı; 60 g/L glukoz, 1 g/L maya özütü, P2 solüsyonları, Sadece EÇAT şekeri; P2 solüsyonu içermeyen 40 g/L EÇAT şekeri

Fermentasyon boyunca standart P2 ortamındaki ve modifiye P2 ortamındaki başlangıç şeker konsantrasyonları şekil 4.2’de gösterilmektedir. Buna göre en yüksek değerlerin elde edildiği 72. (standart P2 ortamı için) ve 48. (modifiye P2 ortamı için) saatlerde şeker konsantrasyonları sırasıyla 63.99 g/L’den 37.38 g/L’ye ve 38.67 g/L’den 21.62 g/L’ye düşmüştür.



Şekil 4.2 İki farklı fermantasyon ortamında fermantasyon sürecinde ortamda kalan şeker ve toplam ABE grafikleri. A; 40 g/L EÇAT şekeri içeren P2 ortamı: 40 g/L EÇAT şekeri, 1 g/L maya özütü, P2 solüsyonları. B; Standart P2 ortamı: 60 g/L glukoz, 1 g/L maya özütü, P2 solüsyonları
Fermantasyon süresi: 96 saat; 37 °C

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi, mevcut çalışmada başlangıç EÇAT şekeri 20 g/L iken, en düşük biyobütanol konsantrasyonu 2.60 g/L olarak gözlenmiştir. Bu keskin düşüş, biyobütanol fermantasyonu için gerekli olan şeker konsantrasyonunun yetersiz olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Ek olarak, EÇAT şeker konsantrasyonu 60 ve 80 g/L'ye yükseldiğinde biyobütanol konsantrasyonu sırasıyla 3.41 ve 3.39 g/L'ye hafifçe düşmüştür. Şeker konsantrasyonu 40 g/L olan ortam ile karşılaştırıldığında bu düşüş, çayın yüksek biyokütle konsantrasyonunda tanenler (genellikle tanen asidi) gibi

fenolik bileşikler nedeniyle fermantasyonu inhibe edici bir etkiye sahip olmasından kaynaklanabilir (Mirfakhar vd. 2017).

Çizelge 4.2’de farklı EÇAT şekeri konsantrasyonlarında ve kontrol gruplarında zamana bağlı biyobütanol konsantrasyonlarındaki değişim gösterilmiştir. EÇAT şekerinin 20 g/L konsantrasyonu için biyobütanol konsantrasyonu en yüksek 24. saatte gözlenmiştir. Fermantasyon sonuna konsantrasyonda önemsiz bir düşüş gözlenmiştir. EÇAT şekerinin 40 g/L konsantrasyonu ise 24. saatten sonra çok hızlı bir biyobütanol üretime sebep olmuştur. Bu durum *C. beijerinckii* DSMZ 6422 hücrelerinde optimum şeker varlığında solventejenez faz aşamasına giriş ile daha hızlı bir üretim sağlanmış olabilir. Fermantasyonun 48. saatinden sonra ise biyobütanol üretiminde hafif bir düşüş gözlenmiştir. EÇAT şekeri konsantrasyonu 60 ve 80 g/L’ye çıkarıldığında ise sırasıyla 72 ve 96. saatlerde en yüksek biyobütanol konsantrasyonları görülmüştür. Fermantasyonun bu kadar gecikmesi substrat konsantrasyonun yüksek olmasından kaynaklı olarak hücrelerin şeker kullanımı daha yavaş bir sürede gerçekleştirdiğini gösterebilir. Şöyleki P2 ortamına bakıldığında, direkt glukoz içeren bir ortam olduğundan hücrelerin fermantasyon için karbon kaynağına ulaşımının hızlandığı düşünülmektedir. Buna göre, ilk 24. saatte dahi, 2 g/L’nin üzerinde biyobütanol üretimi ile sonuçlanmıştır. Bir diğer grup olan sadece 40 g/L EÇAT şekeri içeren ortamda, P2 solüsyonları ile desteklenmiş 40 g/L EÇAT şekeri içeren ortamda olduğu gibi 48. saatte biyobütanol üretiminde hızlı bir yükseliş görülmüştür.

Çizelge 4.2 Farklı EÇAT şekeri konsantrasyonlarında ve kontrol gruplarında zamana bağlı ABE konsantrasyonlarındaki değişim

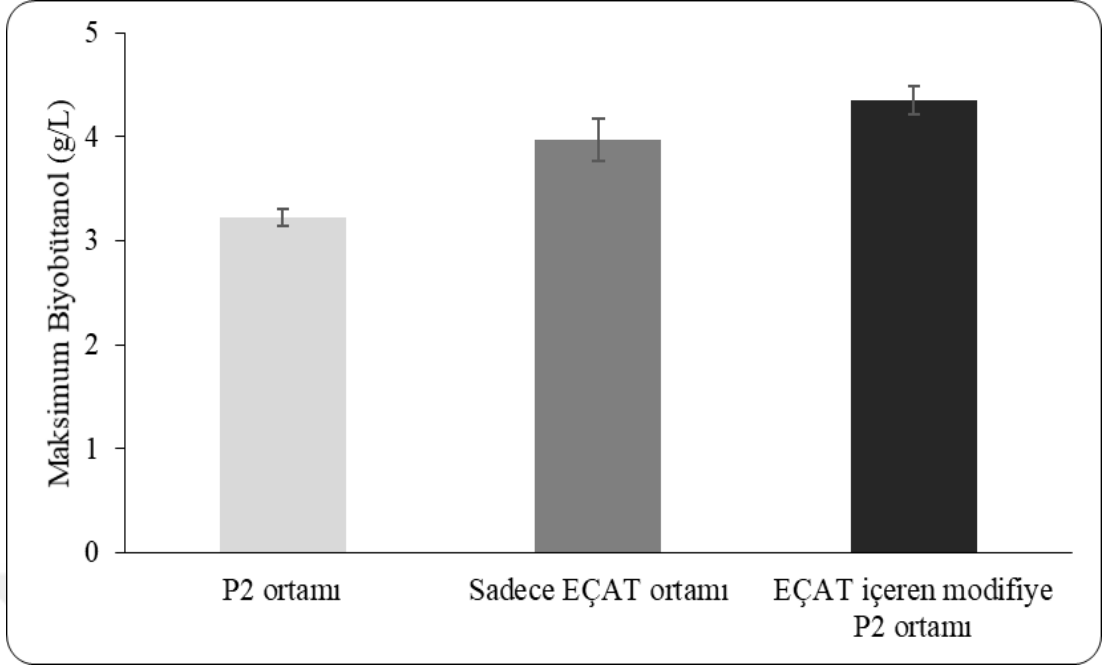
Zaman (saat)	Deney grupları	Aseton (g/L)	Bütanol (g/L)	Etanol (g/L)	Toplam ABE (g/L)
24	20	1.62 ±0.014	2.60 ±0.021	1.33 ±0.028	5.55 ±0.007
	40	1.45 ±0.021	1.85 ±0.028	1.30 ±0.028	4.60 ±0.077
	60	1.32 ±0.007	1.45 ±0.014	1.27 ±0.099	4.04 ±0.106
	80	1.33 ±0.007	1.47 ±0.035	1.50 ±0.212	4.30 ±0.169
	P2 Ortamı*	1.62 ±0.021	2.10 ±0.099	1.25 ±0.035	4.97 ±0.156
	Sadece EÇAT şekeri**	1.32 ±0.014	1.66 ±0.049	1.24 ±0.042	4.22 ±0.007
48	20	1.63 ±0.007	2.49 ±0.028	1.24 ±0.035	5.36 ±0.056
	40	2.03 ±0.205	4.35 ±0.134	1.44 ±0.113	7.82 ±0.113
	60	1.37 ±0.007	1.68 ±0.007	1.21 ±0.035	4.26 ±0.035
	80	1.34 ±0.028	1.54 ±0.488	1.45 ±0.035	4.33 ±0.120
	P2 Ortamı*	1.66 ±0.282	2.84 ±0.198	1.02 ±0.417	5.52 ±0.898
	Sadece EÇAT şekeri**	1.57 ±0.353	3.97 ±0.205	1.23 ±0.063	6.77 ±0.028
72	20	1.57 ±0.049	2.42 ±0.078	1.29 ±0.127	5.28 ±0.155
	40	2.04 ±0.113	3.91 ±0.346	1.72 ±0.247	7.67 ±0.707
	60	1.78 ±0.148	3.41 ±0.460	1.54 ±0.262	6.73 ±0.604
	80	2.04 ±0.092	3.27 ±0.014	2.18 ±0.679	7.49 ±0.784
	P2 Ortamı*	1.71 ±0.042	3.22 ±0.078	1.55 ±0.431	6.48 ±0.395
	Sadece EÇAT şekeri**	1.75 ±0.021	3.79 ±0.035	1.51 ±0.001	7.05 ±0.063

Çizelge 4.2 Farklı EÇAT şekeri konsantrasyonlarında ve kontrol gruplarında zamana bağlı ABE konsantrasyonlarındaki değişim (devam)

	Deney grupları	Aseton (g/L)	Bütanol (g/L)	Etanol (g/L)	Toplam ABE (g/L)
Zaman (saat)	40	2.19 ±0.403	4.06 ±0.360	1.25 ±0.247	7.50 ±0.360
	60	1.68 ±0.057	2.96 ±0.198	1.28 ±0.021	5.92 ±0.275
	80	1.70 ±0.057	3.39 ±0.205	1.55 ±0.205	6.64 ±0.452
	P2 Ortamı*	1.68 ±0.021	3.17 ±0.163	1.27 ±0.021	6.12 ±0.162
	Sadece EÇAT şekeri**	2.10 ±0.070	3.62 ±0.403	1.25 ±0.001	6.97 ±0.473

P2 ortamı solüsyonları; 37 °C

Optimum EÇAT şekeri içeren ortam ve diğer kontrol gruplarında elde edilen biyobütanol konsantrasyonlarının karşılaştırılması şekil 4.3’de gösterilmektedir. Şekilde açıkça görüldüğü gibi EÇAT, etkili bir lignoselülozik ham madde olabilecek potansiyeldedir. P2 ortamında bulunan destekleyici besin maddelerinin EÇAT içeren ortama eklenmemesinde dahi standart P2 ortamına göre biyobütanol konsantrasyonunda bir artış görülmektedir. Bu kullanılan atığın mikrobiyel gelişimi destekleyici ve biyobütanol verimini artırıcı özelliklere sahip olduğunu ve böylelikle hiçbir ek maddeye ihtiyaç olmadan dahi oldukça uygun maliyetle kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.3 Farklı fermantasyon ortamlarında en yüksek biyobütanol konsantrasyon değerleri

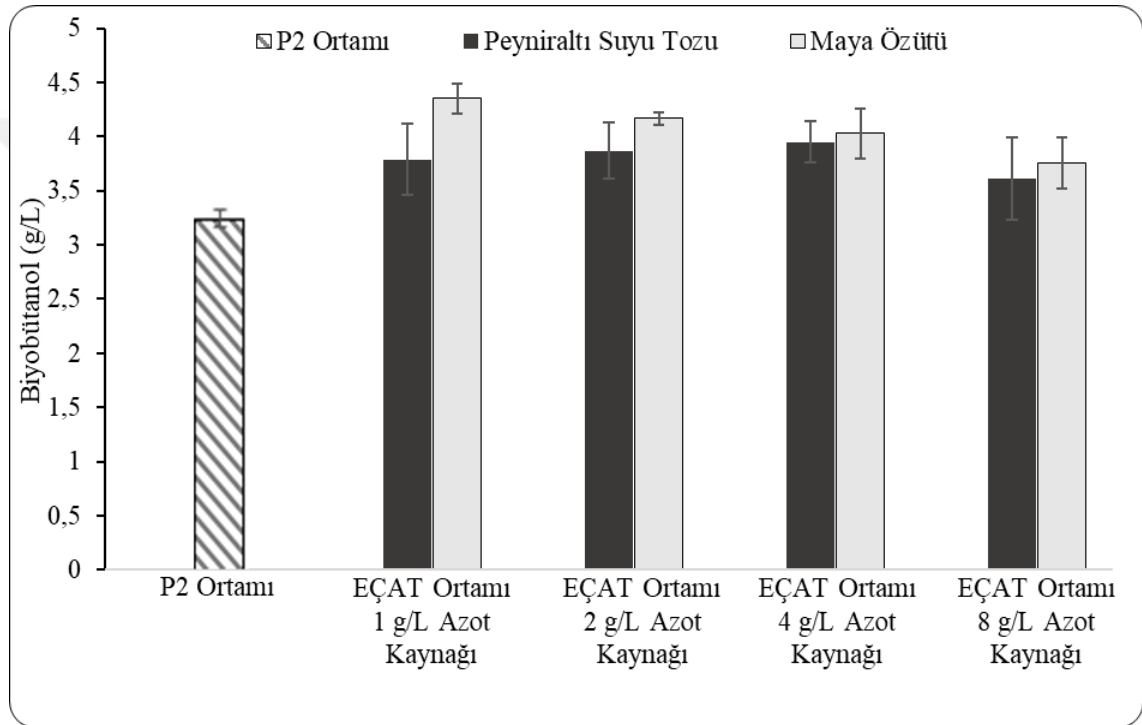
37 °C; P2 Ortamı; 60 g/L glukoz, 1 g/L maya özütü, P2 solüsyonları, Sadece EÇAT ortamı; P2 solüsyonu içermeyen 40 g/L EÇAT şekeri; EÇAT içeren modifiye P2 ortamı; 40 g/L EÇAT şekeri, 1 g/L maya özütü, P2 solüsyonları

4.1.3 Farklı azot kaynaklarının biyobütanol üretimine etkisi

Çalışmanın bu bölümünde mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini önemli derecede etkileyen azot kaynaklarının çeşidi ve konsantrasyonu araştırılmıştır. Buna göre çalışmada, yaygın olarak kullanılan ve ucuz nitrojen kaynaklarından olan maya özütü ve peyniraltı suyu tozu, 1 ile 8 g/L konsantrasyon aralığında incelenerek biyobütanol üretimi için uygun nitrojen kaynağı ve konsantrasyonu tespit edilmiştir.

Şekil 4.4'deki veriler, en yüksek biyobütanol üretiminin 48. saatte 1 g/L maya özütü ile 4.35 g/L olarak bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca, artan maya özütü konsantrasyonlarında biyobütanol konsantrasyonu belirgin şekilde azalmıştır. Ek olarak, aynı peyniraltı suyu tozu konsantrasyonları biyobütanol üretimi için test edilmiştir. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi farklı peyniraltı suyu tozu konsantrasyonları arasında en yüksek biyobütanol üretimi 96 saatlik fermantasyon süresi sonunda 4 g/L peyniraltı suyu tozu

içeren ortamda 3.95 g/L olarak gözlenmiştir. Biyobütanol konsantrasyonu, peyniraltı suyu tozu konsantrasyonları 1 ve 2 g/L olduğunda sırasıyla 3.79 g/L ve 3.87 g/L'ye hafifçe düşmüştür. Ayrıca şekil 4.4'deki veriler, her iki tür nitrojen kaynağının da *C. beijerinckii* DSMZ 6422'nin biyobütanol üretimini olumlu etkilediğini ve bu çalışmanın sonuçlarının literatürle uyumlu olduğunu göstermektedir. En yüksek biyobütanol içeriği literatürde yaygın olarak kullanılan bir nitrojen kaynağı olan 1 g/L maya özütü varlığında elde edildiğinden, ilerleyen deneyler 1 g/L maya özütü ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.4 Nitrojen kaynağı olarak peyniraltı suyu tozu ve maya özütü varlığında en yüksek biyobütanol konsantrasyonları

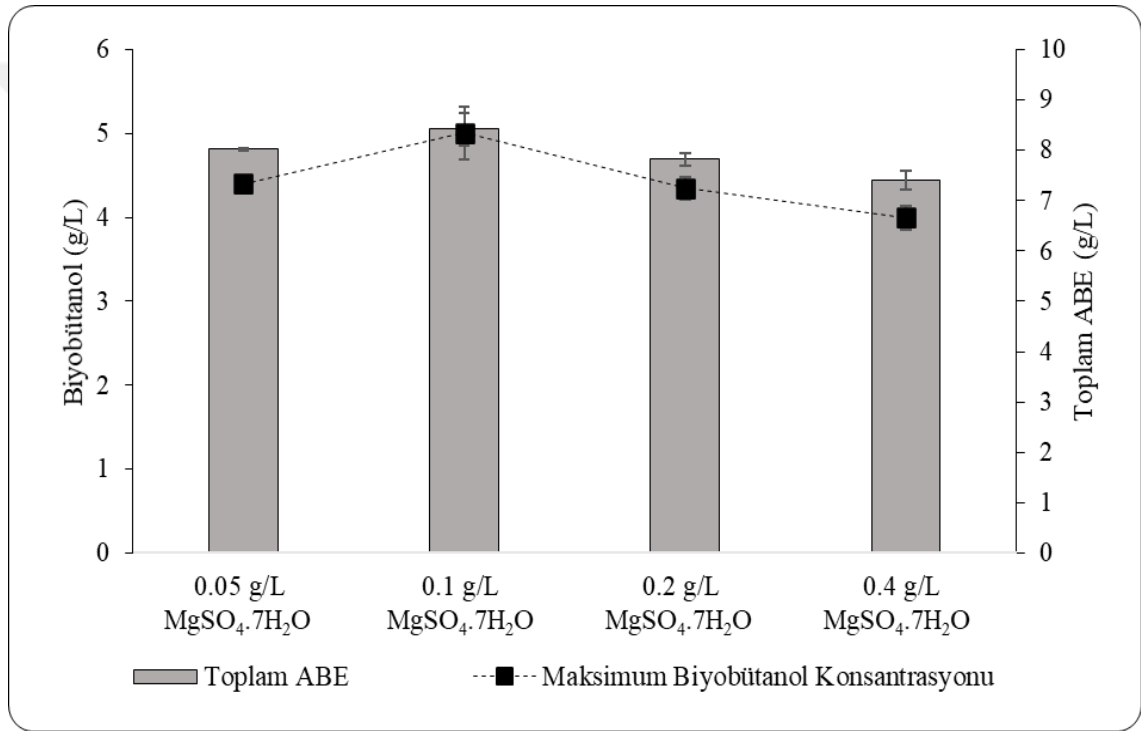
40 g/L EÇAT şekeri; P2 solüsyonları; 37 °C; fermentasyon süresi: P2 Ortamı için 72. saat, tüm peyniraltı suyu tozu konsantrasyonları için 96. saat, 1 g/L maya özütü için 48. saat, 2-8 g/L maya özütü için 96. saat). P2 ortamı; 60 g/L glukoz, 1 g/L maya özütü, P2 solüsyonları, Modifiye P2 ortamı; 40 g/L EÇAT şekeri, 1 g/L maya özütü, P2 solüsyonları

4.1.4 Mineral tuzlarının (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) biyobütanol üretimine etkisi

Tez çalışmasının bu bölümünde mikroorganizmaların onarım, replikasyon, enzim yapısına katılma gibi önemli işlevleri bulunan kritik minerallerin etkisi araştırılmıştır. İlk

olarak Mg^{2+} iyonunun optimum konsantrasyonunu belirlemek için, dört farklı konsantrasyon test edilmiştir.

Şekil 4.5'teki sonuçlar, standart $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonu (0.2 g/L) yarıya düşürüldüğünde biyobütanol konsantrasyonunun arttığını göstermektedir. 0.1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ olacak şekilde Mg^{2+} sınırlamasıyla toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonu sırasıyla 7.82 g/L'den 8.43 g/L'ye ve 4.35 g/L'den 5.01 g/L'ye yükselmiştir. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonu arttığında ise biyobütanol konsantrasyonunda yaklaşık 1 g/L'lik bir azalma gözlenmiştir.

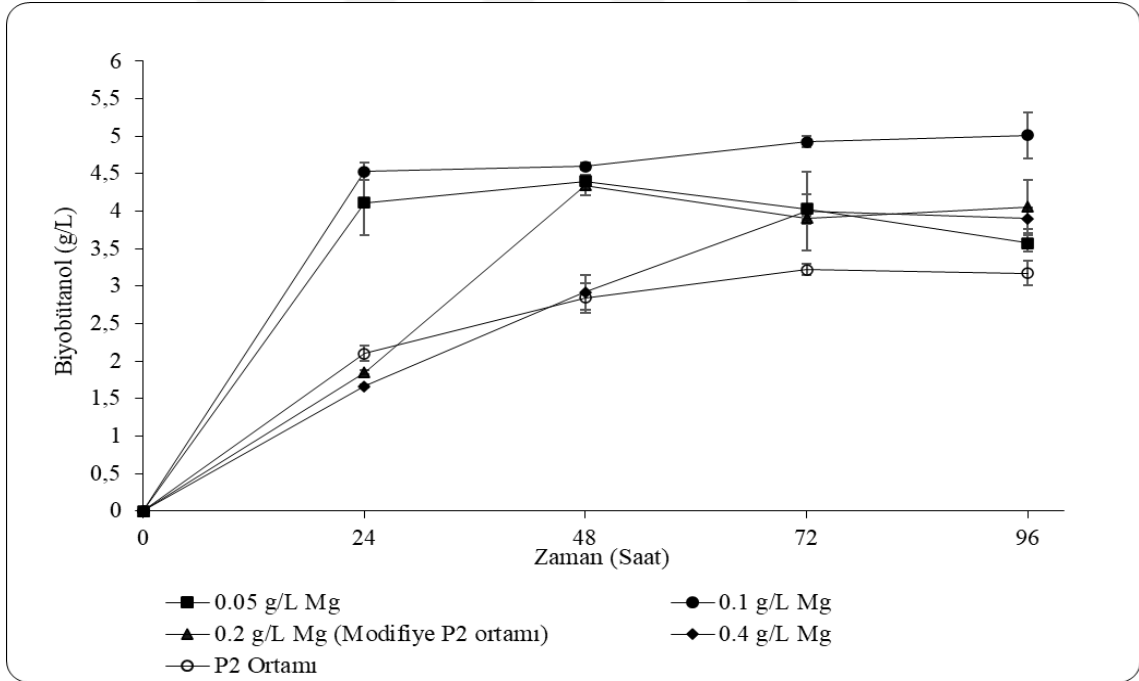


Şekil 4.5 Farklı konsantrasyonlardaki $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ varlığında en yüksek toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonları

40 g/L EÇAT şekeri; 1 g/L maya özütü; P2 solüsyonları; 37 °C; fermentasyon süresi: 0.05 g/L için 48. saat, 0.1 g/L için 96. saat, 0.2 g/L için 48. saat ve 0.4 g/L için 72. saat. 0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; standart P2 ortamı konsantrasyonu

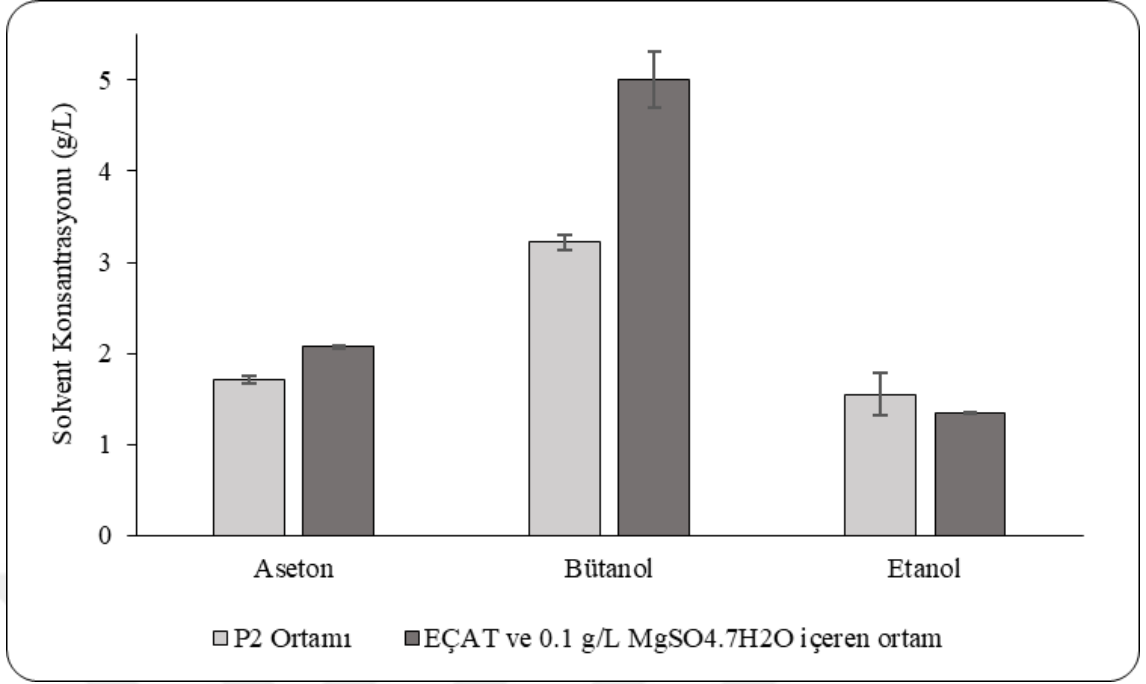
Tüm $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonlarında zamana bağlı biyobütanol konsantrasyonundaki değişim şekil 4.6'da verilmiştir. Düşük $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonlarında ilk 24 saatte biyobütanol üretiminde hızlı bir yükseliş olduğu görülmektedir. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonu 0.1 g/L olduğunda fermentasyonun ilerleyen süreçlerinde üretim hızı düşerek sabit bir artışla devam etmiştir. Ayrıca ortamda çok düşük $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.05

g/L) konsantrasyonunda 48. saatten sonra bir düşüş gözlenmektedir. Diğer konsantrasyonlara bakıldığında ise 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ varlığında 24. saatte biyobütanol üretiminde bir artış gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda ise *C. beijerinckii* DSMZ 6422'in biyobütanol üretim eğilimi 0. saatten 72. saate kadar sabit bir hızla aratarak devam etmiş, daha sonrasında önemsiz bir düşüşle sonuçlanmıştır. Standart P2 ortamı ile karşılaştırıldığında, EÇAT şekeri ve $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunun yarısının kullanımı biyobütanol konsantrasyonunu 3.22 g/L'den 5.01 g/L'ye yükseltmiştir. Bu yükseliş fermantasyon ortamında yaklaşık olarak %55.59'luk bir iyileşmenin sağlandığını göstermektedir. Toplam ABE konsantrasyonunda ise 6.48 g/L'den 8.43 g/L'ye bir artış belirlenmiştir. Bu artış %30.09 oranındadır. Ayrıca bu ortamlardaki aseton, bütanol ve etanol konsantrasyonlarındaki değişim şekil 4.7'de gösterilmektedir. EÇAT şekeri eklemesi ve $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonundaki değişim ile aseton konsantrasyonunu artarken, etanolde çok hafif bir düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.6 40 g/L EÇAT şekeri varlığında farklı $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında biyobütanol üretiminin zamana bağlı değişimi

40 g/L EÇAT şekeri; 1 g/L maya özütü; P2 solüsyonları; 37 °C; fermantasyon süresi: 96 saat. 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; standart P2 ortamı konsantrasyonu



Şekil 4.7 P2 ortamı ve EÇAT şekeri ve 0.1 g/L MgSO₄.7H₂O içeren ortamda en yüksek biyobütanol üretiminin gerçekleştiği fermantasyon zamanındaki aseton, bütanol ve etanol karşılaştırması

40 g/L EÇAT şekeri; 1 g/L maya özütü; P2 solüsyonları; 37 °C; fermantasyon süresi: P2 ortamı için 72. saat, 0.1 g/L MgSO₄.7H₂O içeren EÇAT ortamı için 96. Saat

Farklı MgSO₄.7H₂O konsantrasyonlarında fermantasyon sonunda elde edilen kinetik parametre sonuçları çizelge 4.3’de verilmiştir. Tüm konsantrasyonlarda başlangıç EÇAT şekeri konsantrasyonları yaklaşık 40 g/L olarak ayarlanmıştır. Çizelge incelendiğinde, biyobütanol verimi, en yüksek 0.1 g/L MgSO₄.7H₂O konsantrasyonunda 0.247 g/g olarak belirlenmiş ve mineral konsantrasyonu arttıkça biyobütanol veriminde düşüş gözlenmiştir. Biyobütanol üretkenliği verileri incelendiğinde, aynı şekilde 0.1 g/L’lik konsantrasyon diğer gruplara göre daha yüksek bir üretkenliğe sebep olmuş ve 0.052 g/L/h olarak elde edilmiştir.

