

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ELEKTRO-AKTİVE SUYUN POLİ- β -HİDROKSİBÜTİRAT
ÜRETİMİNE ETKİSİ**

**SERHAN ŞEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2016**

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELEKTRO-AKTİVE SUYUN
POLİ- β -HİDROKSİBÜTİRAT
ÜRETİMİNE ETKİSİ

SERHAN ŞEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. AZİZ TANRISEVEN

GEBZE
2016

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**EFFECT OF ELECTRO-ACTIVATED
WATER ON POLY- β -
HYDROXYBUTYRATE PRODUCTION**

SERHAN ŞEN
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. AZİZ TANRISEVEN

GEBZE
2016



GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 14/01/2016 tarih ve 2016/04 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 26/01/2016 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Serhan ŞEN'in tez çalışması Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN

ÜYE

: Prof. Dr. Ayhan ÇELİK

ÜYE

: Prof. Dr. Bülent KESKİNLER

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Bu tez çalışmasında, ilk kez kullanılan *Wautersia eutropha* NRRL B-2804 suşu ile poli- β -hidroksibütirat (PHB) üretimi için yeni bir yöntem geliştirildi. Mikroorganizmanın PHB üretebilirliği üzerine çalışmalar yapılarak verimin artırılmasına odaklanıldı. PHB üretiminde karbon kaynağının (glukoz-fruktoz karışımı ve hidrolize melas) ve su türünün (distile, asidik ve bazik aktive) etkisi çalışıldı. Karbon kaynağı olarak glukoz-fruktoz karışımı yerine hidrolize melas kullanıldığında daha iyi verimler elde edildi. Ayrıca elektro-aktive sularla (asidik ve bazik aktive) büyütülen besiyerlerinde distile suya göre daha fazla PHB verimi tespit edildi. Karbon kaynağı olarak distile su ile hazırlanan glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyeri kullanıldığında gram kuru hücre başına üretilen PHB miktarı 0,1048 g iken, asidik aktive su kullanıldığında 0,1339 g, bazik aktive su kullanıldığında ise 0,1441 g olduğu tespit edildi. Karbon kaynağı olarak hidrolize melas kullanıldığında distile su ile gerçekleştirilen denemelerde gram kuru hücre başına elde edilen PHB miktarı 0,1282 g olarak bulunurken, besiyeri hazırlanmasında asidik aktive su kullanıldığında 0,1662 g, bazik aktive su kullanıldığında ise 0,1835 g olarak saptandı. Elektro-aktive suların depolama kararlılığının tespiti için sular 5 ve 10 gün bekletilerek besiyeri hazırlanmasında kullanıldı ve bu suların aktivitelerini yitirdiği tespit edildi. Sonuç olarak, bu mikroorganizmayla PHB üretiminde melas ve aktive su kullanımının verim artışı sağladığı bulundu.

Anahtar Kelimeler: Poli- β -Hidroksibütirat (PHB), *Wautersia eutropha*, Melas, Elektro-aktive su.

SUMMARY

In this thesis work; a novel method was developed for the production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) using *Wautersia eutropha* NRRL B-2804 strain which have never been used. PHB production capability of *Wautersia eutropha* NRRL B-2804 was searched. Studies were focused on increase in the yields of PHB production. The effects of carbon sources (a mixture of glucose-fructose, and hydrolyzed molasses) and water (distiled, acidic and basic activated waters) on PHB productions were studied. It was found that molasses as a carbon source gave rise to better yields than mixture of glucose and fructose. It was also found that microorganisms gown in mediums, prepared using acidic and basic activated water as compared to those gown in medium containing distiled water yielded more PHB. Amounts of PHB, per gram dry cell using a mixture of glucose-fructose contain distiled, acidic and basic activated water were as follows: 0.1048 g, 0.1339 g, and 0.1441 g, respectively. In cases where molasses were used on carbon sources, amounts of PHB per gram dry cell in growth medium containing distiled, acidic and basic were as follows: 0.1282 g, 0.1662 g, and 0.1835 g, respectively. The storage effect of activated waters on the production of PHB were also studied. It was found that activated waters stored for 5 and 10 days had no effect on PHB production increase. As a result, usage of molasses and activated waters in growth medium results in better PHB productions by this microorganism.

Key Words: Poly- β -hydroxybutyrates (PHB), *Wautersia eutropha*, Melas, Electro activated water.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve akademik hayatımda desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli danıőmanım Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN'e,

Bütün çalıőmam boyunca yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaőan değerli arkadaşlarım Fatma ERTAN ve Aiőe ÜNLÜ'ye,

Ve yüksek lisans eğitimime baőlamama vesile olan Cengiz KEŐ'e, göstermiő olduğu desteklerinden dolayı her zaman yanımda olan sevgili annem Lalegül şEN, babam Ali şEN'e ve eőim Arzu GÜRBÜZ şEN'e en içten teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	2
2.1. Polihidroksibütirat (PHB) ve Önemi	2
2.1.1. Tarihçesi	3
2.1.2. Poli-β-Hidroksibütirat Sentezi	3
2.2. Su	5
2.2.1. Suyun Yapısı	5
2.3. Elektro-aktive Su	7
2.3.1. Elektro-aktivasyon Sistemleri	9
2.3.2. Elektro Aktivasyon Sistemlerinin Tasarımı	10
2.3.3. Elektro-aktive Suyun Fiziksel ve Kimyasal Aktiviteleri	11
2.3.4. Elektro-aktive Edilmiş Suların Raman Spektrumu	12
2.3.5. Elektro-aktive Edilmiş Suyun Uygulama Alanları	14
2.4. Melas	15
3. MATERYAL VE METOT	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler	17
3.1.2. Mikroorganizma	18
3.1.3. Kullanılan Enzim	18
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	18
3.1.5. Kullanılan Çözelti ve Besiyerleri	19

3.2. Metot	20
3.2.1. İnvvertazın Aktivite Tayini	20
3.2.2. Melasın İçinde Bulunan Sükrozun Hidrolizi	20
3.2.3. TLC Analiz Metodu	21
3.2.4. Toplam Şeker Tayini	21
3.2.5. Elektro-aktive Suyun Hazırlanması	21
3.2.6. <i>Wautersia Eutropha</i> 'nın Büyütülmesi	22
3.2.7. Poli- β -Hidroksibütirat Üretimi	23
3.2.8. Poli- β -Hidroksibütirat Ekstraksiyonu	24
3.2.9. Poli- β -Hidroksibütirat Analizi	24
4. DENEYSEL SONUÇLAR	26
4.1. Melas İçerisinde Bulunan Sükrozun Hidrolizi	26
4.2. Toplam Şeker Tayini	26
4.3. Elektro-aktive Su	27
4.4. Mikroorganizmanın Büyütülmesi	27
4.4.1. <i>Wautersia eutropha</i> Bakterisinin Büyütülmesi	27
4.4.2. Glukoz-Fruktoz Karışımı ile Hazırlanan Besiyerinde Üretim	28
4.4.3. Hidrolize Melas ile Hazırlanan Besiyerinde Üretim	29
4.5. PHB Ekstraksiyonu	30
4.5.1. Glukoz-Fruktoz Karışımı ile Hazırlanan Besiyerinde	30
4.5.2. Hidrolize Melas ile Hazırlanan Besiyerinde	31
4.6. Depolamanın Elektro-aktive Sular Üzerine Etkisi	32
4.6.1. 5 Gün Depolanan Aktive Sularla PHB Üretimi	32
4.6.2. 10 Gün Depolanan Aktive Sularla PHB Üretimi	34
4.7. PHB Analizi	36
4.7.1. UV-Spektrofotometre	36
4.7.2. IR Spektrometre	38
4.7.3. C-NMR ve H-NMR Spektroskopisi	39
4.7.4. Termogavimetric Analiz	41
5. SONUÇLAR VE YORUMLAR	43
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	52

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
e ⁻	: Elektron
g	: Gram
H ₂ O	: Su
H	: Hidrojen
MgSO ₄	: Magnezyum Sülfat
IU	: Uluslararası enzim birimi
pH	: -log[H ⁺]
V	: Hacim
Cl	: Klor
Cm	: Santimetre
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
Kcal	: Kilokalori
M	: Molarite
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mol	: Mol sayısı
mW	: Milivolt
μmol	: Mikromol
μL	: Mikrolitre
NaCl	: Sodyumklorür
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
O	: Oksijen
ORP	: Oksidasyon indirgenme potansiyeli
Rpm	: Bir dakikadaki devir sayısı

TGA	:	Termogavimetrik analiz
TLC	:	İnce tabaka kromatogafisi
α -KG	:	Alfa ketoglutarat
AC	:	Asetat
AcAcCoA	:	Asetoasetil koenzim A
AsCoA	:	Asetil koenzim A
dk	:	Dakika
E4P	:	Eritoz-4-fosfat
F6P	:	Fruktoz-6-fosfat
GAP	:	Gliseraldehit-3-fosfat
Gln	:	Glutamin
Glu	:	Glutamat
Gox	:	Glioksalat
G3P	:	3-fosfogliserat
G6P	:	Glukoz-6-fosfat
LAC	:	Laktat
MAL:	:	Malat
OAA	:	Okzaloasetat
PEP	:	Fosfoenolpirüvat
PHA	:	Polihidroksialkonat
PHB	:	Polihidroksiütirat
PLA	:	Poliaktik asit
PTFE	:	Politetrafloroetilen
PVC	:	Polivinilklorür
PYR	:	Pirüvat
R5P	:	Riboz-5-fosfat
Suc	:	Süksinat
SucCoA	:	Süksinat koenzim A

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Poli- β -hidroksibütirat (PHB).	2
2.2: PHB biyosentezi.	3
2.3: PHB sentezi.	4
2.4: Su molekülünün bipolar yapısı.	6
2.5: Hidrojen bağlarının şematik gösterimi.	6
2.6: Asidik ve bazik su üretimi.	8
2.7: Değişik suların raman spektrumları.	13
3.1: Elektroaktive Su Üretim Cihazı.	22
4.1: Melasda bulunan sukrozun hidroliz ürünlerinin TLC analizi.	26
4.2: Aktive sular ve distile su kullanılarak hazırlanan büyüme besiyerinde <i>Wautersia eutropha</i> bakterisinin optik yoğunluk değerleri.	28
4.3: Aktive sular ve distile su kullanılarak glukoz-fruktoz karışımı ile hazırlanan besiyerinde <i>Wautersia eutropha</i> bakterisinin optik yoğunlukları.	29
4.4: Aktive sular ve distile su kullanılarak hidrolize melas ile hazırlanan besiyerinde mikroorganizmanın büyütülmesi.	30
4.5: Büyüme besiyerinde kullanılan aktive suların (5 gün depolanan) <i>Wautersia eutropha</i> 'nın büyümesi üzerine etkisi.	32
4.6: Glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyerinde kullanılan aktive suların (5 gün depolanan) <i>Wautersia eutropha</i> 'nın büyümesi üzerine etkisi.	33
4.7: Büyüme besiyerinde kullanılan aktive suların (10 gün depolanan) <i>Wautersia eutropha</i> 'nın büyümesi üzerine etkisi.	34
4.8: Glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyerinde kullanılan aktive suların (10 gün depolanan) <i>Wautersia eutropha</i> 'nın büyümesi üzerine etkisi.	35
4.9: Krotonik asit UV absorbans ölçümü.	37
4.10: Poli- β -hidroksibütirat'a ait UV analiz örneği.	37
4.11: PHB'nin FT-IR spektrumu.	38
4.12: PHB'ye ait IR spektrumu örneği.	39
4.13: PHB'nin ^{13}C -NMR spektrumu.	39

4.14:	PHB'nin H-NMR spektrumu.	40
4.15:	PHB'ye ait ¹³ C-NMR spektrumu örneği.	41
4.16:	PHB'nin TGA analizi.	41
4.17:	Marjadi ve Arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki TGA Analizi.	42

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: PHB Üretimi ve Kullanım Alanları.	2
2.2: Elektro-aktif suların bazı kullanım alanları.	15
2.3: Melas içeriği.	16
3.1: Deneyde kullanılan kimyasal malzemeler.	17
3.2: Deneylerde kullanılan cihazlar.	18
3.3: Eser Element Çözeltisi.	19
3.4: Büyüme Besiyeri.	19
3.5: Glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyeri.	19
3.6: Hidrolize Melas İçeren Besiyeri.	20
3.7: Elektro-aktif su cihazının teknik özellikleri.	21
3.8: Elektro-aktif suların hazırlanmasında kullanılan içme suyunun(Lido) özellikleri.	22
4.1: Deneylerde kullanılan su türlerinin özellikleri.	27
4.2: Karbon kaynağı olarak glukoz-fruktoz karışımı kullanılarak Elektro-aktif su ve distile suyla hazırlanan besiyerinde <i>Wautersia eutropha</i> bakterisinin 48 saatlik inkübasyonu ile elde edilen PHB miktarının kuru hücre miktarına oranı.	31
4.3: Karbon kaynağı olarak hidrolize melas kullanılarak Elektro-aktif su ve distile suyla hazırlanan besiyerinde <i>Wautersia eutropha</i> bakterisinin 48 saatlik inkübasyonu ile elde edilen PHB miktarının kuru hücre miktarına oranı.	31
4.4: 5 gün depolanan Elektro-aktif suların PHB üretimlerine etkisi.	34
4.5: 10 gün depolanan Elektro-aktif suların PHB üretimlerine etkisi.	36
4.6: PHB'nin FT-IR spektrumundan elde edilen dalga sayısı değerlerinin karşılığı.	38
4.7: PHB'a ait ¹³ C-NMR spektrumunun kimyasal kayma değeri ve literatürle karşılaştırılması.	40

1. GİRİŞ

Plastik ürünler günlük yaşamımızın birer parçalarıdır. Ancak plastik ürünlerin kullanımı, “kullanıp-atılabilme” özelliği nedeniyle çevre kirliliği açısından büyük sorun oluşturmaktadır [1]. Petrolden elde edilen sentetik polimerler, doğaya atıldıklarında toprakta uzun süre parçalanamadığından çevre kirliliğine neden olmaktadır. Doğada yok edilmesi zor olan bu ürünlerin yerine biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin üretimi önem kazanmış ve bu ürünlere yönelik çalışmalar gün geçtikçe artmıştır [1]. Bu polimerlerden biri de Poli- β -Hidroksibütirat(PHB)'lardır.

