

## İmmobilize Hücrelerle Sürekli Etanol Fermentasyonu

Yrd. Doç. Dr. Filiz ÖZÇELİK — Yrd. Doç. Dr. Sedat DÖNMEZ

A.Ü. Ziraat Fak. Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü — ANKARA

### 1. Giriş

Fermentasyon yoluyla etanol üretiminde, klasik kesikli üretim yöntemlerinin yeterince ekonomik olmaması nedeniyle, sürekli üretim yöntemleri geliştirmek üzere yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar kapsamında son 15 yıl içerisinde immobilize hücre teknolojisiyle gerçekleştirilen sürekli etanol fermentasyonu, klasik etanol fermentasyonuna göre çeşitli üstünlükler göstermektedir.

İmmobilize hücrelerle yapılan sürekli üretimlerde hücreler fiziksel olarak reaktör içerisinde alıkonuldukları için, reaktörü substratla besleme hızı mikroorganizmanın özgül gelişme hızının çok üzerinde olabilmektedir. Böylece substratın etanole dönüşüm hızı yüksek olduğundan, belli sürede reaktörün brim hacminden daha fazla ürün alınabilmekte, başka bir deyişle reaktör verimliliği yükselmektedir.

Sürekli etanol üretiminde immobilize hücre kullanımının, klasik yöntemlere göre çeşitli üstünlükleri şöyle özetlenebilir.

- Reaktördeki hücre konsantrasyonunun artışına bağlı olarak, reaktör verimliliği artar,
- Sürekli üretimde immobilize hücre tekniklerinin kullanılmasıyla, hücreler reaktör dışına süpürülmeksizin, yüksek substrat akış oranlarının uygulanması olasıdır.
- Yüksek immobilize hücre konsantrasyonu, reaktörde kontaminasyon riskini azaltmaktadır.
- İmmobilize hücre sistemleri, substrat besleme ve diğer operasyon koşullarında meydana gelebilecek istenmeyen değişimlere karşı daha dayanıklıdır. Çünkü, biyokitle sistem içinde alıkonulmakta ve bu yüzden fermentasyon aktivitesi sorun çözülene kadar korunabilmektedir.
- İşlemin sürekliliği ve kontrolü daha kolaydır.

— Değişik koşullardaki bir dizi reaktörün birbirine bağlanmasıyla, ardışık reaksiyonların tamamlanabilmesi olasıdır.

— Hücreler sistem içerisinde alıkonulduklarından, biyokitlenin olgun mayşeden ayrılması için uygulanacak işlemlere gerek kalmayacaktır.

— İmmobilize hücre sistemlerinde gerek duyulan reaktör hacmi, klasik kesikli yöntemlerdekine oranla daha küçük olacaktır için, sabit yatırım masrafları azalacaktır.

Dünya enerji krizinin yeni ve yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ilgiyi artırması nedeniyle son yıllarda fermentasyon yoluyla etanol üretimi özel bir önem kazanmıştır. Bu konu üzerinde oldukça fazla sayıda yayın görülmekte ve immobilize hücrelerin kullanıldığı çeşitli sürekli etanol üretim yöntemleri tanıtılmaktadır.

Sunulan bu yayının amacı, immobilize hücrelerle gerçekleştirilen sürekli etanol fermentasyonuna ilişkin çalışmaların belirgin özellikleri ve bazı operasyon karakteristiklerini tanıtmaktır.

Etanol üretiminde, yüksek etanol verimliliğine ulaşmak kadar yüksek etanol konsantrasyonu ve yüksek substrat dönüşüm oranını elde etmek de amaçlanır. Endüstriyel üretimde hammadde girdisi tüm üretim masraflarının % 70 ine kadar çıkabilmektedir. Ayrıca etanol konsantrasyonu düşük mayşeden etanolün ayrılmasında damıtma masrafı da doğal olarak yüksek olacaktır (15). Ancak, immobilize hücrelerle yapılan çalışmalarda yüksek etanol verimliliği, düşük etanol konsantrasyonu ve/veya düşük substrat dönüşüm oranlarında elde edilmiştir. Bir örnek vermek gerekirse, toplam şeker kullanım oranı % 64 iken  $105.7 \text{ g.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  etanol verimliliğine sahip olan bir reaktör, % 97.8 şeker kullanımında  $6.3 \text{ g.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  verimlilik göstermiştir (2). Yüksek etanol verimliliğine ulaşarak işletmenin fermentasyon bölümündeki yatırım ve üretim masraflarının azaltılması, hammadde fiyatlarındaki ve diğer masraflar-

