

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENDÜSTRİYEL SEBZE ATIKLARINDAN İKİNCİ NESİL BİYOBÜTANOL
ÜRETİMİ

Ümit YILDIRIM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2025

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENDÜSTRİYEL SEBZE ATIKLARINDAN İKİNCİ NESİL BİYOBÜTANOL ÜRETİMİ

Ümit YILDIRIM

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

Biyoyakıt üretiminde başlıca sorunlar substrat ve mikrobiyal çeşitliliğdir. Lignoselülozik atıklardan biyobütanol üretimine ilişkin sınırlamalar arasında ise düşük solvent üretimi, yüksek substrat konsantrasyonu kaynaklı inhibitör etki ve düşük şeker kullanımı yer almaktadır. Bu bağlamda, tez çalışmasında, belirtilen sınırlamaların üstesinden gelmek ve biyobütanol üretimini artırmak için patlıcan sapı (PS) atıklarından ko-kültür stratejisi ve biyolojik olarak parçalanabilen surfaktant kullanılarak biyobütanol üretimi hedeflenmiştir. Bu amaçla, fermentasyon zamanı, başlangıç PS konsantrasyonu (%5-%20), surfaktant tipi (Tween 80, Triton X-100, ve nişasta), farklı enzim yüklemeleri (7.5-60 FPU/g_{substrat} selüloz enzim) ve *Clostridium beijerinckii* DSMZ 6422 ile ko-kültür oluşturmak üzere farklı maya suşlarının (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii* ve *Kluyveromyces marxianus*) eklenmesi gibi süreci etkileyen kritik parametreler optimize edilmiştir. Çalışma sonucunda, en yüksek biyobütanol ve Aseton-Bütanol-Etanol (ABE) konsantrasyonu sırasıyla 9.63 g/L ve 15.66 g/L olarak *C. beijerinckii* + *C. boidinii* ko-kültür sisteminde, 15-FPU/g_{substrat} selüloz enzimi ve 80 mg/g_{selüloz} nişasta ile ön işlem yapılmış %20 PS varlığında elde edilmiştir. Ayrıca, en yüksek biyobütanol verimi, biyobütanol üretkenliği ve şeker tüketim oranı, *C. beijerinckii*-*C. boidinii* ko-kültür sistemi ve nişasta surfaktantı kullanılarak sırasıyla 0.0142±0.02 g/g, 0.080±0.003 g/L/h ve %84.20±0.236 olarak elde edilmiştir. Buna göre, verimli ABE üretimi ve PS'den yüksek fermente edilebilir şeker dönüşümü ko-kültür stratejisi ve surfaktant olarak biyolojik olarak parçalanabilen nişasta kullanımıyla mümkün olmuştur. Ayrıca bu tez çalışması ile, biyobütanol üretiminde hammadde olarak PS'nin kullanımı ve potansiyeli literatürde ilk kez gösterilmiş ve ko-kültür stratejisi ve biyolojik olarak parçalanabilen surfaktant kullanımıyla biyobütanol daha da artırılmıştır.

Haziran 2025, 52 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyoyakıt, Biyobütanol, ABE, Fermentasyon, Surfaktant, Ko-kültür

ABSTRACT

Master Thesis

SECOND GENERATION BIOBUTANOL PRODUCTION FROM INDUSTRIAL VEGETABLE

Ümit YILDIRIM

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

Main problems at biofuel production are the substrate and microbial diversity. In this situation, limitations of biobutanol production from lignocellulosic wastes include inhibitory effect caused by high substrate loading, low solvent production and low sugar conversion. In this study, the aim is increase biobutanol production from eggplant stalk (ES) by using co-culture strategy and using biodegradable starch as a biodegradable surfactant. Critical factors affecting the process such as fermentation time, surfactant types (Triton X-100, Tween 80 and starch), initial ES loadings (5-20%), different yeast strains for co-culture with *Clostridium beijerinckii* DSMZ 6422 (*Candida boidinii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*), different enzyme loadings (7.5-60 FPU/g_{substrate} cellulase enzyme) were optimized. The highest total ABE is obtained as 15.66 g/L and highset biobutanol concentration is obtained as 9.63 g/L in the precence of 20% ES pretreated with 80 mg/g_{cellulose} starch and 15 FPU /g_{substrate} cellulase enzyme using *C. beijerinckii*+*C. boidinii* co-culture system. The meaning of this, the recovery of higher fermentable sugar from ES and efficient ABE production is possible with using co-culture system and starch as a biodegradable surfactant. The potential usage of ES as a raw material in biobutanol production has been shown fort he first time in the literature, where production is further improved by using of co-culture strategy and biodegradable surfactant.

June 2025, 52 pages

Keywords: Biofuel, Biobutanol, Abe, Fermentation, Surfactant, Co-cultur

TEŞEKKÜR

Araştırma ve çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de yetiştirme ve gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY'a ve sayın hocam Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ'e tüm içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Yine bu tezin yazımında bana desteklerini esirgemeyen laboratuvar arkadaşım ve hocam diyebileceğin Nazlıhan TEKİN'e ve diğer bütün laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ümit YILDIRIM
Ankara, Haziran 2025

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1 Bütanolün Özellikleri.....	4
2.2 Bütanolün Avantajları.....	4
2.3 Bütanol Üretimi.....	5
2.3.1 Bütanol'ün kimyasal üretimi.....	6
2.3.1.1 Krotonaldehit sentezi.....	6
2.3.1.2 Reppe sentezi.....	7
2.3.1.3 Oxo sentezi.....	7
2.3.2 Bütanolün biyolojik üretimi.....	8
2.4 Biyobütanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler.....	9
2.4.1 Birinci nesil hammaddeler.....	9
2.4.2 İkinci nesil hammaddeler.....	10
2.4.2.1 Patlıcan atığı.....	11
2.4.3 Üçüncü nesil hammaddeler.....	12
2.4.4 Dördüncü nesil hammaddeler.....	13
2.5 Hammaddenin Ön İşlenmesi.....	13
2.5.1 Fiziksel ön işlem metotları.....	13
2.5.1.1 Öğütme ön işlemi.....	14
2.5.1.2 Ekstrüzyon ön işlemi.....	14
2.5.1.3 Mikrodalga ön işlemi.....	14
2.5.1.4 Ultrason ön işlemi.....	15
2.5.2 Kimyasal ön işlem.....	15
2.5.2.1 Asit ön işlemi.....	15
2.5.2.2 Alkali ön işlem.....	16
2.5.2.3 Organosolv ön işlem.....	16
2.5.2.4 Amonyak lifi patlaması (AFEX).....	17
2.5.2.5 Süperkritik akışkanlar ön işlemi (SCF).....	17
2.5.2.6 Derin ötektik çözücüler (DES).....	17
2.5.3 Fiziko-kimyasal ön işlem.....	18
2.5.3.1 Buhar patlaması ön işlemi.....	17
2.5.3.2 Sıcak su ön işlemi.....	19
2.5.3.3 Islak oksidasyon ön işlemi.....	19
2.5.4 Biyolojik ön işlem.....	20
2.6 Biyobütanol Üretimini Artırmak İçin Geliştirilen Fermentasyon Teknikleri.....	20
2.7 Bütanol Üreten Mikroorganizmalar.....	22
2.8 Biyobütanol Üretiminde Sürfaktantların Kullanımı.....	22

2.9 Biyobütanol Üretiminde Ko-kültür Stratejisi.....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1 Mikroorganizmalar ve Ortam.....	25
3.2 Atık Ürünün Hazırlanması.....	25
3.3 PS'nin Hidrolizinde Sürfaktant Etkisi.....	25
3.4 Sürfaktant Varlığında PS'nin Hidrolizinde Enzim Konsantrasyonlarının Etkisi.....	26
3.5 Fermentasyon Deneyleri.....	26
3.5.1 Biyobütanol üretiminde başlangıç ps konsantrasyonlarının etkisi.....	26
3.5.2 PS hidrolizatından biyobütanol üretiminde surfaktant etkisi.....	27
3.5.3 Biyobütanol üretiminde enzim konsantrasyonlarının etkisi.....	27
3.5.4 Biyobütanol üretiminde ko-kültür stratejisinin etkisi.....	27
3.6 Analitik Yöntemler.....	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	30
4.1 PS'nin Özellikleri.....	30
4.2 Biyobütanol Üretiminde Başlangıç PS Konsantrasyonlarının Etkisi.....	31
4.3 Biyobütanol Üretimi Ve PS'nin Enzimatik Hidrolizinde Sürfaktantların Etkisi.....	32
4.4 PS'nin Hidrolizinde Enzim Konsantrasyonlarının Etkisi ve Sürfaktant Olarak Nişasta Varlığında Biyobütanol Üretimi.....	36
4.5 Biyobütanol Üretiminde Ko-Kültür Stratejisinin Etkisi.....	38
5. SONUÇ.....	42
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	52

SİMGELER DİZİNİ

°C	: Santigrad Derece
g/L	: Gram/Litre
mM	: Milimolar
ABE	: Aseton-bütanol-etanol Fermentasyonu
Bar	: Basınç birimi
rpm	: Devir/Dakika
µm	: Mikrometre
cm	: Santimetre
mm	: Milimetre
K ₂ HPO ₄	: Monosodyum fosfat
FeSO ₄	: Demir (II) sülfat
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
MnSO ₄	: Mangan (II) Sülfat
H ₂ O	: Su
mL	: Mililitre
H ₂ SO ₄	: Sülfürik asit
FPU/g	: Filtre kağıdı birimi/Gram
v/v	: Hacim/Hacim
GC	: Gaz kromotografisi
FID	: Alev iyonizasyon dedektörü

Kısaltmalar

PS	Patlıcan Sapı
ES	Eggplant Stalk
dk	Dakika
DNS	Dinitro Salisilik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bütanolün moleküler özellikleri.....	4
Şekil 2.2 Petro-kimyasal bütanol üretimi.....	6
Şekil 2.3 Korotonaldehit sentezi.....	6
Şekil 2.4 Reppe sentezi.....	7
Şekil 2.5 Oxo sentezi.....	8
Şekil 2.6 ABE Fermentasyonu.....	9
Şekil 4.1 Farklı PS konsantrasyonlarında seyreltik asit ön işlemi ve enzim hidrolizinden sonra elde edilen indirgen şeker ve en yüksek biyobütanol konsantrasyonları.....	32
Şekil 4.2 PS'nin ön işleminde ve sonuçta ortaya çıkan indirgen şeker konsantrasyonlarında farklı yüzey aktif madde etkileri.....	34
Şekil 4.3 Farklı yüzey aktif maddelerin varlığında elde edilen %20 PS şekeri içeren fermentasyon ortamındaki biyobütanol konsantrasyonları.....	36
Şekil 4.4 80 mg/gselüloz nişasta varlığında %20 PS ön işleminde farklı enzim konsantrasyonlarının etkisi ve biyobütanol konsantrasyonları.....	37
Şekil 4.5 Bakteri-maya ko-kültür stratejisi sonrasında elde edilen biyobütanol ve biyoetanol konsantrasyonlarının zaman süreci.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 PS'nin fiziksel ve yapısal özellikleri.....	30
Çizelge 4.2 Ko-kültür stratejisi ile 120. saatte kinetik parametreler.....	41



1. GİRİŞ

Dünyadaki temel enerji kaynakları fosil yakıtlar olmasına rağmen, sera gazı emisyonları ve iklim değişiklikleri kaynaklı endişelerden ötürü alternatif enerji kaynaklarına olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Alternatif enerji kaynakları arasında biyoetanol, biyodizel, biyobütanol ve biyohidrojen gibi biyoyakıtlar büyük potansiyele sahiptir. Son zamanlarda bütanol eşsiz özellikleri ile literatürde ‘yeni nesil biyoyakıt’ olarak adlandırılmaktadır (Das ve Maiti, 2022). Biyobütanol; yüksek enerji yoğunluğu ve benzin ve dizel ile kolay karıştırılabilmesi sebebiyle potansiyeli yüksek bir biyoyakıttır. Biyoyakıt olarak kullanılmasına ek olarak, bütanol yıllardır farklı alanlarda bir çözücü ve yan ürün olarak kullanılmaktadır. Çeşitli alanlarda kullanılması sayesinde bütanolün yüksek bir market hacmi vardır. 2030’a kadar farklı biyokütlelerden muazzam bir pazar değeri beklenmektedir. Buna ek olarak, biyobütanol market artış oranı 2022-2030 yılları arasında yaklaşık olarak %8.5 olarak beklenmektedir (Custom Market Insights, 2022). Birinci jenerasyon biyobütanol üretimi tipik olarak mısır ve buğday gibi yenilebilir kaynaklardan sağlanmaktadır (Bhattacharyya vd. 2023). Ancak, yenilebilir kaynaklardan biyobütanol üretimi yiyecek fiyatlarını yukarı çekmektedir. Birinci nesil biyobütanol kullanımı, değişken gıda fiyatları, gıda güvenliği ve gıda ulaşımına ilişkin endişeleri artırdığından bu uygulamayla ilgili giderek artan endişelere neden olmaktadır. Bu nedenle, yiyecek olarak tüketilmeyen lignoselülozik materyal, maliyet uygunluğu ve hammadde erişilebilirliği açısından çok büyük potansiyele sahiptir (Aditiya vd. 2016). Patlıcan dünyada yüksek üretim ve tüketimi olan bir bitkidir (Rosa-Martinez vd. 2021). Besin değeri ve faydalı biyoaktif bileşikleri açısından değerli bir üründür (Naeem ve Uğur, 2019). Flavonoid bileşikler açısından sağlık ve gıda alanlarında kullanılan önemli miktarda antosiyanin pigmentli patlıcan kabuğunda varlığı rapor edilmiştir (Azuma vd. 2008). Türkiye patlıcan üretimi açısından dördüncü sırada yer almaktadır (Cantürk vd. 2023). 2023’de 797241 ton ile Türkiye’de üretimin %2.5’ini oluşturmaktadır (Turkish Statistical Institute, 2023). Patlıcanın farklı alanlarda kullanılması nedeniyle ortaya çıkan tüketilmeyen kısımları, patlıcan hasadından sonra yaklaşık 14.48 milyon ton patlıcan sapı çöp olarak ve bu PS atıklarından kurtulmak için açık alanlarda yakılmaktadır ve bu da hava kirliliğine sebep olmaktadır (Zhu vd. 2022).

Bu sebeple, PS'nin atık yönetimi, biyobütanol üretiminde kullanılmak üzere bu tez çalışmasında önerilmektedir. Buna ek olarak, PS yüksek selüloz, hemiselüloz ve mineral oranı ile biyobütanol üretiminde yüksek bir potansiyele sahiptir (Zhu vd. 2022).

Literatürde; fiziksel (dondurma, öğütme vb.), kimyasal (alkali, asit, organosolvent vb.), fiziko-kimyasal (otoklav-kimyasal, mikrodalga-kimyasal vb.) ve biyolojik (enzimatik) ön işlemler biyobütanol üretiminde fermente edilebilir şekerlerin eldesi için kullanılmaktadır (Cheah vd, 2020). Üstelik enzimatik hidroliz, polimerik karbonhidratları monomerik yapılarına dönüştürmek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

Bununla birlikte, bu işlemin tüm maliyeti enzimlerin yüksek fiyatından dolayı önemli ölçüde etkilenmektedir (Ribeiro vd. 2019). Buna ek olarak, lignoselülozik materyalden fermente edilebilir şeker dönüşümünü artırmak için sürfaktantların kullanımı değerlendirilmiştir (da Nogueira vd. 2022). Sürfaktantların ön işlem sürecinde belirtilen iki temel mekanizma etkisi vardır. Sürfaktant enzimatik hidroliz sırasında lignine bağlanarak enzim ve lignin etkileşimini azaltmaktadır. Ayrıca enzim stabilitesi ve selüloz aktivitesini pozitif anlamda etkilemektedir (Yang vd. 2015). Literatürde belirtildiği üzere, sürfaktantlar hidroliz esnasında enzimleri termal denatürasyondan korumaktadır (Yang vd. 2015, Eriksson vd. 2002). Buna ek olarak, fenolik bileşiklerin olumsuz etkileri ve lignoselülozik parçalanma ürünleri sürfaktantlar tarafından kısmi olarak engellemektedirler (Lee vd. 2015, Jiang vd. 2023).

Çeşitli mikroorganizmalar gelişmiş özellikleri sayesinde pahalı olmayan lignoselülozik şekerleri biyoteknolojik ürünlere dönüştürme kabiliyetine sahiptirler. Bu senaryoda biyoyakıt üretiminin ekonomisi, kullanılan mikroorganizmalar sayesinde pozitif yönde etkilenmiştir. Biyobütanol daha çok, ABE fermentasyonu yoluyla *C. beijerinckii* ve *C. acetobutylicum* gibi *Clostridium* suşları ile anaerobik olarak üretilebilir (Li vd. 2020). Ancak, düşük biyobütanol üretim verimi, solvent toksisitesi, anaerobik koşulları sağlamadaki zorluk gibi olumsuz yönler araştırmacıları çözüm bulmaya itmektedir (Li vd. 2020).

