

Piroliz gazından karışık kültür kullanılarak sentezgaz fermentasyonu ile biyoetanol üretimi: Isıl ön işlem etkisi

Bioethanol production by syngas fermentation from pyrolysis gas using mixed culture: Heat-pretreatment effect

Tugba KESKİN^{1*}, Gozde DUMAN²

¹Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye.

keskin.tugba@gmail.com

²Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, İzmir, Türkiye.

gozdeduman@gmail.com

Geliş Tarihi/Received: 06.08.2019, Kabul Tarihi/Accepted: 16.10.2019

* Yazışılan yazar/Corresponding author

doi: 10.5505/pajes.2019.52284

Araştırma Makalesi/Research Article

Öz

Son yıllarda hava kirliliğinin insan sağlığını ciddi boyutlarda etkileyecek düzeylere gelmesi ve yenilenebilir enerji kaynaklarına olan gereksinimin artmasına sentezgazdan biyoetanol üretimi ortak bir çözüm sunmaktadır. Sentezgaz hava kirliliği oluşturan CO, CO₂, N₂, H₂, NO_x gibi gazların bileşiminden oluşur ve bazı Clostridium türlerinin bu gazları metabolize ederek biyoetanol üretiminde kullanılabilir. Biyoetanol, benzinle karıştırılarak doğrudan kullanılabilmesi avantajından dolayı yenilenebilir enerji kaynakları arasında oldukça önemli bir biyoyakıttır. Biyoetanol üretiminde atık ve lignoselülozik hammaddelerin kullanılmasında uygulanan pahalı ön işlem yöntemlerine göre piroliz işlemi önemli bir alternatiftir. Bu çalışma kapsamında kullanılan biyoetanol üretiminde piroliz işlemi ile lignoselülozik atıkların biyokömüre dönüştürülmesi ve yan ürün olan atık gazın toplanarak biyoetanol üretiminde kullanılması iki farklı enerji kaynağının aynı sistemle üretilmesi açısından yenilikçi ve enerji verimli bir yaklaşımdır. Saf Clostridium türleri ile piroliz gazından etanol üretiminde karışık kültür kullanılması da maliyetlerin düşürülmesi açısından oldukça önemlidir. Bu çalışma kapsamında biyokömür eldesi amacıyla meyve sebze atıklarının pirolizi sırasında açığa çıkan atık gazdan ısı ön işlem uygulanmış karışık kültür kullanılarak biyoetanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Karışık kültürde ısı ön işlemin olumlu etkisi gözlenirken reaktörlere beslenecek piroliz gazı miktarı optimize edilmiş, en yüksek etanol üretimi 5 g/L olarak 5 ve 10 mL piroliz gazı beslemesinde gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyokömür, piroliz, sentezgaz fermentasyonu, biyoetanol, anaerobik karışık kültür, ısı ön işlem

1 Giriş

Birçok ülkede görülen nüfus artışı ve artan sanayileşme ile birlikte, dünyadaki enerji talebi de büyük oranda artmıştır. Ortaya çıkan bu enerji talebi öncelikle petrol rezervleri ile karşılanmaktadır ancak bu kaynakların da tükeneceği öngörülmektedir. Fosil yakıtların işlenmesi ve kullanılması, çevre ve insan sağlığına zararlı olan toksik ve zehirli gazların salınmasına yol açmaktadır. Küresel ısınmaya ilişkin artan kaygı, araştırmacıları sürdürülebilir, güvenli ve yenilenebilir yakıtlar aramaya yöneltmiştir [1]. Özellikle ulaşım sektöründe fosil yakıtların yerine kullanılacak, alternatif, temiz ve çevre dostu yakıt kaynaklarının önemi her geçen gün artmaktadır [2]. Fosil yakıtlara alternatif arayışında en büyük ilgiyi mikrobiyal temelli prosesler ve selülozik biyokütle kaynakları çekmektedir[3]. Etanol, alternatif biyoyakıtlar arasında uygulama açısından en yaygın olan yakıttır. Yakıt etanol; oksijenli, su içermeyen, yüksek oktanlı (108) bir alkol olmasından dolayı benzine potansiyel bir alternatif olarak

Abstract

In recent years, the production of bioethanol from synthesis gas offers a common solution to the increasing levels of air pollution and the need for renewable energy sources. Synthesis gas is the combination of gases such as CO, CO₂, N₂, H₂, NO_x, which can form air pollution and can be used in the production of bioethanol by metabolizing these gases by Clostridium species. Bioethanol is one of the most important biofuels because of the advantage of direct use by blending with gasoline. Pyrolysis and biochar production is an important alternative to expensive pretreatment methods used in waste and lignocellulosic raw materials in bioethanol production. In this study the wastes were converted into biochar by pyrolysis and the waste gas is collected to produce bioethanol which is an integrated and energy intensive approach. The use of mixed culture in the production of ethanol from pyrolysis gas instead of pure Clostridium species is also important in terms of reducing costs. In this study, by using the the waste gas released during biochar production from fruit and vegetable wastes ethanol produced by syngas fermentation using heat pre treated mixed culture. While the positive effect of heat pretreatment was observed in the mixed culture, the amount of pyrolysis gas to be fed to the reactors was optimized and the highest ethanol production was observed in 5 and 10 mL pyrolysis gas feedings as 5 g / L.

Keywords: Biochar, pyrolysis, syngas fermentation, bioethanol, anaerobic mixed culture, heat pre-treatment,

bilinmektedir [4]. Günümüzde etanol, %10,%15, %20 veya %85 oranlarında benzin ile karıştırılarak kullanılabilir (E10, E15, E20 ve E85). Yakıt olarak etanolün kullanılması CO, CO₂, Uçucu organik bileşikler (VOC) ve NO_x gibi zararlı gaz emisyonlarının da %5-10 arasında düşmesini sağlamaktadır. Biyoetanol, günümüzde yaygın olarak şeker, nişasta veya lignoselülozik atıklardan üretilmektedir. Etanol üretim proseslerinin en yaygını olan direkt fermentasyonda şeker bazlı mahsuller (örneğin pancar, sorgum ve kamış) veya nişasta bazlı bitkiler(örneğin mısır, buğday, arpa ve patates) mayalar veya bakteriler tarafından etanole dönüştürülür [5]. Bu teknoloji endüstriyel düzeyde iyi bir şekilde kurulmuş durumdadır ve şu anda dünyada biyoetanol üretiminin yaklaşık % 90'ı, birinci nesil teknoloji olarak da bilinen bu yöntemle gerçekleştirilmektedir. Ancak bu bitkiler gıda maddesi olarak insanlar tarafından yaygın olarak tüketilmektedir ve hayvancılık açısından da oldukça önemli kaynaklardır. Son yıllarda bu kaynakların hektar arazi başına verimliliklerinin düşük olduğu vurgulanarak etanol üretim

teknolojisinin kullanılmasının uygunluğu sorgulanmaktadır. Bu nedenle birinci nesil teknolojilerin yerini ikinci nesil teknolojiler (dolaylı fermentasyon) almaya başlamıştır. İkinci nesil teknolojide tarımsal atıklar veya belediye atıkları gibi lignoselülozik kaynaklar uygun ön işlem uygulaması sonrasında etanol üretimi için kullanılmaktadır. Lignoselülozik atıklar selüloz (% 40-50), hemiselüloz (% 20-40) ve lignin (% 10-40) olmak üzere üç ana bileşenden oluşan ve doğada en bol bulunan biyokütle kaynaklarıdır [1]. Ancak lignoselülozik atıklar sağlam selülozik çeperlerinden dolayı bakteri ve mayalar tarafından direk kullanılamayacağından dolayı kimyasal veya enzimatik olarak basit şekerlerle hidrolize edilmeleri gerekmektedir[5]. Kompleks organik atıklardan biyoetanol üretimi hemiselüloz ve ligninlerin basit şekere indirgenmesi sonucu gerçekleşmektedir. Uygulanması gereken ön işlemler biyolojik, fiziksel ve kimyasal olarak üç ana başlık altında toplanabilir[6-7]. Biyolojik ön işlemler kahverengi veya beyaz mantarlar tarafından salgılanan enzimler ile gerçekleşir. Fiziksel ön işlemler ısı ön işlem, mekanik parçalama ve sıcak su muamelesi, kimyasal ön işlemler ise asidik ve bazik çözümler ile muamele ile gerçekleşmektedir[8]. Hidrotermal karbonizasyon ve piroliz işlemleri ise son yıllarda uygulanmaya başlayan yenilikçi ön işlemlerdir[9].

