

Zymomonas mobilis Bakterisiyle Melastan Etilalkol Üretimi^(*)

Yard. Doç. Dr. Filiz ÖZÇELİK

A.Ü. Ziraat Fakültesi, Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü — ANKARA

ÖZET

Bu çalışmada *Z. mobilis* bakterisinin melastan etilalkol üretme yeteneği araştırılmış ve sonuçlar maya ile elde edilenlerle kıyaslanmıştır. Her iki *Z. mobilis* suşu da, çok uzun fermentasyon sürelerinde bile, şekerin etilalkole dönüşümünü tamamlayamamıştır. En yüksek teorik etanol verimi (% 79), 125.4 g/l şeker içeren melas mayşesinde *Z. mobilis* AL95 suşu ile elde olunmuştur. Buna karşın, maya şekerin tümünü etilalkole dönüştürmüş ve *Z. mobilis*'e oranla önemli ölçüde fazla etilalkol üretmiştir.

1. GİRİŞ

Çok yönlü bir enerji kaynağı olan etilalkole gittikçe artan bir gereksinme duyulması tüm dünya üzerinde bu konudaki araştırmaları teşvik etmektedir. Araştırmalar yalnızca ucuz bir substrat ortaya koyma yönünde değil, aynı zamanda *S. cerevisiae*'den daha uygun bir mikroorganizma bulabilme yönünde de yapılmaktadır (Özçelik, 1985).

Z. mobilis bakterisinin endüstriyel etilalkol üretimindeki çeşitli avantajları şöylece özetlenebilir :

1. Yüksek etilalkol verimi (*Zymomonas* için % 97, maya için % 89),
2. Yüksek glikoz konsantrasyonuna karşı dayanıklılık,
3. Mayanın aksine, tümüyle anaerobik gelişme yeteneği. Böylece sürekli fermentasyonda havalandırma gerekmezdir,
4. Üretilen birim etanole karşılık daha az yan ürün,
5. Yan ürün olarak değerlendirilecek biyokütlelerin daha yüksek birim değeri,

6. Genetik çalışmaların mayaya oranla daha kolay olması (Lee et al., 1980; 1982; Rogers et al., 1980; 1985; Bland et al., 1982; Esser and Karsch, 1984).

Buna karşın endüstriyel etilalkol üretiminde, substrat olarak kullanılacak hammaddenin maliyetteki payı da çok önemlidir. Büyük ölçekteki endüstriyel fermentasyonlarda melas, ucuz olması ve kolay temin edilebilmesi nedeniyle, özellikle ülkemizde, ilk aklı gelen hammadedir (Şahin ve Özçelik, 1979; Özçelik, 1982; Fidan ve Şahin, 1983).

Z. mobilis bakterisinin tüm suşları glikoz ve früktozu kullanabilmelerine karşın ancak % 50 si sakkarozu kullanabilmekte ve sakkarozdan yan ürün olarak önemli ölçüde levan ve sorbitol oluşturmaktadır (Viikari, 1984; Özçelik, 1985).

Vuuren ve Meyer (1982) tarafından şeker kamışı melası üzerinde yapılan bir çalışmada, düşük şeker konsantrasyonunda (% 5) *Z. mobilis*'in mayadan daha fazla etilalkol ürettiği, fakat daha yüksek şeker konsantrasyonlarında (% 10, 15, 20) etkisini kaybettiği ve bu şeker konsantrasyonlarında mayanın çok daha fazla etilalkol ürettiği belirtilmektedir. Araştırmacılar *Z. mobilis*'in melasta yeterince etkili olamamasının nedenini, bu bakterinin melastaki bazı toksik bileşenleri tolere edemediği şeklinde yorumlamışlardır.

Melastaki K, Ca, Mg ve Cl içeren anorganik tuzların *Z. mobilis* üzerindeki gelişme engelleyici etkilerini gidermek amacıyla, bu tuzların konsantrasyonlarını azaltacak membran teknikleri kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Rhee et al., 1984).