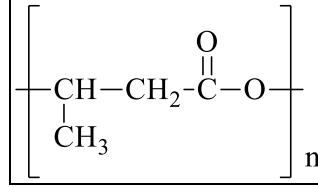
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında, *Wautersia eutropha* NRRL B-2804 suşu ile elektro-aktive su kullanılarak poli- β -hidroksibütirat (PHB) üretimi yapılması amaçlanmaktadır. Bu tez çalışmasında, değişik su türlerinin mikroorganizmanın büyümesine etkisi incelenmiştir. İlk kez kullanılan bu mikroorganizma ile yüksek verimde PHB üretimi için bir metod geliştirilmiştir. Diğer mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen yöntemlere alternatif olabilecek tez çalışması ile maliyeti azaltmak ve verimliliği arttırmak amaç edinilmiştir. Bu amaçla karbon kaynağı olarak glukoz-fruktoz karışımı yerine daha ucuz olarak temin edilebilen hidrolize melas kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Elektro aktive suların depolama kararlılığının belirlenmesi amacıyla kullanılan sular 5 ve 10 gün bekletilerek besiyeri hazırlanmasında kullanıldı. Bu çalışmada, *Wautersia eutropha* NRRL B-2804 suşu ile yüksek verimde PHB üretimi gerçekleştirilmesi için karbon kaynağı olarak melas ve elektro-aktive su kullanılması durumunda en iyi şartlar belirlenerek literatürdeki benzer çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. Polihidroksibütirat (PHB) ve Önemi

Poli-β-hidroksibütirat (PHB), polihidroksialkonatlardan (PHA) bir tanesidir. Açık yapısı Şekil 2.1’ de verilen PHB; biyo-bozunur, yeşil plastik, biyoplastik veya ekoplastik olarak adlandırılan plastiklerden biri olmasından dolayı her geçen gün ticari önemi artmaktadır [2]. Değişik mikroorganizmalar kullanılan bu polimerin üretiminin gerçekleştirilmesinde *A.eutrophus*, *Azotobacter*, *E.coli* bakterileri yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.1: Poli- β -hidroksibütirat (PHB).

Bu önemli polimer değişik ülkelerde büyük ölçekte üretilmekte ve farklı alanlarda kullanılmaktadır (Tablo 2.1). Petrokimyasal ürünlerin azalması ve petrol kullanımının maliyeti gözönüne alındığında, PHB’ nin yeni kullanım alanlarının doğması kaçınılmazdır.

Tablo 2.1: PHB üretimi ve kullanım alanları.

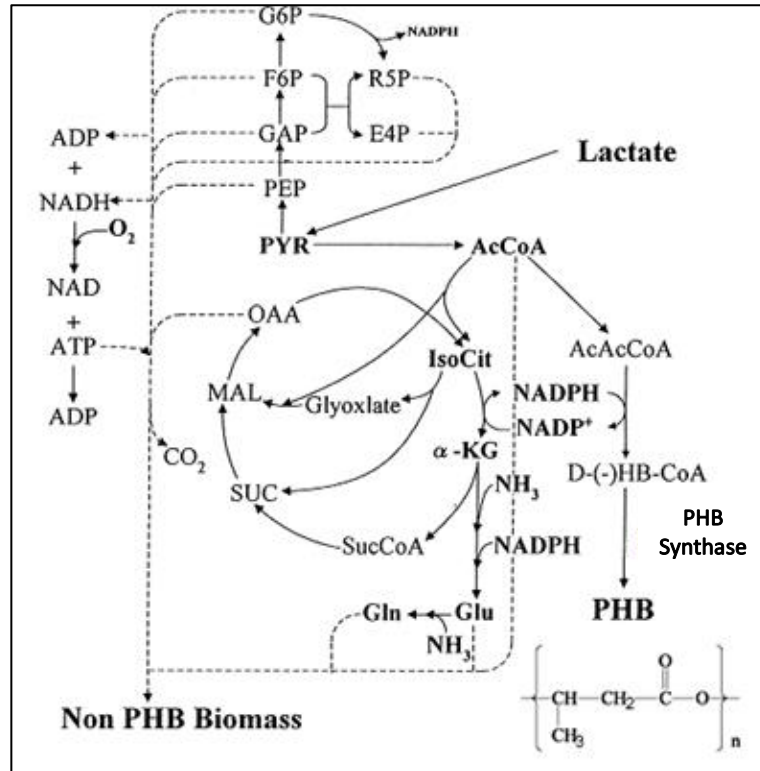
Şirket	PHA türü	Uygulama Alanları
Chemie Linz/Avusturya	PHB	Paketleme ve İlaç Taşıyıcı sistemler
BtF/Avusturya	PHB	Paketleme ve İlaç Taşıyıcı sistemler
Biomers/Almanya	PHB	Paketleme ve İlaç Taşıyıcı sistemler
BASF/Almanya	PHB	Paketleme
Mitsubishi/Japonya	PHB	Paketleme
Biocycles/Brezilya	PHB	Hammadde
Bio-On/İtalya	PHB	Hammadde
Tianjin Northern Food/Çin	PHB	Hammadde

2.1.1. Tarihçesi

Poli- β -hidroksibütirat ilk olarak 1925 yılında, Fransız mikrobiyoloji uzmanı Maurice Lemoigne tarafından izole ve karakterize edilmiştir [3] PHB'nin ticari olarak üretimi ise ICI Inc. (İngiltere) tarafından 1960 yılında gerçekleştirilmiştir. 1998 yılında Tepha Inc. biyobozunur polimerlerin medikal alanlarda (örneğin, valfler, cerrahi iplikler, ortopedik ağılarda) kullanımı üzerine çalışmışlar gerçekleştirmişlerdir [2].

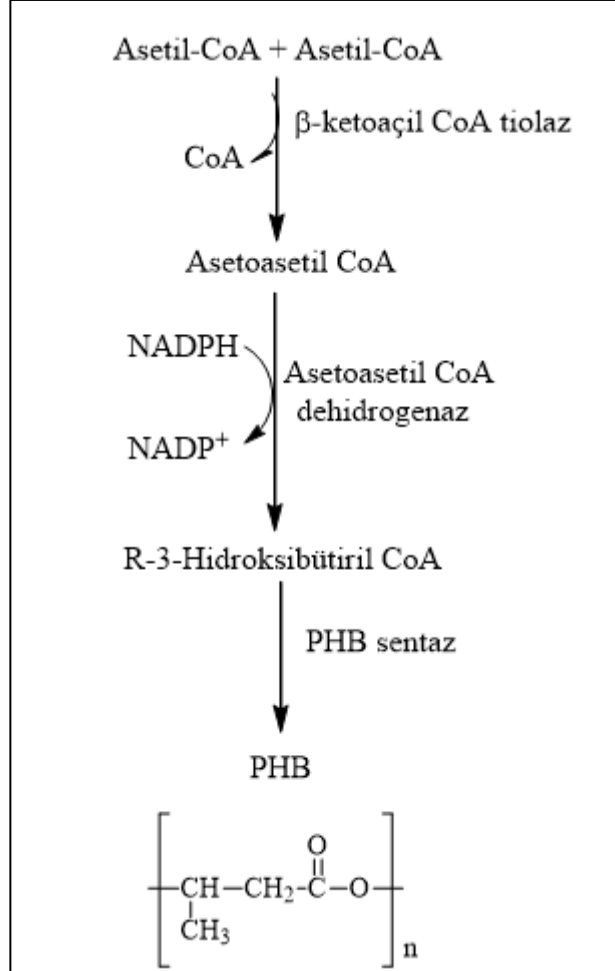
2.1.2. Poli- β -Hidroksibütirat Sentezi

PHB, asetil koenzimA (AcCoA)'nın PHB sentaz tarafından polimerleşmesi ile elde edilir. Büyüme şartlarına bağlı olarak polimerin moleküler ağırlıkları 2×10^5 ile 3×10^6 arasında değişmektedir [4]. Üretim miktarı ve zincir uzunluğu sentez aşamasında yer alan enzimlerin işleyişine bağlıdır [5].



Şekil 2.2: PHB biyosentezi.

- Ac: Asetat, AcCoA: Asetil co-enzim A, AcAcCoA: Asetoasetil co-enzim A, α -KG: α -Ketoglutarat, E4P: Eritroz-4-fosfat, F6P: Fruktoz-6-fosfat, G3P: 3-Fosfoglisarat, GAP: Gliseraldehid-3-fosfat, G6P: Glukoz-6-fosfat, Gln: Glutamin, Glu: Glutamat, GOX: Gliksilat, IsoCİT: izositrat, LAC: Laktat, MAL: Malat, OAA: okzaloasetat, PEP: Fosfoenolpiruvat, PHB: Poli- β -hidroksibutirat, PYR: Piruvat, R5P: Riboz-5-fosfat, SUC: Suksinat, SucCoA: Suksinat co-enzim A [6].



Şekil 2.3: PHB sentezi.

Şekil 2.3’de bu polimerin sentezi detaylı bir şekilde verilmiştir [7]. İlk olarak reaksiyonda iki asetil-CoA molekülü β -ketoaçil CoA tiyolaz enzimi tarafından Asetoasetil CoA’ ya dönüştürülmektedir. Ardından Asetoasetil CoA, NADPH bağımlı asetoasetil CoA dehidrogenaz tarafından R-3- hidroksibütiril CoA’ya indirgenir. Son olarak R-3-Hidroksibütiril CoA monomerleri PHB sentaz enzimi tarafından PHB’ye polimerize edilir.

2.2. Su

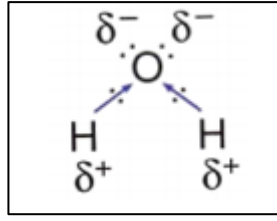
Su bir oksijen ve iki hidrojen atomundan oluşan, oda sıcaklığında sıvı halde bulunan, renksiz, kokusuz ve tatsız maddedir. Su tüm canlılar için hayatın kaynağıdır. Biyolojik sistemlerin önemli bir yapıtaşı olan su, moleküllerin fizikokimyasal özelliklerinde de önemli rol oynamaktadır. Su, canlı organizmalarda, birçok biyolojik, biyokimyasal ve fiziko kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli ortamı sağlamaktadır [8].

2.2.1. Suyun Yapısı

Bir kimyasal madde olarak su, kompozisyonu ve karakteristiği açısından doğadaki diğer maddelerden farklıdır [9]. Suyun yapısının farklılığı ilk olarak kar tanelerinin karmaşık yapılanmasıyla aydınlatılmıştır. Buna rağmen, suyun (H_2O) tanımı, bir oksijen (O) atomuna bağlı iki hidrojen atomundan oluşan kimyasal bir molekül olarak tanımlanır. Su, aşağıda belirtilen farklı yapılarda bulunabilir;

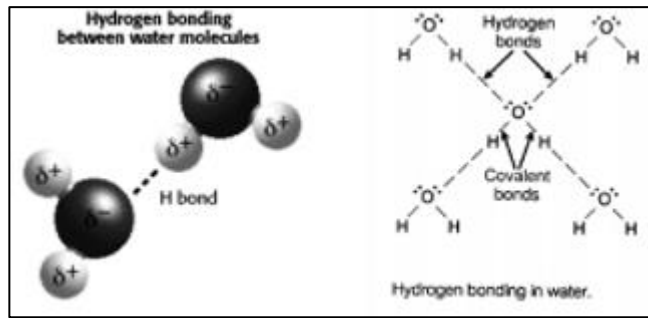
- Kristal buz (11 değişik şekilde)
- Amorf buz (kristal olmayan)
- Kristal hidratları (organik ve anorganik)
- Sıvı su (yalın, süper soğutulmuş veya buhar)
- Sıvı solüsyon (iyonik veya iyonik olmayan)
- Gaz hali (monomer veya guplanmış atomlar)

Su molekülünde bulunan elektronların spesifik dağılımı moleküller arası çekim gücünün yüksek olmasını sağlar. İki hidrojen atomundan her biri 1s orbitalindeki bir elektronunu oksijen atomuyla sp^3 hibritleşmesiyle kovalent bağ yaparlar [9], [10]. Elektronların bu davranışı, suyun farklı bir elektriksel asimetrik yapıya sahip olmasını sağlar. Suyun molekülünde bulunan, hidrojen atomları kısmi pozitif yüklü, oksijen atomları ise kısmi negatif yüklüdür (Şekil 2.4). Bu özelliklerinden dolayı su molekülünün net yükü yoktur [9], [10].



Şekil 2.4: Su molekülünün bipolar yapısı.

Hidrojen bağı, oksijen, azot veya flor atomunda bulunan bir protonun başka bir atomla yaptığı kuvvetli bir bağıdır (Şekil 2.5). İki hidrojen molekülünde bulunan iki pozitif protonun, oksijen atomunda bulunan negatif yalın çiftine bağlanarak düzenli çapraz yapıları oluşturarak güçlü ve kararlı olmasını sağlar.

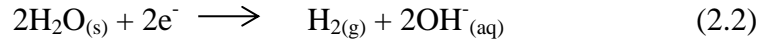


Şekil 2.5: Hidrojen bağlarının şematik gösterimi.

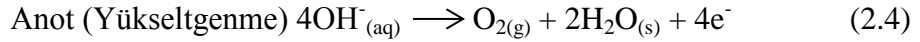
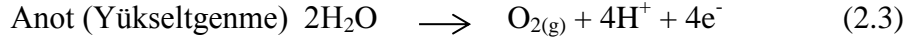
Hidrojen bağları enerjik olarak kovalent bağlardan daha zayıftır. Suda bulunan hidrojen bağları 18-20 kcal/mol enerjiye sahipken, hidrojen ve oksijen arasında bulunan kovalent bağ enerjileri 360-400 kcal/mol enerjiye sahiptir [9]. Su, moleküllerinin birbirine hidrojen bağı yapmasıyla konvansiyonel olarak dört taraflı veya tetrahedral yapıda bulunur. Fakat bu yapısı, ortaya çıkan farklı şartlar altında değişebilmektedir. Suyun yapısında etkili olan temel karakteristik özelliklerinden biri, hidrojen bağlarının maksimize edilmesidir [11]. Oksijen molekülünün etrafındaki elektronların tetrahedral düzeninden dolayı, her bir su molekülü kendisine komşu dört su molekülüyle teorik olarak hidrojen bağı yapabilir. Bu da suyun elektrostatik etkileşiminden kohezyon özelliğini sağlar. Tetrahedral yapıda olan 5 su molekülü 0,5 nm çapa sahiptir [9].