Termokimyasal işlemler de lignoselülozik atıkların enerji ve malzemeye dönüştürülmesinde kullanılan yaygın yöntemlerdir. Termokimyasal yöntemlerden biri olan piroliz, oksijensiz ortamda biyokütlenin ısı olarak (~400 °C-500°C) bozundurma işlemidir. Piroliz yöntemiyle katı (biyokömür), sıvı (biyoyağ) ve gaz olmak üzere üç farklı ürün elde edilmektedir. Ürün verimi ve özelliklerini piroliz koşullarının yani sıra biyokütle tipi de büyük ölçüde etkilemektedir. Literatürde biyoyağ ve biyokömür elde etme amacıyla tarımsal, ormansal ve hayvansal atıklar, kuru yapraklar, kentsel katı atıklar, çekirdek öğütme atıklar, gibi bir çok biyokütlenin pirolizi çalışılmıştır [10]. Biyokömür genellikle pirolizle elde edilen ve karbonca zengin katı malzemedir. Biyokütle gibi biyokömürün de doğrudan yakılarak yada gazlaştırma gibi termokimyasal işlemler sonucunda enerjiye dönüştürülmesi mümkündür. Biyokütleyle göre biyokömür düşük nem içeriği, homojen olması yüksek karbon ve enerji içeriği, kolay öğütülebilmesi gibi özellikleri sayesinde depolama ve kullanım bakımından avantaj sağlamaktadır. Bunun dışında toprak iyileştirici, katalizör, elektrot, enerji ve karbondioksit depolamada kullanımı için önemli çalışmalar yapılmaktadır [11]. Biyoyağ ise koyu renkli viskoz bir sıvıdır ve organik asit, alkol, alifatik ve aromatik hidrokarbon, fenol, keton gibi yüzden fazla organik bileşiği içermektedir. Biyoyağ enerji üretiminde kullanıldığı gibi özel kimyasalların üretimi için bir hammadde kaynağıdır. Biyoyağın asidik yapısı, yüksek oksijen içeriği, viskoz ve çabuk bozulabilir olması sebebiyle biyoyağın zeolit ile parçalama, hidrojenasyon gibi işlemlerle yakıt olarak kalitesinin iyileştirilmesi gerekmektedir [12]. Piroliz gazı ise çoğunlukla CO₂ ve CO, az miktarda C1-C5 hidrokarbon ve H₂ içeren piroliz işlemi yan ürünüdür. İçeriğindeki yüksek karbon oksit içeriği sebebiyle düşük bir kalori değerine sahip olsa da piroliz gazı genellikle sistemin ön ısıtılmasında kullanılmaktadır.

Lignoselülozik atıkların kullanımında ön işlem yöntemlerine son yıllarda yenilikçi bir yaklaşım getirilmiştir. Biyokütlenin öncelikle pirolizi ile açığa çıkan CO içerikli gaz karışımının kullanıldığı sentezgaz fermentasyonu işlemi oldukça son yıllarda oldukça önem kazanmış olan araştırma konuları arasındadır[13].

Sentezgaz fermentasyonu sürdürülebilir yakıt ve kimyasal üretimi için kullanılabilir çevre dostu teknolojiler arasındadır. CO, CO₂ ve CH₄ gazları atmosfere salındıklarında sera gazı emisyonlarını artırarak hava kalitesini düşürürler. Bu gazlar çelik endüstrisi, yağ rafinerileri, kömür ve doğal gaz kullanan endüstrilerde açığa çıkabilirler veya sentez gaz olarak (CO/CO₂/CH₄/H₂/N₂) karışımları biyokütle veya evsel ve tarımsal atıkların yakılması sonucu atmosfere salınabilir. Ototrofik asetojenik, karboksidotrofik ve metanotrofik bakteriler bu karbon kaynaklarını alternatif yakıtlara çevirebilme özelliğine sahip bakterilerdir[14]. Wood-Ljungdahlii yolağı ile hava kalitesini düşüren bu atık gazlar değerli kimyasallara ve etanol, bütanol gibi yakıtlara dönüştürülerek sera gazı emisyonlarının düşürülmesine katkıda bulunabilirler[15].

Anaerobik koşullarda gerçekleşen Wood-Ljungdahlii yolağı asetojenlerde CO fiksasyonu için kullanılabilmektedir[16]. Toksik bir gaz olan CO'ı karbon kaynağı olarak kullanabilen başlıca mikroorganizmalar; *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ragsdalei* 'dir[17].

Bu bakteri gruplarının kullanıldığı biyoproses uygulamalarına bakıldığında mikrobiyal fermentasyonun metal-katalizör tabanlı yaklaşımlara nazaran daha avantajlı oldukları görülmektedir. Katalitik gaz dönüşümleri yerine anaerobik gaz fermentasyonu uygulama açısından daha sürdürülebilir ve ekonomiktir[18].

Gaz fermentasyonu konusunda literatürde yer alan çalışmaların çoğu saf kültürlerin tek başlarına kullanımına yöneliktir. Sülfat indirgeyici bakterilerin, metanojenik arkeaların ve homoasetojenik bakterilerin H₂/CO₂ ve CO'yu fermente ederek etanol üretimini gerçekleştirdikleri bilinmektedir. Bu türlerden iki veya daha fazlasının birlikte kullanıldığı karışık kültürler ile de biyoetanol üretimi üzerine çalışmalar mevcuttur ancak anaerobik parçalanma reaktörlerinden alınan ve tüm bu bakteri gruplarını içerdiği bilinen anaerobik karışık konsorsiyum ile gaz atıklarından biyoetanol üretimi üzerine çalışma literatürde oldukça sınırlı sayıdadır.

Bu çalışma kapsamında piroliz ile biyokömür üretimi ve gaz fermentasyonu ile biyoetanol üretim sistemleri birleştirilerek entegre bir biyoyakıt üretimi gerçekleştirilmiştir. Gaz fermentasyonda kullanılacak anaerobik karışık konsorsiyuma uygulanan ısı ön işleminin proses verimlerine etkisi incelenmiştir.

2 Materyal ve Metot

2.1 Anaerobik karışık konsorsiyum ve ortam kompozisyonu

Anaerobik karışık konsorsiyum Türkiye'de faaliyet göstermekte olan bir enerji tesisinin anaerobik biyoreaktöründen alınmıştır. Karışık konsorsiyum 105°C'de 10 dakika otoklavda (HİRAYAMA 110L) ısı muameleye tabi tutulmuştur. Çalışma boyunca ısı muamele görmüş ve görmemiş olarak iki tip konsorsiyum kullanılmıştır. Modifiye edilmiş bazal ortam kompozisyonu; (1L için) ; 0.9 g NaCl, 0.4 g MgCl₂.6H₂O, 0.75 g KH₂PO₄, 1.5 g K₂HPO₄, 0.5 g maya ekstraktı, 0.0025 g FeCl₃.6H₂O, 20 g bakteriyel pepton, 0.1 g MnCl₂.4H₂O, 0.006 g H₃BO₃, 0.19 g CoCl₂.2H₂O, 0.002 g CuCl₂.2H₂O, 0.024 g NiCl₂.6H₂O, NaMoO₄.2.H₂O, 0.75 g sistein-HCl şeklindedir [19].