daki (sterilizasyon, damıtma, depolama v.b. proses masrafları) artışı dengeleyememektedir. Bu nedenle substratın etanole dönüşüm oranını azaltmak ve olgun mayşedeki etanol konsantrasyonunu düşürmek pahasına, yüksek etanol verimliliği elde etmeye çalışılmamalıdır.

Etanol üretimine değişik reaktörlere ilişkin verimlilik değerleri kıyaslanırken farklı hesaplama yöntemlerinin kullanılabilmesi ve sonuçların seçilen yöntemle ilgili olarak değişebileceği dikkate alınmalıdır. Örneğin, verimlilik sıvı faz hacmi, katı yatak hacmi veya toplam reaktör hacmi esas alınarak hesaplanabilmektedir. Bazen, paket yataklı reaktörlerde (packed bed) olduğu gibi, reaktörlerin kullanılan hacmi toplam reaktör hacminin % 80 ine kadar çıkabilmektedir. Ancak, sıvı hacmi toplam reaktör hacminin genel olarak % 40 ından daha azdır.

Sonuç olarak, sıvı hacmi esas alınarak hesaplanan verimlilik değerleri, toplam reaktör hacmi esas alınarak hesaplanan verimlilik değerlerinden 2-3 kez daha yüksek olmaktadır. Bazı yayınlarda verimlilik değerlerinin hangi esasa göre hesaplandığı belirtilmemiştir.

İmmobilize hücre reaktörlerinin verimliliğinin klasik fermentasyon sistemlerinininkilerle kıyaslanabilmesi için, kesikli fermentörde etanol verimliliğinin  $1.8 - 2.5 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  ve sürekli karıştırılmalı tank tipi reaktörler (SKTR) için bu değerlerin  $6 - 8 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  arasında olduğu burada belirtilmelidir (7, 15).

Fermentörün süreç verimliliğini etkileyen diğer bir faktör kullanılan mikroorganizmanın performansıdır. Etanol üretiminde genel olarak mayalar kullanılır ve bunların etanol üretim kapasiteleri iyi bilinir. Buna karşın, son zamanlarda artan bir ilgiyle üzerinde çalışılan *Zymomonas mobilis* bakterisinin verimi, farklı

metabolizma yolu izlemeleri nedeniyle, daha yüksektir. Ayrıca *Zymomonas*'lar çoğalmaları için havalandırmaya gerek duymazlar ve etanol toleransları da mayalardan daha yüksektir. Bunlara karşın kullanabildiği substrat çeşidi az olup, mayalara göre daha yüksek pH derecelerine (pH 5) gereksinim göstermeleri nedeniyle üretimde bakteriyel kontaminasyon riski daha yüksektir. Bununla birlikte *Z. mobilis* bakterilerinin kullanıldığı immobilize sistemlerde etanol verimliliği mayalarınkinden genellikle çok yüksektir.

## 2. İmmobilize Hücrelerle Sürekli Etanol Fermantasyonu Uygulamalar.

Sürekli etanol üretiminde kullanılan immobilizasyon teknikleri; hücreleri bir taşıyıcıya bağlama, çapraz bağlama, polimer bir matris içinde tutuklama ve bir membran arkasında alıkoyma şeklinde gerçekleştirilmektedir.