2.3. Elektro-aktive Su

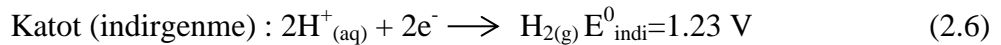
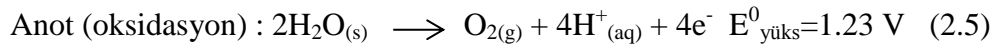
Sıvıların elektro-aktivasyonu elektroliz olarak adlandırılır [12]. Herhangi bir sıvı, dışardan bir elektrik alana maruz bırakıldığında, yüklü partiküller, ters yükü olan tarafa göç ederler. Bu aşamada, yükseltgenme ve indirgenme olayları gerçekleşir. Suda veya herhangi sıvıda, indirgenme reaksiyonu, elektronların negatif (-) yüklü elektrottan (katot), pozitif (+) yüklü elektrota (anot) göçüyle gerçekleşir. Buna örnek olarak hidrojen katyonunun hidrojen gazına dönüşmesini gösterebiliriz.



Yükseltgenme reaksiyonu ise, serbest elektronların anot tarafına göçüyle açıklanır. Buna örnek olarak da, negatif yüklü bir oksijen atomundaki elektronların anot tarafına göçüyle oksijen gazını (O_2) oluşturmasını verebiliriz.



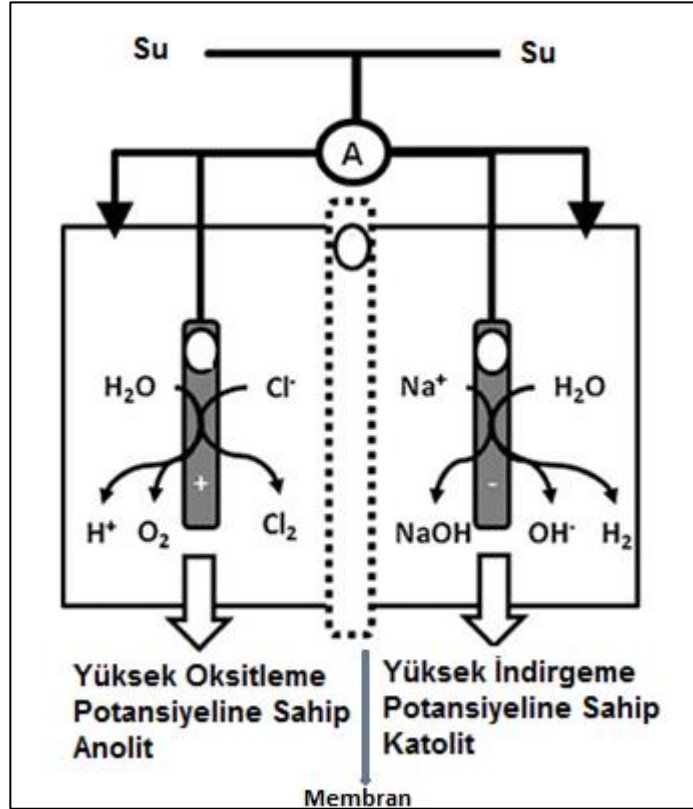
Ortamda sadece oksijen ve hidrojen molekülleri bulunan bir elektroliz düzeneğinde, her iki hidrojen molekülü bir oksijenle reaksiyona girer. İki gaz için, aynı sıcaklık ve basınç şartlarında ise bir oksijen hacmi için iki hidrojen hacmi harcanır. Suyun, standart sıcaklık ve basınç altında, bozunma veya parçalanması termodinamiksel olarak uygun değildir.



“Nernst Denklemi” ne göre, 25 °C ve pH 0’da (H^+ ’nın molar konsatrasyonu 1 iken), saf suyun standart potansiyeli 1,23 Volttur. Negatif voltaj değeri, Gibbs serbest enerjisine göre sıfırdan büyüktür.

$$G = -n.F.E \quad (2.7)$$

- G=Gibbs Serbest Enerji
- n=mol sayısı
- F= Faraday sabiti (96485 C/mol)
- E=Elektrot Potansiyeli



Şekil 2.6: Asidik ve bazik su üretimi.

- Anot (1) ve katot (2) elektrotlarını içeren, iyon-seçici değiştirici diyaframı (3).

Elektro-aktive edilmiş su, düşük konsantrasyonda mineral içeren suların elektroliz yöntemiyle elde edilir (Şekil 2.6). Doğru akım (A) uygulandığında, tuz çözeltilisinin yardımıyla (NaCl) elektrotun yüzeyindeki materyali yarı kararlı forma getirerek moleküler seviyedeki iyonik yapıların modifikasyonunu gerçekleştirip elektrokimyasal reaksiyon başlar [13]. Titanyum(Ti) elektrotlar, kararlılık, seçicilik, elektrokimyasal aktive, korozyona dayanıklılık açısından metal oksit katalizörlerle (örneğin RuO₂, TiO₂, SnO₂, IrO₂) kaplanmaktadır [14]. Anot kısmında (Şekil 2.6),

sürekli olarak anot elektrotunun yüzeyine tutunan NaCl iyonları, klor ve oksijen üretir. Fakat aynı zamanda, diğer reaktif oksidanlar aynı elektrolit sıvısı içerisinde salınır. Bu olay, redoks reaksiyonu sırasında suyun içerdiği güçlü adsorbe olan molekül çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır [14]. Bu reaksiyon, Nernst Denklemine göre, pH'a bağlı ve genellikle klor elementinin serbest formları olan Cl_2 , HClO veya ClO iyonlarını ortaya çıkartır [15]-[17]. Elektro-aktive suyun anot kısmında bulunan elektrolitte, elektrokimyasal hücre ve çalışma parametrelerine bağlı olarak, düşük pH (~2-3) ve yükseltgenme-indirgenme potansiyeli (+800 mv'a kadar) değerleri değişebilir. Katodik kısımda ise, hidrojen gazı ve diğer reaktif maddeler (genellikle antioksidanlar) açığa çıkar. Bunun sonucunda, redoks potansiyeli düşer ve pH değeri yükselir [18].

Elektrolitin yarı kararlı hale dönüşümü geçici formda değildir. Elektro-aktive suyun üretimi ve tekrar kullanımında, spontane şekilde termodinamiksel eşitsizlik şartlarında (rahatlama periyodu) aktif halde olmayan bileşikler tekrar doğru akım verilerek eski formuna sokulabilmektedir [19]. Ayrıca, rahatlama periyodunda olan elektro-aktive edilmiş suyun kararlılığının, pH'ın yükseltilmesiyle uçucu olmayan klor partiküllerinin tekrar uçucu hale getirildiği ve suyun eski formuna geri döndürüldüğü deneysel olarak ispatlanmıştır [20].

2.3.1. Elektro-aktivasyon Sistemleri

Sıvı solüsyonlarda elektro-aktivasyon teknolojisi, ilk olarak 19. Yüzyılın başlarında çalışılmıştır [21]. İlk elektroliz hücresi 1800 yılında Nicholson ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır [16]. Elektrokimyasal gelişmeler yeni elektroliz sistemlerinin gelişmesinde büyük rol oynamıştır. Daha sonra, aktive suyun bakterisit etkisinin keşfedilmesiyle endüstriye ekonomik ve çevresel olarak büyük katkılar sağlamıştır [22].

Temel olarak, elektro-aktivasyon cihazları teknik gereksinimler açısından farklı yapılarda (periyodik ve sürekli sistem) tasarlanabilmektedir. Bu tasarımda, yükleme ve elektroliz işleminin yapılacağı iki bölme (anodik ve katodik bölme) ve bu bölmeleri birbirinden ayıran yarı geçirgen bir membran bulunmaktadır [22]. İlk elektro-aktivasyon sisteminde kullanılan yarı geçirgen membranda, yüklü maddeleri geçirgenlikte seçici olmayan yapılar kullanılmıştır. Bu yapılar genellikle, seramik, kanvas, naylon, PVC (polivinil klorür) ve PTFE (politetrafloroetilen) gibi

maddelerden yapılmıştır [22]. Daha sonra, malzeme bilimindeki gelişmelerle iyon seçici membranlar kullanılmaya başlanmış ve elektroaktivasyon veriminde büyük artışlar sağlanmıştır [22]. Bu gelişmelerle üretilen suyun ya da çözeltinin düzensel yapısında, pH ve yükseltgenme-indirgenme potansiyelinde distile suya göre değişiklikler sağlamıştır. Ayrıca elektro-aktivasyon sistemlerinde anot ve katot tarafının ayrılmadan, inert elektrotlar tarafından üretimleri sağlanmıştır [23]. Bazı cihazlarda elektrotların polaritesi tersinebilir. Bundan dolayı, elektro-aktivasyon sistemleri tersinir elektrotlar kullanılan ve kullanılmayanlar olarak iki sınıfta incelenebilir. Elektrodun maddesi ve yapısı dikkate alınmadan bazı temel gereksinimler bulunmaktadır. Bunlar;

- Yüksek elektrik iletkenliği, yüksek katalitik aktivite ve hedef elektrokimyasal reaksiyon için seçiciliği olmalı,
- Uzun süre kullanılabilmesi için yüksek mekanik dayanıklılığı olmalı,
- Düşük maliyette olmalı,
- Elektrotun kap içerisinde yeri ve şekli, elektrik akımının yoğunluğuna dağılımına uygun olmalı,
- Yiyecek sektörü için, elektrotlar inert ve çözünmeyen formda olmalıdır.

2.3.2. Elektro Aktivasyon Sistemlerinin Tasarımı

Elektro-aktivasyon sistemleri genellikle üretim proseslerinin bir kolu olarak dizayn edilirler. Örneğin, 1999 yılında Japonya'da yapılan bir çalışmada farklı yapılara sahip 30 reaktör kullanılmıştır [24]. Bu çalışmada voltaj, sıvı içeriği, elektrolitin akış hızı, reaksiyon süresi gibi parametrelerin değişiklikleri denenerek optimizasyon yapılmıştır.

Endüstride, suyun elektrokimyasal aktivasyonu, porlu diyaframlar içeren beslemeli ve devirdaimli reaktör sistemleriyle sağlanmaktadır [25]. Sistemde bulunan, porlu diyafram düzeneği, üretilen suyun asidik (anolit), alkalın (katolit) veya nötre yakın olmasını sağlamaktadır. Diyaframlar, yüksek poroziteli, hidrofilik ve düşük elektrik direncine sahip olmalıdırlar [26]. Yapılan bir çalışmada, Elektro-iletken katyonik diyaframların (örneğin; Nafion-450), düşük iletken olan polyester ve polietilen diyaframlar karşılaştırılmıştır [27]. Saf su ve çeşme suyuyla yapılan denemelerde, besleme sıvıları mineralizasyon için 0,1 g/L'den 120 g/L'ye kadar

denenmiştir [28]. Üretilen elektro-aktive edilmiş suyun anolit tarafında pH 2,3-6,5, pozitif redoks potansiyelinin 1000-1200 mV civarında ve çözülmüş klor miktarının ise 30-300 ppm arasında olduğu tespit edilmiştir [21]. Diğer yandan, 10^{-4} M NaCl içeren saf suyla yapılan bir deneyde, katolit tarafında pH 6,2 olduğunda negatif redoks potansiyelinin -329 mV, pH 8,8 olduğunda ise redoks potansiyelinin -390 mV olduğu belirtilmiştir [19].

2.3.3. Elektro-aktive Suyun Fiziksel ve Kimyasal Aktiviteleri

Elektro-aktive edilmiş sular üzerinde yapılan çalışmalarda, elektroliz yapılan reaktörün tipi, çözeltinin özellikleri adına bazı değişikliklere neden olmaktadır. Anolit ve katolit suların fiziksel ve kimyasal özelliklerini açıklamak için 3 farklı temel unsur bulunmaktadır:

- i) Elektrokimyasal reaksiyonlar sonucu kararlı ürünlerin meydana gelmesi (kararlı asitler ve bazlar
- ii) Serbest radikaller içeren, kararlı olmayan yüksek reaktifler içermeleri ve yarılanma sürelerinin distile suya göre yüksek olması
- iii) Kompleksler ve bazı iyon, molekül, radikal gibi maddelerin elektrot yüzeylerinde uzun süre kararlı kalabilen yapılar oluşturması [13], [29].

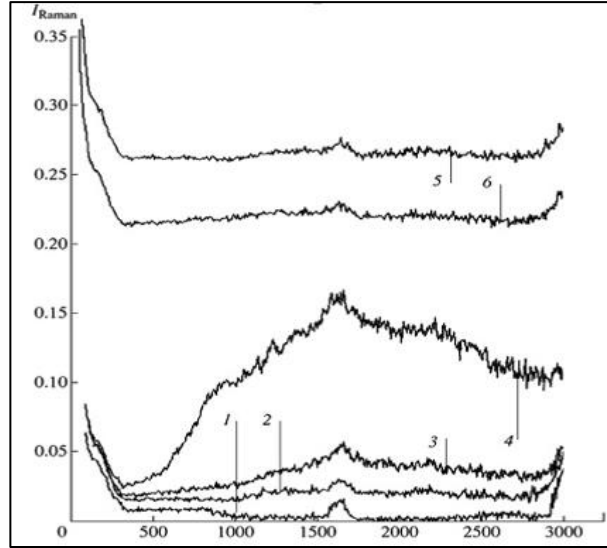
Birinci maddede, elektro-aktive edilmiş suyun asidik veya alkali olması üzerine pH etkisinden bahsedilmektedir. Sıvı asitler ve konjuge bazlar, organik reaksiyonlar için çok yönlü ve yaygın bir katalizör olarak kullanılmaktadırlar [9].