2.2 Biyoetanol üretiminde kullanılan reaktör düzenekleri

Biyoetanol üretiminde 100 mL hacimli koyu renkli cam serum şişeleri kesikli reaktör olarak kullanılmıştır. İnokulum olarak ısıl ön işlem görmüş ve görmemiş olmak üzere iki grup anaerobik konsorsiyum kullanılmıştır. Reaktörlerde inokulum hacmi hepsinde eşit şekilde 40 mL olarak belirlenmiştir. 10 kat derişik olarak hazırlanan bazal ortam ilavesi ile çalışma hacmi 50 mL olarak ayarlanmıştır. İnokulum pH değeri 9 olduğundan reaktörlerin başlangıç pH değerleri 0.1 M HCl çözeltisi ile 5.5'e düşürülmüştür. Reaktörler 5 mL, 10 mL ve 20 mL hacminde gaz karışımları ilave edildikten sonra ağızları kauçuk tıpayla kapatılıp aliminyum yüzük ile sıkıştırılmıştır. Reaktörler gaz kaçağını önlemek amacıyla ters bir şekilde 37°C'de 110 rpm çalkalamalı inkübatörde tutulmuştur.

2.3 Piroлиз işlemi

Piroлиз denemeleri laboratuvar tipi sabit yatak piroлиз reaktöründe (V =1 L) gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 50 g kurutulmuş meyve sebze atığı yüklenen reaktör dikey fırına yerleştirilmiştir. Reaktör çıkışı su buz banyosuyla soğutulan tuzaklara bağlandıktan sonra reaktör 10 °C /dk. ısıtma hızıyla 400 °C kadar ısıtılmış ve bu sıcaklıkta 1 saat bekletilmiştir. Piroлиз deneyleri sırasında ortamdan oksijeni uzaklaştırmak amacı ile 200 °C'ye kadar sistemden azot gazı geçirilmiştir. 200 °C sonra azot gazı kesilerek piroлиз kendi ürettiği gaz ortamında gerçekleştirilmiştir. Piroлиз sırasında oluşan uçucu bozunma ürünleri buz-su ile soğutulan tuzaklardan geçirilip sıvı ürün yoğunlaştırılmıştır. Etanol üretimi için kullanılacak olan gazlar ise azot gazının kesildiği andan itibaren "Tedlar bag" içinde toplanmıştır. Piroлиз sonunda reaktörde kalan piroлиз katı bakiyesi (biyokömür) ve tuzaklarda biriken sıvı ürün tartılarak yüzdesel verimleri hesaplanmıştır.

2.4 Analitik yöntemler

Reaktörlerde etanol konsantrasyonlarına uçucu yağ asidi metodu ile bakılmıştır. Gaz Kromatografisi (GC) (6890N Agilent Technologies Network GC System) Flame Ionization Detektörü (FID) ve HP-FFAP 30mx0.25 mm kapiller kolon (Thermosience) ile tespit edilen alkoller etanol ve bütanol, uçucu yağ asitleri; asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit, izobütirik asit, izovalerik asit, valerik asit, kapriyonik asit, izokapriyonik asit, heptanoik asittir. Kullanılan metotta; kolon başlangıç sıcaklığı olan 40 °C'de 3 dakika bekledikten sonra 20 °C /dak. artışlarla, 60 °C 'ye çıkarılmıştır ve 3 dakika beklemeden sonra, 30 °C /dak artışlarla 120 °C'de 4 dakika bekletilerek sonra sıcaklık noktası olan 240 °C'ye 30 °C /dak artışlarla ulaşılmış ve 240 °C'de 6 dakika bekletilmiştir. İnlet (enjektör) ve detektör sıcaklıkları, 240 °C olarak ayarlanmıştır. Helyum sabit 103 kPa'da taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. Kalibrasyon için yüksek saflıkta GC standart çözeltileri (DR. EHRENSTORFER GmbH) kullanılmıştır. Gaz kromatografisinde etanol miktarının tayini için örnekler haftada bir 1.5 mL hacimde alınmıştır. Örnekler 10000 rpm'd 15 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant 0.22 µm 'lık şırınga filtresinden süzülerek temiz viallere aktarılmıştır. Tepe gazında gaz içeriklerine denemenin son günü bakılmıştır. GC (6890N Agilent Technologies Network GC System) Termal Kondüktivite Detektörü (TCD) ile ve Hayesep D 80/ 100 dolgulu kolon (ALLTECH) kullanılmıştır. Etanolün alıkonma zamanı 2. dakika asetik asitin alıkonma zamadı 10. dakika olarak kabirle edilmiştir. Tayin limiti standart karışım çözelti ile 10 ppm tespit limitleri ise uygun seyreltme ile 1 ppm olarak belirlenmiştir. Kalibrasyonlarda R2 değerleri 0.999 olarak elde edilmiştir. Örnek kalibrasyon kromatogramı destekleyici materyal dosyasında verilmiştir. Gaz ölçümü için kullanılan GC metodunda, inlet (enjektör), detektör ve kolon sıcaklıkları

sırası ile 120 °C , 140 °C, ve 35 °C'dir ve argon 20 mL/dak akım debisi ile taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. Yüksek saflıkta hidrojen, metan ve karbondioksit (% 30 H₂, % 30 CH₄ ve % 30 CO₂) içeren gaz karışımı GC'nin gaz kalibrasyonu için kullanılmıştır.

Piroлиз gazlarının kantitatif analizi ise Agilent 7890B model gaz kromatografisi olan Rafineri Gaz Analizörü (RGA) cihazı ile yapılmıştır. RGA sistemi 5 valf, 7 kolon ve 3 detektörden oluşmaktadır. Referans gaz olarak He kullanılan alev iyonizasyon dedektörde (FID) C1'den C5 kadar olan hidrokarbonlar analiz edilmiştir. Referans gazı He olan birinci termal iletkenlik dedektörde (TCD1) ise gaz üründeki CO₂, CO, O₂ ve N₂ analizlenmiştir. Referans gazı N₂ olan ikinci termal iletkenlik dedektörde (TCD2) ise sadece H₂ tespit edilmiştir. Metot olarak RGA cihazında uygulanan standart metot kullanılmıştır [20] Gaz ürün içeriğinin kantitatif içeriğinin analizi için kalibrasyon gaz karışımı (Agilent) standart olarak kullanılmıştır.

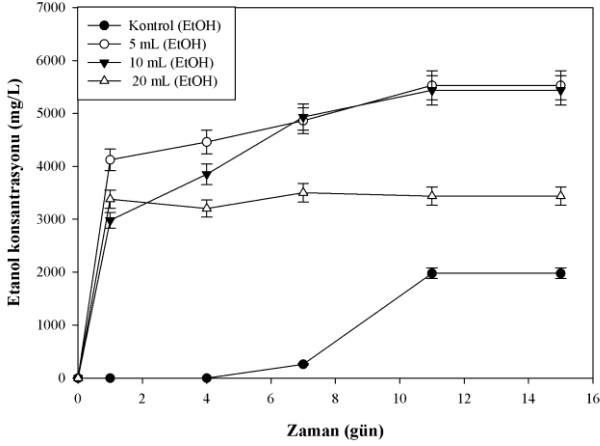
3 Bulgular

Piroлиз işlemi sonucu kurutulmuş meyve sebze atıklarından % 31,2 biyokömür, %39,7 sıvı ve yan ürün olarak % 39,1 gaz ürün elde edilmiştir. Ürün dağılımı literatürde farklı tipte biyokütelerin yavaş piroлиз ile elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Mohan vd.[21] genel olarak biyokütlenin yavaş piroлиз sonucu yaklaşık 30% sıvı, %35 katı ve %35 gaz ürün elde edileceğini belirtmiştir. Biswas vd. [22] sabit yataklı reaktörde ve 400°C-450 °C sıcaklıklarda mısır koçanı, buğday samani, pirinç samani, pirinç kabuğu gibi farklı biyokütelerin piroлизini gerçekleştirmiştir. Elde edilen biyokömür, sıvı (biyoyağ ve su fazı) ve gaz verimleri sırası ile %24-%35, %28-%47 ve %27-%38 olarak bulunmuştur.