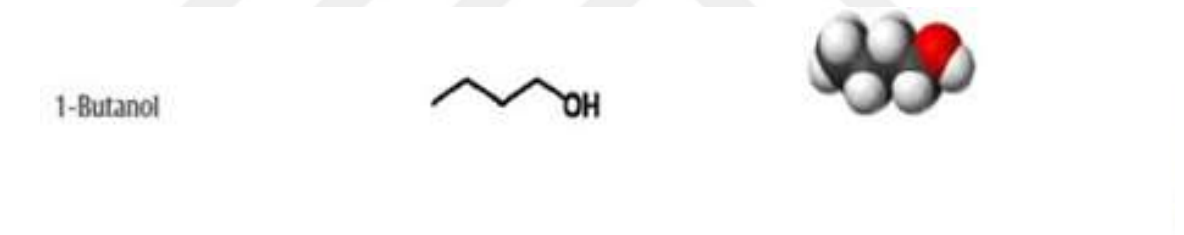
Bu çözümler arasında, ko-kültür yaklaşımı, biyobütanol üretimini, anaerobik koşulların sağlanması ve farklı şekerlerin kullanılmasının artırımını desteklemektedir. Ko-kültür yaklaşımında, farklı aktivitelere (şeker kullanım yolağı, enzim içerikleri, fermentasyon tipi vs.) sahip mikroorganizmaların (maya-bakteri) simültane kullanılmasıyla solvent üretiminin artırılması hedeflenmektedir. Maya bakteriyeye faydalı amino asitler sağlamakta, bakteride NADH yenilenmesinin artırılmakta ve şeker kullanım oranının artırmaktadır (Capilla vd. 2022, Cui vd. 2021, Luo vd. 2015). Buna ek olarak, anaerobik mikroorganizmaların fermentasyon ortamında kullanılması anaerobik koşulların sağlanmasını artırmaktadır (Oliva-Rodriguez vd. 2019). Bu nedenle, ko-kültür metodu, biyobütanol üretiminin genel verimini artırmaktadır ve uygun maliyetli biyobütanol üretimi için yararlı bir araç kılmaktadır.

Anaerobik üretimin zorlukları ve işlem sırasında karşılaşılan sınırlamalar biyobütanolün endüstriyel üretimi için darboğazlardır. Bu nedenle, bu çalışma ko-kültür stratejisi ve surfaktant varlığında ön işlem ile PS'den biyobütanol üretimini artırmayı hedeflemektedir. Bu çalışmada PS'den efektif bir şekilde fermente edilebilir şekerlerin eldesi için asit, enzimatik ve surfaktant gibi farklı ön işlem metotları incelenmiştir. Şeker kullanımını ve anaerobik koşulları artırmak için *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii* ve *Kluyveromyces marxianus* mayaları, *C. beijerinckii* DSMZ 6422 ile birlikte ayrı ayrı kullanılarak biyobütanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, patlıcan sapını karbon kaynağı olarak ve PS'nin ön işleminde surfaktant olarak nişasta kullanımı literatürde ilk kez gösterilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Bütanolün Genel Özellikleri

Bütanol, 4 karbon atomundan oluşan, karbon atomları düz zincirli ya da dallanmış olabilen, -OH grubunun karbon zincirinde farklı yerlerde olmasıyla birlikte farklı izomerleri olan bir alkoldür. 1-butanol, n-butanol olarak da bilinen düz zincirli ve -OH grubu terminal karbon atomunda bulunan biyolojik ve kimyasal olarak üretilen ve endüstriyel olarak en çok kullanılan bütanol izomeridir. Biyoetanole göre daha yüksek enerji içeriğine sahiptir. Düşük suda çözünürlüğe, düşük uçuculuğa ve daha düşük aşındırıcılığa sahiptir. Benzinle benzer oktan sayısı (96 RON, 78 MON) sayesinde herhangi bir karışım oranında kullanılabilirliğe sahiptir ve bu benzerliği sayesinde günümüzde kullanılan motorlarda modifikasyona gerek kalmadan direk kullanılabilme özelliğine sahiptir (Jin vd. 2011).



Şekil 2.1 Bütanolün moleküler özellikleri (Jin vd. 2011)

2.2 Bütanolün Avantajları

Bütanol etanole göre 4 karbon atomuyla birlikte %25 daha yüksek enerji içeriğine sahiptir. Bu nedenle daha az yakıt tüketimine ve araçlarda daha yüksek menzil elde etme avantajına sahiptir. Daha düşük uçuculuğa sahip olmasıyla birlikte yakıt karışımlarında yaz ve kış aylarında farklı karışım oranlarına ihtiyaç duyulmaz. Daha az ateşleme sorunlarına neden olur. N-butanol daha çok karbona sahip olduğu için, dizelle daha iyi karıştırılabilir. Daha yüksek viskoziteye sahiptir. Bu sebeple dizel motor parçalarına daha uyumludur. Daha az korozyon ve su kontaminasyonuna toleransı daha yüksek olduğundan daha kolay taşınabilir ve mevcut boru hatlarıyla dağıtımı sağlanabilir. Çok düşük buhar

basıncı noktası ve yüksek parlama noktası sayesinde yüksek sıcaklıklarda kullanımı daha güvenlidir. Bütanol etanole göre 4 tane daha fazla hidrojen atomuna sahiptir. Bu sayede elektrikli yakıt hücresinde kullanıldığında daha yüksek enerji verme kapasitesine sahiptir. Bütanol fermentasyon işleminde üretilen hidrojen gazı kolayca ayrıştırılabilir ve uzun vade hidrojen dönüşümünde önemli bir rol oynayabilir (Jin vd. 2011).

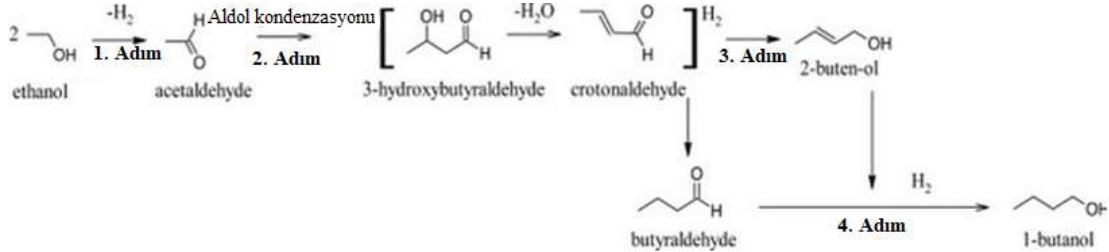
Benzinle karşılaştırıldığında, CO, hidrokarbon ve NO_x emisyonlarını önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu sebeple biyobütanolün kullanımı çevresel kaygılar ve sera gazı salınımının azaltılması bakımından avantajlı bir biyoyakıttır (Dürre 2007).

Bu özellikleri göz önünde bulundurulduğunda biyobütanolün bir biyoyakıt olarak kullanılması hem fosil yakıtlara göre hem de diğer biyoyakıtlara göre oldukça avantajlı olduğu gözlenmektedir.

2.3 Bütanol Üretimi

2024 yılında biyobütanol piyasasının tahmini büyüklüğü 1.4 milyar ABD dolarıydı. Bu pazarın, 2025'ten 2034'e kadar yaklaşık %13.18'lik bileşik yıllık büyüme oranı ile 3.5 milyar ABD dolarına çıkması bekleniyor. Bu, biyobütanol üretiminin gelecekte önemli ölçüde artacağını gösteriyor (Genshan vd. 2025). Bazı araştırmalar, aseton-bütanol-etanol (ABE) toplam üretim kapasitesi olarak yıllık 170.000–171.000 metrik ton (bunun yaklaşık 99.300 tonu sadece bütanol) gibi tesis kapasitelerini incelemiştir. Bu kapasiteler genellikle tatlı sorgum küspesi, gıda atıkları ve sarı üst pres keki gibi hammaddelerden fermentasyon yoluyla üretim üzerine odaklanmıştır (Qureshi vd. 2020). Avrupa özelinde yapılan bir çalışma, peynir altı suyu, şeker içeriği yüksek içecek artıkları, gıda kayıpları/atıkları ve tarım kalıntıları gibi çeşitli atık akışlarından yıllık yaklaşık 39 milyon ton biyobütanol üretme potansiyeli olduğunu belirtmektedir. Bu miktar, Avrupa'nın mevcut biyoyakıt talebini karşılamaya yeterli olacağı belirtilmektedir (Procentese vd. 2017). Bütanol hem kimyasal yollar ile hem de biyolojik olarak üretilir. Bu kimyasal yollar krotonaldehid sentezi, reppe sentezi okso sentezidir. Biyolojik olarak ise ABE fermentasyonu yolu ile üretilir (Ganeshan vd. 2025). Bunun yanında bütanol kimyasal olarak etanolden de üretilir. Etanol fermentasyonu bütanol fermentasyonuna göre çok

daha verimlidir ve bütanole oranla çok daha yüksek miktarlarda üretilebilir. Bu sebepten ötürü araştırmacılar etanolden de bütanol üretiminin de etkili bir çözüm olduğunu göstermiştir (Ndaba vd. 2015).

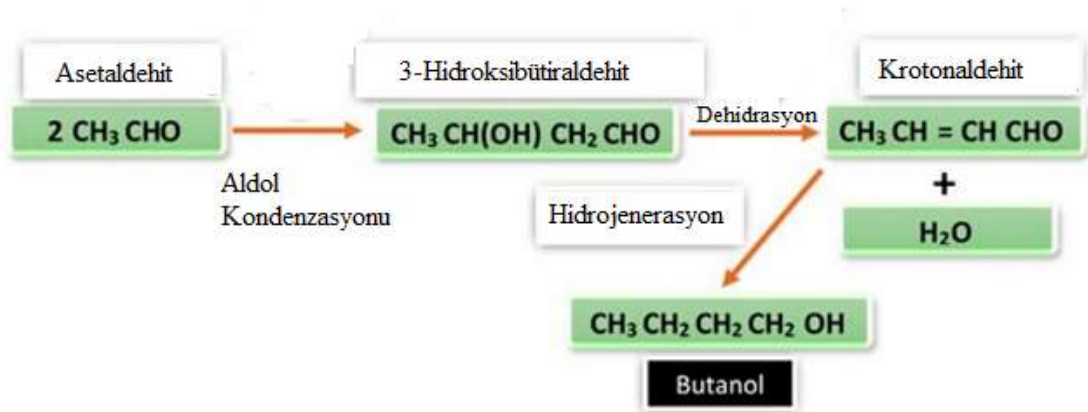


Şekil 2.2 Petro-kimyasal bütanol üretimi (Ndaba vd. 2015)

2.3.1 Bütanolün kimyasal üretimi

2.3.1.1 Krotonaldehit sentezi

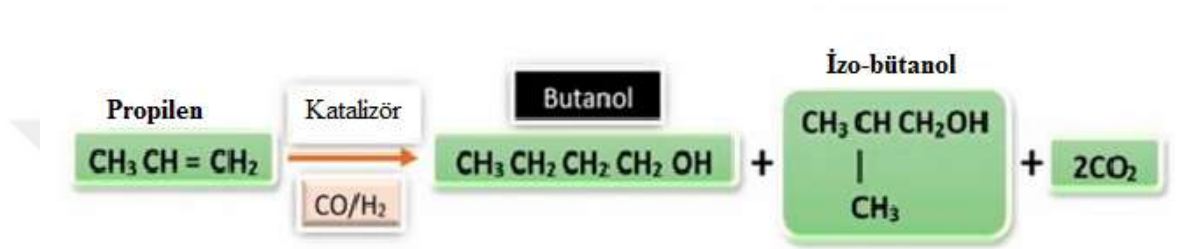
Krotonaldehit sentezinde, bütanol, asetaldehitlerin aldol kondenzasyonu yoluyla üretilir. Sonrasında ise ürün dehidrasyona maruz bırakılır ve sonrasında ise krotonaldehitlerin hidrojenizasyonu işlemi ile bütanol elde edilir. (Ndaba vd. 2015).



Şekil 2.3 Krotonaldehit sentezi (Ganeshan vd. 2025)

2.3.1.2 Reppe sentezi

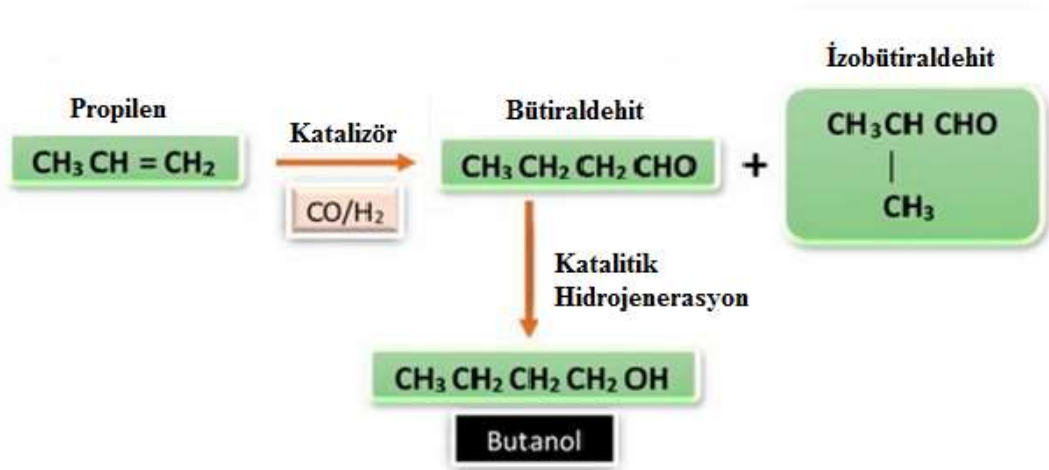
Reppe sentezinde, propilenin karbonilasyonu karbon monoksit, hidrojen ve bir katalizör varlığında meydana gelir ve n-bütanol ve izo-bütanol senteziyle sonuçlanır .Katalizör genellikle bir üçüncül amonyum tuzu veya polinükleer demir karbonil hidritleridir ve reaksiyon 100 °C'lik bir sıcaklıkta ve $0,5-2 \times 10^6$ Pa'lık bir basınçta ilerler (Ganeshan vd. 2025).



Şekil 2.4 Reppe Sentezi (Ganeshan vd. 2025)

2.3.1.3 Oxo sentezi

Oxo veya hidroformilasyon sentezi, daha yüksek aldehitler ve alkollerin üretiminde temel bir adımdır ve rodyum bazlı katalizörlerin kullanımında önemli gelişmeler görülmüştür. Oxo prosesi kullanılarak gerçekleştirilen verimlilik ve düşük üretim maliyeti, krotonaldehit sentezinin yüksek sıcaklıklarda (80–200 °C) ve basınçlarda (20–30 MPa) gerçekleştirilmesine ve %75 n-butanol ve %25 izo-butanol elde edilmesine rağmen, modası geçmiş hale gelmesine yol açtı. Ancak, daha fazla iyileştirme, prosesin daha düşük basınçlarda ($1-5 \times 10^6$ Pa) gerçekleştirilmesine ve %95 n-butanol ve %5 izo-butanol elde edilmesine olanak sağlamıştır (Ganeshan vd. 2025).

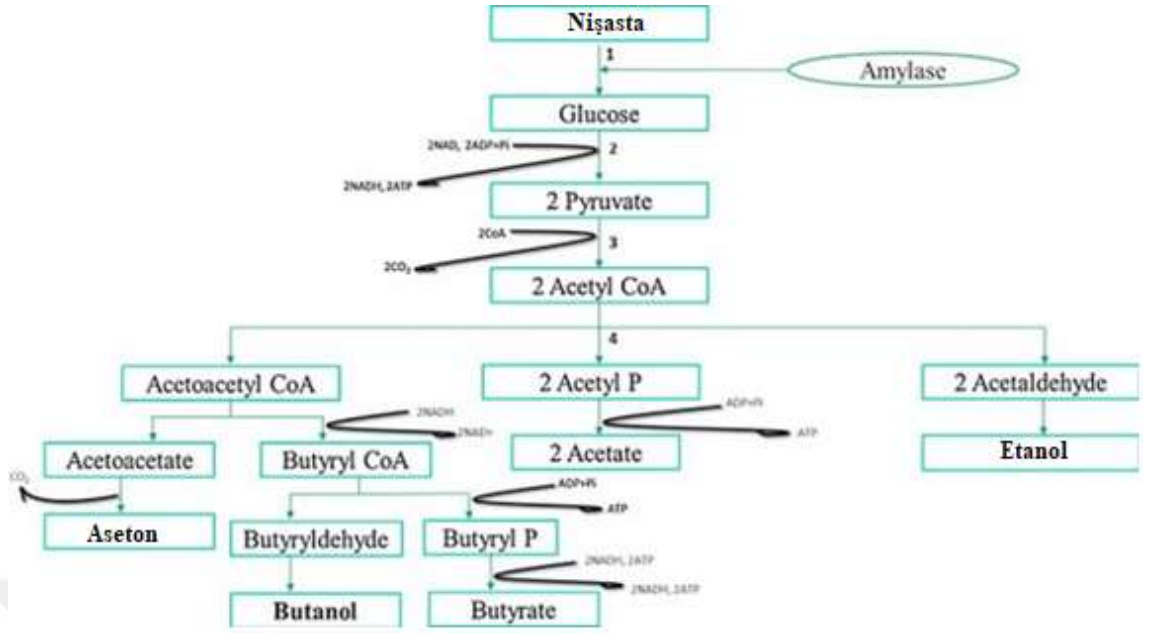


Şekil 2.5 Oxo Sentezi (Ganeshan vd. 2025)

2.3.2 Bütanolün biyolojik üretimi

Biyobütanol fermentasyon yolu ile şeker, gliserol ve lignoselülozik hammaddeden, Clostridiaceae familyasından çeşitli bakterilerin varlığında üretilir. Biyodizel üretiminde yan ürün olarak ortaya çıkan gliserol, fermentasyon için alternatif bir hammadde olabilir (Ndaba vd. 2015).

ABE fermentasyonu en çok kullanılan metabolik yoldur. ABE fermentasyonu karbonhidratların hidrolizinden elde edilen glukozu kullanan anaerobik biyolojik bir yoldur. İki aşamadan oluşur. Bunlar: Asidogenesis ve Solventogenesis'tir. Asidogenesis fazında, ilk olarak asitler üretilir sonrasında ise solventogenesis fazında bu asitler, aseton, bütanol ve etanole dönüştürülür (Ndaba vd. 2015).



Şekil 2.6 ABE Fermentasyonu (Ndaba vd. 2015)

2.4 Biyobütanol Üretiminde Kullanılan Hammaddeler

2.4.1 Birinci nesil hammaddeler

Nişasta ve şeker içeriği zengin bileşiklerden oluşan hammaddelerdir. Biyobütanol üretiminde yüksek verime sahiptir. Karmaşık ön işlem tekniklerine ihtiyaç duymaz ve basit ön işlem teknikleriyle yüksek şeker eldesine ve dolayısıyla yüksek bütanol üretimi gerçekleştirilebilir. Fakat bu hammaddelerin fazla kullanımı gıda kıtlığına yol açma potansiyeline sahiptir (Huzir vd. 2018).

