



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AEROBİK DİNAMİK BESLEMELİ SİSTEMLERDE
FARKLI DÖNGÜ SÜRELERİNİN PHB ÜRETİM
VERİMİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

ŞEBNEM ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOMÜHENDİSLİK VE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2012

**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AEROBİK DİNAMİK BESLEMELİ SİSTEMLERDE
FARKLI DÖNGÜ SÜRELERİNİN PHB ÜRETİM
VERİMİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

ŞEBNEM ÖZDEMİR

**Bu tez,
Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
derecesi için hazırlanmıştır.**

KAHRAMANMARAŞ 2011

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Şebnem ÖZDEMİR tarafından hazırlanan “Aerobik Dinamik Beslemeli Aktif Çamurun Farklı Döngü Sürelerinde PHB Depolama Yeteneğinin Değerlendirilmesi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 26/07/2011 tarihinde oy birliği ile Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özer ÇINAR (DANIŞMAN)

Çevre Mühendisliği, KSÜ

Yrd. Doç. Dr. Kevser CIRIK (II.DANIŞMAN)

Çevre Mühendisliği, KSÜ

Prof. Dr. Metin DIĞRAK (ÜYE)

Biyoloji, KSÜ

Doç. Dr. Hanifi BİNİCİ (ÜYE)

İnşaat Mühendisliği, KSÜ

Doç. Dr. Ümit ALVER (ÜYE)

Fizik, KSÜ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. M. Hakkı ALMA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Şebnem ÖZDEMİR

Bu çalışma K.Maraş Sütçü İmam Üniversitesi Lisansüstü Tez Projesi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2011/4-5YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

AEROBİK DİNAMİK BESLEMELİ AKTİF ÇAMURUN FARKLI DÖNGÜ SÜRELERİNDE PHB DEPOLAMA YETENEĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Plastikler günlük yaşantımızda önemli bir yer tutar. Fakat biyolojik olarak parçalanamayan bu plastikleri uzaklaştırma yöntemleri çevrede tehdit unsuru oluşturmaktadır. Bu nedenle biyolojik olarak parçalanan plastıklere olan ilgi artmıştır. Biyoplastik yenilebilir kaynaklardan sentezlenen plastiklerin bir formudur. Biyoplastikler polihidroksialkanat (PHA) olarak adlandırılır. Polihidroksibütirat (PHB) en yaygın bilinen PHA çeşididir. PHB'ler biyolojik olarak parçalanma özelliklerinden dolayı petrokimyasal plastıklere alternatif olarak üretilen ve mikrobiyal hücrelerde karbon/enerji kaynağı olarak depolanan polimerlerdir. Fakat ticari olarak üretilen PHB polimerindeki ana problem pahalı karbon kaynağı ve saf kültür kullanımının sağladığı yüksek üretim maliyetidir. Bundan dolayı, araştırmacılar optimum işletim parametresini belirleyerek düşük üretim maliyeti elde edebilmek için PHB üretim verimini arttırmayı hedeflemişlerdir. Bu yüzden bu çalışmada farklı döngü sürelerinin PHB üretim verimine etkisi araştırılmıştır.

Aktif çamur, sırasıyla harici substratın uygulandığı (bolluk) ve uygulanmadığı (kıtık) aerobik koşullara maruz bırakıldığında, mikroorganizmalar önemli miktarlarda PHA depolamaktadırlar. Bu proses “aerobik dinamik besleme” ya da “bolluk kıtlık” olarak adlandırılmaktadır. Bu şartlar yüksek ve kararlı kapasitede PHA üreten mikroorganizmaların zenginleştirilmesine olanak sağlar ve saf kültürden PHA üretimi ile ekonomik olarak rekabet edebilir. Basit ve daha az ekipman ile daha az yatırım ve işletim maliyeti gerektirmesi aerobik dinamik beslemeli sistemlerin avantajları arasında yer almaktadır.

Bu çalışmanın amacı karışık kültürden PHB üreten mikroorganizmaların zenginleştirilmesi için en etkin döngü süresinin araştırılmasıdır (12 sa, 8 sa, 4 sa, 2 sa). Farklı döngü sürelerinin mikroorganizmaların PHB depolama verimine olan etkileri aerobik dinamik beslemeli sistem kullanılarak araştırıldı. Çalışma bulgularına göre, polimer depolama verimi döngü süresi ile ters orantılı olarak azalmıştır (%16- 54 aralığında). Maksimum PHB içeriği 2 saatlik döngü süresinde %54,7 olarak elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Polihidroksibütirat, aerobik dinamik besleme, döngü süresi, asetat

EVALUATION OF PHB ACCUMULATION ABILITY OF AEROBIC DYNAMIC FEEDING ACTIVATED SLUDGE UNDER DIFFERENT CYCLE TIME

SUMMARY

Plastics have been an integral part of our life. However, disposal of these non-biodegradable plastics poses a threat to our environment. Thus, much interest has been gained in developing biodegradable plastics. Bioplastic is defined as a form of plastic synthesized from renewable resources. Bioplastics are made from a compound called polyhydroxyalkanoate (PHA). PHA of which polyhydroxybutyrate (PHB) is the most common. PHBs are polymers that accumulate as carbon/energy in microbial cells and provide an alternative to petrochemical plastic because of their biodegradability properties. However, a major problem in commercialised PHB is the high production cost due to expensive carbon substrates and tedious production procedures using pure cultures. Therefore, researchers aimed to increase the production efficiency for lower production costs by determining the optimum operating parameters. Thus in this study, the effect of different cycle times in the production efficiency have been explored.

PHA storage by activated sludge under fully aerobic conditions can be a particularly important process, if the sludge is submitted to consecutive periods of external substrate accessibility (feast) and unavailability (famine). This process is currently known as “aerobic dynamic feeding” (ADF) or “feast and famine”. These conditions allow for the selection of an enriched culture with a high and stable capacity of PHA production and can be economically competitive with PHA production from pure cultures and it has the advantages of being simpler and requiring less investment and operating costs.

The scope of this study was to investigate the most efficient cycle time for the enrichment of an efficient PHB-producing mixed culture. The effect of different cycle times (2 h, 4 h, 8 h, 12 h) on the PHB accumulation yield was investigated by an aerobic dynamic feeding system. According to our results, the polymer storage yield decreased (range 16-54%) inversely with cycle time. The maximum PHB content was obtained as 54.7% in the conditions with a cycle time of 2h.

Key words: Polyhydroxybutyrate, aerobic dynamic feeding, cycle time, acetate

TEŐEKKÖRLER

Tez alıŐmı boyunca bilgi ve deneyimleriyle danıŐmanlıđını yÖrÖten ve maddi manevi desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Do. Dr. Özer INAR ve Yrd. Do. Dr. Kevser CIRIK'a sonsuz teŐekkÖr ederim. Grup toplantılarında yaptıkları yorum ve yönlendirmeleriyle tezimin olgunlaŐmasına katkı sağlayan Doç. Dr. Mustafa DOLAZ, Yrd.Doç. Dr. Yađmur UYSAL ve Yrd. Doç. Dr. Yakup CUCİ'ye teŐekkÖr ederim.

Tez çalıŐmalarımın yÖrÖtÖlmesinde bana laboratuvar imkanı sağlayan Kahramanmaraş SÖtü İmam Öniversitesi evre MÖhendisliđi bÖlÖmÖne ve CNR Research Gruba teŐekkÖr ederim. Tez çalışmalarında desteğini esirgemeyen sevgili arkadaŐım Dilek AYDOğMUŞ'a teŐekkÖr ederim

Öđrenim hayatım boyunca gÖsterdikleri maddi manevi her tÖrlÖ destekleri ve fedakarlıkları için anneme, babama,ablama ve kardeŐime en içten teŐekkÖrlerimi sunarım.

Şebnem ÖZDEMİR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
SUMMARY.....	ii
TEŞEKKÜRLER.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Biyoplastiklerin Tanımı ve Genel Özellikleri.....	4
2.2. Polihidroksialkanatlar (PHA).....	5
2.2.1. PHA çeşitleri.....	7
2.3. PHB'nin Keşfi ve Tarihi Gelişimi.....	8
2.3.1. PHB'nin kimyasal yapısı ve genel özellikleri.....	9
2.3.2. PHB'nin oluşum şartları ve tayini.....	12
2.3.3. PHB biyosentezi.....	13
2.3.4. PHB biyoparçalanma reaksiyonları.....	14
2.3.5. PHB'nin yenilenebilme özelliği.....	17
2.3.6. PHB'nin parçalanabilme özelliği.....	17
2.3.7. PHB üretiminde maliyetin önemi.....	19
2.4. Farklı PHA Üretim Sistemleri.....	21
2.4.1. Anaerobik-aerobik sistemler.....	21
2.4.1.1. Comeau-Wentzel modeli.....	22
2.4.1.2. Mino modeli.....	23
2.4.2. Mikroaerofilik-aerobik sistem.....	24
2.4.3. Aerobik Dinamik Beslemeli (ADB) sistemler (bolluk-açlık Sistemi).....	25
2.4.3.1. ADB sistemlerde PHB üretimini etkileyen parametreler.....	27
2.4.3.1.1.Çözünmüş oksijen.....	27
2.4.3.1.2. pH.....	28
2.4.3.1.3. Substratın türü.....	28

2.4.3.1.4. Çamur yaşı.....	30
2.4.3.1.5. C/N oranı.....	31
2.4.3.2. ADB sistemlerde farklı döngü sürelerinin PHB üretim verimine etkisi.....	32
3. MATERYAL VE METOT.....	33
3.1. Deneysel Plan.....	33
3.2. Simüle Atık su.....	35
3.3. Analitik Metotlar.....	35
3.3.1. Askıda katı madde tayini (AKM).....	36
3.3.2. Toplam organik karbon (TOK) analizi.....	37
3.3.3. Toplam Azot (TN) tayini.....	37
3.3.4. PHB ekstraksiyonu.....	37
3.3.5. PHB analizi.....	38
3.4. Hesaplamalar.....	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	40
4.1. Farklı Döngü Sürelerinin TOK Giderim Verimine Etkisi.....	40
4.2. Farklı Döngü Sürelerinin ÇO Profiline Etkisi.....	42
4.3. Farklı Döngü Sürelerinin ORP Profiline Etkisi.....	44
4.4. Farklı Döngü Sürelerinin PHB Depolama Verimine Etkisi.....	46
4.5. Farklı Döngü Sürelerinde Elde Edilen Çalışma Bulgularına Genel Bir Bakış.....	47
5. SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. PHA'ların genel yapısı.....	7
Şekil 2.2. PHB granüllerinin SEM görüntüsü.....	8
Şekil 2.3. PHB'nin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.4. Hücrenin içindeki PHB görüntüleri.....	10
Şekil 2.5. PHB 'nin sentez reaksiyonları.....	13
Şekil 2.6. PHB parçalanma reaksiyonları.....	15
Şekil 2.7. PHB'nin karbon döngüsü.....	17
Şekil 2.8. Comeau-Wentzel modeli ile fosfor giderim ve PHB üretim metabolizması.....	23
Şekil 2.9. Mino modeli ile fosfor giderim ve PHB üretim metabolizması.....	24
Şekil 2.10. Aerobik dinamik besleme prosesinde PHB üretim metabolizması.....	26
Şekil 3.1. Çalışmanın deneysel planı.....	33
Şekil 4.1. Farklı döngü sürelerinin TOK giderim verimine etkisi.....	42
Şekil 4.2. Farklı döngü sürelerinin ÇO profiline etkisi.....	44
Şekil 4.3. Farklı döngü sürelerinin ORP profiline etkisi.....	45
Şekil 4.4. Farklı döngü sürelerinin PHB depolama verimine etkisi.....	47
Şekil 4.5. Farklı döngü sürelerinde elde edilen çalışma bulgularına genel bir bakış.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Değişik Kriterlere Göre Mikrobiyal Biyoplastiklerin Sınıflandırılması.....	15
Çizelge 2.2. PHB ve petrol kökenli polipropilen (PP)'nin bazı fiziksel özelliklerinin karşılaştırılması.....	20
Çizelge 2.3. PHA üretim maliyetine substratın etkisi.....	23
Çizelge 3.1: Simüle atık suyu içeriği.....	46
Çizelge 4.1. Farklı döngü sürelerinde gözlemlenen açlık-tokluk süreleri.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKM	Askıda katı madde
AKR	Ardışık kesikli reaktör
ATP	Adenozin trifosfat
ÇO	Çözünmüş oksijen
DA	Dalton
GAO	Glikoz akümüle eden mikroorganizmalar
GC	Gaz kromatografisi
KOİ	Kimyasal oksijen ihtiyacı
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
ORP	Yükseltgenme indirgenme potansiyeli
P(3HB-3HV)	Poli(3-hidroksibütirat-3-hidroksivalerat)
PAO	Fosfat akümüle eden mikroorganizma
PHA	Polihidroksialkanat
PHB	Polihidroksibütirat
PHV	Polihidroksi valerat
SRT	Çamur yaşı
TN	Toplam azot
TOK	Toplam organik karbon

1. GİRİŞ

İnsanoğlunun yaşadığı ekolojik sorunların ve özellikle de çevre sorunlarının temel nedenlerinden birisi de hızlı nüfus artışıdır. Nüfusun hızla artışı, büyük miktarlarda geri dönüştürülemeyen atık materyal birikimine sebep olmaktadır (Yıldız ve ark., 2000). Çevre kirliliğinde özellikle katı atıkların önemli yeri vardır. Katı atıklar, anorganik ve organik kökenli olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Anorganik kökenli grup içinde yer alan demir, çinko, kurşun, alüminyum, cam, seramik gibi maddelerin geri kazanımı uzun yıllardan beri gerçekleştirilmektedir. Organik kökenli gruptaki plastik atıklar ise günümüzün önemli sorunlarından (Luengo ve ark., 2003).

Plastikler; ekonomiklikleri, uygulama kolaylıkları ve özelliklerinin her geçen gün geliştirilmeleri nedeniyle kullanım alanlarını ve miktarlarını giderek arttırmaktadırlar. Elektrikli ev aletlerinde, otomobil sektöründe, mutfak eşyası, park ve bahçe alanlarında, gıda malzemesi ambalajı, kozmetik, temizlik malzemesi, tarım ürünleri, tekstil, konfeksiyon ambalajı ve sağlık alanında plastiğe dayalı araç gereç kullanımı ile günlük yaşantımızın her alanında plastikler ile karşılaşmaktadır (Ren, 1998). Plastik ürünler, kanıtlanmış pek çok dezavantajlarına rağmen; kolay şekil alma, nakliyede rahatlık ve ucuzluk gibi nedenlerden dolayı tercih edilen malzemeler olmuşlardır. Ancak plastiğin kullanılıp atılabilme özelliği, çevre kirliliği açısından, büyük sorunlardan biri haline gelmiştir (Yılmaz ve ark., 2003).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan petrol türevli plastikler, kullanımlarından sonra fonksiyonunu kaybetmekte, 'plastik atık' olarak çevreye atıldıklarında yüzlerce yıl doğada parçalanamadıklarından çevre kirlenmesine neden olmaktadır. Atık plastikler genellikle diğer evsel atıklarla birlikte çöp boşaltma sahalarına atılmakta veya çöp çukurlarına dökülmektedir. Atık boşaltma sahalarının ve çukurlarının giderek dolmasıyla alternatif yöntem arayışına girilmiştir. Bu yöntemler; yakarak yok etme, geri dönüşüm uygulama ya da biyolojik olarak parçalanabilen plastikleri üretip kullanmaktır. Petrol kökenli plastikleri yakarak yok etme iyi bir çözüm gibi görünse de, çevre ve insan sağlığını riske atan bir yöntemdir. Çünkü plastik atıklar yakılırken hidroklorik asit ve hidrojen siyanid gibi zararlı gazlar ortaya çıkmaktadır. Geri dönüşüm uygulama da uygun bir çözüm gibi görünmektedir. Ancak bu yöntemin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Atık plastiklerin tekrar kullanıma hazırlanması için toplama, ayıklama, hammadde haline getirme aşamaları maliyeti arttırmaktadır. Bunun dışında, pigment, kaplama, dolgu maddesi gibi çeşitli katkı maddelerinin varlığı maddelerin yeniden kullanılabilirliğini sınırlandırmaktadır (Khanna ve Srivastava, 2005).

Alternatif yöntemlerin giderek artan maliyetleri, çeşitli teknik sorunlar, enerji kaynaklarını koruma ve atıkları çevresel açıdan kabul edilebilir şekilde azaltma isteğiyle birleşince sentetik plastiklerin istenilen fiziksel ve kimyasal özelliklerini taşıyan petrol kökenli plastiklere alternatif, ekolojik yönden yararlı, biyolojik olarak parçalanabilen biyoplastiklerin geliştirilmesi ve kullanımı konusuna ilginin artmasını sağlamıştır (Lee 1996a; Braunegg ve ark., 1998; Amass ve ark., 1998; Muller ve ark., 2001).

Yapılan çalışmaların artırılmasıyla mikroorganizmaların, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere, stres koşullarında depoladıkları lipid granüllerinin plastik özellikte olduğu ve doğada mikroorganizmalar tarafından parçalandığı anlaşılmış, biyoplastik (PHA) olarak adlandırılan plastik madde üretimini kapsayan bir sektörün gelişmesini sağlamıştır (Braunegg ve ark., 1998).

PHA'ların doğada en yaygın ve en bilinen formu poli- β -hidroksibütirat (PHB)'dir. PHB birçok tür tarafından asimile edilebildiğinden (biyoparçalanabilir) ve bakteri de toksik etkiye neden olmadığından (biyoyumlu), diğer konvensiyonel ürünlere göre daha avantajlıdır (Steinbüchel ve Fühstenbusch 1998; Angelova ve Hunkeler 1999; Zinn ve ark., 2001; Williams ve Martin 2002). Bu avantajlarının yanında günümüzde yaygın kullanılmamasının nedeni PHA'ların üretim maliyetinin konvensiyonel plastiklerin maliyetinden yüksek olmasıdır. PHB üretiminde maliyeti düşüren önemli iki faktör, ucuz substrat ve karışık mikroorganizma kullanımıdır. Özellikle karışık mikroorganizma kullanımı, sistemde işletim kolaylığı sağlaması ve sterilizasyon gerektirmemesi üretim maliyetini düşürmektedir.

PHB çeşitli metabolik yollardan elde edilebilmektedir. Düşük maliyetle kaliteli ürün elde edilebilmesi amacıyla bu çalışmada aerobik dinamik beslemeli sistem tercih edilmiştir. Bu sistem bolluk- kıtlık prosesi olarak da adlandırılmaktadır. Pek çok mikroorganizma tarafından hücrel büyüme sınırlandıran oksijen, fosfor, azot, kükürt gibi temel besin maddelerinin yokluğunda ve aşırı karbon kaynağının varlığında PHB, karbon ve enerji kaynağı olarak üretilmekte ve depo edilmektedir (Anderson ve Dawes, 1990).

Aerobik dinamik beslemeli sistemlerde sistem performansını etkileyen parametreler: pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen, karbon kaynağı, C/N oranı ve döngü süresidir. Döngü süresi ile yapılan çalışmalarda döngü süresinin artmasıyla bolluk fazının değişmediği bunun yanında kıtlık fazının uzamasının sistem mekanizmasını olumlu yönde etkidiği görülmüştür.

Bu çalışmada aerobik dinamik besleme mekanizmasından yararlanılarak PHB üretimi gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada tam karışımli ardışık kesikli reaktör kullanılarak

aktif çamurdan alınan karışık mikroorganizma kullanılarak farklı döngü sürelerinin PHB depolanmasına olan etkisi araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Biyoplastiklerin Tanımı ve Genel Özellikleri

Biyoplastikler, değişik besin ve çevre koşulları altında gelişen mikroorganizmalar tarafından, stres koşulları altında hücre içi depo granülleri halinde biriktirilen polimerlerdir (Barnard ve Sander 1989; Madison ve Huisman 1999; Sudesh ve ark., 2000). Bunlar farklı besin ve çevre şartları altında birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir. Aerobik ve anaerobik bakteriler, fotosentetik bakteriler, arke bakteriler ve düşük organizasyonlu ökaryotları da içine alan 90 cinsten daha fazla mikroorganizma bu polyesterleri biriktirebilme ve katabolize etme yeteneğindedirler.

Biyoplastikler; nişasta kökenli plastikler, polilaktik asit plastikler, PHA kökenli plastikler, poliamid kökenli plastikler ve biyolojik etanol kökenli polietilenler şeklinde örneklendirilmektedir. Bu biyoplastikler içinde, ışık aracılığıyla parçalanabilen biyoplastikler, bakteriler tarafından parçalanabilen biyoplastikler, deponi alanlarında gün ışığı ve oksijenin eksik olması nedeniyle parçalanamayan biyoplastikler, zayıf plastik özelliğindeki biyoplastikler olmak üzere çeşitli biyoplastikler vardır. Ancak poliester kökenli biyoplastikler yani PHA, yukarıda sayılan diğer biyoplastiklere göre nemden, oksijenden, UV'den etkilenmemeleri nedeniyle ve toprakta uygun koşulları bulduğunda parçalanmaları nedeniyle oldukça avantajlıdır (Dinigüzel ve ark., 2007).

Biyoparçalanır plastikler 3 kategoriye ayrılabilirler:

- 1) Kimyasal Olarak Sentezlenen Plastikler: Enzimatik veya mikrobiyal etkiye duyarlı poliglikolik asit, polilaktik asit, poli(ϵ -caprolactone), polivinil alkol, poli(etilen oksit) kimyasal olarak sentezlenen plastiklerdir. Plastiklerin bütün özelliklerini taşımadıklarından dolayı, ticari açıdan plastiklerin yerini alacak derecede uygun değildirler.
- 2) Nişasta Bazlı Biyoparçalanır Plastikler: Nişasta, dolgu maddesi olarak kullanılmakta ve çapraz bağlarla nişasta-plastik karışımı oluşturulmaktadır (örneğin; nişasta-polietilen). Toprak mikroorganizmaları nişastayı kolaylıkla parçalayabildiğinden parçalanma süresinde önemli bir azalma meydana gelmektedir. Fakat bazı plastikler kısmen parçalanabilmektedir. Nişasta parçalandıktan sonra açığa çıkan plastikler parçalanmaya dayanıklı olup çevrede uzun bir süre kalmaktadırlar.
- 3) Polihidroksialkanatlar (PHA): Sadece bu grup %100 biyolojik olarak parçalanabilen ve çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından, azot, fosfor gibi temel besinlerin sınırlı

konsantrasyonları ile yüksek karbon konsantrasyonlarında enerji depo materyali olarak sentezlenen çeşitli hidroksialkanat polimerleridir. PHA termoplastiklere benzer özelliklere sahip olduklarından konvensiyonel plastikler yerine kullanılabilirler. PHA'lar mikroorganizmalar tarafından aerobik şartlarda karbondioksit ve suya kadar, anaerobik koşullar altında metana kadar tamamen parçalanabilmektedirler (Khanna ve Srivastava 2005).

Farklı kriterler dikkate alınarak hazırlanan bu sınıflandırmalarda yer alan polihidroksialkanatlar birçok bakteri tarafından hücre içi karbon ve enerji kaynağı olarak sentezlenen hidroksialkanat (HA) polimerleridir.

2.2. Polihidroksialkanatlar (PHA)

Biyoplastiklerin polimer yapısına sahip polimerleri olan PHA, konvensiyonel plastik potansiyeline sahip mikrobiyal olarak üretilen, doğada tamamen (%100) parçalanabilen bir polimer sınıfıdır (Findlay ve White 1983; Lafferty ve ark., 1988). PHA'ların bakterilerde, insandaki yağ veya bitkilerdeki nişasta gibi rol oynadığı bilinmektedir (Pool, 1989).