İkinci maddede, aktive suların indirgeyici ve yükseltgeyici özelliklerinden bahsedilmektedir. Serbest radikaller ve diğer aktif iyonlar içeren, yüksek reaktiviteye sahip ve kararlı olmayan ürünlerin aktive su içerisinde bulunması yarılanma süresinin 48 saatten az olmasına etki ettiğini belirtmektedir. Konsantrasyonları 10^7 /ml'ye ulaşabilen ve 0,2-0,5 μ m boyutunda olan elektrolitik mikro kabarcıkların varlığı bu süreyi etkileyebilmektedir. Bu olay, saf suyun düşük yoğunlukta elektromanyetik alana maruz bırakılmasıyla, çözülmüş gazların konsantrasyonunda artışa sebep olduğu ve tekli oksijen atomunun reaktivitesini arttırarak hidroksil radikallerinin oluşmasını sağladığı belirtilmektedir [30].

Üçüncü maddede, elektroliz sırasında kararlı yapıların oluşmasından bahsedilmektedir. Bu yapılar, elektrotların yakınında oluşan ve elektrota çok yüksek gerilim düşmeleri ($\sim 10^6$ volt/cm) sağlarlar. Bu gerilim düşmeleri, hidratlı membranlar veya elektrotların düz yüzeylerinde oluşan nano boyuttaki kabarcıkların iyon ve moleküllerin çözünmelerini arttırdığı için solüsyon içerisinde birbirini etkileyen atomik ve moleküler yapıların oluşmasından kaynaklandığı bildirilmektedir [30]. Bu tanımlamalar, su molekülü dallanmalarında yeniden yapılanmaya sebep olmakta ve 10-13 dallanma sayısına sahip olan yapıyı 5-6 dallanma sayısına kadar indirdiğini kanıtlamaktadır [29]. Başka bir çalışmada elektroliz sonunda, moleküler dallanma sayısının düşüşünden bahsedilmektedir [31]. Suyun yapısında ortaya çıkan bu değişiklikler, katalitik ve biyo-katalitik özelliklerini de etkilemektedir. Hanoka ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, çelişkili bir şekilde, indirgeyici özellikte olan katot sıvısına ticari antioksidanlar eklendiğinde, uzun süreli hastalıkların potansiyel artışında süper-oksit ters-değişimi oluşumunu incelemişlerdir [32].

2.3.4. Elektro-aktive Edilmiş Suların Raman Spektrumu

Elektro-aktive edilmiş suların, dışardan elektrik akımı verildiğinde uyarılmadan sonra yarı kararlı forma geçtikleri rapor edilmiştir [22]. Ayrıca, yarı kararlı formda, elektro-aktive edilmiş suların reaktifliğinin normal sulara göre daha fazla olduğu söylenmektedir. Bu durum, yapılan bir çalışmada, elektro-aktive suyun titreşimli spektrumu Raman Spektrum cihazıyla izah edilmiştir. Bu çalışmada, distile suya 4×10^{-4} M sodyumtiosülfat eklenerek elektrik alana maruz bırakılmıştır. Moleküler oksijen ve hidrojen anot ve katot bölgelerine dağılmış daha sonra elektrotların yakınılarından numune alınarak anolitin pH'ı 4, katolitin pH'ı ise 10 olarak ölçülmüştür. Raman spektrum çalışmaları için, su örnekleri yine elektrotların yakınılarından alınmıştır. Ayrıca, asidik ve bazik pH'a sahip olan kısımlarla karşılaştırma yapılabilmesi için deneye katılmayan iki örnekten birine sülfirik asit diğerine de sodyum hidroksit eklenmiştir. Dik açılı ve tek geçişli kuartz hücrelerin kullanıldığı Raman spektrumunda, elektro-aktive edilmiş su ve kontrol olarak da su örnekleri kullanılmıştır. 200-mW uyarım ve 480 nm uzunluğunda argon lazer yardımıyla 90° lazere maruz bırakılmıştır. Spektrum aralığı $50-4000 \text{ cm}^{-1}$ olarak 20°C 'de kaydedilmiştir.



Şekil 2.7: Değişik suların raman spektrumları.

- (1) saf su, (2) 4×10^{-4} M sodyum hidrosülfat, (3) bazik aktive su, (4) asidik aktive su, (5) bazik su, (6) asidik su [34].

Elektro aktive suyun Raman spektrumu ile gerçekleştirilen analizi Şekil 2.7’de verilmiştir. Görüldüğü gibi aktif suyun kimyasal yapısı diğer sulara göre oldukça farklı olduğu görülmektedir [34]. Anolit ve katolitin görüldüğü bölgede kimyasal olarak asidik ve bazik hale getirilmiş suların piklerine rastlanmamıştır. Spektrumda, sodyumhidrosülfat eklenen suyun $1000-1500 \text{ cm}^{-1}$ bölgesinde görüldüğü belirtilmektedir. Zamana bağlı şiddete bakıldığında, 24 saat sonra, katot yakınından alınan numunede ufak bir düşüş gözlenmiştir. Aynı durum anot yakınından alınan numune için geçerli değildir. Anolit ve katolitten alınan numunelerden eşit hacimlerde alınıp karıştırıldığında, elektro-aktive edilmiş su örneğine göre, $700-2700 \text{ cm}^{-1}$ aralığında saçılmada düşüş gözlenmiştir. Raman spektrumu, genellikle, su ve sıvı solüsyonların hidrojen bağlarının gücünün zamana bağlı ölçümünde kullanılır [35]. Anot ve katot elektrotlarının yakın yerlerinden alınan numunelerde Raman genişliğinin $700-2700 \text{ cm}^{-1}$ arasında olması ortamda yer alan fazladan H^+ veya OH^- iyonlarının varlığından kaynaklandığı söylenmektedir [35]. Fazladan yer alan bu iyonlar elektro-aktive edilmiş suyun asidik veya alkalın özellikte olmasında etki göstermektedir. Ayrıca, infrared-absorpsiyon spektrumunda konsantre asit ve alkali solüsyonlarla yapılan ölçümlerde elde edilen bantların Raman spektrumunda elde edilen titreşim bantlarını destekler nitelikte olduğu bildirilmiştir [34]. Ayrıca bu

çalışmada, elektro-aktive suyun spesifik özelliklerinde mineral miktarının önemli olduğu söylenmektedir.

Elektro-aktive edilmiş suyun asidik ve bazik kısımlarında farklı polarlaşma etkilerinin olduğu bilinmektedir [36]. Katot yakınlarında bulunan fazladan hidroksil iyonunun, zayıf hidrojen bağının oluşumunda simetriye katkı sağladığı bilinmektedir ($O\cdots H\cdots O$)⁻. Eş zamanlı olarak, anot elektrodu yakınından alınan örneklerde güçlü hidrojen bağı varlığına rastlanılmıştır. Bu durum, anot elektrodu yakınında bulunan suyun katot elektrodu yakınında bulunana oranla hidrojen atomlarının oksijen atomuna daha yakın olduğu ve bu da Raman spektrumunda daha yüksek saçılma göstermesiyle açıklanmıştır. Infrared-spektrumla ölçülen değerlerde ise, anot yakınından alınan örneklerde H_5O_2 gupları, katot yakınından alınan örneklerde ise H_3O^{2-} gupları olduğu görülmüştür [36]. Ayrıca, anot elektrotu yakınından alınan örneklerde, su moleküllerinin elektrokimyasal bozunmasıyla O-O, O-O⁺ ve H-H⁺ kararsız kompleks yapıların oluştuğu incelenmiştir. Başka bir çalışmada, az miktarlarda sodyum hidrosülfat eklenmesinin, elektro-aktive edilmiş suyun her iki kısmından alınan numunelerde, Raman spektrumunda herhangi bir değişikliğe yol açmadığı belirtilmiştir [37].

2.3.5. Elektro-aktive Edilmiş Suyun Uygulama Alanları

Asidik ve bazik aktive su, bazı elektrokimyasal özelliklerinden dolayı birçok kullanım alanına sahiptir (Tablo 2.2). Asidik aktive su genel olarak bakteri ve maya inaktivasyonunda kullanılmaktadır [38]. Bazik aktive su ise enzim ve mayaların aktivasyonunda kullanıldığı bilinmektedir [39].

Tablo 2.2: Elektro-aktif suların bazı kullanım alanları.

Asidik aktive su	Bazik aktive su
<ul style="list-style-type: none">• Kan basıncını azaltır.• Bakteriler üzerinde sterilizasyon etkisi vardır [40].• Süs bitkilerinin canlılıklarının korunumunda etkilidir [41].• Enfeksiyonların iyileştirilmesinde etkili olduğu bilinmektedir.	<ul style="list-style-type: none">• Antioksidan yapısından dolayı vücuttaki alkali dengesini korur [42].• Bitkilerin gelişmesinde etkilidir.• Kan basıncını artırır.• Ev hayvanlarının parazit ve enfeksiyonlardan korunumunda etkilidir.• Bazı mikroorganizmaların inkübasyonunda etkilidir.[43].

2.4. Melas

Kamış ve şekeri pancarından, sukrozun kristal halde elde edilmesi için yapılan işlemlerin sonucunda geriye kalan ve koyu kahve renkli, ortalama % 50 şeker ihtiva eden, yüksek viskoziteli (kıvamlı) şuruba melas denir. Melasın içerdiği maddeler ve yüzdeleri aşağıdaki tabloda verilmiştir;

Tablo 2.3: Melas içeriği.

Bileşen	%
Kuru madde	78,000-85,000
Toplam Şeker	48,000-68,000
Toplam azot	0,000-3,000
Toplam karbon	28,000-34,000
Toplam inorganik madde	4,000-11,000
Potasyum	2,200-5,000
Çinko	0,003-0,005
İnositol	0,500-0,800
Fosfor	0,020-0,070
Kalsiyum	0,150-0,170

Melas, şeker olarak sükroz içerir. Melasın ihtiva ettiği diğer organik maddelerin başlıcaları; azotlu maddeler, organik asitler, nişasta ve pentozanlar gibi kompleks karbohidratlar ve az miktarda mumsu maddeler, steroller ve pigmentlerdir. Melasta bulunan azotlu maddeler aminoasitler, amidler ve diğer basit azotlu maddelerdir. Şeker pancarı melasında baskın halde bulunan azotlu maddeler (betain ve glutamik asit) melasın karakteristik koku ve lezzetinin büyük bir kısmını oluştururlar. Asetik asit, bütirik asit, formik asit ve propiyonik asit, melasta bulunan organik asitlerdir. Melasta potasyum, sodyum, demir, sülfat, magnezyum, kalsiyum, klorür ve fosfat gibi inorganik bileşikleri vardır. Melasta içerisinde biyotin, pantotenik asit, inositol, tiyamin, riboflavin, nikotirik asit, pridoksin ve kolin gibi B gubu vitaminler bulunmaktadır [44].

Melas, glukozdan daha ucuz olması ve içeriğindeki inorganik maddelerden dolayı maya fermantasyonunda kullanılan ticari bir üründür. Son yıllarda şeker kaynağı olarak melas, besiyeri olarak *A. eutrophus*, *Azotobacter vinelandii* ve rekombinant *E.coli* kullanılmasıyla PHB üretimi gerçekleştirilmektedir. Gram hücre başına elde edilen kuru PHB % 15-47 arasında elde edilmektedir [45], [46].

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Kullanılan sarf malzemelerin listesi Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Deneyde kullanılan kimyasal malzemeler.

Malzeme Adı	Firma Adı	Katalog No
Sodyum asetat	SIGMA-ALDRICH	S7899
Asetik asit	RIEDEL	27225
Melas	PAKMAYA	-
Demir(3) klorür	SIGMA-ALDRICH	372870
Kalsiyum klorür	MERCK	20829
Bakır sülfat	SIGMA-ALDRICH	451657
Kobalt klorür	SIGMA-ALDRICH	60818
Nikel klorür	SIGMA-ALDRICH	339350
Çinko sülfat	SIGMA-ALDRICH	Z0251
Fenol	SIGMA-ALDRICH	33522
Sodyum karbonat	SIGMA-ALDRICH	451614
Sodyum hidroksit	MERCK	1064621000
Glukoz	FLUKA	49162
Fruktoz	FLUKA	F0127
Pepton	BD	211693
Yeast Extract	MERCK	1.07363
Meat Extract	SIGMA-ALDRICH	70164
Amonyum sülfat	SIGMA-ALDRICH	A3920
Sodyum klorür	MERCK	1.064.001.000
Amonyum klorür	SIGMA-ALDRICH	A9434
Disodyum fosfat	RIEDEL	4243
Magnezyum fosfat	SIGMA-ALDRICH	M1265
Etil Alkol	SIGMA-ALDRICH	459844
Sülfürik asit	MERCK	1007311000
Magnezyum Sülfat	SIGMA-ALDRICH	M2643
Potasyum fosfat	RIEDEL	4243
Kloroform	SIGMA-ALDRICH	C2432
TLC Tabaka	MERCK	HX271578

3.1.2. Mikroorganizma

Bu çalışmada *Wautersia eutropha* NRRL B-2804 (ATCC 25207) kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Enzim

Bu çalışmada Sigma Aldrich firmasından temin edilen invertaz enzimi (Katalog no: I9253) kullanıldı.

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazların listesi Tablo 3.2 'de verilmiştir.

Tablo 3.2: Deneyleerde kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Firma Adı	Modeli
Isıtıcıli manyetik karıştırıcı	HEIDOLPH	MR Hei-Tec
Otoklav	Varioklav	300
UV-Vis spektrofotometre	Shimadzu	UV-1601
Santrifüj Cihazı	Centurion Scientific Ltd.	K241R
Vakum fırını	VWR	1450M
İnkübatör	Nüve	FN 500
Homojenizatör	IKA	T 25
Evaporatör	Buchi	R144
FT-IR Spektrometre	Perkin Elmer	Spectrum 100 FT-IR
H-NMR Spektrometre	Varian Inova	500 NMR
C-NMR Spektrometre	Varian Inova	500 NMR
Termogavimetre	Mettler Toledo	TGA/SDTA851
Mikropipet Seti	Thermo Scientific	Finnpipette
Steril Kabin	Tez-San	Clas II
Mikrosantrifüj	Beckman Coulter	Microfuge 18
Hassas Terazi	Sartorius	BL210S, BL3100
-80 Derin Dondurucu	Thermo Scientific	Forma -86 ULT
Elektro-aktive su cihazı	Ecovod	EAS 3K

3.1.5. Kullanılan Çözelti ve Besiyerleri

Deneylerde kullanılan çözelti ve besiyeri aşağıda verilmiştir.