Elde edilen piroлиз gazı % 55,0 CO₂, %12,3 CO, %10,9 CH₄, %4,8 C₂-C₅ %0,9 H₂ ve % 9,8 N₂ gazı içermektedir. N₂ içeriği reaktördeki havanın uzaklaştırılması için kullanılan N₂'tan kaynaklanmaktadır. Piroлиз sırasında hemiselüloz ve selülozun dekarboksilasyonu sonucu oluşan CO₂, gaz ürün içeriğinin yarısından fazlasını oluşturmaktadır. CO gazı, düşük sıcaklıklarda dekarbonilasyon reaksiyonları ve daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen biyoyağın ikincil parçalanması ile oluşmaktadır [23]. CH₄ ve C₂-C₅ hidrokarbonların önemli miktarı, yüksek sıcaklıkta ve bekleme süresince ikincil reaksiyonların sonucu biyoyağların parçalanmasından kaynaklanmaktadır. H₂ gazı ise, oluşan biyokömürün dehidrojenasyon reaksiyonu ile aromatik yapıya dönüşümünün başlaması ile düşük bir miktarda elde edilmiştir[24].

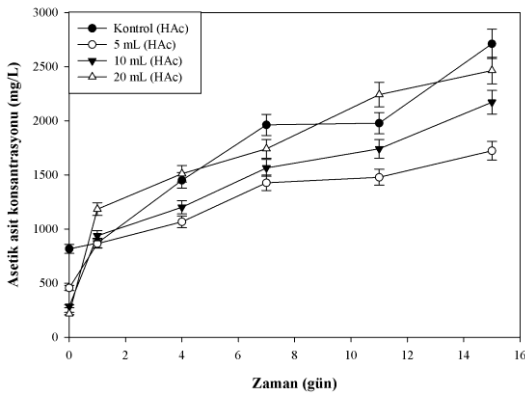
Etanol ve asetik asit üretim değerleri

Sentez gazdan etanol üretiminde görev alan Wood-Ljungdahlii yolizine göre aktif olarak görev alacak olan mikroorganizmalar asetojenik bakteri grubudur. Biyogaz üretim tesisinden alınan karışık kültürlerde baskın olan metanojenik bakterilerin ortamdan uzaklaştırılması için çeşitli ön işlemler uygulanmaktadır [25-27]. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan ve daha önce yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlara göre en ekonomik olanı otoklavda basınç altında ısıl işlem uygulanmasıdır. ısıl işlem uygulamasının ardından metan üreten türlerin baskılandığı ve ortamdan uzaklaştırıldığı sporlu bir tür olan *Clostridium* grubu bakterilerin ise baskın hale geçtiği grubumuz tarafından yayınlanan çalışmalarda görülmüştür [28].



Şekil 1: Isıl ön işlem uygulanmış karışık kültür ile etanol üretimi

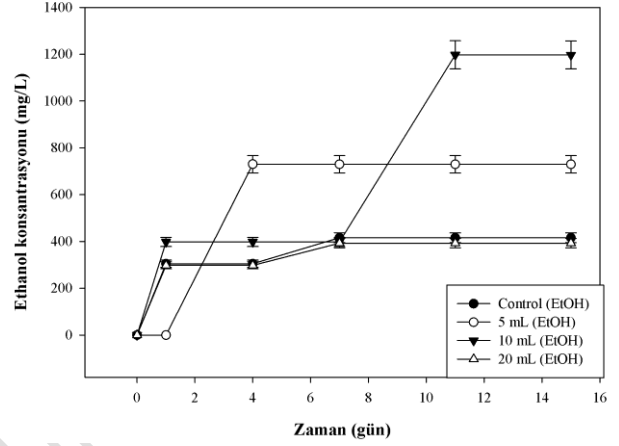
Isıl ön işlem ile baskın hale getirilen *Clostridium* türleri hazırlanan bazal ortam kompozisyonu ile sentezgazdan biyoetanol üretimine yönlendirilmiştir. Buna göre farklı sentez gaz beslenen reaktörlerde hızlı bir şekilde etanol üretiminin başladığı gözlenmiştir. 5 mL, 10 mL ve 20 mL hacminde sentezgazın anaerobikleştirilmiş kesikli reaktörlere beslenmesi sonucunda etanol üretiminin hızlı bir şekilde başladığı gözlenmiştir. Tüm reaktörlerde birinci günden itibaren etanol üretimi gözlenmiştir. 5 mL gaz beslemesi ile birinci günde 4 g/L etanol üretimi gözlenmiş ve 15 gün sonunda etanol üretim değeri toplam 5.5 g/L değerine ulaşmıştır. 10 mL sentezgaz beslenen reaktörlerde etanol üretimi daha yavaş bir şekilde gerçekleşmiştir. Birinci günde 2.8 g/L üretim gözlenirken 15 gün sonunda 5.4 g/L etanol üretim değerine ulaşmıştır. 20 mL sentezgaz beslemesi ile üretimler daha düşük değerlerde kalarak maksimum 3.1 g/L üretim gözlenmiştir. Buna göre artan sentez gaz miktarının toksik etkisi nedeniyle üretimlerin düştüğü sonucuna varılmıştır. Kontrol reaktöründe ise sentez gaz beslemesi olmaksızın anaerobik koşullarda 10. günden itibaren etanol üretimi gözlenmeye başlanmıştır. Bu üretimin ölüm fazına geçmiş bakterilerin besin kaynağı olarak kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 1).



Şekil 2: Isıl ön işlem görmüş reaktörlerde asetik asit üretimi

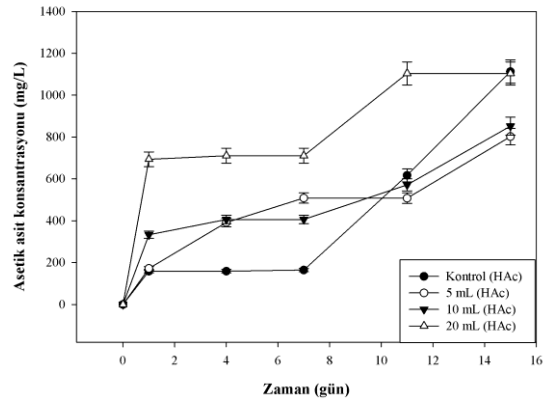
Wood-Ljugdahli yolizinde etanol üretiminde önemli olan bir diğer faktör asetik asit üretimidir. Üretimin asetojenik bakteriler tarafından gerçekleştirilmesinden kaynaklanan bu durum etanol üretiminde takip edilmeli özellikle sürekli

reaktör sistemlerinde pH ayarları ile kontrol altında tutulmalıdır. Kullanılan yolizine göre asetik asit asetojenik bakteriler tarafından tekrar çevrime katılarak etanole dönüştürülebilmektedir. Isıl ön işlem görmüş reaktörlerde asetik asit üretimi en fazla 20 mL sentezgaz beslemesi yapılan reaktörde görülmüştür. 2.4 g/L değerlerine ulaşan asetik asit üretimi 10 mL ve 5 mL sentezgaz beslemelerinde sırasıyla 1.8 ve 1.6 g/L değerlerine ulaşmıştır. pH değerlerinin artması sonucunda artan asetik asit üretimi sürekli sistemlerde pH kontrol sistemleri ile etanol üretimine yönlendirilebilmektedir (Şekil 2).