Biyoplastikler değişik kriterlere göre sınıflandırılabilir (Çizelge 2.1). Monomerlerinin içerdiği karbon atomu sayısına bağlı olarak üç büyük gruba ayrılabilir:

- C3-C5 atomu içeren kısa zincirli polihidroksialkanatlar
- C6-C14 atomu içeren orta uzunluktaki zincirli polihidroksialkanatlar
- C 14 atomundan fazla karbon atomu içeren uzun zincirli polihidroksialkanatlar (Khanna ve Srivastava, 2005).

Monomer sayısına göre; tek tip monomer içeren homopolimerik biyoplastikler ve birden fazla tip (kopolimer) monomer içeren heteropolimerik biyoplastikler olmak üzere ayrılırken; mikroorganizma tarafından polimerler olarak, tek tip ya da karışık (birden fazla) biyoplastik şeklinde gruplandırılmaktadır.

Monomerlerin kimyasal yapısına göre biyoplastikler kendi içerisinde;

- Çeşitli alifatik yağ asiti içeren biyoplastikler (doymuş, doymamış, düz ya da dallanmış monomerler)
- Aromatik yağ asiti içeren biyoplastikler, hem alifatik hem de aromatik yağ asiti çeşitlerini içeren biyoplastikler

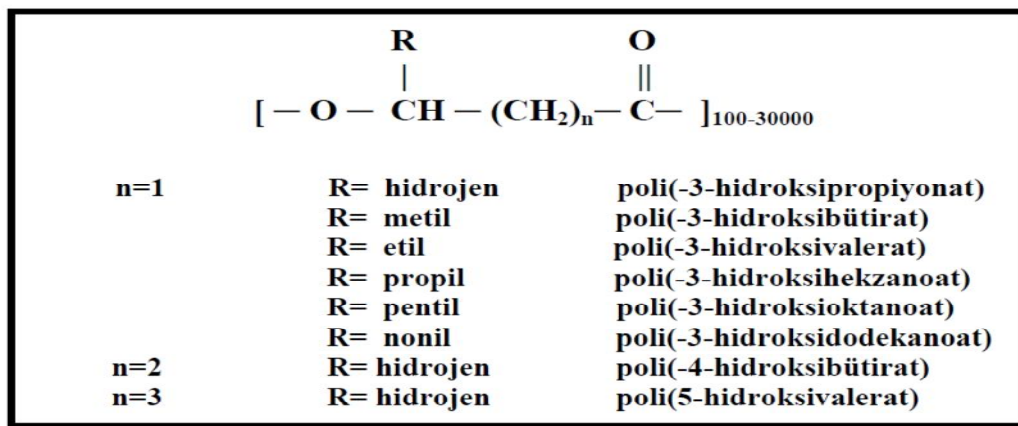
- Farklı bileşikleri içeren biyoplastikler (poli- γ -glutamik asit, poli- ϵ -L-lisin, poli- β -L-malik asit, poliglolik asit, siyanofisin vb.) olarak gruplandırılmaktadırlar (Luengo ve ark., 2003).

Çizelge 2.1. Değişik Kriterlere Göre Mikrobiyal Biyoplastiklerin Sınıflandırılması
(Luengo ve ark., 2003)

SINIF	ALT SINIF
Biyosentetik Köken	Doğal biyoplastikler: Mikroorganizmalar tarafından genel metabolitlerden üretilirler (PHB'ler ve alifatik PHA'lar)
	Yarı sentetik biyoplastikler: Mikroorganizma tarafından sentezlenemeyen bazı öncü maddelerin besiyeri yerine eklenmesine gerek vardır. (aromatik monomerler içeren PHA'lar)
	Sentetik biyoplastikler: Bunlar sadece kimyasal sentezlerle elde edilebilen doğal olanlara benzeyen polyesterlerdir (sentetik termoplastik polimerler)
Monomerlerin Kimyasal Yapısı	Alifatik yağ asiti içeren biyoplastikler: Doymuş veya doymamış (çift ya da üç bağ içeren) monomerler; düz veya dallanmış monomerler
	Aromatik yağ asiti içeren biyoplastikler
	Hem alifatik hem de aromatik yağ asitlerini içeren biyoplastikler
	Değişik plastikler içeren biyoplastikler (poli-K-glutamikasit, poli-C-L-malikasit, poliglolikasit)
Monomer Büyüklüğü	Kısa zincirli biyoplastikler (3-5 karbon atomu içeren PHA'lar)
	Orta zincir uzunluğundaki biyoplastikler (6-14 karbon atomu içeren PHA'lar)
	Uzun zincirli biyoplastikler (14 karbon atomundan fazla karbon atomu içeren PHA'lar)
Polyesterdeki Monomer İçeriği	Homopolimerik biyoplastik: Biyoplastikte tek bir monomer vardır.
	Heteropolimerik biyoplastik (kopolimer): Biyoplastikte birden fazla monomer vardır.

2.2.1. PHA çeşitleri

PHA, doğrusal, kısa zincirli β-hidroksi yağ asiti monomerleri içeren, zarla çevrili hücre içi depo materyali olup, tekrarlanan hidrofobik birimlerden meydana gelmiş uzun bir polimerdir (Findlay ve White, 1983;Lafferty ve ark., 1988;Anderson ve Dawes 1990;Slater ve ark., 1992; Madison ve Huisman, 1999; Poirier, 2002). Bunlar içinde yer alan PHB ve poli-β-hidroksivalerat (PHV), PHA' nın en yaygın formlarıdır (Sato ve ark., 1992). Polihidroksialkanatların genel yapısal formülü Şekil 2.1' de verilmiştir.



Şekil 2.1. PHA'ların Genel Yapısı (Ojumu ve ark., 2004).

R grubu, kullanılan karbon kaynağına ve bakterinin cinsine göre değişir. R grubu değiştikçe polimerin özeliği de değişir. R yan grubundaki karbon zinciri arttıkça daha düşük sıcaklıklarda eriyen yumuşak polyesterler elde edilir (Doi, 1990). Kullanılan karbon kaynağının alkil zincir uzunluğunun ve hidroksil grubunun yerinin farklı olması ya da alkil yan zincirinin çift bağ, metil dallanması, fonksiyonel grup içermesi gibi farklı kimyasal yapıda olmasıyla PHA' nın yapısı değişmektedir (Schmack ve ark., 1998; Brandl ve ark., 1988; Byrom ve ark., 1994).

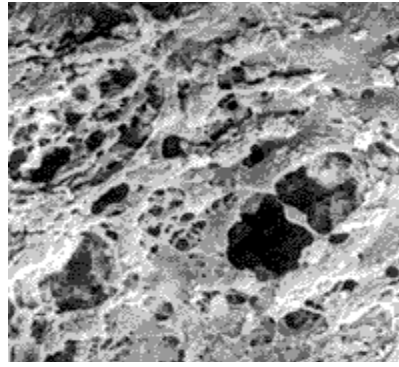
PHA'ların büyük çoğunluğu C3-C14 karbon atomu ile birlikte çeşitli doymuş veya doymamış ve düz ya da dallanmış zincir içeren alifatik ya da aromatik yan gruplar içeren R(-)-3-hidroksialkanoik asit monomerlerinden oluşmaktadır. C8-C12 monomerlerini içeren PHA'lar ise elastomer gibi davranırlar. Bu farklılık, belirli sayıda karbon atomu içeren 3-hidroksialkanatları tanıyan PHA sentazın substrat spesifikliğinden kaynaklanmaktadır (Anderson ve Dawes, 1990; Luengo ve ark., 2003). PHA'nın kısa zincir uzunluğuna sahip monomer alt birimleri üçüncü karbonun dışındaki pozisyonlarda oksidize edilirken, PHA'nın

orta zincir uzunluğuna sahip tüm monomer alt birimleri -birkaç istisnai durum dışında – üçüncü karbondaki oksidize edilirler (Ojumu ve ark., 2004).

PHA'ların çok sayıda değişik tipleri olmasına karşın en yaygın ve en geniş kapsamlı olarak çalışılan tipi PHB'dir. Bu yüzden bakteri PHA'larının fiziksel özellikleriyle ilgili birçok bilgi PHB ve P(HB-HV) ile ilgili araştırmalardan elde edilmiştir (Madison and Huisman, 1999). Mikrobiyal plastiğin hammaddesini PHB oluşturmaktadır.

2.3. PHB'nin Keşfi ve Tarihi Gelişimi

PHB'ler ve diğer PHA'lar suda çözünmeyen inklüzyonlar (yedek besin) halinde sitoplazmada depolanmaktadır. Granülleri kristalize olmayan polimer yapısındadır (Şekil 2.2). Su, polimere plastikleştirici (akışkanlaştırıcı) gibi etki etmektedir (Anderson ve Dawes, 1990).



Şekil 2.2. PHB granüllerinin SEM görüntüsü

Birçok mikrobiyolog tarafından bakterilerdeki lipofilik granüller çok önceden tanımlanmış olmalarına rağmen, ilk kez 1925'te Lemoigne tarafından bu partikülün kompozisyonu teşhis edilmiştir (Braunegg ve ark., 1998). Lemoigne, 1920'li yıllarda topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* bakterisinde bilinmeyen bir materyalin parçalanması sonucu rastlanılan 3-hidroksibütirik asit, PHB homopolyesteri olarak tanımlamıştır. Lemoigne (1926-1927) yapmış olduğu araştırmalarda *Bacillus subtilis* kültürlerini distile suda otoliz ettiği zaman bilinmeyen bir asidin oluşması ile pH değerinin azaldığını gözlemlemiştir. Daha sonraki çalışmalarda ise, monomerik β -hidroksibütirik asidin kaynağının hücre içi poli- β -hidroksibütirik asit olarak *Bacillus megaterium*'un otolizi sırasında oluştuğunu kesin olarak ortaya koymuştur. Sonraki 30 yılda PHB polimerine olan ilgi giderek artmış ve 1958 yılında Macrae ve Wilkinson *Bacillus* hücresi içinde PHB sentezi ve parçalanmasını yönlendiren hücre içi şartları ve mekanizmasını araştırmışlardır (Holmes, 1988; Anderson ve Dawes, 1990; Braunegg ve ark., 1998).

Bakteriyel biyokütleden PHB'nin kantitatif analizi için pratik yollardan birinin geliştirilmesi de bu yıllara rastlamaktadır. 1950'lerin sonuna kadar yaygın olarak kullanılan analitik teknikler gravimetrik metottur. Bu metod kloroformla PHB ekstraksiyonundan ve bunu takiben dietil eter veya aseton ile presipitasyondan oluşmaktadır (Lemoigne, 1926). Williamson and Wilkinson (1958), kontrollü zaman ve sıcaklık altında PHB granülleri dışındaki bütün hücre bileşenlerinin alkali sodyum hipoklorit çözeltisinde çözündüğünü göstermişlerdir. PHB ile ilgili araştırmalarla, termoplastik ve elastomerik bir materyal olduğu anlaşılan polimer, patentli ürünlere dönüşmüştür (Yılmaz ve ark., 2003).

Biyoparçalanabilir, termoplastik bir materyal olan PHB'nin, petrol türevli plastiklerin yerini almak için ticari olarak üretimi çalışmaları, 1960'lı yıllarda başlamıştır. PHB'nin, genellikle küre şeklinde olduğu ve granüllerin 100-800 nm çapında olup, 2-4 nm kalınlığında birim olmayan bir zarla örtüldüğü bulunmuştur (Nickerson ve ark., 1981; Encarnacion ve ark., 1995). Ancak ilk endüstriyel üretimi 1970'li yıllarda gerçekleşmiştir (Holmes, 1985).

Üretilen ilk ticari ürün BIOPOL adıyla patentleşmiştir (Lafferty ve ark., 1988). Biopol, *Alcaligenes* cinsine ait bakteriler kullanılarak endüstriyel olarak üretilmiş ilk biyodönüşümlü plastiktir. Bu materyal, doğal ve sentetik polimerlerin tüm avantajlarını taşımaktadır. Güçlü kristal yapıda olup polimer ya da monomer birimlerine bağlı olan, elastik kauçuklara benzeyen çeşitli özelliklere sahiptir.

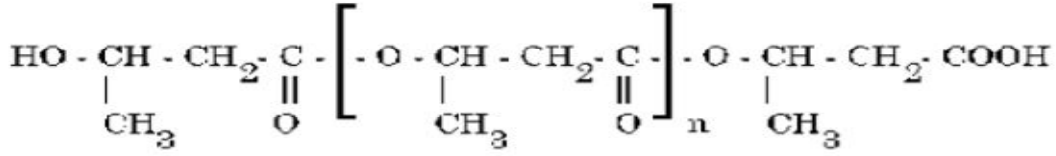
Daha sonraki yıllarda PHB ile ilgili çalışmalar *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Chromatium*, *Bacillus* vb. bakteri cinsleriyle devam etmiştir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar PHB'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri, moleküler ağırlığı, ekstraksiyon metotları, metabolizması, iç-dış parçalanması gibi çok yönlü özellikleri incelenmiştir (Anderson ve Dawes 1990; Braunegg ve ark., 1998).

2.3.1. PHB'nin kimyasal yapısı ve genel özellikleri

PHB'nin yapısı lineer 3-hidroksi yağ asit monomerlerinden oluşan bir poliesterdir. Bu polimer de, bir monomerin karboksil grubu yanındaki monomerin hidroksil grubu ile bir ester bağ oluşturur. C-3 veya β pozisyonundaki karbona bir alkil grubu (burada bir metil grubu) bağlanmıştır (Şekil 2.3). Yan zincirlerin kompozisyonu ve uzunluğundaki değişimler, termobiyoplastik polimer ailesinin çeşitliliği ve çok geniş potansiyel uygulamalarda kullanılmasının temelini oluşturmaktadır (Madison ve Huisman, 1999).

Bakteriler PHB depolama yeteneklerine göre sınıflandırılırlar. PHB'nin kopolimerleri, ek besin kullanılarak oluşabilmekte ve 3-hidroksivalerat (3HV) veya 4-hidroksibütirat (4HB)

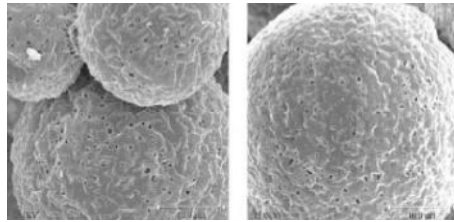
gibi monomerleri içeren polimerler ortaya çıkabilmektedir. PHB yağ asitlerinden veya başka alifatik karbon kaynaklarından sentezlenmekte ve genellikle ortaya çıkan PHB polimerinin kompozisyonu, kullanılan substratlara göre değişmektedir.



Şekil 2.3. PHB'nin kimyasal yapısı (Hajikhani, 2003).

Yan zincirinde bir metil grubu bulunan, 3-hidroksi bütirik asidin makromoloküler bir polimeri olan PHB'nin genel formülü $(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2)_n$ şeklindedir (Nickerson ve ark., 1981; Lafferty ve ark., 1988; Anderson ve Dawes 1990; Madison ve Huisman 1999). n sayısı 35 000 gibi yüksek bir sayıya ulaşabilmektedir. Polimerin molekül ağırlığı, özellikle bakterinin türüne bağlı olmakla birlikte, büyüme koşulları ve hücrenin yaşam döngüsündeki yerine göre de değişebilmektedir (Madison ve Huisman, 1999). Elektron mikroskopuyla (EM) yapılan çalışmalarda PHB granülleri kolaylıkla gözlenebilmektedir (Şekil 2.4). Granülün içte yer alan bir merkezi kısım ve birkaç tabakalı membranla çevrilmiş kabuktan oluştuğu bildirilmiştir (Dunlop ve Robards, 1973).

PHB, genellikle küre şeklinde olup, her granül çap olarak 100-800 nm arasındadır. Bunlar 2-4 nm kalınlığında üniter olmayan bir membranla çevrilidir. Granüllerin yaklaşık % 98'i PHB, % 2'si ise protein içermektedir (Nickerson ve ark., 1981; Encarnacion ve ark., 1995).



Şekil 2.4. Hücrenin içindeki PHB görüntüleri

Hücre içinde sıvı, atmosferde katı halde olan PHB, organik çözücü ile hücreden özütlendiğinde kristalize olmaktadır. Katı ama kırılgan bir materyal olan PHB'nin erime sıcaklığı, 157-188 °C olup, parçalanma sıcaklığı 185 °C 'dir. Erime sıcaklığı parçalanma sıcaklığına çok yakın bir değerde olması enjeksiyonla işleme sırasında polimerin kalıplaşmasını zorlaştırmaktadır (Lafferty ve ark., 1988; Dave ve ark., 1996; Madison ve

Huisman 1999). PHB, kopolimerleri kadar iyi bir şekilde preslenebilir, biçimlendirilebilir, lif haline dönüştürülebilir, filmleri yapılabilir ve polietilen gibi diğer sentetik polimerlerle heteropolimerler yapımında kullanılabilir (Dave ve ark., 1996). PHB, asit ve baz uygulamalarına karşı zayıf dirence sahip iken, UV ışınlarına karşı dirençli olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, polimerin su ve hava geçirmez oluşu, hidrolitik parçalanmaya karşı direnç sağlaması, PHB 'yi diğer biyoplastiklerden ayıran en önemli özelliklerinden birisidir. Buna bağlı olarak da PHB'nin kullanım olanakları genişlemektedir (Holmes, 1988; Lindsay, 1992; Poirier, 2002). PHB'nin, biyolojik parçalanabilirliği, biyolojik uyum yeteneği ve toksik olmayışı sayesinde endüstriyel uygulamalarda kolayca kullanılacağı bildirilmektedir (Weber, 2000; Steinbüchel, 1991).

Monomer sayısının artmasıyla bozunma sıcaklığında bir değişiklik olmadan erime sıcaklığı düşmektedir. Bu ise termal parçalanma olmadan kopolimerin termal işlenmesine olanak tanımaktadır (Ojumu ve ark., 2004). PHB ve kopolimerleri ile petrol kökenli polipropilenin karşılaştırmalı polimer özellikleri Çizelge 2.2. 'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. PHB ve petrol kökenli polipropilen (PP)'nin bazı fiziksel özelliklerinin karşılaştırılması (Ojumu ve ark., 2004).

ÖZELLİKLER	PHB	PP
Kristal erime noktası (°C)	175	176
Camsı geçiş sıcaklığı, T _g (°C)	5-10	-15
Kristalite (%)	80	7
Moleküler ağırlığı (Da)	1-8x10 ⁵	2-7x10 ⁵
Yoğunluk (g/cm ³)	1.250	0.905
Kırmaya karşı uzama (%)	6-8	400
UV direnci	İyi	Zayıf
Çözücü direnci	Zayıf	İyi
Elastiklik (%)	6	400
Oksijen geçirgenliği (cm ³ /m ² .atm.gün)	45	170
Biyobozunurluk	+	-

PHB'nin bazı mekanik özellikleri polipropilene benzemektedir ancak PHB' de kırılma için genişleme özelliği % 6 iken, polipropileninki %400'dür. PHB'nin bu özelliği polipropilenden önemli derecede düşüktür. Bu nedenle 3-hidroksivalerat birimini içeren PHB kopolimeri P(3HB-co-3HV) geliştirilmiştir. PHV gibi monomerlerin eklenmesi ya da diğer polimerlerle karıştırılarak yapılan denemelerle PHB'nin kırılma dayanıklılığının azaldığı bildirilmektedir (Holmes, 1985). Bu sayede mekanik özellikleri daha fazla geliştirilmiştir. Polimer daha sağlam ve daha esnek olmuştur. 3-hidroksivalerat birimleri arttıkça esneklik daha da artmaktadır. (Lee, 1996b). Degradasyon sıcaklığında herhangi bir değişiklik olmaksızın komonomer fraksiyonundaki artışla erime sıcaklığında düşme olmuştur. Bu durum termal degradasyon olmaksızın kopolimerin termal işlenmesine izin vermektedir. Böylece bu maddenin özelliği fermantasyon sırasında 3- hidroksivalerat oranını ayarlamak yoluyla kontrol edilebilmektedir (Ojumu ve ark., 2004).

2.3.2. PHB'nin oluşum şartları ve tayini

Depo materyalleri, dengesiz büyüme koşulları gibi özel koşullar altında organizmalar tarafından sentezlenen maddeler olarak bilinmektedir. Bakterilerin aldıkları besin miktarlarında bir dengesizlik varsa aldıkları fazla besin hücre içinde depolanır. Hücre içinde çözünabilir ara metabolitler polimerize hale getirilir. Böylece hem bu maddeler hücrenin osmotik dengesini bozmadan depolanırlar hem de bu değerli maddelerin hücreden atılmaları engellenir (Brandl ve ark., 1991; McCool ve ark.,1996).

Hücre çoğalması sırasında asetil-CoA'nın kondenzasyonundan PHB'nin sentezi çok az miktarlarda gerçekleşmesine rağmen hücreler karbon kaynağının sınırlandırılmasından ziyade büyümeyi sınırlayıcı şartlar altında bırakıldığında PHB sentez hızı oldukça artar. Azot, fosfor gibi protein sentezini durduracak şartlar söz konusu olduğunda yüksek seviyelerde NADH ve NADPH üretilir (Byrom, 1987).

PHB'nin hücrede teşhisi ve konsantrasyonunun belirlenmesinde, Hidrojen nükleer manyetik rezonans (1H NMR) ve Gaz Kromatografisi (GC) analizi ve FTIR spektroskopisi yöntemi kullanılabilir (Jan ve ark., 1996; Yan ve ark., 2000). Canlı bakteri hücresi içerisindeki PHB depo granüllerinin tespit edilmesi için ise kütle mikroskopisi, Raman spektroskopisi kullanılabilirken geniş olarak kullanılan metot lipofilik boyalarla boyamadır (Ostle ve Holt, 1982; Bonartseva ve Myshkina, 1985; Pierce ve Schroth, 1994). Santrifüjle ya da kloroform, trifloroetanol, dikloroetan, propilen karbonat, metilen klorid, dikloroasetik asit gibi kimyasallarla izole edilen PHB'lerin moleküler ağırlığının hesaplanması jel kromatografisi,

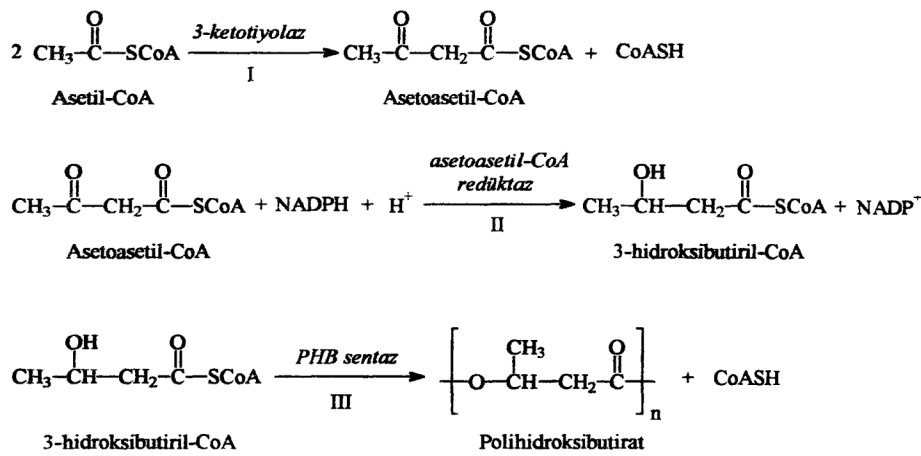
sedimentasyon analizi ve viskozite ölçüm teknikleriyle; monomer kompozisyonları ise GC, kütle spektroskopisi ve NMR analizleriyle belirlenebilmektedir (Marchessault ve ark., 1970, Holmes, 1988; Madison ve Huisman, 1999; Lee ve Choi, 1999; Di Lorenzo ve Silvestre 1999; Kessler ve ark., 2001).