Melastaki anorganik tuzların fermentasyon üzerindeki olumsuz etkisini azaltmak amacıyla «fed-batch» tekniği geliştirilmiş, *Z. mobilis* bakterisi ile 36 saatte 70 - 80 g/l etilalkol konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Bu değer maya ile elde edilen etilalkol konsantrasyonuyla kıyaslanabilir olup, devam eden genetik çalışmalarla

(*) Bu çalışma ALKO (Finnish State Alcohol Company) araştırma laboratuvarlarında yapılmıştır.

daha da yükseltilebilecektir. Aynı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen suş seçme çalışmaları içerisinde mutasyon yoluyla, tuza dayanıklı bir suş olan ZM 482 izole edilmiş ve bu suş «fed -batch» tekniği ile birlikte melas fermentasyonunda başarıyla kullanılmıştır (Rogers et al., 1985).

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan *Zymomonas mobilis* suşları VTT - E - 78082 ve ATCC 31821 (ZM4) olup, ALKO (Finnish State Alcohol Company) kolleksiyonunda sırasıyla AL 94 ve AL 95 olarak kotlandırılmışlardır. Maya olarak yine ALKO kolleksiyonundan *Saccharomyces cerevisiae* MK 270 (ispirto mayası) kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılan iki farklı şeker pancarı melası; Bergen O.Z. Alkol Fabrikası'ndan temin edilen Hollanda melası (1983) ve Ankara Şeker Fabrikası'ndan temin edilen Türk melası (1985) dir.

Z. mobilis suşları 10 g/l Bacto - peptone, 10 g/l maya ekstraktı, 20 g/l glikoz içeren sıvı besiyeri içerisinde ve +4°C de muhafaza edilmiştir. İki haftada bir yenilenen bakteri kültürleri aşağıdaki işleme uygun olarak melasa alıştırılmıştır.

Stok kültür

% 1.5 glikoz + % 0.5 melas + % 0.5 maya ekstraktı

% 1.0 glikoz + % 1.0 melas + % 0.4 maya ekstraktı

% 0.5 glikoz + % 1.5 melas + % 0.25 maya ekstraktı

% 2 melas + % 0.25 maya ekstraktı (x 2)

% 5 melas + % 0.25 maya ekstraktı (x 2)

% 10 melas + % 0.25 maya ekstraktı

Substrat olarak kullanılan melas mayşesinin hazırlanmasında; melas eşit miktardaki damıtık su içinde çözündürülmüş, derişik H₂SO₄ ile yapılan pH ayarlamasından sonra 10 dakika kaynatılıp, +4°C de bir gece bekletilmiştir. Filtre edilen mayşede Brix ayarlanmış, pH yeniden kontrol edilmiştir. Besin yetersizliğinden doğabilecek gelişmedeki engellenmeyi en aza

indirmek amacıyla melas ortamına sterilizasyondan önce 2.5 g/l maya ekstraktı ilave edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Etilalkol üretimi

Fermentasyonlar 1 l mayşe içeren 2 l hacmindeki Bioengineering KLF 2000 fermentör (Wald, İsviçre) kullanılarak yapılmıştır. Başlatıcı kültür 30°C de 20 - 24 saat geliştirilmiş ve % 10 oranında kullanılmıştır. Fermentasyon sıcaklığı 30°C, karıştırma hızı 200 devir/dakika olup, ortamın pH sı otomatik olarak ilave edilen 2 N KOH ile *Z. mobilis* için 5.0, maya için 4.5'e ayarlanmıştır.

Örnekler doğrudan fermentörden alınmış, gelişmeyi ve fermentasyonu hemen durdurmak amacıyla 10 ml örnek üzerine 0.1 ml % 5 lik merthiolate ilave edilmiş, —20°C de analiz edilene kadar bekletilmiştir.

2.2.2. Analizler

Örnekler kuru hücre ağırlığı, şeker ve etanol yönünden analiz edilmişlerdir.