Tablo 3.3: Eser element çözeltisi.

İçerik	% (w/w)
Demir (3) klorür	9,70
Kalsiyum klorür	7,80
Bakır sülfat	0,16
Kobalt Klorür	0,12
Nikel Klorür	0,12
Çinko Sülfat	0,06
Saf Su	82,04

Tablo 3.4: Büyüme besiyeri.

İçerik	% (w/w)
Peptone	1,0
Yeast Extract	1,0
Meat Extract	0,5
Amonyum Sülfat	0,5
Saf Su, asidik aktive ve bazik aktive su	97,0

Tablo 3.5: Glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyeri.

İçerik	% (w/w)
Disodyum fosfat	0,38
Potasyum fosfat	0,27
Amonyum klorür	0,20
Magnezyum sülfat	0,02
Eser element çözeltisi	1,00
Glukoz	1,58
Fruktoz	1,58
Distile, asidik ve bazik aktive su	96,11

Tablo 3.6: Hidrolize melas içeren besiyeri.

İçerik	% (w/w)
Disodyum fosfat	0,38
Potasyum fosfat	0,27
Amonyum klorür	0,20
Magnezyum sülfat	0,02
Eser element çözeltisi	1,00
Hidrolize Melas	4,68
Saf Su, asidik aktive ve bazik aktive su	93,45

3.2. Metot

3.2.1. İnvvertazın Aktivite Tayini

Sukroz çözeltisi (40 ml, 300 mM) kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 4.3) içerisinde hazırlanarak 100 mg invertaz enzimiyle (30 °C, 60 dakika, 300 rpm) muamele edilmiştir. Toplam şeker miktarı DNS methoduyla belirlenmiştir. Aktivite birimi (IU), aktivite tayin şartlarında dakikada 1 µmol sukroz hidrolize eden enzim miktarı olarak tanımlandı. Enzimin aktivitesi 145 IU/mg enzim olarak hesaplandı.

$$IU = \frac{\mu\text{mol sukroz}}{\text{dakika} \times \text{mg enzim}} \quad (3.1)$$

3.2.2. Melasın İçinde Bulunan Sükrozun Hidrolizi

Melas (30 g), asetat tampon çözeltisiyle (25 mM, pH:4,5) 5 kat seyreltildi. Çözelti homojen hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcı (500 rpm, 10 dakika) ile karıştırıldı. Çözelti ortamına 1 ml invertaz (2,5 mg/ml) ilave edilip manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak (45 dk, 65 °C, 500 rpm) hidroliz reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon süresince (45 dk) alınan örnekler 100 °C'de 10 dakika muamele edilerek enzim aktivitesi durduruldu. Elde edilen şeker örnekleri ince tabaka kromatografisi (TLC; Thin Layer Chromatography) ile takip edilerek, toplam indirgen şeker miktarı ise DNS metoduyla tayin edildi [47].

3.2.3. TLC Analiz Metodu

Enzimatik hidroliz reaksiyonu ile melas içerisindeki sükrözün, glukoz ve fruktoz yan ürünlerine hidrolizi İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography; TLC) yöntemiyle takip edilmiştir. Ürünler silika jel ile kaplanmış plakalar (Merck 555) üzerine 0,002 ml damlatılarak asetonitril: su (80:20 v/v) bulunan çözelti sisteminde yürütüldü. Reaksiyon ürünlerinin görünür hale getirilebilmesi için yürütülen plaka % 5 sülfirik asit (w/w) ve % 0,5 α -naftol (w/w) içeren % 95'lik etil alkol çözeltisine daldırılarak sıcak plaka (hot plate) üzerinde 110 °C'de 10 dakika yakıldı.

3.2.4. Toplam Şeker Tayini

DNS (Dinitro salisilik asit) çözeltisi, fenol (0,2 g), sodyum karbonat (50 mg) ve sodyum hidroksit (1,6 g) toplam hacim 100 ml olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlandı [47]. 100 μ l melas numunesi üzerine 100 μ l DNS çözeltisi eklenerek vorteks ile karıştırıldı. Karışım 100 °C'de 5 dakika tutulduktan sonra oda sıcaklığına soğutuldu ve UV absorbansı (575 nm) ölçüldü. Standart gafiği için farklı konsantrasyonlarda (0,25-1,75 mg/ml) hazırlanan glukoz çözeltileri kullanıldı.

3.2.5. Elektro-aktif Suyun Hazırlanması

Elektro-aktif su, cihazın (Ecovod EAS 3K) anot ve katot hücrelerine 1'er lt içme suyu (Lido Su) konularak 2 saat boyunca çalıştırılıp, dış ortam sıcaklığında elde edildi.

Tablo 3.7: Elektro-aktif su cihazının teknik özellikleri.

Parametre	Değer
Kapasite	1 L/saat
Gerilim	220 V
Frekans	50 Hz
Ortalama Güç Tüketimi	0,4 kW

Tablo 3.8: Elektro-aktif suların hazırlanmasında kullanılan içme suyunun(Lido) özellikleri.

Bileşen/Parametre		Birim	Değer
Anyon ve Katyonlar	Florür(F ⁻)	mg/L	0,04
	Bikarbonat(HCO ₃ ⁻)		104,92
	Klorür(Cl ⁻)		1,20
	Sülfat(SO ₄ ⁻²)		6,90
	Kalsiyum(Ca ⁺²)		32,20
	Magnezyum(Mg ⁺²)		4,20
	Potasyum(K ⁺)		0,20
	Sodyum(Na ⁺)		5,40
	Demir(Fe ⁺²)		0,00
Parametre	İletkenlik	µs/cm	111,20
	pH	-	7,04



Şekil 3.1: Elektroaktif su üretim cihazı.

3.2.6. *Wautersia Eutropha* 'nın Büyütülmesi

PHB üretimi için *Wautersia eutropha* bakterisi kullanıldı. Gliserol stoktan alınan 150 µL bakteri örneği başlangıç pH değeri 7.0 olan Tablo 3.4'teki besiyerine (5 ml) aktarılarak 24 saat boyunca inkübasyona (150 rpm, 30 °C) tabii tutuldu ve optik yoğunluğu ($\lambda_{600 \text{ nm}}$) UV-VIS spektrofotometre ile takip edildi. Elde edilen hücre kültürü glukoz-fruktoz karışımı veya hidrolize melas içeren besiyerinde kullanıldı.

3.2.7. Poli-β-Hidroksibütirat Üretimi

Bu çalışmada, 5ml'lik büyüme besiyerinden (Tablo 3.4) elde edilen hücre kültürü, farklı sularla (distile, asidik aktive ve bazik aktive) hazırlanan 100 ml'lik besiyerine (Tablo 3.4) aktarıldı. Bu aşamadan sonra elde edilen hücre kültürü glukoz-fruktoz karışımı veya hidrolize melas içeren besiyerinde kullanıldı.

3.2.7.1. Glukoz-fruktoz Karışımı İçeren Besiyerinde Üretim

Büyüme besiyerinden 1 ml alınarak 250 ml erlenmayer flask içerisindeki (100 ml) pH değeri 7.0 olan besiyerine (Tablo 3.4) aşılama yapıldı. Belirli zaman aralıklarında türbidite değeri ölçülerek bakteri kültürünün üremesi takip edildi. Türbidite değerinin sabitlendiği mertebede (~2,000) inkübasyon durdurularak santrifüj (20 dk, 4 °C, 3800 rpm) edildi. Hücre pelleti NaCl çözeltisiyle (% 0,9, 10 ml) yıkandıktan sonra 10 ml glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyeri ile süspanse edildi ve hücre kültürü 650 ml'lik glukoz-fruktoz karışımı ile hazırlanan besiyerine (Tablo 3.5) transfer edilerek 48 saat inkübe (30 °C'de, 150 rpm) edildi. İnkübasyon sırasında türbidite değeri takip edilerek 48 saat sonunda elde edilen kültür santrifüj (4 °C, 3800 rpm) edildi. Hücre kültürü, NaCl çözeltisi (% 0,9, 5 ml) ile yıkandıktan sonra tekrar santrifüj (4 °C, 3800 rpm) edilerek vakum fırınında (15 saat, 50 °C) kurutuldu. Besiyerinin inkübasyon başlangıcı ve sonundaki toplam şeker miktarı DNS metodu [47] ile belirlendi. Deneylede kullanılan besiyeriler, saf su veya Elektro-aktive edilmiş suyla seyreltilerek pH 7.0 olacak şekilde hazırlandı. Besiyeri hazırlanırken glukoz, fruktoz ve MgSO₄.7H₂O ayrı ayrı otoklavlandı ve aseptik olarak besiyerine ilave edildi.

3.2.7.2. Hidrolize Melas İçeren Besiyerinde Üretim

Büyüme besiyerinden 1 ml alınarak 250 ml erlenmayer flask içerisindeki hidrolize melas içeren (100 ml) pH değeri 7.0 olan besiyerine (Tablo 3.4) aşılama yapıldı. Belirli zaman aralıklarında türbidite değeri ölçülerek bakteri kültürünün üremesi takip edildi. Türbidite değerinin sabitlendiği mertebede (~2,000) inkübasyon durdurularak santrifüj (20 dk, 4 °C, 3800 rpm) edildi. Hücre pelleti NaCl çözeltisiyle (% 0,9, 10 ml) yıkandıktan sonra 10 ml hidrolize melas içeren besiyeri ile süspanse

edildi ve hücre kültürü 650 ml'lik besiyerine (Tablo 3.6) transfer edilerek 48 saat boyunca inkübe (30 °C'de, 150 rpm) edildi. İnkübasyon sırasında türbidite değeri takip edilerek 48 saat sonunda elde edilen kültür santrifüj (4 °C, 3800 rpm) edildi. Hücre kültürü, NaCl çözeltisi (% 0,9; 5 ml) ile yıkandıktan sonra tekrar santrifüj (4 °C, 3800 rpm) edilerek vakum fırınında (15 saat, 50 °C) kurumaya bırakıldı. Besiyerinin inkübasyon başlangıcı ve sonundaki toplam şeker miktarı DNS metodu [47] ile belirlendi. Deneylerde kullanılan besiyeriler, saf su veya elektro-aktive edilmiş suyla seyreltilerek hazırlandı. Besiyeri hazırlanırken hidrolize melas ve MgSO₄.7H₂O ayrı ayrı otoklavlandı ve aseptik olarak besiyerine ilave edildi.

3.2.8. Poli-β-Hidroksibütirat Ekstraksiyonu

Poli-β-Hidroksibütirat (PHB) eldesi Chaijamrus ve Udpuay tarafından geliştirilen ekstraksiyon metodu kullanılarak gerçekleştirildi [48]. Vakum fırınında kurutulan hücreler ağırlığının 10 katı kadar kloroform içerisinde homojenizatör (10 dk, 25 °C, 13500 rpm) kullanılarak parçalandı ve elde edilen süpernatant filtre kâğıdıyla süzüldü. Süpernatant evaporatör kullanılarak viskoz hale getirildi ve hacmen 10 katı etil alkol (% 95 v/v) çözeltisine damla damla ilave edilerek çöktürüldü. Çöken PHB iki kez etil alkol kullanılarak yıkandı ve vakum fırında (50 °C, 24 saat) kurutuldu.

3.2.9. Poli-β-Hidroksibütirat Analizi

Elde edilen ürün, UV-spektrometre, FT-IR, H-NMR, ¹³C-NMR ve TGA kullanılarak analiz edildi.

3.2.9.1. UV-Spektrometre

Kurutma işlemi sonrasında elde edilen katı örnekten alınan numune (0,1 g), balon içerisinde bulunan sülfirik asit (5 ml, % 98 v/v) üzerine eklenip su banyosunda ısıtma işlemi (1 saat, 60 °C) gerçekleştirildi [49]. Oda sıcaklığında soğumaya bırakılan çözeltiden 20 µl örnek alındı ve 1 ml'ye sülfirik asitle (% 98 v/v) tamamlanarak UV spektrometrede (200-300 nm) absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Uygulanan yöntem ile 235 nm'de maksimum absorbans değeri gözlemlendi.

3.2.9.2. Infrared ve NMR Spektrumu

IR-spektrometrik (Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR spectrometer) ölçüm için 1 mg örnek kullanılarak 650-4000 cm^{-1} bölgesindeki absorpsiyon dalga boyunda ölçüm gerçekleştirildi. NMR spektrumu için 4 mg örnek alınarak d-kloroform içerisinde çözülüp, H-NMR (Varian Inova 500 NMR) spektrum analizi gerçekleştirildi. ^{13}C -NMR spektrum ölçümü için 10 mg örnek kullanıldı.

3.2.9.3. Termogavimetrik Analiz

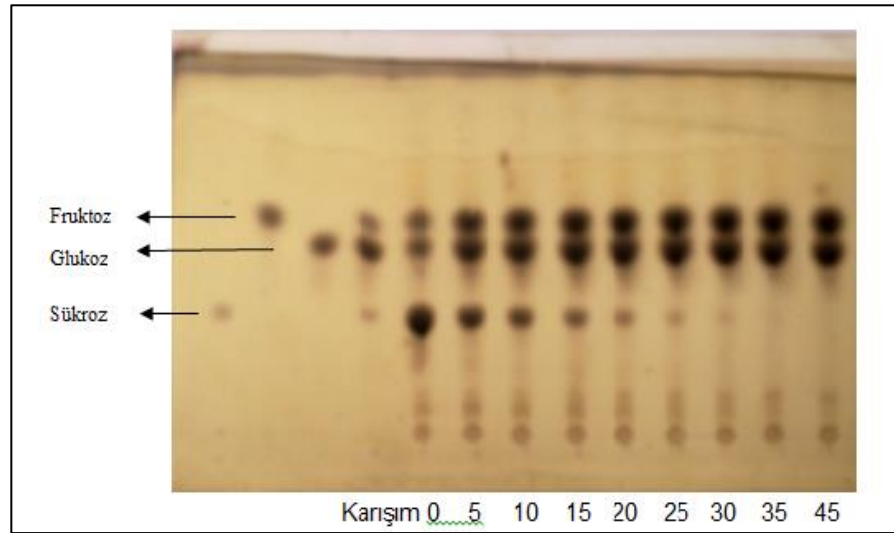
Üretilen PHB için TGA analizi TGA/SDTA851 Mettler Toledo marka cihaz ile gerçekleştirildi. Analizde N_2 akış hızı 20 ml/dk olarak belirlendi.