2.3.3. PHB biyosentezi

Polimerin biyosentezi; monomerlerin oluşumu ve birleştirilmesi gibi iki enzimatik aşama ile gerçekleşir ve bu enzimatik aşamaların performansı, üretim seviyesini, zincir uzunluğunu ve oluşan kopolimerlerin kompozisyonunu etkilemektedir.

Prokaryotik hücrelerde PHB'nin intrasellüler sentezi için ilk bileşik asetil- CoA'dır. Substrat ve asetil-CoA'nın hücre içi konsantrasyonunun artmasıyla oluşan koşullar, PHB sentezinde pozitif bir etkiye sahiptir. En kapsamlı karakterize edilen polimer olan PHB'nin biyosentezi, asetil- CoA'dan üç farklı enzim ile basamaklı şekilde katalizlenen bir işlemle sentezlenir(Şekil 2.5). Bu yoldaki ilk enzim 3-ketotiyolaz (asetil-CoA açıl transferaz), iki asetil-CoA molekülünün asetoasetil-CoA oluşturmak üzere dönüşümlü kondenzasyonunu katalizler. İkinci enzim olan asetoasetil- CoA redüktaz ise oluşan asetoasetil-CoA molekülünü 3-hidroksibütiril-CoA' ya indirgemektedir. Oluşan bu 3-Hidroksibütiril-CoA monomerleri ise, PHB sentaz tarafından PHB'ye polimerize edilmektedir (Poirier ve ark., 1995; Madison ve Huisman, 1999).

Hücre içinde PHB birikiminin artması için, yüksek NAD(P)H, yüksek asetil-CoA ve düşük serbest CoA düzeyinin olması gerekmektedir. Bu şartların oluşumu, mikroorganizmalara göre değişmekle beraber genelde nitrojen, potasyum, sülfür gibi büyümeyi sınırlandırıcı etkenlere bağlıdır (Holmes, 1985; Lee, 1996b).



Şekil 2.5. PHB 'nin sentez reaksiyonları (Poirier ve ark.,1995).

PHB granülleri ile sentaz enzimi polimerizasyonu arasındaki ilişki yıllardır bilinmektedir. Sınırlı karbonlu ortamda gelişme sırasında, sentaz enzimi çözünmüş formda oluşmaktadır. Nitrojen azlığında ise PHB sentaz oluşmaktadır. Çözünmüş sentazın bu şartlar altında hızla tükenmesi PHB granülleri ile ilişkilidir ((McCool ve ark., 1996).

PHB genellikle 10^3 - 10^4 monomerden oluşan bir polimer şeklinde üretilir ve 0,2-0,5 μ m çapında granüller halinde bulunur. *R. eutropha* glikoz gibi karbon kaynağının aşırı olduğu ortamda büyütüldüğünde PHB granülleri hücre kuru ağırlığının % 80 'ini doldurabilir. Bu şartlar altında PHB sentezi karbon stoğu olarak görev yapmaktadır. Büyüme şartları kaldırıldığında ise PHB asetil-CoA'ya katabolize edilmektedir (Anderson ve Dawes, 1990).

Çevre şartları ve bakterilerin fizyolojik yetenekleri genellikle PHB'lerin kantitatif oluşumunu kontrol eder. Farklı besinlerin bol olmayışı ya da düşük konsantrasyonda olması PHB sentezini artırır ya da azaltır. Deneysel çalışmalarda daima azot sınırlı şartlar tercih edilmektedir (Fuller, 1995)

A.eutrophus 'u glikoz gibi karbon kaynağının aşırı miktarda bulunduğu ancak esansiyel bir besini (azotu ya da fosforu) sınırlı oranda içeren ortamda inkübe edilince kuru ağırlığının %80'ine kadar PHB akümüle ettiği saptanmıştır (Ojumu ve ark., 2004).

2.3.4. PHB biyoparçalanma reaksiyonları

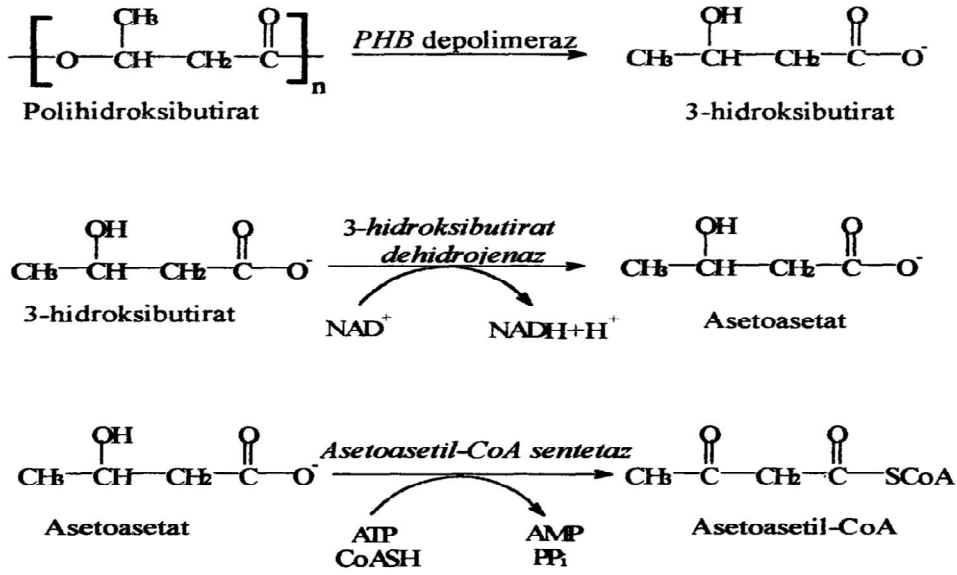
Depo materyali olarak PHB üretebilen bakterilerin büyük bir çoğunluğu doğada bulunabilmektedir (toprak, atık çöpler, deniz suyu vb.). PHB'nin en önemli özelliklerinden biri, toprak, insan vücudu gibi yerlerde toksik ürün oluşturmaksızın tamamen biyoparçalanabilir materyal olmasıdır.

PHB'nin, karbon ve enerji kaynağı olarak bakteriler tarafından kullanılabilmesi için depolimerize olması gerekmektedir. Depolimerizasyon sonucu oluşan monomerik 3-hidroksibütirik asit ve dimer yapı birçok organizma için kullanılabilir substratlardır (Lafferty ve ark., 1988).

PHB'ler polimerlerin üretildiği türlerdeki ya intraselüler depolimerazlar veya ekstraselüler depolimerazlar tarafından hücre içinde ya da ekstraselüler depolimerazlar tarafından hücre dışından parçalanabilirler. Hücre içi depolimerazların, hücre dışı depolimerazlardan farklı fonksiyonları vardır. Hücre içi depolimerazlar, hücre içinde hareketli ve kristalize olmayan, doğal PHB elastomerlerini parçalarlar. Dönüşüm sonrasında kristalize olan, denatüre edilmiş PHB ise hücre dışı depolimerazlar tarafından hidrolize edilir (Lee, 1996a). Bununla beraber, hücre dışı PHA depolimerazlarla hücre içi depolimerazlar arasındaki yapısal farklılık

nedeniyle, bozulmamış, doğal PHA granüllerinin hücre dışı PHA depolimerazlarla direkt olarak parçalanamadığı bildirilmektedir (Braunegg ve ark., 1998).

PHA'ların intraselüler parçalanması sentezinden farklı bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. PHB granülüne bağlı bir depolimeraz D(-)3-hidroksibütirik asidin hidrolizini sağlar ve bu moleküller de bir NAD-spesifik dehidrogejenaz ile asetoasetata yükseltgenirler. Bir asetat-süksinil-CoA transferaz daha sonra asetoasetat moleküllerinin süksinil-CoA ile reaksiyonunu katalizleyerek asetoasetil-CoA'nın oluşumunu sağlamaktadır (Şekil 2.6) (Senior ve Dawes, 1973).



Şekil 2.6. PHB parçalanma reaksiyonları

Değişik kompozisyon, stereokimya ve molekül ağırlığındaki PHA'lar değişik biyolojik parçalanma eğilimleri gösterirler. Polimerin parçalanmasında, bakteri, mantar, ve yüksek organizmalar biyolojik faktörler olarak; hidroliz ve oksidasyon kimyasal faktörler olarak; güneş ışığı, ıslanma ve mekanik aşınma ise fiziksel faktörler olarak etki etmektedir (Madison ve Huisman, 1999). Tamamen parçalanma için gereken zaman ve biyoparçalanma oranının; kalınlık, yüzey özellikleri, ısı ve çevredeki mikrobiyal nüfus gibi etkenlere bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Lee, 1996a). Genellikle başlangıç molekül ağırlığının, polimerin biyolojik parçalanma üzerine çok önemli bir etkiye sahip olmadığı ve yüksek molekül ağırlıklı bir PHB homopolimerlerinin düşük molekül ağırlıklı bir polimer kadar çabuk parçalandığı bilinmektedir. Aerobik şartlarda parçalanmanın son ürünü CO₂ ve H₂O iken, anaerobik koşullarda ise CH₄'dir. Parçalanmada nitrojen oksidin oluşmaması, çevre

korunmasında önemlidir. Parçalanmış biyoplastik, bitkilerin gelişmesini olumlu yönde etkilemektedir (Hajikhani, 2003)

Tanio ve arkadaşlarının (1982) yaptıkları bir çalışmada depolimerizasyon sırasında salıverilen hidroksibütirat monomerlerinin tayini ve oligomerlerin hidroliz sırasında ester bağlarındaki azalma polimer zincirin serbest hidroksil ucundan her defasında bir dimer şeklinde ayrıldığı sonucunu ortaya koymuştur.

Farklı işletme şartları altında yapılan çalışmalarda, 4HB monomer birimi içeren kopolimerlerin, PHB ya da P(HB-HV) (polihidroksibütirat-cohidroksivalerat) kopolimerlerine göre çok daha çabuk parçalandığını göstermiştir. Aktive edilmiş çamurda 30 °C'de %94 P(3HB-coHB) filminin 14 günde tamamıyla parçalandığı gözlenmiştir. Bir başka çalışmada ise %17 P(3HB-co-4HB) filminin ise 2 haftada tamamıyla parçalandığı ancak PHB tam parçalanması için ise 10 haftadan fazla sürüğü tespit edilmiştir (Doi ve ark., 1989) Farklı ortamlarda yapılan bir çalışmada ise P(HB) ve P(3HB-co-3HV) kopolimerlerinin sırasıyla anaerobik çamurda toprakta ve deniz suyunda tamamen parçalanma sürelerinin 60, 75, 350 hafta olduğu görülmüştür (Brandl ve ark., 1990).

Nguyen ve ark. (2002) PHB ve kopolimerlerinde, ısıya bağlı (170-200 °C) parçalanmayı araştırdıkları çalışmalarında, reaksiyonun ilk birkaç saatindeki tabakalaşmayı, ısı etkisiyle erimenin takip ettiğini bildirmişlerdir.

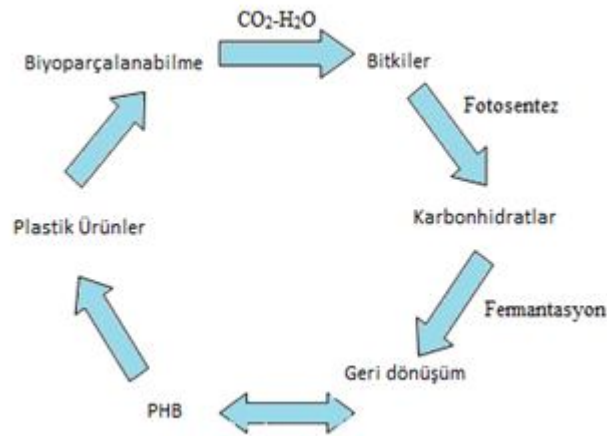
PHB'nin toprakta ve steril tampon çözeltide parçalanmasını araştıran çalışmada, Mergaert ve ark. (1993) ise, her iki ortamda da molekül ağırlığının düştüğünü, ancak kütle miktarındaki azalmanın sadece toprakta görüldüğünü ve bunun toprak çeşidine bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmayı destekleyen başka bir araştırmada ise, en yüksek kütle azalması killi toprak kullanılarak elde edilmiştir. Bazı araştırmacılar da, topraktaki P(HB-HV) biyoparçalanabilirlik yüzdesinin toprağın çeşidi ve içerdiği su miktarına bağlı olarak değiştiğini bildirmektedirler.

PHB ve çeşitli oranlarda hazırlanan P(HB-HV) kopolimerlerinin ev atıklarında parçalanması incelenmiş ve yaklaşık 20 hafta sonra bu polimerlerde önemli düzeylerde kütle kaybı gözlenmiştir. Bu sistemlerdeki parçalanmanın; ortamdaki mikrobiyal popülasyona, ekstraselüler enzimlerin özgünlüğüne ve sıcaklığa bağlı olduğu bildirilmiştir (Mergaert ve ark., 1993). Benzer sonuçlar aktive edilmiş çamurda da gözlenmiş ve polimer parçalanma işleminin pH'a bağlı olduğu tespit edilmiştir (Briese ve ark., 1994).

2.3.5. PHB'nin yenilenebilme özelliği

PHB'nin biyolojik karakterleri ve biyolojik olarak parçalanabilir olması kadar önemli olan bir başka özellik de onun üretim kaynaklarının yenilenebilme yeteneğine sahip olmasıdır. PHB'nin fermantasyon ile üretiminde, şeker ve yağ asiti gibi tarım ürünleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. CO₂ ve H₂O kullanılarak ortaya çıkmış bu tarım ürünleri, biyolojik olarak parçalanabilen PHB'ye dönüştükten sonra da yine yıkım ürünleri CO₂ ve H₂O'dur. Böylece PHB'ler azalmakta olan fosil yakıtların yerine yenilenebilen bileşikler olarak karşımıza çıkmaktadır (Madison ve Huisman, 1999).

Biyoplastiklerin yeniden oluşum devresi, sentez-parçalanma sentez olarak gösterilmiştir (Şekil 2.7). Bu devre tabiatta kendiliğinden gerçekleşebileceğinden, çevre korunması açısından da önemlidir (Dave ve ark., 1996).



Şekil 2.7. PHB'nin karbon döngüsü (Dave ve ark., 1996).

Savenkova ve ark. (2000) yaptığı araştırmada toprak mikroorganizmalarından PHB'yi parçalayan başlıca mikroorganizmalar tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmalar arasında en önemli bakteri cinslerinin *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces* ve *Trichoderma* olduğunu rapor etmişlerdir.

2.3.6. PHB'nin parçalanabilme özelliği

Endüstriyel olarak üretilen biyoplastikler polietilene oranla dört kat daha fazladır (20 kg/m). PHB'nin petrol kökenli polipropilene göre daha kristal yapıda olması, özgül ağırlığının daha yüksek oluşu, UV'ye dirençliliği gibi bazı özelliklerinden dolayı üretiminin daha iyi bir seçenek olduğu bildirilmiştir (Barham ve ark., 1984; Beyatlı, 1996; Bluhm, ve ark., 1998).

PHB'nin doğaya bırakıldığında tamamen parçalanabilmesi, çevre kirliliği yaratmaması gibi özelliklerinden dolayı endüstriyel uygulamalar açısından önemi her geçen gün artmaktadır (Page ve ark., 1995).

PHB kolay şekil alabildiğinden ve parçalanabilme özelliğinden dolayı daha çok paketleme malzemesi olarak kullanılmaktadır (Madison ve Huisman, 1999). PHB ve kopolimerleri preslenebilmekte, biçimlendirilebilmekte, lif haline dönüştürülebilmekte, filmleri yapılabilen ve sentetik polimerlerle heteropolimer yapımında kullanılabilir. Biyolojik olarak parçalanabildiklerinden tek kullanımlık ürünlerin üretimi için biyoplastikler ilgi çekmişlerdir. Tıraş bıçağı, hijyenik kadın ürünleri, çocuk bezleri, tek kullanımlık mutfak malzemeleri, şampuan şişeleri gibi ürünlerin imalatında da kullanılmaktadır (Lafferty ve ark., 1988).

PHB ve kopolimerleri çeşitli ürünlerin yapısında önemli bir potansiyele sahiptirler. Biyolojik uygunluğundan ve maliyetinden dolayı son zamanlarda tıp ve eczacılık alanında kullanılmaya başlanmıştır. Hayvan dokularına yerleştirilen PHB'nin toksik bir etkiye neden olmamasından dolayı, vücutta absorbe edilebilen protez aletlerinin, yapay kan damarlarının ve cerrahi dikişlerde PHB'nin kullanılması bir çok araştırmacının bu alana yönelmesine neden olmuştur.

Biyoyumlu olan PHB monomerleri insan vücudunda bulunan doğal metabolit olması nedeniyle, polimer vücutta sadece çok hafif bir immünolojik cevap oluşmasına neden olur. Bu özelliğinden dolayı PHB insanlarda ilaçların kontrollü salınımı için test edilmiştir. Böyle çalışmalarda ilaç, PHB'den yapılmış bir hap içine sıkıştırılmış ve ağız yoluyla hastalara verilmiştir.

PHB'nin vücut içinde biyolojik parçalanması yavaştır. İnsan vücudu PHB depolimeraz enzimi içermez. Bu özelliğinden dolayı da PHB pansuman sargısı, cerrahi dikişler, eldiven, önlük, maske, yapay kan damarları, protezler, ortopedik plaka, çubuk, vida ve iğneler gibi cerrahi malzemelerin yapımında kullanılmıştır.

PHB'ler tarımda, toprakta parçalanma gerektiren uygulamalar ve kaplama işlemlerinde kullanılabilir. Biyoplastikler, ekin sulaması için yapılan olukların üretiminde tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında örnekleri korumak için, gübre ve pestisitlerin kontrollü salınımında plastik kılıflar olarak da kullanılabilir (Holmes, 1985).

PHB kalıp yapımı, sıkıştırılmış film ve bazı fibrillerin geliştirilmesinde de kullanılabilir. Yapılan paket filmleri mükemmel bir gaz bariyeri özelliğindedir. 25 µm kalınlığındaki bir PHB filmi 45 cm³/m²/gün'lük bir oksijen geçirgenliğine sahiptir. Düşük olan bu oksijen

geçirgenliğinden dolayı gıda maddelerinin paketlenmesinde PHB filmleri rahatlıkla kullanılabilir. Bu PHB filmleri polipropilen filmleri kadar güçlüdür, fakat polietilen fitalat kadar dayanıklı değildir. Ancak birçok plastik, cam-fiber dolgusu ilavesiyle kuvvetlendirilebilmiştir (Holmes, 1985; Lafferty ve ark., 1988).

PHB polimerinin uygulama alanları özelliklerine bağlı olarak doğrudan kullanılmasının yanında depolimerizasyon ürünü olan monomerinin kullanımı da oldukça ilginç ve yaygındır. 3-hidroksibütirik asit tüm yüksek organizmalarda bir ara metabolit bileşiktir ve lipid metabolizmasının ürünü olarak bulunur. İnsan kanının normal bir ögesi olan 3-hidroksibütirik asit, belirli dokularda özellikle de beyin ve kalp dokusu için bir enerji kaynağı olarak hizmet eder. 3-hidroksibütirik asitin diabetiklerin kan serumunda anormal konsantrasyonlarda var olan keton yapılarından biri olarak rol oynadığına dair birçok bilgi yer almaktadır (Holmes, 1985).

Ayrıca, biyoplastikler, özellikle uzun yan zincire sahip olan PHB'ler, basınca duyarlı yapışkanlar olarak kullanılabilirler. Lateks gibi kağıt örtüler, günlük krem öncülleri üretimi ve gıdalardaki unun dağılımını sağlayan ajanların üretiminde de PHB kullanılmaktadır (Madison ve Huisman 1999; Weber 2000; Lootz ve ark., 2001).

2.3.7. PHB üretiminde maliyetin önemi

Konvansiyonel plastiklerle PHB'nin üretim gideri karşılaştırıldığında, PHB'nin üretim maliyetinin yüksek olduğu gözlenmiştir ve bu durumun da PHB'nin üretim ve ticaretini engellediği görülmüştür. Örneğin; en ucuz substrat kaynağında maliyet 0.22 \$/kg PHB iken polipropilenin maliyeti 0.185 \$/kg'dır (Kothuis ve Schelleman, 1998). Bu nedenle hem düşük maliyetle için hem de yüksek kalitede ve verimlilikte ürün elde edebilmek amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmalarda karbon kaynağı, mikroorganizma çeşidi ön sıralarda yer almaktadır (Choi ve Lee, 1997).

Ekonomik PHA üretimini sınırlandıran faktörlerden biri substrattır. PHB üretiminde yapılan çalışmalarda çeşitli karbon kaynağına sahip atıksular kullanılmıştır. Bu atıksular: şeker atıksuyu melas (Albuquerque ve ark., 2007), peyniraltı atıksuyu, zeytinaltı atıksuyu (karasu) (Beccari ve ark., 2009), soya atık sularındır (Law ve ark., 2001). Bu atıksularının kullanılmasında 2 amaç vardır. Hem atık suyu deşarj kriterleri doğrultusunda arıtmak hem de arıtım sırasında PHB üretmektir.

Çizelge 2.3'de farklı substrat kaynakları kullanılan çalışmalardaki PHB verimleri ve maliyetleri özetlenmiştir. Karbon kaynağı değiştiği halde PHB veriminin (tüketilen substrat

(g) başına oluşan PHB (g) çok da değişmediği böylece PHB üretiminde substratın maliyete etkisini açıkça ortaya koymuştur (Lee ve Choi, 1998; Madison ve Huisman, 1999).

Çizelge 2.3. PHA üretim maliyetine substratın etkisi (Lee, 1996b).

Substrat	Maliyet (US \$ /k)	Verim (g PHB/g substrat)	Substrat Maliyeti (US \$ /kg PHB)
Glukoz	0,493	0,38	1,35
Sukroz	0,295	0,40	0,72
Metanol	0,180	0,43	0,42
Asetik Asit	0,595	0,38	1,56
Etanol	0,50	0,50	1,00
Şeker kamışı	0,220	0,42	0,52
Peyniraltı suyu	0,071	0,33	0,22
Hemisellüloz	0,069	0,20	0,34
Hidrolize mısır nişastası	0,220	0,185	0,58

Çizelge 2.3.'den de görüldüğü gibi düşük maliyete sahip substrat kullanıp diğer substratlara kıyasla iyi verimde PHB elde etmek mümkün olmaktadır.

PHB sentez hızı da, üretim maliyetine etki eden diğer faktörlerden biridir. Ancak, bu besin maddesi fiyatı ile karşılaştırıldığında oldukça düşük kalmaktadır. PHB üretim hızı, 1.98 g/L.h'den 3.2 g/L.h'e artırıldığı zaman PHB maliyeti 5.37 \$/kg'dan 4.91 \$/kg'a düşmektedir.

Biyokütlenin PHB muhtevası, PHB'nin elde edilme maliyetine etki etmektedir. %50 PHB muhtevası ile PHB elde edilmesi 4.8 \$/kg PHB'ye mal olmaktadır. %88'lik PHB muhtevası ile PHB elde edilmesi ise sadece 0.92 \$/kg PHB'dir (Lee ve Choi, 1998).

PHA'lar *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, rekombinat *Alcaligenes eutrophus* ve rekombinat *Escherichia coli* gibi birçok saf kültür tarafından endüstriyel olarak üretilmektedir (Lee, 1996b; Lee ve Choi; 1998; Grothe ve ark., 2000).

Fakat saf kültür mikroorganizma kullanarak yüksek PHB içeriği elde edilmesine rağmen, PHB üretimine ekstra maliyeti getirmektedir.

PHB'nin üretim maliyetini azaltmak için aktif çamurda karışık bakteri kültürünün kullanılması son yıllarda güncel hale gelmiştir. Karışık kültür ve saf kültürlerde PHA üretimi kıyaslandığında özellikle uygulamaya yönelik çalışmalarda karışık kültür sterillik gerektirmemesi, buna bağlı olarak da prosesin kontrolünün daha kolay olması ve yüksek verimde PHA üretimi avantajlarından dolayı tercih edilmektedir (Satoh, 1994).