Şekil 3: Isıl ön işlemsiz karışık kültür ile etanol üretimi

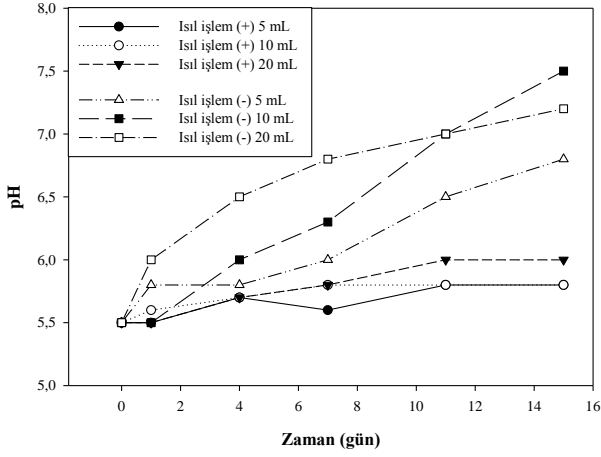
Isıl ön işlem görmemiş karışık kültür *Metanobakterler*, *Arkea* türleri ve *Clostridium* türlerini içermektedir. Bu türlerde aktif olan türlere bağlı olarak metabolit üretimleri gözlenmektedir. Isıl ön işlem görmemiş karışık kültüre 5 mL, 10 mL ve 20 mL sentezgaz beslemesi yapılması sonucunda en yüksek etanol üretimi 1.2 g/L olarak gözlenmiştir. 5 mL sentezgaz beslemesi ile 0.7 g/L etanol üretimi, 20 mL sentezgaz beslemesi ile ise 0.4 g/L etanol üretimleri gözlenmiştir. Karışık kültürde var olan türlerin yarışmaları sonucu üretimin yavaşlaması ve hatta durmasından dolayı etanol üretiminde karışık kültür kullanımında ısıl ön işlem gereklidir (Şekil 3).



Şekil 4: Isıl ön işlemsiz reaktörlerde asetik asit üretimi

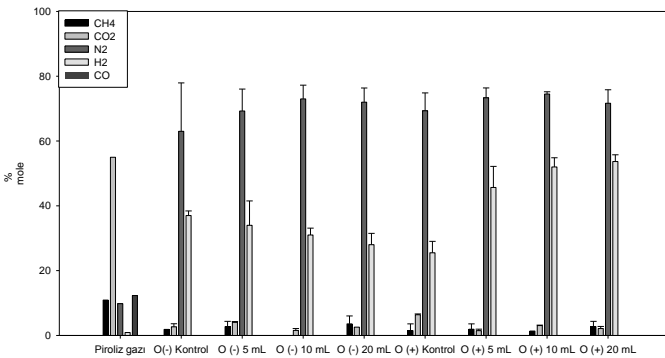
Isıl ön işlem uygulanmamış olan reaktörlerde asetojenik türlerin baskın olmaması dolayısıyla daha düşük asetik asit üretim değerleri gözlenmiştir. 20 mL sentezgaz beslemesi ile 1.2 g/L, 5 mL ve 10 mL sentezgaz beslemeleri sonucunda ise yaklaşık 0.7 g/L asetik asit üretim değerleri gözlenmiştir.

Kontrol reaktöründe etanol üretimi 6. günden itibaren hızla yükselişe geçmiş ve 1.2 g/L değerine ulaşmıştır ve bu değer artmaya devam ettiği gözlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 5: Tüm reaktörlerde pH değişimleri

Etanol üretiminde Wood-Ljungdahlii yolizinde önemli faktörlerden biri de pH değerleridir. Tüm reaktörlerde pH başlangıç değerleri 5.5 olarak ayarlanmış ve etanol üretim değerleri ile birlikte pH kontrolleri yapılmıştır. Isıl işlem görmüş ve 5 mL sentezgaz beslemesi yapılmış reaktörlerde pH değerlerinin 5.5-5.8 arasında değiştiği gözlenmiştir. 10 mL sentezgaz beslemesi yapılan reaktörde pH değeri 5.8'e kadar yükselmiş, 20 mL sentezgaz beslemesi yapılan reaktörde ise 6 değerine kadar artış gözlenmiştir. Isıl ön işlem uygulanmamış reaktörlerde pH değerleri uçucu yağ asitlerinin üretiminin artması nedeniyle artış göstermiştir. 5 mL, 10 mL ve 20 mL sentezgaz beslemelerinde pH değerleri sırasıyla 6.8, 7.5 ve 7.2 değerlerine yükselmiştir. Etanol üretimi için en uygun pH aralığının 4.5-6.0 arasında olmasından dolayı ısıl ön işlem görmemiş reaktörlerde yüksek pH değerlerinden dolayı daha düşük etanol üretimleri gözlenmiştir (Şekil 5).



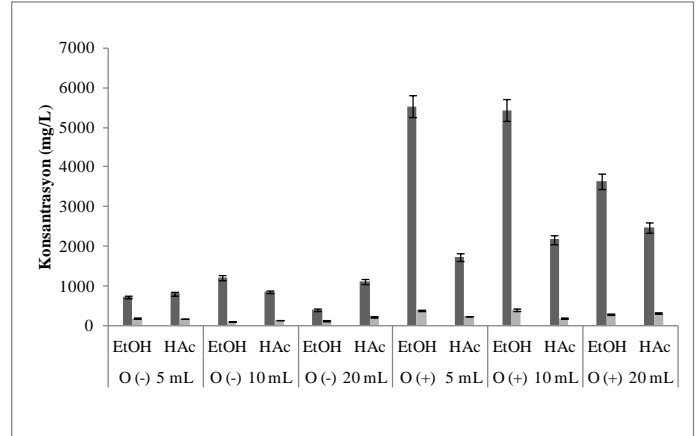
Şekil 6: Reaktörlerde tep gazı kompozisyonları (O(-): Isıl ön işlemsiz; O (+) Isıl ön işlemlili)

Meyve sebze atıklarının pirolizi sonucunda elde edilen sentez gazının içeriği ile etanol üretimi sonucunda tep gazlarının kompozisyonları Şekil 6'da yer almaktadır. Şekil 6'da görüldüğü üzere başlangıçta piroliz gazında var olan CO içeriğinin tüm reaktörlerde tükendiği görülmektedir. CO₂ içerikleri de tüm reaktörlerde büyük oranda tüketilmiştir. En düşük CO₂ içerikleri ısıl ön işlemlili reaktörlerde 5 ve 10 mL

sentez gaz beslemelerinde gözlenmiştir. Tüm reaktörlerde üretim sonrasında yüksek oranlarda N₂ yüzdesi ise tüketilen CO₂ ve CO düşmesi sonucu gözlenmiştir. Karışık kültürde baskın hale geçen *Clostridium* türlerinin, sentez gaz içeriklerindeki CO ve CO₂'nin tüketilmesinin ardından metabolik yolizini kültürde ölüm fazına geçen bakterilerin substrat olarak işlev görmesi sonucunda H₂ üretimine kaydırıldığı gözlenmektedir. Isıl ön işlem görmüş karışık kültürün kullanıldığı reaktörlerde tep gazlarına H₂ içerikleri ısıl ön işlemsizlere göre daha fazladır. Bu durum *Clostridium* türlerinin baskın hale geçmesinden kaynaklanmaktadır.