4. DENEYSEL SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, *Wautersia eutropha* NRRL B-2804 suşu kullanılarak PHB üretimine karbon kaynağının (glukoz-fruktoz karışımı veya hidrolize melas) ve elektro-aktive suların (asidik ve bazik aktive) etkisi çalışıldı. Yapılan çalışmalarda her bir deney 3 (üç) kez tekrarlanmıştır. Elektro-aktive sularla yapılan deneyler suyun hazırlandığı gün ve depolanan (5 gün ve 10 gün) sularla gerçekleştirildi.

4.1. Melas İçerisinde Bulunan Sükrozun Hidrolizi

İnvertaz kullanılarak gerçekleştirilen melas şekerinin hidroliz reaksiyonu TLC metoduyla takip edildi (Şekil:4.1).



Şekil 4.1: Melasda bulunan sukrozun hidroliz ürünlerinin TLC analizi.

TLC'den görüldüğü gibi 45 dakika hidroliz sonunda melas şekeri tamamen glukoz ve fruktoza çevrildi.

4.2. Toplam Şeker Tayini

İnvertaz kullanılarak gerçekleştirilen melas şekerinin hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen monosakkaritlerin (glukoz ve fruktoz) miktarları DNS metodu ile tayin edildi. Reaksiyon neticesinde; 45 dakikada 1 gram melastan 0,64 g indirgen şeker elde edildi. Bu değer Tablo 2.3'te verilen aralıktadır.

4.3. Elektro-aktive Su

Deneylerde kullanılan elektro-aktive suyun eldesinde Lido marka içme suyu kullanıldı. Elektro-aktive su cihazıyla yapılan işlemde sonra aşağıdaki değerlere sahip sular elde edildi.

Tablo 4.1: Deneylerde kullanılan su türlerinin özellikleri.

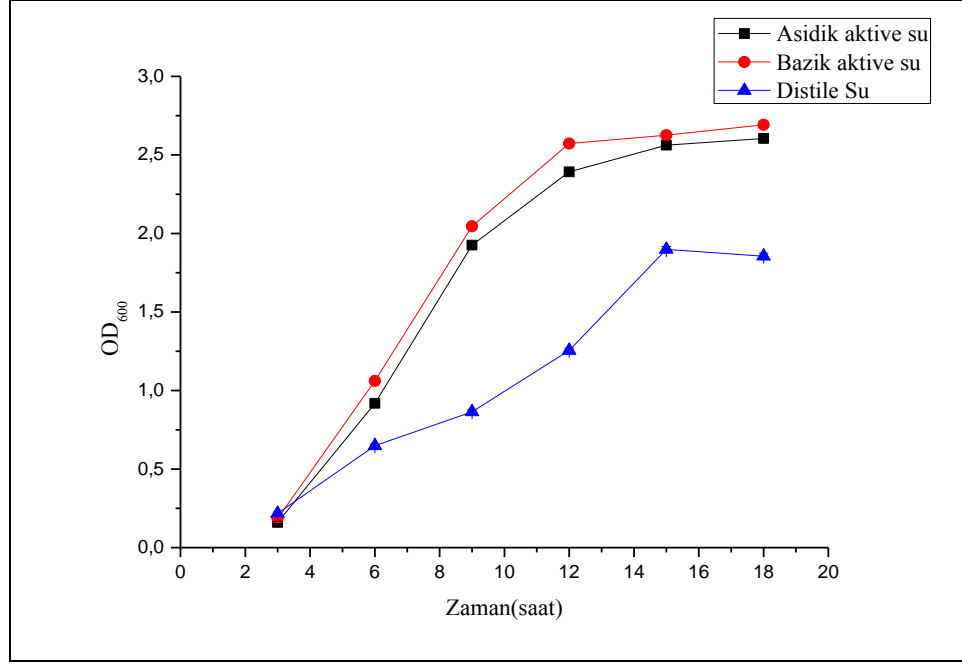
Su	pH	ORP (mV)
Distile	6,80	+141
Asidik aktive	3,51	+38
Bazik aktive	9,75	-255

4.4. Mikroorganizmanın Büyütülmesi

Wautersia eutropha bakterisinin büyüme besiyerinde zamana göre optik yoğunluk değerleri incelendi. Büyüme besiyerlerinde aktive su (asidik ve bazik aktive) ve distile su kullanıldı.

4.4.1. *Wautersia eutropha* Bakterisinin Büyütülmesi

Mikroorganizmanın büyüülmesi asidik aktive, bazik aktive ve distile su kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.2’de verilmiştir

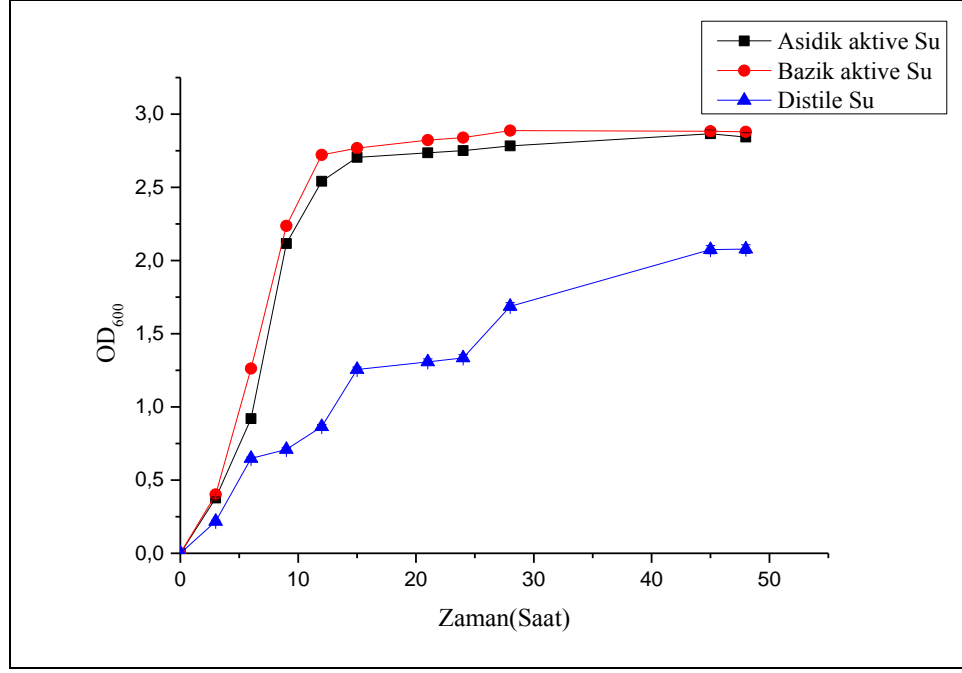


Şekil 4.2: Aktive sular ve distile su kullanılarak hazırlanan büyüme besiyerinde *Wautersia eutropha* bakterisinin optik yoğunluk değerleri.

Şekil 4.2'den görülebileceği gibi, bazik aktive suyla hazırlanan besiyeri, diğer besiyerlerine göre 4 saat daha erken gecikme evresine geldiği görülmektedir. Bu sonuca göre elektro-aktive edilmiş suların difüzyonu hızlandırdığını ortaya koymaktadır.

4.4.2. Glukoz-Fruktoz Karışımı ile Hazırlanan Besiyerinde Üretim

Glukoz-fruktoz karışımı ile hazırlanan besiyerinde *Wautersia eutropha* bakterisinin zamana göre optik yoğunluk değerleri incelendi. Besiyerlerinde aktive sularla (asidik ve bazik aktive) ve distile su kullanıldı.

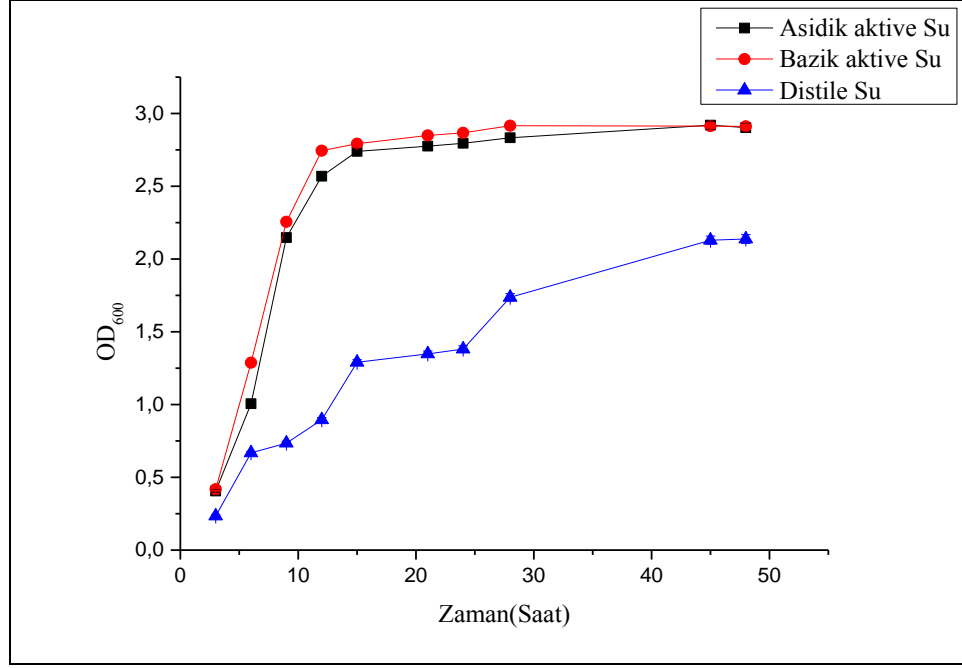


Şekil 4.3: Aktive sular ve distile su kullanılarak glukoz-fruktoz karışımı ile hazırlanan besiyerinde *Wautersia eutropha* bakterisinin optik yoğunlukları.

Şekil 4.3'den de anlaşılacağı gibi, elektro-aktive edilen sular (asidik ve bazik aktive), büyüme eğrisinin 9. saatinde yakın optik değerlere ulaşmış olmalarına rağmen distile suyla hazırlanan besiyerinin daha düşük değerlere sahip olduğu açıkça görülmektedir.

4.4.3. Hidrolize Melas ile Hazırlanan Besiyerinde Üretim

Hidrolize melas ile hazırlanan besiyerinde *Wautersia eutropha* bakterisinin zamana göre optik yoğunluk değerleri incelendi. Besiyerlerinde elektro-aktive sular (asidik ve bazik aktive) ve distile su kullanıldı.



Şekil 4.4: Aktive sular ve distile su kullanılarak hidrolize melas ile hazırlanan besiyerinde mikroorganizmanın büyütülmesi.

Şekil 4.4'den görüldüğü gibi, elektro-aktive edilen sular(asidik ve bazik aktive) büyüme eğrisinin 9. saatinde yakın optik değerlere ulaştı. Distile suyla hazırlanan besiyerinin daha düşük değerlere sahip olduğu görülmektedir.

4.5. PHB Ekstraksiyonu

4.5.1. Glukoz-Fruktoz Karışımı ile Hazırlanan Besiyerinde

Wautersia eutropha bakterisinin, karbon kaynağı olarak glukoz-fruktoz karışımı kullanılan besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen kuru hücre ağırlıkları asidik ve bazik aktive su ile saf su için sırasıyla 1,62 g/L, 1,86 g/L ve 1,29 g/L olarak belirlendi.

Elektro-aktive sularla hazırlanan besiyerinde *Wautersia eutropha* bakterisinin 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen PHB miktarının kuru hücre miktarına oranı Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2: Karbon kaynağı olarak glukoz-fruktoz karışımı kullanılarak Elektro-aktive su ve distile suyla hazırlanan besiyerinde *Wautersia eutropha* bakterisinin 48 saatlik inkübasyonu ile elde edilen PHB miktarının kuru hücre miktarına oranı.

Su	PHB miktarı (g)/Kuru hücre miktarı (g)
Asidik aktive	0,1339
Bazik aktive	0,1441
Distile	0,1048

Çalışma sonunda elde edilen PHB miktarları asidik (% 13,39), bazik (% 14,41) ve distile su (% 10,48) için incelendiğinde Elektro-aktive suyun bazik kısmıyla yapılan inkübasyonun daha iyi sonuç verdiği belirlendi.

4.5.2. Hidrolize Melas ile Hazırlanan Besiyerinde

Wautersia eutropha bakterisinin karbon kaynağı olarak hidrolize melas kullanılan besiyerinde 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen kuru hücre ağırlıkları asidik ve bazik aktive su ile saf su için sırasıyla 2,02 g/L, 2,31 g/L ve 1,62 g/L olarak belirlendi.

Elektro-aktive sularla hazırlanan hidrolize melas içeren besiyerinde *Wautersia eutropha* bakterisinin 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen PHB miktarının kuru hücre miktarına oranı Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3: Karbon kaynağı olarak hidrolize melas kullanılarak Elektro-aktive su ve distile suyla hazırlanan besiyerinde *Wautersia eutropha* bakterisinin 48 saatlik inkübasyonu ile elde edilen PHB miktarının kuru hücre miktarına oranı.