PHB üretiminde mikroorganizmaların PHB depolama kapasitesini artıracak ortam koşullarının seçilmesi önemlidir. Günümüzde yapılan bu konuyla ilgili olan çalışmaların amacı ortam koşullarını belirlemeye yönelik PHB üretim mekanizmalarını geliştirerek ve bu gelişimi de uygulamaya yönelik kullanmaktır.

2.4. Farklı PHA Üretim Sistemleri

2.4.1. Anaerobik-aerobik sistemler

Anaerobik aerobik sistemlerde PHB üretimi, mikroorganizmaların aktivitesine dayanmaktadır. Bu üretim mekanizmasında amaç hem fosfor giderimi yapmak hem de yenilenebilir bir materyal olan PHB'yi mikroorganizmanın bünyesinde depo etmektir. Bu proseste 2 mikroorganizma aktif olarak rol almaktadır. Bunlar; fosfat akümüle eden organizmalar (PAO) ve glikojen akümüle eden organizmalardır (GAO) (Chech ve Hartman, 1990; 1993).

PHA üretimi için her iki mikroorganizma da anaerobik şartlarda pasif difüzyonla asetatı hücre içine alarak asetil-CoA'ya dönüştürür (Mino ve ark., 1987). Asetil-CoA, acetoasetil-CoA'ya dönüşerek PHB'nin sentezi için tüketilir, hidroksiasil-CoA'ya indirgenir ve sonunda PHA'a polimerize olmaktadır.

PAO'lar, anaerobik şartlarda kısa zincirli yağ asitlerini (genellikle asetat) hücre içine olarak PHB olarak depolarlar. (Mino ve ark., 1995). Asetatın hücre içine alınması için gerekli enerji, PAO'ların hücre içi polifosfat depolarının bozunması ile elde edilir. PAO'lar aktif çamur sistemlerinde buldukları halde fosforu depolayabilme özelliğine yalnız anaerobik-aerobik ardışık sistemlerde sahiptirler (Comeau ve ark., 1986; Wentzel ve ark., 1986) Anaerobik-Aerobik ardışık fazların sağlandığı aktif çamur sistemlerinde PAO'ların baskın olduğunu ortaya koymuştur.

GAO'lar PAO'larla rekabet eden mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar anaerobik şartlarda polifosfattan enerji elde etmeden organik maddeyi depolama özelliğine sahiptir. Ayrıca ortamdaki uçucu yağ asitlerini depolamak için gerekli enerjiyi PAO'lar gibi polifosfatın bozunmasından değil glikojenden elde ederler (Cech ve Hartman, 1993). GAO'ların önemli miktarda glikojeni tüketerek enerji ve indirgeme kuvveti sağladıkları bilinmektedir.

Fosfor ve glikojen depolayan organizmalar arasındaki rekabet biyolojik aşırı fosfor giderim verimini önemli ölçüde etkileyen bir faktördür. Çünkü glikojen, PHA oluşumu için enerji kaynağı ve indirgeyici güç olarak kullanılabilen ve enerji kaynağı için polifosfatın hidrolizine gereksinimi azaltmaktadır (Cech ve Hartman, 1993; Liu ve ark., 1994). PAO ve GAO'ların çoğalması, substratın düzenli olarak olduğu ama elektron alıcısının olmadığı (anaerobik) sistemlerde gerçekleşmektedir (Cech ve Hartman 1993).

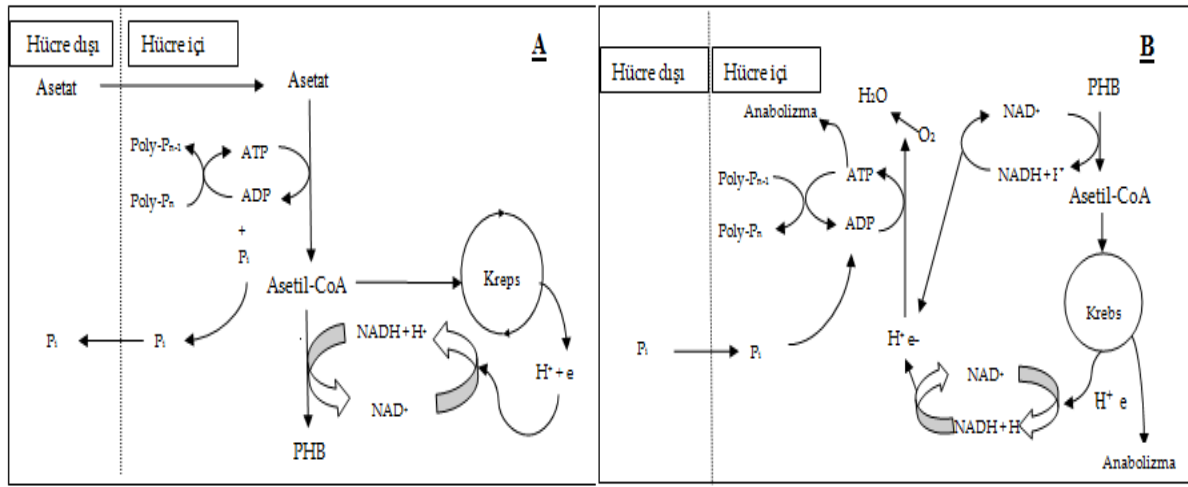
Anaerobik-aerobik ardışık sistemlerde PHA üretimi ileri fosfor giderimi ile yapılmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda P içeren atıksuların kontrolsüz şekilde alıcı ortama deşarj edilmesi sonucunda su kalitesinde önemli ölçüde bozulmalar oluşmaktadır (Lee ve ark., 1978). Su kalitesinin korunması ve alıcı ortamlarda ötrifikasyon riskinin azaltılması için gerekli fosforun da arıtılması gerekli olmaktadır. Fosforun gideriminde kullanılan kimyasal ve biyolojik yöntemler karşılaştırıldığında düşük sermayeye ve işletme maliyetine sahip olan ileri biyolojik fosfor giderim prosesi önemini daha da artırmıştır (Osborn ve Nicholls, 1978).

PHA üretimini açıklamak üzere iki model geliştirilmiştir: Comeau-Wentzel ve Mino Modelleri (Comeau ve ark., 1986; Mino ve ark., 1987;1996). Geliştirilen bu metabolik modeller, PHA'nın depolanması için gerekli indirgeme kuvvetinin sağlanması konusunda temel farklılıklara sahiptirler.

2.4.1.1. Comeau-Wentzel modeli

Comeau-Wentzel Modelinde; asetat hücre membranından hücre içine pasif difüzyonla taşınır. Hücre içine giren asetatın asetil-CoA' ya aktivasyonu ATP'nin hidroliziyle birlikte gerçekleşir. Hücre, azalan ATP/ADP oranını depolanmış polifosfatın hidrolizi sonucu ATP üreterek dengeler. Bu sırada fosfor salınmaya başlar ve asetat tükenene kadar ortamda fosfat konsantrasyonu artmaya devam eder. Asetil-CoA'nın bir kısmı, PHB sentezi için gerekli olan indirgeyici bileği (NADH₂) temin etmek için krepse çevriminde metabolize edilir. Geriye kalan asetil-CoA PHA sentezi için kullanılmaktadır (Şekil 2.8). Anaerobik koşullar sonlandığında atıksu ve biyokütle aerobik prosese geldiğinde, atıksuyun çözünmüş organik

madde yükü düşük fakat PAO'lar yüksek miktarlarda PHB rezervelerine sahiptirler. Ayrıca aerobik ortamda oksijen elektron alıcısı olduğundan, PAO'lar karbon ve enerji kaynağı olarak depolanmış PHA'ları kullanarak aerobik metabolizması gerçekleşir. ATP'in elektron taşıma fosforilasyonunda sentezlenmesiyle artan ATP/ADP oranı polifosfat sentezini sitümüle eder. Böylelikle atıksudaki fosfor hücre içinde polifosfat olarak depolanır. Aerobik ortamda PHA'ların metabolize olmasıyla fazla enerji açığa çıktığından anaerobik koşullarda PAO'lar hücre dışına salınan fosfora ek olarak atıksuyun başlangıçta sahip olduğu fosforun tamamını depolama kabiliyetine sahiptirler. (Comeau ve ark., 1986; Grady ve ark., 1999).



Şekil 2.8. Comeau-Wentzel modeli ile fosfor giderim ve PHB üretim metabolizması
(A), anaerobik koşullar; (B), aerobik koşullar

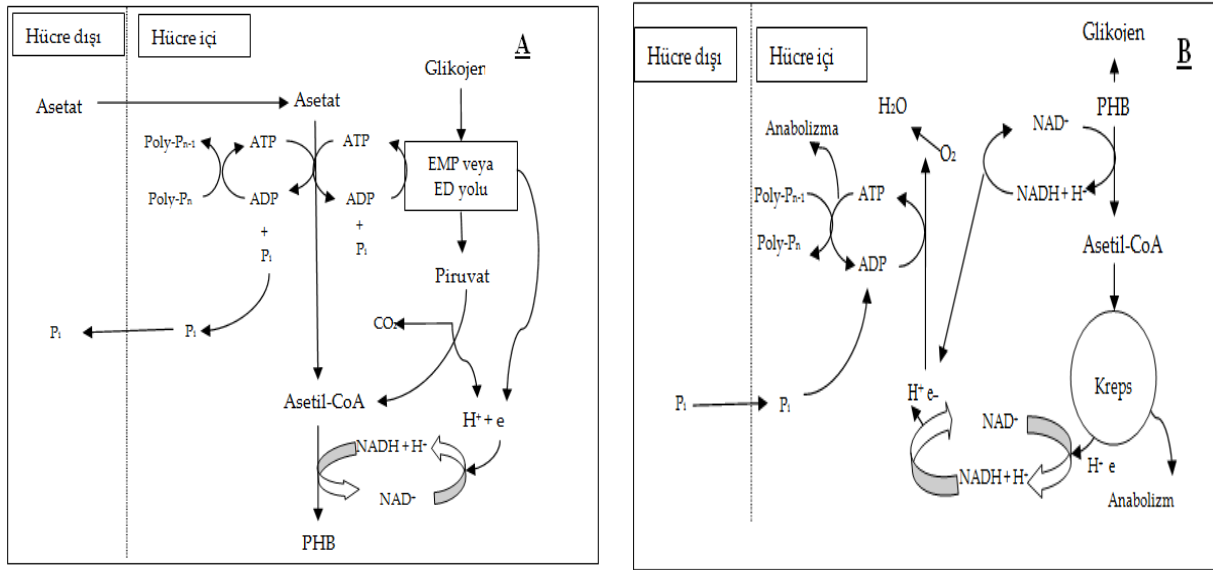
2.4.1.2. Mino modeli

Mino modeli (1987), Comeau-Wentzel modeline benzemektedir. İki model arasındaki fark indirgeyici bileşiklerin nasıl oluştuğu konusudur. Anaerobik koşullarda glikojenin EMP yoluyla ile pirüvata yükseltgenmesi sırasında; asetatin asetil-CoA'ya dönüşmesi için gerekli ATP ve asetil-CoA'dan PHA üretimi için gerekli indirgenme kuvvet olan NADH₂ elde edilmektedir (Şekil 2.9). PAO'lar elde edilen indirgeme kuvvetlerini PHA depolamak için kullanırlar. Bu nedenle, Mino modeline göre, depolanan PHA'nın asetata oranı Comeau-Wentzel modeline göre daha yüksektir (Grady ve ark., 1999).

Bu iki modelde de tüketilen asetate için farklı konsantrasyonlarda fosfor salınmaktadır. Comeau-Wentzel Modelinde, her C-mol asetate için $0,5 + \alpha$ P-mol salınırken Mino Modelinde ise; $0,25 + \alpha$ P-mol salındığı ileri sürülmektedir (α , 1 C mol asetatin hücre içi taşınımı için gerekli enerji miktarını göstermektedir) (Filipe ve Daigger, 1998).

Cech ve Hartman (1990, 1993), besi maddesi olarak asetat ve glikoz karışımını kullanarak ardışık kesikli reaktörde yaptığı çalışmada fosfor gideriminin bozulduğunu gözlemlemişlerdir. Sistem asetatla beslendiğinde fosfor giderimi gerçekleştiğinden fosfor gideriminin bozulmasını kullanılan glikoza bağlamışlardır. Ayrıca reaktörde başka bir bakterinin hakim olduğunu gözlemlenmiş ve bu mikroorganizmayı G bakterisi olarak adlandırmışlar. Bu G bakterisi, anaerobik şartlarda hücre içindeki glikojeni besin maddesinin bağlanması için indirgeyici bileşik ve ATP kaynağı olarak kullandığını rapor etmişlerdir.

Takabatake ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada anaerobik- aerobik sistemde PHA içeriğini %30-% 57 arasında elde etmişlerdir. Fakat bu sürecin çok kararlı olmadığını çünkü bunun için PHA biriktiren bakterilerinin bulunması gerektiğini bununda işletme kontrolünün zor olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca aerobik koşullar altında PHB veriminin anoksik koşullardan daha düşük olduğunu vurgulayarak bu konudaki çalışmaların artması gerektiğini vurgulamışlardır.



Şekil 2.9. Mino modeli ile fosfor giderim ve PHB üretim metabolizması

(A), anaerobik koşullar; (B), aerobik koşullar

2.4.2. Mikroaerofilik-aerobik sistem

Anaerobik-aerobik şartlar altında aktif çamur PHA depolamasına rağmen PHA depolayan organizmaların zenginleşmesi için garanti proses olmayabilir (Ueno ve ark., 1993). Saito ve ark. (1995); aerobik koşullar altında, anaerobik koşullar altındakinden daha fazla PHA depolama yeteneğine sahip mikroorganizmaların olduğunu bulmuşlardır.

Satoh ve ark. (1998) anaerobik-aerobik prosesin anaerobik fazında sınırlı miktarda oksijenin uygulandığı mikroaerofilik-aerobik prosesi öne sürmüşlerdir. Bu şartlar altında, organik substratın bir kısmının, oksidatif parçalanması boyunca elde ettiği enerji ile mikroorganizmalar organik substratı bünyelerine alabilmektedirler. Eğer uygulanan oksijen yeterli ise mikroorganizmalar protein, glikojen ve diğer hücre bileşenlerini üretmek gibi benzer aktiviteleri, organik substratla eş zamanlı kullanarak gerçekleştirir. Fakat uygulanan oksijen sınırlı ya da kontrol altında ise mikroorganizmaların aktiviteleri sınırlandırıldığından dolayı PHA üretebilirler. Bu koşullar altında PHA depolayan mikroorganizmalar, fosfat ya da glikojen depolayan mikroorganizma olup olmadığına bakılmaksızın seçilecek ve seçilen PHA mikroorganizmalarının glikojen depolamaya eğilimleri çok düşük olmaktadır.

Satoh ve ark. ile Takabatake ve ark. mikroaerofilik-aerobik sistemi kullanarak ilk adım içinde oksijen sınırlaması ile mikroorganizmaların, karbonu PHA üretimi için kullanırken aerobik aşamada PHA, mikroorganizmaların büyümesi ve yaşamsal faaliyetlerini devam ettirmesi için gerekli enerjiyi karşılaması amacıyla karbon ve enerji kaynağı olarak kullanacaklarını vurgulamışlardır ve bu çalışmada % 62 maksimum PHA içeriği elde edildiğini fakat PHA üretimi istikrarlı olmadığı rapor edilmiştir (Dias ve ark., 2006).

2.4.3. Aerobik Dinamik Beslemeli (ADB) sistemler (bolluk-açlık sistemi)

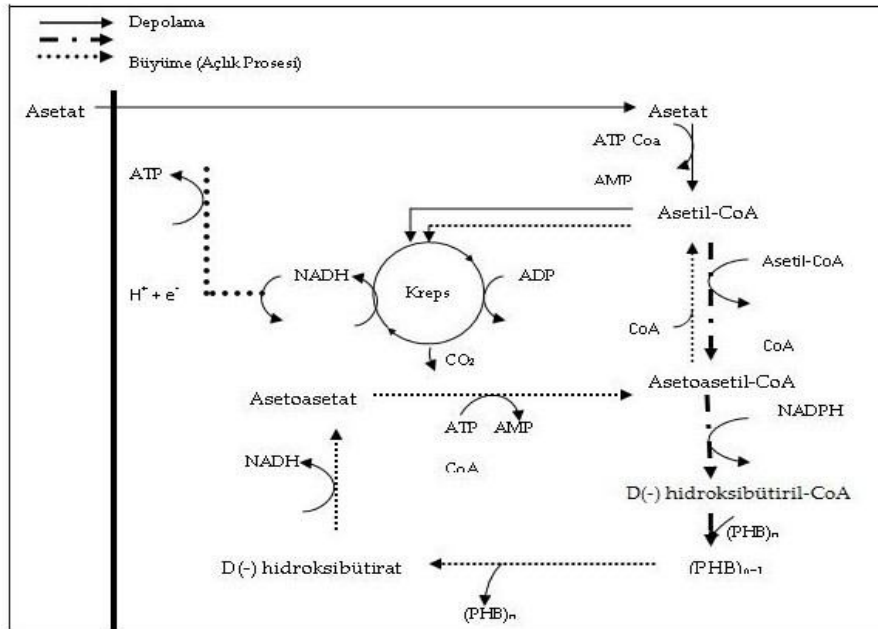
Son zamanlarda araştırmacılar, geçici bir karbon kaynağına maruz kalındığında, karışık kültürden PHA üretimi üzerine yoğunlaşmışlardır. Aktif çamur prosesleri besleme rejimi bakımından oldukça dinamik proseslerdir. (Serafim ve ark., 2004). Biyokütle sırasıyla harici substratın mevcut olduğu (bolluk periyodu) ve harici substratın olmadığı (kıtık periyodu) periotlara maruz kalır ve buna literatürlerde “dengesiz büyüme”de denir. (Salehizadeh ve van Loosdrecht, 2004). Dinamik koşullar altında biyomasın büyümesi ve polimerin depolanması, harici substratın aşırı olduğu bolluk periyodunda eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir. Harici substratın tamamı tüketildiği zaman depolanan polimer (PHA) karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaya başlamaktadır.(Serafim ve ark., 2004; van Loosdrecht ve ark.,1997; Satoh ve ark.,1998). Bolluk prosesinde karbon kaynağının aşırı miktarda olmasından dolayı çözünmüş oksijen minimum düzeydedir (Serafim ve ark., 2004). Substratın zamanla tükenmesiyle çözünmüş oksijen artmaya başlar. Maksimum çözünmüş oksijen miktarı kıtık prosesinde görülür ve bir müddet sonra sabitleşir. Bu yaklaşım karbon kaynağının PHA’ya dönüşümünü artırır ve glikojen ya da diğer hücre içi materyallere dönüştürmez. Bu yüzden de endüstride PHA üretiminin en umut verici sistemi olmuştur (Salehizadeh ve van Loosdrecht,

2004). Aerobik dinamik besleme koşullarında PHA üretiminin daha verimli, stabil olduğu ayrıca %65'den daha fazla PHA içeriğine rastlandığı rapor edilmiştir (Serafim ve ark., 2004).

Aerobik dinamik beslemeli sistemde verilen substratın glikojen gibi hücre içi başka bir materyale dönüşmeden mikroorganizmalar tarafından depo materyali olan PHB'ye dönüşmesi diğer 2 sisteme göre avantajıdır (Salehizadeh ve van Loosdrecht, 2004).

Yapılan literatür çalışmalarında bolluk prosesinde tüketilen substratın %66-100'ü PHA'nın depolanması için kullanılır. Geriye kalan substrat, büyüme ve mikroorganizmanın yaşamsal faaliyetleri için kullanılır. Polimerin depolanması ve biyokütle büyümesinin harici substratın aşırı olduğu zaman gerçekleşmekte olduğu ve PHB depolamasının aerobik dinamik beslemeli sistemlerde büyüme ile rekabet halinde olduğu ve depolamanın daha baskın olduğu rapor edilmiştir (Yaoping, 2007).

PHA oluşumu için aerobik metabolizma Şekil 2.10'da gösterilmiştir. Bu metabolik model van Aalst- van Leeuwen ve ark. (1997) ile Beun ve ark. (2000a,b) tarafından formüle edilmiştir. Bu model asetattan asetil-CoA'nın sentezi, anabolik reaksiyonlar, katabolik reaksiyonlar, elektron taşıma fosforilasyonu, asetil-CoA'dan PHA'nın sentezi ve PHA'den asetil-CoA'nın sentezi gibi birbirini takip eden reaksiyonları izlemektedir.



Şekil 2.10. Aerobik dinamik besleme prosesinde PHB üretim metabolizması (Grady ve ark., 1999).

Bolluk ve kıtlık proseslerinde karbon oksidasyonu için kullanılan elektron alıcısı oksijen ya da nitrat olabilir. SBR'da aerobik şartlar altında asetat alımının PHA depolanmasına oranı

yaklaşık 0,6 Cmol/Cmol'dür (çamur yaşı >2gün olan sistemlerde) (Filipe ve ark., 2001). Anoksik koşullar altında ise asetat alımının PHA depolamaya oranı 0,4-0,5 Cmol/Cmol'dür (Beun ve ark., 2002). Sonuç olarak spesifik PHA üretim oranı, anoksik şartlara kıyasla aerobik şartlarda daha yüksektir.

Yapılan tez çalışmasında aerobik dinamik beslemeli sistemler; işletim kolaylığı, daha az yatırım ve işletme maliyeti gerektirmesi, PHB depolayan mikroorganizmaların daha baskın hale getirilebilmesi ve yüksek PHB içeriğinin elde edilebilmesi gibi avantajlara sahip olmasından tercih edilmiştir.

2.4.3.1. ADB sistemlerde PHB üretimini etkileyen parametreler

PHB içeriğinin ve PHB üretim veriminin, geliştirilebilmesi ve iyileştirilebilmesi için aerobik dinamik besleme prosesleri için yapılan optimizasyon çalışmalarında sistem performansını etkileyen birçok parametrenin olduğu bildirilmiştir. pH, çözülmüş oksijen miktarı, substratın çeşidi, çamur yaşı ve C/N oranı araştırmacıların üzerinde en çok yoğunlaştığı parametrelerdendir.

2.4.3.1.1.Çözülmüş oksijen

Aerobik sistemlerde oksijen elektron alıcı olduğu için çözülmüş oksijen (ÇO) konsantrasyonu bolluk- kıtlık sistemlerinde önemlidir. Bolluk dönemi ÇO konsantrasyonunun düşük olduğu (2 mg O₂/L), famine dönemi ise ÇO konsantrasyonunun yüksek olduğu fazdır. ÇO'daki artış başlangıcı olarak adlandırılabilir. Bu dönemde ÇO 7mg/L den daha yüksek olduğu yapılan çalışmaların bir sonucudur.

Çözülmüş oksijen konsantrasyonunun artmasıyla substrat alımı artmaktadır. Sistem mekanizması gereği, bolluk döneminde substrat alınmasıyla bağlantılı olarak PHB veriminde de artış olmaktadır.

Bo ve Junxin (2009) PHB üretiminde optimum çalışma koşullarını belirlemek için yaptıkları çalışmada, PHB üretiminde üç kritik faktör olduğunu ve bunların ÇO, pH, besin/ mikroorganizma (F/M) olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada; aynı işletme koşullarında çözülmüş oksijen konsantrasyonlarını (%10, %20, %40, %70) değiştirerek değişimin PHB üretim verimini incelemişlerdir. % 10'luk ve % 70'lik ÇO konsantrasyonlarında PHB verimlerinin sırasıyla % 26 ve % 37 olduğunu bulmuşlardır. ÇO konsantrasyonu arttıkça asetat tüketiminin daha kısa sürede gerçekleştiği yani bolluk

döneminin daha kısa sürdüğü buna bağlı olarak da en yüksek PHB veriminin bu konsantrasyonda olduğu rapor edilmiştir.