İmmobilize hücrelerle etanol üretiminde ilk uygulanan yöntem taşıyıcıya bağlama yöntemi olup, sonraları yakalama yöntemleri daha yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

### 2.1. Taşıyıcıya Bağlayarak İmmobilize Edilmiş Hücrelerle Sürekli Etanol Fermantasyonu

Hücrelerin bir taşıyıcıya bağlanması, adsorbsiyon veya kovalent bağlama yoluyla olmakta ve adsorbsiyon daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu şekilde immobilize edilmiş hücrelerle, pahalı olmayan destek maddeleri kullanarak, uzun süreli yüksek verimlilik elde edilebilmiştir. Bu yöntemle immobilize edilmiş hücrelerle gerçekleştirilen etanol üretimine ilişkin bazı örnekler çizelge 1'de özetlenmiştir

Çizelge 1. Taşıyıcıya bağlayarak immobilize edilmiş hücrelerle sürekli etanol fermentasyonu

Taşıyıcı tipi	Mikroorganizma	Substrat konsantr. g.l <sup>-1</sup>	Şeker kullanımı %	Etanol konsantr. g.l <sup>-1</sup>	Etanol verimliliği g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Kaynak
Vermiculite (patent)	Z. mobilis ATCC 10988	Glikoz 105	64	29	105 (V <sub>L</sub> )	2
Oğun yongası	S. cerevisiae	Glikoz 164	98	76	21.2	5
Taşıyıcı A (patent)	S. cerevisiae	Melas 197 (I.Ş.)	74	71	24.9 (V <sub>L</sub> )	6
İyon değiştirci reğine	Z. mobilis ATCC 29191	Glikoz 100	97.4	40.8	89.9 (V <sub>L</sub> )	11
Plastik bulaşık - teli	Z. mobilis ZM <sup>4</sup>	Glikoz 100	97.9	45.2	65.1 (V <sub>L</sub> )	23
Plastik bulaşık - teli	Z. mobilis VTT-E-78082	Glikoz 100	97.8	44.9	64.2 (V <sub>L</sub> )	23

V<sub>L</sub> — Etanol verimliliği reaktördeki sıvı hacmi esas alınarak hesaplanmıştır.

I.Ş. — İndirgen şeker.

Taşıyıcıya bağlama sistemlerinin üstünlükleri; immobilizasyonun yumuşak koşullarda ger-  
çekleşmesi, taşıyıcının yeniden kullanılması ve kitle transferinin kolay olmasıdır. Bunlara kar-  
şın, hücreleri taşıyıcıya bağlayan güç yeterince kuvvetli olmadığından hücreler taşıyıcıdan kolayca ayrılabilirler.

## 2.2. Çapraz Bağlayarak İmmobilize Edilmiş Hücrelerle Sürekli Etanol Fermentasyonu

Çok yeni bir yöntem olup, hücrelerin immobilizasyonu için glutaraldehit veya ışıkta çapraz bağlanabilen reğineler kullanılmaktadır. Bu uygulamaya ilişkin örnekler izelge 2.'de görülmektedir.

Çizelge 2. Çapraz bağlama metoduyla immobilize edilmiş hücrelerle sürekli etanol fermentasyonu

Taşıyıcı tipi	Mikroorganizma	Substrat konsantr. g.l <sup>-1</sup>	Şeker kullanımı %	Etanol konsantr. g.l <sup>-1</sup>	Etanol verimliliği g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Kaynak
Jelatin ve glutaraldehitte kaplanmış	K. fragilis NRRL 2415	Laktoz 109	99	47.5	50.6 (V <sub>T</sub> )	3
seramik ışıkta çapraz bağlanabilen reğine	Saccharomyces sp.	—	95	85	11 (V <sub>T</sub> )	22

V<sub>T</sub> — Etanol verimliliği toplam reaktör hacmi esas alınarak hesaplanmıştır.

### 2.3. Polimer Matrisler İçinde Tutuklanmış Hücrelerle Sürekli Etanol Fermentasyonu

Hücrelerin gözenekli bir matris içerisinde tutuklanması esasına dayanan immobilizasyon yöntemleri, sürekli etanol fermentasyonunda en çok uygulanan yöntemlerden birisidir. Bu amaçla yapay polimerlerin kullanılması durumunda, gereksinim duyulan polimerizasyon koşulları hücreye önemli ölçüde zarar verebilmektedir. Fakat, Ca - alginat ve K - karragenan gibi doğal polimerler immobilizasyon koşullarının basit ve yumuşak olması nedeniyle en çok kullanılan polimerlerdendirler. Bu yöntemin başlıca sorunları; Ca - alginat'ın fosfatlara karşı stabil olmayışı ve fermentasyon sırasında açığa çıkan CO<sub>2</sub> nedeniyle polimer jel'in parçalanmasıdır.