4 Tartışma

Wood Ljungdahlii yolağında en önemli son ürünler etanol ve asetatır. Prosesin etanol veya asetata yönlendirmesinde enzimler çok önemli rol oynamaktadır. Bu enzimlerin aktif bölgesinde bulunan enzim ko-faktörlerinin içeriğindeki elementler de proses verimlerini etkileyen önemli parametrelerdir[26]. Metabolik yol izine göre asetat üretimi ATP ile dengelenir etanol üretiminde ise ATP harcanır. Bu durum biyomasın büyümesini engeller. Bu nedenle asetat üretimi ve etanol üretimi arasında çok iyi bir denge kurularak proses verimleri artırılmalıdır. CO karbon kaynağı olarak kullanılabilir ve ürün üretimi açısından spesifik nütrientlere ihtiyaç vardır. Se, Fe, Ni, Zn, Cu, W, Mo ve Mn CO fiksasyonunda ve etanol/asetat sentezinde önemli metaloenzim parçalarıdır. Bu elementlerin konsantrasyonları yüksek üretim verimleri için optimize edilmelidir[27]. Yüksek etanol üretim verimleri yüksek mikroorganizma konsantrasyonu ile sağlanacağından, düşük konsantrasyonlu saf kültür yerine farklı kültürlerin bir arada bulunduğu karışık kültürlerin kullanımı oldukça avantajlıdır.



Şekil 7: Tüm sonuçların karşılaştırılması (O (-): Isıl ön işlemsiz; O(+): Isıl ön işlemlili)

Sentez gazdan biyoetanol üretiminde saf kültür kullanımı çok yaygın olmasına rağmen asetojenik bakterilerin bulunduğu karışık kültürün kullanılması önemli bir alternatiftir. Karışık kültürün saf kültürlerle göre en önemli avantajı sterilizasyona gerek olmaması, ucuz yöntemlerle temin edilebilmesi ve devamlılığının olabilmesidir. Farklı saf kültür türlerinin biraraya kontrollü bir şekilde getirilmesi ile de karışık kültürler oluşturulabilmektedir. Anaerobik karışık kültürün kullanılmasında en önemli dezavantaj ise asetojenik bakterilerin baskın hale getirilmesinde kullanılacak olan ön işlem yöntem maliyetleridir. Karışık kültür ile biyohidrojen üretiminde yaygın biçimde ön işlem çalışmaları mevcuttur ve bu çalışmalarda genel olarak en uygun ön işlem yönteminin ısıl ön işlem olduğu görülmüştür[28].

Bu çalışma kapsamında anerobik karışık kültüre otoklavlama ile ısı ön işlem uygulanarak asetojenik bakteriler baskın hale getirilmiştir. Ön işlem uygulanmasının yanısıra sentezgaz miktarının da optimizasyonunu sağlamak amacıyla 5 mL, 10 mL ve 20 mL miktarlarda sentezgaz reaktör tepegazlarına beslenmiştir. Isıl ön işlemin etanol üretimine etkisini görmek amacıyla aynı reaktörler bir de ön işlemsiz anaerobik karışık konsorsiyum ile işletilmiştir. Şekil 7'de yer alan sonuçlara bakıldığında ısı ön işlemin olumlu etkisi görülmektedir. Farklı hacimlerde sentezgaz beslemesi sonucunda ısı ön işlem uygulanmış reaktörlerde daha yüksek etanol üretimleri gözlenmiştir. Isıl ön işlem uygulamasında en yüksek etanol üretimleri 5 ml ve 10 mL besleme sentezgaz miktarlarında gözlenirken 20 mL beslenen reaktörde üretimin düştüğü gözlenmiştir. Sentez gaz içeriklerinin toksik etkisini kazın kaynaklanan bu durum sonucunda optimum gaz besleme değeri 5 ve 10 mL olarak belirlenmiştir. Ölçek büyütme operasyonlarında hava kirliliği ile mücadele açısından daha fazla sentezgazin kullanılabilmesi adına bu çalışmada optimum gaz miktarı 10 mL olarak belirlenmiştir.

Dünya'da en yaygın biçimde kullanılan temiz enerji kaynağı olan biyoetanol genellikle maya temelli fermentasyon ile mısırdan üretilmektedir. Nişasta ve şeker bazlı fermentasyon dünya üzerindeki üretimin %90'ını oluşturmaktadır [18]. Ancak gıda kaynaklarının enerji kaynağı olarak kullanılması konusundaki tartışmalar ikinci nesil etanol üretimini cazip hale getirmiştir. İkinci nesil etanol üretiminde son yılların popüler alternatifi ise sentezgaz fermentasyonudur[29]. Biyokütlenin termokimyasal-biyokimyasal yöntemlerle biyoyakıtta dönüştürülme işlemi bir gıda kaynağının kullanılmasına gerek olmaması avantajının yanısıra sakkarifikasyon-fermentasyon proseslerine göre daha yüksek verimle çalışmaktadır [30]. Sentez gaz fermentasyonu çoğunlukla saf kültür ve ko-kültür çalışmaları ile mezofilik koşullarda sentezgazin uçucu yağ asitlerine (asetat-bütirat-kaproat) ve alkollere (etanol-bütanol-hekzanol) dönüştürülmesi şeklinde gerçekleşmektedir. En yaygın biçimde kullanılan bakteri türleri *Clostridium Carboxydivarans* ve *Clostridium Lungdahlii*'dir [31]. Cheng et al. [32] tarafından yapılan bir çalışmada *C. carboxydivarans*'a metabolik mühendislik ile yapılan müdahaleler sonucunda %20 CO₂-%40 CO-%40 H₂ konsantrasyonlarında sentez gaz karışımından en yüksek 3 g/L etanol üretimi gözlenmiştir [32]. %60 CO, %35 H₂ ve %5 CO₂ kompozisyonunda sentezgaz karışımı ile *Clostridium Ljugdahlii*'nin kullanıldığı iki fazlı sürekli sistemle yapılan başka bir çalışmada ise 13.1 g/L asetat ve 10.5 g/L etanol üretimi gerçekleşmiştir [33]. Buna göre sürekli reaktör sistemlerinin kullanılması ve sentezgaz karışımında CO oranının artırılması ile çalışmamızda elde edilen 6 g/L etanol konsantrasyon değeri artırılabilirliği görülmektedir. *Alkalibaculum bacchi* ve *Clostridium porpionicum* ile hazırlanan ko-kültür fermentasyonunda %20 CO, %15 CO₂, %5 H₂ ve %60 N₂ oranlarında sentezgaz karışımından 8 g/L etanol üretimi gözlenmiştir [2]. Bu çalışmada kullanılan sentezgaz içeriği de bu çalışma ile benzerlik göstermektedir ve karışık kültür ile yaklaşık 6 g/L etanol üretim değerleri elde edilmiştir.

Saf kültür veya ko-kültür çalışmalarında yüksek işletme maliyetleri, suşların dejenerasyonu ve sürekli kontaminasyon risklerinden dolayı, sentezgaz fermentasyonunda karışık kültür kullanılması oldukça önemli ve ekonomik bir alternatif olacaktır[29].

Shen et al. [34] tarafından yapılan çalışmada mezofilik anaerobik çürütücülerden alınan karışık kültüre metanojenlerin inhibisyonu için 10 mmol Bromoetanosülfonat eklenmiş ve hollow fiber membran reaktöründe % 60 H₂ ve %40 CO kompozisyonunda sentezgazdan 4.22 g/L asetat üretimi gözlenmiştir. Uçucu yağ asidi üretiminin amaçlandığı çalışmada yapılan filogenetik analizler sonucunda karışık kültür içerisinde % 41.6 oranında *Clostridium* türlerinin bulunduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada kullanılan inokulumda ısı ön işlem sonrası yapılan analizler baskın türlerin *Clostridium* türleri olduğunu göstermiştir.[30]

Clostridium carboxydivarans P7 suşu ile yapılan bir optimizasyon çalışmasında ise kullanılan iz elementlerin önemi vurgulanmıştır. Kullanılan ortamda varolan Ni, Co, Cu, Zn ve Fe konsantrasyonlarının artırılması ile etanol/CO veriminde %47'den %89'a artış gözlenmiştir. Mezofilik koşullarda yapılan çalışmada etanol konsantrasyonları ortam kompozisyonuna bağlı olarak 1.67-4.37 g/L arasında değişiklik göstermiştir[31]. Buna göre bu çalışma kapsamında karışık kültür kullanmanın bir diğer önemli avantajı iz element kullanılmasına gerek olmaması veya daha düşük konsantrasyonların yeterli olması şeklinde gösterilmiştir.