Aktif çamur proseslerinde özellikle havalandırma fazında çözülmüş oksijen konsantrasyonu çok önemlidir. Suda çözünürlüğü az olan oksijenin sürekli sağlanması ve oksijen sınırlamasının önüne geçilebilmesi için oksijen transfer hızının oksijen kullanma hızından daha büyük olması gerekmektedir.

2.4.3.1.2. pH

Aerobik dinamik beslemeli sistemlerde pH'la ilgili yapılan çalışmaların çoğunda PHB depolanması için optimum pH aralığı 7-7.5 arasında tutulmaktadır (Krisha 1999; Beun 2000a; Dionisi 2004). Sistem incelendiğinde aerobik sistemin başında yani zamanla substratın tükenmesiyle sistemin pH'ının arttığı görülmüştür. pH kontrolünün yapılmadığı sistemlerde pH'ın 8-9.5 arasında olması da bunu desteklemektedir.

Bo ve Junxin (2009) yaptıkları bir çalışmada, işletme koşullarını sabit tutarak farklı pH'ların PHB verimine etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada işletme şartları 26.6 C-mmol /N-mmol, F/M: 1.0 (C-mmol C-mmol⁻¹); % 40 ÇO olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada 7, 8, 9 ve 10 pH değerleri denenmiş, en sonunda pH kontrolü yapılmamıştır. Kontrolsüz olsa da yapılan ölçümde pH'ın 8-9.5 arasında olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda zayıf alkali ortamlarında PHB verimlerinin değiştiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca pH 6 ve 11'de asetat tüketimi ve depolanmasının durduğu vurgulanmıştır. pH 6 iken asetat tüketimi inhibe olurken PHB'nin oluşumu durmuştur. Bunun nedenini olarak zayıf asit formlarında çamur içi asitleşme görüldüğünden bu sistemi inhibe ettiği vurgulanmıştır (Jones, 1986).

Serafim ve ark. (2004) yaptığı çalışmada farklı pH değerlerinin aerobik dinamik besleme mekanizmasına etkisini araştırmışlardır. Karbon kaynağı olarak asetat kullanılmıştır. Asetat miktarı 60 Cmmol/L, amonyum ise 0.7 N mmol/L olarak belirlenmiştir. Çalışmada 7, 8 ve kontrolsüz pH değerleri denenmiş ve diğer işletme parametreleri sabit tutularak PHB üretim verimleri değerlendirilmiştir. Değişen pH değerlerinde oluşan PHB içerikleri sırasıyla %27,5, %39,8, %47,5 olarak elde edilmiştir. pH değeri arttıkça asetatin büyük bir kısmının enerji için değil PHB depolanması ve büyüme için kullanıldığı rapor edilmiştir.

2.4.3.1.3. Substrat türü

Biyoplastik üretiminde karbon kaynağının önemli yeri vardır. Kullanılan karbon kaynağının cinsine göre depolanan PHA çeşidi değiştiği yapılan çalışmaların bir sonucudur. Substrat

maliyeti PHA üretiminin maliyetini etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Yapılan araştırmalar PHA maliyetinin % 40'ının substrattan meydana geldiğini ortaya konmuştur.

Endüstriyel uygulamalarda mikroorganizmalar tarafından kullanılabilen düşük maliyetli ve yüksek PHA üretilen bir substrat seçilmesi önemlidir. Son 10 yılda düşük maliyetli karbon kaynağı olarak tarım ve sanayi atıkları veya yan ürünleri (nişasta, peyniraltısuyu, ksiloz, melas vb.) ile saf kültürlerin PHA üretim çalışmaları hız kazanmıştır (Ediz ve Beyatlı, 2005). Asetat bolluk ve kıtlık koşullarında karışık kültürlerle yapılan çalışmalarda PHA üretimi için en iyi çalışılan substratlardan biridir. Ayrıca asetat tüketimiyle PHB homopolimeri oluşur ve polimer üretim hızı ise reaktör işletim koşullarına bağlı olmaktadır.

Karbon kaynağı olarak bütirat kullanıldığında ise, homopolimer olarak PHB elde edildiği gözlemlendiği halde asetatın tercih edilmesinin sebebi, tüketilen substrata karşı üretilen PHB 'nin daha az olması yani depolanan PHB veriminin daha az olmasıdır. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada; kesikli reaktörde döngü süresi 12 saat, çamur yaşı 6 gün olarak belirlenmiş ve depolanan PHA veriminin 0.44, PHA içeriğinin % 14.5, PHA bileşiminin ise PHB olduğu rapor edilmiştir (Dias ve ark., 2006).

Serafim ve ark. (2004) aerobik dinamik besleme ile yaptıkları çalışmada; kesikli sistem ile karbon kaynağı olarak 5.4g/L asetat kullanılmış ve döngü süresi 12 saat tutulmuştur. Karbon kaynağının inhibisyon etkisi göstermemesi için belirlenen miktar 3 seferde verilmiştir. Bu çalışmada; PHA depolama verimi 0.56, % PHA içeriği ise 65 olarak rapor edilmiştir. PHA bileşimi ise %100 PHB 'dir.

Dionisi ve arkadaşlarının (2004) asetat/propiyonat/laktat (%40/%20/%40) substrat karışımıyla yaptıkları çalışmada, PHA içeriğinin % 46 ve PHA bileşiminin ise kopolimer olan P(HB/HV) 69/31 olduğu rapor edilmiştir

Lemos ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, karbon kaynağı olarak propiyonat (0.63g/L) kullanılmış, kesikli reaktörde döngü süresi 12 saat olarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmanın sonucunda % PHA içeriğinin 13.6 olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca PHA birleşimi P(HB/HV/HMV) 12:61:27 olarak belirlenmiştir. Daha sonra yine bu çalışmada karbon kaynağı olarak propiyonat+asetat (0.75 g/L) karışımı denenmiş ve diğer işletme parametreleri değiştirilmemiştir. PHA içeriği % 25.4'e yükselmiş ve PHA bileşim oranları ise P(HB/HV/HMV) 54:33:13 olarak rapor edilmiştir.

Serafim ve ark. (2006) karbon kaynağı olarak fermente melas ile yaptıkları çalışmada PHA içeriği %31; PHA bileşimi ise P(HB/HV) 47:53 olarak rapor edilmiştir.

Ramsay ve ark. (1990), *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas pseudoflava*, *Pseudomonas cepacia* ve *Micrococcus halodenitrificans* bakterilerini glikoz ve propiyonik asit bulunan ortamda geliştirdiklerinde ve nitrojeni sınırlandırdıklarında P(HB-co-HV) kopolimeri ürettiklerini tespit etmişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar, kopolimer içindeki HV oranının propiyonik asit miktarına bağlı olarak değiştiğini de saptamışlardır.

Durner ve ark. (2000), *Pseudomonas oleovorans* ile yaptıkları çalışmada, oktonat ve amonyum içeren besiyerini farklı C/N oranlarında hazırlamışlar ve C/N oranı arttığında PHA birikimini yükseldiğini ve bunun nitrojenin sınırlanmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Bertrand ve ark. (1990); *Pseudomonas pseudoflava* ile yapılan bir çalışmada karbon kaynağı olarak glukoz ve ksiloz kullanıldığında %PHB verimimin %22, arabinoz kullanılırsa %17 olabileceği rapor etmişlerdir. Araştırmanın devamında arabinoz ve ksiloz içeren ortamda, PHB biriktirilmesinin son aşamasında nitrojen sınırlandırıldığında PHB miktarının düştüğünü de bildirmişlerdir.

Page ve ark. (1995), *Azotobacter vinelandi* suşunu, glikoz ve balık peptonu içeren besi ortamında geliştirdiklerinde %80 PHB verimine ulaşmışlardır. *Rhizobium meliloti*'nin fruktozlu ortamda üretildiğinde yüksek miktarda PHB depo ettiği bildirilmiştir. Ayrıca amonyum klorür amonyum asetat, balık peptonu, amonyum sülfat vb. azot içeren kaynakların PHB verimini arttırıcı etkisi olduğunu vurgulamıştır (Braunegg ve ark., 1998).

2.4.3.1.4. Çamur yaşı

Literatürde yapılan çalışmalarda çamur yaşı 2 günden fazla seçilmiştir. Bunun sebebi olarak, düşük çamur yaşlarında substratın büyük bir miktarının mikroorganizmanın büyümesi için kullanıldığı ve PHA depolanma veriminin düşük olduğu rapor edilmiştir. Çalışmaların ilk aşamasını oluşturan biyokütlenin çoğalması ve adaptasyon süresince çamur yaşının düşük tutulduğu görülmüştür.

Chua ve ark. (2003) farklı çamur yaşları ile yaptıkları çalışmada, çamur yaşını 3 gün tuttuklarında PHA içeriği %31 iken, çamur yaşı 10 gün iken % 21 olduğunu rapor etmişlerdir. Çamur yaşı 10 gün olduğunda biyokütle konsantrasyonu, çamur yaşı 3 gün olana göre 4 kat daha yüksek olmasına rağmen, daha düşük PHA içeriğine sebep olmasına dikkat çekmişlerdir. Bunun nedeninin her iki çalışmada karbon kaynağının miktarının aynı olduğu fakat çamur

yaşı 10 gün olduğunda birim biyokütle başına düşen PHA miktarının daha az olduğundan kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Martins ve ark. (2003) farklı çamur yaşları (1-6.9 gün) deneyerek yaptıkları çalışmada, kesikli sistem ile çalıştırılmış karbon kaynağı ise asetat kullanılmıştır. Döngü süresi 8 gün ve diğer işletme parametreleri aynı tutulmuştur. Bu çalışmada PHA depolama veriminin yüksek çamur yaşında daha fazla olduğu rapor edilmiştir.

Düşük çamur yaşları aerobik dinamik besleme mekanizmasında sistem performansını azaltmaktadır

2.4.3.1.5. C/N oranı

PHB üretimini etkileyen parametrelerden biriside C/N oranıdır. Biyokütlenin önemli nütrientlerinden birisi azottur ($C_5H_7O_2N$). Mikroorganizmalar bünyesinde azotu amonyum olarak alırlar. PHB mikroorganizmada depolandığından verilen amonyum miktarı bu sistemler için önemlilik kazanmaktadır. Yapılan çalışmalarda verilen amonyum kaynağına karşı verilen substratın da sistem performansını etkilediği gözlenmiştir.

Serafim ve ark. (2004) değişen amonyum konsantrasyonlarına karşı depolanan PHB miktarını araştırmışlardır. 0 Nmmol/L, 0.7 Nmmol/L ve 2.8 Nmmol/L konsantrasyonlarında yaptıkları bu çalışmada, substrat başına düşen PHB sırasıyla 0.83 CmmolHB/CmmolHA; 0.72 CmmolHB/CmmolHA, 0.37 CmmolHB/CmmolHA olarak elde edilmiştir. Amonyum miktarı arttıkça büyüme için kullanılan karbon miktarı artarken, PHB depolanma veriminin azaldığı rapor edilmiştir. Biyokütlerdeki PHB içeriği ise en yüksek 0.7 Nmmol/L azot konsantrasyonunda % 38.6 olarak elde edilirken, 2.8 Nmmol/L azot konsantrasyonunda %25.4 olarak elde edilmiştir. Ayrıca amonyum kaynağının artmasıyla büyümenin baskın geldiği rapor edilmiştir.

Fang ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada farklı amonyum konsantrasyonlarının PHB depolamasına etkisi araştırmışlardır. Çalışmada KO_2/N oranı 40' da sabit tutulmuştur. Farklı amonyum konsantrasyonları olarak 8,5 mg/L, 12,5 mg/L belirlenmiş ve amonyum konsantrasyonu 12.5 mg/L iken çamur konsantrasyonu 1700 mg/L; amonyum konsantrasyonu 8.5 mg/L'ye düşürüldüğü zaman çamur konsantrasyonunun 1000 mg/L'ye azaldığı gözlenmiştir. Mikroorganizmadaki azalışa bağlı olarak da PHB depolanma veriminde artış gözlenmiştir.

2.4.3.2. ADB sistemlerde farklı döngü sürelerinin PHB üretim verimine etkisi

Döngü süresi, PHB üretiminde sistem performansını etkileyen parametrelerden biridir. Aerobik dinamik beslemeli sistemler de döngü süresiyle yapılan literatür çalışmaları sınırlıdır. Yapılan çalışmalarda döngü süresinin artmasıyla bolluk süresinin değişmediği, buna bağlı olarak kıtlık döneminin uzadığı görülmüştür. Kıtlık döneminin uzamasıyla açlık hali arttığı için bolluk döneminde substratın daha çabuk tüketilmesi ve daha verimli PHB depolanmasını sağladığı rapor edilmiştir.

Johnson ve ark. (2009) farklı döngü süreleriyle (4 ve 12 saat) yaptıkları çalışmada, AKR sistemde çamur yaşı 1 gün, sıcaklık 20⁰C ve C/N oranı 8Cmol/Nmol olarak belirlenmiş ve diğer işletme parametreleri sabit tutulmuştur. Döngü süresi 12 saat tutulduğunda kıtlık döneminin daha uzun sürmesinden dolayı, bolluk döneminde yüklenen aşırı substratın hemen tüketildiği PHB depolanmasının veriminin de arttığı rapor edilmiştir.

Yapılan literatür çalışmalarında farklı döngü süreleri kullanılmıştır. Döngü süresi 12 saat olan çalışmalarda elde edilen PHB içerikleri % 69 (Johnson ve ark., 2010), % 67.5 (Serafim, 2004), % 30 (Albuquerque ve ark., 2007), % 25.4 (Lemos ve ark., 2006), 14.5 (Lemos ve ark., 2006); döngü süresi 6 saat olan çalışmalarda PHB içeriği %47 (Beccari ve ark., 2002) ; % 37 (Dionisi ve ark., 2004); döngü süresi 4 saat olan çalışmalarda elde edilen PHB içeriği % 40 (Beun ve ark., 2002) %36.3 (Third ve ark.,2003), %11.8 (Martins ve ark., 2003), döngü süresi 96 saat olan çalışmada PHB içeriği ise % 33.7 (Dın ve ark., 2008); döngü süresi 2 saat olan çalışmalarda ise % PHB içeriği ölçülememiştir.

Literatürde aynı döngü süresine sahip çalışmalarda PHB içeriklerinin farklı olduğunu gözlemlenmesine rağmen aynı işletme parametrelerine sahip olmadığından karşılaştırma yapılamamaktadır. Bu çalışmada farklı döngü sürelerinin karşılaştırılmasıyla ilgili yapılan araştırmaların kısıtlı olması nedeniyle literatürdeki eksikliğin giderilmesi amaçlanmaktadır.

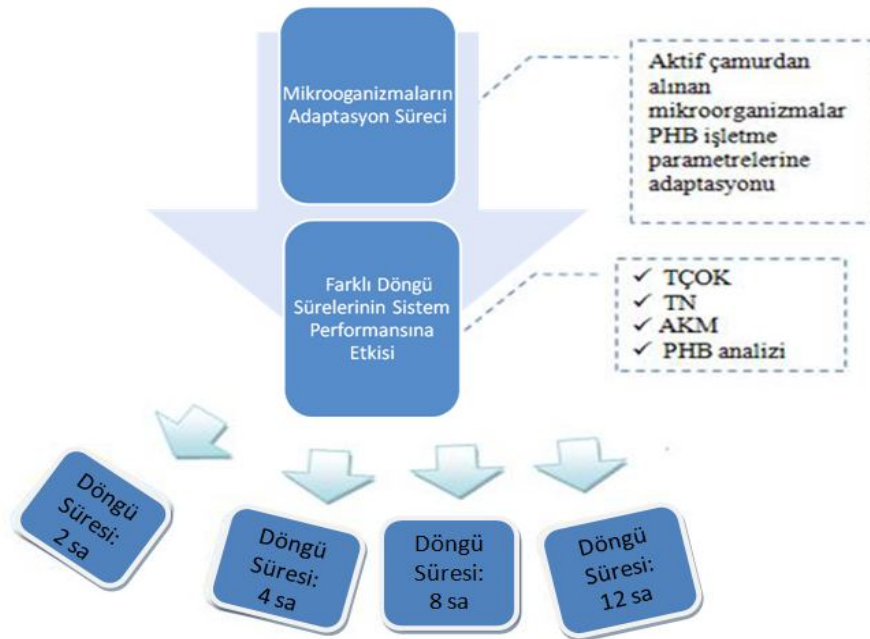
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deneysel Plan

Çalışma boyunca ardışık kesikli biyoreaktörlerde aerobik dinamik beslemeli sistem kullanılarak, farklı döngü sürelerinin mikroorganizmada depolanan PHB verimine etkisi araştırılmıştır. PHB'nin üretim verimi; toplam çözünmüş organik madde ve toplam azot analizleri yapılarak sistem performansı değerlendirilmiştir. Bu tez çalışmasına ait deneysel plan Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Bu çalışmada öncelikle aktif çamur prosesinin aerobik kısmından alınan mikroorganizmaların 1-2 hafta PHB işletme parametrelerine adaptasyonu için beklenilmiştir.

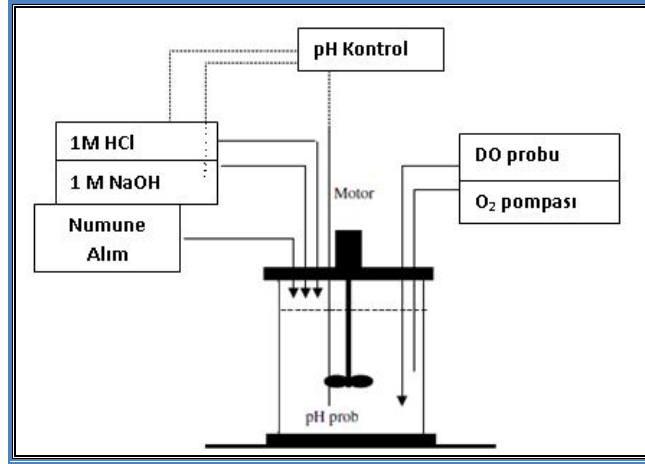
Adaptasyon sürecinden sonra çalışmanın amacı olan farklı döngü sürelerinin PHB depolanma verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Her farklı döngü süresince diğer işletme parametreleri sabit tutulmuştur. PHB üretmek amacıyla, karbon kaynağı olarak sodyum asetat (CH_3COONa), azot kaynağı olarak amonyum klorür (NH_4Cl) kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmanın deneysel planı

Çalışma boyunca işletme ve kontrol bakımından esnek bir sistem olan uygulamaya yönelik Ardışık kesikli reaktör (AKR) sistemi, (Sartorius Stedim, Biostat B plus, Melsungen, Almanya) kullanılmıştır (Şekil 3.2). Reaktörün çalışma hacmi 5L olarak belirlenmiştir.

Mikroorganizmaların karışması 250 rpm’de sağlanmıştır. Sıcaklık su ceketı yardımıyla 20⁰C’de sabit tutularak ve cihaz tarafından kontrol edilmiştir. PHB üretiminde pH 8-9.5 arasında seyrettiğinden pH’ın 7.5 ‘da sabitlenebilmesi pH düşürülmesi veya artırılması istendiğinde hazırlanan 1M NaOH ve 1M HCl çözeltilerine bağlı pompalar kullanılarak cihaz tarafından kontrol edilmiştir. Bolluk döneminde asetatın tüketilmesiyle oluşan değişimler çözünmüş oksijen probuyla cihaz tarafından kontrol edilmiştir



Şekil 3.2. AKR'nin şematik gösterimi

Sistem 8 günlük çamur yaşı ile çalıştırılmıştır. Günlük deşarj edilen biyokütle miktarı ile çamur yaşının sabit kalması sağlanılmıştır. Çamur yaşı (SRT) Garrett yöntemi ile ayarlanmıştır. Konvansiyonel yöntemlerde çamur, son çökeltim havuzunda çökelen çamurun uzaklaştırılmasıyla; Garret yönteminde ise karışım halindeki reaktörden direkt alınan çamur+su uzaklaştırılmasıyla SRT ayarlanmaktadır (Denklem 3.1).

$$SRT \text{ (gün)} = \frac{V \text{ (m}^3\text{)} X \left(\frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right)}{F_w \left(\frac{\text{m}^3}{\text{gün}} \right) X_w \left(\frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right)} \quad (3.1)$$

V: Son çökeltim havuzu hacmi

X: Son çökeltim havuzundaki mikroorganizma konsantrasyonu

F_w: Çekilen çamurun debisi

X_w: Çekilen çamurdaki mikroorganizma konsantrasyonu

Garrett yönteminde çamur reaktör içerisinde alınacağından ve reaktör içerisindeki mikroorganizma konsantrasyonu ile atılan çamur+su içerisindeki mikroorganizma konsantrasyonu eşit olacağından SRT, Denklem 3.2’de gösterildiği şekle dönüşür.

$$SRT \text{ (gün)} = \frac{V \text{ (m}^3\text{)}}{F_w \left(\frac{\text{m}^3}{\text{gün}} \right)} \quad (3.2)$$

Çalışmada kullanılan reaktör 5L olduğundan 8 günlük SRT’yi sağlayabilmek için reaktörden günlük 625 ml (çamur +su) alınmıştır. Alınan çamur sistemin döngü süresinin sonundan reaktör tam karışım halindeyken çöktürme sürecinin hemen öncesinden alınmıştır.

Çalışmada farklı döngü sürelerinin PHB üretim verimine olan etkisi incelenmiştir. Denenecek döngü süreleri olarak 2sa, 4sa, 8sa , 12sa belirlenmiştir. Bu döngü sürelerinin 1 saati, çöktürme, boşaltma, doldurma ve oksijenle doyurma (10 dk) olarak kullanılacak olup geriye kalan saati ise reaksiyon süresi olarak değerlendirilmiştir. Reaktörlerin doldurulması ve boşaltılmasında peristaltik pompa kullanılmıştır.

3.2. Simüle Atıksu

Çalışmada aerobik ortamda mikroorganizmanın PHB üretmesi için ve aynı zamanda atıksu özelliği göstermesi için sentetik atıksu hazırlanmıştır. Atıksu içeriğinin mikroorganizmanın gelişmesi için makro ve mikro elementler ilave edilmiştir (Tablo 3.1).

Sentetik atıksuya karbon kaynağı olarak 1000 mg/L KOİ (31.5 mM C) ilave edilmiş ayrıca amonyum kaynağı olarak da 11.28 mg/L N verilmiştir

Hazırlanan makro nütrient çözeltisinde önce pH 7.2’ye ayarlanılmıştır. pH ‘ı ayarlanmış çözelti sterilizasyon işleminden geçirildikten sonra fosfor çözeltisi ilave edilmiştir. Mikro nütrient çözeltisinden 2 mL makro nütrient çözeltisine eklenerek sentetik atık su hazırlanmıştır.