Hücre kuru ağırlığını saptamak amacıyla santrifüj edilen örnekler, 2 kez damıtık su ile yıkandıktan sonra tekrar eski hacmine sulan. dırılmış ve 105°C de bir gece bekletilerek kuru ağırlıkları saptanmıştır.

Sakkaroz, glikoz ve früktoz enzimatik yöntemle (Boehringer test kit, Cat. No: 716260) tayin edilmiştir.

Etilalkol, damıtılmış örneklerde gaz kromatografik yöntemle saptanmıştır. Bu amaçla «Flame Ionization Dedektor» ve 3 mm x 2 m Porapak Q cam kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 190°C, enjeksiyon sıcaklığı 200°C, dedektör sıcaklığı 250°C ve taşıyıcı gaz akışı 60 ml/dak. olarak ayarlanmış, internal standart olarak etil metil keton kullanılmıştır.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

Z. mobilis suşlarının melastan etilalkol üretme yetenekleri araştırılmış ve sonuçlar Tablo 1'de mayanınki ile kıyaslanarak özetlenmiştir. Fermentasyon eğrileri Şekil 1, 2, 3, 4 ve 5'de görülmektedir.

Tablo 1. Melastan etilalkol üretiminin özetlenmiş sonuçları

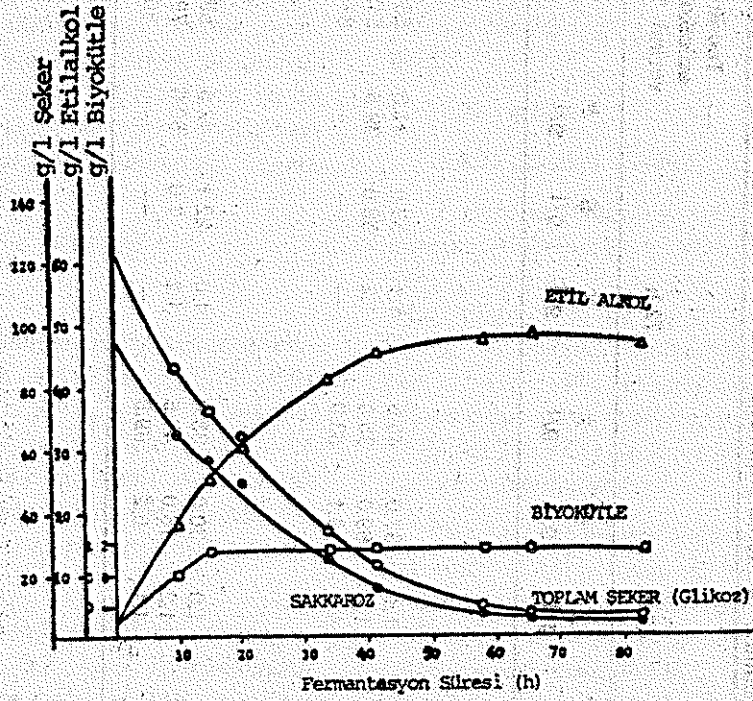
Fermentasyon Süresi		24 h			48 h			72 h			Teorik etilalkol verimi %		
Başlangıç		X	S	P	X	S	P	X	S	P			
		g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l		
Hollanda melası :													
Mikroorganizma													
Z. mobilis AL 94	0.3	122.3	3.3	0.9	60.0	31.0	1.1	37.0	40.5	1.1	33.0	41.5	66
Z. mobilis AL 95	0.5	151.6	3.4	1.2	86.0	28.5	1.2	69.0	35.0	1.2	58.0	39.5	51
S. cerevisiae MK 270	0.6	141.9	1.7	4.3	40.0	50.0	4.5	0.1	63.0	—	—	—	87
Türk melası :													
Mikroorganizma													
Z. mobilis AL 94	0.3	120.6	2.9	1.0	61.0	26.0	1.0	30.0	38.0	1.0	22.1	42.5	69
Z. mobilis AL 95	0.4	125.6	2.4	1.2	53.5	34.0	1.2	16.0	47.5	1.2	7.0	50.6	79
S. cerevisiae MK 270	0.4	159.8	1.6	4.0	36.0	55.5	4.1	0.2	69.8	—	—	—	86