Su	PHB miktarı (g)/Kuru hücre miktarı (g)
Asidik Su	0,1662
Bazik Su	0,1835
Distile su	0,1282

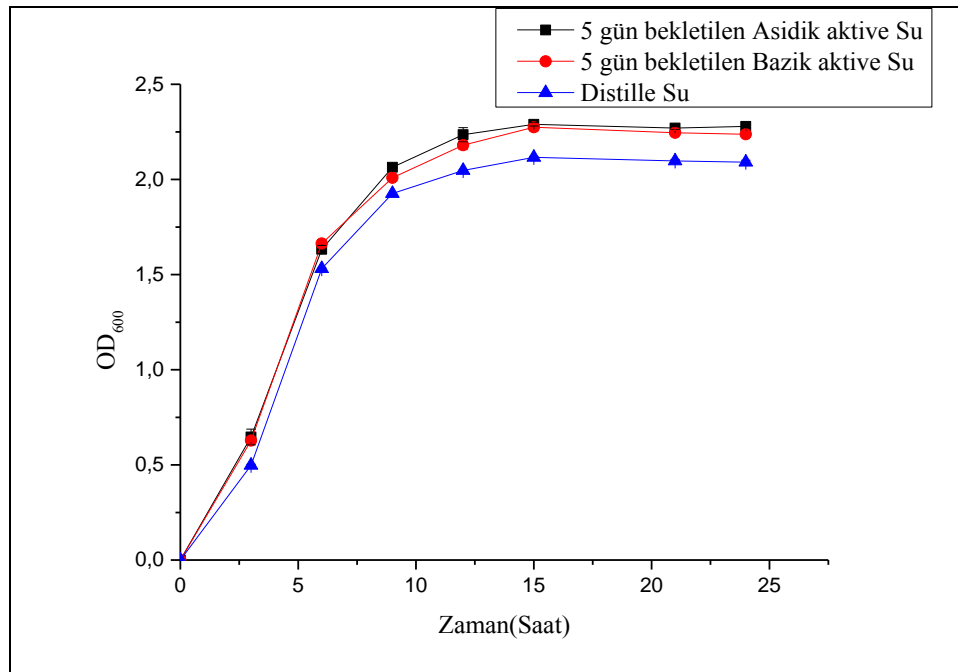
Çalışma sonunda elde edilen PHB miktarları asidik aktive (% 16,62), bazik aktive (% 18,35) ve distile su (% 12,82) için incelendiğinde bazik aktive suyla yapılan inkübasyonun daha iyi sonuç verdiği belirlendi.

4.6. Depolamanın Elektro-aktive Sular Üzerine Etkisi

Mikroorganizmanın büyütülmesinde kullanılan Elektro-aktive suyun depolanarak (5 gün ve 10 gün), *Wautersia eutropha* bakterisinin büyümesine ve PHB üretim kapasitesine etkisi incelendi.

4.6.1. 5 Gün Depolanan Aktive Sularla PHB Üretimi

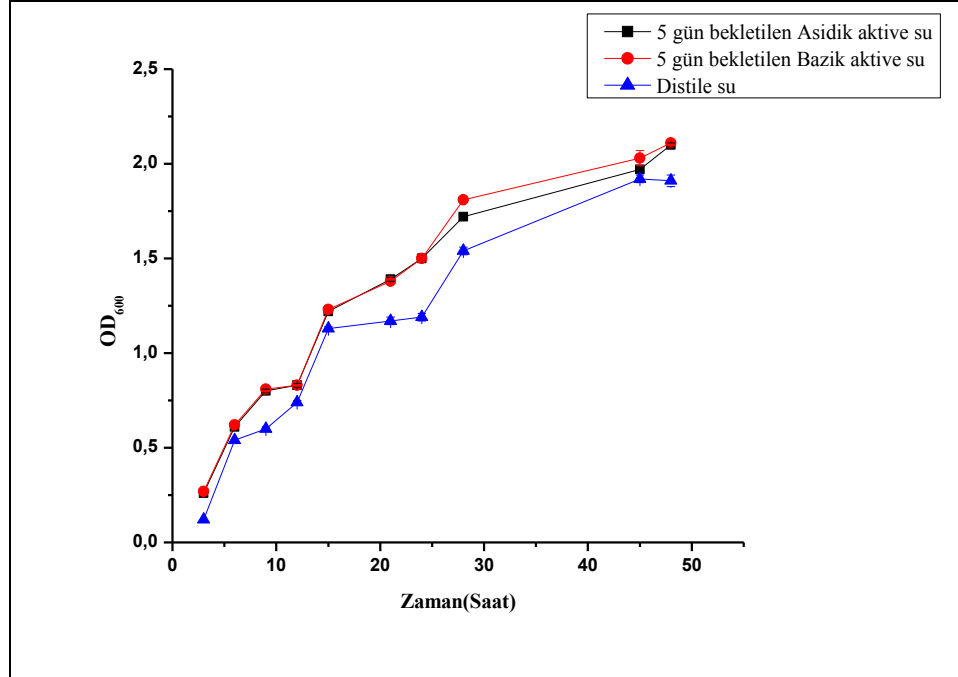
PHB üretiminde kullanılan Elektro-aktive edilmiş su (asidik ve bazik) 5 gün depolanarak besiyerleri hazırlandı. Mikroorganizmanın büyüme değerlerini gösteren sonuçlar Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5: Büyüme besiyerinde kullanılan aktive suların (5 gün depolanan) *Wautersia eutropha*'nın büyümesi üzerine etkisi.

Bu sonuçlara göre; mikroorganizmanın büyüme besiyerindeki gelişimine su farklılığının etkisi incelendiğinde asidik ve bazik su arasında herhangi bir fark gözlenmezken distile suya göre daha iyi performans gösterdikleri gözlemlendi.

Büyüme besiyerlerinden glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyerlerine aktarılan mikroorganizmanın gelişimi incelendiğinde 5 gün depolanan sularla (asidik aktive su, bazik aktive su, distile su) yapılan denemeler Şekil 4.6’da verildi.



Şekil 4.6: Glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyerinde kullanılan aktive suların (5 gün depolanan) *Wautersia eutropha*'nın büyümesi üzerine etkisi.

Çalışma sonunda elde edilen verilere göre, mikroorganizmanın glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyerindeki gelişimine su farklılığının etkisi incelendiğinde, asidik ve bazik su birbirine benzer sonuçlar gösterirken distile suya göre yaklaşık % 10 daha fazla türbidite değerine sahip oldukları açıkça görülmektedir.

Farklı sularla (asidik, bazik ve distile) hazırlanan glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyerinde *Wautersia eutropha* bakterisinin 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen kuru hücre ağırlıkları asidik ve bazik aktive ile saf su için sırasıyla 2,12 g/L; 2,11 g/L ve 2,02 g/L mertebesindedir.

Elektro-aktive sularla hazırlanan ve glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyerinde *Wautersia eutropha* bakterisinin 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen PHB miktarının kuru hücre miktarına oranı Tablo 4.4’de verilmiştir.

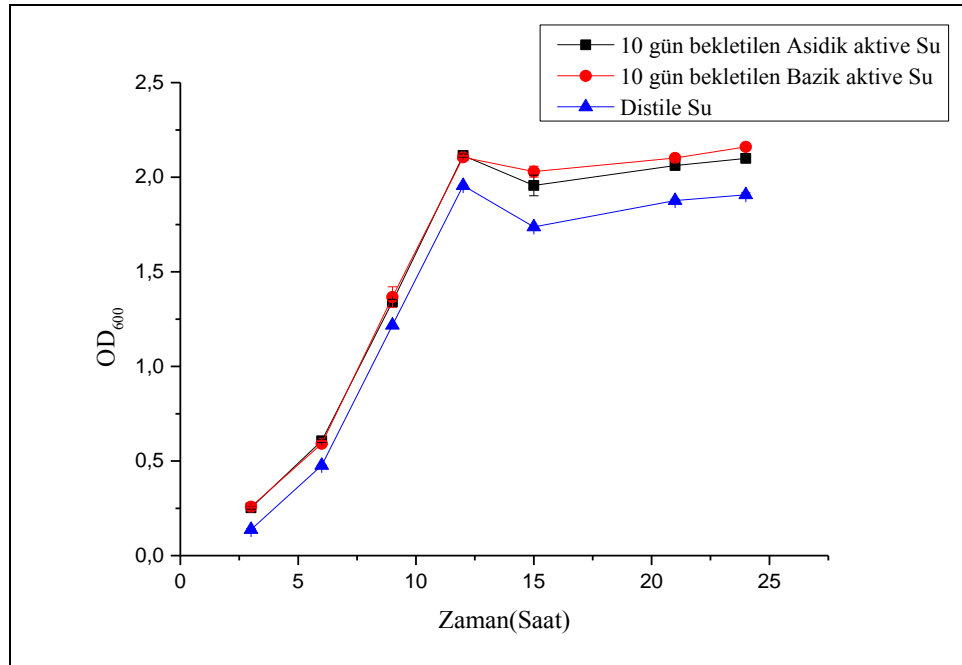
Tablo 4.4: 5 gün depolanan Elektro-aktif suların PHB üretimlerine etkisi.

Su	PHB miktarı(g)/Kuru hücre miktarı(g)
Asidik aktive	0,1072
Bazik aktive	0,1088
Distile	0,1041

Çalışma sonunda elde edilen PHB miktarları asidik (% 10,72), bazik (% 10,88) ve distile (% 10,41) su için incelendiğinde farklı bir sonuç elde edilmedi.

4.6.2. 10 Gün Depolanan Aktive Sularla PHB Üretimi

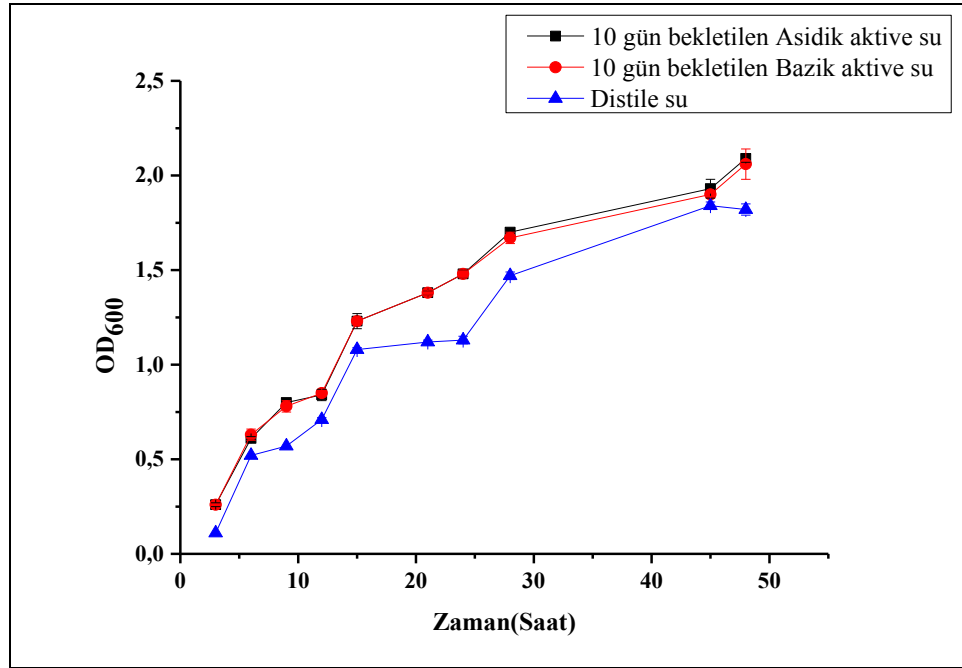
PHB üretiminde kullanılan Elektro-aktif edilmiş su (asidik ve bazik) 10 gün depolanarak besiyerleri hazırlandı. Mikroorganizmanın büyüme değerlerini gösteren sonuçlar Şekil 4.7' de verilmiştir.



Şekil 4.7: Büyüme besiyerinde kullanılan aktive suların(10 gün depolanan) *Wautersia eutropha*'nın büyümesi üzerine etkisi.

Çalışma sonunda elde edilen verilere göre mikroorganizmanın büyüme besiyerindeki gelişimine 10 gün depolanan farklı suların (asidik, bazik ve distile) etkisi incelendiğinde, asidik ve bazik su arasında herhangi bir fark gözlenmezken distile suya göre daha iyi sonuç elde edildi.

Büyüme besiyerlerinden glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyerlerine aktarılan mikroorganizmanın gelişimi incelendiğinde 10 gün depolanan suyla (asidik, bazik, distile) yapılan denemeler Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8: Glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyerinde kullanılan aktive suların(10 gün depolanan) *Wautersia eutropha*'nın büyümesi üzerine etkisi.

Elde edilen verilere göre, mikroorganizmanın glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyerindeki gelişimine su farklılığının etkisi incelendiğinde, asidik ve bazik su birbirine benzer sonuçlar gösterirken distile suya göre % 10 daha fazla türbidite değerine oldukları görülmektedir.

Farklı sularla (asidik, bazik ve distile) hazırlanan glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyerinde *Wautersia eutropha* bakterisininin 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen kuru hücre ağırlıkları asidik ve bazik aktive ile distile su için sırasıyla 1,89 g, 2,03 g ve 2,02 g mertebesindedir.

Elektro-aktif sularla hazırlanan glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyerinde *Wautersia eutropha* bakterisinin 48 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen PHB miktarının kuru hücre miktarına oranı Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.5: 10 gün depolanan Elektro-aktif suların PHB üretimlerine etkisi.

Su	PHB miktarı(g)/Kuru hücre miktarı(g)
Asidik aktive	0,1055
Bazik aktive	0,1058
Distile	0,1029

Çalışma sonunda elde edilen PHB miktarları asidik (% 10,55), bazik (% 10,58) ve distile (% 10,29) su için incelendiğinde farklı bir sonuç elde edilmedi.

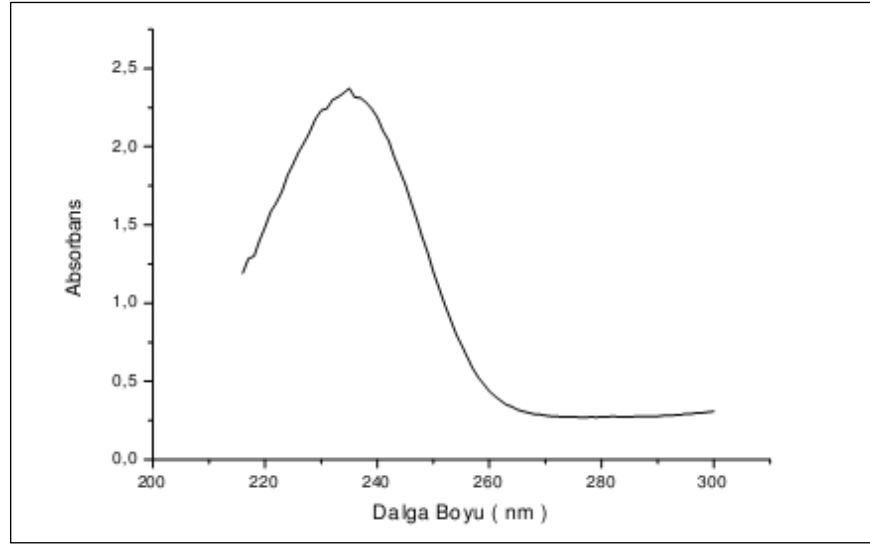
Elektro-aktif edilmiş suyun depolanan (5 ve 10 gün) kısımları (asidik ve bazik) ve distile suyla hazırlanarak gerçekleştirilen inkübasyon denemelerinde, mikroorganizmanın büyümesine ve PHB üretimine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlendiğinden çalışmalara bekletilmemiş elektro-aktif su kullanılarak devam edildi.