Biyobütanol üretkenliğindeki zamana bağlı değişiklikler şekil 4.8’de gösterilmektedir. Üretkenlik zaman bağı olarak değişmekle birlikte, yukarıda da bahsedildiği gibi özellikle 0.1 g/L MgSO₄.7H₂O varlığında ilk 24 saatte 0.193 g/L/h olacak şekilde yüksek bir üretkenlik değeri elde edilirken, fermantasyon boyunca üretkenlik hızı yavaşlayarak 48, 72 ve 96. saatlerde sırasıyla 0.096 g/L/h, 0.068 g/L/h ve 0.052 g/L/h olacak şekilde belirlenmiştir. Böylelikle ilk 24 saatten sonra biyobütanol konsantrasyonunda belirgin bir

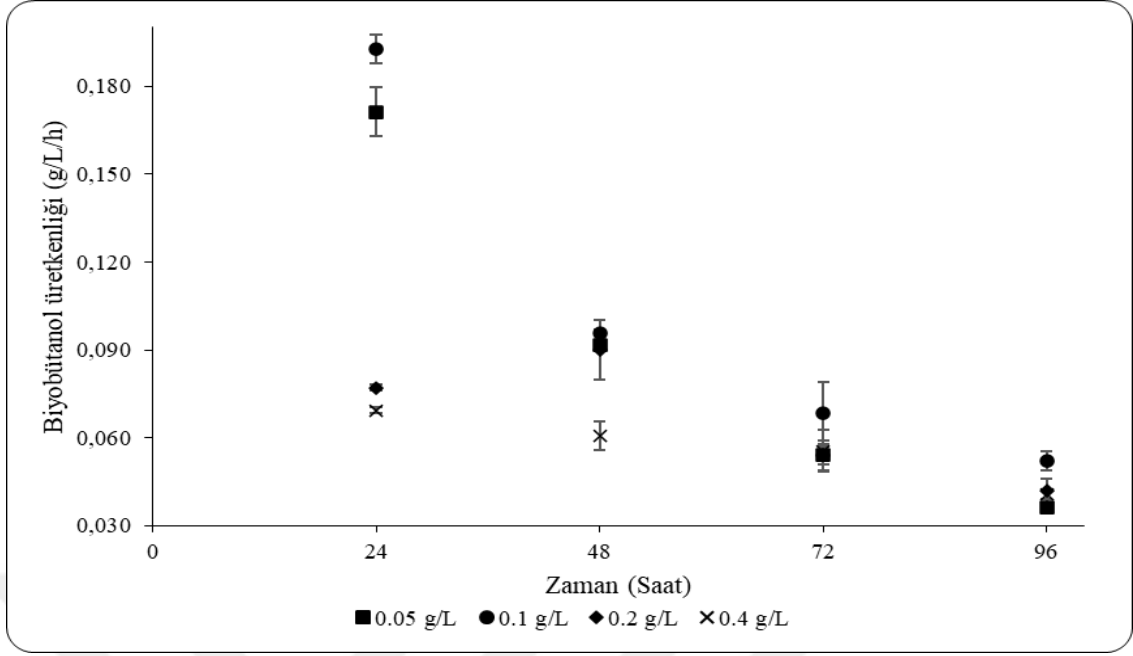
artış gözlenmemiştir (4.11 g/L'den 5.01 g/L'ye). Standart besiyeri konsantrasyonu olan 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ varlığında ise 24. saatten 48. saate doğru ilerlerken biyobütanol üretimi oldukça hızlanmış ve üretkenlik de bu durumda yükselmiştir. Ancak 48. saatten sonra şekilde de görüldüğü gibi sabit bir düşüş belirlenmiştir. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonu 0.4 g/L'e çıkarıldığında fermentasyon ortamındaki üretkenlik süreç boyunca sabit bir hızda düşmüştür.

Şeker üretkenlik oranlarına bakıldığında ise çizelge 4.3'dan da anlaşılabacağı gibi tüm konsantrasyonlarda belirgin bir değişim gözlenmemiştir.

Çizelge 4.3 Farklı $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonu içeren fermentasyon ortamlarında 96. saatte elde edilen kinetik parametre değerleri

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonu (g/L)	Başlangıç Şeker Konsantrasyonu (g/L)	Biyobütanol (g/L)	Biyobütanol Verimi (g/g)	Biyobütanol Üretkenliği (g/L/h)	Şeker Tüketim Oranı (%)
0.05	43.95 ±0.184	3.49 ±0.113	0.173 ±0.006	0.036 ±0.001	45.89 ±2.85
0.1	41.17 ±0.057	5.01 ±0.311	0.247 ±0.025	0.052 ±0.003	49.26 ±2.09
0.2	38.67 ±0.891	4.06 ±0.360	0.218 ±0.018	0.042 ±0.004	48.15 ±0.70
0.4	42.96 ±0.615	3.80 ±0.144	0.178 ±0.002	0.040 ±0.001	49.69 ±0.58

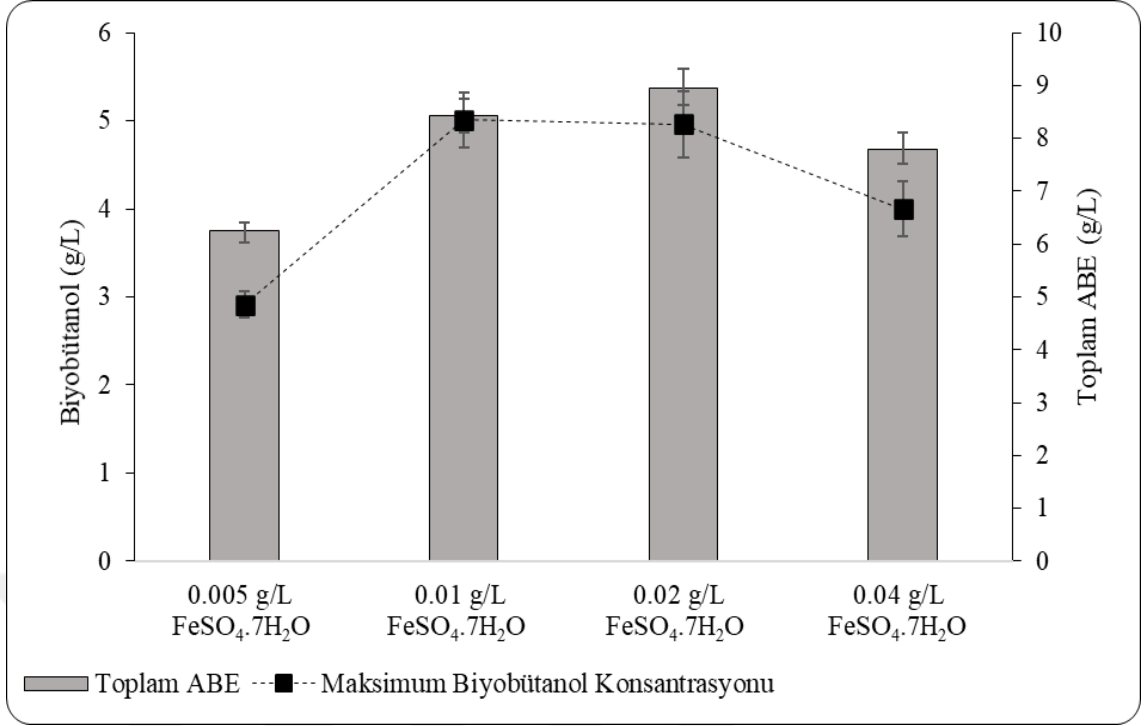
40 g/L EÇAT şekeri; 1 g/L maya özütü; P2 ortamı solüsyonları; 37 °C



Şekil 4.8 40 g/L EÇAT şekeri varlığında farklı $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında biyobütanol üretkenliğinin zamana bağlı değişimi

P2 ortamı solüsyonları; 37 °C

Bu tez çalışmasında, optimum $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ varlığında EÇAT ortamında farklı $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarının (0.005, 0.01, 0.02 ve 0.04 g/L) biyobütanol üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Fe^{2+} minerali biyobütanol üretiminin asidojenez fazında görevli olan enzimin yapısına katıldığı için, fermentasyon ortamında optimum oranda bulunması önemli bir parametredir. Buna göre şekil 4.9'da görüldüğü gibi en yüksek biyobütanol konsantrasyonu 0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren ortamda 5.01 g/L olarak belirlenmiştir. Şekil 4.9'daki sonuçlara göre, 0.02 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonu, 0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ile karşılaştırıldığında biyobütanol konsantrasyonunda (4.96 g/L) çok az bir düşüşe neden olmuştur. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonu 0.005 ve 0.04 g/L olduğunda ise biyobütanol üretiminin keskin bir şekilde düştüğü şekil 4.9'da görülmektedir.



Şekil 4.9 Farklı FeSO₄.7H₂O konsantrasyonları varlığında en yüksek toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonları

40 g/L EÇAT şekeri; 1 g/L maya özü; 0,1 g/L MgSO₄.7H₂O; P2 ortamı solüsyonları; 37 °C; tüm FeSO₄.7H₂O konsantrasyonları için fermantasyon süresi: 96. saat. 0.01 g/L FeSO₄.7H₂O; standart P2 ortamı konsantrasyonu

Fermantasyon sonunda tüm FeSO₄.7H₂O konsantrasyonlarında elde edilen kinetik parametre değerleri çizelge 4.4’de gösterilmektedir. Tüm konsantrasyonlarda en yüksek biyobütanol değerleri 96. saatte elde edilmiştir. Diğer deneylerde olduğu gibi fermantasyon ortamlarının başlangıç EÇAT şekeri konsantrasyonları yaklaşık 40 g/L olacak şekilde belirlenmiştir. Çizelge 4.4’e göre fermantasyon ortamlarında biyobütanol üretkenliği fermantasyon sonunda, FeSO₄.7H₂O konsantrasyonu 0.005 g/L’den 0.01 g/L’ye arttırıldığında 0.030 g/L/h’den 0.052 g/L/h’ye yükselmiştir. Ayrıca biyobütanol konsantrasyonlarının benzer olduğu 0.01 g/L ve 0.02 g/L konsantrasyonlarında, biyobütanol üretkenliği de benzerdir. Buna göre 0.02 g/L FeSO₄.7H₂O varlığında biyobütanol verimi 0.052 g/L/h olarak belirlenmiştir. FeSO₄.7H₂O konsantrasyonu 0.04 g/L arttığında ise, üretkenlik 0.042 g/L/h’ye düşmüştür. Şeker tüketim oranları ise 0.01-0.04 g/L FeSO₄.7H₂O’de benzerken, 0.005 g/L’de diğer gruplara göre daha düşüktür.

Çizelge 4.4 Farklı $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında elde edilen kinetik parametre değerleri

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonu (g/L)	Başlangıç Şeker Konsantrasyonu (g/L)	Biyobütanol (g/L)	Biyobütanol Verimi (g/g)	Biyobütanol Üretkenliği (g/L/h)	Şeker Tüketim Oranı (%)
0.005	37.52 ± 0.799	2.89 ± 0.148	0.210 ± 0.014	0.030 ± 0.002	36.67 ± 1.40
0.01	41.17 ± 0.057	5.01 ± 0.311	0.247 ± 0.025	0.052 ± 0.003	49.26 ± 2.09
0.02	41.63 ± 0.148	4.96 ± 0.374	0.231 ± 0.013	0.052 ± 0.004	51.57 ± 0.72
0.04	42.87 ± 0.615	4.00 ± 0.311	0.189 ± 0.016	0.042 ± 0.003	49.36 ± 0.44

40 g/L EÇAT şekeri; 1 g/L maya özütü; 0.1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; P2 ortamı solüsyonları; 37 °C; tüm $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonları için fermantasyon süresi: 96. saat. 0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; standart P2 ortamı konsantrasyonu

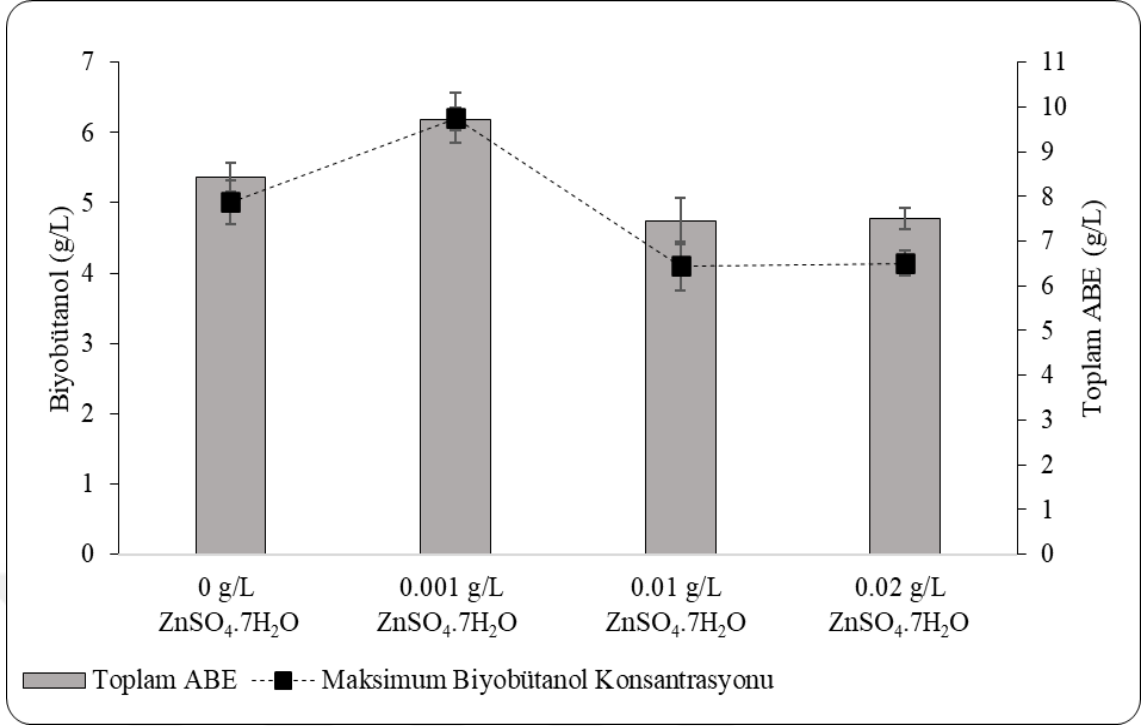
Fermantasyon sonunda biyobütanol verimi, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonu 0.005 g/L'den 0.01 g/L arttığında 0.210 g/g'dan 0.247 g/g'a yükselmiştir. Ancak mineral konsantrasyonu arttıkça verimde düşüş gözlenmiştir. Çizelge 4.5 tüm $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında belirli fermantasyon zamanlarındaki biyobütanol verimlerini göstermektedir. Biyobütanol verimi 0.005 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ varlığında 24. saatten sonra keskin bir şekilde düşmüştür. Ortamda 0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ varlığında ise, fermantasyon süresi boyunca biyobütanol verim etkinliği stabil bir şekilde korunmuş ve hafif bir düşüş gözlenmiştir. Ayrıca, 0.02 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kullanıldığında biyobütanol konsantrasyonu, 0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren ortamla çok benzer olmasına rağmen, biyobütanol verimi 0.01 g/L'ye göre daha belirgin bir düşüş göstermiştir. Benzer şekilde 0.04 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ varlığında 24. saatten sonra bir düşüş gözlenmiştir.

Çizelge 4.5 Farklı $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonlarında elde edilen biyobütanol verimi değerlerinin zamana bağlı değişimi

Zaman (Saat)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonu (g/L)			
	0.005	0.01	0.02	0.04
24	0.501 ± 0.053	0.295 ± 0.043	0.388 ± 0.104	0.304 ± 0.030
48	0.292 ± 0.053	0.263 ± 0.054	0.219 ± 0.003	0.237 ± 0.036
72	0.204 ± 0.063	0.253 ± 0.025	0.254 ± 0.015	0.219 ± 0.023
96	0.210 ± 0.014	0.247 ± 0.025	0.231 ± 0.013	0.189 ± 0.016

40 g/L EÇAT şekeri; 1 g/L maya özütü; 0.1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; P2 ortamı solüsyonları; 37 °C

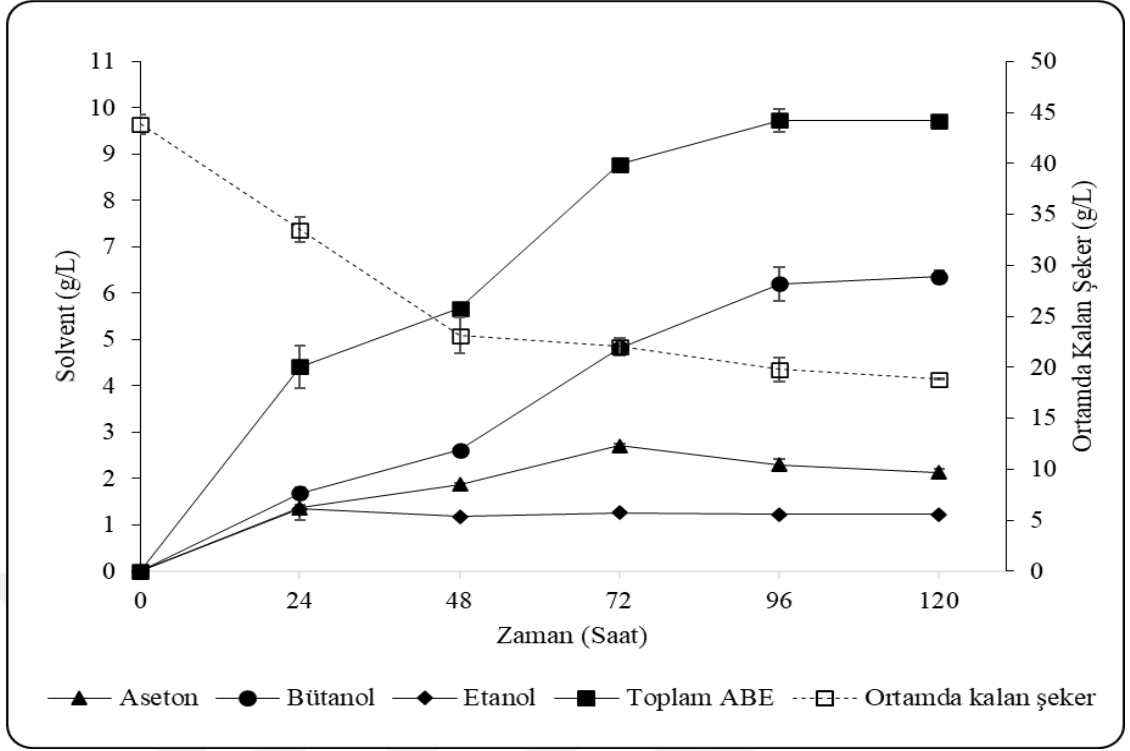
Zn minerali mikrobiyel hücre metabolizmasında bir çok birimde görev alan önemli bir besin maddesidir. Hücre içindeki ve dışındaki yapısal ve düzenleyici birimlerde bulunduğu konsantrasyon yine bu aktiviteleri etkileyebilmektedir. Mevcut çalışmada optimum $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'in pozitif etkisi şekil 4.10'te gösterilmektedir. *C. beijerinckii* DSMZ 6422 tarafından en yüksek toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonu 0.001 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ varlığında sırasıyla 9.73 g/L ve 6.21 g/L olarak üretilmiştir. Buna göre, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ilavesinin, modifiye edilmiş P2 ortamında toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonunu %24.42 ve %42.75 oranında iyileştirdiği görülmektedir. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonu 0.01 g/L ve 0.02 g/L'ye artırıldığında ise toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonu belirgin bir şekilde düşmüştür. Ayrıca bu konsantrasyonlar birbirleri ile karşılaştırıldığında neredeyse bir fark görülmemiştir. Bununla birlikte optimize edilmiş P2 ortamında 43.87 g/L olan başlangıç EÇAT şekeri konsantrasyonu, 96 saatlik fermantasyon sonunda 19.81 g/L'ye düşmüştür.



Şekil 4.10 Artan ZnSO₄.7H₂O konsantrasyonları varlığında en yüksek toplam ABE ve biyobütanol değerleri

40 g/L EÇAT şekeri; 1 g/L maya özütü; 0.1 g/L MgSO₄.7H₂O; 0.01 g/L FeSO₄.7H₂O; P2 ortamı solüsyonları; 37 °C; fermentasyon süresi: 0 ve 0.001 g/L için 96. saat, 0.01 ve 0.02 g/L için 72. saat. 0 g/L ZnSO₄.7H₂O; Standart P2 ortamı ZnSO₄.7H₂O içermez

Tez çalışmasında ZnSO₄.7H₂O konsantrasyonlarının etkisi 120 saatlik bir fermentasyon boyunca incelenmiştir. Fermentasyonun 96. saatinden sonra solvent ve şeker konsantrasyonunda değişim gözlenmemiştir. Şekil 4.11’de maksimum biyobütanol ve toplam ABE değerinin elde edildiği 0.001 g/L ZnSO₄.7H₂O içeren ortamda solvent ve şeker konsantrasyonun fermentasyon boyunca değişimi gösterilmektedir. Şekilde solvent, aseton, bütanol veya etanolü ifade etmektedir. Belirtilen ortamda başlangıç şeker konsantrasyonu 43.87 g/L iken, fermentasyon boyunca şeker kullanımı ilk 48 saatte hızlı bir şekilde gerçekleşirken, daha sonrasında kullanım hızı düşerek sabit bir şekilde 120. saat sonunda 18.81 g/L’ye ulaşmıştır. Bu süreçte, biyobütanol konsantrasyonu 96 saat boyunca artarak devam etmiş, ancak sonrasında sabitlenmıştır. Aynı şekilde toplam ABE, fermentasyon boyunca biyobütanol konsantrasyonun eğilimini göstermiştir. Etanol konsantrasyonu ilk 24 saatte artarken, daha sonrasında önemsiz bir düşüş gözlenmiştir. Aseton konsantrasyonunda ise, 72 saat boyunca bir artış belirlenirken, sonraki süreçte hafifçe azalmıştır.



Şekil 4.11 40 g/L EÇAT şekeri ve 0.001 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ varlığında fermantasyon ortamındaki solvent ve şeker konsantrasyonundaki değişim

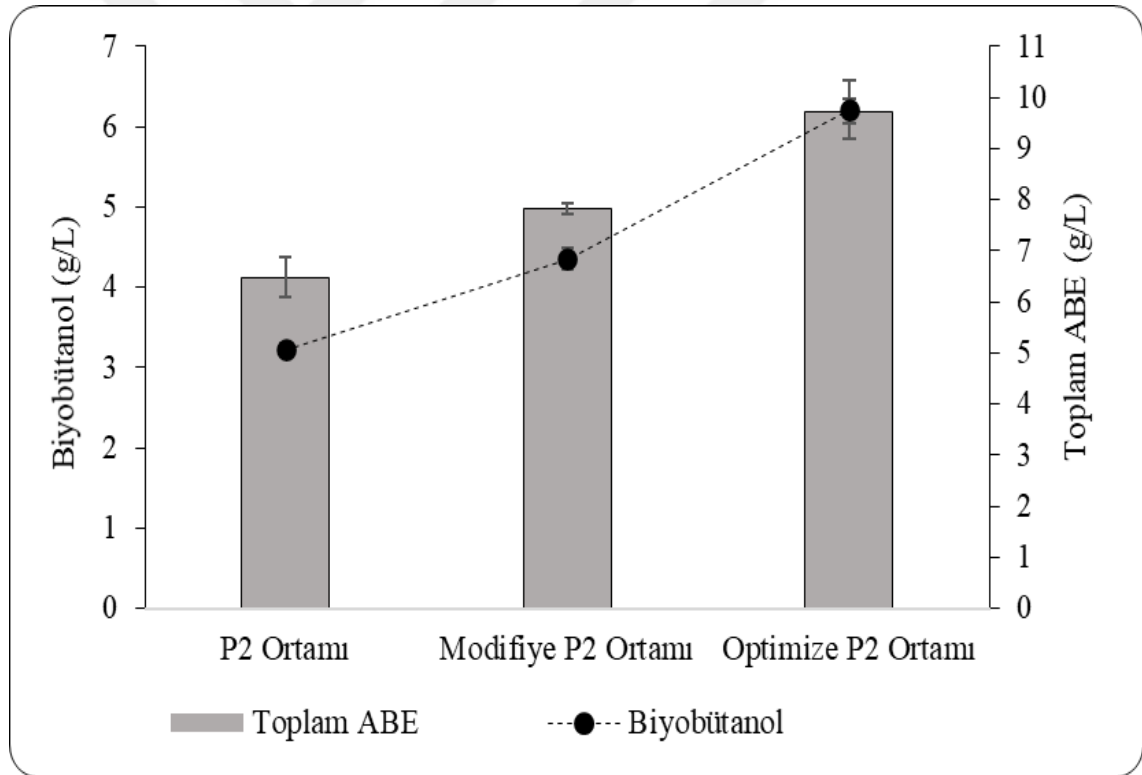
40 g/L EÇAT şekeri; 1 g/L maya özütü; 0.1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.01 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; P2 ortamı solüsyonları; 37 °C

Bu tez çalışmasında, EÇAT şekerinin ve farklı mineral tuzlarının fermantasyon ortamlarında kullanımı ile *C. beijerinckii* DSMZ 6422 tarafından biyobütanol üretiminde bir iyileştirme hedeflenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, bu yaklaşımın olumlu etkilerinin olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.12, fermantasyon ortamı bileşiminin toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonu üzerindeki etkisini açıkça göstermektedir. Şekil 4.12'ye göre, fermantasyon ortamında EÇAT kullanımı ve mineral tuzlarında yapılan modifikasyonlar ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ sınırlaması, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ve $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ takviyesi), *C. beijerinckii* DSMZ 6422 tarafından biyobütanol üretimini artırmıştır. Buna göre, en düşük biyobütanol konsantrasyonu standart P2 ortamı kullanıldığında 3.22 g/L olarak elde edilmiştir. Daha sonrasında, glukoz yerine 40 g/L EÇAT şekerinin kullanımı, biyobütanol miktarını 4.35 g/L olacak şekilde iyileştirmiştir. Bunun yanında, mineral tuzlarının konsantrasyonlarında gerçekleştirilen modifikasyonlar ile belirtilen biyobütanol

konsantrasyonu 6.21 g/L'ye artırılmıştır. Bu durum özellikle besiyeri ortamında $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kullanımının biyobütanol üretimini oldukça desteklediğini göstermektedir. Ayrıca yine şekil 4.12'deki veriler göz önüne alındığında, mineral tuzlarının biyobütanol üretiminde oldukça etkili oldukları görülmektedir. Şöyleki sadece 40 g/L EÇAT şekeri içeren ortamda 3.97 g/L olarak elde edilen yüksek biyobütanol konsantrasyonu, P2 ortamının diğer mineral tuzları ve tez çalışmasında araştırılan mineral tuzları varlığında 6.21 g/L'ye kadar artırılmıştır.