* X — Hücure kuru ağırlığı

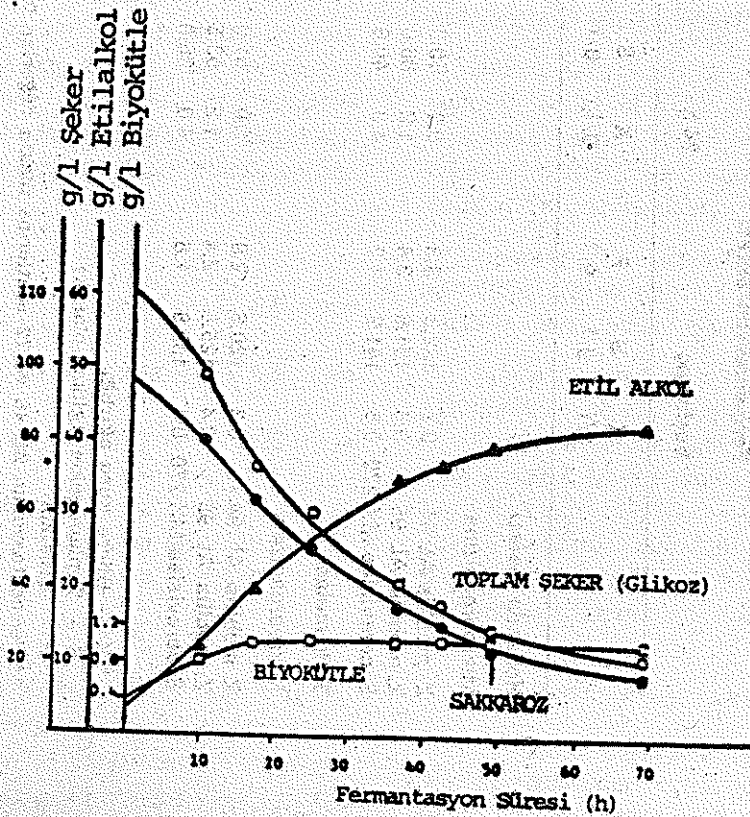
S — Toplam şeker (glükoz olarak)

P — Etilalkol

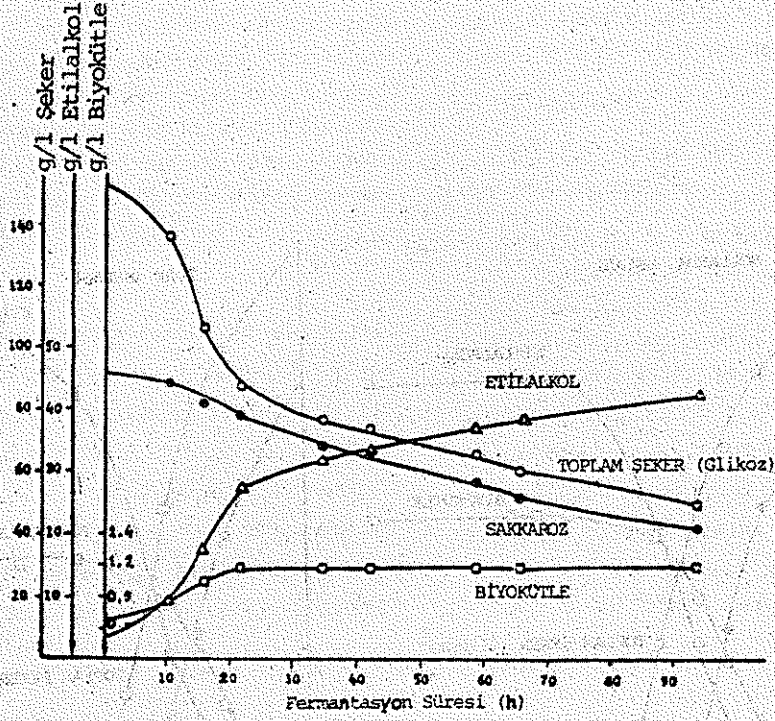
** Fermentasyonun 24, 48 ve 72 saatlerine ilişkin değerler fermentasyon kurvelerinden hesaplanmıştır.