Mısır, küresel olarak biyoetanol üretiminde en yaygın kullanılan tahıl olmasının yanı sıra, biyobütanol üretimi için de önemli bir nişasta kaynağıdır. Özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde mısır nişastası, ABE fermentasyonu için ticari bir substrat olarak kullanılmıştır (Ezeji vd. 2007).

Şeker kamışı ve şeker pancarı, şeker içeriği yüksek olan bu bitkiler, doğrudan fermente edilebilir şekerler sağladıkları için biyobütanol üretiminde tercih edilebilirler. Brezilya

gibi ülkelerde şeker kamışı, biyoetanol üretiminde lider konumdadır ve biyobütanol için de potansiyel bir hammaddedir (Procentese vd. 2017).

Buğday ve diğer tahıllar, nişasta açısından zengin olan buğday, pirinç ve tritikale arpa gibi tahıllar da biyobütanol üretiminde kullanılabilen birinci nesil hammaddeler arasındadır (Adıgüzel, A. O. (2013).

Patates ve diğer yumrulu bitkiler, nişasta içeriği yüksek olan patates, özellikle Almanya ve Doğu Avrupa'da biyoetanol üretiminde kullanılmıştır ve biyobütanol için de potansiyel bir kaynaktır (Adıgüzel, A. O. (2013).

2.4.2 İkinci nesil hammaddeler

İkinci nesil hammaddeler, mısır, buğday gibi tarımsal hammaddelerden geriye kalan mısır koçanı, saman gibi yenilemeyen hammaddeler ve yine kurumuş ağaç ot gibi yenilemeyen ormansal atıklardan elde edilen hammaddelerdir (Reshmy vd. 2023). Bu hammadde kaynakları ucuzdur, gıda ile rekabete girmez ve gıda fiyatlarında artışa neden olmaz, bol miktarlarda bulunur erişimi kolay ve ucuzdur ve bu hammadde kaynaklarının kullanımı atık yönetimine katkıda bulunur. Fakat dirençli ve karmaşık yapısı nedeniyle karmaşık ön işlemlere ihtiyaç duyar bu da işlemin maliyetine ve süresine olumsuz etkiye neden olur (Huzir vd. 2018).

Arpa samanı bol miktarda bulunan bir tarım atığı olup, ikinci nesil biyoyakıt üretimi için cazip bir lignoselülozik kaynaktır. Yapılan bir çalışmada arpa samanı enzimatik ve sülfürik asit ön işleminden geçirilmiştir. Enzimatik hidrolizin performansını artırmak için surfaktant kullanılmıştır ve ABE fermentasyonu sonucunda 10.8 g/L total ABE ve 7.9 g/L bütanol üretimine ulaşmışlardır (Yang vd. 2015).

Buğday samanı da dünya genelinde bol miktarlarda bulunan bir tarım atığıdır. Yapılan bir çalışmada ön işlenmiş buğday samanı kullanılarak eş zamanlı hidroliz ve

fermentasyon işlemi ile gaz sıyırma işlemi kullanılarak 21.42 g/L total ABE miktarına ulaşmışlardır (Qureshi vd. 2008).

Pirinç kepeği de Kore ve Japonya'da bol miktarlarda bulunan ikinci nesil bir hammadde. Yapılan bir çalışmada hammadde olarak yağsız pirinç kepeği enzim ve asit ön işleminden geçmiş ve bu ön işlem sonunda 12.24 g/L bütanol konsantrasyonuna ulaşmıştır (Lee vd 2009).

Mısır samanı da ikinci nesil hammadde olarak kullanılan diğer bir materyaldir. Yapılan bir çalışmada buhar patlama ön işleminden geçmiş mısır samanı simultane sakkarifikasyon ve fermentasyon işleminden geçmiştir ve işlem sonunda 17.1 g/L total ABE konsantrasyonuna ulaşmıştır (Liv d. 2016).

2.4.2.1 Patlıcan atığı

Dünya genelinde 1,5 milyon hektardan fazla alanda patlıcan yetiştiriciliği yapılmaktadır. Dünya patlıcan üretiminin %93'ü yedi ülkeden sağlanmakta olup, Çin (%55) ve Hindistan (%28) başı çekmektedir. Bu ülkeleri Mısır, Türkiye ve Japonya takip etmektedir. Türkiye'de yaklaşık 1 milyon hektarlık tarım arazisi patlıcan, domates, biber gibi sebzelerin yetiştirilmesi için kullanılmaktadır. Antalya bölgesindeki küçük bir kasabada her yıl 100.000 tondan fazla kuru tarımsal atık oluşmaktadır. Yakın zamana kadar patlıcan artıkları da dahil olmak üzere sebze sapsı ya atılıyor ya da yakılıyordu. Ancak, bertaraf maliyetlerinin artması ve yakmanın çevresel sorunlara yol açması nedeniyle bu durum değişmektedir. Son dönemdeki ekonomik, teknolojik ve politik gelişmeler, tarımsal atıklar için yeni pazarlar açmakta ve bu pazarlar, birçok kırsal ekonominin yeniden endüstrileşmesinin temelini oluşturma potansiyeli taşımaktadır (Güntekin ve Karakuş, 2008). Gıda işleme sektörü, kabuk, çekirdek, sap gibi yenmeyen bitki kısımlarından oluşan büyük miktarda atık ve yan ürün üretir. Bu durum, değerli materyallerin kaybına yol açarken, çevresel ve ekonomik sorunları da artırır (Philippi vd. 2016).

2016 FAO raporlarına göre 52,3 milyon tonluk küresel üretimiyle patlıcan, dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilen sebzelerden biridir. Patlıcanın atığı genellikle ticari değeri olmayan, ancak fenolik bileşikler ve pektin gibi polisakkaritler açısından zengin olan kabuk ve yeşil çanak yapraklarından oluşur (Kazemi vd. 2019)

Patlıcanın dünya üzerinde tüketimine bakıldığında, dolayısıyla oluşturulan atık miktarı da göz önüne alındığında ve ilerleyen bölümlerde patlıcan atığının yapısı da göz önünde bulundurulduğunda verimli biyobütanol üretimi için uygun bir ikinci nesil hammadde olduğu değerlendirilmektedir.

2.4.3 Üçüncü nesil hammaddeler

Yüksek karbonhidrat üretebilme yeteneğine sahip alglerden elde edilen hammaddelerdir. 1. ve 2. nesil hammaddelere göre birim alanda daha hızlı ve daha fazla hammadde üretimi avantajına sahiptir (Reshmy vd. 2023). Yapısında lignin çok az bulunduran ya da hiç bulundurmeyen hammaddelerdir (Huzir vd. 2018).

Literatürde 3. nesil hammaddeden bütanol üretimi oldukça yeni bir başlıktır. Yapılan bir çalışmada hammadde olarak termal ayrıştırma ön işlemine tabi tutulmuş bir alg ve 40g/L gliserol kullanılmıştır. *Clostridium acetobutylicum* bir jel içerisinde immobilize edilerek ABE fermentasyonu gerçekleştirilmiştir ve bu işlem sonucunda bütanol de içeren 14-16 g/L solvent üretilmiştir (Jones D ve Woods D, 1986).

Başka bir çalışmada atık su algı hammadde olarak kullanılmış ve asit ön işlemine tabi tutulmuştur ve bu ön işlenmiş alg hidrolizatına ksilanaz ve selülaz enzimleri eklenmiştir. ABE fermentasyonu sonucunda 9.74 g/L total ABE konsantrasyonuna ulaşılmıştır (Ellis vd 2012).

2.4.4 Dördüncü nesil hammaddeler

Bu hammaddeler ise genetiği değiştirilmiş algler ve tarımsal ürünler olarak nitelendirilebilir. Aynı zamanda bütanol üretiminde fermentatif mikroorganizmaların da genetik olarak düzenlenmesini de içerir. Çok yeni bir araştırma konusudur literatürde bu konu üzerine çok az araştırma vardır (Reshmy vd. 2023).

Yapılan bir çalışmada *Clostridium tyrobutyricum* suşu adhE2 geninin overekspresyonu ile modifiye edilerek bütanol üretiminde %60 artışa ulaşmışlardır (Feng vd. 2025).

Başka bir çalışmada ise *Clostridium beijerinckii* bakterisi pykA ya da pfkA genlerinin overekspresyonu metabolik mühendislik işlemleriyle bütanol toleransı %2.5 (v/v) artırılmıştır ve total ABE konsantrasyonu 13.65 g/L olarak gözlenmiştir (Zhou vd. 2025).

2.5 Hammaddenin Ön İşlenmesi

Biyobütanol üretiminde hammaddenin ön işlemi olmazsa olmaz kritik bir aşamadır. Lignoselülozik materyal, içeriğindeki lignin nedeniyle dirençli bir hammaddedir. Belirli enerji gerektiren işlemlerle ligninin elimine edilmesi ve hammaddenin içeriğindeki selüloz ve hemiselülozun açığa çıkarılması elzemdir. Bu açığa çıkarılan selüloz ve hemiselüloz ise belirli enzimlerle muamele edilerek fermentasyon için gerekli fermente edilebilir şekerler açığa çıkarılmalıdır. Bu işlemler enerji gerektiren ve sürecin maliyetini olumsuz etkileyen faktörleridir dolayısıyla bu işlemler görece az enerji harcayan, üretim maliyetlerine az etki edecek şekilde tasarlanması gerekmektedir. Aşağıdaki başlıklarda bu ön işlem süreçleri tanımlanmaktadır.

2.5.1 Fiziksel ön işlem metotları

Fiziksel ön işlem yöntemleri genellikle lignoselülozik hammaddenin boyutunu küçültmek, direncini kırmak ve sonraki işlemlerde kolaylık sağlaması açısından

kullanılan işlemlerdir. Değirmenler, öğütücüler, vidalar, ultraviyole veya mikrodalga araçları gibi mekanik cihazlar bu süreç için kullanılan cihazlardır (Mankar vd. 2021).

2.5.1.1 Öğütme ön işlemi

Öğütme ön işlemi, hammaddenin partükül boyutunu azaltmak için kullanılan bir fiziksel ön işlemdir. Yapılan öğütme türüne göre parçacık boyutu 0.2 ila 2 mm arasına indirgenebilir. Bu işlemin avantajları şunlardır; selülozun kristalitesini azaltmak, hammaddenin yüzey alanını artırarak enzimatik hidrolizi hızlandırmak, selüloz polimerisasyonunun kapsamının azaltılmasıdır (Mankar vd. 2021).

2.5.1.2 Ekstrüzyon ön işlemi

Ekstrüzyon, biyokütle ön işlemi süreçlerinde kullanılan, yüksek basınç ve sıcaklık yaratan termo-mekanik bir yöntemdir. Bu işlemde, vida (tekli veya ikiz) ve namlu arasındaki yüksek kesme kuvvetleri, biyokütlenin fiziksel (lif kısalması, liften arındırma) ve kimyasal yapısını değiştirerek yüzey alanını artırır. Bu artış, enzimlerin biyokütleyle erişimini kolaylaştırır ve hidrolizi destekler (Mankar vd. 2021).

2.5.1.3 Mikrodalga ön işlemi

Mikrodalga ışınları, lignoselülozik biyokütlenin ön işleminde giderek daha fazla ilgi gören, iyonlaştırmayan elektromanyetik radyasyonlardır. Bu teknoloji, yeşil kimya prensipleriyle uyumlu olması ve biyoyakıt üretimindeki biyorafineri uygulamalarına sağladığı faydalar nedeniyle öne çıkmaktadır. Mikrodalga ışınları, malzeme içindeki parçacıklarda iç patlamalara neden olarak, dirençli yapıların parçalanmasını kolaylaştırır. Biyokütlenin selülozik bileşenlerindeki polar grupların varlığı, mikrodalgaların ürettiği ısı nedeniyle parçacıklar içinde sıcak noktaların oluşmasına yol açar. Mikrodalga ısıtmanın başlıca avantajları; kısa reaksiyon süresi, hızlı ve homojen ısıtma, düşük reaksiyon aktivasyon enerjisi, yüksek ürün verimi, minimum yan ürün oluşumu, uygun maliyetli, çevre dostu ve enerji verimli olmasıdır (Mankar vd. 2021).

2.5.1.4 Ultrason ön işlemleri

Ultrason, işleme aralığının üzerindeki frekanslarda (>20 kHz) dalgalar halinde yayılan bir akustik enerjidir. Bu teknoloji, lignoselülozik biyokütle ön işleminde, malzemenin dayanıklı yapısını kırmak ve biyokütlenin değerlendirilmesi için çeşitli reaksiyonları hızlandırmak amacıyla son yıllarda öncü bir yöntem haline gelmiştir. Ultrason dalgalarının lignoselülozik hammadde üzerindeki etkileri iki ana teoriyle açıklanmaktadır. Akustik kavitasyon ve şok dalgaları; ultrason dalgaları, herhangi bir ortamda yayılırken akustik kavitasyon adı verilen bir olayı tetikler. Bu olay, kendiliğinden mikro kabarcıkların oluşmasına yol açar. Bu mikro kabarcıklar çöktüğünde, yaklaşık 5000°C'ye varan yüksek sıcaklık ve ~50 MPa basınca sahip şok dalgaları/yerel sıcak noktalar oluşur. Bu yüksek sıcaklık ve basınçtaki şok dalgaları veya sıcak noktalarla karşılaştığında, ortamda bulunan katı parçacıkların kristalin yapısı parçalanır. Oksitleyici radikallerin oluşumu; akustik salınımların neden olduğu yüksek frekans, su moleküllerinin ayrışmasıyla H° ve OH° gibi oksitleyici radikallerin oluşumuna neden olur. Bu oldukça reaktif radikaller, LCB'nin karmaşık ağ yapısında bulunan glikozidik bağları koparır. Ultrason kullanımı, kısa kalış süresi, yüksek aktivasyon enerjisi ve LCB'nin etkili bir şekilde parçalanması için yeterli kütle transferi gibi birçok avantaj sunar (Mankar vd. 2021).

2.5.2 Kimyasal ön işlemler

2.5.2.1 Asit ön işlemleri

Lignoselülozik biyokütlenin asit ön işlemleri, genellikle hemiselülozun uzaklaştırılması ve selülozun enzimlere erişilebilirliğinin artırılması amacıyla kullanılır. Bu işlemlerde en yaygın kullanılan asitler sülfürik asit, asetik asit ve fosforik asittir. Asit ön işlemleri iki farklı şekilde uygulanabilir. Seyreltik asit ön işlemleri, yüksek sıcaklıklarda (>200°C) %0.1 gibi düşük asit konsantrasyonları kullanılır. Bu yöntemde asit tüketimi azdır ancak yüksek sıcaklıklar nedeniyle genel süreçte enerji ihtiyacı fazladır. Konsantre asit ön işlemleri, nispeten düşük sıcaklıklarda (<50°C) %30-70 gibi yüksek asit konsantrasyonları kullanılır. Bu yaklaşım, düşük reaksiyon sıcaklığı sayesinde enerji tüketimini azaltır.

Ancak, yüksek asitlilik, fermentasyon inhibitörleri (furfural, 5-hidroksimetilfurfural) oluşumuna yol açar. Bu inhibitörler, DNA yıkımı ve RNA sentezinin azalması gibi etkilere sahiptir, bu da enzimatik aktiviteyi engeller. Ayrıca, yüksek asit konsantrasyonları nedeniyle reaksiyon kabının korozyon riski de yüksektir (Mankar vd. 2021).

2.5.2.2 Alkali ön işlem

Alkali ön işlemi, potasyum, sodyum, amonyum ve kalsiyum hidroksitler kullanılarak biyokütlenin ön işlemidir. Bu süreçte, lignin-karbonhidrat kompleksindeki ester, aril-eter ve alkil-aril bağları sabunlaşma ve solvasyon reaksiyonlarıyla parçalanır. Ayrıca, hemiselülozda bulunan asetil ve üronik asit grupları da uzaklaştırılır. Bu kimyasal değişiklikler sonucunda, enzimlerin selüloz fraksiyonuna erişilebilirliği artar, bu da şekerlerin etanol üretimi için fermentasyonuna yardımcı olur. Alkalın ön işlem sürecinin başlıca dezavantajları arasında çamurun nötralizasyonu için yüksek ön işlem sonrası maliyet, daha uzun kalış süresi ve odun gibi yüksek lignin içeriğine sahip biyokütle hammaddelerini ön işlemeye uygun olmaması yer almaktadır (Mankar vd. 2021).

2.5.2.3 Organosolv ön işlemi

Organosolv ön işlemi, biyokütlenin ön işleminde metanol, etanol, tetrahidrofurfuril alkol, etilen glikol ve aseton gibi organik çözücülerini kullanır. Bu süreçte bazen organik asitler (asetilsalisilik, oksalik, salisilik) veya bazlar (sodyum hidroksit, kireç) katalizör olarak da kullanılabilir. Bu yöntemde, lignin ve hemiselüloz arasındaki bağlar çözünürleştirme yoluyla parçalanır, bu da enzimatik hidroliz için selülozun genel yüzey alanını artırır (Mankar vd. 2021).

2.5.2.4 Amonyak lifi patlaması (AFEX)

Amonyak lifi patlaması (AFEX) ön işlemi, lignoselülozik hammaddenin susuz sıvı amonyakla orta dereceli sıcaklıklarda ve yüksek basınçlarda kısa süreli olarak işlenmesini içerir. AFEX yöntemi birçok önemli avantaj sunar, lignoselülozik hammaddenin yüzey alanını ve enzimlerin hidrolize erişimini artırır, inhibitör üretimi ihmal edilebilir düzeydedir, orta sıcaklıklarda çalışır ve kısa kalış süresi gerektirir, selüloz/hemiselüloz içeriğinin yüksek oranda korunmasını sağlar, hemiselülozun deasetilasyonunu ve hammaddenin kolayca parçalanmasını sağlar. Ayrıca, AFEX süreci, sıcaklık, kalış süresi, basınç, su içeriği ve amonyak içeriği gibi beş ana parametre değiştirilerek maksimum gluklan ve ksilan verimi elde etmek için optimize edilebilir (Mankar vd. 2021).

