

***Clostridium pasteurianum*'un Biyo-Yakıt Üretimine Katkısı**

Mehmet Şamil Kök

Abant İzzet Baysal Üniv., Müh-Mim. Fakültesi, Gıda Müh. Bölümü, Bolu
kok_s@ibu.edu.tr

Özet

Her gün kullandığımız 1×10^{15} kJ'luk enerjinin %90 nı petrol ve kömür gibi fosil kaynaklıdır. Mikroorganizmalardan üretilen biyo-yakıtların, hem fosil kaynaklı enerjinin biteceği hem de buna sahip olmayan ülkeler göz önüne alındığında ne kadar önemli olduğu anlaşılır. Biyo-yakıtların önemi özellikle 1970'lerdeki petrol krizi ile anlaşıldı. Bu amaçla biyoteknolojistler ucuz biyo-atıklardan en verimli şekilde biyo-yakıt üretimi yapabilecek mikroorganizmalar üzerine yoğun araştırmalara giriştiler. Araştırmaların önemli bir kısmı; yakıt ve solvent üretimi esnasındaki metabolik evreleri anlamaya, bunun yanında üretimi artırmak amacıyla gen mühendisliğine ve fermantasyon metodu iyileştirilmesine ayrıldı (1). Bu araştırma endüstriyel solvent üretim potansiyeli bulunan *Clostridium pasteurianum* un maltoz transferi ve metabolizmasını aydınlatılmaya çalışır. Bu bakterinin karbonhidrat metabolizmasını anlamak, kendisinin solvent üretiminin aydınlatılması ve bu bağlamda potansiyelinin artırılması bakımından elzemdir.

Anahtar kelimeler: *Clostridium pasteurianum*, biyo-yakıt, solvent

Giriş

Saccharomyces türlerinden alkol ve *Lactobacilli* türlerinden yoğurt üretimi gibi mikroorganizmalardan yararlanma insanlık tarihinin binlerce yıldır uyguladıkları yöntemlerdir. Fermantasyondan enerji amaçlı yakıt üretimi yeni sayılan bir teknolojidir.

Yakıt Amaçlı Fermantasyon: Biyoteknolojistler için obligat anaerob bakterilerin fermantasyonları ilginçtir. Substratlardaki ve bunların fermantasyonuyla üretilen ürünlerin çeşitliliğinin geniş oluşu, araştırma ve geliştirmeleri gerekli ve ilgi çekici kılar.

Clostridium un bazı türlerinin etanol ve bütanol üretebilme potansiyelleri araştırmacıların ilgi kaynakları olmuştur. Sıkıntılar arasında belli başlı olanları; ürün miktarının, veriminin ve son ürün konsantrasyonunun sınırlı oluşu sayılabilir (2). *Saccharolytic clostridia* heksozlar, pentozlar ve disakkaritler gibi birçok şekeri fermente edebilir ve bunlardan organik asitler ve solvent üretirler. Etanol üreten en azından 30 çeşit *colstridia* türü bilimsel çalışma literatürüne girmiştir.

Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu

Bunlar anaerobtur ve bazı durumlarda da termofildirler. Termofil oluşları avantaj sağlar çünkü bu bakterilerin oluşturduğu ürünler uçucudur ve yüksek sıcaklıklarda kolayca buharlaşırlar. *C. acetobutylicum* endüstride nişasta ve melastan; aseton ve bütanol üretiminde başarı ile kullanılmıştır (3). I. Dünya Savaşı'nda Avrupa ve USA da barutun hammaddesi olan aseton yapımında sıkça kullanılan bir prosesi. Bunun yanında II. Dünya Savaşı'nda özellikle sanayide kullanılan vernik çözücü olan bütanol yapımı için de aynı proses kullanılmıştır.

II. Dünya Savaşı'ndan sonra petrokimya endüstrisinin gelişimi ve üretimini artırması sonucu akaryakıtın ve solventlerin ucuzladığı görülür. Avrupa'daki kararlı biyoteknolojik ve mikrobiyolojik bilimsel araştırmalar, bu proseslerin gelecekteki öneminin tekrar canlanacağını gösterir. Örneğin *C. thermocellum* selülozlu atıklardan kolayca etanol üretebilir. USA'da buz çözme amaçlı kullanılan asetat, asetojenik *Clostridium* 'lardan üretilmektedir (1).