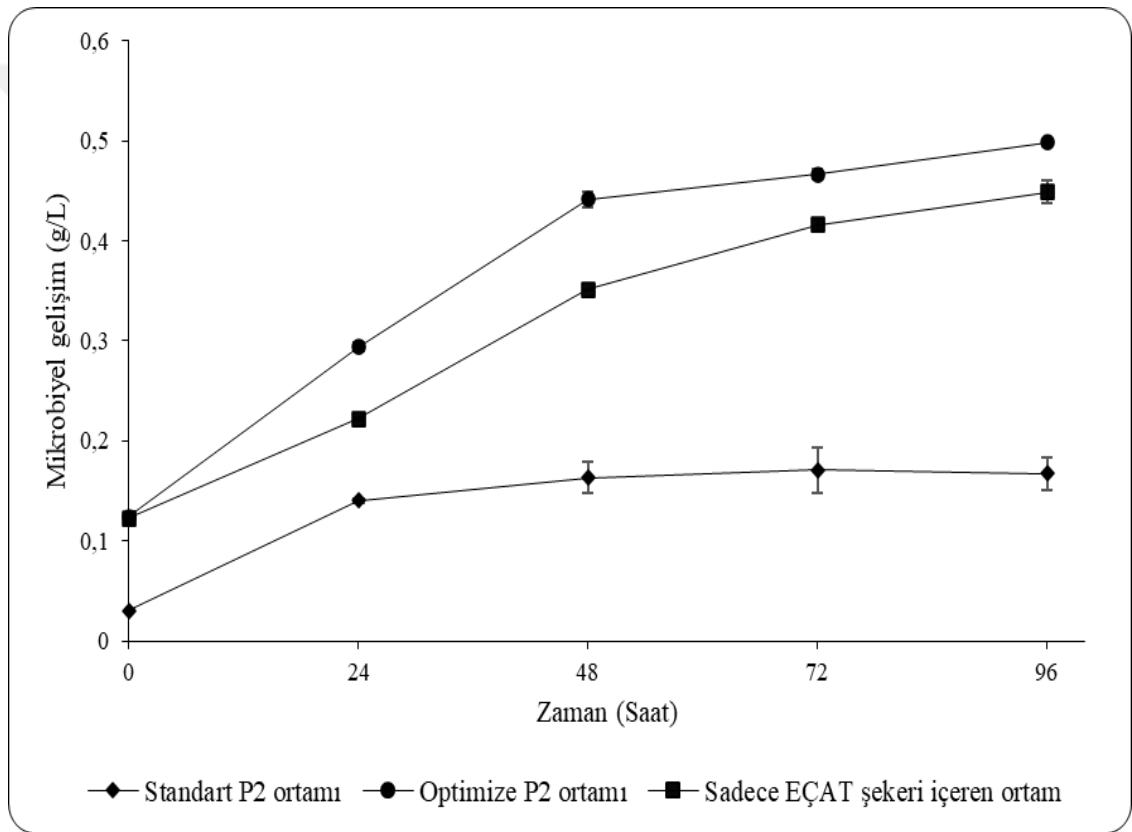
Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, standart P2 ortamı ile elde edilen 6.48 g/L toplam ABE konsantrasyonu, optimizasyon çalışmaları ile 9.73 g/L'ye ulaşmıştır. Buna göre, toplam ABE ve biyobütanol üretimi sırasıyla %50.15 ve %92.85 oranında iyileştirilmiştir.



Şekil 4.12 Tüm ortamlarda elde edilen en yüksek toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonları

P2 Ortamı; 60 g/L glukoz, 1 g/L maya özütü, P2 ortamı solüsyonları, Modifiye P2 Ortamı; 40 g/L EÇAT şekeri, 1 g/L maya özütü, P2 ortamı solüsyonları, Optimize Edilmiş P2 Ortamı; 40 g/L EÇAT şekeri, 1 g/L maya özütü, 0.1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, P2 ortamı solüsyonları

Ayrıca, standart P2 ortamı ve Optimize P2 ortamı mikrobiyel gelişim açısından incelendiğinde, şekil 4.13'te görüldüğü gibi büyük bir fark gözlenmiştir. 96 saat sonunda standart P2 ortamında mikrobiyel gelişim 0.167 g/L olarak belirlenirken, optimize P2 ortamında 0.498 g/L olarak elde edilmiştir. Buna göre, çay atığının kullanımı ve besiyeri optimizasyonu ile mikrobiyel gelişim 2.98 kat iyileştirilmiştir. Ayrıca, mineral ve vitamin eklenmeden sadece EÇAT şekeri varlığında ise 0.449 g/L mikrobiyel biyokütle elde edilmiştir. Bu sonuç, EÇAT'nın mikrobiyel büyümeyi ve fermantasyon aktivitesini önemli ölçüde artırdığını göstermektedir.



Şekil 4.13 Tüm ortamlarda zamana bağlı mikrobiyel gelişim

P2 Ortamı; 60 g/L glukoz, 1 g/L maya özütü, P2 ortamı solüsyonları, Sadece EÇAT şekeri içeren P2 Ortamı; 40 g/L EÇAT şekeri, Optimize Edilmiş P2 Ortamı; 40 g/L EÇAT şekeri, 1 g/L maya özütü, 0.1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, P2 ortamı solüsyonları

4.1.5 Fermantasyon ortamlarında elde edilen kinetik parametreler ve istatistiksel analiz

Tez çalışmasında, EÇAT şekeri ve mineral optimizasyonlarının biyobütanol verimi, üretkenliği ve şeker tüketim oranı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çizelge 4.6, farklı fermantasyon ortamlarından elde edilen kinetik parametrelerin sonuçlarını göstermektedir. Çizelge 4.6'ya göre farklı EÇAT şekeri konsantrasyonları ile 96 saatlik fermantasyon sonunda en yüksek biyobütanol verimi, üretkenliği ve şeker tüketim oranı yaklaşık 40 g/L EÇAT şekeri varlığında sırasıyla 0.218 g/g, 0.042 g/L/h ve %48.15 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, standart P2 ortamına kıyasla 40 g/L EÇAT şekeri varlığında biyobütanol verimi %100 oranında önemli ölçüde artarken, biyobütanol üretkenliği ve şeker tüketim oranı %27.27 ve %5.96 oranında iyileşmiştir.

Ek olarak, fermantasyon ortamının optimizasyonu, mevcut çalışmada *C. beijerinckii* DSMZ 6422'nin kinetik parametrelerini önemli ölçüde iyileştirmiştir. Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi, 96 saat sonunda sırasıyla biyobütanol verimi, biyobütanol üretkenliği ve şeker tüketim oranı sırasıyla 0.218'den 0.258 g/g'ye, 0.042'den 0.065 g/L/h'ye ve % 48.15'ten % 54.84'e yükselmiştir. Mevcut çalışmadaki tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, 96 saat sonunda biyobütanol verimi standart P2 besiyerine göre yaklaşık 2.4 kat iyileşmiştir. Ayrıca, biyobütanol üretkenliği, standart P2 ortamına kıyasla %96.96 oranında önemli ölçüde artmıştır.

Çizelge 4.6 Farklı fermantasyon ortamlarında 96. saat sonunda elde edilen kinetik parametreler

	P2 Ortamı ^a		Modifiye P2 Ortamı ^b		Optimize P2 Ortamı ^c
	72 s*	96 s	48 s*	96 s	96 s*
Başlangıç Şeker Konsantrasyonu (g/L)	63.99 ±1.301 ^d	63.99 ±1.301 ^d	38.67 ±0.891 ^e	38.67 ±0.891 ^e	43.87 ±0.948 ^f
Toplam ABE (g/L)	6.48 ±0.395 ^g	6.12 ±0.162 ^g	7.82 ±0.113 ^h	7.50 ±0.360 ^h	9.73 ±0.240 ⁱ
Biyobütanol (g/L)	3.22 ±0.078 ^j	3.17 ±0.163 ^k	4.35 ±0.134 ^l	4.06 ±0.360 ^m	6.21 ±0.361 ⁿ
Biyobütanol verimi (g/g)	0.121 ±0.006 ^o	0.109 ±0.012 ^p	0.255 ±0.023 ^r	0.218 ±0.018 ^s	0.258 ±0.013 ^r
Biyobütanol Üretkenliği (g/L/h)	0.045 ±0.001 ^{t,u}	0.033 ±0.002 ^t	0.090 ±0.010 ^v	0.042 ±0.004 ^{t,u}	0.065 ±0.004 ^{u,v}
Şeker Tüketim Oranı (%)	41.58 ±2.148 ^y	45.44 ±1.658 ^z	44.09 ±1.141 ^x	48.15 ±0.700 ^q	54.84 ±1.640 ^β

*En yüksek toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonlarının elde edildiği fermantasyon zamanları

^a 60 g/L glukoz, maya özütü ve P2 solüsyonları içeren ortam

^b 40 g/L EÇAT şekeri, maya özütü ve P2 solüsyonları içeren ortam

^c 40 g/L EÇAT şekeri, maya özütü, 0.1 g/L MgSO₄.7H₂O, 0.01 g/L FeSO₄.7H₂O, 0.001 g/L ZnSO₄.7H₂O ve P2 solüsyonları içeren ortam

Aynı satırdaki üst simgelerdeki farklı harfler, başlangıç şeker konsantrasyonları, biyobütanol, toplam ABE, biyobütanol verimi, biyobütanol üretkenliği ve şeker tüketim oranı bakımından önemli farklılıkları gösterir. İstatistiksel anlamlılık ($p \leq 0,01$)

Ayrıca fermantasyon ortamından elde edilen sonuçların istatistiksel önemi %99 güven aralığında one-way ANOVA tekniği ve Tukey Post Hoc Test kullanılarak belirlenmiştir. Tukey Post Hoc Testi, fermantasyon ortamı arasındaki çoklu karşılaştırmaları belirlemek için gerçekleştirilmiştir. ANOVA analiz modelinde Y bağımlı değişken olarak biyobütanol, faktör olarak ise fermantasyon ortamı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların biyobütanol üretimi üzerindeki önemini tahmin etmek için hesaplanan Kareler Toplamı ($\sum(x_i - \bar{x})^2$), serbestlik derecesi (df), Ortalama Kare (X^2), F ve p değeri çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Tek yönlü ANOVA sonuçlarına göre, $p(0,000) < 0,01$ ve $F(4,5)$

(60786.800 > tablo kritik değeri (5.20)) değerleri, farklı ortamların biyobütanol üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7 Farklı fermantasyon ortamlarında biobütanol konsantrasyonunun ANOVA analizi

$\Sigma (xi - \bar{x})^2$	df	X^2	F	p
12.157	4	3.039	60786.800	0.000

$\Sigma (xi - \bar{x})^2$; Kareler toplamı, df ; serbestlik derecesi, X^2 ; Ortalama kare

4.2 Üçüncü Nesil Ham Madde Olan *D. salina* Biyokütlesi ile Yapılan Çalışmalar

4.2.1 *D. salina*'nın yapısal ve kimyasal özellikleri

Mikroalgler, karbonhidratlar, lipidler, proteinler, vitaminler, mineraller ve karotenoidler açısından zengin bir besin içeriğine sahiptir. Bu nedenle tez çalışmasında biyobütanol üretimi için *D. salina*'nın bazı yapısal ve kimyasal özellikleri incelenmiş ve elde edilen veriler çizelge 4.8'de gösterilmiştir. Verilere göre mikroalg biyokütlesinde glukoz, arabinoz ve diğer şekerlerin (galaktoz, mannoz ve ksiloz dahil) içerikleri sırasıyla %77.21, %5.98 ve %16.81 olarak belirlenmiştir. Ayrıca *D. salina*'nın protein içeriği %64.2 olarak gözlenmiştir. Ayrıca HMF, formik asit ve asetik asit sırasıyla 0.412 g/L, 0.170 g/L ve 0.670 g/L olarak belirlenmiştir. Buna göre *D. salina*, yüksek protein içeriği, düşük furfural ve organik asit bileşikleri ile mikrobiyal büyümeyi destekleyen uygun bir materyaldir.

Çizelge 4.8 *D. salina*'nın yapısal ve kimyasal özellikleri

Özellik	İçerik
Glukoz (%)	77.21
Arabinoz (%)	5.98
Diğer şekerler (Galaktoz, Mannoz ve Ksiloz) (%)	16.81
Asetik asit (g/L)	0.670
Formik asit (g/L)	0.170
HMF (g/L)	0.412
Protein (%)	64.2

Ön işlenmiş mikroalgal biyokütle, %1 H₂SO₄, 121 °C, 15 dakika

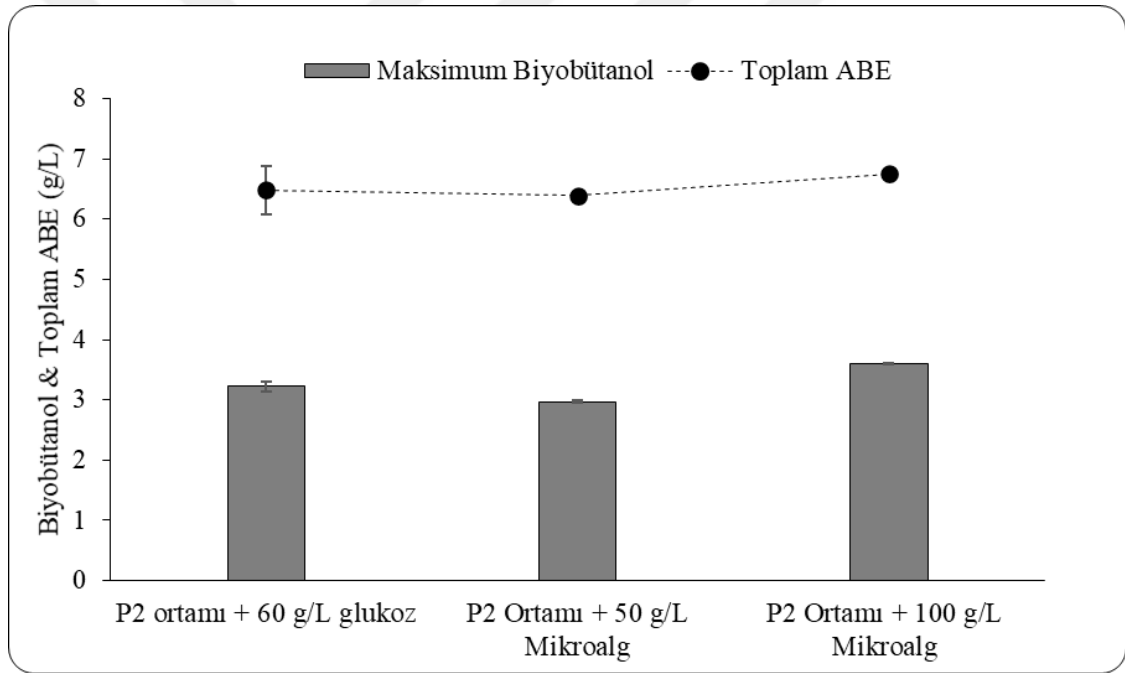
4.2.2 Fotoototrofik mikroalgal biyokütlenin biyobütanol üretimindeki etkisi

Tez çalışmada, standart Johnson ortamında yetiştirilen ve hasat edilen yaş *D. salina* biyokütlesi kullanılmıştır. Ön işleme tabi tutulmamış 50 g/L ve 100 g/L mikroalgal biyokütle eklenen ve glukoz içermeyen P2 ortamında verimli biyobütanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.14'te görüldüğü gibi, *C. beijerinckii* DSMZ 6422 96 saat sonunda 50 g/L ve 100 g/L mikroalgal biyokütle varlığında sırasıyla 2.97±0.020 g/L ve 3.60±0.020 g/L biyobütanol üretmiş ve 60 g/L glukoz içeren standart P2 ortamında ise 72 saat sonunda maksimum biyobütanol konsantrasyonu 3.22±0.078 g/L olarak saptanmıştır. Ayrıca P2 ortamında fermantasyonun 96. saatine gelindiğinde ise bu değer hafifçe düşmüş ve 3.17±0.163 g/L'ye gerilemiştir.

Toplam ABE konsantrasyonları değerlendirildiğinde, standart P2 ortamında 6.48±0.395 g/L elde edilirken, karbon kaynağı ve destekleyici madde olarak sadece 50 g/L mikroalgal biyokütle kullanıldığında ise bu değer 6.39±0.030 g/L olmuştur. Bunun yanında biyokütle

konsantrasyonu 100 g/L'ye artırıldığında, toplam ABE konsantrasyonu 6.75 ± 0.030 g/L'ye yükselmiştir.

Bu verilere göre fermantasyon ortamları karşılaştırıldığında, en yüksek biyobütanol ve toplam ABE konsantrasyonları, sırasıyla 3.60 ± 0.020 g/L ve 6.75 ± 0.030 g/L ön işlem görmemiş 100 g/L mikroalg biyokütlesi içeren ortamda elde edilmiştir. Deneyin bu adımında, glukoz yerine mikroalg biyokütlesi eklendiğinde hemen hemen aynı biyobütanol konsantrasyonlarının gözlemlendiği açıkça gösterilmiştir. Bu nedenle, bundan sonraki deneylerde, daha yüksek miktarda mikroalg biyokütlesi elde etmek için mikroalg yetiştirme koşullarının iyileştirilmesi hedeflenmiştir.



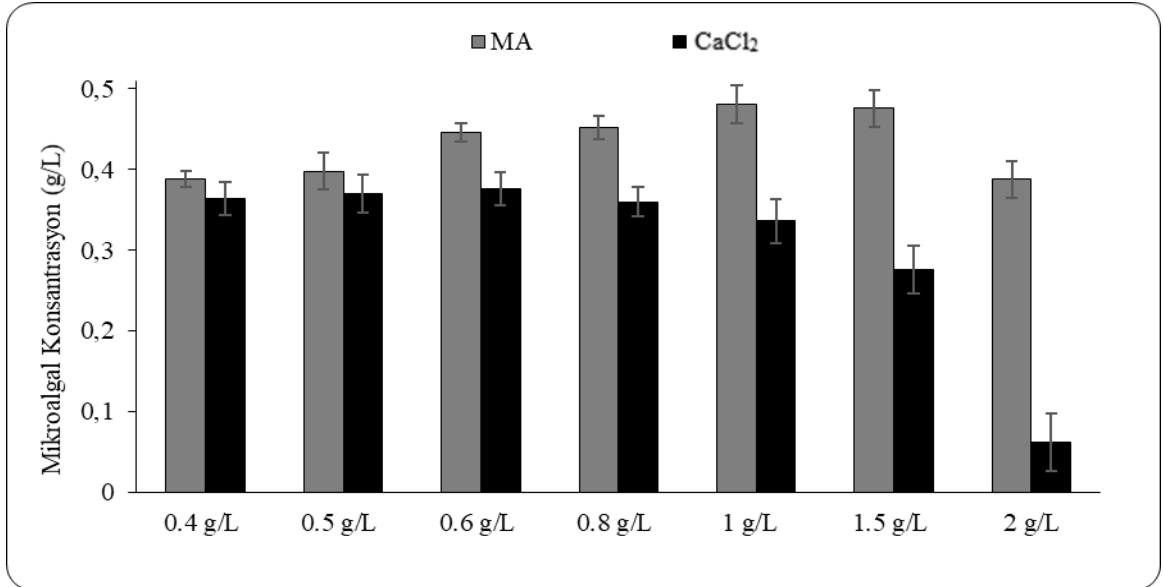
Şekil 4.14 Farklı fermantasyon ortamlarının biyobütanol üretimine etkisi

P2 solüsyonları; 37°C; pH 6.8; fermantasyon süresi: P2 ortamı için 72. saat ve P2 ortamı + 50 g/L mikroalg ve P2 ortamı + 100 g/L mikroalg için 96. saat

4.2.3 Farklı kültivasyon koşullarının mikroalg gelişimine etkisi

Tez çalışmada, farklı MA ve CaCl_2 konsantrasyonlarının varlığında, mikсотrofik ve fotoototrofik yetiştirme koşullarında mikroalgal büyüme incelenmiştir. Öncelikle MA'nın mikсотrofik koşullarda mikroalg gelişimini artırıcı etkisi belirlenmiştir. MA yüksek

düzeyde kalsiyum içerdiğinden, kalsiyumun etkisini aydınlatmak için Johnson ortamındaki CaCl_2 , MA ile aynı konsantrasyonlarla karşılaştırılmıştır. Şekil 4.15'deki veriler, farklı kültürasyon koşullarında *D. salina* mikroalginin gelişimini göstermektedir. Sonuçlara göre, incelenen tüm konsantrasyonlarda mikсотotrofik kültürasyonun, mikroalgal biyokütle üretimi için fotoototrofik gelişmeye göre açıkça daha elverişli olduğu görülmektedir. Şekil 4.15'de görüldüğü gibi, MA konsantrasyonu 0.4'ten 1 g/L'ye çıkarıldığında mikroalgal gelişme önemli ölçüde artmıştır. En yüksek mikroalgal gelişim, 1 g/L MA varlığında 0.481 ± 0.023 g/L olarak belirlenmiştir. Ayrıca 1.5 g/L MA, mikroalgal büyümede 0.476 ± 0.023 g/L'ye kadar hafif bir düşüşe neden olmasına rağmen, hücreler 2 g/L MA'yı tolere edememiştir. Öte yandan, CaCl_2 içeren gruplarda, 0.6 g/L'den daha yüksek CaCl_2 konsantrasyonlarının varlığında biyokütle konsantrasyonu keskin bir şekilde azalmıştır. Şekil 4.15'deki verilere göre mikсотotrofik kültürasyonda en yüksek mikroalg gelişim fotoototrofik kültürasyona göre yaklaşık 1.28 kat artmış ve 0.376 ± 0.020 g/L'den 0.481 ± 0.023 g/L'ye yükselmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, kalsiyumun mikrobiyal büyüme üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı, ancak MA'nın biyokütle miktarını önemli ölçüde arttırabileceği görülmüştür. Böylece MA'nın *D. salina* biyokütlesi üretimi için umut verici bir kaynak olarak kullanılabileceği görülmektedir.



Şekil 4.15 Johnson ortamında artan CaCl_2 ve MA konsantrasyonları varlığında fotoototrofik ve mikсотotrofik kültürasyon koşullarının *D. salina*'nın gelişimi üzerindeki etkisi

Johnson ortamı; 2400 lx; 25°C; pH 6.8; kültürasyon süresi, 15 gün

4.2.4 Miksotrofik mikroalgal biyokütlenin biyobütanol üretimine etkisi

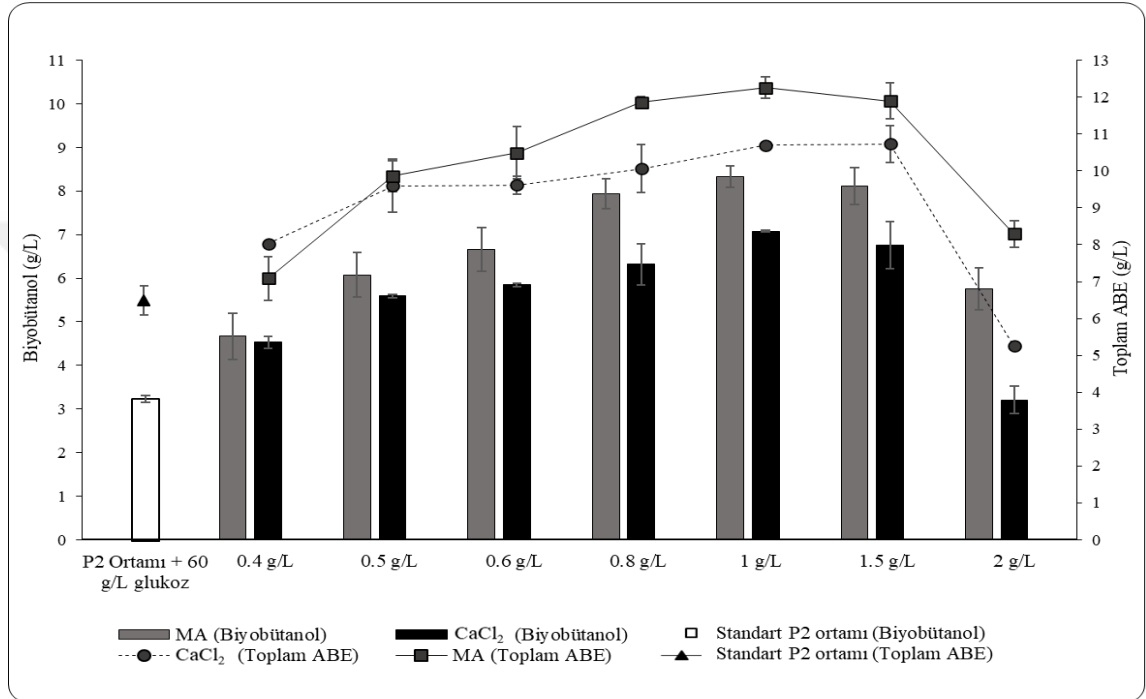
Mevcut çalışmada, biyobütanol üretimi için farklı MA ve CaCl_2 konsantrasyonlarında yetiştirilen 50 g/L *D. salina* biyokütlesi kullanılmıştır. Tüm fermantasyon işlemlerinde biyobütanol konsantrasyonunu artırmak için 60 g/L glukoz içeren P2 ortamı *D. salina* biyokütlesinin eklenmesi ile desteklenmiştir. Burada, kontrol grubu olarak MA ile aynı konsantrasyonlarda CaCl_2 ile yetiştirilen 50 g/L *D. salina* biyokütlesi kullanılmıştır.

Şekil 4.16, miksotrofik olarak yetiştirilen mikroalg biyokütlesinin varlığında daha yüksek biyobütanol konsantrasyonlarının elde edildiğini göstermektedir. Buna göre, mevcut çalışmada 0.4 g/L'den 1 g/L'ye artan MA konsantrasyonlarında yetiştirilen biyokütle kullanıldığında biyobütanol konsantrasyonu sırasıyla 4.67 ± 0.530 g/L'den 8.33 ± 0.350 g/L'ye yükselmiştir. Bu önemli artış, miksotrofik *D. salina*'nın mikrobiyal büyümeyi ve biyobütanol üretimini destekleyen maddeler içermesinden kaynaklanıyor olabilir. Çünkü mikrobiyal hücrelerin bileşimi ve yüzey özellikleri büyüme koşulları ile ilişkili olabilmektedir (Joo vd. 2021, Dostalek vd. 2004, Liyanaarachchi vd. 2021). Ayrıca mikroalgal hücrelerin çeşitli büyüme koşullarında makro (karbonhidratlar, proteinler, lipitler vb.) ve mikro (fosfor vb.) maddeler gibi içeriklerinin etkinliğini değiştirdiği de vurgulanmaktadır.