2.5.2.5 Süperkritik akışkanlar ön işlemi (SCF)

SCF'ler, sıvı ve gaz arasında homojen bir fazda bulunur ve her ikisinin özelliklerini sergiler. Yüksek difüzyon yeteneği ve düşük viskozite gibi üstün fizikokimyasal özelliklere sahip olmaları sayesinde, bu toksik olmayan ve nispeten düşük maliyetli çözücüler, katı malzemelerin içine kolayca nüfuz edebilir. SCF'lerin gaz benzeri difüzyon yeteneği ve viskozitesi ile sıvı benzeri yoğunluk ve çözme gücünün sinerjik kombinasyonu, diğer geleneksel çözücülere kıyasla daha hızlı kütle transferi sağlar. Düşük işletme maliyetleri ve yüksek enerji verimliliği nedeniyle SCF'lerin birçok endüstriyel uygulamada kullanımı giderek. Bu nedenle, bu akışkanlar geleceğin "yeşil çözücüler" olarak da anılmaktadır. En sık kullanılan SCF'ler arasında süperkritik CO₂ (ScCO₂) ve süperkritik su (SCW) bulunur. Hem ScCO₂ hem de SCW, kanserojen olmayan, yanıcı olmayan ve termodinamik olarak kararlı maddelerdir (Mankar vd. 2021).

2.5.2.6 Derin ötektik çözücüler (DES)

Yeşil kimya ilkelerine göre, çevre dostu çözücülerin kullanımı bir sürecin genel yenilenebilirliğini belirlemede hayati bir kriterdir. Sanayide yaygın olarak kullanılan geleneksel çözücüler toksiktir ve çevre için ciddi tehditler oluşturur. Bu nedenle,

alternatif yeşil çözücü geliştirme arayışı artmıştır. Bu bağlamda, derin ötektik çözücüler, son yirmi yılda çevre dostu ortamlar olarak büyük ilgi görmüştür. Hidrojen bağı vericisi ve hidrojen bağı alıcısının uygun oranlarda karıştırılmasıyla DES'leri sentezlenmiştir. Geleneksel çözücüler ve iyonik sıvılarla karşılaştırıldığında, DES'ler ekonomik, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen çözücülerdir. Ayrıca, DES'lerin sentezi basittir ve karmaşık saflaştırma adımları içermez. Ötektik çözücülerin önemli avantajlarından biri, iyonik sıvılara benzer şekilde fizikokimyasal özelliklerinin geniş bir yelpazede ayarlanabilir olmasıdır. DES'lerin yüksek polarite, su ve diğer eş-çözücülerle kolay karışabilirlik gibi benzersiz çözücü özellikleri, farklı biyokütle hammaddelerinin verimli delignifikasyonu için önemli ölçüde kullanılmasını teşvik etmiştir. İlginç bir şekilde, DES'ler, lignoselülozik biyokütle kompleksinden lignini seçici olarak uzaklaştırma yeteneğine sahiptir, böylece hafif reaksiyon koşulları altında lignoselülozik hammaddenin ön işlemleri için çevre dostu ve yeni bir yol oluşturur (Mankar vd. 2021).

2.5.3 Fiziko-kimyasal ön işlem

2.5.3.1 Buhar patlaması ön işlemi

Buhar patlaması, lignoselülozik biyokütlenin kısa sürede parçalanmasına yardımcı olmak için yüksek basınç ve yüksek sıcaklık altında uygulanan bir ön işlem yöntemidir. Bu işlem esas olarak biyokütle matrisinin önemli ölçüde bozulmasına, ligninin kısmen uzaklaştırılmasına ve hemiselülozik şekerlerin çözünmesine neden olur. Ligninin kısmen uzaklaştırılması sonucunda biyokütle yüzeyinde sözde lignin (pseudo lignin) oluşumu da gözlemlenebilir. Kimyasal maddelerin eklenmesi, buhar patlaması ön işlemi sırasında delignifikasyon sürecini hızlandırır. Buhar patlaması genellikle sert ağaç ve tarımsal atıklar için kullanılır. Ancak, yüksek hemiselüloz uzaklaştırması nedeniyle yumuşak ağaç biyokütlesine karşı o kadar etkili değildir (Purkait ve Haldar, 2021).

2.5.3.2 Sıcak su ön işlemi

Sıvı sıcak su veya hidrotermal ön işlem, biyokütlenin karmaşık yapısal ağın parçalamak için çevre dostu bir yöntem olarak kabul edilir. Bu süreç, herhangi bir harici kimyasal madde eklemesi gerektirmez; bunun yerine, çözücü olarak sıkıştırılmış su kullanır. Bu durum, daha az enerji gerektirmesi nedeniyle uygun maliyetli bir süreç olmasını sağlar ve inhibitör oluşumunu sınırlar. Ancak, hidronyum iyonları lignoselülozun değişimlerine müdahale etmekle kalmaz, aynı zamanda enzimatik hidroliz sürecini etkileyen yalancı lignin (pseudo lignin) ve istenmeyen inhibitörlerin oluşumuna da yol açabilir. 200°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, ligninin biyokütle yüzeyinde yeniden dağılımı rapor edilmiştir, bu da daha fazla artık lignin varlığını gösterir. Sıvı sıcak su arıtmanın başlıca avantajları, herhangi bir harici kimyasal madde eklemeye gerek olmaması ve lignoselülozik içeriğin büyük bir kısmının ön işlem görmüş biyokütlerde korunmasıdır. Ancak, dezavantajı hem sert hem de yumuşak ağaçtan ligninin önemsiz düzeyde uzaklaştırılmasıdır. (Purkait ve Halder, 2021).

2.5.3.3 Islak oksidasyon ön işlemi

Islak oksidasyon ön işlemi, biyokütlenin 20 MPa basınç altında, 100-200°C sıcaklık aralığında ve oksitleyici olarak oksijen varlığında 0.5-2 saat süreyle işlenmesini içerir. Sürecin genel maliyetini artırması nedeniyle, oksijen veya hava yerine başka kimyasalların oksitleyici olarak kullanılması genellikle tercih edilmez. Bu ön işlem, selülozun katı kristal matrisini parçalamada etkilidir, bu da hemiselülozun katı polimerik fazdan sıvı faza dönüşümünü kolaylaştırır. 170°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, lignoselülozik biyokütle otohizolize uğrar ve organik asitlerin oluşumuyla sonuçlanır. Ayrıca, reaksiyon ortamının asidik pH'sı hidroksimetilfurfural oluşumuna neden olurken, bazik ortam aldehit tipi bileşiklerin üretimine yol açar. Islak oksidasyon sürecinin avantajları arasında biyokütlenin önemli ölçüde delignifikasyonu ve reaksiyon karışımlarından düşük inhibitör oluşumu yer alır. Ancak, yüksek maliyetler bu sürecin yaygın kabulünü sınırlayan temel dezavantajıdır (Purkait ve Halder, 2021).

2.5.4 Biyolojik ön işlem

Biyolojik ön işlem, özellikle beyaz çürük mantarları kullanılarak, lignoselülozik biyokütleyi parçalamak için daha az enerji yoğun ve daha az kimyasal gerektiren bir yöntem sunar. Lignoselülozik biyokütlenin parçalanmasındaki en büyük engel lignindir ve bu mantarlar onu parçalamak için ligninolitik enzimler üretir. *Pleurotus florida*, *Irpex lacteus*, *Coriolopsis caperata* ve *Ganoderma sp.*'nin ligninaz üretimi yaparak lignoselülozik hammaddedeki lignini parçaladığı literatürde bildirilmiştir. Biyolojik ön işlemin hafif reaksiyon koşulları, daha az enerji tüketimi, ligninin etkili şekilde parçalanması ve hemiselülozun kısmen giderilmesi gibi önemli avantajları olmasına rağmen, yavaş reaksiyon hızı ve tatmin edici olmayan verim bu sürecin önündeki başlıca engellerdir (Purkait ve Haldar, 2021).

2.6 Biyobütanol Üretimini Artırmak İçin Geliştirilen Fermentasyon Teknikleri

Biyobütanol üretimini artırmak ve maliyeti düşürmek için farklı fermentasyon sistemleri geliştirilmektedir. Batch fermentasyon işlemi basit bir işlemdir ve kontaminasyon riski azdır (Jang vd. 2012). Bir çalışmada batch fermentasyon sistemi ile simultane hidroliz ve fermentasyon işlemi kullanılmıştır ve hammadde olarak buğday samanının işlenmesi sonucu 0.27 g/L/h üretkenliğe ulaşmıştır (Marchal vd. 1985). Başka bir çalışmada ise yine batch fermentasyon işlemi kullanılarak nişastanın fermentasyonu işleminde butanol üretimi 5.4 ile 6.5 kat artış göstermiştir (Tran vd. 2010).

Fed-batch fermentasyon ise endüstriyel olarak tercih edilen bir fermentasyon işlemidir. Üretilen üründen yüksek konsantrasyon ve üretkenliğe izin verir (Jang vd. 2012). Yapılan bir çalışmada substrat ve ürün inhibasyonunu önlemek için fed-batch fermentasyon ve gaz sıyırma tekniği kullanılmıştır. 201 saat boyunca süren fed-batch fermentasyon sürecinde 500 gram glukoz kullanılarak 151.1 gram bütanol üretilmiştir (Ezeji vd. 2005). Başka bir çalışmada ise glikoz ve bütirik asit birleşimi fed-batch fermentasyonla *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 bakterisi kullanıldığında 16 g/L bütanol üretimine ulaşımlardır (Tashiro vd. 2005).

Sürekli fermentasyon sisteminde ise batch ve fed-batch fermentasyonuna göre hazırlama zamanının gecikmesinin önüne geçmeyi hedefler. Yüksek hücre yoğunluklu sürekli fermentasyon sistemi mikroorganizmanın yavaş gelişim gösterdiği veya ürün inhibasyonundan güçlü bir şekilde etkilendirği durumlarda özellikle uygundur. Biyofilm bazlı biyoreaktörler ve membran hücre yenilemeli biyoreaktörler bu sistemlere örnek verilebilir (Jang vd. 2012).

Fermentasyonun verimli bir şekilde devam edebilmesinde biyotoksisite istenmeyen önemli bir faktördür. Bu toksisite verim kaybına hatta fermentasyonun tamamen inhibasyonuna neden olabilir. Bu sorunların önüne geçmek için araştırmacılar in-situ ürün ayrıştırma teknikleri üzerine çalışmaktadırlar. Pervoporasyon, adsorbsiyon ile ürün ayrıştırma ve gaz sıyırma bu tekniklerden bazılarıdır (Jang vd. 2012).

Pervoporasyon, in-situ ayrıştırma teknikleri arasında yüksek seçiciliğe düşük enerji ihtiyacı ve mikroorganizmalara olan minimal etkileri nedeniyle sıklıkla başvurulan yöntemlerdendir. Seçici geçirgen bir filtre ayrıştırma işlemine dayanır. Bir çalışmada polidimetiloksan destekli kompozit membran kullanılarak bütanol fermentasyonu işlemi gerçekleştirilmiş ve kontrol sistemine göre yüksek biyokütle konsantrasyonu ve glukoz kullanma oranı gözlenmiştir (Liv d. 2011).

Adsorbsiyon ile ürün ayrıştırma tekniğinde fermentasyon ortamındaki ürün reçine bazlı maddeler kullanılmaktadır. Bir çalışmada Dowex Optipore SD-2 reçinesi kullanılarak in-situ bütanol ayrıştırması yapılmış ve 22.2 g/L bütanol verimine ulaşılmıştır (Nielsen, D. R., & Prather, K. J., 2009).

Gaz ayrıştırma yöntemi tekniğinde ise diğer tekniklere göre pahalı membranlara, toksik ve pahalı ekstraktlara ihtiyaç duyulmaz. Bu işlem sırasında H₂ ve CO₂ gibi taşıyıcı bir gaz biyoreaktörde gaz kabarcıkları oluşturmasıyla bir püskürtücüden geçirilir, gaz püskürtülmesi yoluyla buharlaşmış bütanol bir konsantratörden geçer ve yoğunlaştırmayla bütanol elde edilir ve gaz biyoreaktöre geri gönderilir. Bir çalışmada bu teknik kullanılarak 18.4 g/L total ABE konsantrasyonuna ulaşılmıştır.

2.7 Bütanol Üreten Mikroorganizmalar

Biyobütanol genel olarak *Clostridium* suşları tarafından üretilir. *Clostridium* suşlarının genel özellikleri spor oluşturan, zorunlu anaerob, çubuk şekilli ve gram-pozitif bakterilerdir (Kumar ve Gayen 2012).

Clostridium türlerinin hücre döngüsü iki ana aşamadan oluşur; asidogenesis ve solventogenesis. Asidogenesis fazı, hücre kültürünün eksponansiyel evresinde gerçekleşir ve asetik asit ve bütirik asit üretilir. Bu fazda pH 4.8'dir. Solventogenesis fazı ise durağan fazda gerçekleşir ve aseton, bütanol ve etanol üretilir. Bu fazda ise pH yaklaşık 6.8'dir (Kumar ve Gayen 2012).

Biyobütanol *Clostridium* türlerinin kullanılmasıyla üretilmesinin yanında Clostridial olmayan mikroorganizmalar tarafından genetik modifikasyonlar yoluyla da üretilebilir. *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida* ve *Bacillus subtilis* çalışmalarda karşılaşılan diğer suşlardır. Gerekli enzimleri kodlayan genlerin eklenmesi veya delesyonuyla Clostridial olmayan mikroorganizmalardan bütanol üretimi sağlanabilir. Asetil CoA asetiltransferaz, beta hidroksibütiril-CoA dehidrojenaz, krotonaz, bütiril-CoA dehidrojenaz, bütiraldehid dehidrojenaz ve bütanol dehidrojenaz bu enzimlerden bazılarıdır (Kumar ve Gayen 2012).

2.8 Biyobütanol Üretiminde Sürfaktantların Kullanımı

Biyobütanol üretiminde, hammaddenin hidrolizi sırasında enzimler yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat enzimler bu esnada girdi maliyetlerini yukarı çekmektedir. Bu sebep dolayısıyla enzim maliyetlerini azaltmak girdi maliyetlerini de aşağı çekmektedir. Bu sebeple kullanılan enzim miktarını azaltmak amacıyla hidroliz esnasında surfaktantların kullanımı özellikle iyonik olmayan surfaktantların kullanımı umut vadeden bir yaklaşımdır (Qing vd. 2010). Sürfaktantların, bir emülsiyon oluşturarak çözünmüş lignin parçaları ile sıvı faz arasındaki yüzey gerilimini azaltma yeteneğine sahip olduğu ve böylece katı hal kümeleşmesini ve tortulaşmasını önlediği bildirilmiştir

(Massarweh vd. 2020). Surfaktantların enzimatik hidrolizi nasıl artırdığı ile ilgili çeşitli açıklamalar mevcuttur. Bunlar; surfaktantlar substratların yapısında değişikliğe neden olur ve enzimlerin substrata olan erişimini daha da mümkün hale getirir, surfaktantlar enzimleri daha stabil hale getirir ve hidroliz sırasında denatürasyonun önüne geçer, surfaktantlar, substrat ve enzim arasındaki pozitif etkileşimi artırır, surfaktantlar enzimlerin verimsiz adsorbsiyonunu azaltır (Qing vd. 2010). Fakat surfaktantların enzimatik hidrolizi nasıl iyileştirdiğini tutarlı bir şekilde açıklayacak bir mekanizma henüz geliştirilmemiştir (Qing vd. 2010). Lignin, verimli bir enzimatik hidrolizin önündeki engellerden biri olduğu yaygın olarak bilinmektedir. Hidroliz esnasında selüloz enzimine bağlanarak selüloz ve hemiselülozun etkili bir şekilde hidrolize olmasının önüne geçer ve hidroliz süresini önemli ölçüde artırarak sürecin maliyetini artırır (Qing vd. 2010). Yapılan araştırmalara bakıldığında iyonik sıvılar hidroliz sırasında selülozun kristallliğini azaltmaktadır ve enzimlere ya da fermentatif mikroorganizmada inhibasyona neden olmadan kısmi lignin ve hemiselüloz giderimine neden olduğu bildirilmektedir. İyonik sıvı ön işlem metotları diğer ön işlem metotlarına göre daha az enerji ihtiyacına sahip, idare etmesi kolay ve daha çevreci ön işlem metotlarıdır. Surfaktantlar hem hidrofobik hem de hidrofilik özelliklere sahiptir ve iki sıvı faz arasındaki yüzey gerilimini azaltarak hidrofobik madde giderimini artırır. Yapılan bir araştırmada iyonik sıvı ön işleminde Tween 80 ve PEG 4000 surfaktantları kullanılarak kontrol grubuna göre %12.5 lignin giderimine ulaşıldığı bildirilmiştir (Chang vd. 2017). Yapılan bir çalışmada, küspenin enzimatik hidrolizi sırasında iyonik olmayan Tween 20 surfaktanı kullanılmış ve ön işlem %3.33 hızlanmıştır. Bu ön işlenmiş küspede kalan lignin miktarı %22-27 oranında azalmıştır (Kurakake vd. 1994). Yapılan başka bir çalışmada ise bütanolü fermentasyon ortamından ekstrakte etmek bütanol üretimini artırmak için iyonik olmayan surfaktanlar kullanılmıştır. Yapılan optimizasyonlar sonucunda %6'lık L62 surfaktanı kullanılarak kontrol grubuna göre %225 bütanol verimliliğinde artış gözlemlendiği belirtilmiştir (Dhamole vd. 2012).