Clostridia Metabolizması: Selüloz ve nişasta gibi ucuz ve geri dönüşümlü atık maddelerinin hücreye alınması daha küçük ünitelere parçalanmalarını gerektirir. Değişik *clostridia* türleri nişastalı fermantasyonları sonucu sellüloz, pullunaz ve amilaz enzimi üretirler (4). Amaç; ucuz olan selüloz ve nişasta gibi atık maddelerden etanol ve diğer değerli kimyasal maddeler üretmektir. Fakat şu an için sellebiyozdan yararlanabilme ancak selülotik olmayan organizmaların ön kültürleriyle selülozdan serbest kalacak şekerleri kullanabilmeleriyle mümkündür. Özellikle *C. thermocellum* gibi selülotik olmayan türlerin potansiyel hammaddelerinin genişletilmesi maksadıyla, selülotik sistemlerinin iyileştirilmesi gerekir.

Solvent Üretimi: Monosakkaritlerin pürivat ve asetil-CoA ya Emben-Meyerhof yoluyla çevirimi sonrasında *C. acetobutylicum* ve *C. thermocellum* gibi solvent üreten türleri iki belirgin evreye sahiptir. İlk evre asidojeniktir, asetil-CoA; asetata, bütürata, CO₂ ve H₂ e çevrilir. Bu fazda yüksek miktarlarda H₂ üretilir ve pH asidik ürünlerin artışıyla düşer. İkinci faz solventojeniktir; H₂ üretiminin azalmasına bağlı olarak asitler solvent oluşturulmak üzere tekrar kullanılır. Kültür ortamının mannitol ile beslenmesi durumunda da *C. pasteurianum* un bütanol ürettiği tespit edildi. Substrata asetat ilavesi durumunda ise bütanol üretimi ve molar bazda hücre gelişim verimi azalırken bütürat ve H₂ üretimi artmıştır (5).

Substrat Taşınması: Substratların hücre zarlarından taşınması aktif (enerji-bağımlı) veya pasif (enerji-bağımsız) olabilir. ATP bağımlı taşımada enerjiye ihtiyaç vardır. Böylece substrat daha yoğun bir ortama karşı taşınabilir ve permiaz enziminin varlığına bağımlıdır. *C. acetobutylicum* tarafından maltozun taşınması esnasındaki inhibitörlerin etkisi, enerji-bağımlı proseslerin operasyonları ile uyumluluk gösterir (6).

PEP Bağımlı Fosfotransferaz Sistemi (PTS): Grup translokasyonlarında substratlar kimyasal değişime uğramadan taşınmaz. En iyi incelenmiş örneği PEP bağımlı PTS sistemidir. *Clostridia* gibi bakteri metabolizmalarına karbonhidratların taşınmasından bu sistem sorumludur ve bu sistemler geniş çapta enzim faaliyetlerini içerirler (7).

Clostridia Metabolizmasında Maltoz Transferi: *Clostridia*'nın maltoz metabolizmasında enzimlerin rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. *C. acetobutylicum* un bütün hücresinde maltoz birikiminin enerji-bağımlı olduğu kanıtlandı ancak fosfotransferaz sisteminde olması gereken maltoz-kinaz ve fosfotransferaz enzimlerinin varlığına dayalı hiçbir kanıt bulunamadı. Maltoz transferi teşvik edilirken glikozun varlığında bu engellenir. Çalışmalar esnasında maltaz enziminin varlığı tespit edilmiş ve maltozun hidrolizinden tamamen sorumlu olduğu gösterilmiştir (6). Karbonhidratların metabolizmaları hakkında daha fazla bilgi elde edilebilmesi için genetik biliminden faydalanılması zorunludur (8).

Bulgular ve Tartışma

Aktif Olan *Clostridia* Enzimlerin Saptanması:

α -glikosidaz enzimlerinin aktiviteleri ham ekstrakta ve geçirgen özelliği kazandırılmış hücrelerde incelendi. Enzimlerin tasnifi Jel Filtrasyon Kromatografisi (GFC) ile yapılarak α -glikosidaz enzimik aktivite tespit edildi. Filtrasyon sonucu iki önemli α -glikosidaz enzimik aktivite tespit edilmiş ve maltaz I ve maltaz II olarak adlandırılmıştır. Çizelge 1 α -glikosidaz enzimlerinin nispi olarak yüzde (%) değerlerini göstermektedir.