3.3. Analitik Metotlar

Çalışma boyunca farklı döngü sürelerinin AKR’de işletimine bağlı olarak PHB üretimi ve verimliliği açısından incelenmiştir. Farklı döngü sürelerinin etkisi, toplam çözünmüş organik karbon, toplam azot PHB ekstraksiyonu ve GC’de ölçümü analizleri yapılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.1: Simüle atık suyu içeriği (Serafim ve ark., 2004)

Makro elementler	Konsantrasyon mg/L	Mikro elementler	Konsantrasyon mg/L
CH ₃ COONa	2140	FeCl ₃ . 6H ₂ O	1500
NH ₄ Cl	43	H ₃ BO ₃	150
MgSO ₄ . 7H ₂ O	600	CoCl ₂ . 6H ₂ O	150
EDTA	100	MnCl ₂ .4H ₂ O	120
CaCl ₂ . 2H ₂ O	70	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	120
KH ₂ PO ₄	45	Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	60
K ₂ HPO ₄	92	CuSO ₄ .5H ₂ O	30
		Nitrifikasyon İnhibitörü	10

3.3.1. Askıda katı madde tayini (AKM)

Çalışmada AKM tayini 2540B standart yöntemine (APHA, 2005) uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Filtre kağıdı (0,45 µm çaplı, selüloz asetat filtre) ilk olarak etüvde (Ecocell, EC111, Planegg, Almanya) 103–105 °C’de 1 saat kurutulduktan sonra etüvden alınan filtre kağıdı 30 dakika boyunca desikatörde sabit tartıma gelinceye kadar bekletilmiştir ve tartılmıştır (Ohaus, Pioneer™, Pine Brook, Nj USA). Ardından reaktörden karışım halinde alınan 50 mL’lik numune filtre kağıdından süzülmüştür. 103–105 °C’de etüvde 1 saat kurutularak desikatörde bekletildikten sonra tartılmıştır. Tartımlar sonucunda elde edilen veriler, aşağıda yazılan denklemde (Denklem 3.3) yerlerine konularak askıda katı madde miktarı belirlenmiştir.

$$AKM \text{ (mg/L)} = [(B-A) \times 1000] / C \quad (3.3)$$

A = Filtre kağıdı + Filtre edilebilen madde (mg)

B = Filtre kağıdının ağırlığı (mg)

C = Numune hacmi (ml)

3.3.2. Toplam organik karbon (TOK) analizi

Aerobik dinamik besleme prosesinde sabit konsantrasyonda eklenen ve mikroorganizma tarafından kullanılan asetatın zamana bağılı olarak tüketimi, belirlenen zaman aralıklarında alınan numunelerdeki TOK miktarını belirlemede, Toplam Organik Karbon (TOC) (Teledyne Tekmar, Torch, USA) cihazında ölçülmüştür. Cihaz kalibrasyonu, analizi yapılacak numunelerin yaklaşık TOK değeri baz alınarak yapılmıştır. TÇOK kalibrasyonu için 500 ppm'lik stok çözelti kullanılarak, 10 -500 ppm aralığında 7 noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

3.3.3. Toplam azot (TN) tayini

Aerobik dinamik besleme prosesinde sisteme amonyum halinde verilen ve mikroorganizma tarafından kullanılan azot miktarı TOK ölçüm cihazının toplam azot ölçüm ünitesinde (Shimadzu, TNM-1, Kyoto, Japonya) TN ölçüm parametresiyle ölçülmüştür.

TN kalibrasyonu için 50 ppmlik stok çözelti kullanılarak 0–50 ppm aralığında 7 noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur ve kalibrasyon 10 ppm ile kontrol edilmiştir.

3.3.4. PHB ekstraksiyonu

PHB ekstraksiyonu, AKR sistemlerinden alınan ve askıda katı madde miktarı önceden belirlenmiş çamura yapılmıştır. Çalışma boyunca belirlenen zaman aralıklarında tam karışımli biyoreaktörden ekstraksiyon için 20 ml numune alınmış ve biyolojik aktiviteyi durdurmasından dolayı birkaç damla formaldehit eklenip santrifüj (Hermle, Z 200A, Wehngen, Almanya) edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı dökülmüştür. Ttüpteki çamurun üzerine 5 mL fosfat tamponu (0,58 g/L K_2HPO_4 ve 0,23 g/L KH_2PO_4) ilave edilmiştir. Tekrar santrifüj edilerek üstteki sıvı dökülmüştür.

Elde edilen çamur $105^{\circ}C$ 'de 16- 20 saat kurutulmuştur (Comeau ve ark., 1988). Kurutulan numunelere ve PHB konsantrasyonunu belirlemede referans olan PHB standardına (Sigma) aynı işlemler uygulanmıştır. Numune ve PHB standardı kapaklı tüplere konularak üzerine 1,5 mL kloroform, 1,5 mL asitlendirilmiş metanol (% 3'lük H_2SO_4) ilave edilerek $100^{\circ}C$ ' de 4 saat bekletilmiştir. Süre tamamlandıktan sonra oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletilmiştir. Gaz kromatografi cihazına zarar vermemesi ve kloroform fazındaki partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 1,5 ml saf su eklenerek 5 dk 2500 rpm'de santrifüj edilerek faz

ayrımının gerçekleşmesi sağlanmıştır (Comeau ve ark., 1988). Ayrılan organik faz (kloroform fazı) viallere aktarıldıktan sonra, PHB konsantrasyonunu belirlemek için kloroform fazı, gaz kromatografi cihazında ölçülecek hale getirilmiştir (Oehmen ve ark., 2005).

3.3.5. PHB analizi

PHB konsantrasyonunu ölçebilmek için ekstraksiyon işlemi sonunda hazırlanan organik faz GC cihazına (Shimadzu, GC-2010) verilmiştir. PHB konsantrasyonu, alev iyonizasyon dedektörü ve BPX5 kolon (60 m × 0.32 mm × 0.25 µm) aparatlarına sahip Gaz Kromatografisi (GC) (Shimadzu, GC-2010) cihazında belirlenmiştir. Kolon içinden örneğin taşınması için taşıyıcı gaz olarak He kullanılmıştır. Enjektör gaz olarak da kuru hava, helyum ve N₂ tüpleri kullanılmıştır. PHB konsantrasyonu belirlemede kullanılacak metotta başlangıç fırın sıcaklığı 80°C belirlenmiştir. 1 dk sonra sıcaklık 10°C'lik artışlarla 120°C ye yükselip 3dk beklendikten sonra 45°C'lik artışla 270°C ye gelerek ve bu sıcaklıkta bekleme süresi 20 dk'ya ayarlanmıştır. Enjektör sıcaklığı 250°C, dedektör sıcaklığında 300°C olarak belirlenmiştir. Basınç 320 kPa'a ayarlanarak cihaz otomatik olarak toplam akışı ayarlamıştır. GC'ye numuneler verilmeden farklı konsantrasyonlarda enjekte edilen PHB standartları ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve daha sonra numuneler enjekte edilip ölçülen PHB konsantrasyonları ile sistem performansı belirlenmiş ve farklı işletim parametreleri karşılaştırılmıştır.

3.4. Hesaplamalar

Yapılan analizler sonucunda mikroorganizmadaki PHB içeriği aşağıda verilen denklem (denklem 3.4) ile hesaplanmıştır.

$$\%PHB = (PHB / AKM) \times 100 \quad (3.4)$$

Tüketilen substrata karşı oluşan PHB (Cmmol PHB/Cmmol Asetat) ya da aktif biyokütle (Cmmol X/Cmmol Asetat) verimleri; tüketilen substrat tarafından formlanan PHB miktarı ve aktif biyokütle miktarı ölçülerek bulunmuştur.

Spesifik PHB depolama hızı (Cmmol PHB/Cmmol X.h), spesifik asetat alım hızı (Cmmol Asetat/ Cmmol X.h), spesifik amonyum alım hızı (Nmmol/Cmmol X.h) ve spesifik PHB tüketim hızı (CmmolPHB/Cmmol X.h) yapılan deneyler boyunca elde edilen veriler sonucunda hesaplanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Tezin deneysel çalışmalarında elde edilen veriler bu bölümde sunulmuş ve tartışılmıştır. Bu çalışmada aerobik dinamik beslemeli sistem kullanılarak farklı döngü sürelerinin PHB depolama verimine etkisini incelenmesi amaçlanmıştır. Literatürde farklı döngü süresiyle ilgili çalışma olmamasından dolayı yapılacak çalışmanın literatüre katkıda bulunacağı düşünülmüştür. Çalışmada döngü süresi dışındaki parametreler sabit tutularak (karbon konsantrasyonu, azot konsantrasyonu, SRT, sıcaklık.vs.) her bir döngü süresi için TOK, ÇO, ORP, PHB analizleri yapılmıştır. Elde edilen veriler, çalışmalarda kullanılan farklı döngü sürelerine göre ayrılmıştır. Deneysel veriler iki tekrarlı olarak toplanmış ve elde edilen bulgular aşağıda tartışılmıştır.

4.1. Farklı Döngü Sürelerinin TOK Giderim Verimine Etkisi

Aerobik dinamik beslemeli sistemlerde elektron alıcısı oksijen elektron vericisi ise ortamda bulunan organik bileşiklerdir. PHB'nin mikroorganizmalar tarafından depolanması indirgenme yükseltgenme reaksiyonlarına gerçekleşmektedir. Tez çalışmalarında simüle atıksu kullanılarak, sisteme elektron verici, karbon ve enerji kaynağı olarak asetat eklenmiştir. Sistemde depolanacak biyoplastik maddesinin PHB olması istendiğinden elektron verici olarak asetat kullanılmıştır. Elektron verici kaynağın yükseltgenmesi ile açığa çıkan elektronlar, sistemdeki elektron alıcısı kaynağı olan oksijen ile buluşarak PHB'nin mikroorganizma bünyesinde depolanması gerçekleşmektedir. Bu nedenle elektron verici kaynağının (TOK) sistemde zamanla nasıl değiştiğinin bilinmesi, sistem performansının belirlenmesinde önemlidir.

Mikroorganizmalar, organik maddeyi karbon-enerji kaynağı olarak kullanmakta ve yaşamsal faaliyetlerini gerçekleştirmektedir. Aerobik dinamik beslemeli sistemlerde mikroorganizmalar şok organik yüklemelere maruz kalırlar ve organik kaynağın tükenmesi için belirli bir reaksiyon süresi uygulanması gerekmektedir. Bu reaksiyon süresi tamamlandığında arıtılmış suyu uzaklaştırmak için mikroorganizmalar çöktmeye bırakılır. Arıtılmış su reaktörden uzaklaştırıldığında tekrar organik karbon yüklü atıksu reaktöre alınarak yeni bir döngü başlatılmış olmaktadır. Tez çalışmasında farklı döngü süreleri uygulanarak mikroorganizmaların PHB depolama yetenekleri karşılaştırılmıştır.

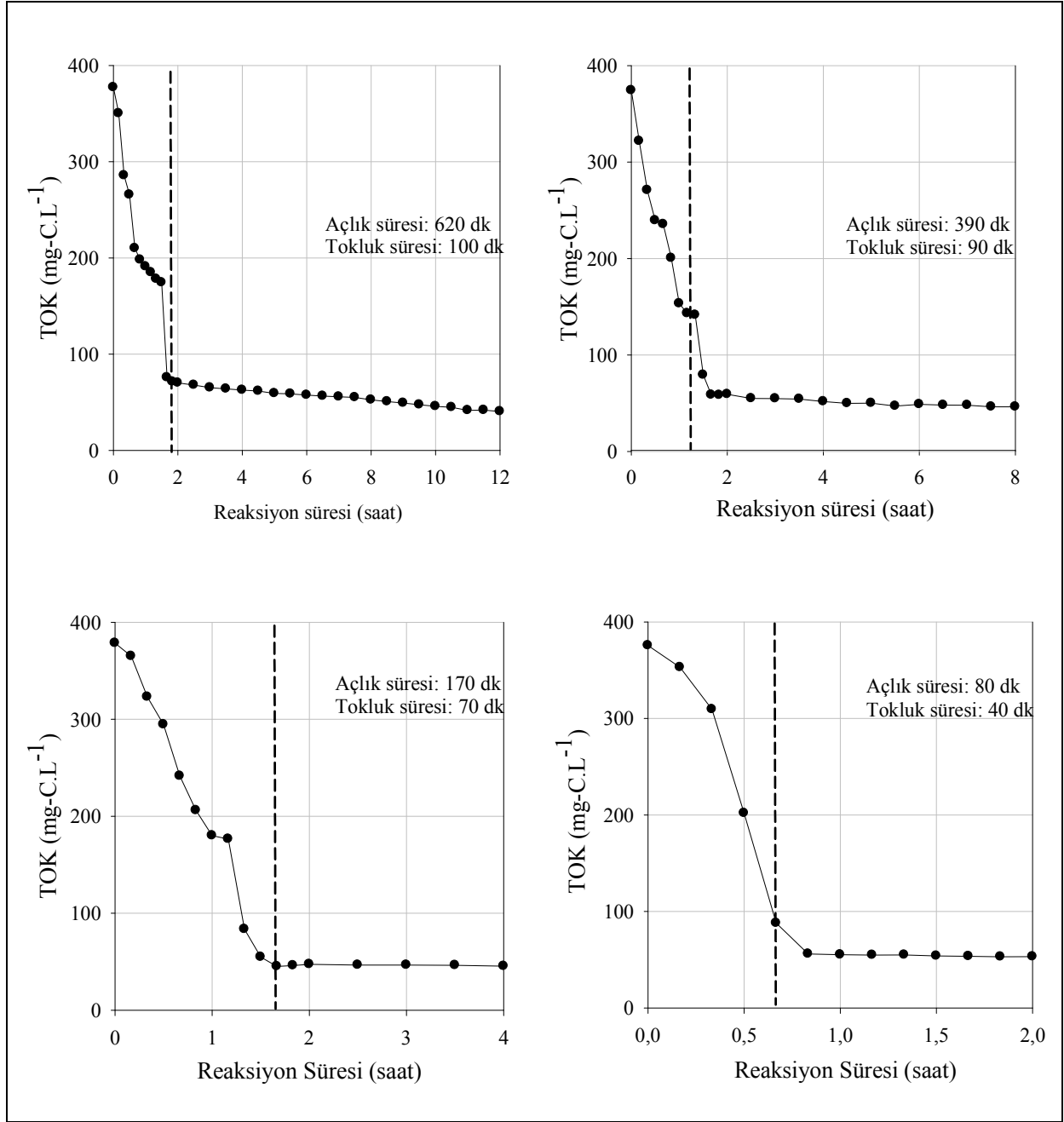
Çizelge 4.1. Farklı döngü sürelerinde gözlemlenen açlık-tokluk süreleri

Döngü süresi (sa)	Açlık (dk)	Tokluk (dk)	Açlık (%)	Tokluk(%)
12	620	100	86,1	13,8
8	390	90	81,25	18,75
4	170	70	70,83	29,1
2	80	40	66,6	33,3

Çizelge 4.1.'de farklı döngü sürelerinde gözlemlenen açlık ve tokluk süreleri verilmiştir. Tokluk süresi, ortamda TOK'un tükendiği ve çözünmüş oksijenin artmaya başladığı zaman aralığı olarak değerlendirilmektedir. Açlık süresi ise oksijenin artmaya başladığı zaman ile organik karbon yüklemesine kadar geçen zaman aralığı olarak değerlendirilmektedir. Toplam döngü süresinin azalması ile elde edilen açlık süreleri azalmakta tokluk süreleri ise artmaktadır.

Şekil 4.1.'de sistemdeki farklı döngü sürelerine maruz kalan mikroorganizmaların TOK giderim verimleri sunulmuştur. Döngü süresinin azalması yapılan günlük organik yükü arttığı için TOK giderim veriminde azalma görülmektedir. Döngü süresi 12 sa olan çalışma koşullarında TOK giderim verimi % 90 iken, döngü süresi 2 sa olan çalışma koşullarında TOK giderim verimi %85 olarak elde edilmiştir. 2 sa döngü süresinin kullanıldığı çalışma koşullarında elde edilen düşük TOK giderim verimi uygulanan reaksiyon süresinin yetersiz kaldığını göstermektedir.

Aerobik dinamik sistemlerde döngü süresi kendi içinde açlık ve tokluk fazlarından meydana gelmektedir. Döngü süresinin azalmasıyla tokluk süresi yani mikroorganizmanın TOK tükettiği süre azalmaktadır. Döngü süresi 12 sa iken sistemdeki TOK'u 1 sa 66 dk'da tüketirken, döngü süresi 2 sa olan sistemde TOK'u 0,6 saatte büyük bir kısmını tüketmiştir. Döngü süresinin artması ile açlık süresinin artmasını ilişkilendirirsek açlık fazında sisteme daha uzun süre oksijen verildiğinden döngü süresi arttıkça TOK giderim veriminin de arttığı görülmüştür.



Şekil 4.1. Farklı döngü sürelerinin TOK giderim verimine etkisi

4.2. Farklı Döngü Sürelerinin ÇO Profiline Etkisi

Aerobik dinamik sistemlerde tokluk ve açlık sürelerinin belirlenmesinde en önemli parametrelerinden birisi çözünmüş oksijendir. Açlık fazının sonunda çözünmüş oksijen en yüksek değerde iken tokluk fazının sonunda en düşük değerde olduğu gözlenmiştir.

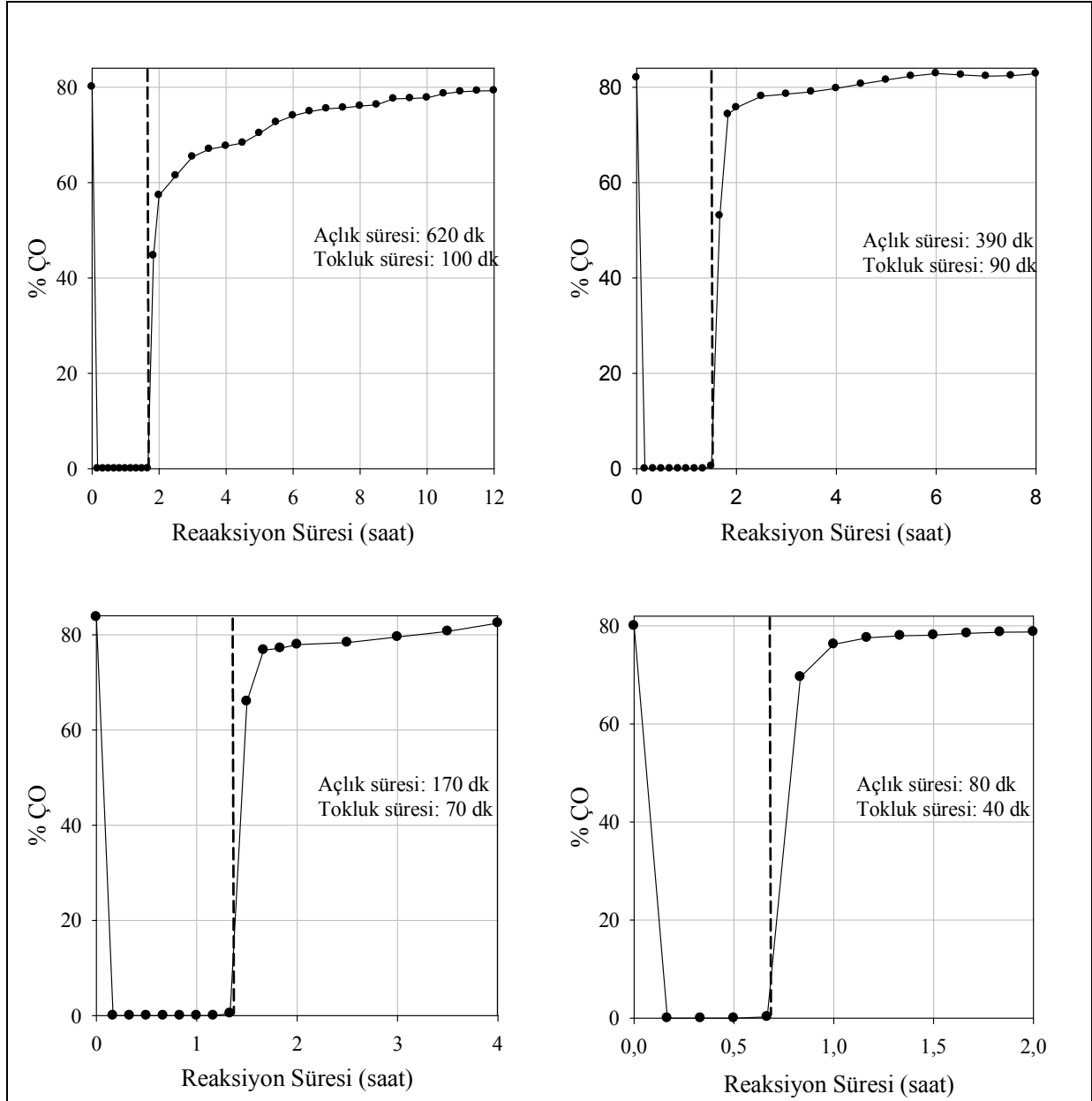
Sistemde PHB depolanmasının gerçekleşebilmesi için karbon kaynağına (elektron) ihtiyaç vardır. Sisteme eklenen asetat bu ihtiyacı karşılamaktadır. Asetatın parçalanmasıyla açığa çıkan elektronlar elektron alıcısına yani oksijene taşınmaktadır. Sonuç olarak asetat

yükseltgenme reaksiyonunu gerçekleştirerek, biyokimyasal süreçte oksijenin indirgenmesi ve PHB olarak depolanması için gereken elektronları sağlamaktadır.

ÇO konsantrasyonu substrat eklenmesi ile ani olarak azalmakta tokluk periyodu boyunca neredeyse sabit kalmaktadır ve karbon kaynağı tükendiğinde artmaya başlamaktadır. Çalışma bulguları tokluk periyodu boyunca tüketilen substratın PHB depolamada, hücre büyümesinde ve oksijen respirasyonunda kullanıldığını göstermektedir. Tokluk periyodunun sonu ve açlık periyodunun başlangıcı ÇO seviyesindeki ani artış ile tanımlanmaktadır. Bu noktada hücre içinde depoladığı PHB'yi tüketmeye başlamaktadır.

Bo ve Junxin (2009), aerobik dinamik beslemeli sistemi kullanarak 5 farklı ÇO doygunluk seviyesinin (%70, 40, 20 ve 10) PHB üretim verimine olan etkisini denemiş ve ÇO doygunluk seviyesi arttıkça PHB içeriğinde arttığını gözlemlenmiştir. Bu çalışmayı referans olarak çalışmada kesikli sistem kullanıldığı için doldur-boşaltma işlemlerinden sonra her yeni döngüye başlandığında % ÇO seviyesinin % 80'lere gelmesi beklenerek yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir ve sistemde çözünmüş oksijen online olarak kaydedilmiştir. Çalışmada farklı döngü sürelerinde % ÇO profili hakkında bilgi elde edilmiştir. Çalışmada denenmiş olan her döngü süresinde % ÇO'nin ilk dakikalarda sıfırlandığı görülmüştür. % ÇO döngü süresi 12 sa iken 1 dk'da sıfırlanırken, döngü süresi 2 sa iken 3 dk'da sıfırlanmıştır. Döngü süresinin artmasıyla sistem daha fazla açlık fazına maruz kalmıştır ve buna bağlı olarak da mikroorganizmalar karbon kaynağını ilk zamanlarda daha hızlı tüketmişlerdir.

Sistemde ortalama % 80'lerde olan çözünmüş oksijen seviyesi karbon kaynağının eklenmesiyle mikroorganizmalar tarafından tüketilmeye başlanır ve tokluk zamanı başlamış olur. Çözünmüş oksijen seviyesinin artmasıyla sistemde artık inert ya da çok yavaş çözünen karbon kaynaklarının kalması ve mikroorganizmaların bu kaynakları hızlı bir şekilde kullanamamalarından dolayı tokluk fazı yerini açlık fazına bırakmıştır. Çalışmada döngü süresinin azalmasıyla mikroorganizma stres koşullarına maruz kaldığından karbon kaynağını daha hızlı tüketir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi 12 sa, 8 sa, 4 sa, 2 sa döngü sürelerinin tokluk zamanları sırasıyla 1,6 sa, 1,5 sa, 1,33 sa ve 0,66 sa olarak elde edilmiştir.