Artışın olduğu aralık incelendiğinde, hem MA hem CaCl_2 varlığında yetiştirilen mikroalgal biyokütlerde konsantrasyon arttıkça genellikle sabit bir artış oranı ile biyobütanol ve toplam ABE konsantrasyonun yükseldiği görülmektedir. Ancak MA ve CaCl_2 konsantrasyonu 2 g/L olduğunda, biyobütanol üretiminde keskin bir düşüş olduğu gözlenmiştir.

Yukarıda verilen sonuçlarla birlikte şekil 4.16, standart P2 ortamının diğer fermantasyon ortamları ile bir karşılaştırmasını da göstermektedir. Buna göre, standart P2 ortamı ile elde edilen biyobütanol konsantrasyonu (3.22 g/L), tüm MA konsantrasyonlarında yetiştirilen mikroalgal biyokütlerle desteklenen fermantasyon ortamlarına göre oldukça düşüktür. CaCl_2 varlığında yetiştirilen biyokütlerle desteklenen fermantasyon

ortamlarında ise sadece 2 g/L CaCl_2 'de yetişen biyokütle kullanıldığında, standart P2 ortamı ile benzer bir biyobütanol konsantrasyonu (3.21 g/L) elde edilmiştir. Ayrıca, Şekil 4.16, 1 g/L MA ile yetiştirilen mikroalgal biyokütle içeren P2 ortamındaki biyobütanol konsantrasyonunun, standart P2 ortamına göre 2.58 kat arttığını göstermektedir. Bu nedenle, sonraki kültürasyon deneyleri için 1 g/L MA seçilmiştir.



Şekil 4.16 Fermantasyon ortamına farklı MA ve CaCl_2 konsantrasyonlarında (0.4 – 2 g/L) yetiştirilen mikroalg biyokütle eklenmesinin biyobütanol ve toplam ABE üretimi üzerindeki etkisi

P2 ortam çözeltileri, 60 g/L glukoz; 37°C; pH 6.8; fermantasyon süresi: standart P2 ortamı için 72. saat ve tüm MA ve CaCl_2 konsantrasyonlarını içeren ortamlar için 96. saat. Mikroalgal biyokütle ile katkılanmış fermantasyon ortamları; P2 solüsyonları + 60 g/L glukoz + 50 g/L mikroalgal biyokütle

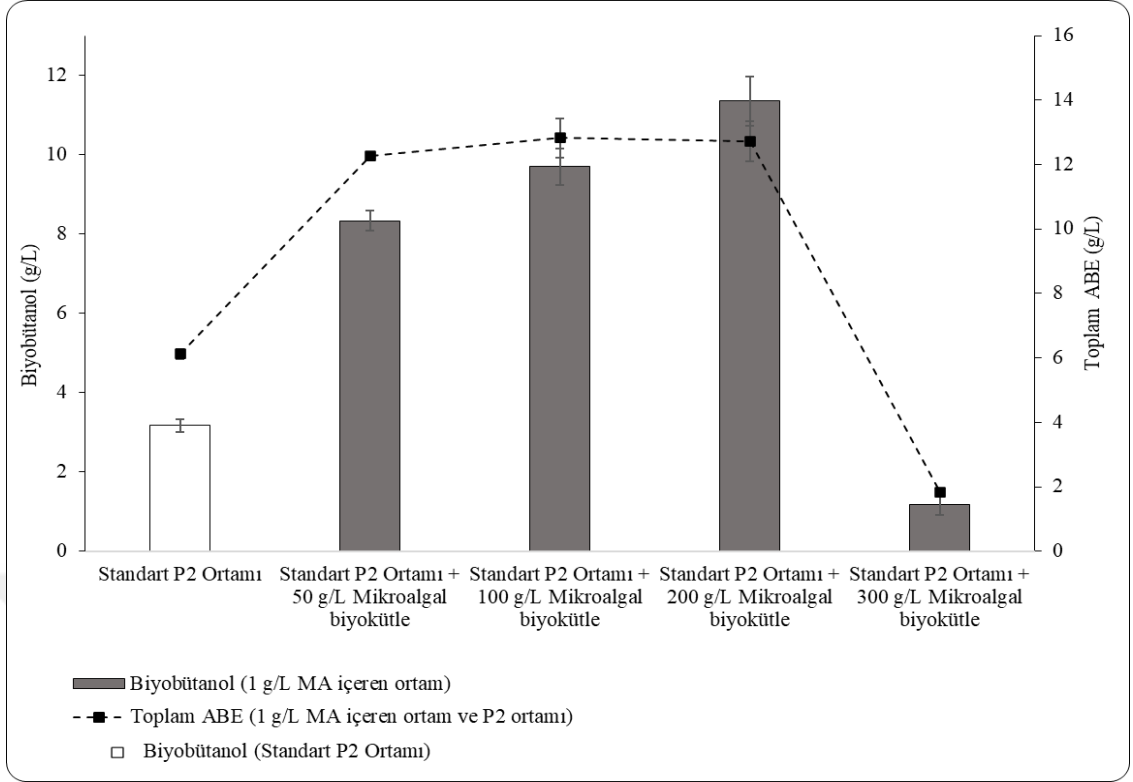
4.2.5 Miksotrofik mikroalgal biyokütle konsantrasyonunun ve fermantasyon süresinin biyobütanol üretimine etkisi

Tez çalışmasının bu bölümünde, 1 g/L MA'da yetiştirilen mikroalg biyokütlesinin artan konsantrasyonlarının (100, 200, 300 g/L) biyobütanol üretimi ve toplam ABE üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bunun için hazırlanan fermantasyon ortamlarında bir önceki bölümde olduğu gibi, fermantasyon ortamı olarak 60 g/L glukoz ve solüsyon içeren P2

ortamlarına mikroalgal biyoküteller destekleyici ham madde olarak kullanılmış ve ortama eklenmiştir.

Şekil 4.17’da görüldüğü gibi tüm mikroalgal biyokütle konsantrasyonlarında biyobütanol üretimi değişiklik göstermektedir. En yüksek biyobütanol konsantrasyonu 200 g/L mikroalgal biyokütle ilavesi ile 96. fermantasyon süresinde 11.35 ± 0.617 g/L olarak belirlenmiştir. Mikroalg konsantrasyonu 50 g/L’den 200 g/L’ye arttıkça, biyobütanol konsantrasyonları belirli bir oranda artmıştır. Şöyleki, 50 g/L mikroalgal biyokütle ile elde edilen biyobütanol miktarı 8.33 ± 0.350 g/L, 100 g/L mikroalgal biyokütle ile 9.70 ± 0.461 g/L ve 200 g/L biyokütle ile 11.35 ± 0.617 g/L olarak elde edilmiştir. Ayrıca, biyokütle konsantrasyonu 300 g/L’ye artırıldığında biyobütanol konsantrasyonunda keskin bir düşüş gözlenmiştir. Bu azalma, yüksek konsantrasyonlarda alg biyokütlesi kullanımı sonucunda salınan proteinlerden türetilen inhibe edici bileşikler nedeniyle biyobütanol üretiminin engellenmesi ile açıklanabilir (Wang vd. 2016).

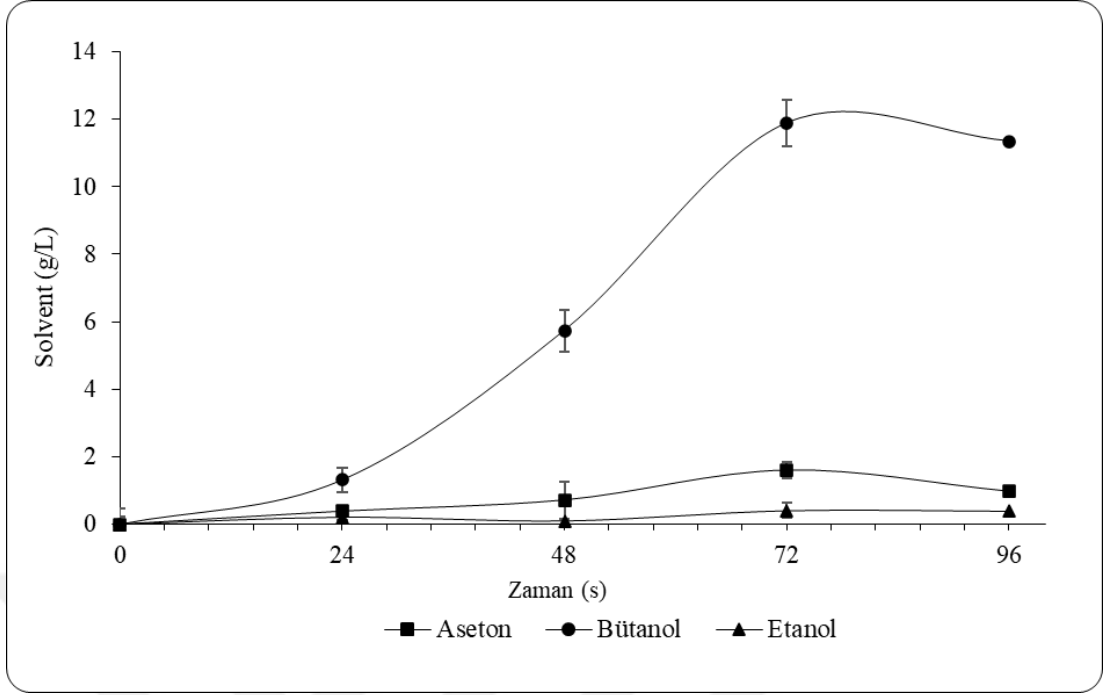
Bununla birlikte toplam ABE konsantrasyonları incelendiğinde, 50, 100 ve 200 g/L mikroalgal biyokütle varlığında bütanol haricinde aseton ve etanol büyük oranda değişmemiş ve bu nedenle belirtilen biyokütle konsantrasyonlarında toplam ABE benzer değerlere sahip olarak belirlenmiştir. Ancak yine biyokütle konsantrasyonu 300 g/L olduğunda, biyobütanol konsantrasyonunda olduğu gibi, toplam ABE değeri belirgin derecede azalmıştır.



Şekil 4.17 1 g/L MA ile yetiştirilen mikroalg biyokütlesinin artan konsantrasyonlarının biyobütanol ve toplam ABE üretimi üzerindeki etkisi

P2 ortamı solüsyonları; 60 g/L glukoz; 37°C; pH 6.8; fermentasyon süresi: standart P2 ortamı için 72. saat, tüm mikroalgal biyokütle konsantrasyonları için 96 saat. Standart P2 Ortamı; 60 g/L glukoz + P2 solüsyonları

Ek olarak, şekil 4.18'deki veriler, 200 g/L mikroalgal biyokütle varlığında *C. beijerinckii* DSMZ 6422 tarafından biyobütanol üretimi üzerinde zamanın etkisini göstermektedir. Buna göre, biyobütanol üretimi 48 saat sonra önemli ölçüde artmıştır. Aseton ve etanol konsantrasyonları 72. saatte maksimum seviyeye ulaşmış, biyobütanol ve toplam ABE konsantrasyonları sırasıyla 11.88 ± 0.617 g/L ve 13.89 ± 0.615 g/L olarak belirlenmiştir. Bu kapsamda ABE üretimi için optimum fermentasyon süresi 72 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.18 Optimize edilmiş koşullarda *C. beijerinckii* DSMZ 6422 tarafından biyobütanol üretimi üzerinde zamanın etkisi

Standart P2 ortamı + 200 g/L mikroalg biyokütlesi; 37°C; pH 6.8

Tüm veriler değerlendirildiğinde, mikroalg katkılı P2 ortamında *C. beijerinckii* DSMZ 6422'nin fermantasyon performansı, standart P2 ortamına kıyasla maksimum biyobütanol ve toplam ABE açısından sırasıyla 3.69 ve 2.14 kat iyileştirilmiştir. Bu iyileştirilmiş değerler, standart P2 ortamına ek olarak mikroalg biyokütlesinin eklenmesinin biyobütanol üretimi üzerinde önemli bir pozitif etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

4.2.6 Fermantasyon ortamlarında elde edilen kinetik parametreler

Bu çalışmada optimizasyon çalışmalarından sonra, standart P2 ortamı ve mikroalg katkılı P2 ortamı için biyobütanol verimi, üretkenliği ve şeker tüketim oranı gibi kinetik parametreler incelenmiştir.

Çizelge 4.9'daki veriler, P2 ortamına mikroalg biyokütle eklenmesinin tüm kinetik parametre değerlerini iyileştirdiğini göstermektedir. Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi mikroalg katkılı P2 ortamında 72 saat sonunda biyobütanol verimi, üretkenliği ve şeker

tüketim oranı sırasıyla 0.121 ± 0.006 'den 0.331 ± 0.022 g/g'ye, 0.045 ± 0.001 g/L/h'ten 0.165 ± 0.015 g/L/h'ye ve 41.58 ± 2.148 'den 48.13 ± 2.228 'e yükselmiştir. Buna göre, standart P2 ortamına kıyasla mikroalg katkılı P2 ortamında biyobütanol üretkenliği, verimi ve şeker tüketim oranı sırasıyla 3.66, 2.73 ve 1.16 kat iyileşmiştir.

Toplam ABE konsantrasyonu standart P2 ortamı ile karşılaştırıldığında, bu ortama 200 g/L *D. salina* biyokütlesi eklendiğinde 6.48 g/L'den 13.89 g/L'ye yükselmiştir. Benzer bir artış biyobütanol konsantrasyonunda gözlenmiş ve 3.22 g/L'den 11.88 g/L'ye ulaşmıştır. Bu bağlamda, *D. salina* biyokütlesi ile takviye edilen P2 besiyerinin, biyobütanolün konsantrasyonunu, üretkenliğini ve verimini önemli ölçüde artıracak olan gelişme ortamı için alternatif bir yaklaşım olduğu açıkça görülmektedir.

Çizelge 4.9 72 saatlik fermentasyon sonunda elde edilen kinetik parametre değerleri

	P2 Ortamı ^a	Mikroalg katkılı P2 Ortamı ^b
Başlangıç Şeker Konsantrasyonu (g/L)	63.99 $\pm 1.301^a$	74.56 $\pm 4.360^b$
Toplam ABE (g/L)	6.48 $\pm 0.395^c$	13.89 $\pm 0.615^d$
Biyobütanol (g/L)	3.22 $\pm 0.078^e$	11.88 $\pm 0.617^f$
Kinetik parametreler		
Biyobütanol verimi (g/g)	0.121 $\pm 0.006^g$	0.331 $\pm 0.022^h$
Biyobütanol Üretkenliği (g/L/h)	0.045 $\pm 0.001^i$	0.165 $\pm 0.015^j$
Şeker Tüketim Oranı (%)	41.58 $\pm 2.148^k$	48.13 $\pm 2.228^l$

P2 ortamı solüsyonları; 37°C, pH 6.8

Aynı satırdaki üst simgelerdeki farklı harfler, farklı başlangıç şeker konsantrasyonları, biyobütanol, toplam ABE, biyobütanol verimi, biyobütanol üretkenliği ve şeker tüketim oranı bakımından önemli farklılıkları gösterir. İstatistiksel anlamlılık ($p \leq 0.05$)

^a 60 g/L glukoz, 1 g/L maya özütü ve P2 solüsyonları içeren ortam

^b 60 g/L glukoz, 1 g/L maya özütü, 200 g/L mikroalgal biyokütle ve P2 solüsyonları içeren ortam

5. TARTIŞMA

5.1 İkinci Nesil Ham Madde Olan Endüstriyel Çay Atığı ile Yapılan Çalışmalar

5.1.1 Endüstriyel çay atığının fiziksel, yapısal ve kimyasal içeriği

Clostridium türleri doğal biyobütanol üreticileri olarak bilinmektedir. Tarihte ABE fermantasyonunun keşfinden sonra, bu fermantasyon metabolizmasına sahip *Clostridium* türlerinin keşfi ve izolasyonu ile biyobütanolün farklı alanlarda kullanımı başlamıştır. Bu nedenle mikroorganizma ve aseton, bütanol ve etanol üretimi için tarih boyunca patates nişastası, buğday gibi farklı karbon kaynaklarının kullanımı gündemde olmuştur. Bununla birlikte literatürde, mikroorganizmaların üretimleri için sentetik besiyerlerinin kullanımı da yer almıştır. Ancak bu besiyerleri içerisinde kullanılan maddelerin oldukça maliyetli olması, ABE fermantasyonu için çeşitli karbon kaynaklarının kullanımını mümkün kılmıştır. Öyleki ABE fermantasyonunun %60'nı oluşturduğu için ham madde fiyatı önemli bir yer tutmaktadır (Bankar vd. 2013). Bu nedenle uygun maliyetli karbon kaynakları çoğunlukla atık lignoselülozik ham maddelerden oluşmaktadır.

Lignoselülozik ham maddeler içeriğindeki zengin besin çeşitlerini barındıralarından dolayı literatürde biyobütanol üretiminde sıklıkla kullanılmakta ve oldukça etkili sonuçlar elde edilmektedir. Örneğin, Zhang ve Jia (2018) yaptıkları çalışmada mısır işleme atığından elde ettikleri mısır koçanı hidrolizati ve mısır likörünün biyobütanol üretimindeki etkisini incelemişlerdir. Deneyler sonucunda araştırmacılar, mısır likörünün zengin eser elementler, azotlu bileşenler ve amino asitler içerdiğini vurgulayarak ABE veriminin ve üretkenliğinin arttığını belirtmişlerdir.

Bu bilgiler ışığında yapılan tez çalışmasında ise literatürde ilk kez biyobütanol üretiminde kullanılacak çay atığının içeriğine bakıldığında yüksek oranda selüloz, hemiselüloz ve lignin yapısına sahip olduğu görülmektedir. Şöyleki, Germec vd. (2016) selüloz, hemiselüloz ve lignin içeriğini sırasıyla %13.60, %32.16 ve %33.38 olarak belirlerken, Çağlar ve Demirbaş (2001) %28.8 selüloz, %18.9 hemiselüloz ve %37.8 lignin içeriği

belirlemişlerdir. Bu anlamda, çay atığı biyobütanol üretiminde sürdürülebilirliği artırmak için besleyici ve uygun maliyetli bir karbon kaynağı olarak değerlendirilebilmektedir. Buna göre, tez çalışmasında kullanılan EÇAT'ın selüloz ve hemiselüloz içeriğine dair elde edilen sonuçlar yukarıda belirtilen literatür çalışmalarıyla benzerdir. Aynı şekilde mevcut tez çalışmasında kullanılan EÇAT'ın nem içeriği (%7.8), Yagmur vd. (2008)'nin yaptıkları çalışma sonucu elde ettikleri çay atığı nem içeriği değeriyle (%5.1) benzerdir.

Ayrıca lignoselülozik yapınının temelini oluşturan selüloz, hemiselüloz ve lignin yapıların yanında çay atıklarında %4-8 yağ, %16 protein, %2-4 amino asit ve %5 mineral olduğu da görülmektedir (Sharma vd. 2008). Buna göre, mevcut çalışmada EÇAT'da mikrobiyel metabolizmayı destekleyici protein içeriği araştırılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen protein içeriği, literatürdeki çalışmalarla benzerdir. Örneğin, Kaya vd. (2018) çay atıklarında 174 g/kg protein tespit ederken, Zuorro ve Lavecchia (2010) %22.6 (w/w) protein tespit etmiştir.

Literatürde çay atığı hidrolizatının fermente olabilen şekerler olarak çoğunlukla glukoz, ksiloz, fruktoz, mannoz ve arabinoz gibi şekerler içerdiği belirtilmektedir (Qi vd. 2020). Germec ve Turhan (2018) çay atığı hidrolizatındaki glukoz, ksiloz-galaktoz-mannoz ve arabinoz konsantrasyonlarını sırasıyla 2.16 ± 0.03 g/L, 4.53 ± 0.09 g/L ve 2.71 ± 0.05 g/L olarak belirlemişlerdir. Ayrıca, tez çalışmasında literatüre benzer şekilde, seyreltik asit hidrolizinden sonra EÇAT hidrolizatında çoğunlukla glukoz, arabinoz ve diğer şekerler sırasıyla 3.60 g/L, 2.45 g/L ve 3.70 g/L olarak bulunmuştur. Ancak EÇAT fermentatif şekerler açısından zengin olmasına rağmen literatürde EÇAT 'ın biyobütanol üretimi için ham madde olarak kullanımına ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, elde edilen sonuçlar, EÇAT'nın biyobütanol üretimi için umut vaadeden potansiyelde olduğunu göstermektedir.

Tez çalışmasının bu bölümünde ayrıca mikrobiyel gelişimi inhibe edebilen bazı bileşiklerin varlığı ve konsantrasyonu araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, literatürdeki değerlerden oldukça düşüktür. Örneğin, Germec ve Turhan (2018) detoksifiye edilmemiş çay işleme atığında, 2.27 ± 0.01 g/L asetik asit ve 0.80 ± 0.01 g/L HMF gözlemlemiş ancak

formik asit belirlememiştir. Bu anlamda, tez çalışmasında kullanılan çay atığı biyobütanol üretimi için oldukça destekleyici olabileceği açıktır.

Ek olarak, EÇAT'ın su tutma kapasitesi %20.73 olarak belirlenmiştir ve bu değer lignoselülozik bir ham madde açısından değerlendirildiğinde oldukça düşüktür. Bu durum EÇAT içeriğinde yüksek oranda selülozik yapının olduğuna işaret etmektedir. Çünkü selüloz moleküller arasındaki zincirde serbest hacmi azaltarak suyun penetrasyonunu azaltmaktadır (Razali vd. 2015, Ibrahim vd. 2019). Ayrıca düşük su tutma kapasitesi, bir fermantasyon ham maddesi olarak kullanımı açısından, ön işlem aşamasında daha yüksek bir homojenizasyon ve sakkarifikasyon imkanı sunmaktadır.

5.1.2 Farklı endüstriyel çay atığı şeker konsantrasyonlarının biyobütanol üretimine etkisi

Lignoselülozik ham maddeler yukarıda belirtildiği gibi mikrobiyel gelişim ve biyobütanol üretimi için önemli besin kaynaklarıdır. Bu anlamda literatürde lignoselülozik ham maddelerin biyobütanol üretimi için etkili bir ham madde olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Ayrıca bu çalışmalar çoğunlukla ham maddenin ön işlemine, substrat konsantrasyonuna, fermantasyon stratejilerine ve detoksifikasyon yöntemlerine odaklanmaktadır.

Mevcut tez çalışmasının ilk aşamasında ise EÇAT, %1 seyreltik asit ön işlemine tabi tutularak SHF stratejisi ile farklı EÇAT şekeri konsantrasyonlarında hazırlanan fermantasyon ortamlarında *C. beijerinckii* DSMZ 6422 tarafından biyobütanol üretimi için incelenmiştir. Çalışma sonucunda yaklaşık 40 g/L EÇAT şekeri varlığında 4.35 g/L biyobütanol ve 7.82 g/L ABE konsantrasyonu elde edilmiştir. Benzer şekilde Khedkar vd. (2017a), lignoselülozik bir ham madde olarak ananas atıklarını kullanmıştır. Asit hidrolizi ve detoksifikasyondan sonra 120 °C'de kurutulan ananas hidrolizatında 60.66 g/L başlangıç şekeri belirlemiştir. *C. acetobutylicum* NRRL B-527 tarafından fermantasyon sonucu 33.07 g/L şeker tüketimi ile en yüksek ABE 5.23 g/L olarak elde edilmiştir. ABE üretimi için *Coleus forskohlii* kök hidrolizatlarını kullanan Harde vd. (2016) ise, *C. acetobutylicum* NCIM 2877'un fermentasyon metabolizması sonucu 50 g/L

başlangıç şekeri kullanarak yaklaşık olarak 5.14 g/L ABE ve 3.00 g/L biyobütanol elde etmiştir. Bir başka çalışmada ise 80°C'de kurutulmuş, asit ön işlemleri ve detoksifiye edilmiş karnabahar atık hidrolizatlarından 59.7 ± 0.2 g/L başlangıç şekeri ile *C. acetobutylicum* NRRL B 527 kullanılarak toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonu sırasıyla 5.31 g/L ve 2.99 ± 0.10 g/L olarak belirlenmiştir (Khedkar vd. 2017b). Dalal vd. (2019) pirinç samanı hidrolizatı kullanarak *C. beijerinckii* C-01 suşu tarafından izopropanol-bütanol üretimini gerçekleştirmiştir. Farklı ön işlem yöntemleri kullanmış ve pirinç samanının asitle ön işlenmiş hidrolizatını kullanarak 4.9 g/L biyobütanol üretilmiştir.

Lignoselülozik biyokütle olarak bir sebze atığı olan bezelye atıklarının kullanıldığı bir başka çalışmada, bezelye kabuğu atıklarının kuru bazda %32.08 selüloz ve %21.12 hemiselüloz içeriğine sahip olduğu ve biyobütanol üretiminde kullanılabileceği gösterilmiştir. Farklı sıcaklıklarda kurutulan örnekler %1.3 (v/v) H₂SO₄ ile ön işleme tabi tutulmuş ve ardından aktifleştirilmiş odun kömürü ile detoksifiye edilmiştir. Seyreltik asit ön işlemi sonucu 100 °C'de kurutulmuş atıktan toplam 48.07 g/L şeker eldesi gerçekleşmiştir. Aktif kömür detoksifikasyonu ile bezelye kabuğu atık bulamacından ABE'nin fermantatif üretimi sonucu yaklaşık %50 şeker kullanımı ile 5.94 g/L toplam ABE üretilmiştir (Nimbalkar vd. 2018). Procentese vd. (2017), yine bir sebze atığı olan marul yapraklarının ABE üretiminde kullanımını incelemiştir. Ham madde öncelikle NaOH ile alkali ön işleme maruz bırakılmış ve ardından enzimatik olarak hidroliz edilmiştir. Optimal koşullar altında, enzimatik hidrolizden sonraki şeker konsantrasyonu 19.5 g/L olarak belirlenmiştir. Hidrolizatın *C. acetobutylicum* DSMZ 792 tarafından fermantasyonu sonucu 1.44 g/L ABE ve 1.1 g/L biyobütanol konsantrasyonu elde edilmiştir.

Yukarıda belirtilen çalışmalar, mevcut tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla uyumludur. Ayrıca yukarıda belirtilen çalışmalarda kullanılan ham maddeler çoğunlukla ön işleme ve ardından detoksifikasyona maruz bırakılmış hidrolizatlar kullanılarak belirtilen değerlerde ABE ve biyobüyanol konsantrasyonları elde edilmiştir. Bunların yanında elde edilen değerlerin çoğu, başlangıç şekeri 50 g/L üzerinde olan ham maddeler ile elde edilmiş olup, mevcut çalışmada başlangıç şekeri 38.67 g/L olan EÇAT

kullanıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre, EÇAT'ın, zengin besin içeriği ile, enzimatik hidrolize ve detoksifikasyon işlemine gerek kalmadan literatüre göre daha verimli biyobütanol ve ABE fermantasyonu için elverişli bir ham madde olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.