Çizelge 1. α -glikosidaz enzimlerinin nispi olarak yüzde (%) değerleri.

ENZİMLER	Çözünür Ekstrakt %	Membran %	Süpernatant %
Maltaz	89.5	7.5	3.0
pNPGaz	86.6	7.6	5.8
Glukoamilaz	15.4	5.0	79.6

Enzimlerin Substrat Seçiciliği:

Substrat seçiciliği hızlı ve kısa sürede sonuç veren Microtitre Plate Analizi (MPA) ile ölçülmüştür. Bu analizden elde edilen sonuçlar Çizelge 2 de sunulmuştur. Substrat hidrolizi Mikro Titre Plate de değişen renk miktarının oranı ile tahlil edilmiştir. Bu renk değişimi de kontrol olarak kullanılmış her bir substratın GOD-PAD renk ayırıcı ile karıştırılmış solüsyonu ile mukayese edilmiştir. Filtrasyon sonucu elde edilen iki maltaz enziminin değişik şekere karşı gösterdikleri aktivite spektrumlarının yaklaşık aynı olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 2. Mikro Titre Plate analiziyle yapılan substrat hidrolizi.

SUBSTRAT	MALTAZ I	MALTAZ II
Maltoz	+	+
Nişasta	-	-
Rafinoz	+ / -	+ / -
pNPG	+	+
X-glu	+	-

Sonuç

Endüstriyel çapta solvent üretim kapasitesi bulunan *Clostridium pasteurianum* un karbonhidrat metabolizmasını anlamak bu mikroorganizmanın kapasitesini bütünü ile kavramak ve bu kapasiteyi artırabilmek açısından gereklidir.

Elde edilen GFC fraksiyonu sonucu maltoz ortamında yetiştirilen *Clostridium pasteurianum*'un çözümlü ekstraktında iki önemli enzimin bulunduğunu tespit edildi ve bunlar maltaz I ve maltaz II olarak adlandırıldı. Substrat seçiciliği analiz sonuçları ise iki enzimin birbirine yakın benzer özellikler gösterdiği fakat bazı küçük farklılıkların da mevcut olduğunu gösterdi (Çizelge 2).

Teşekkür

Dr.W.J Mitchell (Heriot-Watt) ve Prof.Dr.H. Bahl'a (Göttingen) CASE (Cooperative Awards in Science & Eng) bursu için teşekkür ederim.

Kaynaklar

- 1.Emsley J, 1994. Energy and Fuels in *New Scientist*: (15/01/94) pp.1-4.
- 2.Boyles DT. 1984. *Bio-Energy: Technology, Thermodynamics & Costs*. Ellis Horwood Series in Energy & Fuel Science. New York. pp158.
- 3.Holland KT, Knapp JS, Shoesmith JG. 1987. 'Anaerobic Bacteria' ed. Blackie/Chapman & Hall. p 206.
- 4.Burchardt G, Sahn K, Matuscheck M, Müller H, Haekel K. 1994. Molecular analysis of the pullunase-encoding gene of *C.thermosulfurogenes* EM1. Proceedings of the 6th EU Congress on Biotech.: Part 1. Ed. Alberghine K, Frontali L, Sensi P. pp. 341-344.
- 5.Heyndrickx M, De Vos P, De LJ. 1991. Fermentation characteristics of *Clostridium pasteurianum* LMG 3285 grown on glucose and mannitol. *J. of Applied Bacteriology*, 70:52-58.
- 6.Albaseri, KA, WJ Mitchell. 1995. Identification of two-glucosidase activities in *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052. *J. Appl. Bacteriol.* 78:149-156.
- 7.O'Brien RW, Morris JG. 1971. Oxygen and the growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Gen Microbiol*, 68 : 307-311
- 8.Bahl H, Burchardt G, Wienecke A. 1991. Nucleotide sequence of two *Clostridium thermosulfurogenes* EM1 genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 81:83-88.