Anaerobik granül çamurun kullanıldığı başka bir çalışmada saf CO beslemesi sonucunda tam kontrollü sürekli sistemde pH değeri 6.2 ile 4.9 arasında değiştirilerek etanol üretimi gözlenmiştir. Çalışmada ön işlem olarak ön pasajlama ve CO üzerinde büyütme yöntemleri kullanılması fermentasyon süresinin uzamasına neden olmuştur. İlk 7 gün boyunca baskılama yapılmadığından metan üretimi gözlenmiş, 7 gün sonundan Bromoetanosülfonat eklenerek metan üretimi baskılanmıştır. Etanol üretimi 21. günde başlamıştır. Isıl ön işlem uygulanmış anaerobik kültür ile yaptığımız çalışmamızda mikroorganizmaların alışma süreleri kısalmış ve ilk günden itibaren etanol üretimleri gözlenmiştir. Charobarty et al. [36] tarafından yapılan çalışmada saf CO ile 11.1 g/L etanol üretimi gözlenirken bu çalışmada %12 CO konsantrasyonunda daha kısa sürede yaklaşık 6 g/L etanol üretimleri gözlenmiştir.

Phillips et al [3] tarafından yapılan başka bir çalışmada kesikli reaktörlerde saf kültür olan *Clostridium autoethanoganum* kullanılarak prosesin birinci gününden itibaren etanol üretimi başlamış ve 3 g/L değerine kadar ulaşmıştır.

Sentez gaz fermentasyonunda önemli proses parametrelerinden bir diğeri de pH kontrolüdür [37]. Çoğu *Clostridium* türlerinin optimum pH aralığı 5.5-7.5 arasındadır. pH 7 civarından tutulan çalışmalarda aynı zamanda uçucu yağ asitleri oluşumu gözlenirken pH 5 ve altı değerlerde alkol üretimi hızlanmaktadır. pH değerinin etkisi asit şokları yani pH değerlerindeki ani değişimin hücrelerdeki proton değişim potansiyelini zayıflatması şeklinde kendini gösterir. Oluşan bu stres ortamı bakterinin hayatta kalmasını zorlaştırır [38].

Biyoproseslerin tümünde olduğu gibi sentezgaz fermentasyonunda da reaktör tipi oldukça büyük önem taşımaktadır. Literatürde yaygın olarak kullanılan reaktör tipleri sürekli karıştırılmalı tank reaktörler ve membran reaktörlerdir. Kesikli reaktörlerde yapılan çalışmalara göre etanol üretim verimlerinin artırılması sürekli modda işletilen reaktörler ile mümkündür [38].

Karışık kültürün kullanılabilirliği uygun bir sürekli reaktör tipi bu çalışma kapsamında elde edilen etanol üretim verimi değerlerini artıracaktır. Sürekli karıştırılmalı tank reaktörlerde maliyetlerin artmasına neden olan karıştırma işlemi yüksek

gaz-sıvı kütle transferi ve artan etanol verimleri ile kompanse edilir[39]. Karışık kültürün hızlı biyofilm oluşturma kapasitesi ise kullanılacak membran reaktörlerde verimin artmasını sağlayacak bir etken olacaktır [40]. Karışık kültür sistemlerinin kullanılmasının saf kültür sistemlerine göre bir diğer avantajı ise uzayan reaksiyon süreleridir. Farklı *Clostridium* türleri ile yapılan çalışmalarda kesikli reaktör sistemleri ile 250 saatte etanol üretiminin durduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada 384 saate kadar uzayan fermentasyon süreleri gözlenmiştir [41-42].

5 Sonuçlar

Meyve sebze atıkları özellikle ülkemizde çok fazla açığa çıkan ve değerlendirilmesi gereken organik içerikleri yüksek atıklardır. Meyve-sebze atıklarının piroliziyle biyokömür üretimi önemli bir yenilenebilir enerji kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Piroliz işlemi sırasında açığa çıkan gazın içeriği CO, CO₂, N₂, vb içeren atık piroliz gazı hava kirliliği oluşturan sanayi gazları ile benzerlik göstermektedir. Sentez gaz adı verilen bu gaz özellikle demir çelik endüstrisi ve eksik yanma prosesleri sonucunda açığa çıkmaktadır. Sentez gaz fermentasyonu ile CO ve CO₂ gazları temiz bir enerji kaynağı olan biyoetanolle dönüştürülmektedir. Biyoetanol tüm dünyada yaygın biçimde kullanılan önemli bir temiz enerji kaynağıdır. Sentez gaz fermentasyonu ile etanol üretimi ise son yılların önemli konusu arasında yer almaktadır. Literatürde yer alan çoğu çalışma saf *Clostridium* türleri ile gerçekleştirilmiştir. Anaerobik karışık kültür kullanılması sterilizasyon gibi maliyetli bir basamağı atlamasından dolayı oldukça avantajlıdır. Anaerobik karışık kültürün sentez gaz fermentasyonunda kullanılmasında en önemli avantaj ise metanojen bakterilerinin inhibe edilmesi ve sporlu türler olan *Clostridium* türlerinin konsorsiyumda baskın hale getirilmesidir. Bunun için kullanılan en yaygın metod ise ısı ön işlemidir. Bu çalışma kapsamında sentez gaz fermentasyonunda karışık kültür kullanılması ile saf kültürle etanol üretimine ekonomik bir alternatif getirilmiştir. Isıl ön işlem ile maksimum 6 g/L konsantrasyonunda biyoetanol üretimi gözlenmiştir. Bu çalışma biyokömür ve biyoetanol üretimini birarada gerçekleştiren ve bu sayede meyve sebze atık bertarafına oldukça ekonomik bir çözüm getirmiştir.

6 Teşekkür

7 Kaynaklar

- [1] Dürre P, Eikmanns BJ. "C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation". *Current Opinion in Biotechnology*, 35, 63–72, 2015.
- [2] Liu K, Atiyeh HK, Stevenson BS, Tanner RS, Wilkins MR, Huhnke RL. "Continuous syngas fermentation for the production of ethanol, n-propanol and n-butanol". *Bioresource Technology*, 151, 69–77, 2014.
- [3] Phillips JR, Huhnke RL, Atiyeh HK. "Syngas fermentation: A microbial conversion process of gaseous substrates to various products". *Fermentation*, 3(2), 28, 2017.
- [4] Advanced Biofuels USA "Syngas Fermentation - The Third Pathway for Cellulosic Ethanol". Advanced Biofuels USA.org

<https://advancedbiofuelsusa.info/tag/syngas-fermentation/>. 07.08.2019.