Ayrıca literatürde şeker veya substrat konsantrasyonunun biyobütanol üretimi için önemli bir parametre olduğu belirtilmektedir (İbrahim vd. 2018). Mevcut çalışmada başlangıç EÇAT şekeri 20 g/L iken en düşük biyobütanol konsantrasyonu elde edilmiştir. Bu düşük konsantrasyon, biyobütanol fermantasyonu için gerekli olan şeker konsantrasyonunun yetersiz olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, EÇAT şekeri konsantrasyonu 60 ve 80 g/L'ye yükseldiğinde, biyobütanol konsantrasyonu 4.35 g/L'den sırasıyla 3.41 ve 3.39 g/L'ye hafifçe düşmüştür. 40 g/L ile karşılaştırıldığında bu düşüş, çayın yüksek biyokütle yüklemesinde tanenler (genellikle tanen asidi) gibi fenolik bileşikler nedeniyle fermantasyonu inhibe edici bir etkiye sahip olmasından kaynaklanabilir (Mirfakhar vd. 2017). Kaczmarek'e (2020) göre, çay atığı içindeki yüksek tannik asit içeriği (70,6 g/kg kuru malzeme toplam ekstrakte edilebilir tanenler ve 5.1 g/kg kuru malzeme yoğunlaştırılmış tanenler), şeker ve amino asit alımını önlediğinden mikrobiyal büyümeyi engellemektedir. Yüksek tannik asit içeriğine sahip meşe palamudunun biyobütanol üretiminde kullanımını gösteren bir çalışmada, ön işlenmemiş meşe palamudu kullanıldığında tannik asitin büyümeyi inhibe edici özelliğinden dolayı biyobütanol üretimi gözlenmemiştir. Ancak, tannik asidi uzaklaştırmak için ham madde kaynamaya yakın bir suda bekletilerek ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Bu ön işlem, meşe palamudu tozunun *C. acetobutylicum* tarafından fermente edilebilirliğini önemli ölçüde iyileştirmiş ve 0.34 ± 0.02 g ABE/g substrat değerinde verim elde edilmiştir (Heidari vd. 2016). Ek olarak, tannik asidin MİK değeri mikroorganizma tipine ve tannik asit kaynağına göre değişmektedir (Elizondo vd. 2010). Elizondo vd. (2010) quebracho ve kestane tanenlerinin MİK değerlerini *C. perfringens* 68 toksin tipi için sırasıyla 0.150 mg/mL ve 0.003 mg/mL olarak belirlemiştir. Araştırmacılar ayrıca *C. perfringens*'in farklı toksin tiplerinde farklı MİK değerleri gözlemlemiştir.

Ayrıca bu çalışmada substrat konsantrasyonu ile ilgili olan bu düşüşler literatürdeki bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Linggang vd. (2013), *C. acetobutylicum* ATCC 824

kullanılarak 30–70 g/L sago özü kalıntıları hidrolizatı ve 0–5 g/L maya özütü ile ABE üretimi gerçekleştirmiştir. En yüksek ABE ve biyobütanol konsantrasyonu 40 ± 0.88 g/L glukoz içeren 50 g/L sago özü kalıntıları hidrolizatı ve 0.5 g/L maya özütü eklenen ortamda sırasıyla 8.84 ± 0.20 g/L ve 5.41 ± 0.10 g/L olarak belirlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar, hidrolizat konsantrasyonu 30 ve 70 g/L olduğunda, biyobütanol konsantrasyonunun sırasıyla 2.23 ± 0.12 g/L ve 3.48 ± 0.06 g/L'ye düştüğünü gözlemlemiştir. Araştırmacılar düşük sago hidrolizatı konsantrasyonunda, suşun daha fazla asetik asit ve bütirik asit ürettiğini ve yüksek asit konsantrasyonunun bakterilerin asit oluşumundan çözücü oluşumuna geçişini engelleyebileceğini ve böylece düşük ABE üretimine sebep olduğunu belirtmiştir. Yüksek hidrolizat konsantrasyonunda ise, 50 g/L'den yüksek glukoz konsantrasyonu ABE konsantrasyonunun düşmesine neden olabileceği ve substrat kaynaklı olarak inhibisyon ve hidrolizattaki yüksek asetik asit gibi inhibitör varlığından kaynaklanabileceği vurgulanmıştır (Linggang vd. 2013, Al-Shorgani vd. 2011, Kumar ve Das 2000).

Md Razali vd. (2018), farklı ön işlem görmüş palmye yağı boş meyve demeti lif konsantrasyonlarını farklı yaklaşımlarla test ederek, yüksek konsantrasyondaki katı substratın homojenleşmeyi önleyebileceğini ve sakkarifikasyon performansını azaltabileceğini belirtmiştir. Mevcut çalışmada ise stok EÇAT hidrolizat solüsyonu (300 g/L) düşük su tutma kapasitesi sayesinde yüksek homojenizasyon ve sakkarifikasyon etkinliği ile hazırlanmıştır. Böylelikle özellikle 40 g/L şeker içeren fermantasyon ortamında yüksek biyobütanol konsantrasyonu elde edilmiştir. Bununla birlikte, 60 ve 80 g/L gibi daha yüksek EÇAT şekeri konsantrasyonları, daha yüksek miktarlarda inhibitör içerebilen yüksek hidrolizat hacimleri ile hazırlanmıştır. Bu nedenle, bu büyüme ortamlarında biraz daha düşük biyobütanol konsantrasyonları elde edilmiştir. Böylece en yüksek biyobütanol 40 g/L EÇAT şekeri ile 4.35 g/L olarak bulunmuştur. Bu bağlamda, belirlenen substrat şekeri ve biyobütanol konsantrasyonları literatürde Harde vd. (2016), Linggang ve diğerleri (2013)'nin yaptığı çalışmalar ile uyumludur. Bu nedenle, mevcut çalışmada daha ileriki deneyler için 40 g/L EÇAT şekeri seçilmiştir.

5.1.3 Farklı azot kaynaklarının biyobütanol üretimine etkisi

Nitrojen kaynakları, hücrenin replikasyonu ve onarımı, karbonhidrat hidrolize edici enzimlerin üretimi, metabolik regülasyon ve hücre içi biyomoleküllerin sentezi gibi mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri için çok önemlidir (de Brito Bezerravd. 2023). Bu nedenle çeşitli organik veya inorganik nitrojen kaynaklarının varlığının fermantasyon ve biyobütanol üretiminde önemli rol oynadığı vurgulanmıştır (Luo vd. 2018). ABE fermantasyonunda, ortamdaki nitrojen kaynağının azalması, yeterli biyokütle oluşumunu ve karbon kaynağının etkin kullanımını engellemektedir. Bu nedenle, ortamdaki belirli bir karbon ve nitrojen (C/N oranı) kaynağı kombinasyonunun *Clostridial* fermantasyonda sinerjistik olarak işlev gördüğü öne sürülmüştür (Yerushalmi ve Volesky 1987, Rajagopalan 2016). Özellikle nitrogen kaynağının sınırlandırılması, asit son ürünlerinin yeterli miktarda üretilmemesine neden olarak, biyobütanol üretimini de böylelikle engelleyebilmektedir (Jones ve Woods 1986).

Biyobütanol üretimi için literatürde maya özütü yaygın olarak kullanılsa da NH_4NO_3 , üre, soya proteini gibi nitrojen kaynakları da biyobütanol üretimini desteklemektedir. Örneğin, Loyarkat vd. (2013), peynir altı suyu proteini ve izole soya proteininin, asitlerin biyobütanole dönüşümünü etkili bir şekilde desteklediğini bildirmiştir. Ayrıca bu çalışmada, ham madde olarak detoksifiye edilmiş dekantör kek hidrolizatı (decanter cake) varlığında, en yüksek biyobütanol üretimi peynir altı suyu proteini ile 2.32 g/L gerçekleşmiş ve bunu 1.18 g/L izole soya proteini ve 0.65 g/L ile üre takip etmiştir. Maya özütü varlığında ise 0.45 g/L biyobütanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Aynı zaman çalışmada bu nitrojen kaynaklarının organik asit (asetik asit ve bütirik asit) üretimindeki etkisine de bakılmıştır. Sonuçta, maya özütü ve ürenin üremeye bağlı asit üretimini desteklediği, peyniraltı suyu proteini ve soya proteininin ise asitlerin biyobütanole dönüşümünü sağladığı gösterilmiştir.

Komonkiat ve Cheirsilp (2013), 1 g/L konsantrasyonundaki farklı nitrojen kaynaklarının palmye yağı özü ve gövdesinin biyobütanole dönüşümü üzerindeki etkisini belirlemiştir. En yüksek biyobütanol konsantrasyonunun NH_4NO_3 varlığında elde edildiğini

bulmalarına rağmen, tüm nitrojen kaynakları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Şöyleki 1 g/L maya özütü, izole soya proteini, peyniraltı suyu proteini, üre ve NH_4NO_3 eklendiğinde sırasıyla, 7.29 g/L, 6.90 g/L, 6.69 g/L, 6.28 g/L ve 7.74 g/L biyobütanol konsantrasyonu elde edilmiştir. Rajagopalan (2016) ise en yüksek biyobütanol konsantrasyonunu organik nitrojen kaynakları arasında maya özütü ile 3.15 g/L olarak ve inorganik azot kaynakları arasında amonyum sülfat ile 3.32 g/L olarak belirlemiştir.

Bu bilgiler ışığında, literatür çalışmalarında incelenen uygun maliyetli organik veya inorganik nitrojen kaynaklarının kullanımının biyobütanol üretimini her ne şekilde olursa olsun destekleyebildiğini göstermektedir. Bunun nedeni yine literatürde açıklandığı üzere, azot varlığının glukoz kullanımını, biyokütle gelişimini ve böylelikle biyobütanol üretimini önemli ölçüde desteklemesidir. Bu anlamda tez çalışmasında, yaygın olarak kullanılan maya özütü ve ucuz nitrojen kaynaklarından olan peyniraltı suyu tozunun, 1 ile 8 g/L konsantrasyon aralığında incelenerek biyobütanol üretimi için oldukça elverişli nitrojen kaynakları olduğu belirlenmiştir.

5.1.4 Mineral tuzlarının (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) biyobütanol üretimine etkisi

Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} gibi mineraller, enzimlerin yapısına katılma, metabolizma yardımcılarının sentezlenmesi ve hücre büyümesine katkıda bulunma, hücreyi koruma gibi işlevleriyle fermantasyon sürecinde önemli rol oynamaktadır (Dziemianowicz vd. 2022). Dziemianowicz vd. (2022) çalışmalarında fermantasyon süreçlerinde makro ve mikro elementlerin önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Fermantasyon ortamına amonyum sülfat, magnezyum sülfat ve amonyum fosfat takviyesinin SSF ve SHF/SSF yöntemlerinde ABE fermantasyon hızını ve biyobütanol üretimini oldukça olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir. Mineral bileşikler içermeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, mineral tuzu takviyesi solventojenezin daha erken başlamasını ve ABE fermantasyonunun ilk 48 saatinde toplam biyobütanol konsantrasyonunun yaklaşık %88-92'nin üretildiği belirlenmiştir.

Jin vd. (2022), tatlı patates atıklarını biyobütanol üretiminde değerlendirmiş ve bu ortamda biyobütanole ait kinetik parametrelerin iyileştirilmesi için mineral takviyesinin etkisini RSM yöntemi ile araştırmıştır. Ortama ilave edilen mineral bileşikler 0.1-0.3 aralığında olup FeSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 ve KH_2PO_4 'tür. RSM ile oluşturulan modelde optimum mineral takviyeleri 0.26 g/kg FeSO_4 , 0.17 g/kg MnSO_4 , 0.24 g/kg ZnSO_4 ve 0.11 g/kg KH_2PO_4 olarak belirlenmiştir ve bu konsantrasyonlar ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda 11.39 g/L biyobütanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir optimizasyon çalışması yapılmamış grupta ise en yüksek biyobütanol konsantrasyonu 8.93 ± 0.38 g/L olarak belirlenmiştir.

Yukarıda belirtilen çalışmalar, mineral bileşiklerinin ABE fermantasyonunda çok önemli bir parametre olduğunu göstermektedir. Mevcut tez çalışmasında da bu durum göz önüne alınarak Fe^{2+} , Mg^{2+} ve Zn^{2+} minerallerinin etkisi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Fermantasyon ortamında, minerallerin yokluğu ya da yeterli konsantrasyonda olması ABE fermantasyonunda solvent (aseton, bütanol, etanol) üretimini ve fermantasyon sürecini etkilemektedir. Örneğin, Maddox (1989) solventojenezin sürekli kültürde Mg^{2+} ve sülfat sınırlamaları gibi besin sınırlamaları altında meydana gelebileceğini belirtmektedir. Ayrıca literatürde magnezyum, nitrojen, fosfor ve kükürt gibi temel besinlerin kısıtlanması veya ortamda bulunmaması hücreleri durağan faza yönlendirdiği vurgulanmaktadır. Böylece hücreler, biyokütle sentezi için karbon tüketmeyerek potansiyel olarak hedef metabolit üretimini arttırmaktadır (Tokuyama vd. 2019).

Magnezyum, hücre bölünmesi sırasında ribozom bozunmasını önleme, çeşitli enzimlerin kofaktörü olma ve hücre duvarına yapısal stabilite sağlama gibi birçok önemli işlevde yer almaktadır. Magnezyum varlığının optimum düzeyde olması önemlidir, çünkü aşırılık veya eksiklik hücre bölünmesinin ve metalik iyonu kofaktör olarak kullanan enzimlerin aktivitesinin inhibisyonuna neden olabilir (Ahlawat vd. 2019). Bu bağlamda biyobütanol üretimindeki kilit rolünden dolayı literatürde Mg^{2+} konsantrasyonlarının etkisi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Çeşitli metal iyonlarının yokluğunun veya takviyesinin etkisini inceleyen Mukherjee vd. (2019), *C. acetobutylicum* ATCC 824 kullanarak biyobütanol

üretimini, kontrole kıyasla Mg^{2+} olmayan ortamda %16 arttığını belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, Mg^{2+} bulunmayan ortamda, glukoz metabolizmasında yer alan glukokinaz, fosfofruktokinaz ve piruvat kinaz gibi enzimlerin spesifik aktivitesinin yukarı doğru regüle edildiğini ve glukoz kullanım oranının arttığını bildirmiştir. Bu bağlamda, bu tez çalışmasında $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ sınırlamasının veya artışının biyobütanol üretimi üzerindeki etkisini belirlemek için $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 'nun dört farklı konsantrasyonu (0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 g/L) test edilmiştir. Sonuçlara göre, standart $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonu (0.2 g/L) yarıya düşürüldüğünde biyobütanol konsantrasyonunun arttığı görülmüştür. Buna göre, 0.1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ile mineral sınırlaması sonucu toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonu sırasıyla 7.82 g/L'den 8.43 g/L'ye ve 4.35 g/L'den 5.01 g/L'ye yükselmiştir. Benzer şekilde, Ahlawat vd. (2019), *C. acetobutylicum* MTCC 11274 kullanarak en yüksek biyobütanol konsantrasyonunun, optimize edilmiş $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonunun yarısı ile sınırlı ortamda olduğunu gözlemlemiştir. Yine Monot vd. (1982), aseton ve bütanol fermantasyonunda sentetik bir ortamda bileşik konsantrasyonlarının etkisini incelemiş ve 0-500 mg/L $MgSO_4$ konsantrasyonu aralığında (0, 50-200 ve 350-500 mg/L) en yüksek biyobütanol konsantrasyonunu 50-200 mg/L aralığında elde etmiştir (Monot vd. 1982). Ayrıca, her iki çalışmada da, mevcut çalışmada elde edildiği gibi, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonu arttığında biyobütanol konsantrasyonu azalmıştır.

Özellikle *Clostridium* türlerinin fermantasyon metabolizmasında Fe^{2+} , asidojenik fazda glikoliz yolu ile piruvatın Asetil CoA'ya dönüştürülmesinde yer alan ferredoksin enziminin üretiminde temel mineraldir (Restiawaty ve Grinanda 2017). Ayrıca literatürde Fe^{2+} iyonları ile bütirik asit oluşumunun arttırılması ve asetik asit oluşumunun azaltılmasıyla solventojenik fazda biyobütanol üretiminin ve seçiciliğinin artırılacağı belirtilmiştir (Restiawaty ve Grinanda 2017). Bu önemli işlevlerinden dolayı mevcut tez çalışmasında Fe^{2+} mineralinin farklı konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir.

Literatürdeki bazı çalışmalar, Fe^{2+} konsantrasyonunun biyobütanol üretimi üzerindeki etkisini göstermektedir. Örneğin, Wu vd. (2017), 10 ile 500 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonları aralığında 10 mg/L varlığında *C. beijerinckii* IB4 kullanarak en yüksek biyobütanol verimini belirlemiştir. Ayrıca, biyobütanol konsantrasyonları, test edilen tüm

demir konsantrasyonlarında hemen hemen aynıdır. Şöyle ki, 10, 50, 100, 250, 500 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ varlığında sırasıyla, 12.06, 11.73, 12.30, 12.46 ve 12.05 g/L biyobütanol üretimi gözlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonu 50 mg/L'nin üzerine çıktığında, ortam pH'nın düştüğünü ve buna bağlı olarak hücre büyümesinin zayıfladığını ve glukoz tüketiminin azaldığını belirtmiştir.

Benzer şekilde, Mohanraj vd. (2014) *C. acetobutylicum* NCIM 2337 kullanılarak fermentatif hidrojen üretimini inceledikleri çalışmalarında, 50 mg/L'nin üzerindeki FeSO_4 ilavelerinde glukoz kullanım etkinliğinin büyük ölçüde azaldığını ve bunun da hidrojen üretimini etkilediğini belirlemişlerdir.

Gallardo vd. (2017) ise, 2, 10 ve 20 mg/L demir konsantrasyonlarının varlığında en yüksek biyobütanol konsantrasyonu 10 mg/L demir ilavesi ile elde edilmesine rağmen, aslında tüm konsantrasyonlarda birbirine yakın biyobütanol konsantrasyonları belirlenmiştir. Ayrıca 2 mg/L demir ilave edildiğinde bile, biyobütanol üretimi demir ilave edilmeyen besiyerine göre %163 artmıştır.

Yukarıda belirtilen literatür çalışmalarında belirlenen sonuçlar, mevcut tez çalışması ile uyumludur. 0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunun üzerine çıkıldığında biyobütanol miktarlarında hafif düşüş gözlenmiştir. Buna göre, EÇAT şekeri varlığında, optimum $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonu 0.01 g/L olarak belirlenmiştir.

Zn^{2+} mineralinin biyobütanol üretiminin merkezi enzimi olan bütanol dehidrojenaz üzerinde dengeleyici etkiye sahip olduğu literatürde belirtilmiştir (Sun vd. 2020). Ayrıca Zn^{2+} , ABE üretimi ve şeker kullanımında yer alan çeşitli genleri yukarı doğru düzenleyerek hücre içi metabolizmanın düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Böylece mikrobiyel hücrelerde hızlı büyümeye ve asit birikimine neden olur (Ujor vd. 2016). ABE fermantasyon sürecindeki öneminden dolayı, tez çalışmasında, normalde standart P2 ortamında bulunmayan Zn^{2+} mineralinin EÇAT şekeri ile desteklenmiş P2 ortamına ilavesinin biyobütanol üretimi üzerindeki etkisi araştırılmış ve etkili sonuçlar elde edilmiştir.

Wu vd. (2016), Zn^{2+} ilavesinin formik asit, bütirik asit ve asetik asit gibi çeşitli stres koşulları altında *C. acetobutylicum* L7'nin toleransını ve biyobütanol üretimini artırabileceğini belirtmiştir. Yaptıkları çalışmada Zn^{2+} içermeyen 7.5 g/L asetik asit ve 5.5 g/L bütirik asit varlığında fermantasyon gözlenmezken, biyobütanol üretimi 0.001 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ilave edilerek aynı asetik asit ve bütirik asit konsantrasyonlarında sırasıyla 2.15 ± 0.22 g/L ve 2.50 ± 0.21 g/L olmuştur.

Wu vd. (2013) ayrıca 0.001'den 0.5 g/L'ye artan Zn^{2+} konsantrasyonlarının hücrelerde biyobütanol üretimini inhibe edici bir etkiye neden olduğunu belirtmiştir. Benzer şekilde mevcut çalışmada da ortamdaki $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonu 0.1 ve 0.2 g/L olduğunda biyobütanol konsantrasyonunda keskin bir düşüş gözlenmiştir.

Başka bir raporda, Mg^{2+} açlığı ve Zn^{2+} ilavesinin, karbon kaynağı olarak mısır dik likörü (CSL) ve endüstriyel sınıf mısır nişastası varlığında *C. acetobutylicum* ATCC 824 tarafından biyobütanol üretimini %43.57 oranında iyileştirdiği gösterilmiştir (Mukherjee vd. 2020). Bu artış eğilimi tez çalışmasında da belirlenmiş olup, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonu yarıya indirildiğinde ve ortama $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ilavesi yapıldığında toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonu, modifiye P2 ortamına göre sırasıyla %24.42 ve %42.75 oranında artırılmıştır.

Literatürde lignoselülozik ham maddelerin mikrobiyel gelişimi etkileyebileceği daha önce de belirtilmiştir. Hücresel gelişimde ve hücresel metabolik aktivitelerin gerçekleştirilmesinde koenzim ve kofaktör olarak yapıya katılan vitaminler ve mineraller ve protein türevli azotlu bileşikler çoğu lignoselülozik ham maddenin içerisinde yer almaktadır. Bu anlamda, çay atıklarının mevcut çalışmada belirtilen sonuçlar ve literatürde belirtilen çalışmalar ile mikrobiyel gelişimi olumlu derecede etkileyecek zengin bir besin içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Sunulan tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, mikrobiyel gelişimin optimize P2 ortamında, standart P2 ortamına göre 2.98 kat artırıldığını göstermektedir.

Literatürde de lignoselülozik atıklar ile yapılan çalışmalarda benzer etkiler görülmüştür. Örneğin, Sanguanchaipaiwong ve Leksawasdi (2018) , *C. beijerinckii* TISTR 1390'nin hücre gelişiminin ananas atığı suyu içeren ortamda en yüksek $2.40 \pm 0.12 \times 10^8$ CFU/mL olarak belirlerken, 60 g/L glukoz içeren P2 ortamında hücre konsantrasyonunu $9.46 \pm 0.43 \times 10^6$ CFU/mL olarak elde etmiştir.

Bir başka çalışmada ise, substrat olarak sago hampası kullanılmıştır. Çalışmada, 24. saatte 50 g/L sago hampası hidrolizatı içeren bir ortamda 1.5 g/L'nin üzerinde mikrobiyel biyokütle elde edilmiş ve ilerleyen saatlerde biyokütle konsantrasyonu neredeyse sabit devam etmiştir. 50 g/L saf glukoz içeren ortamda ise mikrobiyel gelişimin 48. saatte 1 g/L olduğunu gösterilmiş ve 48 saatten sonra mikrobiyel gelişim azalmıştır. Buna göre, lignoselülozik atık hem konsantrasyonu artırmış hem de hücre gelişimini hızlandırmıştır (Husin vd. 2019).

5.1.5 Fermantasyon ortamlarında elde edilen kinetik parametreler

Literatürdeki bazı çalışmalar, lignoselülozik biyokütlenin toplam çözücüler ve biyobütanol verimini ve üretkenliğini arttırdığını göstermektedir. Zhou ve ark. (2020), örneğin, ABE üretiminde yenilenebilir ham madde olarak puerariae cürufunu kullanmıştır. Substrat ultrason destekli seyreltik asit yoluyla hidroliz edilmiş ve fermantasyon sonunda 8.79 ± 0.16 g/L biyobütanol üretilmiştir. Ayrıca biyobütanol verimi, 85.79 ± 1.29 g/L indirgen şeker miktarı ile 0.19 g/g olarak belirlenmiştir.

Bu artışlarla elde edilen nihai verim ve verim değerleri literatürdeki çalışmalara göre oldukça yüksektir. Bu bağlamda, optimizasyon çalışmaları sayesinde çay atığı fermantasyon ortamı, biyobütanol konsantrasyonu, biyobütanol verimi ve biyobütanol üretkenliğini önemli ölçüde iyileştirecek ortam için alternatif bir yaklaşımdır.

5.2 Üçüncü Nesil Ham Madde Olan *D. salina* Biyokütlesi ile Yapılan Çalışmalar

5.2.1 *D. salina*'nın yapısal ve kimyasal içeriği

Mikroalgler, karbonhidratlar, lipidler, proteinler, vitaminler, mineraller ve karotenoidler gibi zengin bir besin içeriğine sahiptir. Dünya çapında sağlık, gıda ve hayvan yemi gibi farklı alanlarda kullanım alanı bulunan mikroalglerden *D. salina*, şeker çeşidi, protein ve vitamin içeriği bakımından oldukça zengindir (de Souza Celente vd. 2022). Mevcut çalışmada biyobütanol üretimi için *D. salina*'nın bazı yapısal ve kimyasal özellikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *D. salina* hücre içerisinde %77.21 glukoz, %5.98 arabinoz ve %16.81 diğer şekerleri (mannoz, galaktoz ve ksiloz dahil) barındırmaktadır. Benzer şekilde, Dai vd. (2010), *D. salina*'nın farklı polisakkarit fraksiyonlarında başlıca glukoz, galaktoz, mannoz, ramnoz, ksiloz, arabinoz ve fukoz monosakkaritleri içerdiğini belirlemiştir. Yazarlar ayrıca PD1 fraksiyonunda baskın şeker profilinin glukoz olduğunu gözlemlemişlerdir.

Efremenko vd. (2012), *D. salina*'nın çözünür ve toplam karbonhidrat içeriğinin (% kuru biyokütle) sırasıyla 27.9 ± 2.3 ve 69.7 ± 5.5 olduğunu belirlemiştir. Bir başka çalışmada ise, Um ve Kim vd. (2009) *D. salina*'nın kuru biyokütlesinin %32 karbonhidrat içerdiğini belirtmiştir.

Protein içeriği yüksek olan bu mikroalg, uygun bir nitrojen kaynağıdır. Mevcut çalışmada *D. salina*'nın protein içeriği %64.2 olarak elde edilmiştir. Literatürde de benzer sonuçların elde edildiği çalışmalara rastlanmaktadır. Örneğin, Sui vd. (2019), 12 saat/12 saat (aydınlık/karanlık) ışık rejimi altında 16 gün sonra *D. salina*'da (külsüz kuru ağırlık bazında) yaklaşık %60 protein içeriği gözlemlemiştir. Sui ve Harvey (2021) ise, 100 ışık yoğunluğunda (μmol fotoğraflar $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) beyaz ışıktaki *D. salina*'nın en yüksek proteinin %74 olduğunu belirlemiştir. Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlara göre, hücre içeriğinin (kuru biyokütle) %64.2'si protein, geri kalanı ise karbonhidratlar, lipidler ve diğer bileşiklerden oluşmaktadır. Buna göre sonuçlar literatürdeki çalışmalarla benzer

olarak elde edilmiş olup, *D. salina* biyokütlesi, biyobütanol üretimi için, mikrobiyel gelişimde önemli bir nitrojen kaynağı olabileceği öngörülmektedir.

D. salina, mikrobiyal büyümeyi destekleyen vitaminler (B12, C, E) ve β -karoten gibi çeşitli karotenoidler açısından yüksek bir içeriğe sahiptir (Kumudha ve Sarada 2016). Mikroalglerin zengin besin içeriğine sahip olması nedeniyle bu çalışmada *D. salina* biyokütlesi biyobütanol üretiminde bir takviye maddesi olarak değerlendirilmektedir. *D. salina* biyokütlesinin farklı şeker, vitamin ve karotenoid profili ve protein içeriği ile mikroorganizma ve biyobütanol üretimi için eşsiz bir destekleyici kaynak olduğu çalışmada gösterilmiştir.