Birinci sorun, fermentasyon ortamındaki fosfat konsantrasyonunu en aza indirmek veya alginat taneciklerini poliamin, polietilen veya glutaraldehit'le kaplayarak dış stabilizasyon yoluyla; ikinci sorun ise küçük ve çok gözenekli parçacıklar kullanmakla çözümlenebilmektedir. Bu yöntemin etanol fermentasyonundaki bazı uygulamalarının sonuçları çizelge 3'de verilmiştir.

Bu çalışmalarda en çok paket yataklı düşey reaktörler kullanılmaktadır. Basit yapıda olmalarına karşın kullanılmayan hacimlerinde hücre ve CO<sub>2</sub> toplanması önemli olumsuzluklarıdır. Bu durum reaktör etkinliğinin azalmasına, jel yatağının tıkanmasına ve jel'de kanallı oluşmasına neden olmaktadır. Bu sorunlar Akışkan Yataklı Reaktörler ve Çapraz Akışlı Reaktörler kullanılarak giderilmektedir.

Çizelge 3. Polimerik matrisler içinde tutuklanmış hücrelerle sürekli etanol üretimi.

Taşıyıcı tipi	Mikroorganizma	Substrat konsantr. g.l <sup>-1</sup>	Şeker kullanımı %	Etanol konsantr. g.l <sup>-1</sup>	Etanol verimliliği g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Kaynak
Ca - alginat	K. marxianus UCD 55 - 82	Yer elması 100 (İ.Ş.)	90	48.5	92 (V <sub>L</sub> )	1
Karragenan	Z. mobilis ZM 4	Glikoz 150	96	73.8	16.5 (V <sub>T</sub> )	8
Karragenan	Z. mobilis ZM 4	Früktöz 100	96	46.0	14 (V <sub>T</sub> )	9
Ca - alginat	Z. mobilis DSM 424	Glikoz 150	98	74.0	98.5 (V <sub>L</sub> )	10
Ca - alginat	S. cerevisiae	Melas 175 (İ.Ş.)	78	70.0	17.5 (V <sub>T</sub> )	14
Karragenan	Z. mobilis ATCC 10988	Glikoz 200	90	92.0	22 (V <sub>T</sub> )	15
Jelatin	S. uvarum ATCC 26602	Darı 11.5 (İ.Ş.)	100	5.5	86 (V <sub>L</sub> )	18
Ca - alginat	S. cerevisiae	Melas 150 (İ.Ş.)	98	70.0	20 (V <sub>T</sub> )	19
Pektin	S. cerevisiae CMI - 120	Melas 160 (İ.Ş.)	90	70.0	40 (V <sub>L</sub> )	20

V<sub>L</sub> — Etanol verimliliği reaktördeki sıvı hacmi esas alınarak hesaplanmıştır.

V<sub>T</sub> — Etanol verimliliği toplam reaktör hacmi esas alınarak hesaplanmıştır.

İ.Ş. — İndirgen şeker.

#### 2.4. Membran Arkasında Tutulan Hücrelerle Sürekli Etanol Fermentasyonu

Hücrelerin membran arkasında alıkonarak immobilize edilmesi yöntemi, sürekli etanol fermentasyonunda yaygın olarak uygulanma-

maktadır. Bu yöntemde karşılaşılan başlıca sorunlar; substrat ve ürün difüzyonu, membran tıkanması, mekanik güçlükler ve operasyon stabilitesinin düşük olmasıdır. Bu teknikle yapılan sürekli etanol fermentasyonuna ilişkin araştırmaların sonuçları Çizelge 4.'de görülmektedir.