2.9 Biyobütanol Üretiminde Ko-kültür Stratejisi

Biyobütanol üretiminde hammadde olarak kullanılan lignoselülozik materyaller selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşur. Bu materyalin hidrolizinden sonra açığa baskın olarak iki monosakkarit açığa çıkar, bunlar; glukoz ve ksilozdur (Qi vd. 2015). Fakat bu iki monosakkariti efektif bir şekilde bütanole fermente edebilmek için her iki şekeri de fermente edebilecek özellikler gösteren mikroorganizmaların ko-kültür stratejisine ihtiyaç duyulur. Bu tarz ko-kültür sistemlerinde *Saccharomyces cerevisia* yaygın olarak kullanılan bir mayadır. Bu maya yüksek alkol konsantrasyonu, organik asit ve sıcaklık gibi stres etkilerine karşı fermentasyon ortamına amino asit sağlar. Bu amino asitler fermentasyon ortamındaki ko-kültür bakterisine bu olumsuz koşullara karşı dayanıklılık sağlar ve metabolizma aktivitesini artırarak bütanol üretiminde artış sağlanmasına yardımcı olur (Mohapatra vd. 2020).

Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında Mishra ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hammadde olarak muz kabuğu atığı kullanılmış, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pishia sp* ko-kültür sisteminin kullanılmasıyla 72 saat fermentasyon süresinde 7,4 g/L biyobütanol üretimi gözlenmiştir (Mishra vd. 2020)

Wu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada hammadde olarak pirinç samanı kullanılmış, *Clostridium beijerinckii* ve *Saccharomyces cerevisiae* ko-kültür sisteminin kullanımı ile 72 saat fermentasyon süresinde 10,62 g/L biyobütanol üretimi gözlenmiştir. Bu değer kontrol grubunda 4,22 g/L'dir ve artış 6,4 G/L olarak ölçülmüştür (Wu vd. 2020).

Mohapatra ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya baktığıldığında ise hammadde olarak yine pirinç samanı kullanılmıştır. Ko-kültür sistemi olarak *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pishia sp.* kullanılmıştır. 72 saat fermentasyon süresinde ise 4,32 g/L biyobütanol üretimi gözlenmiştir (Mohapatra vd. 2020).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Mikroorganizmalar Ve Ortam

Bu çalışmada kullanılan bütün mikroorganizmalar Ankara Üniversitesi Kültür Koleksiyonundan sağlanmıştır. Fermentasyon deneylerinden önce *C. beijerinckii* DSMZ 6422 anaerobik olarak Hungate Tüplerinde 37 °C’de 24 saat P2 ortamında ön kültüre alınmıştır (Plaza vd. 2017). *S. cerevisiae*, *C. boidinii* (Demiray vd. 2022) ve *K. marxianus* (Kabadayı vd. 2024) mayaları YPD ortamında 30 °C’de anaerobik olarak ön kültüre alınmıştır. P2 ortamı içeriği(g/L): K₂HPO₄, CH₃COONH₄ 2.20.5, K₂HPO₄ 0.5, thiamine 0.001, para-amino-benzoik asit 0.001, biotin 0.00001, MnSO₄.7H₂O 0.01, MgSO₄.7H₂O 0.2, NaCl 0.01, FeSO₄.7H₂O 0.01 maya özütü 1 ve glukoz 60 (Qureshi ve Blaschek, 1999). YPD ortamı ise 3 g/L maya özütü, 10 g/L peptone ve 20 g/L glukoz içermektedir.

3.2 Atık Ürünün Hazırlanması

PS Yurt Konserve Co.’den temin edilmiştir. PS 70 °C’de etüvde kurutulmuş ve endüstriyel öğütücüde 0.2 cm çapında öğütülmüştür. Fiziko-kimyasal ön işlem için, %5, %10 ve %20’lik konsantrasyonlarda PS, %1’lik sülfürik asit (H₂SO₄) ile ön işlem uygulanmıştır. Asidik örnekler 121 °C’de 15 dk otoklavlanmıştır (Germec ve Turhan, 2018). Buna ek olarak fiziko-kimyasal ön işlem etkisini araştırmak için Whatman No. 1 filtre kağıdıyla filtrelenmiştir. Ön işlem uygulanmış ve filtrelenmemiş PS’nin enzimatik hidrolizinde örneklerin pH’sı 50 mM sitrat tamponu kullanılarak 4.8’e ayarlanmıştır. Daha sonra örnekler 15 FPU/g CelliCTec2 enzimi ilave edilmiştir ve örnekler 72 saat boyunca 50 °C’e sallanan su banyosunda inkube edilmiştir (Chen vd. 2012). 72 saat sonra, enzimatik aktiviteyi sonlandırmak için 10 dk 90 °C’de su banyosunda bekletilmiştir. Hidrolizat deneylere başlanmadan önce Whatman No. 1 filtre kağıdı kullanılmıştır.

3.3 PS’nin Hidrolizinde Sürfaktant Etkisi

PS’nin enzimatik hidrolizinde surfaktant etkisini belirlemek için, Tween 80 (%0.5 (v/v)), Triton-X 100 (%0.5 (v/v)), ve nişasta (80 mg/g_{selulöz}) kullanılmıştır. Bu surfaktantlar %20

PS ve 15 FPU/g_{substrat} selüloz enzimi içeren erlenlere aynı anda eklenmiştir (Hou vd. 2022) ve bölüm 2.2’de aktarıldığına göre hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir (Hou vd. 2022, Nababan vd 2022).

3.4 Surfaktant Varlığında PS’nin Hidrolizinde Enzim Konsantrasyonlarının Etkisi

80 mg/g_{selüloz} nişasta varlığında, PS’nin enzimatik hidrolizinde dört farklı enzim konsantrasyonunun (7.5, 15, 30 ve 60 FPU/g_{substrat} selüloz enzimi) etkisi incelenmiştir (Zhu vd. 2019).

3.5 Fermentasyon Deneyleri

Bütün fermentasyon deneyleri, optimum koşullarda, glukoz içermeyen P2 ortamı ihtiva eden PS hidrolizatı ile hazırlanmış Hungate tiplerinde gerçekleştirilmiştir. Örnekler anaerobik koşulları sağlamak amacıyla %99.9 nitrojen gazıyla temizlenmiştir. Anaerobik tüpler otoklavda sterilize edilmiştir. Sonrasında, P2 solüsyonları (asetat, mineral ve vitamin) ve *C. beijerinckii* DSMZ 6422, PS içeren fermentasyon ortamına eklenmiştir. Fermentasyon tüpleri, 37 °C’de 96 saat boyunca inkübe edilmiştir. Önceden belirlenen aralıklarda örnekler alınarak, etanol, bütanol ve aseton konsantrasyonlarını belirlemek için gaz kromatografisi (GC) cihazı kullanılmıştır.

3.5.1 Biyobütanol üretiminde başlangıç ps konsantrasyonlarının etkisi

Enzimatik hidroliz öncesinde (PS-E, fiziko-kimyasal ön işlem) ve sonrasında (ES+E, fiziko-kimyasal + biyolojik ön işlem) biyobütanol üretiminde %5, %10 ve %20 öğütülmüş PS konsantrasyonları değerlendirilmiştir. Bölüm 2.5’e göre fermentasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.5.2 PS hidrolizatından biyobütanol üretiminde surfaktant etkisi

Örnekler *C. beijerinkii* DSMZ 6422'den biyobütanol üretimi için bölüm 2.3'e göre hazırlanmıştır. Surfaktant etkisi 96 saat boyunca 37 °C'de gözlemlenmiştir.

3.5.3 Biyobütanol üretiminde enzim konsantrasyonlarının etkisi

Bu çalışmada, biyobütanol üretiminde enzim konsantrasyonlarının etkisini belirlemek için, 7.5, 15, 30 ve 60 FPU/g_{substrat} selüloz enzim konsantrasyonları ve surfaktant olarak 80 mg/g_{selüloz} nişasta ile ön işlenmiş %20'lik PS içeren P2 ortamı kullanılmıştır. Fermentasyon ortamı 96 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir.

3.5.4 Biyobütanol üretiminde ko-kültür stratejisinin etkisi

15 FPU/g_{substrat} selüloz enzimi ve 80 mg/g_{selüloz} nişasta ile ön işlenmiş %20'lik PS, *C. beijerinkii* DSMZ 6422-maya (*S. cerevisiae*, *C. boidinii* ya da *K. marxianus*) kullanılarak, ko-kültür stratejisi ile fermente edilmiştir. Hazırlanmış fermentasyon ortamında inokulum oranı %10 (%95 *C. beijerinkii* DSMZ 6422 + %5 maya)'dur. Bu amaçla fermentasyon ortamına ilk olarak *C. beijerinkii* DSMZ 6422 eklenmiştir. Fermentasyonun 72. saatinde ise maya ortama eklenmiş ve fermentasyon işlemi 168 saate kadar izlenmiştir.

3.6 Analitik Yöntemler

Fermentasyon ortamındaki ABE konsantrasyonu, alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve RESTEK RTX-Was kılcal kolon ile donatılmış gaz kromatografisi (GC 2010 Shimadzu-Japan) ile ölçülmüştür (Rochon E vd. 2018). GC başlangıçta 50 °C'ye ayarlandıktan sonra, kolon sıcaklığı 150 °C'ye yükseltilmiştir. FID ve enjeksiyon portu sırasıyla 160 °C ve 150 °C'ye ayarlanmıştır.

Fermentasyon ortamındaki indirgen şeker konsantrasyonu, spektrofotometrik olarak 540 nm dalga boyunda dinitrosalisilik asit metoduyla (DNS) belirlenmiştir (Miller, 1959).

PS'nin selüloz içeriği standart ISO 5498-1981 protokolüyle dışarıdan hizmet alınarak analiz edilmiştir (Düzen Norwest/Ankara) (Smiechowska ve Dmowski, 2006).

PS'nin protein içeriği spektrofotometrik olarak 660 nm dalga boyunda Lowry Metoduyla belirlenmiştir (Lowry vd. 1951).

PS'nin nem içeriği Nielsen'in aktarımına göre belirlenmiştir (Nielsen, 2017). Örnekteki nem yüzdesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\text{Moisture (\%)} = ((\text{wt of wet sample} + \text{petri dish}) - (\text{wt of dried sample} + \text{petri dish})) / ((\text{wt of wet sample} + \text{petri dish}) - (\text{wt of petri dish})) \times 100$$

Su tutma kapasitesi İbrahim ve arkadaşlarının aktardığına göre belirlenmiştir (İbrahim MIJ vd. 2019). PS'nin su tutma kapasitesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\text{Su Tutma Kapasitesi (\%)} = ((M_{\text{son}} - M_{\text{başlangıç}}) / M_{\text{başlangıç}}) \times 100$$

Biyobütanol verimi, üretkenliği ve şeker tüketim oranı fermentasyon performansını belirlemek için hesaplanmıştır (Valles A vd. 2020, Avcı A vd. 2023):

$$\text{Biyobütanol verimi (g/g)} = \text{Biyobütanol konsantrasyonu (g/L)} / \text{Tüketilen şeker (g/L)}$$

$$\text{Biyobütanol üretkenliği (g/L/h)} = \text{biyobütanol konsantrasyonu (g/L)} / \text{Fermentasyon zamanı (h)}$$

$$\text{Şeker tüketim Oranı (\%)} = [(\text{başlangıç şeker (g/L)} - \text{Artık Şeker (g/L)}) / \text{Başlangıç Şeker (g/L)}] \times 100$$

Biyobütanol verimi, üretkenliği ve şeker tüketim oranı için istatistiksel analiz varyans analiz testi (ANOVA) ve ticari SPSS yazılımı versiyon 25 kullanılarak belirlenmiştir. Anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ 'dir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Ps'nin Özellikleri

Mikrobiyal aktivite, biyoyakıtın üretiminde kullanılan hammaddenin bileşiminden etkilenebilir. Tablo 4.1 bu çalışmada biyobütanol üretmek için kullanılan PS'nin fiziksel ve yapısal karakteristiğini betimlemektedir. PS, %25.7 selüloz, %3.23 protein %6.96 nem ve %83.97 su tutma kapasitesine sahiptir. Literatürde, Li ve Chen (2014), PS'nin selüloz ve hemiselüloz içeriğini sırasıyla %34.31 ve %11.03 olarak belirlemişlerdir. Zhu ve arkadaşları (2022) ise %50.6±0,1 selüloz ve %15.1±hemiselüloz olarak belirlemişlerdir (Zhu vd. 2022, Li ve Chen, 2014). Buna ek olarak PS'nin protein içeriği diğer lignoselülozik atıklarla benzerlik göstermektedir. Bunlar biyoyakıt üretiminde kullanılan buğday samanı (%3.1), mısır samanı (%5.1) ve küspe (%3)'dir (Mohanty ve Abdullahi, 2016, Sarkar vd. 2012). Ayrıca PS, zengin hidrofilik organik madde içeriği (selüloz, hemiselüloz gibi) sayesinde yüksek su tutma kapasitesine sahiptir (Zhu vd. 2022, Chami Khazraji ve Robert, 2013). Bu özellik, hammaddenin ön işleminde yüksek hammadde konsantrasyonlarının eklenmesi ile homojenizasyonda önemli bir parametredir. Özetle, PS'nin bu özellikleri onu, biyobütanol üretiminde kullanılabilir bir hammadde kılar.

Çizelge 4.1 PS'nin fiziksel ve yapısal özellikleri

Özellikler	İçerik
Selüloz (%)	25.7
Nem (%)	6.96
Su tutma kapasitesi (%)	83.97
Protein (%)	3.23

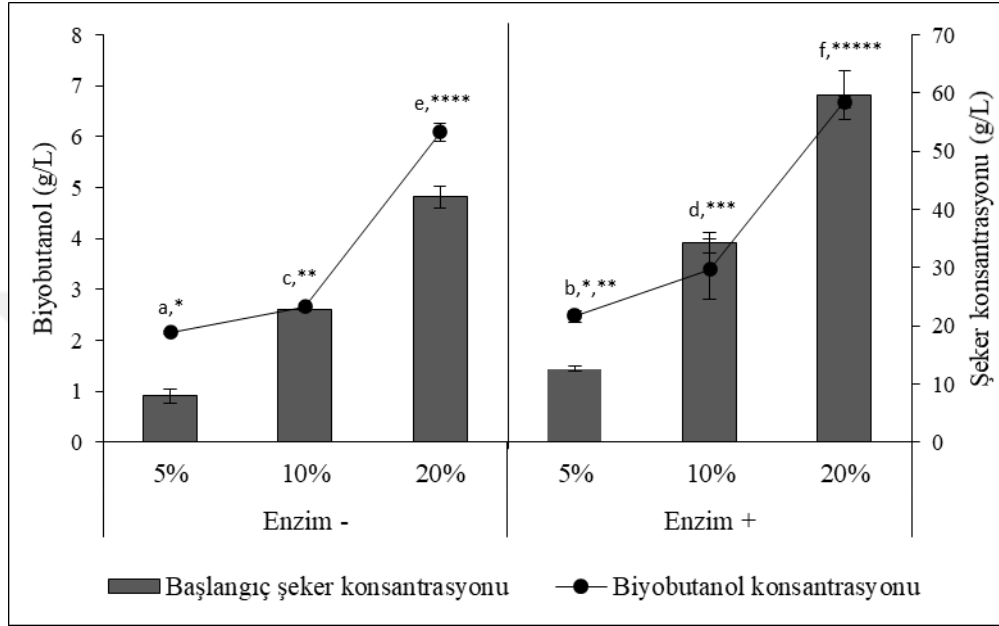
4.2 Biyobütanol Üretiminde Başlangıç PS Konsantrasyonlarının Etkisi

Biyobütanol üretiminde biyokütle konsantrasyonu, optimum şeker konsantrasyonu elde etmek ya da inhibitör üretiminde önemli bir parametredir. Asitlerin sentezlendiği asidojenez fazında yüksek şeker kullanımı nedeniyle, mikrobiyal hücreler düşük biyokütle kaynaklı düşük şeker konsantrasyonu nedeniyle geriye kalan şekerden aseton, bütanol ve etanol üretmez (genellikle 40 g/L) (İbrahim vd. 2015). Ayrıca, yüksek biyokütle konsantrasyonu, zayıf asitlerin üretimi ya da fenolik bileşikler nedeniyle ABE fermentasyonunun inhibasyonuna neden olabilir (Pratto vd. 2020). Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Biyobütanol üretiminde PS'nin %5, %10 ve %20 enzimle ya da enzim olmadan ön işlenmiş konsantrasyonları Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Bütün biyokütle konsantrasyonlarında enzimatik hidroliz, sadece asit ön işlemine göre başlangıç şeker konsantrasyonlarında kayda değer bir artışa neden olmuştur. En yüksek başlangıç şeker konsantrasyonu, %20 PS+Enzim varlığında 59.56 ± 4.18 g/L olarak gözlenmiştir. Buna ek olarak indirgen şeker miktarı, biyokütle konsantrasyonu %5'den %20'ye çıkarıldığında, 12.65 ± 0.52 g/L'den 59.56 ± 4.18 g/L'ye yükselmiştir.

Biyobütanol üretiminde de benzer bir artış gözlenmiştir. Biyobütanol konsantrasyonunda da biyokütle konsantrasyonunun artması ile birlikte artış gözlenmiştir. En yüksek biyobütanol konsantrasyonu, %20 PS+E varlığında 6.68 ± 0.106 g/L olarak gözlenmiştir. Bununla birlikte, %5 ES-E, %5 ES+E, %10 ES-E, %10 ES+E ve %20 ES-E'nin biyobütanol konsantrasyonları sırasıyla 2.16 ± 0.021 g/L, 2.48 ± 0.113 g/L, 2.66 ± 0.070 g/L, 3.40 ± 0.599 g/L ve 6.22 ± 0.176 g/L olarak gözlenmiştir. Şekil 4.1'de görüldüğü üzere, *C. beijerinckii* 6422 %20 PS-E ve %20 PS+E varlığında ABE fermentasyon performansında gözle görülür bir artış sağlanmıştır. Ve bu göstermektedir ki PS'den biyobütanol üretimi için optimum başlangıç şeker konsantrasyonu 40 g/L'nin üzerinden olmalıdır.