Mikroalg biyokütlesinin ön işleme maruz bırakılması, şekerlerden türevlenen asetik asit, HMF ve formik asit gibi bileşiklerin açığa çıkmasına sebep olabilmektedir (Miranda vd. 2012). Örneğin, Pirwitz vd. (2016)'nin çalışmasında, hidrotermal işlem görmüş *D. salina*'nın sulu fazında asetat ve format konsantrasyonlarının sırasıyla 0.60-5.30 mg/g_{kuru} ağırlık ve 1.92-15.97 mg/g_{kuru} ağırlık aralığında değiştiği gösterilmiştir. Ayrıca bu sonuçların mevcut çalışmadan oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Mevcut çalışmada formik asit, asetik asit ve HMF sırasıyla 0.170 g/L, 0.670 g/L ve 0.412 g/L olarak belirlenmiştir. Bunların yanında, *D. salina* biyokütlesi herhangi bir kimyasal ön işlem görmeden biyobütanol üretimi için kullanılmıştır. Böylece HMF, asetik asit ve formik asit gibi inhibitör maddelerin mikrobiyal büyümeyi ve biyobütanol üretimini engelleme riski en aza indirilmiştir. Bu sonuçlara göre *D. salina*, yüksek protein içeriği, düşük furfural ve organik asit bileşikleriyle mikrobiyal büyümeyi destekleyen uygun bir materyaldir.

5.2.2 Fotoototrofik olarak yetiştirilen *D. salina* biyokütlesinin biyobütanol üretimi üzerindeki etkisi

D. salina gibi mikroalglerin yararlı kimyasal ve yapısal özelliklerinden dolayı, biyoyakıt üretimi için mikroalgal biyokütle takviyesi için büyük bir potansiyel olmasına rağmen, literatürde mikroalglerin biyobütanol üretiminde kullanıldığı çalışma sayısı azdır. Bununla birlikte, Onay (2020a), biyobütanol üretimi için mikroalgal biyokütle olarak *Nannochloropsis gaditana*'yı kullanmıştır. Çalışma sonucunda farklı ışık şiddetlerinde ve

çeşitli asidik hidroliz yöntemlerinde en yüksek karbonhidrat verimine sahip olan mikroalg biyokütlesini kullanarak 2.9 ± 0.24 g/L biyobütanol üretimi gerçekleştirmiştir. Castro vd. (2015), %10 yaş mikroalg biyokütle kullanarak, 1 M H_2SO_4 , 80 - 90°C, 120 dakika olan optimum koşullar altında elde edilen atık su mikroalg hidrolizatından 166.1 g/kg şeker verimi ile *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 tarafından en yüksek 3.74 g/L biyobütanol ve 5.23 g/L toplam ABE elde etmiştir. Figueroa-Torres vd. (2020), *Chlamydomonas reinhardtii* CCAP 11/32C'nin ham ve hidrolizat formlarını kullanarak biyobütanol üretimini incelemiştir. Biyobütanol konsantrasyonları ham mikroalg biyoküttele 1.031 g/L ve hidrolize mikroalg biyoküttele 0.89 g/L olarak belirlenmiştir. Bu çalışmalarla karşılaştırıldığında, mevcut çalışmada ön işlem görmemiş 50 g/L ve 100 g/L biyokütle ile takviye edilmiş glukozsuz fermantasyon ortamı kullanıldığında verimli biyobütanol üretimi sağlanmıştır. *C. beijerinckii* DSMZ 6422 96 saat sonunda 50 g/L ve 100 g/L mikroalg biyokütlesinden sırasıyla 2.97 ± 0.020 g/L ve 3.60 ± 0.020 g/L biyobütanol üretmiştir.

Mikroalg biyokütlesinin şeker konsantrasyonu, standart P2 ortamından daha düşük olmasına rağmen, mevcut çalışmada benzer biyobütanol konsantrasyonları elde edilmiştir. Bu durum mikroalglerin fermantasyon metabolizmasını destekleyen besinler ve bileşikler içermesinden kaynaklanabilir. Örneğin, Hou vd. (2017), *C. beijerinckii* DSM-6422 tarafından ABE fermantasyonu için *Laminaria digitata* hidrolizatı ve yarı sentetik bir ortam kullanmıştır. Çalışma sonucunda fermantasyon sonunda her iki besiyerinde de benzer konsantrasyonlarda şeker tüketilmesine rağmen, *L. digitata*'da bulunan etkili bileşikler sayesinde daha yüksek biyobütanol üretimi sağlanmıştır.

Sonuç olarak, üçüncü nesil biyoyakıtlarla ilgili sınırlı sayıda çalışma olduğundan, mevcut çalışmada verimli biyobütanol üretimi için mikroalglerin de katkı maddesi olarak kullanılabileceğinin gösterilmesi amaçlanmış ve literatür ile benzer ve etkili sonuçlar elde edilmiştir.

5.2.3 Farklı yetiştirme koşullarının mikroalg gelişimine etkisi

Kültivasyon yönteminin mikroalg hücrelerinde değerli bileşiklerin birikmesinde önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Araştırmacılar, biyoyakıt, lipid, protein, pigment vb. gibi mikroalglerden türetilen ürünlerin üretkenliğini ve miktarını artırmak için miksotrofik, heterotrofik ve fotoototrofik mikroalg yetiştirme yöntemlerini inceleme eğiliminde olmuştur.

Mikroalgler, mermer kayalar ve atık su gibi ekstrem ortamlarda büyüyebilir (Maheshwari vd. 2020). CaCO_3 açısından zengin bir endüstriyel atık olan MA'nın (Tozsın 2016) karbon kaynağı olarak kullanıldığında *D. salina*'nın büyümesini artırabileceği mevcut çalışmada öne sürülmüştür. Mikroalg büyümesi, farklı MA ve CaCl_2 konsantrasyonları ile miksotrofik ve fotoototrofik yetiştirme koşulları altında incelenmiştir. Çalışma sonucunda oldukça etkili sonuçlar elde edilmiştir.

Mevcut tez çalışmasının bu bölümünde, biyokütle konsantrasyonu, 0.6 g/L'den daha yüksek CaCl_2 konsantrasyonlarının varlığında keskin bir şekilde azalmıştır. Bu düşüş, mikrobiyal büyümeyi engelleyen klor (Cl^-) iyonlarındaki artıştan kaynaklanabilir. Ayrıca, *Dunaliella* besiyerinde 0.8 ile 20.0 arasında değişen Magnezyum : Kalsiyum ($\text{Mg}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$) oranını tolere edebildiğinden (Hosseini Tafreshi ve Shariati 2009), Ca^{2+} konsantrasyonundaki hafif artışlar 0.8 g/L CaCl_2 'ye kadar büyümeyi etkilememiş olabilir.

Mevcut çalışmaya benzer şekilde, karbonca zengin endüstriyel atıkların mikroalg biyokütle üretimi için etkili ve ucuz ham maddeler olduğu literatür çalışmalarında gösterilmiştir. Örneğin, Chavoshi and Shariati (2019) miksotrofik, heterotrofik ve ototrofik koşullar altında *D. bardawil*'in (UTEX 2538) hücre büyümesini ve lipid üretimini araştırmıştır. En hızlı lipid üretimi ve mikroalgal büyüme, asetat veya glukoz içeren miksotrofik durumda oluşmuştur. Bredda vd. (2020), optimum ışık dalga boyunda sodyum asetat varlığında miksotrofik koşullarla *D.salina*'nın biyokütle üretkenliğini 105.06 mg/L/gün olarak elde etmiştir.

Kassim vd. (2022) ise, *Halochlorella rubescens* ve *Tetraselmis suecica* mikroalglerinin gelişimini ve karbonhidrat içeriklerini iyileştirmek için farklı tarımsal-endüstriyel atıkları incelemiştir. Melas içeren besiyerinde en yüksek biyokütle miktarı *H. rubescens* için 0.653 ± 0.009 g/L ve *T. suecica* için 0.669 ± 0.01 g/L olmuştur.

Ji vd. (2016), *Nephroselmis* sp. gelişimini bold basal ortam (BBM) ile seyreltilmiş sıvı kristal atık suyunda (liquid crystal display wastewater (LCDW)) incelemiştir. 1/1000 seyreltilmiş LCDW'de 6 gün sonra maksimum mikroalg konsantrasyonu 0.37 g/L olarak belirlenmiştir. De Melo vd. (2018), tarımsal-endüstriyel yan ürünler olan peynir altı suyu, posa ve mısır dik likörünün *C. vulgaris* hücrelerinin büyümesi üzerindeki etkisini araştırmıştır. Miksotrofik (peynir altı suyu, mısır dik likörü ve posa) ve ototrofik koşullarda mikroalg konsantrasyonu 10. günde sırasıyla 1.60 ± 0.01 g/L, 2.10 ± 0.01 g/L, 0.77 ± 0.03 g/L ve 0.91 ± 0.02 g/L olarak elde edilmiştir. Sohrabi vd. (2019), ototrofik koşullara kıyasla kalsine yağ asitlerinin sentezinin bir yan ürünü olan ham gliserol kullanarak daha yüksek biyokütle üretkenliği, protein ve karotenoid içeriği elde etmiştir.

Buna göre, bu çalışmanın yaklaşımı ve sonuçları yukarıda belirtilen çalışmalarla uyumludur ve MA'nın *D. salina*'nın miksotrofik büyümesi üzerindeki etkisi ile ilgili literatürdeki ilk çalışmadır.

5.2.4 Miksotrofik mikroalg kültürasyonunun biyobütanol üretimine etkisi

Mikroalg hücrelerinin karbonhidrat, lipid ve protein içerikleri farklı yetiştirme koşullarında iyileştirilmektedir. Bu durum özellikle biyoyakıt üretiminde fermentatif mikroorganizma aktivitelerini artırmakta ve ortam içeriğini zenginleştirmektedir. Örneğin, Kallarakkal vd. (2021), biyobütanol üretimi için farklı stres koşulları altında peynir altı suyu suyuyla miksotrofik büyüme yoluyla *Oscillatoria* sp. hücrelerindeki karbonhidrat yüzdesini artırmayı amaçlamıştır. Miksotrofik olarak yetiştirilen biyokütlenin fermentasyonu sonucunda, *C. acetobutylicum*'un biyobütanol üretimi kontrol grubuna göre 1.6 kat artmıştır. Başka bir çalışmada *C. zofingiensis* CCALA 944'ün maksimum biyokütlesi %25 evsel atık su ve 80 µM Indole-3-asetik asit içeren

besiyerinde elde edilmiş ve mikroalg biyokütlesinin %4 H₂O₂ hidrolizinden sonra *C. acetobutylicum* tarafından maksimum 4.2 g/L biyobütanol üretimi gerçekleştirilmiştir (Onay 2020b).

Literatürde mikroalg biyokütle ortamına glukoz ilavesinin biyobütanol üretimini arttırdığı belirtilmektedir. Kushwaha vd. (2020), tek aşamalı büyütülmüş *Lyngbya limnetica* biyokütlesinin sadece hidrolizatı kullanıldığında 3.79 g/L biyobütanol üretildiğini gözlenmiştir. Bu hidrolizata 10.0 g/L glukoz eklendiğinde, biyobütanol konsantrasyonu yaklaşık 6 g/L'ye yükselmiştir.

Ellis vd. (2012) asit/baz ile ön işleme tabi tutulmuş alglerden ve %1 glukoz ile takviye edilmiş önceden işlenmiş alglerden sırasıyla 2.26 g/L ve 5.61 g/L biyobütanol elde etmiştir.

Mevcut çalışmada, yukarıdaki çalışmalar ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, MA konsantrasyonu 0.4 g/L'den 1 g/L'ye artırıldığında, biyobütanol konsantrasyonu 4.67±0.530 g/L'den 8.33±0.350 g/L'ye yükselmiştir. Bu belirgin artış, mikсотrofik *D. salina*'nın mikrobiyal büyümeyi ve biyobütanol üretimini destekleyen maddeler içermesinden kaynaklanabilir, çünkü mikroalglerin bileşimi büyüme koşullarıyla ilişkili olabilir (Liyanaarachchi vd. 2021). Örneğin, Morowvat ve Ghasemi (2016), *D. salina*'nın β-karoten ve biyokütle içeriğinin, Johnson ortamıyla karşılaştırıldığında, mikсотrofik yetiştirmede sırasıyla 1.95 ve 1.75 kat arttığını göstermiştir.

Bu sonuçlara göre, mevcut çalışma literatür ile karşılaştırıldığında, *D. salina* biyokütlesine herhangi bir asit veya baz ön işleme uygulanmadığından ve kimyasal kirletici kullanılmadan verimli biyobütanol üretimi gerçekleştirildiğinden, çevre dostu bir yaklaşım önermektedir.

5.2.5 Miksotrofik mikroalgal biyokütle konsantrasyonunun ve fermentasyon süresinin biyobütanol üretimine etkisi

Mikroalglerin başlangıç konsantrasyonu, biyobütanol konsantrasyonu, üretkenlik, verim ve şeker tüketimi için önemli bir parametredir. Bu çalışmada biyobütanol üretimi için 1 g/L MA'da yetiştirilen mikroalg biyokütlesinin artan konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. Mikroalg konsantrasyonu, 100 g/L'den 200 g/L'ye yükseldiğinde, biyobütanol konsantrasyonunda hafif artış gözlenmiştir. Ancak, biyokütle konsantrasyonu 300 g/L olduğunda keskin bir düşüş gözlenmiştir. Bu azalma, bu çalışmada kullanılan *D. salina*'nın yüksek protein içeriğine sahip olması nedeniyle, yüksek alg biyokütle konsantrasyonlarının kullanılması sonucunda salınan proteine bağlı bileşikler nedeniyle biyobütanol üretiminin engellenmesi ile açıklanabilir. Wang vd. (2016) çalışmasında yüksek mikroalg biyokütle konsantrasyonu sonucu açığa çıkan protein bazlı bileşiklerin biyobütanol üretimini inhibe ettiğini göstermiştir.

Literatürde benzer etkilere sahip çalışmalar mevcuttur. Cheng vd. (2015) substrat olarak biyodizel üretiminden sonra elde edilen 300 g/L mikroalg kalıntısı kullanıldığında en iyi biyobütanol konsantrasyonunun 3.86 g/L olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca 100, 150, 200 ve 250 g/L mikroalg biyokütlesi içeren ortamlar sırasıyla 3.35 g/L, 1.45 g/L, 2.75 g/L ve 2.42 g/L biyobütanol ile sonuçlanmıştır.

Ellis vd. (2012), farklı alg konsantrasyonları arasında ABE üretimi için optimum alg konsantrasyonunu 100 g/L olarak belirlemiştir. Ayrıca yaptıkları çalışmada ön işlem görmemiş %10 alg ile 0.52 g/L biyobütanol elde ederken, %1 glukoz katkılı %10 ön işlem görmüş alg biyokütlesi ile bu konsantrasyon 5.61 g/L'ye yükselmiştir. Mevcut çalışmada literatüre göre daha yüksek biyobütanol ve ABE konsantrasyonlarının sırasıyla 11.88 ± 0.617 g/L ve 13.89 ± 0.615 g/L olarak belirlendiği açıkça görülmektedir.

ABE fermentasyonunda toplam ABE (aseton:butanol:etanol) oranı tipik olarak 3:6:1'dir. Bu çalışmada, biyobütanol üretimi mikroalg biyokütle katkılı P2 besiyeri ile desteklenmiş ve aseton, bütanol ve etanol oranı 1.16:8.55:0.29 olarak belirlenmiştir. Ayrıca bütanol:ABE oranı, 0.85 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, Hou vd. (2017)

deniz yosunu *L. digitata* hidrolizatı kullanarak yarı sentetik bir ortama göre daha yüksek bütanol:ABE oranı (0.85) gözlemlemiştir. Araştırmacılar, deniz yosunu *L. digitata*'nın *C. beijerinckii* DSM-6422'de biyobütanol üretimini, içeriğindeki flavonoidler ve fenolikler gibi bileşikler ile destekleyebileceğini vurgulamışlardır. Narayanasamy vd. (2020) 25 g/L başlangıç şekeri olan şeker kamışı küspe hidrolizatının fermantasyonu sonucunda toplam aseton, bütanol ve etanol oranı 2.6:7.2:0.6 belirlemiş ve şeker kamışı küspesinin fermantasyon sırasında biyobütanol üretiminin seçiciliğini arttırdığını belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, yeşil hindistan cevizi kabuğu hidrolizatı içeren kapalı bir fermantasyon ortamında ABE oranı 0.3:4.6:1 olarak belirlenmiştir (de Brito Bezerra vd. 2023). Araştırmacılar, fermantasyonun kapalı bir ortamda gerçekleşmesine bağlı olarak, ortamda CO₂ birikmesinin fermantasyon rotasını asetoasetat yerine, 3-hidroksibütiril-CoA üretimine yöneltmesini ve böylelikle biyobütanol konsantrasyonunun daha fazla artmasını sağladığını vurgulamışlardır.

Yukarıdaki çalışmalarda da belirtildiği gibi kullanılan ham maddelerin içerdiği yararlı bileşikler sayesinde bütanol:ABE oranı artırılabilir. Mevcut çalışmada da *D. salina* mikroalginin içerdiği ve fermantasyon sürecinde karbon akışını destekleyen bileşiklerin biyobütanol konsantrasyonunu ve oranını artırdığı açıkça görülmektedir.

5.2.6 Kinetik parametreler

Bu çalışmada standart P2 ortamı ve mikroalg katkılı P2 ortamı için biyobütanol üretkenliği, şeker tüketim oranı ve biyobütanol verimi gibi kinetik parametreler incelenmiştir. Çalışma sonucunda, mikroalg katkılı P2 ortamında 72 saat sonra şeker tüketim oranı, biyobütanol üretkenliği ve verimi % 48.13±2.228, 0.165±0.015 g/L/h ve 0.331±0.022 g/g'ye yükselmiştir.

Çalışmada biyobütanol verimindeki 0.121±0.006'dan 0.331±0.022 g/g'ye belirgin artış kısmen, mikroalg katkılı P2 ortamındaki daha yüksek bütanol:ABE oranı ile ilişkilidir. *D. salina* biyokütlesindeki flavonoidler ve fenolikler gibi karbon akışını destekleyen

faydalı bileşiklerin varlığı (Murthy vd. 2005, Singh vd. 2019), biyobütanol üretim yolunu desteklemiş olabilir (Hou vd. 2017).

Ayrıca literatürdeki bazı çalışmalar, mikroalgal biyokütlenin, biyobütanolün üretkenliğini, verimini ve toplam ABE konsantrasyonunu iyileştirdiğini göstermektedir. Örneğin, Onay (2020a) optimum koşullarda yetiştirilen *N. gaditana*'dan 20 g/L başlangıç şeker içeriği ile 0.145 ± 0.01 g/g şeker biyobütanol verimi elde etmiştir. Diğer bir çalışmada, Ellis vd. (2012), %1 glukoz ile takviye edilmiş, ön işleme maruz bırakılmış atık su alg ortamının fermantasyonundan 0.208 g/g biyobütanol verimi ve 0.059 g/L/h biyobütanol üretkenliği elde etmiştir. Cheng vd. (2015)'nin çalışmalarında ise biyodizel üretimi sonrası elde edilen farklı konsantrasyonlardaki mikroalg kalıntılarından en yüksek biyobütanol verimi 100 g/L'de 0.3 ± 0.02 g/g karbonhidrat olarak belirlenmiştir. Bu literatür çalışmalarına göre, mevcut çalışmada optimizasyon çalışmaları ile elde edilen nihai biyobütanol verimi (0.331 g/g) ve üretkenliği (0.165 g/L/h) literatürdeki diğer çalışmalara kıyasla oldukça yüksektir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmasında hem ikinci nesil ham madde olan EÇAT'tan hem de üçüncü nesil ham madde olan *D. salina* biyokütlesinden biyobütanol üretiminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amacın temel motivasyonu, sürdürülebilir, çevre dostu, uygun maliyetli ve verimi yüksek biyobütanol üretimi gerçekleştirmektedir. Çalışma sonucunda her iki kaynağında biyobütanol üretimi için etkili birer ham madde olduğu gösterilmiştir. Buna göre, çalışmanın ilk kısmında, 40 g/L EÇAT şekeri içeren fermantasyon ortamında en yüksek toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonu 7.82 g/L ve 4.35 g/L olarak belirlenmiştir. Azot ve mineral tuzlarının optimizasyon çalışmaları sonucunda 40 g/L EÇAT şekeri ile elde edilen toplam ABE ve biyobütanol konsantrasyonu 9.73 g/L ve 6.21 g/L'ye yükselmiştir. Ayrıca, standart P2 ortamı ile karşılaştırıldığında, biyobütanol verimi ve üretkenliği 96 saat sonunda sırasıyla 0.109 g/g'den 0.258 g/g'ye ve 0.033 g/L/h'den 0.065 g/L/h'ye yükselmiştir. Dolayısıyla bu çalışma, EÇAT'ın sürdürülebilir biyobütanol üretimi için umut verici bir ham madde olduğunu göstermektedir.

Tez çalışmasının ikinci kısmında, literatürde ilk kez MA'nın mikсотrofik mikroalg kültürasyonunda etkili, sürdürülebilir ve kullanılabilir bir ham madde olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Biyoyakıt üretiminde üçüncü nesil ham madde miktarının artırılması için mikсотrofik kültürasyon şekili sıklıkla kullanılmaktadır. Bu anlamda MA ile mikсотrofik olarak yetiştirilen *D. salina*, ham biyokütle olarak veya üçüncü nesil biyobütanol üretimi için ABE fermantasyon ortamında destekleyici malzeme olarak kullanılabilir.

MA ile yapılan deneyler sonucunda, en yüksek mikroalg konsantrasyonu, kültürasyon ortamına 1 g/L MA eklendiğinde 0.481 g/L olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, MA'nın *D. salina* yetiştiriciliği için etkili bir substrat olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Ayrıca, optimizasyon çalışmaları sonucunda en yüksek biyobütanol ve toplam ABE konsantrasyonları 200 g/L mikroalgal biyokütle katkılı P2 besiyerinde sırasıyla 11.88 g/L

ve 13.89 g/L olarak belirlenmiştir. Standart P2 ortamına kıyasla biyobütanol üretkenliği ve verimi 72 saat sonunda sırasıyla 0.045 g/L/h'den 0.165 g/L/h'ye ve 0.121 g/g'den 0.331 g/g'ye yükselmiştir. Bu nedenle, mevcut çalışma, *D. salina*'nın sürdürülebilir biyobütanol üretimi için gelecek vadeden bir substrat olduğunu göstermiştir.

Tez çalışması sonucunda EÇAT veya *D. salina* biyokütlesinin kullanımı ile üretilen biyobütanol, sadece biyoyakıt olarak değil, boya, tekstil, ilaç ve kimya gibi alanlarda çözücü ve plastikleştirici olarak da kullanılabilir (Ranjan ve Moholkar 2012). Biyobütanolün tarihsel geçmişine bakıldığında antibiyotik, hormon gibi ilaçların yapımı ve kozmetik ürünlerde solvent olarak kullanımı, boya ve tekstil alanında plastikleştirici ve yapıştırıcı olarak kullanımı, otomotiv sektöründe vernik yapımında kullanımı gibi bir çok sektörde önemli bir madde görevindedir (Bankar vd. 2013). Bu anlamda, tez çalışmasının yaklaşımı ile yüksek konsantrasyonlarda biyobütanol üretimi sayesinde belirtilen alanlardaki solvent ihtiyacının karşılanabileceği öngörülmektedir.

Tez çalışması ile umut vadeden sonuçların elde edilmesi, EÇAT veya *D. salina* biyokütlesinin kullanılabilirliğini göstermiştir. Ancak elde edilen sonuçlar, damıtma, genetik ve metabolizma mühendisliği çalışmaları gibi uygulamalarla iyileştirilebilir. Örneğin, doğal biyobütanol üreticisi *Clostridium* türleri, %2 oranında bütanol konsantrasyonunu tolere edebilmekte, daha yüksek konsantrasyonlarda ise hücre membran yapısı bozularak hücre dejenerasyona uğramaktadır (Pugazhendhi vd. 2019, Ranjan ve Moholkar 2012). Bu durumun üstesinden gelebilmek için en iyi yöntemlerden biri, üretilen biyobütanolün devamlı olarak ortamdan gaz sıyırma, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, adsorpsiyon gibi metodlar ile geri dönüştürülmesi olabilir (Xue vd. 2017). Bu yöntem mevcut çalışmanın yaklaşımına entegre edildiğinde, daha yüksek konsantrasyonlarda biyobütanol üretiminin gerçekleştirilebileceği ön görülmektedir. Ayrıca son yıllarda *Clostridium* türlerinin bütanole olan toleransını artırmak için genetik uygulamalı çalışmalar yapılmaktadır (Rao vd. 2016). Böyle bir suşun kullanımının biyobütanol konsantrasyonunu artırabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, mevcut çalışmada *D. salina* biyokütlesi ile desteklenmiş P2 ortamında bütanol:ABE oranı teorik orana göre oldukça yüksektir. Bu durum *D. salina*'nın içeriğindeki yararlı bileşiklerin fermentasyonu yolunu çoğunlukla biyobütanol üretimine çevirmesi olarak açıklanmıştır.

Bu yaklaşım ile biyobütanol üretiminin daha da artırılabilceğı açıktır. Ayrıca, metabolizma mühendisliğı ile, doğal suşların ABE fermantasyonu yolunda görev alan enzimlerin düzenlenmesi ve genetik modifikasyonlar biyobütanol konsantrasyonunu diğler üretilen ürünlere kıyasla artırabilir. Bu uygulamaların mevcut çalışmaya entegre edilmesinin böylelikle daha yüksek biyobütanol eldesi sağlayacağı öngörülmektedir.

Mevcut çalışmada, EÇAT'nın artan konsantrasyonlarında tannik asitin yüksek miktarlarının mikrobiyel gelişimi ve biyobütanol üretimini etkileyebildiğı öne sürülmüştür. Bu durum aktif karbon kullanımı, kireçle muamele gibi detoksifikasyon yöntemleri kullanılarak inhibe edici bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılması ile giderilebilir (Ebrahimian vd. 2022). Buna göre, mevcut tez çalışmasında olduğı gibi EÇAT sürdürülebilir bir şekilde kullanımı için detoksifikasyon yöntemleri ile daha yüksek konsantrasyonlarda biyobütanol üretimini sağlanabileceğı söylenebilmektedir.

Ayrıca literatürde sakkarifikasyonun ve biyobütanol üretiminin artırılması için çeşitli fermantasyon stratejileri kullanılmaktadır (Nagarajan vd. 2019). Mevcut çalışmada, EÇAT ile gerçekleştirilen deneylerde SHF stratejisi kullanılırken, *D. salina* biyokütlesi herhangi bir sakkarifikasyon yöntemi olmadan direkt fermentasyon için kullanılmıştır. Buna göre, özellikle lignoselülozik ham maddeler için selüloz veya hemiselüloz sindirimini sağlayan enzimleri sentezleyen mikroorganizmalar ile ko-kültür yaklaşımı kullanılabilir veya metabolizma ve genetik mühendisliğı ile geliştirilmiş hem enzim sentezleyebilen hem de fermantasyonu gerçekleştiren tek bir türün kullanıldığı CBP stratejisi bu çalışmanın yaklaşımı ile değerlendirilebilir (Xin vd. 2019). Böylelikle hem maliyet hem de verim açısından yüksek bir katkı sağlanabileceğı düşünülmektedir.