- [5] Adıgüzel OA. "Lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimi için kullanılan ön-muamele ve hidroliz yöntemleri". *Sakarya University Journal of Science*, 17(3), 381–397, 2013.
- [6] Kumar R, Wyman CE. "Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies" *Biotechnology Progress* 25(2), 302-314, 2009
- [7] Rocha MVP, Rodrigues YHS, De MacEdo GR, Gonçalves LRB. "Enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated cashew apple bagasse with alkali and diluted sulfuric acid for bioethanol production" *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 155 (1-3): 104-114, 2009.
- [8] Mosier N, Hendrickson R, Ho N, Sedlak M, Ladisch MR. "Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover" *Bioresource Technology* 96 (18), 1986-1993. 2015.
- [9] Devarapalli M, Atiyeh HK. "A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation" *Biofuel Research Journal*, 2, 268–280, 2015
- [10] Uddin MN, Techato K, Taweekun J, Rahman M. "An overview of recent developments in biomass pyrolysis technologies". *Energies*, 11 (11), 1-24, 2018.
- [11] Liu W, Jiang H, Yu H. "Development of biochar-based functional materials: toward a sustainable platform carbon material". *Chemical Reviews*, 115, 12251-12285, 2015.
- [12] Duman G, Pala M, Ucar S, Yanik J. "Two-step pyrolysis of safflower oil cake". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 103, 352–361, 2013.
- [13] Zheng Y, J. Zhao, F. Xu, Y. Li. "Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production". *Progress in Energy and Combustion Science*, 42 (1), 35–53, 2014.
- [14] Lennartsson PR, Erlandsson P, Taherzadeh MJ. "Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products". *Bioresource Technology*, 165, 3–8, 2014.
- [15] Jack J, Lo J, Maness PC, Ren RJ. "Directing Clostridium ljungdahlii fermentation products via hydrogen to carbon monoxide ratio in syngas" *Biomass and Bioenergy*. 124,95–101,2019.
- [16] Oelgeschläger E, Rother M. "Carbon monoxide-dependent energy metabolism in anaerobic bacteria and archaea". *Archives of Microbiology*, 190 (3), 257–269, 2008.
- [17] Abubackar HN, Veiga MC, Kennes C. "Biological conversion of carbon monoxide: Rich syngas or waste gases to bioethanol". *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 5 (1). 93–114, 2011.
- [18] Abubackar HN, Veiga MC, Kennes C. "Biological conversion of carbon monoxide to ethanol: Effect of pH, gas pressure, reducing agent and yeast extract". *Bioresource Technology*, 114, 518–522, 2012.
- [19] Abubackar HN, Veiga MC, Kennes C. "Carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum* in a bioreactor with no accumulation of acetic acid". *Bioresource Technology*, 186, 122–127, 2015.

- [20] <https://www.agilent.com/en/products/gas-chromatography/gc-analyzers/energy-chemical/refinery-gas-analyzers#literature>
- [21] Mohan D, Pittman CU, Steele PH. "Pyrolysis of wood / biomass for bio-oil: A critical review". *Energy and Fuels*, 4, 848–889, 2006.
- [22] Biswas B, Pandey N, Bisht Y, Singh R, Kumar J, Bhaskar T. "Pyrolysis of agricultural biomass residues: Comparative study of corn cob , wheat straw , rice straw and rice husk". *Bioresource Technology*, 237, 57–63, 2017.
- [23] Neves D, Thunman H, Matos A, Tarelho A, Gómez-barea A. "Characterization and prediction of biomass pyrolysis products". *Progress in Energy Combustion Science*, 37(5), 611–630, 2011.
- [24] Widyawati M, Church TL, Florin NH, Harris AT. "Hydrogen synthesis from biomass pyrolysis with in situ carbon dioxide capture using calcium oxide". *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (8), 4800–4813, 2011.
- [25] Abubackar HN, Keskin T, Arslan K, Eroglu D, Ozdemir G, Azbar N. "Effects of size and autoclavation of fruit and vegetable wastes on biohydrogen production by dark dry anaerobic fermentation under mesophilic condition". *International Journal of Hydrogen Energy*, 44 (33), 17767–17780, 2019.
- [26] Fernández-Naveira A , Abubackar HN, Veiga MC, Kennes C. "Carbon monoxide bioconversion to butanol-ethanol by *Clostridium carboxidivorans*: kinetics and toxicity of alcohols". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (9), 4231–4240, 2016.
- [27] Van Groenestijn JW, Abubackar HN, Veiga MC, Kennes C. *Air Pollution Prevention and Control: Bioreactors and Bioenergy*, West Sussex, United Kingdom, "Bioethanol" Wiley 431–463, 2013.
- [28] Keskin T, Arslan K, Nalakath Abubackar H, Azbar N. *Biohydrogen 2-Biomass, Biofuels, Biochemicals*, Cambridge, United States, "Biohydrogen Production from Solid Wastes" ELSEVIER, 321-346, 2019.
- [29] Orgill JJ, Atiyeh HK, Devarapalli M, Phillips JR, Lewis RS, Huhnke RL. "A comparison of mass transfer coefficients between trickle-bed, Hollow fiber membrane and stirred tank reactors". *Bioresource Technology*, 133, 340–346, 2013.
- [30] Sierra R, Smith A, Granda C, Holtzapfle MT. "Producing fuels and chemicals from lignocellulosic biomass". *Chemical Engineering Progress*, 104 (8), 10-18, 2008.
- [31] Shen S, Gu Y, Chai C, Jiang W, Zhuang Y, Wang Y. "Enhanced alcohol titre and ratio in carbon monoxide-rich off-gas fermentation of *Clostridium carboxidivorans* through combination of trace metals optimization with variable-temperature cultivation". *Bioresource Technology*, 239, 236-343, 2017.
- [32] Cheng C, Bao T, Yang ST. "Engineering *Clostridium* for improved solvent production: recent progress and perspective". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103 (14), 5549–5566, 2019.
- [33] Martin ME, Richter H, Saha S, Angenent LT. "Traits of selected *Clostridium* strains for syngas fermentation to ethanol". *Biotechnology and Bioengineering*, 113 (3) 531-539, 2016.
- [34] Shen Y, Brown R, Wen Z. "Enhancing mass transfer and ethanol production in syngas fermentation of *Clostridium carboxidivorans* P7 through a monolithic biofilm reactor". *Applied Energy*, 136, 68–76, 2014.
- [35] Shen Y, Brown R, Wen Z. "Syngas fermentation of *Clostridium carboxidivorans* P7 in a hollow fiber membrane biofilm reactor: Evaluating the mass transfer coefficient and ethanol production performance". *Biochemical Engineering Journal*, 85, 21–29, 2014.
- [36] Chakraborty S , Rene ER, Lens PNL, Veiga MC, Kennes C. "Enrichment of a solventogenic anaerobic sludge converting carbon monoxide and syngas into acids and alcohols". *Bioresource Technology*, 272,130-136, 2019.
- [37] Abubackar HN, Bengelsdorf FR, Dürre P, Veiga MC, Kennes C. "Improved operating strategy for continuous fermentation of carbon monoxide to fuel-ethanol by *clostridia*". *Applied Energy*, 169, 210–217, 2016.
- [38] Asimakopoulos K, Gavala HN, Skiadas IV. "Reactor systems for syngas fermentation processes: A review". *Chemical Engineering Journal*, 348, 732–744, 2018.
- [39] Bredwell MD, Worden RM. "Mass-transfer properties of microbubbles. 1.Experimental studies". *Biotechnology Progress*, 14, 31–38, 1998.
- [40] Klasson KT, Ackerson MD, Clausen EC, Gaddy JL. "Bioreactors for synthesis gas fermentations". *Resource Conservation and Recycling*, 5 (2), 145–165, 2003.
- [41] Xie BT, Liu ZY, Tian L, Li FL, Chen XH. "Physiological response of *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 of ethanol production under different fermentation conditions". *Bioresource Technology*, 177, 302–307, 2015.
- [42] Jack J, Lo J, Maness PC, Ren ZJ. "Directing *Clostridium ljungdahlii* fermentation products via hydrogen to carbon monoxide ratio in syngas". *Biomass and Bioenergy*, 124, 95–101, 2019.