Çizelge 4. Membranlar arkasında alıkonulan hücrelerle sürekli etanol fermentasyonu

Mikroorganizma	Substrat konsantr. g.l <sup>-1</sup>	Şeker kullanımı %	Etanol konsantr. g.l <sup>-1</sup>	Etanol verimliliği g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Kaynak
S. cerevisiae ATCC 4126	Glikoz 104	100	—	27.3 (V <sub>T</sub> )	16
K. fragilis NRRL-Y-2415	Laktoz 50	100	24	24 (V <sub>T</sub> )	17

V<sub>T</sub> — Etanol verimliliği toplam reaktör hacmi esas alınarak hesaplanmıştır.

#### 2.5. Flokülant Hücrelerle Sürekli Etanol Üretimi

Flokülasyon özelliğindeki bakteri ve maya hücreleri, herhangi bir taşıyıcıya gerek duymaksızın, immobilize hücre sistemlerinin üstünlüklerini göstermektedir. Çizelge 5.'de flokülant hücrelerle yapılan sürekli etanol fermentasyonuna ilişkin bazı araştırmaların sonuçları görülmektedir.

Bu sistemde, silindirik bir gövdeye sahip kule fermentörler en yaygın olarak kullanılan

reaktörlerdir. Reaktörlerin daha geniş olan konik şekilli üst kısmı çıkan mayşedeki hücre floklarının çökmesini sağlamaktadır. Ancak, bu sistemde sadece flokülant hücreler kullanılabilen ve reaktördeki denge durumuna (steady - state) erişilmesi uzun zaman almaktadır. Ayrıca flokların bozulmasından kaçınmak için substrat akış hızının diğer immobilizasyon sistemlerine kıyasla daha düşük olması gerekmektedir ve oluşan CO<sub>2</sub> flokların dağılmasına neden olabilmektedir.

Çizelge 5. Flokulant hücrelerle sürekli etanol fermentasyonu

Mikroor- ganizma	Substrat konsantr. g.l <sup>-1</sup>	Şeker kullanımı %	Etanol konsantr. g.l <sup>-1</sup>	Etanol verimliliği g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	Kaynak
Z. mobilis WR 6	Glikoz 100	97	47.6	80 (V <sub>T</sub> )	4
Maya IR - 2	Şeker kamışı 125 (i.ş.)	98.3	54.8	34.6 (V <sub>T</sub> )	12
Z. mobilis ZM 401	Glikoz 100	100	49	39 (V <sub>T</sub> )	13
S. cerevisiae NRRL-Y-265	Glikoz 130	98.2	60.1	18.4 (V <sub>T</sub> )	21
Z. mobilis ATCC 10988	Glikoz 105	98	50	100 (V <sub>T</sub> )	24
S. cerevisiae	Sakkaroz 117	98.6	57.2	15 (V <sub>T</sub> )	25
Z. mobilis NRRL-B-12526	Glikoz 110	96	46	39 (V <sub>T</sub> )	26
Z. mobilis ZM 4 F	Fruktoz 100	96	47	85,6 (V <sub>T</sub> )	27

V<sub>T</sub> → Etanol verimliliği toplam reaktör hacmi esas alınarak hesaplanmıştır.  
i.ş. → İndirgen şeker.

### 3. Sonuç

Fermentasyon yoluyla etanol üretiminde yöntemin ekonomikliğine katkıda bulunacak en önemli değişken substrat dönüşüm hızıdır. Substrat dönüşüm hızını artırmak amacıyla, ortamdaki hücre konsantrasyonunu artırmak için immobilize hücre teknikleri kullanılmaktadır. Bu teknikler klasik kesikli yöntemlerle kıyaslandığında çeşitli üstünlükler göstermektedirler. Örneğin, klasik kesikli etanol üretiminde

fermentörün etanol verimliliği 2g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> iken, immobilize hücre reaktörlerinde bu değer 20 - 25 kez artabilmektedir. Bu da 20 - 25 kez küçük fermentör hacmiyle birim zamanda aynı üretim kapasitesine ulaşılabileceği anlamında olup, birim maliyette önemli azalmalar sağlayacaktır. Ayrıca, immobilize hücre sisteminin bir kaç hafta korunabildiği düşünüldüğünde, immobilizasyon masraflarının işletmeye önemli mali yükler getirmeyeceği de anlaşılmaktadır.