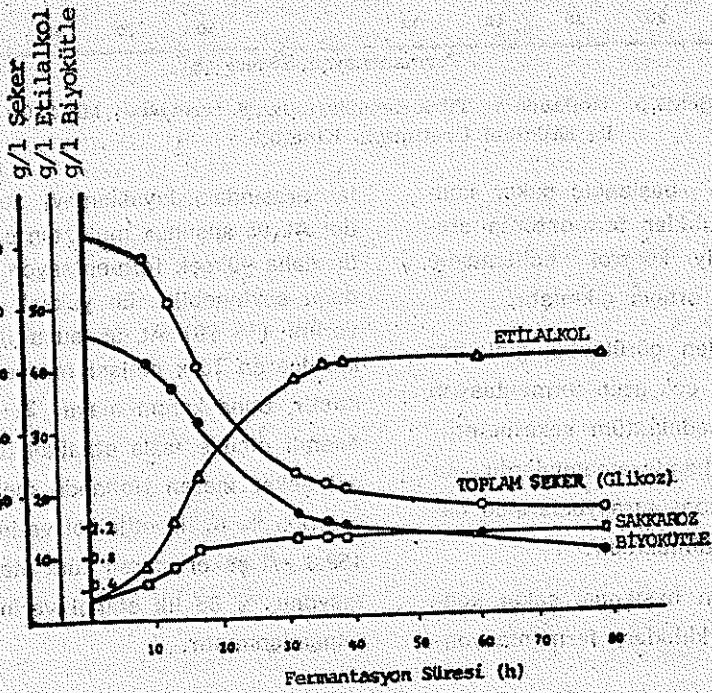
Şekil 1. Hollanda Melasından *Z. mobilis* AL94 ile Etilalkol Üretiminin Kinetiği.



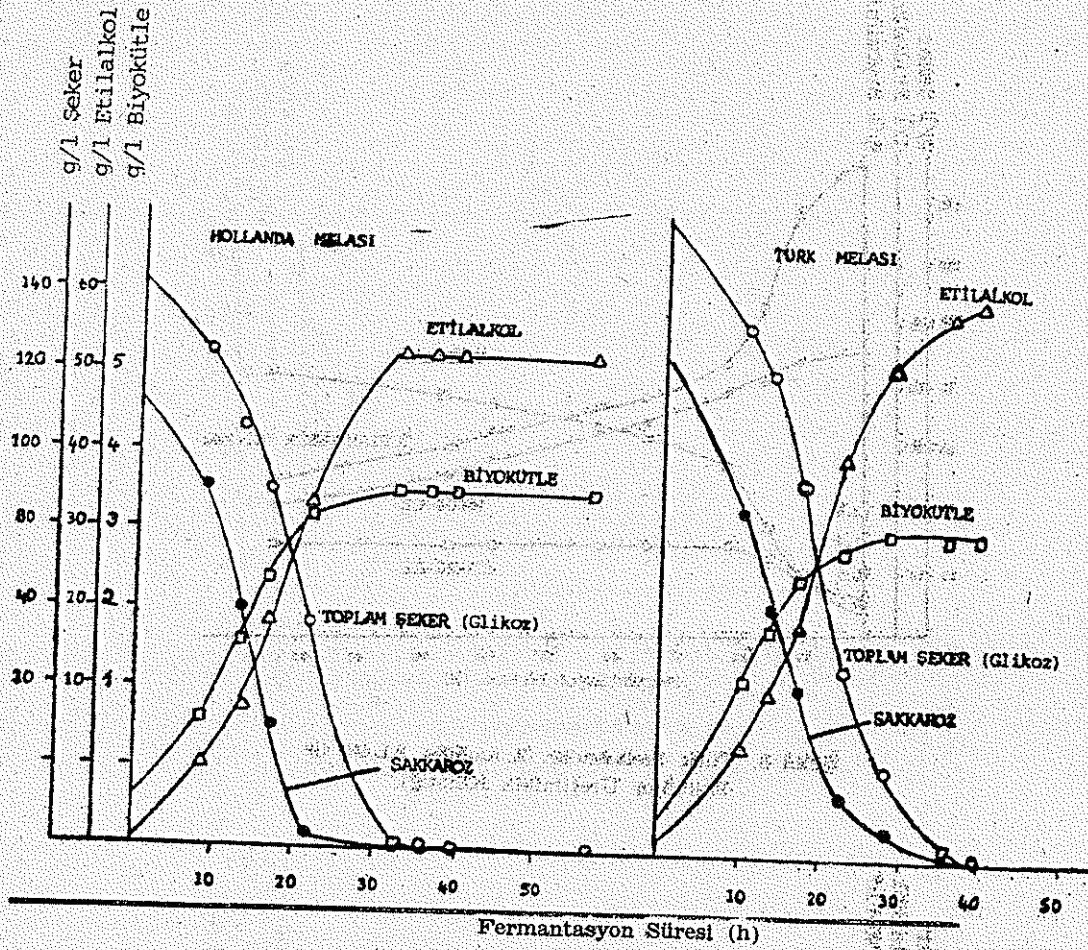
Şekil 2. Hollanda Melasından *Z. mobilis* AL95 ile Etilalkol Üretiminin Kinetiği.