Bu tez çalışmasında en doğru biyokütle konsantrasyonu %20 PS olarak saptanmıştır. Literatürdeki çalışmalarda, katı kütle konsantrasyonu oranı çoğunlukla %15'e kadar olması gerekmektedir ve şeker kullanım verimliliği ve bütanol konsantrasyonu genellikle %10 üzerindeki biyokütle konsantrasyonlarında artış sağlamaktadır (Plaza vd. 2017, Kumar vd. 2017, Valles vd. 2021, Dong vd. 2016). Biyobütanol üretiminde yüksek

biyokütle konsantrasyonları ön işlemdeki karıştırma ve homojenizasyonun zorluğundan dolayı tercih edilmez (Modenbach ve Noke, 2013). Ancak bu çalışmada %20 PS konsantrasyonu, düşük su tutma kapasitesi nedeniyle şeker dönüşümü ve biyobütanol üretiminde etkili olmuştur.



Şekil 4.1 Farklı PS konsantrasyonlarında seyreltik asit ön işlemi ve enzim hidrolizinden sonra elde edilen indirgen şeker ve en yüksek biyobütanol konsantrasyonları

4.3 Biyobütanol Üretimi Ve PS'nin Enzimatik Hidrolizinde Sürfaktantların Etkisi

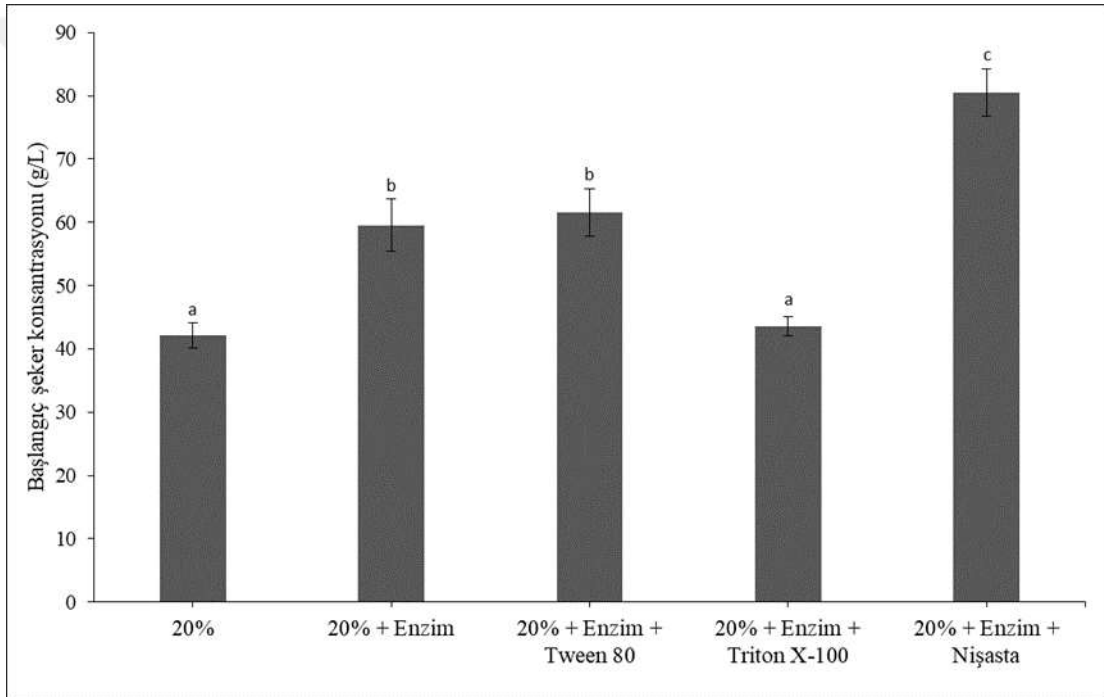
Biyobütanol üretimi için lignoselülozik materyalin enzimatik hidrolizi işleminde, enzimler lignine ya da benzer yapılara verimsiz bir şekilde bağlanabilir. Bu durum biyokütleden düşük şeker dönüşüm oranına neden olur ve şeker verimi düşer. İyonik olmayan surfaktantlar, selüloz enziminin lignine verimsiz ve spesifik olmayan bağlar kurmasının önüne geçebilir. Böylece, enzimin aktivitesi ve performansı artmış olur. Bu sayede enzim konsantrasyonlarında ve dolayısıyla işleme maliyetlerinde azalmaya ve geri dönüşüm veriminde bir artışa neden olur (Morone ve Pandey, 2014). Ericksson ve arkadaşları (2002), buharla ön işlenmiş ladinin hidrolizinde farklı iyonik olmayan surfaktantların kullanılmasının etkisini değerlendirmiştir.

Çalışmalarının sonuçlarına göre surfaktantların kullanılması lignoselülozun dönüşümünde artışa neden olmuştur (Eriksson vd. 2002). Başka bir çalışmada ise Triton X-100, Tween 80 ve PEG 8000 gibi iyonik olmayan surfaktantların eklenmesi kağıt fabrikası çamurunun dönüşümünde artışa neden olmuştur. Maksimum dönüşüm oranı %5 PEG 8000 ve %1 Triton X-100 eklenmesiyle sırasıyla %55.4 ve %56.3 olarak gözlenmiştir (Zhu vd. 2019). Huang ve arkadaşları (2022) ise seyreltik asitle ön işleme tabi tutulmuş bambunun enzimatik hidrolizinde Tween 80 ve PEG 4000 kullanarak biyokütle dönüşümünü sırasıyla %29.4'den %61.6 ve %64.6'ya yükseltmişleridir (Huang C vd. 2022). Bahsedilen çalışmalar ile benzer bir şekilde bu tez çalışmasında ise surfaktant olarak Tween 80 (%0.5), Triton X-100 (%0.5) ve nişasta (80 mg/g_{selülaz}) kullanımıyla PS'den elde edilen indirgen şeker oranında artış gözlenmiştir.

Surfaktantların varlığında PS'nin enzimatik hidrolizinden elde edilen sonuçlar Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Tween 80 ve nişasta, PS'nin hidrolizinde gözle görülür bir şekilde artışa neden olmuştur Triton X-100 ise inhibasyona neden olmuştur. Şeker konsantrasyonu, surfaktant olmadan ön işlenmiş %20+E (59.56±4.18 g/L)'ye göre Tween 80 ve nişasta kullanıldığında sırasıyla %3.25 (61.56±3.59 g/L) ve %35.25 (80.56±3.75 g/L) artış gözlenmiştir. Ayrıca, Triton X-100'ün kullanımı ise enzim aktivitesini 43.58±1.50 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu sonucuyla neredeyse tamamen inhibe etmiştir. Bu inhibitör etkisi hammaddenin partikül boyutuyla ya da Triton X-100'ün yüksek konsantrasyonda kullanımıyla alakalı olması muhtemeldir (Menegol vd. 2014, Zhou vd 2015). Dahası, Triton X-100'ün kullanımı içerdiği aromatik halkaların toksik etkisi nedeniyle çevresel olarak kullanıma elverişli değildir (Eriksson vd. 2002).

Şekil 4.2'de görüldüğü üzere, en yüksek şeker konsantrasyonu nişastanın varlığında elde edilmiştir. Nişasta şu anda literatürde biyolojik olarak parçalanabilen surfaktant olarak belirlenmiştir. Doğal kaynaklardan elde edilen polimerik surfaktantların kullanımına ilişkin yayınların sayısı özellikle de sulardan kirleticilerin uzaklaştırılması ve doğal hayata verilen zararın önlenmesiyle yapılan çalışmalar her geçen gün artış göstermektedir (Mondal ve Mohsinhosain, 2014). Mondal ve arkadaşları (2016), patates nişastasının iyonik ve iyonik olmayan surfaktantlarla etkileşim mekanizmasını inceleyerek biyolojik olarak parçalanabilen yarı-doğal surfaktantların üretimini hedeflemektedirler. Bu çalışma

sonucunda, SDS ve CTAB ile birlikte oluşturulmuş olan nişasta kompleksi, çok iyi bir surfaktant performansı ve emülsifikasyon verimliliği göstermiştir (İbrahim Mondal vd. 2016). Bu yaklaşım, mevcut çalışmadaki nişastanın surfaktant olarak kullanımını ve nişastanın etkinliğini desteklemektedir. Ayrıca, depolimerize olmuş lignin fragmentleri (pseudo-lignin) ya da asit ön işlemi sonucu oluşan ham lignin yapıları, nişasta ile bağlanarak enzimin lignine olan afinitesini azaltmış olabilir (Ghaffar ve Fan 2014, He vd. 2020). Ligninin görece yüksek hidrofilik özellikleri (ya da onun yapısını oluşturan fenolik hidroksi, alkol hidroksi, karbonil, methoksil ve karboksil gibi grupları) ve nişasta muhtemelen bu etkileşimi desteklemiş olabilir (Yong vd. 2019, Wang vd. 2020).



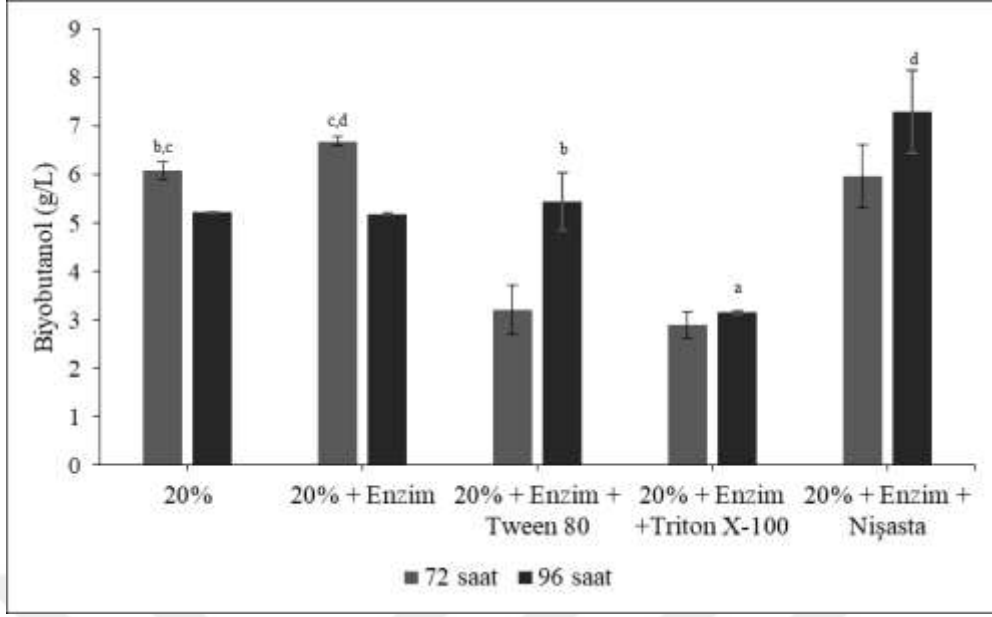
Şekil 4.2 PS'nin ön işleminde ve sonuçta ortaya çıkan indirgen şeker konsantrasyonlarında farklı yüzey aktif madde etkileri (Ön işlem; 20% PS, 1% H₂SO₄, 121°C, 15 dk, Hidroliz; 15 FPU/g_{substrate} selüloz enzimi, pH 4.8, 72 h, 50° C, surfactant; 0.5% Triton X-100, 0.5% Tween 80, 80 mg/g_{cellulose} nişasta)

Şekil 4.3 nişasta varlığında ön işlenmiş PS+E'den elde edilen biyobütanol konsantrasyonlarını göstermektedir. Bu sonuçlara göre, Tween 80 ve Triton X-100, surfaktant içermeyen PS-E ve PS+E'ye göre biyobütanol üretimini ve fermentasyon işlemini negatif bir şekilde etkilemiştir. Tween 80 ve Triton X-100 için en yüksek biyobütanol konsantrasyonları 96 saat fermentasyon sonunda sırasıyla 5.45±0.594 g/L ve

3.15±0.042 g/L olarak gözlenmiştir. Triton X-100 mikroorganizmanın tipine göre farklı bir inhibasyon etkisi göstermiş olması muhtemeldir.

Ancak, literatürde anaerobik mikroorganizmaların toleransının aerobik mikroorganizmalara göre daha düşük olduğu belirtilmektedir (Abu-Ghunmi vd. 2014). Literatürde, Lee ve ark. (1996), Triton X-100'ün etanol fermentasyonunu negatif bir şekilde etkilediğini bulmuşlardır (Lee vd. 1996). Buna ek olarak Tween 80'in yüksek konsantrasyonlarda kullanımı anaerobik mikroorganizmaların asidojeniz fazında çeşitli ürünlerin üretiminde inhibitör etkisine sahiptir (Yue vd. 2008). Bu nedenle, mevcut çalışmada kullanılan %0.5'lik Tween 80 konsantrasyonu, *C. beijerinckii*'nin anaerobik fermentasyonunu negatif bir şekilde etkilemiş olması muhtemeldir. Mevcut çalışmada en yüksek biyobütanol konsantrasyonu, nişasta içeren ortamda 7.30±0.854 g/L olarak gözlenmiştir. Literatürde daha önce biyobütanol üretiminde nişastanın surfaktant olarak kullanılmasına rastlanmamıştır. Bu çalışma ilk kez bütanol üretiminde nişastanın etkili bir surfaktant olarak kullanılabileceği yaklaşımını önermektedir.

Nişastanın enzimatik hidroliz sırasında indirgenip indirgenmediğini kanıtlamak amacıyla kontrol grubu olarak hidroliz aşamasında sadece nişasta çözeltisinin kullanıldığı ayrı bir deney yapılmıştır. İnkübasyon sonunda, sadece 0.45 g/L şeker salındığı gözlenmiştir. Bu değer, nişasta içeren PS+E'den elde edilen yaklaşık 80 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu karşında göz ardı edilebilecek bir değerdir.

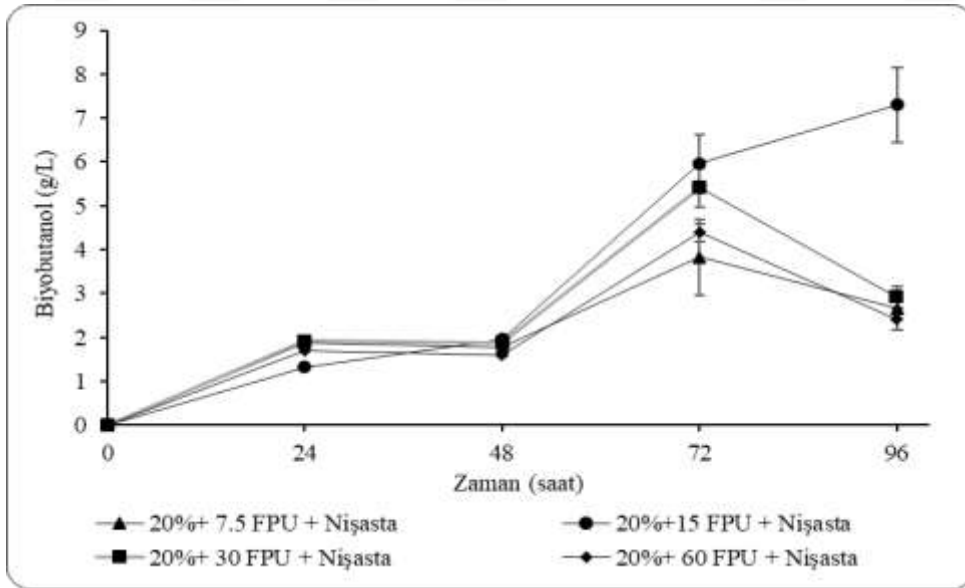


Şekil 4.3 Farklı yüzey aktif maddelerin varlığında elde edilen %20 PS şekeri içeren fermentasyon ortamındaki biyobütanol konsantrasyonları (10% *C. beijerinckii* DSMZ 6422, pH 6.8, 37°C, P2 Medium solutions + 20% ES hydrolyzate)

4.4 PS'nin Hidrolizinde Enzim Konsantrasyonlarının Etkisi ve Surfaktant Olarak Nişasta Varlığında Biyobütanol Üretimi

Hidroliz işlemi, enzim konsantrasyonu, cinsi, substratla olan etkileşim süresi gibi enzim parametrelerinden etkilenmektedir. Enzimin maliyeti, lignoselülozik materyalin ön işlenmesinde işleme olan maliyet yükü nedeniyle başka bir zorluk getirmektedir. Bu çalışmada, hidroliz ve biyobütanol üretiminde 80 mg/g_{selülaz} varlığında 7.5-60 FPU/g_{substrat} konsantrasyonları değerlendirilmiştir. Şekil 4.4'de görüldüğü üzere, %20'lik ön işlenmiş PS'de, enzim konsantrasyonu 7.5 FPU/g_{substrat}'dan 15 FPU/g_{substrat}'a yükseltildiğinde, şeker konsantrasyonu 52.52±1.96 g/L'den 80.56±3.75 g/L'ye keskin bir şekilde yükseldiği gözlenmiştir. Ancak, yüksek enzim konsantrasyonunda şeker geri kazanımında azalma görülmüştür ve 60 FPU/g_{substrat} selülaz enzimi 90.26±3.13 g/L şeker üretimine neden olmuştur. Çünkü sellobiyoz ve glukoz gibi yüksek ürün konsantrasyonları, selüloz bağlanma bölgesini engellemiştir ve bu da sonuç olarak selülazların inhibasyonuna neden olmuştur (Hsieh vd. 2014). Ayrıca nişasta, enzim konsantrasyonunu yarı yarıya azaltmakla birlikte aynı oranda şeker dönüşümüne neden olmuştur. Şekil 4.4'de görüldüğü üzere, 15 FPU/g_{substrat} selülaz enzimiyle %20'lik PS ön işlendiğinde

şeker konsantrasyonu 59.56 ± 4.18 g/L iken nişasta varlığında $7.5 \text{ FPU/g}_{\text{substrat}}$ selüloz enzimi ile 52.52 ± 1.96 g/L şeker dönüşümü gözlenmiştir. Dahası, düşük enzim konsantrasyonu ve yüksek hammadde konsantrasyonunda enzimatik hidrolizde önemli bir şeker verimi elde edilmiştir (Morone ve Pandey, 2014). Bu eğilim, %20 PS ile yüksek hammadde konsantrasyonu ve $15 \text{ FPU/g}_{\text{substrat}}$ ile düşük enzim konsantrasyonu olarak bu tez çalışmasında da gösterilmiştir. En yüksek biyobütanol konsantrasyonu nişasta ve $15 \text{ FPU/g}_{\text{substrat}}$ selüloz varlığında %20 PS'den 96. saatte 7.30 ± 0.854 g/L olarak gözlenmiştir. Ancak, biyobütanol konsantrasyonu, 30 ve $60 \text{ FPU/g}_{\text{substrat}}$ selüloz enziminde sırasıyla 5.42 ± 0.450 g/L ve 4.39 ± 0.205 g/L'ye düşmüştür. Bu düşüş, yüksek enzim konsantrasyonunda bakteriyel gelişimi inhibe etmiş olması muhtemeldir (Valles vd. 2020). Valles ve ark. (2020) optimum enzim konsantrasyonu $13.5 \text{ FPU g-dw}^{-1}$ olarak belirlemişlerdir ve bu enzim konsantrasyonunda 5.43 g/L biyobütanol üretimi gözlemlenmiştir. Buna ek olarak yazarlar, 16 FPU g-dw^{-1} 'den yüksek olan enzim konsantrasyonlarının biyobütanol üretiminde ani düşüslere neden olduğunu belirtmektedirler (Valles vd. 2020). Buna göre, bu tez çalışmasındaki sonuçlar literatür ile bağdaşmaktadır.