Yukarıda belirtilen öneriler doğrultusunda, mevcut tez çalışması bir çok alan ile entegre edilip, hem biyoyakıt olarak hem de çeşitli alanlarda kullanılan bir madde olarak yüksek konsantrasyonda biyobütanol üretiminin gerçekleştirilebileceğı açıktır. Bu çalışma, ileride yapılacak çalışmalar için önemli bir fizibilite örneğı olup, ülkemizde büyük ölçekli biyobütanol üretimini destekleyen etkili bir adımdır.

KAYNAKLAR

- Abo, B. O., Gao, M., Wang, Y., Wu, C., Wang, Q., ve Ma, H. 2019. Production of butanol from biomass: recent advances and future prospects. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 20164-20182.
- Abreu, A. P., Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J., ve Dragone, G. 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource technology*, 118, 61-66.
- Abubackar HN Veiga MC ve Kennes C. 2015. Ethanol and acetic acid production from carbon monoxide in a *Clostridium* strain in batch and continuous gas-fed bioreactors. *Int J Environ Res Public Health*. 12(1):1029-43.
- Aftab, M. N., Iqbal, I., Riaz, F., Karadag, A., ve Tabatabaei, M. 2019. Different pretreatment methods of lignocellulosic biomass for use in biofuel production. *Biomass for bioenergy-recent trends and future challenges*, 1-24.
- Ahlawat, S., Kaushal, M., Palabhanvi, B., Muthuraj, M., Goswami, G., ve Das, D. 2019. Nutrient modulation based process engineering strategy for improved butanol production from *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Progress*, 35(2), e2771.
- Akhtar, N., Gupta, K., Goyal, D., ve Goyal, A. 2016. Recent advances in pretreatment technologies for efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Environmental Progress ve Sustainable Energy*, 35(2), 489-511.
- Alalwan, H. A., Alminshid, A. H., ve Aljaafari, H. A. 2019. Promising evolution of biofuel generations. Subject review. *Renewable Energy Focus*, 28, 127-139.
- Aldred, E. M. 2008. *Pharmacology: a handbook for complementary healthcare professionals*. Churchill Livingstone Elsevier, 339, China.
- Alfani, F., Gallifuoco, A., Saporosi, A., Spera, A., ve Cantarella, M. 2000. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 184-192.
- Al-Shorgani, N. K. N., Mohd, S. K., ve Wan, M. 2011. The effect of different carbon sources on biobutanol production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Biotechnology*, 10(3), 280-285.
- Amiri, H., ve Karimi, K. 2018. Pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic wastes for butanol production: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*, 270, 702-721.
- Ask, M., Olofsson, K., Di Felice, T., Ruohonen, L., Penttilä, M., Lidén, G., ve Olsson, L. 2012. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo*

donax revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process biochemistry*, 47(10), 1452-1459.

- Avcı, A., Kamiloğlu, A., ve Dönmez, S. 2023. Efficient production of acetone butanol ethanol from sole fresh and rotten potatoes by various *Clostridium* strains. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(5), 4161-4169.
- Avula, S. V., Reddy, S., ve Reddy, L. V. 2015. The feasibility of mango (*Mangifera indica* L.) peel as an alternative substrate for butanol production. *BioResources*, 10(3), 4453-4459.
- Azadi, P., Inderwildi, O. R., Farnood, R., ve King, D. A. 2013. Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 506-523.
- Bankar, S. B., Survase, S. A., Ojamo, H., ve Granström, T. 2013. Biobutanol: the outlook of an academic and industrialist. *Rsc Advances*, 3(47), 24734-24757.
- Barton, D. ve Meth-Cohn, O. (Eds.). 1999. *Comprehensive natural products chemistry*. Elsevier, 768, USA.
- Baruah, J., Nath, B. K., Sharma, R., Kumar, S., Deka, R. C., Baruah, D. C., ve Kalita, E. 2018. Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Frontiers in Energy Research*, 6, 141.
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., ve Kumar, S. 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and sustainable energy reviews*, 36, 91-106.
- Benaïmeche, O., Seghir, N. T., Sadowski, Ł., ve Mellas, M. 2020. The utilization of vegetable fibers in cementitious materials, In: *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Elsevier Reference Collection.
- Bhatia, S. K., Ahuja, V., Chandel, N., Gurav, R., Bhatia, R. K., Govarthanan, M., ... ve Yang, Y. H. 2022. Advances in algal biomass pretreatment and its valorisation into biochemical and bioenergy by the microbial processes. *Bioresource Technology*, 358, 127437.
- Bhatia, S. K., Jagtap, S. S., Bedekar, A. A., Bhatia, R. K., Patel, A. K., Pant, D., ... ve Yang, Y. H. 2020. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource technology*, 300, 122724.
- Bhattacharyya, A., Jain, A., & Rajagopalan, G. (2023). Biobutanol production from food crops. In *Advances and Developments in Biobutanol Production*. Woodhead Publishing, 245-260.

- Borand, M. N., ve Karaosmanoğlu, F. 2018. Effects of organosolv pretreatment conditions for lignocellulosic biomass in biorefinery applications: a review. *Journal of renewable and sustainable energy*, 10(3).
- Bredda, E. H., Da Silva, A. F., Silva, M. B., ve Da Rós, P. C. M. 2020. Mixture design as a potential tool in modeling the effect of light wavelength on *Dunaliella salina* cultivation: an alternative solution to increase microalgae lipid productivity for biodiesel production. *Preparative Biochemistry ve Biotechnology*, 50(4), 379-389.
- Brown, L. M. 1996. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. *Energy Conversion and Management*, 37(6-8), 1363-1367.
- Castillo, T., Ramos, D., García-Beltrán, T., Brito-Bazan, M., ve Galindo, E. 2021. Mixotrophic cultivation of microalgae: an alternative to produce high-value metabolites. *Biochemical Engineering Journal*, 176, 108183.
- Castro, Y. A., Ellis, J. T., Miller, C. D., ve Sims, R. C. 2015. Optimization of wastewater microalgae saccharification using dilute acid hydrolysis for acetone, butanol, and ethanol fermentation. *Applied Energy*, 140, 14-19.
- Cavelius, P., Engelhart-Straub, S., Mehlmer, N., Lercher, J., Awad, D., ve Brück, T. 2023. The potential of biofuels from first to fourth generation. *PLoS Biology*, 21(3), e3002063.
- Chaturvedi, V., ve Verma, P. 2013. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. *3 Biotech*, 3, 415-431.
- Chaudhari, S. M., ve Meshram, R. B. 2021. A Comparative Life Cycle Assessment (LCA) of Gasoline Blending with Different Oxygenates in India. *Nature Environment and Pollution Technology*, 20(5), 1947-1958.
- Chavoshi, Z. Z., ve Shariati, M. 2019. Lipid production in *Dunaliella bardawil* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Brazilian Journal of Oceanography*, 67.
- Cheah, W. Y., Sankaran, R., Show, P. L., Ibrahim, T., Baizura, T. N., Chew, K. W., ... ve Chang, J. S. 2020. Pretreatment methods for lignocellulosic biofuels production: current advances, challenges and future prospects. *Biofuel Research Journal*, 7(1), 1115-1127.
- Cheawchanlertfa, P., Sutheeworapong, S., Jenjaroenpun, P., Wongsurawat, T., Nookaew, I., Cheevadhanarak, S., ... ve Tachaapaikoon, C. 2020. *Clostridium manihotivorum* sp. nov., a novel mesophilic anaerobic bacterium that produces cassava pulp-degrading enzymes. *PeerJ*, 8, e10343.

- Cheng, H. H., Whang, L. M., Chan, K. C., Chung, M. C., Wu, S. H., Liu, C. P., ... ve Lee, W. J. 2015. Biological butanol production from microalgae-based biodiesel residues by *Clostridium acetobutylicum*. *Bioresource technology*, 184, 379-385.
- Çağlar, A. ve Demirbas, A. 2001. Hydrogen-rich gaseous products from tea waste by pyrolysis. *Energy Sources*, 23(8), 739-746.
- Çelekli, A., Bozkurt, H., ve Dönmez, G. 2014. Predictive modeling of β -carotene accumulation by *Dunaliella salina* as a function of pH, NaCl, and irradiance. *Russian journal of plant physiology*, 61, 215-223.
- Dai, J., Wu, Y., Chen, S. W., Zhu, S., Yin, H. P., Wang, M., ve Tang, J. 2010. Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. *Carbohydrate polymers*, 82(3), 629-635.
- Dalal, J., Das, M., Joy, S., Yama, M., ve Rawat, J. 2019. Efficient isopropanol-butanol (IB) fermentation of rice straw hydrolysate by a newly isolated *Clostridium beijerinckii* strain C-01. *Biomass and Bioenergy*, 127, 105292.
- de Brito Bezerra, P. K. S., de Azevedo, J. C. S., ve dos Santos, E. S. 2023. Biobutanol production by batch and fed-batch fermentations from the green coconut husk hydrolysate using *C. beijerinckii* ATCC 10132. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-13.
- de Melo, R. G., de Andrade, A. F., Bezerra, R. P., Correia, D. S., de Souza, V. C., Brasileiro-Vidal, A. C., ... ve Porto, A. L. F. 2018. *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. *Chemosphere*, 204, 344-350.
- de Souza Celente, G., Rizzetti, T. M., Sui, Y., ve de Souza Schneider, R. D. C. 2022. Potential use of microalga *Dunaliella salina* for bioproducts with industrial relevance. *Biomass and Bioenergy*, 167, 106647.
- Demiray, E., Açikel, E., Ertuğrul Karatay, S., ve Dönmez, G. 2022. *Saccharomyces cerevisiae* and newly isolated *Candida boidinii* co-fermentation of industrial tea waste for improved bioethanol production. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 44(1), 1160-1172.
- Devi, J., Deb, U., Barman, S., Das, S., Bhattacharya, S. S., Tsang, Y. F., ... ve Kim, K. H. 2020. Appraisal of lignocellulosic biomass degrading potential of three earthworm species using vermireactor mediated with spent mushroom substrate: compost quality, crystallinity, and microbial community structural analysis. *Science of the Total Environment*, 716, 135215.
- Dickinson, S., Mientus, M., Frey, D., Amini-Hajibashi, A., Ozturk, S., Shaikh, F., ... ve El-Halwagi, M. M. 2017. A review of biodiesel production from microalgae. *Clean technologies and environmental policy*, 19(3), 637-668.

- Dostalek, P., Patzak, M., ve Matejka, P. 2004. Influence of specific growth limitation on biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *International biodeterioration ve biodegradation*, 54(2-3), 203-207.
- Du, G., Zhu, C., Xu, M., Wang, L., Yang, S. T., ve Xue, C. 2021. Energy-efficient butanol production by *Clostridium acetobutylicum* with histidine kinase knockouts to improve strain tolerance and process robustness. *Green Chemistry*, 23(5), 2155-2168.
- Dutta, K., Daverey, A., ve Lin, J. G. 2014. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable energy*, 69, 114-122.
- Dziemianowicz, W., Kotarska, K., ve Świerczyńska, A. 2022. Increase Butanol Production from Corn Straw by Mineral Compounds Supplementation. *Energies*, 15(19), 6899.
- Ebrahimian, F., Denayer, J. F., Mohammadi, A., Khoshnevisan, B., ve Karimi, K. 2022. A critical review on pretreatment and detoxification techniques required for biofuel production from the organic fraction of municipal solid waste. *Bioresource technology*, 128316.
- Efremenko, E. N., Nikolskaya, A. B., Lyagin, I. V., Senko, O. V., Makhlis, T. A., Stepanov, N. A., ... ve Varfolomeev, S. D. 2012. Production of biofuels from pretreated microalgae biomass by anaerobic fermentation with immobilized *Clostridium acetobutylicum* cells. *Bioresource technology*, 114, 342-348.
- Elizondo, A. M., Mercado, E. C., Rabinovitz, B. C., ve Fernandez-Miyakawa, M. E. 2010. Effect of tannins on the in vitro growth of *Clostridium perfringens*. *Veterinary microbiology*, 145(3-4), 308-314.
- Ellis, J. T., Hengge, N. N., Sims, R. C., ve Miller, C. D. 2012. Acetone, butanol, and ethanol production from wastewater algae. *Bioresource technology*, 111, 491-495.
- Ezeji, T. C., Qureshi, N., ve Blaschek, H. P. 2007. Production of acetone butanol (AB) from liquefied corn starch, a commercial substrate, using *Clostridium beijerinckii* coupled with product recovery by gas stripping. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(12), 771-777.
- Ezeji, T. C., Qureshi, N., ve Blaschek, H. P. 2007. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current opinion in biotechnology*, 18(3), 220-227.
- Farmanbordar, S., Karimi, K., ve Amiri, H. 2018. Municipal solid waste as a suitable substrate for butanol production as an advanced biofuel. *Energy conversion and management*, 157, 396-408.

- Figuerola-Torres, G. M., Mahmood, W. M. A. W., Pittman, J. K., ve Theodoropoulos, C. 2020. Microalgal biomass as a biorefinery platform for biobutanol and biodiesel production. *Biochemical Engineering Journal*, 153, 107396.
- Fu, D., ve Mazza, G. 2011. Optimization of processing conditions for the pretreatment of wheat straw using aqueous ionic liquid. *Bioresource technology*, 102(17), 8003-8010.
- Gallardo, R., Alves, M., ve Rodrigues, L. R. 2017. Influence of nutritional and operational parameters on the production of butanol or 1, 3-propanediol from glycerol by a mutant *Clostridium pasteurianum*. *New biotechnology*, 34, 59-67.
- García, V., Pääkilä, J., Ojamo, H., Muurinen, E., ve Keiski, R. L. 2011. Challenges in biobutanol production: how to improve the efficiency?. *Renewable and sustainable energy reviews*, 15(2), 964-980.
- Gauss, W. F., Suzuki, S., ve Takagi, M. 1976. U.S. Patent No. 3,990,944. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Germec, M., ve Turhan, I. 2018. Ethanol production from acid-pretreated and detoxified tea processing waste and its modeling. *Fuel*, 231, 101-109.
- Germec, M., Ozcan, A., ve Turhan, I. 2020. Chemical characterization of acid-pretreated renewable resources: effect of pretreatment time. *Biofuels*, 1-11.
- Germec, M., Tarhan, K., Yatmaz, E., Tetik, N., Karhan, M., Demirci, A., ve Turhan, I. 2016. Ultrasound-assisted dilute acid hydrolysis of tea processing waste for production of fermentable sugar. *Biotechnology progress*, 32(2), 393-403.
- Gouveia, L. 2011. *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*. Springer Heidelberg, 1-69, New York.
- Guo, T., Tang, Y., Zhang, Q. Y., Du, T. F., Liang, D. F., Jiang, M. ve Ouyang, P. K. 2012. *Clostridium beijerinckii* mutant with high inhibitor tolerance obtained by low-energy ion implantation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(3), 401-407.
- Harde, S. M., Jadhav, S. B., Bankar, S. B., Ojamo, H., Granström, T., Singhal, R. S., ve Survase, S. A. 2016. Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using the root hydrolysate after extraction of forskolin from *Coleus forskohlii*. *Renewable energy*, 86, 594-601.
- He, S., Fan, X., Katukuri, N. R., Yuan, X., Wang, F., ve Guo, R. B. 2016. Enhanced methane production from microalgal biomass by anaerobic bio-pretreatment. *Bioresource Technology*, 204, 145-151.

- Hebhoub, H., Aoun, H., Belachia, M., Houari, H., ve Ghorbel, E. 2011. Use of waste marble aggregates in concrete. *Construction and Building Materials*, 25(3), 1167-1171.
- Heidari, F., Asadollahi, M. A., Jeihamipour, A., Kheyrandish, M., Rismani-Yazdi, H., ve Karimi, K. Biobutanol production using unhydrolyzed waste acorn as a novel substrate. *RSC Adv* 2016; 6: 9254–60.
- Hosseini Tafreshi, A., ve Shariati, M. 2009. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of applied microbiology*, 107(1), 14-35.
- Hou, Q., Ju, M., Li, W., Liu, L., Chen, Y., ve Yang, Q. 2017. Pretreatment of lignocellulosic biomass with ionic liquids and ionic liquid-based solvent systems. *Molecules*, 22(3), 490.
- Hou, X., From, N., Angelidaki, I., Huijgen, W. J., ve Bjerre, A. B. 2017. Butanol fermentation of the brown seaweed *Laminaria digitata* by *Clostridium beijerinckii* DSM-6422. *Bioresource technology*, 238, 16-21.
- Huang, H., Singh, V., ve Qureshi, N. 2015. Butanol production from food waste: a novel process for producing sustainable energy and reducing environmental pollution. *Biotechnology for biofuels*, 8, 1-12.
- Huisheng, L. Ü., Miaomiao, R. E. N., ZHANG, M., ve Ying, C. H. E. N. 2013. Pretreatment of corn stover using supercritical CO₂ with water-ethanol as co-solvent. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 21(5), 551-557.
- Husin, H., Ibrahim, M. F., Kamal Bahrin, E., & Abd-Aziz, S. (2019). Simultaneous saccharification and fermentation of sago hampas into biobutanol by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Energy Science & Engineering*, 7(1), 66-75.
- Huzir, N. M., Aziz, M. M. A., Ismail, S. B., Abdullah, B., Mahmood, N. A. N., Umor, N. A., ve Muhammad, S. A. F. A. S. 2018. Agro-industrial waste to biobutanol production: Eco-friendly biofuels for next generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94, 476-485.
- Ibrahim, M. F., Kim, S. W., ve Abd-Aziz, S. 2018. Advanced bioprocessing strategies for biobutanol production from biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 1192-1204.
- Ibrahim, M. I., Sapuan, S. M., Zainudin, E. S., ve Zuhri, M. Y. M. 2019. Extraction, chemical composition, and characterization of potential lignocellulosic biomasses and polymers from corn plant parts. *BioResources*, 14(3), 6485-6500.
- Jang, Y. S. Malaviya, A. Cho, C. Lee, J. ve Lee, S. Y. 2012. Butanol production from renewable biomass by clostridia. *Bioresource technology*, 123, 653-663.

- Jernigan, A., May, M., Potts, T., Rodgers, B., Hestekin, J., May, P. I., ... ve Hestekin, C. 2013. Effects of drying and storage on year-round production of butanol and biodiesel from algal carbohydrates and lipids using algae from water remediation. *Environmental Progress ve Sustainable Energy*, 32(4), 1013-1022.
- Ji, M. K., Yun, H. S., Hwang, B. S., Kabra, A. N., Jeon, B. H., ve Choi, J. 2016. Mixotrophic cultivation of *Nephroselmis* sp. using industrial wastewater for enhanced microalgal biomass production. *Ecological engineering*, 95, 527-533.
- Jin, Y., Ding, F., Wang, J., Yi, Z., Gao, Y., Yang, L., ... ve Zhao, H. 2022. One-step conversion of sweet potato waste to butanol via fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-12.
- Jin, C., Yao, M., Liu, H., Chia-fon, F. L., ve Ji, J. 2011. Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renewable and sustainable energy reviews*, 15(8), 4080-4106.
- Johnson, M. K., Johnson, E. J., MacElroy, R. D., Speer, H. L., ve Bruff, B. S. 1968. Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology*, 95(4), 1461-1468.
- Jones, D. T., ve Woods, D. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological reviews*, 50(4), 484-524.
- Joo, G., Lee, W., ve Choi, Y. 2021. Heavy metal adsorption capacity of powdered *Chlorella vulgaris* biosorbent: effect of chemical modification and growth media. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 25390-25399.
- Joshi, S. M., Waghmare, J. S., Sonawane, K. D., ve Waghmare, S. R. 2015. Bio-ethanol and bio-butanol production from orange peel waste. *Biofuels*, 6(1-2), 55-61.
- Kaczmarek, B. 2020. Tannic Acid with Antiviral and Antibacterial Activity as A Promising Component of Biomaterials” A Minireview. *Materials*, 13 (14), 3224.
- Kallarakkal, K. P., Muthukumar, K., Alagarsamy, A., Pugazhendhi, A., ve Mohamed, S. N. 2021. Enhancement of biobutanol production using mixotrophic culture of *Oscillatoria* sp. in cheese whey water. *Fuel*, 284, 119008.
- Karthick, C., ve Nanthagopal, K. 2021. A comprehensive review on ecological approaches of waste to wealth strategies for production of sustainable biobutanol and its suitability in automotive applications. *Energy Conversion and Management*, 239, 114219.
- Kassim, M. A., Ramli, S. H., ve Meng, T. K. 2022. Analysis of microalgal growth kinetic model and carbohydrate biosynthesis cultivated using agro-industrial waste residuals as carbon source. *Preparative biochemistry ve biotechnology*, 52(5), 514-524.

- Katahira, R., Elder, T. J., ve Beckham, G. T. 2018. A brief introduction to lignin structure, In book: Lignin Valorization., Royal Society of Chemistry, 1-20, United States.
- Kaya, H., Çelebi, Ş., Kaya, A., ve Gül, M. 2018. Use of water-treated black tea waste instead of wheat bran in laying hen diets. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47.
- Kazemi Shariat Panahi, H., Dehghani, M., Kinder, J. E., ve Ezeji, T. C. 2019. A review on green liquid fuels for the transportation sector: a prospect of microbial solutions to climate change. *Biofuel Research Journal*, 6(3), 995-1024.
- Khan, M. U., Usman, M., Ashraf, M. A., Dutta, N., Luo, G., ve Zhang, S. 2022. A review of recent advancements in pretreatment techniques of lignocellulosic materials for biogas production: Opportunities and Limitations. *Chemical Engineering Journal Advances*, 10, 100263.
- Khedkar, M. A., Nimbalkar, P. R., Gaikwad, S. G., Chavan, P. V., & Bankar, S. B. 2017a. Sustainable biobutanol production from pineapple waste by using *Clostridium acetobutylicum* B 527: drying kinetics study. *Bioresource technology*, 225, 359-366.
- Khedkar, M. A., Nimbalkar, P. R., Chavan, P. V., Chendake, Y. J., ve Bankar, S. B. 2017b. Cauliflower waste utilization for sustainable biobutanol production: revelation of drying kinetics and bioprocess development. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40, 1493-1506.
- Kim, D. 2018. Physico-chemical conversion of lignocellulose: inhibitor effects and detoxification strategies: a mini review. *Molecules*, 23(2), 309.
- Kim, M. S., Baek, J. S., Yun, Y. S., Sim, S. J., Park, S., ve Kim, S. C. 2006. Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: anaerobic conversion and photosynthetic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(6), 812-816.
- Kiyoshi, K., Furukawa, M., Seyama, T., Kadokura, T., Nakazato, A. ve Nakayama, S. 2015. Butanol production from alkali-pretreated rice straw by co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Bioresource technology*, 186, 325-328.
- Knoshaug, E. P. ve Zhang, M. 2009. Butanol tolerance in a selection of microorganisms. *Applied biochemistry and biotechnology*, 153, 13-20.
- Ko, F. K., Goudarzi, A., Lin, L. T., Li, Y., ve Kadla, J. F. 2016. Lignin-based composite carbon nanofibers. *Lignin in polymer composites*, 167-194.
- Komonkiat, I., ve Cheirsilp, B. 2013. Felled oil palm trunk as a renewable source for biobutanol production by *Clostridium* spp. *Bioresource technology*, 146, 200-207.

- Köpke, M. Held, C. Hujer, S. Liesegang, H. Wiezer, A. Wollherr, A. ... ve Dürre, P. 2010. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(29), 13087-13092.
- Kumar, N., ve Das, D. 2000. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochemistry*, 35(6), 589-593.
- Kumar, N., Dixit, A. 2021. Management of biomass, In: *Nanotechnology for Rural Development*. Kumar, N., Dixit, A. (eds). Elsevier, 97-140.
- Kumari, D., ve Singh, R. 2018. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, 877-891.
- Kumudha, A., ve Sarada, R. 2016. Characterization of vitamin B 12 in *Dunaliella salina*. *Journal of food science and technology*, 53, 888-894.
- Kushwaha, D., Srivastava, N., Prasad, D., Mishra, P. K., ve Upadhyay, S. N. 2020. Biobutanol production from hydrolysates of cyanobacteria *Lyngbya limnetica* and *Oscillatoria obscura*. *Fuel*, 271, 117583.
- Law, L., ve Gutierrez, N. 2013. Butanol production by submerged fermentation of white grape pomace. *Current biotechnology*, 2(2), 114-116.
- Lee, J. D., Qi, Z., Foucher, A. C., Ngan, H. T., Dennis, K., Cui, J., ... ve Biener, J. 2022. Facilitating Hydrogen Dissociation over Dilute Nanoporous Ti–Cu Catalysts. *Journal of the American Chemical Society*, 144(37), 16778-16791.
- Lee, S. Y. Park, J. H. Jang, S. H. Nielsen, L. K. Kim, J. ve Jung, K. S. 2008. Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnology and bioengineering*, 101(2), 209-228.
- Li, T., Yan, Y., ve He, J. 2015. Enhanced direct fermentation of cassava to butanol by *Clostridium* species strain BOH3 in cofactor-mediated medium. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), 1-12.
- Linggang, S., Phang, L. Y., Wasoh, H., ve Abd-Aziz, S. 2013. Acetone–butanol–ethanol production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using sago pith residues hydrolysate. *Bioenergy Research*, 6, 321-328.
- Liu, X., Miao, R., Lindberg, P., ve Lindblad, P. 2019. Modular engineering for efficient photosynthetic biosynthesis of 1-butanol from CO₂ in cyanobacteria. *Energy ve Environmental Science*, 12(9), 2765-2777.
- Liyanaarachchi, V. C., Premaratne, M., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., ve Malik, A. (2021). Two-stage cultivation of microalgae for production of high-value compounds and biofuels: A review. *Algal Research*, 57, 102353.

- Lloyd, T. A., ve Wyman, C. E. 2005. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource technology*, 96(18), 1967-1977.
- Loyarkat, S., Cheirsilp, B., ve Umsakul, K. 2013. Decanter cake waste as a renewable substrate for biobutanol production by *Clostridium beijerinckii*. *Process Biochemistry*, 48(12), 1933-1941.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- Luo, W., Zhao, Z., Pan, H., Zhao, L., Xu, C., ve Yu, X. 2018. Feasibility of butanol production from wheat starch wastewater by *Clostridium acetobutylicum*. *Energy*, 154, 240-248.
- Lütke-Eversloh, T., ve Bahl, H. 2011. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current opinion in biotechnology*, 22(5), 634-647.
- Lynd, L. R., Van Zyl, W. H., McBride, J. E., ve Laser, M. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current opinion in biotechnology*, 16(5), 577-583.
- Mack, J. H. Schuler, D. Butt, R. H. ve Dibble, R. W. 2016. Experimental investigation of butanol isomer combustion in Homogeneous Charge Compression Ignition (HCCI) engines. *Applied Energy*, 165, 612-626.
- Maddox, I. S. 1989. The acetone-butanol-ethanol fermentation: recent progress in technology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 7(1), 189-220.
- Madiah, M. S., Ariff, A. B., Sahaid, K. M., Suraini, A. A., ve Karim, M. I. A. 2001. Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 567-576.
- Magalhães, B. L., Grassi, M. C. B., Pereira, G. A., ve Brocchi, M. 2018. Improved n-butanol production from lignocellulosic hydrolysate by *Clostridium* strain screening and culture-medium optimization. *Biomass and Bioenergy*, 108, 157-166.
- Maheshwari, N., Krishna, P. K., Thakur, I. S., ve Srivastava, S. 2020. Biological fixation of carbon dioxide and biodiesel production using microalgae isolated from sewage waste water. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 27319-27329.
- Malik, S., Shahid, A., Liu, C. G., Khan, A. Z., Nawaz, M. Z., Zhu, H., ve Mehmood, M. A. 2021. Developing fourth-generation biofuels secreting microbial cell factories for enhanced productivity and efficient product recovery; a review. *Fuel*, 298, 120858.