Şekil 3. Türk melasından *Z. mobilis* AL 94 ile Etilalkol Üretiminin Kinetiği.



Şekil 4. Türk melasından *Z. mobilis* AL 95 ile Etilalkol Üretiminin Kinetiği.



Şekil 5. Hollanda ve Türk melaslarından *S. cerevisiae* MK 270 ile Etilalkol Üretiminin Kinetiği.

Melas mayşesinin başlangıç şeker konsantrasyonundaki farklılıklar fermentörün sterilizasyonu sırasında iyi kontrol edilemeyen buharlaşma nedeniyle ortaya çıkmıştır.

Tablo ve şekillerden görüleceği gibi, her iki *Z. mobilis* suşu da, çok uzun fermentasyon sürelerinde bile, mayşedeki tüm şekerin etilalkole dönüşümünü tamamlayamamışlardır. Bu durum yüksek şeker konsantrasyonlarında daha belirgin olarak görülmektedir.

Melas mayşelerinin başlangıç şeker konsantrasyonlarındaki farklılıklar, fermentasyon-

lar arasındaki kıyaslamayı zorlaştırmakta ise de; AL 95 suşunun melastan etilalkol üretiminde daha yüksek fermentasyon yeteneğinde olduğu söylenebilir. En yüksek teorik etilalkol verimi (% 79) AL 95 suşu ile 125.4 g/l şeker içeren Türk melası mayşesinde elde edilmiştir. Buna karşın maya *Z. mobilis*'e oranla önemli ölçüde fazla etilalkol üretmiş ve 141.9 g/l şeker içeren Hollanda melasında fermentasyonu % 87'lik etilalkol verimi ile 35 saatte, 159.8 g/l şeker içeren Türk melasında fermentasyonu % 86'lık etanol verimi ile 40 saatte tamamlanmıştır.

Şekillerin incelenmesinden anlaşılacağı gibi, *Z. mobilis* bakterisiyle yapılan fermentasyonların ilk 20 - 25 saatinde şeker kullanım oranı oldukça yüksek olmasına karşın bu süreden sonra düşmektedir. Bu duruma fermentasyon sırasında sakkarozun hidrolizindeki bir gecikmenin neden olduğu söylenebilir.