Şekil 4.4 80 mg/gselüloz nişasta varlığında %20 PS ön işleminde farklı enzim konsantrasyonlarının etkisi ve biyobütanol konsantrasyonları (Ön işlem; 20% PS, 1% H_2SO_4 , 121°C , 15 dk, Hidroliz; $15 \text{ FPU/g}_{\text{substrate}}$ selüloz enzimi, pH 4.8, 72 saat, 50°C , 80 mg/g $_{\text{cellulose}}$ nişasta; Fermentasyon; 10% *C. beijerinckii* DSMZ 6422, pH 6.8, 37°C , 96 saat, P2 Besiyeri solüsyonları + 20% PS hidrolizatı)

4.5 Biyobütanol Üretiminde Ko-Kültür Stratejisinin Etkisi

Clostridium tarafından gerçekleştirilen ABE fermentasyonunun büyük ölçekli üretiminde anaerobik koşulların sağlanmasında maliyet ve enerji, hammaddelerin etkin kullanımı ve bütanol toksisitesi gibi bazı engelleri vardır. *Clostridium* ko-kültürleri bu zorlukların üstesinden gelmek için kullanılan yeni stratejilerdir. Clostridiumun oksijen toleransının geliştirilmesi, substrat kullanım çeşitliliğini genişletilmesi, ürün oluşumunu artırması ve ürün kapsamının gelişmesi *Clostridium* ko-kültür stratejisi ile gerçekleştirilebilir (Cui vd. 2021).

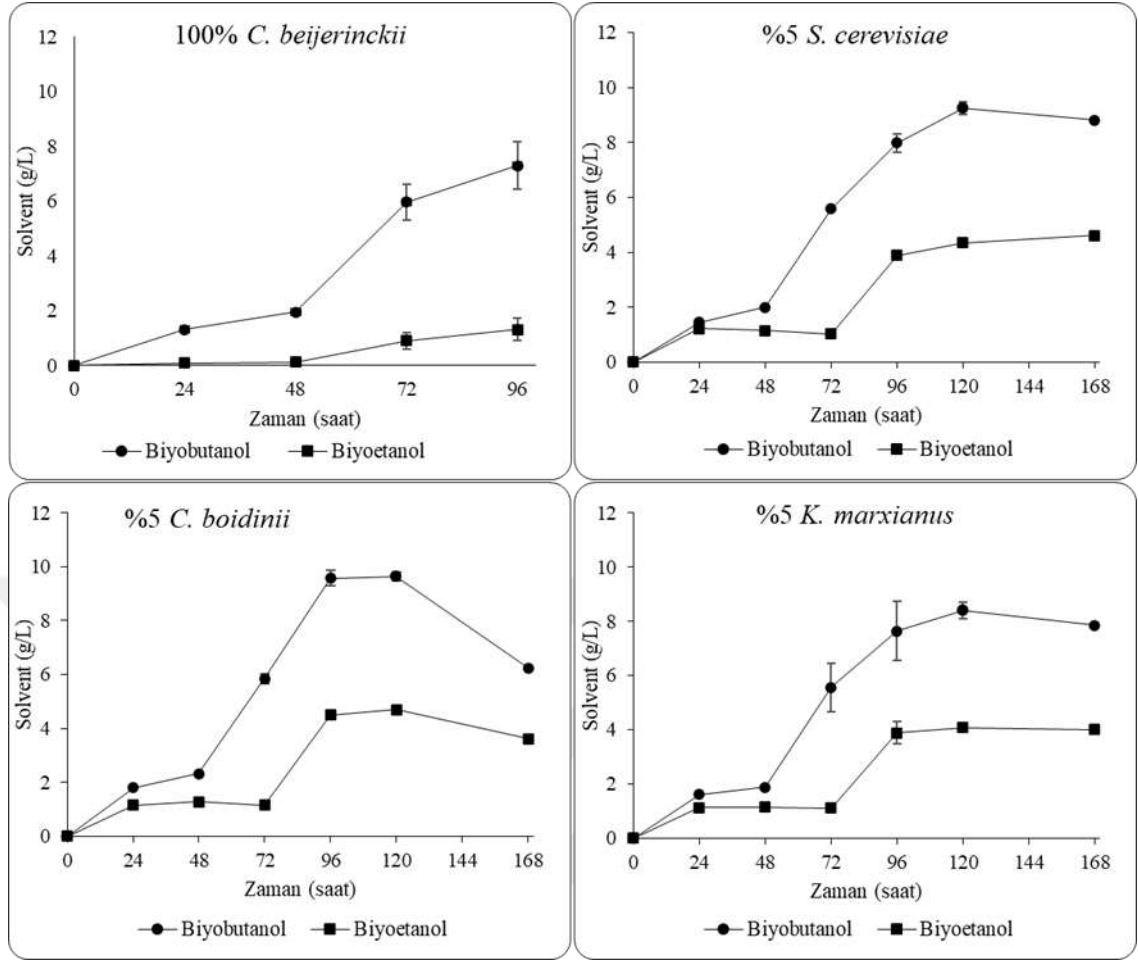
Bu nedenle, bu tez çalışmasında, biyobütanol konsantrasyonun artırılması için *S. cerevisiae*, *C. boidinii* ve *K. marxianus*, ayrı ayrı kullanılarak bakteri-maya ko-kültür stratejisi incelenmiştir. Şekil 4.5’de mayaların varlığında fermentasyon ortamındaki biyobütanol konsantrasyonlarının değişimi gösterilmiştir. Biyobütanol konsantrasyonu 120. Saatin sonunda *S. cerevisiae*, *C. boidinii* ve *K. marxianus* ko-kültür sistemlerinde sırasıyla 9.24 ± 0.242 g/L, 9.63 ± 0.176 g/L ve 8.39 ± 0.305 g/L olarak gözlenmiştir.

Bu değerler sadece *C. beijerinckii* DSMZ 6422 bakterisini ihtiva eden kontrol grubuna (7.30 ± 0.854 g/L biyobütanol) göre sırasıyla %26.57, %31.92 ve %14.93 artış göstermiştir.

Bu artış mayanın bakteriye aminoasit sağlaması kaynaklı, *Clostridiumun* glukoz kullanma yeteneğinin artması ve bakteride NADH rejenerasyonunun yukarı yönlü regülasyonu sayesinde olmuş olabilir (Cui vd. 2021). Bu çalışmayla bağdaşacak şekilde, Luo ve ark. (2015), *C. acetobutylcum/S. cerevisiae* ko-kültür stratejisiyle birlikte ABE fermentasyonu için dışarıdan bütirat eklenmesini önermişlerdir. Çalışmalarının sonuçlarına göre biyobütanol konsantrasyonu kontrol ortamına göre %35’lik bir artışla 15.74 g/L’ye ulaşmıştır (Luo vd. 2015). Başka bir çalışmada ise *C. acetobutylcum/S. cerevisiae* ko-kültür stratejisi ile birlikte pirinç samanından fermentasyon işleminde ksiloz kullanımının artışı araştırılmıştır ve ksiloz alımı pH regülasyonu kullanılarak %94 artış göstermiştir (Capilla vd. (2022). Wen ve ark. (2014), alkali ekstrakte edilmiş soyulmuş mısır koçanları kullanarak, *C. cellulovorans* 743B ve *C. beijerinckii* NCIMB

8052 ko-kültür sistemi ile birlikte 8.30 g/L biyobütanol gözlemlemiştir (Wen vd. 2014).

Bu tez çalışmasında maya inokülasyonu 72. saatte gerçekleştirilmiştir. ABE fermentasyonunun asidojenez fazında üretilen asetat ve bütiratın yüksek konsantrasyonda olması mayalar için uygun olmayabilir (Qi vd. 2018). Buna ek olarak, mayayı fermentasyon işleminin erken aşamalarında eklemek bütanol üretimini negatif olarak etkileyerek şeker kullanma rekabetine neden olması sebebiyle etanol konsantrasyonunda artışa neden olabilir (Capilla vd. 2022). Bu nedenle bu tez çalışmasında ilk olarak ABE fermentasyonda solventojenesiz fazına izin vermek kaydıyla biyobütanol üretimi artış göstermiştir. Daha sonra ise, maya gelişimi ve bütanol üretimini desteklemek için işlemin tepe noktasında maya eklenmiştir. Böylece, bu çalışmada, ko-kültür yaklaşımı kullanılarak biyobütanol konsantrasyonu artış göstermiştir. Buna ek olarak, maya kültürleri eklendiğinde bütün besi ortamlarında etanol konsantrasyonlarında keskin bir artış gözlenmiştir. Buna göre, *S. cerevisiae*, *C. boidinii* ya da *K. marxianus* varlığında etanol konsantrasyonları 120. saatte sırasıyla 4.35 ± 0.020 g/L, 4.70 ± 0.100 g/L ve 4.08 ± 0.070 g/L olarak gözlenmiştir. Üstelik, bakteri-maya ko-kültür stratejisinde *C. boidinii* kullanıldığında biyobütanol konsantrasyonu %31.92 olarak kayda değer bir şekilde artış göstermiştir.



Şekil 4.5 Bakteri-maya ko-kültür stratejisi sonrasında elde edilen biyobütanol ve biyoetanol konsantrasyonlarının zaman süreci (*S. cerevisiae*, *C. boidinii*, *K. marxianus*) (10% inoculum (95% *C. beijerinckii* DSMZ 6422+ 5% maya 72. saatte), pH 6.8, 37°C, 168 h, P2 Medium solutions + 20% PS hidrolizatı)

Tablo 4.2’de gösterildiği üzere, sürfaktant kullanımı ve ko-kültür yaklaşımının fermentasyon işlemini desteklediğini belirtmek için biyobütanol verimi, biyobütanol üretkenliği ve şeker tüketim oranı gibi kinetik parametreler hesaplanmıştır. En yüksek verim, üretkenlik ve şeker tüketim oranı, *C. beijerinckii*-*C. boidinii* ko-kültür sistemi ve nişasta surfaktanı kullanılarak sırasıyla 0.0142 ± 0.02 g/g, 0.080 ± 0.003 g/L/h ve $\%84.20 \pm 0.236$ olarak gözlenmiştir. Buna ek olarak, biyobütanol verimi ve üretkenliğinde bütün fermentasyon ortamlarında kayda değer bir artış gözlenmemiştir ancak şeker tüketim oranlarında kayda değer bir artış gözlenmiştir.

Çizelge 4.2 Ko-kültür stratejisi ile 120. Saatte kinetik parametreler (20% PS + 15 FPU/g_{substrate} selüloz enzimi + 80 mg/g_{cellulose} nişasta, 5% maya, P2 Medium solüsyonları, pH 6.8, 37°C)

Parametreler	PS içeren P2 ortamı			
	<i>*C. beijerinckii</i>	<i>C. beijerinckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>	<i>C. beijerinckii</i> + <i>C. boidinii</i>	<i>C. beijerinckii</i> + <i>K. marxianus</i>
Biyobutanol (g/L)	7.30 ±0.854 ^a	9.24 ±0.242 ^b	9.63 ±0.176 ^b	8.39 ±0.305 ^{a,b}
Total ABE (g/L)	9.98 ±0.650 ^a	14.90 ±0.098 ^{b,c}	15.66 ±0.247 ^c	13.79 ±0.424 ^b
Biyobutanol verimi (g/g)	0.132 ±0.04 ^a	0.139 ±0.04 ^a	0.142 ±0.02 ^a	0.132 ±0.03 ^a
Biyobutanol üretkenliği (g/L/h)	0.076 ±0.03 ^a	0.077 ±0.02 ^a	0.080 ±0.003 ^a	0.070 ±0.03 ^a
Şeker tüketim oranı (%)	68.64 ±1.641 ^a	82.55 ±0.192 ^{b,c}	84.20 ±0.236 ^c	78.66 ±1.392 ^b

*Aynı satırdaki üst simgelerdeki farklı harfler parametrelerdeki ana değişiklikleri gösterir. İstatistiksel anlamlılık (p≤0.05) *96. saat sonunda elde edilen değerler

5. SONUÇ

Bu tez çalışması, patlıcan sapı (PS) hammaddesinin yüksek şeker içeriği, yüksek su tutma kapasitesi ve besin içeriği sayesinde biyobütanol üretiminde maliyet odaklı kullanımının mümkün olduğunu göstermektedir. Bunun yanında bu çalışmada surfaktant kullanımının çevre odaklı kullanımı, enzimatik hidroliz için maliyetli bir girdi olan enzim maliyetlerini düşürme gibi artıları gösterilmiştir. Ayrıca yine bu çalışmada kullanılan ko-kültür sisteminin mikrobiyal aktiviteyi artırdığı ve biyobütanol üretimi üzerindeki olumlu etkileri de gösterilmiştir. Dahası bu tez çalışması ilk kez biyolojik olarak parçalanabilen bir surfaktant olarak nişastanın kullanımının mümkün olduğunu ve biyobütanol üretiminde hammadde olarak patlıcan sapı (PS) kullanımının maliyet odaklı ve umut vadeden olduğu göstermiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar verimli solvent üretimi elde etmek için biyolojik kaynakların kullanımının uygulanabilir olduğunu ve uygun maliyetli bir yaklaşımı temsil ettiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Abu-Ghunmi L, Badawi M, Fayyad M (2014) Fate of Triton X-100 applications on water and soil environments: a review. *J Surfactants Deterg* 17:833–838
- Adıgüzel, A. O. (2013). Biyoetanölün genel özellikleri ve üretimi için gerekli hammadde kaynakları. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(2), 204-220.
- Aditiya HB, Mahlia TMI, Chong WT et al (2016) Second generation bioethanol production: a critical review. *Renew Sustain Energy Rev* 66:631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- Avcı A, Kamiloğlu A, Dönmez S (2023) Efficient production of acetone butanol ethanol from sole fresh and rotten potatoes by various *Clostridium* strains. *Biomass Convers Biorefinery* 13:4161–4169. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01584-w>
- Azuma K, Ohyama A, Ippoushi K et al (2008) Structures and antioxidant activity of anthocyanins in many accessions of eggplant and its related species. *J Agric Food Chem* 56:10154–10159. <https://doi.org/10.1021/jf801322m>
- Bhattacharyya A, Akanksha J, Rajagopalan G (2023) Biobutanol production from food crops. In: Segovia-Hernandez JG, Behera S, Sanchez-Ramirez E (eds) *Advances and developments in biobutanol production*. Woodhead Publishing, pp 245–260
- Cantürk A, Cemek B, Taşan M, Taşan S (2023) Effect of deficit irrigation on yield, water productivity, energy indices and economic productivity in eggplant cultivation. *Gesunde Pflanz* 75:1579–1589. <https://doi.org/10.1007/s10343-022-00814-z>
- Capilla M, Valles A, San-Valero P et al (2022) Solvent production from rice straw by a co-culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Saccharomyces cerevisiae*: effect of pH control. *Biomass Convers Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02750-4>
- Chami Khazraji A, Robert S (2013) Interaction effects between cellulose and water in nanocrystalline and amorphous regions: a novel approach using molecular modeling. *J Nanomater* 2013:. <https://doi.org/10.1155/2013/409676>
- Chang, K. L., Chen, X. M., Wang, X. Q., Han, Y. J., Potprommanee, L., Liu, J. Y., ... & Huang, Q. (2017). Impact of surfactant type for ionic liquid pretreatment on enhancing delignification of rice straw. *Bioresource Technology*, 227, 388-392.
- Cheah WY, Sankaran R, Show PL et al (2020) Pretreatment methods for lignocellulosic biofuels production: current advances, challenges and future prospects. *Biofuel Res J* 7:1115–1127. <https://doi.org/10.18331/BRJ2020.7.1.4>
- Chen X, Shekiri J, Franden MA et al (2012) The impacts of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process. *Biotechnol Biofuels* 5:. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-8>

- Cui Y, Yang KL, Zhou K (2021) Using co-culture to functionalize *Clostridium* fermentation. Trends Biotechnol 39:914–926. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.11.016>
- Custom Market Insights (2022) Global bio-butanol market 2023 – 2032. Custom Market Insights, 8.5% 25 from 2022 to 2030. <https://www.custommarketinsights.com/report/bio-butanol-market/#:~:text=According>. Erişim tarihi: 9 Haziran 2024.
- da Nogueira C, C, de Araújo Padilha CE, de Souza Filho PF, dos Santos ES, (2022) Effects of the addition of poly(ethylene glycol) and non-ionic surfactants on pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanol fermentation. Bioenergy Res 15:889–904. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10388-9>
- Das M, Maiti SK (2022) Current knowledge on cyanobacterial biobutanol production: advances, challenges, and prospects. Springer, Netherlands
- Demiray E, Açikel E, Ertuğrul Karatay S, Dönmez G (2022) *Saccharomyces cerevisiae* and newly isolated *Candida boidinii* co-fermentation of industrial tea waste for improved bioethanol production. Energy Sources, Part A Recover Util Environ Ef 44:1160–1172. <https://doi.org/10.1080/15567036.2022.2053763>
- Dhamole, P. B., Wang, Z., Liu, Y., Wang, B., & Feng, H. (2012). Extractive fermentation with non-ionic surfactants to enhance butanol production. *Biomass and Bioenergy*, 40, 112-119.
- Diaz-Baca JA, Fatehi P (2024) Production and characterization of starch-lignin based materials: a review. Biotechnol Adv 70:108281. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108281>
- Dong JJ, Ding JC, Zhang Y et al (2016) Simultaneous saccharification and fermentation of dilute alkaline-pretreated corn stover for enhanced butanol production by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864. FEMS Microbiol Lett 363:1–6. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw003>
- Dürre, P. (2007). Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2(12), 1525-1534.
- Ellis, J. T., Hengge, N. N., Sims, R. C., & Miller, C. D. (2012). Acetone, butanol, and ethanol production from wastewater algae. *Bioresource technology*, 111, 491-495.
- Eriksson T, Börjesson J, Tjerneld F (2002) Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Enzyme Microb Technol 31:353–364. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00134-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00134-5)
- Ezeji, T. C., Karcher, P. M., Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2005). Improving performance of a gas stripping-based recovery system to remove butanol from *Clostridium beijerinckii* fermentation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 27, 207-214.