### KAYNAKLAR

1. BAJPAI, P. and A. MARGARITIS, 1986. Process Biochemistry, 6, 86 - 89.
2. BLAND, R.R., H.C. CHEN, W.J. JEWELL, W.D. BELLAMY and R.R. ZALL, 1982. Biotechnol. Letters, 4, 5, 323 - 328.
3. DALE, M.C., M.R. OKOS and P.C. WANKAT, 1985. Biotechnol. Bioeng., 27, 932 - 942.
4. FEIN, J.E., H.G. LAWFORD, G.R. LAWFORD, G.C. ZAWADZKI and R. CHARLEY, 1983. Biotechnol. Letters, 5, 1, 19 - 24.
5. GENÇER, M.A. and R. MUTHARASAN, 1983. Biotechnol. Bioeng., 15, 2243 - 2262.
6. GHOSE, T.K. and K.K. BANDYOPADHYAY, 1980. Biotechnol. Bioeng., 12, 1489 - 1496.
7. GODIA, F., C. CASAS and C. SOLA, 1987. Process Biochemistry, 1987, 4, 43 - 48.
8. GROTE, W., K.J. LEE and P.L. ROGERS, 1980. Biotechnol. Letters, 2, 11, 481 - 486.

9. JAIN, V.K., I. TORAN-DIAZ and J. GARATTI, 1985. *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 273 - 370.
10. KLEIN, J. and B. KRESSDORF, 1983. *Biotechnol. Letters*, 5, 8, 497 - 502.
11. KRUG, T.A. and A.J. DAUGLIS, 1983. *Biotechnol. Letters*, 5, 159.
12. KURIYAMA, H., Y. SEIKO, T. MURAKAMI, H. KOBAYASHI and Y. SONODA, 1985. *J. Ferment. Technol.*, 63, 2, 159 - 165.
13. LEE, K.J., M.L. SKOTNICKI and P.L. ROGERS, 1982. *Biotechnol. Letters*, 4, 9, 615 - 620.
14. LINKO, Y.Y. and P. LINKO, 1981. *Biotechnol. Letters*, 3, 1, 21 - 26.
15. LUONG, J.H.T. and M.C. TSENG, 1984. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 207 - 216.
16. MARGARITIS, A. and C.R. WILKE, 1978. *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 5, 709 - 726.
17. MARGARITIS, A. and C.R. WILKE, 1978. *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 5, 727 - 753.
18. MOHITE, U. and H.S. RAMAN, 1984. *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 1126 - 1127.
19. NAGASHIMA, M., M. AZUMA, S. NOGUCHI, K. INUZUKA and H. SAMEJIMA, 1984. *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 992 - 997.
20. NAVARRO, A., H. MARANGONI, I.M. PLAZA and D. CALLIERI, 1984. *Biotechnol. Letters*, 6, 7, 465 - 470.
21. NETTO, C.B., A. DESTRUHAUT and G. GOMA, 1985. *Biotechnol. Letters*, 7, 5, 355 - 360.
22. ODA, G., H. SAMEJIMA, T. YAMADA, 1983. *Proc. Biotechnol.*, 83, 597 - 611.
23. ÖZÇELİK, F., 1985. Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*, ALKO (A-13048), Helsinki, 28 s.
24. PRINCE, I.G. and J.P. BARFORD, 1982. *Biotechnol. Letters*, 4, 8, 525 - 530.
25. RAMIREZ, A. and M.J. BOUDAREL, 1983. *Biotechnol. Letters*, 5, 10, 659 - 664.
26. STRANDBERG, G.W., T.L. DONALDSON and E.J. ARCURI, 1982. *Biotechnol. Letters*, 4, 6, 347 - 352.
27. TORAN - DIAZ, I., V.K. JAIN and J.C. GARATTI, 1984. *Biotechnol. Letters*, 6, 6, 389 - 394.

# TÜRKİYE 6. GIDA KONGRESİ

17 - 19 Ekim 1988

Ankara