4. SONUÇ

Etilalkol üretiminde, hammadde olarak melas sözkonusu olduğunda, mayanın *Z. mobilis* bakterisinden üstün olduğu anlaşılmaktadır. Bunun nedeni, *Z. mobilis*'in melasta bulunan bazı toksik bileşenlerden etkilenmesidir. Bu bakteri üzerinde devam eden genetik çalışmalar ve toksik maddelerin etkisini azaltacak yeni fermentasyon yöntemlerinin uygulanmaya konma-

sıyla, *Z. mobilis* ileride iyi bir etilalkol üreticisi olma yönünde ümit vermektedir.

SUMMARY

Ethanol Production from Molasses by *Zymomonas mobilis*.

The ability of *Z. mobilis* to produce ethanol from molasses has been investigated and results were compared with those obtained with yeast. Neither strain of *Z. mobilis* could complete the conversion of sugar to ethanol, even with very long fermentation times. The highest theoretical ethanol yield (79 %) was obtained with AL 95 in molasses medium containing 125.4 g/l sugar. However, yeast completed the conversion of sugar and produced considerably more ethanol than *Z. mobilis*.

KAYNAKLAR

1. BLAND, R.R., H.C. CHEN, W.D. BELLAMY and R.R. ZALL, 1982. Continuous High Rate Production of Ethanol by *Zymomonas mobilis* in an Attached Film Expanded Bed Fermenter. *Biotechnology Letters* 4, 5, 323 - 328
2. ESSER, K. and T. KARSCH, 1984. Bacterial Ethanol Production: Advantages and Disadvantages. *Process Biochemistry* 19, 3, 116 - 121.
3. FIDAN, I. ve İ. ŞAHİN, 1983. Alkol ve Alkollü İçkiler Teknolojisi, Ank. Üni. Ziraat Fakültesi Yayınları No: 863, Ankara, 304 s.
4. LEE, K.J., M.L. SKOTNICKI, D.E. TRIBE and P.L. ROGERS, 1980. Kinetic Studies on Highly Productive Strain of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters* 2, 8, 339 - 344.
5. LEE, K.J., M.L. SKOTNICKI and P.L. ROGERS, 1982. Kinetic Studies on a Flocculent Strain of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters* 4, 9, 615 - 620.
6. ÖZÇELİK, F., 1982. Melastan Alkol Üretiminde Bazı Etkenlerin Verime ve Ham İspirto Bileşimine Etkileri Üzerinde Araştırmalar. Doktora tezi (Basılmamış). Ankara, 88 S.
7. ÖZÇELİK, F., 1985. Bakteriyel Etanol Üretimi, *Gıda Dergisi* 10, 6, 347 - 353.
8. RHEE, S.K., R.J. PAGAN, M.F. LEFEBVRE, L. WONG and P.L. ROGERS, 1984. Ethanol Production from Desalted Molasses Using *Saccharomyces uvarum* and *Zymomonas mobilis*. *J. Ferment. Technol.* 62, 3, 297 - 300.
9. ROGERS, P.L., K.J. LEE and DE. TRIBE, 1980. High Productivity Ethanol Fermentations with *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry* 15, 7 - 11.
10. ROGERS, P.L., A.T. STRZELECKI and A.E. GOODMAN, 1985. Commercial Potential of *Zymomonas* Process for Ethanol Production. Symposium on «Commercial Feasible Alcohol Fermentation Systems», August 15, Helsinki - Finland.
11. ŞAHİN, İ. ve F. ÖZÇELİK, 1979. Melastan Etilalkol Fermentasyonu Sırasında Önemi Bazı Etkenler. Ank. Üni. Ziraat Fakültesi Yılığ 29, 2, 439 - 448.
12. VIKARI, L., 1984. Formation of Levan and Sorbitol from Sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 252 - 255.
13. VUUREN, H.J.J. and L. MEYER, 1982. Production of Ethanol from Sugar Cane Molasses by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters* 4, 4, 253 - 256.