- Ezeji, T. C., Qureshi, N., & 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.
- Feng, J., Wang, Q., Guo, X., Hu, J., Wang, G., Lu, L., ... & Yang, S. T. (2025). Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for high-yield n-butanol production by increasing intracellular reducing equivalent with NADPH-dependent 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase. *ACS Synthetic Biology*.
- Ganeshan, S., & Tülbek, M. Ç. (2025). Fermentative Butanol Production—Perspectives and Scale-Up Challenges. *Encyclopedia*, 5(2), 50.
- Germec M, Turhan I (2018) Ethanol production from acid-pretreated and detoxified tea processing waste and its modeling. *Fuel* 231:101–109. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.05.070>
- Ghafar SH, Fan M (2014) Lignin in straw and its applications as an adhesive. *Int J Adhes Adhes* 48:92–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2013.09.001>
- Guntekin, E., & Karakus, B. (2008). Feasibility of using eggplant (*Solanum melongena*) stalks in the production of experimental particleboard. *Industrial Crops and Products*, 27(3), 354-358.
- He J, Huang C, Lai C et al (2020) The effect of lignin degradation products on the generation of pseudo-lignin during dilute acid pretreatment. *Ind Crops Prod* 146:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112205>
- Hou S, Shen B, Zhang D et al (2022) Understanding of promoting enzymatic hydrolysis of combined hydrothermal and deep eutectic solvent pretreated poplars by Tween 80. *Bioresour Technol* 362:127825. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127825>
- Hsieh CWC, Cannella D, Jørgensen H et al (2014) Cellulase inhibition by high concentrations of monosaccharides. *J Agric Food Chem* 62:3800–3805. <https://doi.org/10.1021/jf5012962>
- Huang C, Zhao X, Zheng Y et al (2022) Revealing the mechanism of surfactant-promoted enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated bamboo. *Bioresour Technol* 360:127524. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127524>
- Huzir, N. M., Aziz, M. M. A., Ismail, S. B., Abdullah, B., Mahmood, N. A. N., Umor, N. A., & 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 MF, Abd-Aziz S, Yusof MEM et al (2015) Simultaneous enzymatic saccharification and ABE fermentation using pretreated oil palm empty fruit bunch as substrate to produce butanol and hydrogen as biofuel. *Renew Energy* 77:447–455. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.12.047>

- Ibrahim MIJ, Sapuan SM, Zainudin ES, Zuhri MYM (2019) Extraction, chemical composition, and characterization of potential lignocellulosic biomasses and polymers from corn plant parts. *BioResources* 14:6485–6500. <https://doi.org/10.15376/biores.14.3.6485-6500>
- Ibrahim Mondal MH, Mofakkharul Islam M, Khademul Islam M, Mohsin Hossain M (2016) Eco-friendly biodegradable seminatural surfactants from starch for green chemistry. *IOSR J Appl Chem (IOSR-JAC)* 9:1–9. <https://doi.org/10.9790/5736-0906010109>
- Jang, Y. S., Malaviya, A., Cho, C., Lee, J., & Lee, S. Y. (2012). Butanol production from renewable biomass by clostridia. *Bioresource technology*, 123, 653-663.
- Jiang X, Zhai R, Li H et al (2023) Binary additives for in-situ mitigating the inhibitory effect of lignin-derived phenolics on enzymatic hydrolysis of lignocellulose: enhanced performance and synergistic mechanism. *Energy* 282:128062. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2023.128062>
- Jin, Chao, et al. "Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel." *Renewable and sustainable energy reviews* 15.8 (2011): 4080-4106.
- Jones, D. T., & Woods, D. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological reviews*, 50(4), 484-524.
- Kabadayı HK, Demiray E, Ertuğrul Karatay S, Dönmez G (2024) Enhanced Cu (II) bioremoval by newly isolated *Kluyveromyces marxianus* with sodium dodecyl sulphate. *Bioremediat J* 0:1–7. <https://doi.org/10.1080/10889868.2024.2338210>
- Kazemi, M., Khodaiyan, F., & Hosseini, S. S. (2019). Utilization of food processing wastes of eggplant as a high potential pectin source and characterization of extracted pectin. *Food chemistry*, 294, 339-346.
- Kumar S, Gujjala LKS, Banerjee R (2017) Simultaneous pretreatment and saccharification of bamboo for biobutanol production. *Ind Crops Prod* 101:21–28. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.02.028>
- Kumar, Manish, and Kalyan Gayen. "Developments in biobutanol production: new insights." *Applied Energy* 88.6 (2011): 1999-2012.
- Kurakake, M., Ooshima, H., Kato, J., & Harano, Y. (1994). Pretreatment of bagasse by nonionic surfactant for the enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 49(3), 247-251.
- Lee KM, Kim KY, Choi O et al (2015) In situ detoxification of lignocellulosic hydrolysate using a surfactant for butyric acid production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755. *Process Biochem* 50:630–635. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.01.020>
- Lee WG, Lee JP, Shin CS et al (1996) Effect using of surfactants glucose and on ethanol cellulosic fermentation hydrolyzates. *Biotechnol Lett* 18:299–304

- Lee, J. E., Seo, E. J., Kweon, D. H., Park, K. M., & Jin, Y. S. (2009). Fermentation of rice bran and defatted rice bran for butanol production using *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Journal of microbiology and biotechnology*, 19(5), 482-490.
- Li LX, Chen HT (2014) The research on the physical and chemical properties of eggplant stalk fiber for the complex utilization of stalk. *Adv Mater Res* 881:1161–1164
- Li S, Huang L, Ke C et al (2020) Pathway dissection, regulation, engineering and application: lessons learned from biobutanol production by solventogenic clostridia. *Biotechnol Biofuels* 13:1–25. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01674-3>
- Li, J., Wang, L., & Chen, H. (2016). Periodic peristalsis increasing acetone–butanol–ethanol productivity during simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn straw. *Journal of bioscience and bioengineering*, 122(5), 620-626.
- Li, S. Y., Srivastava, R., & Parnas, R. S. (2011). Study of in situ 1-butanol pervaporation from A-B-E fermentation using a PDMS composite membrane: Validity of solution-diffusion model for pervaporative A-B-E fermentation. *Biotechnology progress*, 27(1), 111-120.
- Linan LZ, Fakhouri FM, Nogueira GF et al (2024) Benefits of incorporating lignin into starch-based films: a brief review. *Polymers (Basel)* 16:. <https://doi.org/10.3390/polym16162285>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Luo H, Ge L, Zhang J et al (2015) Enhancing butanol production under the stress environments of co-culturing *Clostridium acetobutylicum*/*Saccharomyces cerevisiae* integrated with exogenous butyrate addition. *PLoS ONE* 10:1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141160>
- Mankar, A. R., Pandey, A., Modak, A., & Pant, K. K. (2021). Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresource Technology*, 334, 125235.
- Marchal, R., Blanchet, D., & Vandecasteele, J. P. (1985). Industrial optimization of acetone-butanol fermentation: a study of the utilization of Jerusalem artichokes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23, 92-98.
- Massarweh, O., & Abushaikha, A. S. (2020). The use of surfactants in enhanced oil recovery: A review of recent advances. *Energy Reports*, 6, 3150-3178.
- Menegol D, Scholl AL, Fontana RC et al (2014) Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants.

- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mishra, R. R., Samantaray, B., Behera, B. C., Pradhan, B. R., & Mohapatra, S. (2020). Process optimization for conversion of waste banana peels to biobutanol by a yeast co-culture fermentation system. *Renewable Energy*, 162, 478-488.
- Modenbach AA, Nokes SE (2013) Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - a review. *Biomass Bioenerg* 56:526–544. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.05.031>
- Mohanty B, Abdullahi II (2016) Bioethanol production from lignocellulosic waste-a review. *Biosci Biotechnol Res Asia* 13:1153– 1161. <https://doi.org/10.13005/bbra/2146>
- Mohapatra, S., Mishra, R. R., Nayak, B., Behera, B. C., & 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.
- Mondal M, MohsinHosain M (2014) Biodegradable surfactant from natural starch for the reduction of environmental pollution and safety for water living. *Int J Innov Res Adv Eng* 1:424–433
- Morone A, Pandey RA (2014) Lignocellulosic biobutanol production: gridlocks and potential remedies. *Renew Sustain Energy Rev* 37:21–35. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.009>
- Nababan MYS, Fatriasari W, Wistara NJ (2022) Response surface methodology for enzymatic hydrolysis optimization of jabon alkaline pulp with Tween 80 surfactant addition. *Biomass Convers Biorefinery* 12:2165–2174. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00807-w>
- Naeem MY, Ugur S (2019) Nutritional content and health benefits of eggplant. *Turkish J Agric Sci Technol* 7:31–36
- Ndaba, Busiswa, Idan Chiyanzu, and Sanette Marx. "n-Butanol derived from biochemical and chemical routes: A review." *Biotechnology Reports* 8 (2015): 1-9.
- Nielsen SS (2017) *Food analysis laboratory manual: third edition*, third. Springer
- Nielsen, D. R., & Prather, K. J. (2009). In situ product recovery of n-butanol using polymeric resins. *Biotechnology and bioengineer,ng*. 102(3), 811-821.
- Oliva-Rodríguez AG, Quintero J, Medina-Morales MA et al (2019) *Clostridium* strain selection for co-culture with *Bacillus subtilis* for butanol production from agave

- Patáková, P., Lipovský, J., Čížková, H., Fořtová, J., Rychtera, M., & Melzoch, K. (2009). Exploitation of food feedstock and waste for production of biobutanol. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(4), 276-283.
- Plaza PE, Gallego-Morales LJ, Peñuela-Vásquez M et al (2017) Biobutanol production from brewer's spent grain hydrolysates by *Clostridium beijerinckii*. *Bioresour Technol* 244:166–174. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.139>
- Pratto B, Chandgude V, de Sousa R et al (2020) Biobutanol production from sugarcane straw: defining optimal biomass loading for improved ABE fermentation. *Ind Crops Prod* 148:112265. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112265>
- Procentese, A., Raganati, F., Olivieri, G., Russo, M. E., de la Feld, M., & Marzocchella, A. (2017). Renewable feedstocks for biobutanol production by fermentation. *New biotechnology*, 39, 135-140.
- Purkait, M. K., & Haldar, D. (2021). Chapter 3—Conventional pretreatment methods of lignocellulosic biomass. *Lignocellulosic biomass to value-added products*. Elsevier, 31-46.
- Qi G, Xiong L, Luo M et al (2018) Solvents production from cassava by co-culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Environ Chem Eng* 6:128–133. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.067>
- Qi, G. X., Xiong, L., Huang, C., Chen, X. F., Lin, X. Q., & Chen, X. D. (2015). Solvents production from a mixture of glucose and xylose by mixed fermentation of *Clostridium acetobutylicum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 177, 996-1002.
- Qin Z, Duns GJ, Pan T, Xin F (2018) Consolidated processing of biobutanol production from food wastes by solventogenic *Clostridium* sp. strain HN4. *Bioresour Technol* 264:148–153. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.076>
- Qing, Q., Yang, B., & Wyman, C. E. (2010). Impact of surfactants on pretreatment of corn stover. *Bioresource technology*, 101(15), 5941-5951.
- Qureshi N, Blaschek HP (1999) Butanol recovery from model solution/fermentation broth by pervaporation: evaluation of membrane performance. *Biomass Bioenerg* 17:175–184. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(99\)00030-6](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(99)00030-6)
- Qureshi, N., Lin, X., Liu, S., Saha, B. C., Mariano, A. P., Polaina, J., ... & Singh, V. (2020). Global view of biofuel butanol and economics of its production by fermentation from sweet sorghum bagasse, food waste, and yellow top presscake: Application of novel technologies. *Fermentation*, 6(2), 58.
- Qureshi, N., Saha, B. C., Hector, R. E., Hughes, S. R., & Cotta, M. A. (2008). Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation

- using *Clostridium beijerinckii*: Part I—Batch fermentation. *Biomass and bioenergy*, 32(2), 168-175.
- Reshmy, R., Philip, E., Unni, R., Paul, S. A., Sindhu, R., Madhavan, A., ... & Binod, P. (2023). Bioethanol—A promising alternative fuel for sustainable future. In *Valorization of Biomass to Bioproducts* (pp. 179-196). Elsevier.
- Ribeiro RSA, Pohlmann BC, Calado V et al (2019) Production of nanocellulose by enzymatic hydrolysis: trends and challenges. *Eng Life Sci* 19:279–291. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800158>
- Rochón E, Ferrari MD, 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 Fuels* 32:9470–9477. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.8b01660>
- Rosa-Martínez E, García-Martínez MD, Adalid-Martínez AM et al (2021) Fruit composition profile of pepper, tomato and eggplant varieties grown under uniform conditions. *Food Res Int* 147:. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110531>
- Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renew Energy* 37:19–27. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>
- Śmiechowska M, Dmowski P (2006) Crude fibre as a parameter in the quality evaluation of tea. *Food Chem* 94:366–368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.026>
- Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., & Sonomoto, K. (2005). High production of acetone–butanol–ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding. *Journal of biotechnology*, 120(2), 197-206.
- Tran, H. T. M., Cheirsilp, B., Hodgson, B., & Umsakul, K. (2010). Potential use of *Bacillus subtilis* in a co-culture with *Clostridium butylicum* for acetone–butanol–ethanol production from cassava starch. *Biochemical Engineering Journal*, 48(2), 260-267.
- Turkish Statistical Institute (2023) Bitkisel Üretim 1.Tahmini, 2023. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-1>. Tahmini-2023-49534. Accessed 01 June 2024
- Valles A, Álvarez-Hornos FJ, Martínez-Soria V et al (2020) Comparison of simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation processes for butanol production from rice straw. *Fuel* 282:118831. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118831>
- Valles A, Capilla M, Álvarez-Hornos FJ et al (2021) Optimization of alkali pretreatment to enhance rice straw conversion to butanol. *Biomass Bioenergy* 150:. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106131>

- Wang X, Huang L, Zhang C et al (2020) Research advances in chemical modifications of starch for hydrophobicity and its applications: a review. *Carbohydr Polym* 240:116292. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116292>
- Wen Z, Wu M, Lin Y et al (2014) Artificial symbiosis for acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation from alkali extracted deshelled corn cobs by co-culture of *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium cellulovorans*. *Microb Cell Fact* 13:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0092-5>
- Wu, J., Dong, L., Liu, B., Xing, D., Zhou, C., Wang, Q., ... & Cao, G. (2020). A novel integrated process to convert cellulose and hemicellulose in rice straw to biobutanol. *Environmental Research*, 186, 109580.
- Yang, M., Zhang, J., Kuittinen, S., Vepsäläinen, J., Soininen, P., Keinänen, M., & Pappinen, A. (2015). Enhanced sugar production from pretreated barley straw by additive xylanase and surfactants in enzymatic hydrolysis for acetone–butanol–ethanol fermentation. *Bioresource technology*, 189, 131-137.
- Yong M, Zhang Y, Sun S, Liu W (2019) Properties of polyvinyl chloride (PVC) ultrafiltration membrane improved by lignin: hydrophilicity and antifouling. *J Memb Sci* 575:50–59. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.01.005>
- Yue ZB, Yu HQ, Hu ZH et al (2008) Surfactant-enhanced anaerobic acidogenesis of *Canna indica* L. by rumen cultures. *Bioresour Technol* 99:3418–3423. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.010>
- Zhou Y, Chen H, Qi F et al (2015) Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose. *Bioresour Technol* 182:136–143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.137>
- Zhou, Z., Ding, H., Shi, C., Peng, S., Zhu, B., An, X., & Li, H. (2025). Enhanced butanol tolerance and production from puerariae slag hydrolysate by *Clostridium beijerinckii* through metabolic engineering and process regulation strategies. *Bioresource Technology*, 419, 132035.
- Zhu S, Sui J, Liu Y et al (2019) Effects of washing, autoclaving, and surfactants on the enzymatic hydrolysis of negatively valued paper mill sludge for sugar production. *Energy Fuels* 33:1219–1226. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.8b03586>
- Zhu Z, Zhang S, Song C et al (2022) Influences of organic loading, feed-to-inoculum ratio, and different pretreatment strategies on the methane production performance of eggplant stalk. *Environ Sci Pollut Res* 29:85433–85443. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20940-5>