- Mata, T. M., Martins, A. A., ve Caetano, N. S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.
- Maurya, D. P., Singla, A., ve Negi, S. 2015. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*, 5, 597-609.
- Md Razali, N. A. A., Ibrahim, M. F., Kamal Bahrin, E., ve Abd-Aziz, S. 2018. Optimisation of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) for biobutanol production using pretreated oil palm empty fruit bunch. *Molecules*, 23(8), 1944.
- Mehmood, T., Nadeem, F., Meer, B., Ashraf, H., Meer, K., & Saeed, S. (2023). Biomass valorization to biobutanol. In *Valorization of Biomass to Bioproducts*. Elsevier, 151-178.
- Menon, V., ve Rao, M. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals ve biorefinery concept. *Progress in energy and combustion science*, 38(4), 522-550.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Miranda, J. R., Passarinho, P. C., ve Gouveia, L. 2012. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. *Bioresource technology*, 104, 342-348.
- Mirfakhar, M., Asadollahi, M. A., Amiri, H., ve Karimi, K. 2017. Phenolic compounds removal from sweet sorghum grain for efficient biobutanol production without nutrient supplementation. *Industrial crops and products*, 108, 225-231.
- Mohan, S. V., Rohit, M. V., Chiranjeevi, P., Chandra, R., ve Navaneeth, B. 2015. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: progress and perspectives. *Bioresource technology*, 184, 169-178.
- Mohanraj, S., Kodhaiyolii, S., Rengasamy, M., ve Pugalenthii, V. (2014). Green synthesized iron oxide nanoparticles effect on fermentative hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173, 318-331.
- Mohapatra, S., Mishra, R. R., Nayak, B., Behera, B. C., ve Mohapatra, P. K. D. 2020. Development of co-culture yeast fermentation for efficient production of biobutanol from rice straw: A useful insight in valorization of agro industrial residues. *Bioresource Technology*, 318, 124070.

- Monjed, M. K., Achour, B., Robson, G. D., ve Pittman, J. K. 2021. Improved saccharification of *Chlorella vulgaris* biomass by fungal secreted enzymes for bioethanol production. *Algal Research*, 58, 102402.
- Monot, F., Martin, J. R., Petitdemange, H., ve Gay, R. 1982. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(6), 1318-1324.
- Anonymous. 2021. Bio-Butanol Market - Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2022 - 2027). Web sitesi: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/bio-butanol-market>. Erişim tarihi: 12.02.2022.
- Morowvat, M. H., ve Ghasemi, Y. 2016. Culture medium optimization for enhanced β -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 217-223.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., ve Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 96(6), 673-686.
- Motoda, T., Yamaguchi, M., Tsuyama, T., ve Kamei, I. 2019. Down-regulation of pyruvate decarboxylase gene of white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60 modify the metabolism of sugars and productivity of extracellular peroxidase activity. *Journal of bioscience and bioengineering*, 127(1), 66-72.
- Mukherjee, M., Goswami, G., Mondal, P. K., ve Das, D. 2020. Biobutanol as a potential alternative to petroleum fuel: Sustainable bioprocess and cost analysis. *Fuel*, 278, 118403.
- Mukherjee, M., Sarkar, P., Goswami, G., ve Das, D. 2019. Regulation of butanol biosynthesis in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 under the influence of zinc supplementation and magnesium starvation. *Enzyme and microbial technology*, 129, 109352.
- Mupondwa, E., Li, X., Tabil, L., Sokhansanj, S., ve Adapa, P. 2017. Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part I: Pretreatment technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72, 178-190.
- Murthy, K. C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M. M., Sowmya, P. R., ve Ravishankar, G. A. 2005. In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*—a green microalga. *Life sciences*, 76(12), 1381-1390.
- Nagarajan, D., Lee, D. J., ve Chang, J. S. 2019. Recent insights into consolidated bioprocessing for lignocellulosic biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(28), 14362-14379.

- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., ve Dalai, A. K. 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2), 578-597.
- Nanda, S., Azargohar, R., Dalai, A. K., ve Kozinski, J. A. 2015. An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 925-941.
- Nandhini, R., Rameshwar, S. S., Sivaprakash, B., Rajamohan, N., ve Monisha, R. S. 2023. Carbon neutrality in biobutanol production through microbial fermentation technique from lignocellulosic materials–A biorefinery approach. *Journal of Cleaner Production*, 137470.
- Narayanasamy, S., Chan, K. L., Cai, H., Abdul Razak, A. H. B., Tay, B. K., ve Miao, H. 2020. Biobutanol production from sugarcane bagasse by *Clostridium beijerinckii* strains. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67(5), 732-737.
- Nielsen SS. 2017. *Food Analysis Laboratory Manual*. Third Edition. Springer, 249, USA.
- Nielsen, D. R., Leonard, E., Yoon, S. H., Tseng, H. C., Yuan, C., ve Prather, K. L. J. 2009. Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metabolic engineering*, 11(4-5), 262-273.
- Niemistö, J., Saavalainen, P., Isomäki, R., Kolli, T., Huuhtanen, M., ve Keiski, R. L. 2013. Biobutanol production from biomass, In: *Biofuel technologies: recent developments*, Springer, 443-470, Berlin.
- Nigam, P. S., ve Singh, A. 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in energy and combustion science*, 37(1), 52-68.
- Nimbalkar, P. R., Khedkar, M. A., Chavan, P. V., ve Bankar, S. B. 2018. Biobutanol production using pea pod waste as substrate: Impact of drying on saccharification and fermentation. *Renewable Energy*, 117, 520-529.
- Obergruber, M., Hönig, V., Procházka, P., Kučerová, V., Kotek, M., Bouček, J., ve Mařík, J. 2021. Physicochemical properties of biobutanol as an advanced biofuel. *Materials*, 14(4), 914.
- Ohtake, T., Pontrelli, S., Laviña, W. A., Liao, J. C., Putri, S. P., ve Fukusaki, E. 2017. Metabolomics-driven approach to solving a CoA imbalance for improved 1-butanol production in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 41, 135-143.
- Onay, M. 2020a. Enhancing carbohydrate productivity from *Nannochloropsis gaditana* for bio-butanol production. *Energy Reports*, 6, 63-67.
- Onay, M. 2020b. The effects of indole-3-acetic acid and hydrogen peroxide on *Chlorella zofingiensis* CICALA 944 for bio-butanol production. *Fuel*, 273, 117795.

- Ou, J., Xu, N., Ernst, P., Ma, C., Bush, M., Goh, K., ... ve Liu, X. M. 2017. Process engineering of cellulosic n-butanol production from corn-based biomass using *Clostridium cellulovorans*. *Process Biochemistry*, 62, 144-150.
- Panahi, H. K. S., Dehhaghi, M., Guillemin, G. J., Okonkwo, C. C., Kinder, J. E., & Ezeji, T. C. (2023). Bio-butanol production: scope, significance, and applications. In: *Advances and Developments in Biobutanol Production*. Woodhead Publishing, 1-45.
- Pang, N., Gu, X., Chen, S., Kirchhoff, H., Lei, H., ve Roje, S. 2019. Exploiting mixotrophy for improving productivities of biomass and co-products of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 112, 450-460.
- Panwar, N. L., Kaushik, S. C., ve Kothari, S. 2011. Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 15(3), 1513-1524.
- Parekh, M., Formanek, J., ve Blaschek, H. P. 1998. Development of a cost-effective glucose-corn steep medium for production of butanol by *Clostridium beijerinckii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(4), 187-191.
- Park, Y. C., ve Kim, J. S. 2012. Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. *Energy*, 47(1), 31-35.
- Patáková, P., Lipovský, J., Čížková, H., Fořtová, J., Rychtera, M., ve Melzoch, K. 2009. Exploitation of food feedstock and waste for production of biobutanol. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(4), 276-283.
- Patel, A. K., Choi, Y. Y., ve Sim, S. J. 2020. Emerging prospects of mixotrophic microalgae: Way forward to sustainable bioprocess for environmental remediation and cost-effective biofuels. *Bioresource Technology*, 300, 122741.
- Patel, A. K., Joun, J. M., Hong, M. E., ve Sim, S. J. 2019. Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae. *Bioresource technology*, 282, 245-253.
- Patra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., & Reungsang, A. (2008). Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *International journal of hydrogen energy*, 33(19), 5256-5265.
- Pielhop, T., Amgarten, J., Rohr, P. R., and Studer, M. H. 2016. Steam explosion pretreatment of softwood: the effect of the explosive decompression on enzymatic digestibility. *Biotechnol. Biofuels*. 9:152.
- Pirwitz, K., Rihko-Struckmann, L., ve Sundmacher, K. 2016. Valorization of the aqueous phase obtained from hydrothermally treated *Dunaliella salina* remnant biomass. *Bioresource Technology*, 219, 64-71.

- Plaza, P. E., Coca, M., Lucas Yagüe, S., Fernández-Delgado, M., López-Linares, J. C., ve García-Cubero, M. T. 2021. Exploring the use of high solid loadings in enzymatic hydrolysis to improve biobutanol production from brewers' spent grains. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 99(12), 2607-2618.
- Potts, T., Du, J., Paul, M., May, P., Beitle, R., ve Hestekin, J. 2012. The production of butanol from Jamaica bay macro algae. *Environmental Progress ve Sustainable Energy*, 31(1), 29-36.
- Procentese, A., Raganati, F., Olivieri, G., Russo, M. E., ve Marzocchella, A. 2017. Pre-treatment and enzymatic hydrolysis of lettuce residues as feedstock for biobutanol production. *Biomass and bioenergy*, 96, 172-179.
- Pu, Y., Zhang, D., Singh, P. M., ve Ragauskas, A. J. 2008. The new forestry biofuels sector. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy*, 2(1), 58-73.
- Pugazhendhi, A., Mathimani, T., Varjani, S., Rene, E. R., Kumar, G., Kim, S. H., ... ve Yoon, J. J. 2019. Biobutanol as a promising liquid fuel for the future-recent updates and perspectives. *Fuel*, 253, 637-646.
- Qi, F., Shen, P., Hu, R., Xue, T., Jiang, X., Qin, L., ... ve Huang, J. 2020. Carotenoids and lipid production from *Rhodospiridium toruloides* cultured in tea waste hydrolysate. *Biotechnology for biofuels*, 13(1), 1-12.
- Qi, G., Huang, D., Wang, J., Shen, Y., ve Gao, X. 2019. Enhanced butanol production from ammonium sulfite pretreated wheat straw by separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation. *Sustain. Energy Technol. Assessments* 36, 100549.
- Qureshi, N. ve Blaschek, H. P. 1999. Butanol recovery from model solution/fermentation broth by pervaporation: evaluation of membrane performance. *Biomass and Bioenergy*, 17(2), 175-184.
- Raganati, F., Procentese, A., Olivieri, G., Götz, P., Salatino, P., ve Marzocchella, A. 2015. Kinetic study of butanol production from various sugars by *Clostridium acetobutylicum* using a dynamic model. *Biochemical engineering journal*, 99, 156-166.
- Rajagopalan, G. 2016. Effect of nitrogen salts on butanol and hydrogen production from xylan by using *Clostridium* strain BOH3. *J Appl Biotechnol Bioeng*, 1(2), 44-51.
- Rajan, K., ve Carrier, D. J. 2014. Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 62, 222-227.

- Ranjan, A., ve Moholkar, V. S. 2012. Biobutanol: science, engineering, and economics. *International Journal of Energy Research*, 36(3), 277-323.
- Rao, A., Sathiavelu, A., ve Mythili, S. 2016. Genetic engineering in biobutanol production and tolerance. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59.
- Razali, N., Salit, M. S., Jawaid, M., Ishak, M. R., ve Lazim, Y. 2015. A study on chemical composition, physical, tensile, morphological, and thermal properties of roselle fibre: Effect of fibre maturity. *BioResources*, 10(1), 1803-1824.
- Restiawaty, E., ve Grinanda, D. 2017, July. Ferrous ion and medium composition effects on acidogenic phase in biobutanol production from molasses. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 877, No. 1, p. 012072). IOP Publishing.
- Richter, H., Molitor, B., Wei, H., Chen, W., Aristilde, L., ve Angenent, L. T. 2016. Ethanol production in syngas-fermenting *Clostridium ljungdahlii* is controlled by thermodynamics rather than by enzyme expression. *Energy & Environmental Science*, 9(7), 2392-2399.
- Rochón, E., Ferrari, M. D., ve Lareo, C. 2018. Process energy evaluation of fuel butanol production from sugar cane–sweet sorghum juices by Acetone–Butanol–Ethanol fermentation associated with a gas stripping system. *Energy ve Fuels*, 32(9), 9470-9477.
- Rodionova, M. V., Bozieva, A. M., Zharmukhamedov, S. K., Leong, Y. K., Lan, J. C. W., Veziroglu, A., ... ve Allakhverdiev, S. I. (2022). A comprehensive review on lignocellulosic biomass biorefinery for sustainable biofuel production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(3), 1481-1498.
- Rooni, V., Raud, M., ve Kikas, T. 2017. The freezing pre-treatment of lignocellulosic material: a cheap alternative for Nordic countries. *Energy*, 139, 1-7.
- Rouches, E., Herpoël-Gimbert, I., Steyer, J. P., ve Carrere, H. 2016. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 59, 179-198.
- Ruberto, G., Renda, A., Amico, V., ve Tringali, C. 2008. Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis vinifera* L. *Bioresource technology*, 99(2), 260-268.
- Sakuragi, H., Kuroda, K., ve Ueda, M. 2011. Molecular breeding of advanced microorganisms for biofuel production. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1-11.
- Salapa, I., Katsimpouras, C., Topakas, E., ve Sidiaras, D. 2017. Organosolv pretreatment of wheat straw for efficient ethanol production using various solvents. *Biomass and Bioenergy*, 100, 10-16.

- Salehi Jouzani, G., ve Taherzadeh, M. J. 2015. Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Research Journal*, 2(1), 152-195.
- Sanguanchaipaiwong, V., & Leksawasdi, N. (2018). Butanol production by *Clostridium beijerinckii* from pineapple waste juice. *Energy Procedia*, 153, 231-236.
- Sankaran, R., Cruz, R. A. P., Pakalapati, H., Show, P. L., Ling, T. C., Chen, W. H., ve Tao, Y. 2020. Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Bioresource technology*, 298, 122476.
- Seifollahi, M., ve Amiri, H. 2018. Phosphoric acid-acetone process for cleaner production of acetone, butanol, and ethanol from waste cotton fibers. *Journal of Cleaner Production*, 193, 459-470.
- Seifollahi, M., ve Amiri, H. 2020. Enhanced production of cellulosic butanol by simultaneous co-saccharification and fermentation of water-soluble cellulose oligomers obtained by chemical hydrolysis. *Fuel*, 263, 116759.
- Sen, B., Chou, Y. P., Wu, S. Y., ve Liu, C. M. 2016. Pretreatment conditions of rice straw for simultaneous hydrogen and ethanol fermentation by mixed culture. *international journal of hydrogen energy*, 41(7), 4421-4428.
- Shafizadeh, F., ve Bradbury, A. G. W. 1979. Thermal degradation of cellulose in air and nitrogen at low temperatures. *Journal of applied polymer science*, 23(5), 1431-1442.
- Sharma, A., Vivekanand, V., ve Singh, R. P. 2008. Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. *Bioresource technology*, 99(9), 3444-3450.
- Sharma, H. K., Xu, C., ve Qin, W. 2019. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. *Waste and Biomass Valorization*, 10, 235-251.
- Sharma, Y. C., ve Singh, B. 2009. Development of biodiesel: current scenario. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(6-7), 1646-1651.
- Shi, S., Si, T., Liu, Z., Zhang, H., Ang, E. L., ve Zhao, H. 2016. Metabolic engineering of a synergistic pathway for n-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific reports*, 6(1), 25675.
- Shirkavand, E., Baroutian, S., Gapes, D. J., ve Young, B. R. 2016. Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 217-234.

- Singh, A. K., Tiwari, R., Singh, V. K., Singh, P., Khadim, S. R., Singh, U., ... ve Asthana, R. K. 2019. Green synthesis of gold nanoparticles from *Dunaliella salina*, its characterization and in vitro anticancer activity on breast cancer cell line. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 164-176.
- Singh, L., ve Kalia, V. C. (Eds.). 2017. *Waste biomass management-A holistic approach*. Springer International Publishing, 392, Switzerland.
- Siwale, L., Kristóf, L., Adam, T., Bereczky, A., Mbarawa, M., Penninger, A., ve Kolesnikov, A. 2013. Combustion and emission characteristics of n-butanol/diesel fuel blend in a turbo-charged compression ignition engine. *Fuel*, 107, 409-418.
- Śmiechowska, M., ve Dmowski, P. 2006. Crude fibre as a parameter in the quality evaluation of tea. *Food chemistry*, 94(3), 366-368.
- Sohrabi, D., Jazini, M. H., ve Shariati, M. 2019. Mixotrophic cultivation of *Dunaliella salina* on crude glycerol obtained from calcinated fatty acid production process. *Russian Journal of Marine Biology*, 45, 470-480.
- Srirangan, K., Akawi, L., Moo-Young, M., ve Chou, C. P. 2012. Towards sustainable production of clean energy carriers from biomass resources. *Applied energy*, 100, 172-186.
- Sui, Y., ve Harvey, P. J. 2021. Effect of light intensity and wavelength on biomass growth and protein and amino acid composition of *Dunaliella salina*. *Foods*, 10(5), 1018.
- Sui, Y., ve Vlaeminck, S. E. 2019. Effects of salinity, pH and growth phase on the protein productivity by *Dunaliella salina*. *Journal of Chemical Technology ve Biotechnology*, 94(4), 1032-1040.
- Sui, Y., Muys, M., Vermeir, P., D'Adamo, S., ve Vlaeminck, S. E. 2019. Light regime and growth phase affect the microalgal production of protein quantity and quality with *Dunaliella salina*. *Bioresource Technology*, 275, 145-152.
- Sun, X., Atiyeh, H. K., Adesanya, Y., Okonkwo, C., Zhang, H., Huhnke, R. L., ve Ezeji, T. 2020. Feasibility of using biochar as buffer and mineral nutrients replacement for acetone-butanol-ethanol production from non-detoxified switchgrass hydrolysate. *Bioresource technology*, 298, 122569.
- Taherzadeh, M. J., ve Karimi, K. 2007. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*, 2(4), 707-738.
- Tangney, M. ve Mitchell, W. J. 2000. Analysis of a catabolic operon for sucrose transport and metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2(1), 71-80.

- Tokuyama, K., Toya, Y., Matsuda, F., Cress, B. F., Koffas, M. A., ve Shimizu, H. 2019. Magnesium starvation improves production of malonyl-CoA-derived metabolites in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 52, 215-223.
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J. M., Ballesteros, M., ve Olsson, L. 2008. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and bioengineering*, 100(6), 1122-1131.
- Tozsin, G. 2016. Inhibition of acid mine drainage and immobilization of heavy metals from copper flotation tailings using a marble cutting waste. *International Journal of Minerals, Metallurgy, and Materials*, 23, 1-6.
- Travaini, R., Marangon-Jardim, C., Colodette, J. L., Morales-Otero, M., ve Bolado-Rodríguez, S. 2015. Ozonolysis. In: *Pretreatment of Biomass: Processes and Technologies*. Elsevier, 105-135.
- Trincone, A. 2018. Update on marine carbohydrate hydrolyzing enzymes: biotechnological applications. *Molecules*, 23(4), 901.
- Ujor, V., Okonkwo, C., ve Ezeji, T. C. 2016. Unorthodox methods for enhancing solvent production in solventogenic *Clostridium* species. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 1089-1099.
- Um, B. H., ve Kim, Y. S. 2009. A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 15(1), 1-7.
- Uyttenbroek, M., Van Hecke, W., ve Vanbroekhoven, K. 2015. Sustainability metrics of 1-butanol. *Catalysis Today*, 239, 7-10.
- Valles, A., Álvarez-Hornos, F. J., Martínez-Soria, V., Marzal, P., ve Gabaldón, C. 2020. Comparison of simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation processes for butanol production from rice straw. *Fuel*, 282, 118831.
- Van der Wal, H., Sperber, B. L., Houweling-Tan, B., Bakker, R. R., Brandenburg, W., ve López-Contreras, A. M. 2013. Production of acetone, butanol, and ethanol from biomass of the green seaweed *Ulva lactuca*. *Bioresource technology*, 128, 431-437.
- Varelas, V., ve Langton, M. 2017. Forest biomass waste as a potential innovative source for rearing edible insects for food and feed—A review. *Innovative Food Science ve Emerging Technologies*, 41, 193-205.
- Ventura, J. S., Escobar, E. C., ve Jahng, D. 2016. Bio-butanol Production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 Using Selected Species of Brown and Red Macroalgae. *Iranian (Iranica) Journal of Energy ve Environment*, 7(4), 325-333.

- Veza, I., Said, M. F. M., ve Latiff, Z. A. 2021. Recent advances in butanol production by acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 144, 105919.
- Virunanon, C. Chantaroopamai, S. Denduangbaripant, J. ve Chulalaksananukul, W. 2008. Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract. *Anaerobe*, 14(2), 109-117.
- Visioli, L. J., Enzweiler, H., Kuhn, R. C., Schwaab, M., ve Mazutti, M. A. 2014. Recent advances on biobutanol production. *Sustainable chemical processes*, 2(1), 1-9.
- Wang, Y., Guo, W. Q., Chang, J. S., ve Ren, N. Q. 2014. Butanol Production Using Carbohydrate-Enriched *Chlorella vulgaris* as Feedstock. *Advanced Materials Research*, 830, 122-125.
- Wang, Y., Guo, W., Cheng, C. L., Ho, S. H., Chang, J. S., ve Ren, N. 2016. Enhancing bio-butanol production from biomass of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with sequential alkali pretreatment and acid hydrolysis. *Bioresource technology*, 200, 557-564.
- Wang, Y., Ho, S. H., Cheng, C. L., Nagarajan, D., Guo, W. Q., Lin, C., ... ve Chang, J. S. 2017b. Nutrients and COD removal of swine wastewater with an isolated microalgal strain *Neochloris aquatica* CL-M1 accumulating high carbohydrate content used for biobutanol production. *Bioresource technology*, 242, 7-14.
- Wang, Y., Ho, S. H., Yen, H. W., Nagarajan, D., Ren, N. Q., Li, S., ... ve Chang, J. S. 2017a. Current advances on fermentative biobutanol production using third generation feedstock. *Biotechnology advances*, 35(8), 1049-1059.
- Wen, Z., Ledesma-Amaro, R., Lin, J., Jiang, Y., ve Yang, S. 2019. Improved n-butanol production from *Clostridium cellulovorans* by integrated metabolic and evolutionary engineering. *Applied and environmental microbiology*, 85(7), e02560-18.
- Wu, H., Wang, C., Chen, P., He, A. Y., Xing, F. X., Kong, X. P., ve Jiang, M. 2017. Effects of pH and ferrous iron on the coproduction of butanol and hydrogen by *Clostridium beijerinckii* IB4. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(10), 6547-6555.
- Wu, Y. D., Xue, C., Chen, L. J., ve Bai, F. W. 2013. Effect of zinc supplementation on acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of biotechnology*, 165(1), 18-21.
- Wu, Y. D., Xue, C., Chen, L. J., Yuan, W. J., ve Bai, F. W. 2016. Improvements of metabolites tolerance in *Clostridium acetobutylicum* by micronutrient zinc supplementation. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 21, 60-67.

- Xin, F., Dong, W., Zhang, W., Ma, J. ve Jiang, M. 2019. Biobutanol production from crystalline cellulose through consolidated bioprocessing. *Trends in biotechnology*, 37(2), 167-180.
- Xu, H., Miao, X., ve Wu, Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of biotechnology*, 126(4), 499-507.
- Xue, C., Zhao, J., Chen, L., Yang, S. T. ve Bai, F. 2017. Recent advances and state-of-the-art strategies in strain and process engineering for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology advances*, 35(2), 310-322.
- Yagmur, E., Ozmak, M., ve Aktas, Z. 2008. A novel method for production of activated carbon from waste tea by chemical activation with microwave energy. *Fuel*, 87(15-16), 3278-3285.
- Yazdani, S. S. ve Gonzalez, R. 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current opinion in biotechnology*, 18(3), 213-219.
- Yen, H. W., Li, R. J., ve Ma, T. W. 2011. The development process for a continuous acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation by immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(6), 902-907.
- Yeong, T. K., Jiao, K., Zeng, X., Lin, L., Pan, S., ve Danquah, M. K. 2018. Microalgae for biobutanol production–Technology evaluation and value proposition. *Algal research*, 31, 367-376.
- York, R., ve Bell, S. E. 2019. Energy transitions or additions?: Why a transition from fossil fuels requires more than the growth of renewable energy. *Energy Research ve Social Science*, 51, 40-43.
- Yuan, X., Wen, B., Ma, X., Zhu, W., Wang, X., Chen, S., ve Cui, Z. 2014. Enhancing the anaerobic digestion of lignocellulose of municipal solid waste using a microbial pretreatment method. *Bioresource technology*, 154, 1-9.
- Zavrel, M., Bross, D., Funke, M., Büchs, J., ve Spiess, A. C. 2009. High-throughput screening for ionic liquids dissolving (ligno-) cellulose. *Bioresource technology*, 100(9), 2580-2587.
- Zetty-Arenas, A. M., Alves, R. F., Portela, C. A. F., Mariano, A. P., Basso, T. O., Tovar, L. P., ... ve Freitas, S. 2019. Towards enhanced n-butanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate: Strain screening, and the effects of sugar concentration and butanol tolerance. *Biomass and Bioenergy*, 126, 190-198.

- Zhang, J. Yu, L. Xu, M. Yang, S. T. Yan, Q. Lin, M. ve Tang, I. C. 2017. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production from sugarcane juice. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(10), 4327-4337.
- Zhang, J., ve Jia, B. 2018. Enhanced butanol production using *Clostridium beijerinckii* SE-2 from the waste of corn processing. *Biomass and Bioenergy*, 115, 260-266.
- Zhang, Z. 2021. Waste pretreatment technologies for hydrogen production. In *Waste to Renewable Biohydrogen* (pp. 109-122). Academic Press.
- Zhen, X., Wang, Y., ve Liu, D. 2020. Bio-butanol as a new generation of clean alternative fuel for SI (spark ignition) and CI (compression ignition) engines. *Renewable Energy*, 147, 2494-2521.
- Zhou, Z. Y., Yang, S. T., Moore, C. D., Zhang, Q. H., Peng, S. Y., ve Li, H. G. 2020. Acetone, butanol, and ethanol production from puerariae slag hydrolysate through ultrasound-assisted dilute acid by *Clostridium beijerinckii* YBS3. *Bioresource Technology*, 316, 123899.
- Zuorro, A., ve Lavecchia, R. 2010. Adsorption of Pb (II) on spent leaves of green and black tea. *American Journal of Applied Sciences*, 7(2), 153-159.