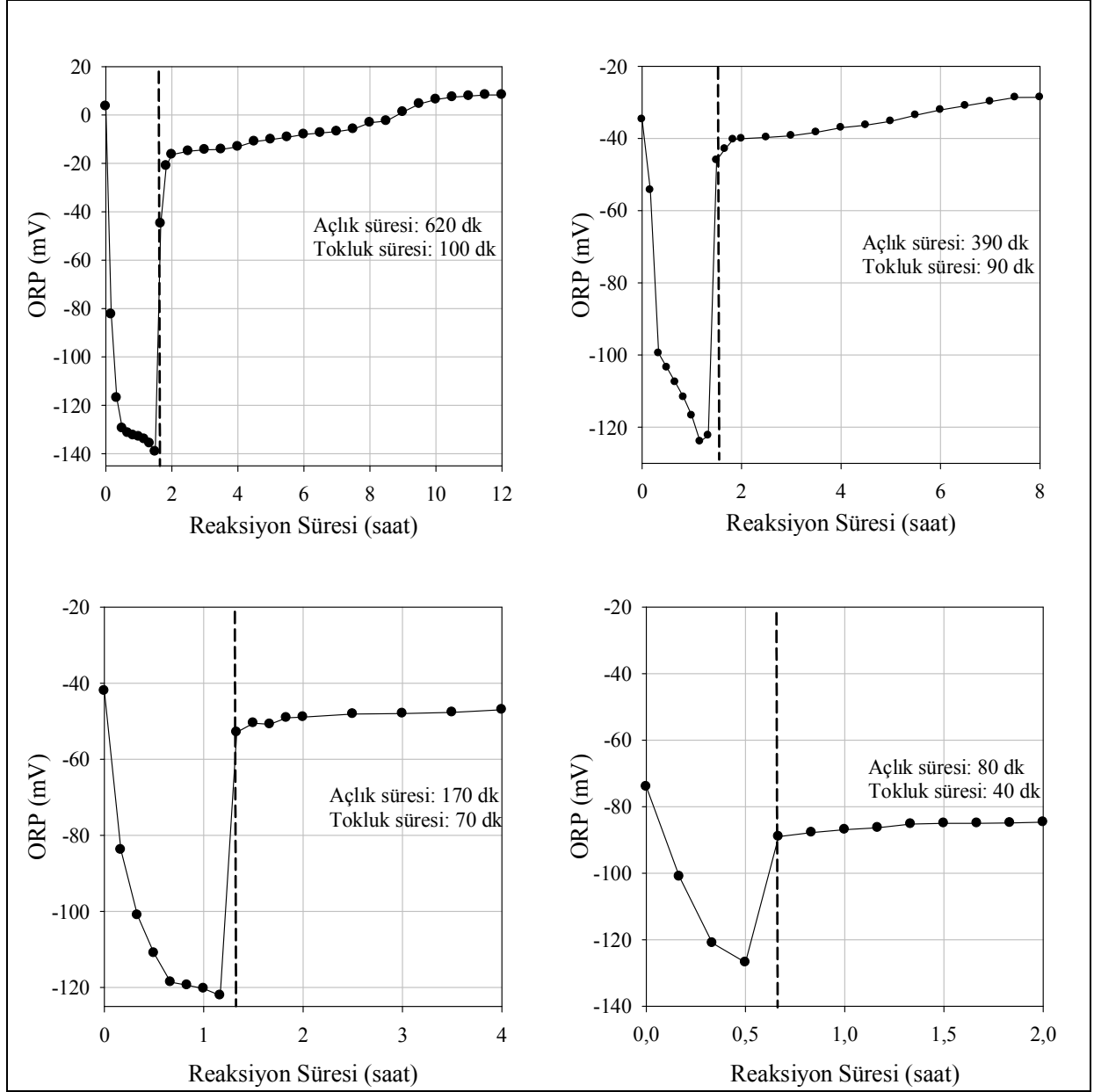


Şekil 4.2. Farklı döngü sürelerinin ÇO profiline etkisi

4.3. Farklı Döngü Sürelerinin ORP Profiline Etkisi

ORP biyokimyasal süreçlerde elektron alma (indirgenme) eğilimini göstermektedir. Çalışmada kullanılan reaktörde, elektron verici kaynağı asetattır ve her döngünün başlangıcında reaktöre eklenmektedir. Aerobik reaksiyon süresi başladığında ORP değerleri hızlı bir şekilde negatif değerlere doğru inmektedir (Şekil 4.3.). Elektron verme eğiliminin yüksek olduğunu gösteren bu süreçte, eklenen asetat parçalanarak ve elektronlarını vermektedir.

Şekil 4.3.'de aerobik dinamik beslemeli koşullara farklı döngü sürelerinin ORP değerleri üzerindeki etkisi görülmektedir. Sistemde elektron verici kaynağının tükenmesiyle mikroorganizmaların oksijeni kullanma hızının düştüğü görülmüştür (Bkz Şekil 4.2). Eş zamanlı olarak ORP değerinin yükselmesi her iki verinin birbirini doğruladığını göstermektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Farklı döngü sürelerinin ORP profiline etkisi

Sistemde mikroorganizmalar karbon ve enerji kaynağı olarak asetatı kullanmaktadırlar. Oksijen varlığında mikroorganizmalar substrat tükenene kadar hızlı bir şekilde oksijeni kullanacaklardır (tokluk fazı). Fakat substrat tükendiğinde ise ortamda oksijenin tüketim hızı azalacak ve oksijen birikmesi gerçekleşecektir. Böylelikle açlık fazında, yani substrat

tükendikten sonra, ORP verilerindeki yükselme oksijenin artık sistemde birikmeye başladığının bir göstergesi olarak açıklanabilir.

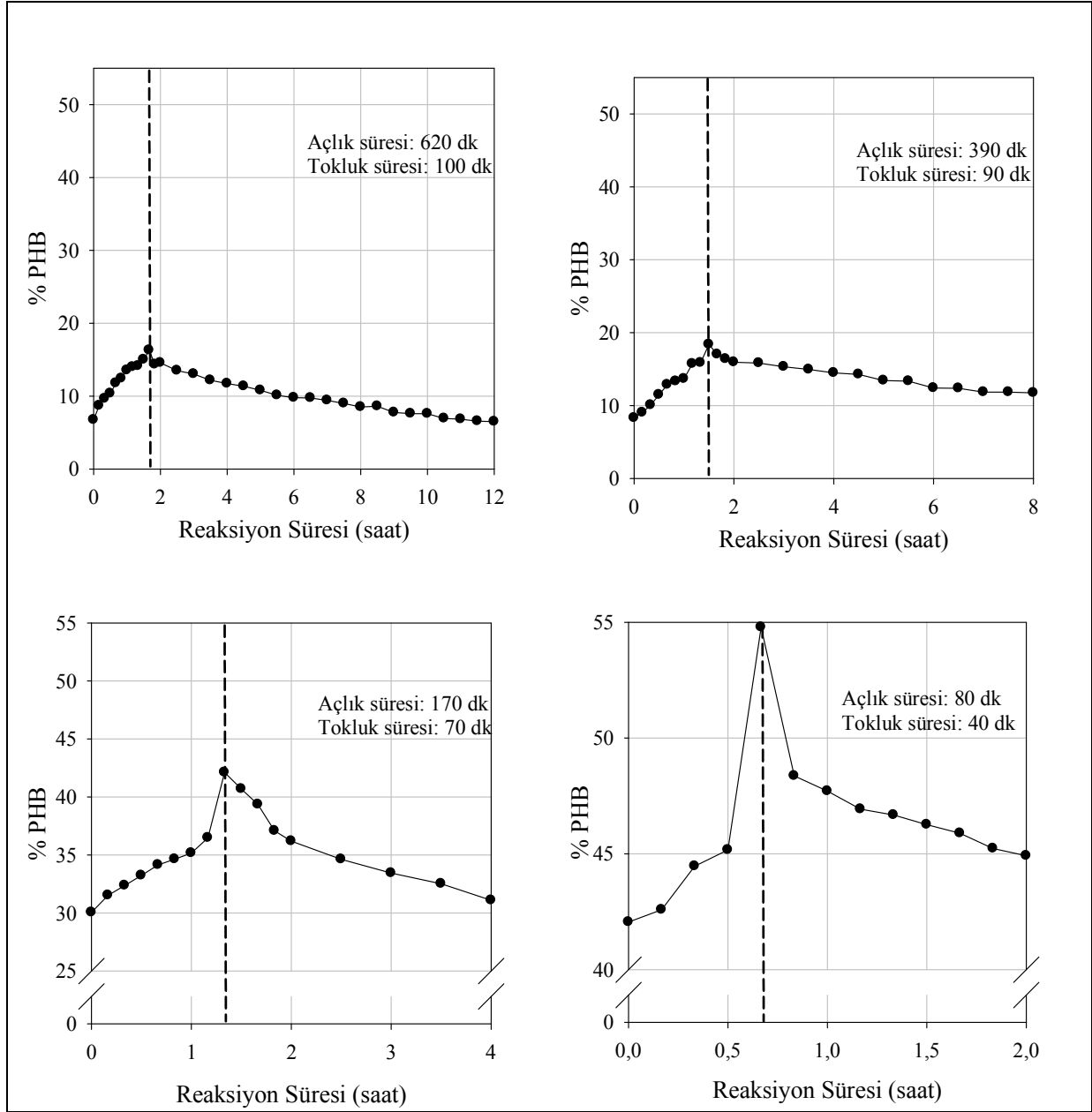
Döngü sürelerinin artmasıyla TOK tüketim verimi azalmaktadır (Bkz Şekil 4.1). TOK tüketim verimindeki azalma ORP değerlerinde artışa neden olmuştur (Şekil 4.5) ve 12 sa döngü süresinde sistem daha fazla açlık fazına maruz kaldığından daha yüksek ORP verileri elde edilmiştir. Açlık fazı en kısa olan 2 sa'lik döngü süresinde ise en düşük ORP değerleri elde edilmiştir.

4.4. Farklı Döngü Sürelerinin PHB Depolama Verimine Etkisi

Konvansiyel plastiklere göre daha maliyetli olmasından dolayı günümüzde PHB yaygınlaşmamıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda bu doğrultuda PHB üretimini etkileyen parametrelerin (Farklı karbon kaynakları, farklı C/N oranları ,farklı pH, farklı %ÇO, vs) sistem koşulları değiştirilerek daha yüksek depolanma veriminin elde edilmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda PHB depolanma verimi etkileyebileceği düşünülen döngü süresi ile yapılan çalışma olmaması nedeniyle bu çalışmada literatürdeki bu eksikliğin giderilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda değişen farklı döngü süreleri (12 sa, 8 sa, 4 sa ve 2sa) denemiştir. Şekil 4.4, azalan döngü sürelerine mikroorganizmaların depoladıkları %PHB içeriklerini göstermektedir. Genel olarak PHB üretim profili incelendiğinde aerobik dinamik sürecin sonunda benzer PHB değişim profili elde edilmiştir.

Aerobik dinamik beslemeli sistemlerde bir döngü süresince açlık ve tokluk fazları olmak üzere 2 faza ayrılmıştır. Karbon kaynağının sisteme eklenmesiyle tokluk fazında hızlı şekilde tüketilerek mikroorganizmaların bünyelerinde granüler halde PHB depolanmıştır. Depolanan polimerin bir kısmı kullanılabilir karbon kaynağının tükenmesiyle karbon ve enerji kaynağı olarak açlık fazında tüketilmiştir. Çalışmada farklı döngü sürelerinde PHB depolanma veriminde önemli farklılıklar elde edilmiştir. (Şekil 4.4.).

Döngü süresinin azaltılmasıyla mikroorganizmalardaki maksimum PHB içeriği artmıştır. Döngü süresinin 2 sa olduğu işletme koşullarında elde edilen maksimum PHB içeriği %54,7 iken döngü süresinin 12 sa olduğu işletme koşullarında % 16,9 olarak elde edilmiştir. Döngü süresi 12 sa tutulduğunda diğer döngü sürelerine kıyasla en uzun açlık süresi gerçekleştiğinden oluşan PHB'nin sistemdeki PHB üretim miktarının döngü süresinin azaltılmasından olumsuz etkilenmediği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.4. Farklı döngü sürelerinin PHB depolama verimine etkisi

4.5. Farklı Döngü Sürelerinde Elde Edilen Çalışma Bulgularına Genel Bir Bakış

Bu bölümde çalışma boyunca denenmiş olan 2 sa, 4 sa, 8 sa ve 12 sa ve döngü sürelerinde ÇO, TOK ve PHB içeriği parametreleri baz alınarak elde edilen veriler Şekil 4.5’de genel olarak incelenmiştir.

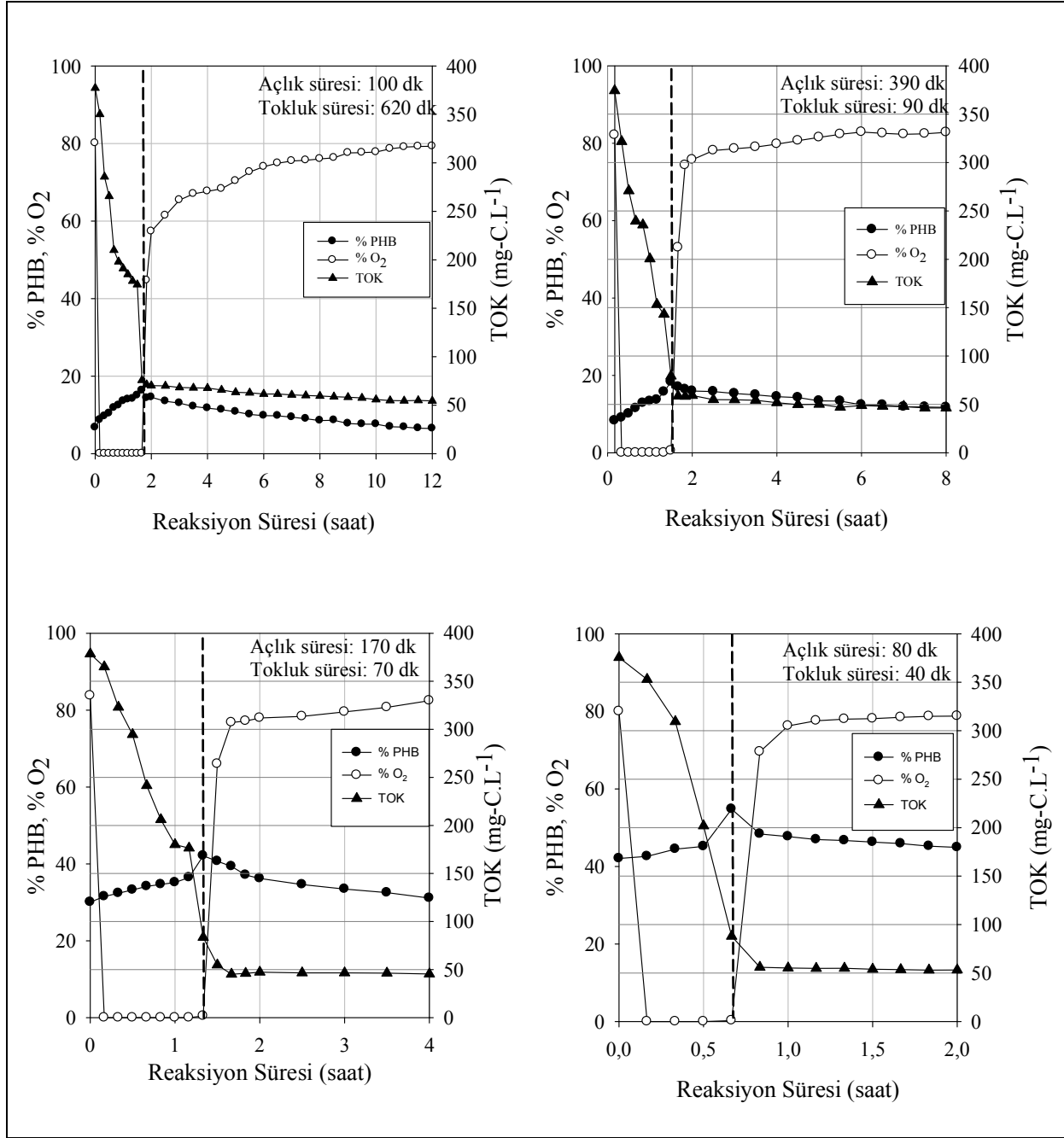
Döngü süresinin 12 saat olduğu işletme koşullarında sistem % 80 ÇO seviyelerinde organik karbon yüklemesi yapılarak başlatılmış ve döngü süresince TOK giderimi % 89,3 olarak elde edilmiştir. Karbon kaynağı olarak 375 mg-C.L^{-1} sisteme eklenen asetatın tüketilmesiyle eş zamanlı olarak % ÇO’ de hızlı olarak sıfırlanmıştır ve sistemdeki karbon kaynağı tükenene

kadar aynı profili izlemiştir. Karbon kaynağının tükendiği % ÇO seviyesinin minimum olduğu süreye tokluk fazıdır. Şekil 4.5’de görüldüğü gibi sistem koşullarında tokluk fazı 1,66 sa sürmüştür. İlave edilen asetat konsantrasyonunun bir kısmını mikroorganizmalar büyüme için kullanılırken kalan kısmını PHB depolama kapasitesine sahip mikroorganizmalar bünyelerinde biyoplastik olarak depolanmıştır. Bolluk fazı süresince depolanan PHB miktarı zamanla artış göstermiştir (19.25 mmol-C.L⁻¹ veya % 16,4 maksimum. PHB).

Tokluk fazının sonunda kalan karbon kaynağının mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak parçalanmasının güç olmasından dolayı reaksiyonun başlamasından 1,6 sa sonra TOK giderim miktarı sabit hale gelmiş ve buna bağlı olarak tüketilen ÇO seviyesi artmaya başlamıştır. Bu sürede aynı zamanda açlık fazının başlangıcını oluşturmuştur. Şekil 4.5’den de görüldüğü gibi bolluk fazında mikroorganizmalar tarafından depolanan PHB materyalinin yaklaşık %60’ı kitle fazında mikroorganizmalar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmıştır.

Karbon kaynağı olarak 375 mg-C.L⁻¹ asetat ile döngü süresi 8 sa olan işletme koşullarının PHB depolama verimine olan etkisi denenmiştir. Şekil 4.5’de reaktöre yüklenen asetatın yükseltgenme reaksiyonunu gerçekleştirip zamanla hızlı bir biçimde azalmaya başladığı ve biyokimyasal süreçte buna karşılık oksijenin indirgenmesi ile ÇO’nin minimum seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada tokluk süresi 1,5 sa sürmüştür ve 8 sa döngü süresince giderilen TOK miktarı % 88’dir. Bu çalışmada döngü süresinin azaltılması PHB üretim verimini arttırmış ve mikroorganizma kuru ağırlığı içerisindeki maksimum PHB içeriği %18,3 (21,4 mmol C.L⁻¹ PHB) olarak elde edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler incelendiğinde döngü süresinin azaltılmasıyla mikroorganizma stres koşulları altına girmekte ve organik karbonu daha hızlı tükettiği gözlenmiştir.

Döngü süresinin 4 sa olduğu işletme koşullarında mikroorganizmaların granüler PHB materyalini depolama verimine olan etkisi saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.5). Aerobik dinamik sistemlerde PHB üretim prensibi gereği bu çalışmada da karbon kaynağının sisteme eklenip hızlıca tüketilmesiyle elektron alıcısı minimum seviyelere düşmektedir ve sistemdeki karbon kaynağı tükenene kadar aynı profili izlemiştir. Karbon kaynağının tükenmesiyle çözünmüş oksijen artmaya başladığı zamanda açlık fazı başlar. Sabit işletme koşullarında döngü süresinin 4 sa tutulduğu bu çalışmada tokluk süresi 1,33 sa’dır. Depolanan maksimum PHB içeriği %42,1 (45,5 mmol-C.L⁻¹) olarak elde edilmiştir. Çalışmadaki diğer işletme koşulları da (döngü süresi 12 sa ve 8 sa) göz önünde bulundurulduğunda döngü süresinin azaltılmasının PHB içeriğine olan katkısının önemi anlaşılmaktadır.



Şekil 4.5. Farklı döngü sürelerinde elde edilen çalışma bulgularına genel bir bakış

Döngü süresinin PHB depolama verimine etkisinin denendiği çalışmanın son aşamasında ise döngü süresinin 2 sa olduğu aşamadır. 1000 mg/L KOİ eşdeğerindeki asetatin yükseltgenme verimi % 85 iken yükseltgenme süresi mikroorganizmanın stres koşullarının artmasından dolayı 0,6 sa inmiştir. Bolluk/kıtlık süresinin kısalmasından dolayı mikroorganizmalar için stres koşulları oluşmuş ve asetatin sisteme yüklenmesi ile biyokütlenin kuru ağırlığı içerisinde depolanan PHB içeriği artmıştır. Elde edilen PHB içeriği % 54,2 (61,2 mmol-C.L⁻¹) olarak elde edilmiştir. İşletme koşullarının sabit tutulduğu yalnız döngü sürelerinin değiştirildiği bu

Çalışmada döngü süresinin azaltılmasıyla depolanan % PHB içeriğinin önemli derecede arttığı gözlenmiştir.

5. SONUÇ

Tez çalışmasında asetat içeren simüle atıksuların aerobik dinamik sistemlerde karışık kültürle arıtılabilirlik çalışmaları ile PHB depolanabilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ana amacı, aerobik dinamik asetat beslemeli sistemlerde organik maddenin elektron verici oksijenin ise elektron alıcısı olarak görev yaptığı yükseltgenme indirgenme reaksiyonları sonucunda mikroorganizmaların bünyelerinde oluşan PHB materyalinin değişim mekanizmasını araştırmaktır. PHB depolama verimi mikroorganizmaların stres koşullarını oluşturan döngü süresinin azaltılması ile değerlendirilmiştir. Çalışmada işletme parametrelerinin sabit kalmasıyla birlikte döngü süreleri azaltılmış ve 4 farklı döngü süresi (2, 4,8,12 sa) denenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Aerobik dinamik beslemeli sistemlerde sistem performansını etkileyen parametrelerden döngü süresinin PHB depolama verimine etkisi çalışmada elde edilmiştir.
- Aerobik dinamik sistemlerde PHB üretim mekanizması; asetatın yüklendiği ve elektron alıcısı ile eş zamanlı olarak tüketildiği bolluk süreci ile biyokütle tarafından rahatlıkla kullanılacak organik maddenin kalmadığı, oksijen seviyesinin yükselmeye başladığı kıtlık süreçlerinden oluşmaktadır.
- Çözünmüş oksijen seviyesi sisteme karbon kaynağının yüklenmesiyle minimum seviyelere düşmektedir ve bu durum karbon kaynağının hızlı bir şekilde giderildiğinin göstergesidir.
- Karbon ve enerji kaynağı olan asetatın yükseltgenmesi ile açığa çıkan elektronların bir kısmı mikroorganizmaların büyümesi için kullanılırken bir kısmı da PHB depolamak için kullanılmaktadır.
- PHB depolama kapasitesine sahip mikroorganizmalar tarafından polimerin depolanması ve biyokütle içerisindeki maksimum PHB içeriği bolluk süreci içerisinde gerçekleşmektedir.
- Organik maddenin giderilmesiyle aktif çamur karbon ve enerji kaynağı olarak kıtlık fazında depolanan PHB içeriklerini kullanmaktadırlar.
- Yüksek PHB üretim verimi elde edebilmek için “bolluk” ve “kıtlık” proseslerinin kontrolünde döngü süresi önemli bir parametredir.
- Döngü süresinin azalmasıyla biyokimyasal süreçte elektron alma (indirgenme) eğilimini gösteren ORP değeri bolluk süresi içerisinde düşüş göstermektedir.
- Döngü süresinin 12 sa olduğu çalışma koşullarında ORP değeri pozitif değerlere çıkmıştır.

- Maksimum verimde PHB üretimi için döngü süresinin 2 sa tutulması iyi bir stratejidir.
- Döngü süresinin azaltılması TOK giderim verimini %85'in altına düşürmeyip döngü süresinin azaltılması TOK giderim hızını yavaşlatmıştır.
- Sistem döngü sürelerindeki değişim bolluk fazında oksijenin tüketim hızlarında belirgin farklar elde edilmemektedir.
- Döngü süresinin artırılmasıyla mikroorganizmaların bünyesinde depolanan PHB içeriğinde önemli bir azalma gözlenmiştir.
- Döngü süresinin artırılırken açlık süresi de arttığından tokluk fazında depolanan PHB'nin büyük bir kısmı karbon ve enerji kaynağı olarak mikroorganizmalar tarafından tüketilmiştir.
- Döngü zamanının düşürülmesi ile mikroorganizmalar stres altına girerek sisteme verilen karbon kaynağını daha hızlı tüketmiştir ve en yüksek verimde PHB depolanmıştır.

KAYNAKLAR

- Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R., Reis, M.A.M. 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses, *J. Biotechnol.*, 130: 411–421.
- Amass, W., Amass, A., Tighe, B. 1998. A review of biodegradable polymers: Use, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradable studies, *Polymer Int.*, 47: 89-144.
- Anderson, A. J., Dawes, E. A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoate, *Microbiol. Rev.*, 54: 450-472.
- Angelova, N. and Hunkeler, D. 1999. Rationalizing the design of polymeric biomaterials, *Trends Biotechnol*, 17: 409-421.
- APHA, AWWA, WEF. 2005. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 20th edition. Washington, DC, USA
- Barham, P.J., Keller, A., Otun, E.L., Holmes, P.A. 1984. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic:poly-3-hydroxybutyrate, *Journals of Materials Science*, 19: 2781-2794.
- Barnard, G.N. and Sander, J.K. 1989. The poly- β -hydroxybutyrate granule in vivo. A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells, *J. Biol Chem*, 264: 3286-3291.
- Beccari, D. Dionisi, A. Giuliani, M. Majone, R. Ramadori. 2002. Effect of different carbon sources on aerobic storage by activated sludge, *Water Sci. Technol.*, 45: 157.
- Beccari, M., Bertin, L., Dionisi, D., Fava, F., Lampis, S., Majone, M., Valentino, F., Vallini, G., Villano, M. 2009. Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic–aerobic process, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 84: 901–908.
- Bertrand, J. L., Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., Chavarie, C. 1990. Biosynthesis of poly- β hydroxyalakoates from Pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*, *Applied and Environmental Microbiology*, 56:10, 3133-3138
- Beun, JJ., Dirks, K., Van Loosdrecht, MCM., Heijnen, JJ. 2002 Poly-(hydroxybutyrate) metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures, *Water Research*, 36: 1167-1180.
- Beun, JJ., Paletta, F., Van Loosdrecht, MCM., Heijnen, JJ. 2000a Stoichiometry and kinetics of polyhydroxybutyrate metabolism in aerobic, slow growing, activated sludge cultures, *Biotechnology Bioengineering*, 67: 379– 389.
- Beun, JJ., Paletta, F., Van Loosdrecht, MCM., Heijnen, JJ. 2000b Stoichiometry and kinetics of polyhydroxybutyrate metabolism under denitrifying conditions in activated sludge cultures, *Biotechnology Bioengineering* 68, 496– 507.

- Beyatlı, Y. 1996. Mikrobiyal termoplastik üretimi, KÜKEM Dergisi, 19: 23-32.
- Bluhm, T.L., Hamer, G.K., Sundararajan, P.R. 1998. Isodiorporism in poly(β hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) copolyesters, Polymer Prepr., 29: 603.
- Bo, Q., JunXin L. 2009. Determination of optimum operating conditions for production of polyhydroxybutyrate by activated sludge submitted to dynamic feeding regime, Chinese Science Bulletin, 54: 142-149
- Bonartseva, G.A., Myshkina, V.L. 1985. Fluorescence intensity of nodule bacteria (*Rhizobium meliloti*, *R. phaseoli*) differing in activity, grown in the presence of the lipophilic vital stain phosphine 3R., Microbiology. 54:535-541.
- Bond, P.L., Keller, J., Blackall, L.L. 1999 Anaerobic phosphate release from activated sludge with enhanced biological phosphorus removal. A possible mechanism of intracellular pH control., Biotechnol Bioeng, 63: 507-515
- Brandl, H., Gross R A, Lenz R. W., Fuller R. C. 1990. Plastics from Bacterias and for Bacterial Poly(3-hydroxyalkanoates) as Natural, Biocompatible and Biodegradable Polyesters, Adv. Biochem. Eng. Biotech., 41: 77-93.
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W. and Fuller, R. C. 1988. Pseudomonas oleovorans as a source of poly(-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters, Appl. Environ. Microbiol., 54:1977–82
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Lloyd, R. and Fuller, R. C., 1991. The accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in Rhodobacter sphaeroides, Arch. Microbiol., 155, 337-340.
- Braunegg, G., Lefebeure, G., Genser, K.F. 1998. Polyhydroxyalkanoates, Biopolyesters From Renewable Resources: Physiological and Engineering Aspects, Journal of Biotechnology, 65: 127-161.
- Briese, B. H., Jendrossek, D., Schlegel, H. G. 1994. Degradaation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate) by aerobic sewage sludge, FEMS Microbiol. Rev., 117:107-112.
- Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics, Trends Biotechnol, 5:246-296.
- Byrom, D. 1994. Polyhydroxyalkanoates. In: Mobley DP, editor. Plastics from microbes microbial synthesis of polymers and polymer precursors. Munich: Hanser; p.5–33.
- Cech, J.S., Hartman, P. 1990. Glucose induced breakdown of enhanced biological phosphate removal, Environ Technol, 11:651-657.
- Cech, J.S., Hartman, P. 1993. Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphate removal systems, Water Research, 27: 1219-1225.
- Choi, J., Lee, S.Y. 1997. Process analysis and economic evaluation for poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation, Bioprocess Engineerig, 17: 335–342.

- Chua, A.M., Takabatake, H., Satoh, H., Mino, T. 2003. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent, *Water Res.*, 37:3602-3611.
- Comeau, Y. , Hall, K.J., Hancock, R.E.W., Oldham, W.K. 1986. Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal, *Water Research*, 20 (12): 1511– 1521.
- Dave, H., Ramakrishna, C., Desai, J. D. 1996. Production of polyhydroxybutyrate by Petrochemical Activated Sludge and *Bacillus* sp. IPCB-403., *Ind. Jour. Exp. Bio.*, 34: 216-219.
- Di Lorenzo, M.L., Silvestre, C. 1999. Non-isothermal crystallization of polymers, *Prog Polym. Sci.*, 24:917-950.
- Dias J.M.L., Lemos P.C., Serafim L.S., Oliveira C., Eiroa M., Albuquerque M.G.E., Ramos A.M., Oliveira R., Reis M.A.M. 2006. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product, *Macromol. Bioscience*, 6 : 885–906.
- Dinigüzel, Ö. 2007. Türkiye’den PHB Üreticisi Halofilik Bakterilerin izolasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dionisi D, Majone M, Papa V. 2004. Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding, *Biotechnol Bioeng*, 85: 69-579.
- Doi, Y. 1990. *Microbial Polyesters*, VCH Publishers, New York, USA.
- Doi, Y., Kawaguchi, Y., Nakamura, Y., Kunioka M. 1989. Nuclear magnetic resonance studies of poly(3-hydroxybutyrate) and polyphosphate metabolism in *Alcaligenes eutrophus*, *Appl. Environ. Microbiol*, 55:2932–2938.
- Dunlop, W. F., Robards, A. W. 1973. Ultrastructural Study of Poly Hydroxybutyrate Granules from *Bacillus cereus*, *J. of Bacteriol*, 114 (3): 1271-1280.
- Durner, R., Witholt, B., Egli, T., 2000. Accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8, 3408-3414.
- Ediz, N., Beyatlı, Y. 2005. *Bacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 3:1-22.
- Ellar, D., Lundgren, D. G., Olumura, K., Marchessault, R. H. 1968. Morphology of Polyhydroxybutyrate Granule, *J.Mol. Biol.*, 35: 489.
- Encarnacion, S., Dunn, M., Willims, K., Mora, J. 1995. Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli* , *Journal of Bacteriology*, 177 (11): 3058-3066.
- Fang, F., Liu, X.W., Xu, J., Yu, H.Q., Li, Y.M. 2009. Formation of aerobic granules and their PHB production at various substrate and ammonium concentrations, *Bioresource Technology*, 100: 59-63.

- Filipe, C. M. D. And Daigger, G. T. 1998 Development of a revised metabolic model for the growth of phosphorus- accumulating organisms, *Water Environment Research*, 70:67-79.
- Filipe, C.M., Daigger, G.T., Leslie Grady, C.P. 2001. A metabolic model for acetate uptake under anaerobic condition by glycogen accumulating organisms: stoichiometry, kinetics, and the effect of pH, *Biotechnology Bioengineering*, 76: 17–31.
- Findlay, R. H., White, D. C. 1983. Polymeric Beta-hydroxyalkanoates From Environmental Samples and *Bacillus megaterium* , *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 71-78.
- Fuller, R.C. 1995. Polyester and photodynamic bacteria (R.E. Blankenship, M.T., Madigan, C.E., Bauer, Editörler), *Anoxygenic photosynthetic bacteria*, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands.
- Grady, C.P.L., Jr., Daigger, G.T., Lim, H.C. 1999. *Biological Wastewater Treatment*, 2nd Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, Inc. New York, NY. ISBN:. 0-8247-8919-9.
- Grothe, E. and Chisti, Y. 2000. Poly(β -hydroxybutyric acid) thermoplastic production by *Alcaligenes latus*: Behavior of fed-batch cultures, *Bioprocess Engineer.*, 22: 441-449.
- Hajikhani, R. 2003. Poli- β -Hidroksibütirat Üretimi, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1: 10-18, Ankara.
- Holmes, P. A. 1985. Applications of PHB a microbially produced biodegradable thermoplastic, *Phys. Technol.* 16: 32-36.
- Holmes, P.A. 1988. Biologically produced PHA polymers and copolymers. In: Bassett DC, editor. *Developments in Crystalline Polymers*, London, Elsevier. 2:1-65..
- Jan, S., Roblot, C., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J. N., Seguin, J. P. 1996. ¹H NMR spectroscopic determinatin of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass, *Enzyme and Microbial Technol.*, 18: 195-201.
- Johnson, K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M. 2010. Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures, *Journal of Biotechnology*, 73-79.
- Johnson, K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M. 2009. Model-based data evaluation of polyhydroxybutyrate producing mixed microbial cultures in aerobic sequencing batch and fed-batch reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 104: 50–67.
- Jones, D T., Woods D R. 1986. Acetone-Butanol fermentation revisited, *Microbiol Rev*, 50:484-524
- Kessler, B. and Witholt, B. 2001. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism, *Journal of Biotechnology*, 86:97–104.
- Khanna, S., Srivastava, A.K. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates, *Process Biochemistry*, 40: 607-619.

- Kothuis, B., Schelleman, F. 1998. Environmental economic comparison of biotechnology with traditional alternatives, In: Meesters KHP, editor, Production of poly-(3-hydroxyalkanoates) from waste streams, Delft: Tudelft Press, s. 4.
- Krishna, C, van Loosdrecht M C M. 1999. Substrate flux into storage and growth in relating to activated sludge modeling, *Water Res*, 33: 3149-3161.
- Lafferty, R. M., Korsatko, B., Korsatko, W. 1988. Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid, *Biotechnology*, edited by H. J. Rehm and G. Reed, Volume 6b, Special Microbial Processes, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Law, K., Leung, Y., Lawford, H., Chua, H., Lo, W., Yu, P. H., 2001. Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93: 515-524.
- Lee, G. F., Rast, W., Jones, R. A. 1978. Eutrophication of waterbodies: Insights for an age-old problem. *Envir. Science Technology*. 12: 900-908.
- Lee, S.Y., Choi, J. 1998. Effect of fermentation performance on the economics of poly-(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus* 59: 387-393..
- Lee, S.Y., 1996a. Bacterial Polyhydroxyalkanoates, *Biotechnol. Bioeng.*, 49:1-14.
- Lee, S.Y., 1996b. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, *Trends Biotechnology*, 14: 431– 438.
- Lee, S.Y., Yim, K.S., Chang, H.N., Chang, Y.K. 1994. Construction of plasmids, estimation of plasmid stability and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric) acid by recombinant *Escherichia coli*, *J. Biotechnol*, 32;203–211.
- Lemoigne, M. 1927. Etudes sur l'autolyse microbienne. Origine de l'acide f-oxo-butyrique forme par autolyse. *Ann. inst. pasteur* 41: 148-165.
- Lemoigne, M., 1926, Products of Dehydration and of Polymerization of β -Hydroxybutyric Acid, *Bull Soc., Cheim. Biol.*, 8, 770-782.
- Lemos, P. C., Serafim, L. S., Reis, M. A. M. 2006. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short- chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding, *Biotechnol*, 122: 226—238.
- Lindsay, K. 1992. 'Truly degradable' resins are now truly commercial. *Modern Plastics*, 2: 62-64.
- Liu, W.T., Mino, T, Nkamura, K, Matsuo, T. 1994. Role of glycogen in acetate uptake and polyhydroxyalkanoate synthesis in an anaerobic-aerobic activated sludge with minimized polyphosphate content, *Ferment Bioeng*, 77: 535– 40.
- Lootz, D., Behrend, D., Kramer, S., Freier, T., Haubold, A., Benkiesser, G., Schmitz, K. P., Becher, B. 2001. Laser cutting: influence on morphological and physicochemical properties of polyhydroxybutyrate, *Biomaterials*, 22: 2447-2452.

- Luengo, M.J., Garcia,B., Sandoval,A., Naharro, G., Olivera, R.E. 2003. Bioplastics From Microorganisms, *Current Opinion in Microbiology*, 6: 251-260.
- Madison, L. L., Huisman, G. W. 1999. Metabolic Engineering of Poly3-Hydroxyalkanoates From DNA to Plastic , *Mic. Mol. Bio. Reviews*, 63: 21-53.
- Marchessault, R.H., Okamura, K.,Su, C.J. 1970. Physical properties of poly(β hydroxybutyrate), II Conformational aspect in solution. *Macromolecules*, 3:735-740.
- Martins, M. P., Heijnen, J. J., van Loosdrecht, C. M. 2003. Effect of feeding pattern and storage on the sludge settleability under aerobic conditions, *Water Res.*, 37: 2555.
- McCool, G.J., Fernandez, T., Li, N., Cannon, M.C. 1996. Polyhydroxyalkanoate Inclusion Body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 138: 41- 48.
- Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A., Swings, J. 1993. Microbial Degradation of Poly-3-Hydroxybutyrate and Poly3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate in Soils, *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 3233-3238.
- Mino, T., Liu, W. T. , Kurisu, F. , Matsuo, T. 1995. Modeling glycogen storage and denitrification capability of microorganisms in enhanced biological phosphate removal processes, *Water Science Technology*, 31 (2): 25–34.
- Mino, T., Liu, W. T., Satoh, H., Matsuo, T. 1996. Possible metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs) and glycogen non accumulating organisms (GAOs) in enhanced biological phosphate removal process, *Applied Biotechnology*, s. 1769 – 1776.
- Mino, T., Tsuzuki, Y., Matsuo, T. 1987. Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in biological phosphorus removal process, *Advance Water Pollution Control*, London, s. 27– 38.
- Muller, R.J., Kleeberg, I. and Deckwer, W.D. 2001. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents, *J. Biotechnol.*, 86: 87-95.
- Nguyen, S., Yu Ge, G. E., Marchessault R. H. 2002. Thermal Degradation of Poly-3-Hydroxyalkanoates Preparation of Well Defined Oligomers, *Biomacromolecules*, 3: 219-224.
- Nickerson, K. W., Zarnick, W. J., Kramer, V. C. 1981. “Poly- β -hydroxybutyrate parasporal bodies in *Bacillus thuringiensis*”, *FEMS Microbiology Letters*, 12: 327-331
- Ojumu, T.V., Yu, J., Solomon, B.O. 2004. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer, *African Journal of Biotechnology* 3 (1):18-24.
- Osborn, D.W., Nicholls, H.A. 1978. Optmization of the activated sludge process fort he biological removal of phosphours, *Program Water Tecnology*, 10: 261-277.
- Ostle, A.G. and Holt, J.G. 1982. Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate, *Appl. Environ. Microbiol.*,44: 238–241.

- Page, W.J., 1995. Bacterial polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future, *Can. J. Microbiol.*, 141 (Suppl.1), 1-3.
- Pierce, L., Schroth, M. N. 1994. Detection of *Pseudomonas* colonies that accumulate poly- β -hydroxybutyrate on nile blue medium, *Plant Disease*, 78(7):683-685.
- Poirier, Y. 2002. Polyhydroxyalkanoate Synthesis in Plants as a Tool for Biotechnology and Basic Studies of Lipid Metabolism, *Progress in Lipid Research*, 41 (2):131-155
- Poirier, Y., Nawrath, C., Somerville, C. 1995. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of Biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant, *Biotechnol.*, 13:142-150.
- Pool, R. 1989. In search of the plastic potato, *Science*, 245: 1187-1189.
- Ramsay, J.A, Berger E., Voyer, R., Chavarie C., Ramsay B. A. 1994. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents, *Biotechnology Techniques*, 8: 589-594,
- Ren, Q., Kessler, B., vander Leij, F. and Witholth, B. 1998. "Mutants of *Pseudomonas putida* affected in poly-3-hydroxyalkanoate synthesis" , *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 49: 743-750.
- Saito, Y., Soejima, T., Tomozawa, T., Doi, Y., Kiya, F. 1995. Production of biodegradable plastics from volatile acids using activated sludge, *Environmental Systems Engineering*, 52, 145– 54.
- Salehizadeh, H., Van Loosdrecht, M.C.M. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance, *Biotechnology Advances*, 22: 261–279.
- Satoh, H., Iwamoto, Y., Mino, T., Matsuo, T. 1998. Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic, *Water Science Technology*, 38: 103–109.
- Satoh, H., Mino, T., Matsuo, T. 1992. Uptake of organic substrates and accumulation of polyhydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in the biological excess phosphate removal processes, *Water Science Technology*, 26 (5–6): 933– 942.
- Satoh, H., Mino, T., Matsuo, T. 1994. Deterioration of enhanced biological phosphorus removal by the domination of microorganisms without polyphosphate accumulation, *Water Sci Technol.*, 3: 203–11.
- Savenkova, L., Gercberga, Z., Nikolaeva, V., Dzene, A., Bibers, I. and Kalnin, M. 2000. Mechanical Properties and Biodegradation Characteristics of PHB-Based Films, *Process, Biochem.*, 35: 573-579.
- Schmack, G., Gorenflo V., Steinbüchel A. 1998. Biotechnological Production and Characterization of Polyesters Containing 4-Hydroxyvaleric Acid and Medium-Chain-Length Hydroxyalkanoic Acids, *Macromolecules*, 31: 644-649.
- Senior, P. J., Dawes, E. A. 1971. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and regulation og glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*, *Biochem, J.*, 125, 55-66.

- Serafim, L. S., Lemos, P. C., Rossetti, S., Levantesi, C., Tandoi, V., Reis, M. A. M. 2006. Microbial community analysis with a high PHA storage capacity *Water Sci. Technol.* 54: 183.
- Serafim, L.S., Lemos, P. C., Oliveira, R. F., Reis, M.A.M. 2004. Optimisation of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions, *Biotechnology Bioengineering*, 87 (2):145–160.
- Slater, S., Gallaher, T., Dennis, D. 1992. Production of Polyhydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate in a Recombinant *Escherichia coli* Strain, *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (4): 1089-1094.
- Steinbüchel, A. 1991. Recent advances in the Knowledge of the Metabolism of bacterial polyhydroxyalkanoic acids and potential impacts on the production of biodegradable thermo plastics, *Acta Biotechnol.*, 11: (5) 419-427.
- Steinbüchel, A. and Fuchtenbusch, B. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. *TIBTECH*, 16: 419-427.
- Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters, *Prog. Polym. Sci.*, 25: 1503- 1555.
- Takabatake, H., Satoh, T., Mino, T., Matsuo, T. 2000. Recovery of biodegradable plastics from activated sludge process. *Water Sci. Technol.*, 42, 351–356.
- Tanio, T. Fukui, T., Shirakura, Y., Saito, T., Tomita, K., Kaiho, T. And Masamune, S. 1982. An extracellular poly(3- hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*, *Eur.J.Biochem.*, 124: 71-77.
- Third K. A., Newland, M. 2003. Cord-Ruwisch, R. The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures, *Biotechnol Bioeng*, 82: 238-250
- Ueno, T., Satoh, H., Mino, T., Matsuo, T. 1993. Production of biodegradable plastics, *Polymer Preprint*, 42: 981– 986.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Pot, M.A., Heijnen, J. J. 1997. Importance of bacterial storage polymers in bioprocess, *Water Science and Technology*, 35: 41-47.
- Van-Leeuwen, M.A., Pot, M.A., Van Loosdrecht, M.C.M. 1997. Kinetic modeling of poly-(hydroxyalkanoate) production and consumption by *Paracoccus pantotrophus* under dynamic substrate supply, *Biotechnology Bioengineering*, 55: 773- 782.
- Weber, C. J. 2000. *Biobased Packaging Materials for the food Industry*, The EU Directorate 12, Frederiksberg.
- Wentzel, M.C., Lötter, L.H., Loewenthal, R.E., Marais, G. V.R. 1986. Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal, *Water Research*, 12: 209–224.
- Williams, S.F. and Martin, D. 2002. Application of PHAs in medicine and pharmacy. In *Biopolymers*, vol 4, *Polyesters III: Applications and Commercial Products*. Edited by Doi Y and A Steinbüchel. Germany: Wiley-VCH, 91-128.

- Williamson, D.H. and Wilkinson, J.F. 1958. The isolation and estimation of the poly- β -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species, *J Gen Microbiol.*, 19: 198–209.
- Yan, Y., Wu, Q., Zhang, R., 2000. Dynamic accumulation and degradation of poly(3-hydroxyalkanoate)s in living cells of *Azotobacter vinelandii* UWD characterized by ^{13}C NMR, *FEMS Microbiology Letters*, 193:269-273.
- Yaoping, LÜ. 2007. Advance on the production of polyhydroxyalkanoates by mixed cultures, Higher Education Press and Springer, 21-25.
- Yıldız, K., Sipahioğlu Ş. Ve Yılmaz, M. 2000. Çevre bilimi günüz eğitim ve yayıncılık Ankara.
- Yılmaz, M., Beyatlı, Y. 2003. Biyoplastik Polihidroksibütirat, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1 (9): 1-33.
- Zinn, M., Witholt, B., Egli, T. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, *Adv. Drug. Rev.*, 53: 5-21.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Şebnem ÖZDEMİR
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 15.04.1986 Samsun
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 539 790 16 16
Faks : ----
e-posta : sebnemozdemir@cnrgroup.info

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	KSÜ/ Kimya	2009
Lise	Samsun 19 Mayıs Lisesi	2003

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Cırık K., Aydoğmuş D., Özdemir Ş., Gezginci M., Çınar Ö. 2010. "Parameters Affecting Polyhydroxyalkanoate Synthesis from Wastewaters" International Symposium on Sustainable Development, Haziran 8-9, Sarejova.
2. Cırık K., Özdemir Ş., Aydoğmuş D., Çınar Ö. 2010. "Literature Review of PHA Production Processes" International Sustainable Water and Wastewater Management Symposium, Ekim 26-28, Konya/Turkey.
3. Cırık K., Özdemir Ş., Aydoğmuş D., Çınar Ö. 2010. "Decolorization Studies of Remazol Brilliant Violet-5R under Anaerobic-Aerobic Cycle Conditions" International Sustainable Water and Wastewater Management Symposium, Ekim 26-28, Konya/Turkey.

Hobiler

Kitap okumak, bisiklet sürmek ve müzik dinlemek .