4.7. PHB Analizi

Elde edilen ürün, UV-spektrometre, FT-IR, H-NMR, ¹³C-NMR ve TGA kullanılarak analiz edildi.

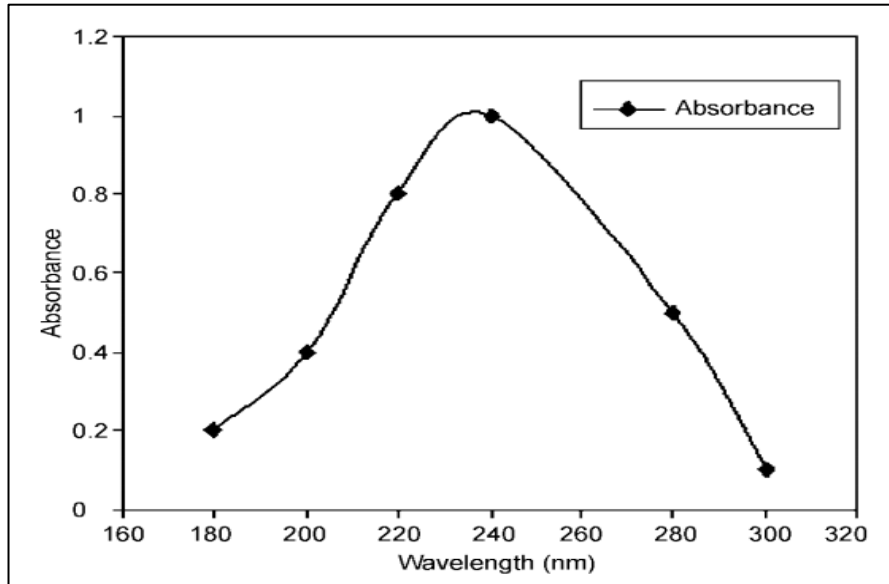
4.7.1. UV-Spektrofotometre

Ürün sülfürik asit kullanılarak krotonik aside çevrildi. Krotonik asidin UV-spektrometre analizi sonucu Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9: Krotonik asit UV absorbans ölçümü.

UV analizi sonucu 235 nm'de elde edilen absorbans değeri ürünün polihidroksi alkonoat türevi bir polimer olduğunu göstermektedir. Pal ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışma sonucunda Şekil 4.10'da verilen UV örneği ürünümüzün doğruluğunu desteklemektedir [50].



Şekil 4.10: Poli- β -hidroksibütirat'a ait UV analiz örneği.

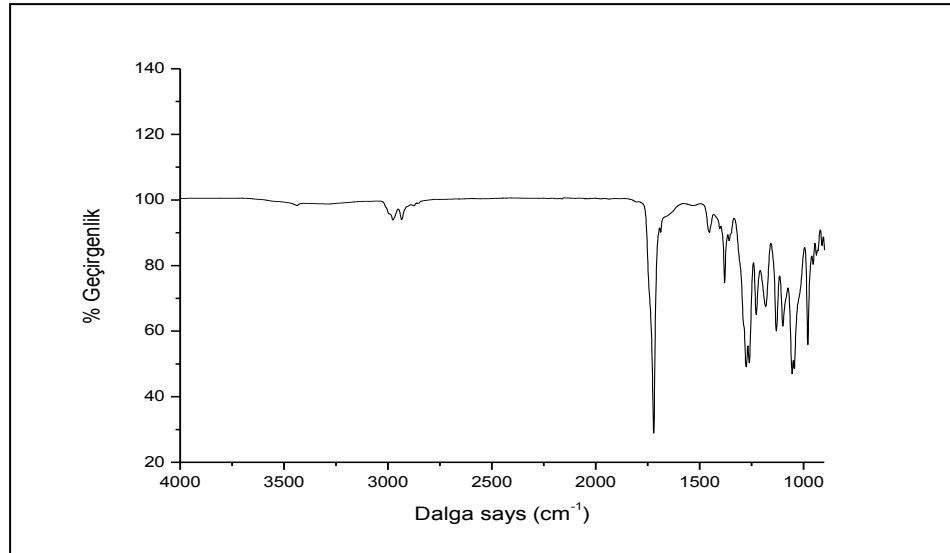
4.7.2. IR Spektrometre

800-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yapılan ölçüm sonucunda verilen spektrumdan sağlanan değerlerin karşılığı Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6: PHB'nin FT-IR spektrumundan elde edilen dalga sayısı değerlerinin karşılığı.

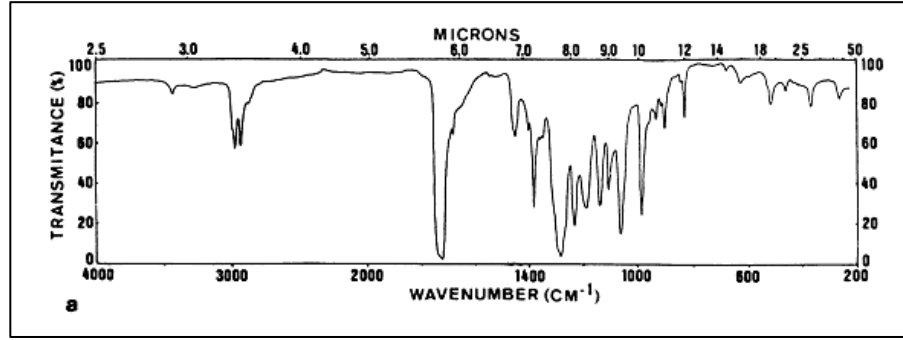
Dalga Sayısı (cm^{-1})	Karşılığı
1719	Karboksilik asitteki karbonil grubunu
2974-2934	Alifatik -CH gerilmesi
1275	Ester grubu
1379	Metil grubu

C-O bandları 1000-1300 cm^{-1} bölgesinde iki veya daha çok band halinde gözlemlenir. Şekil 4.11'te görüldüğü gibi spektrumumuzda 1130 cm^{-1} ve 1100 cm^{-1} bölgesindeki pikler 1300-1000 cm^{-1} de yer alan piklere göre daha keskindir, bu nedenle bu piklerin C-O pikleri olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: PHB'nin FT-IR spektrumu.

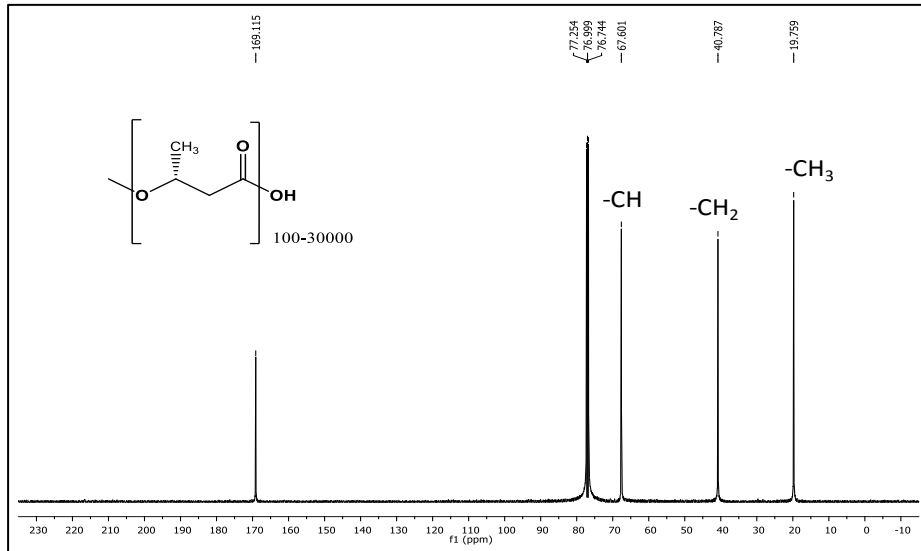
Darshan ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışma sonucunda Şekil 4.12’de verilen FT-IR spektrumu ürünümüzün doğruluğunu desteklemektedir [51].



Şekil 4.12: PHB’ye ait IR spektrumu örneği.

4.7.3. C-NMR ve H-NMR Spektroskopisi

Şekil 4.13’de görüldüğü gibi ¹³C-NMR spektrum piklerine baktığımızda yapının PHB olduğunu görmekteyiz, çünkü R grubundaki yapı -CH₃ değil de farklı bir karbon grubu olsaydı spektrumda gözlenecek olan pik sayısı daha fazla ve kimyasal kayma değerleri daha farklı olması gerekmektedir (Tablo 4.7).

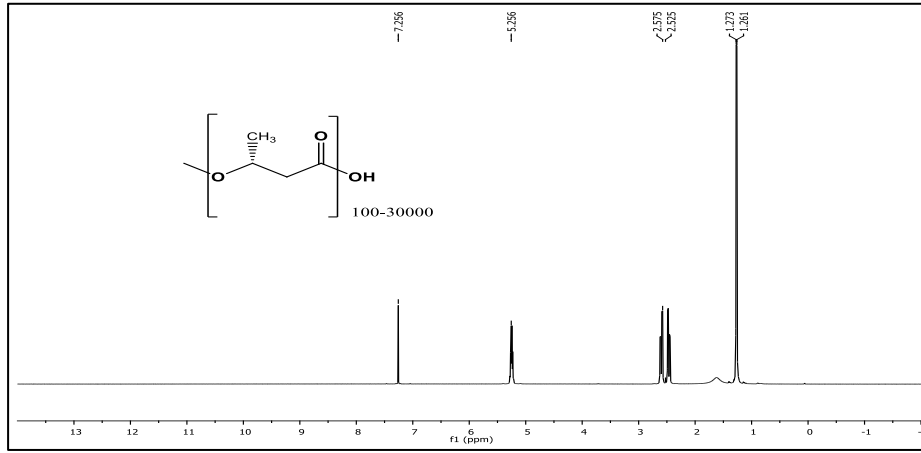


Şekil 4.13: PHB’nin ¹³C-NMR spektrumu.

Tablo 4.7: PHB'a ait ^{13}C -NMR spektrumunun kimyasal kayma değeri ve literatürle karşılaştırılması (a: Elde edilen ürüne (PHB) ait kimyasal kaymalar, b: Literatüre ait PHB verileri).

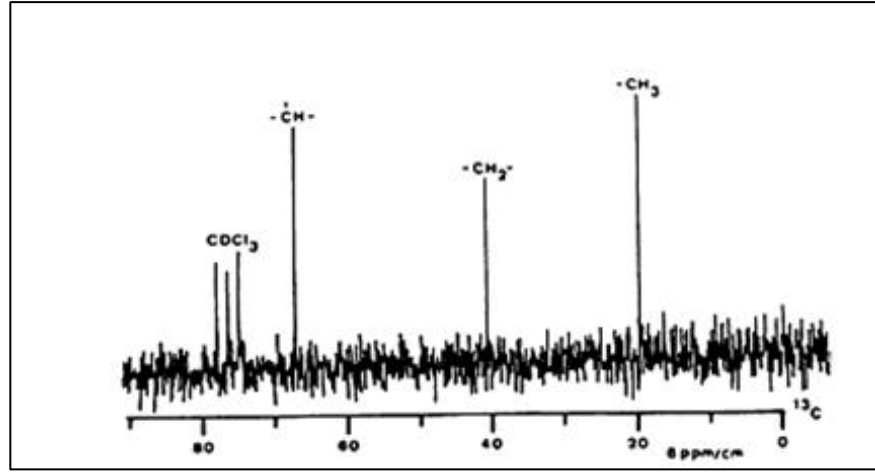
Karbon atomu	Kimyasal kayma (ppm) ^a	Kimyasal kayma ^b
-CH ₃	19,76	19,76
-CH ₂	40,79	40,77
-CH	67,60	67,40
-C=O	169,12	169,14

H-NMR spektrometresinde elde edilen sonuçlara göre 1,273 ve 1,261 ppm'de gözlenen ikiye yarılmış pik polimerde yer alan -CH karbonuna bağlı -CH₃ yapısını, 2-3 ppm arasındaki pikler -CH₂ yapısını, 5,256 ppm'deki pikte bize -CH yapısını göstermektedir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: PHB'nin H-NMR spektrumu.

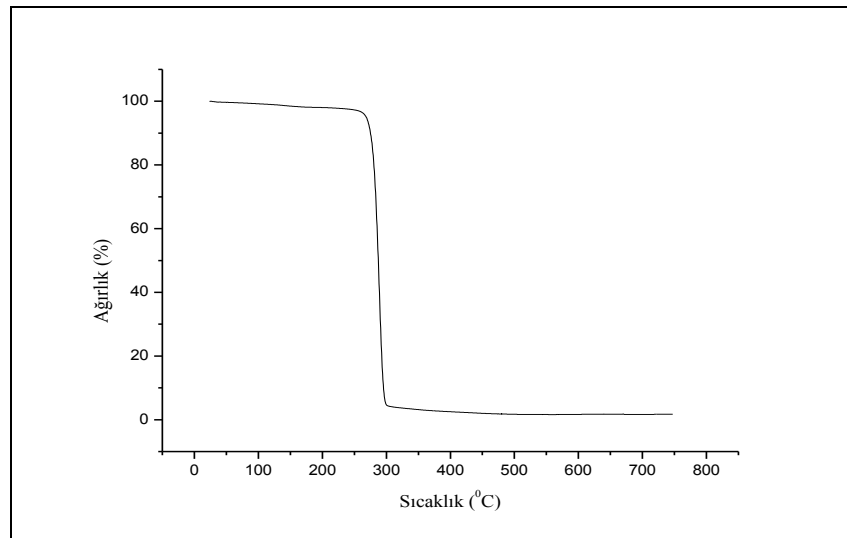
Fernandez ve arkadaşlarının tarafından gerçekleştirilen çalışma sonucunda Şekil 4.15'de verilen ^{13}C -NMR spektrumu ürünümüzün doğruluğunu desteklemektedir [53].



Şekil 4.15: PHB'ye ait ¹³C-NMR spektrumu örneği.

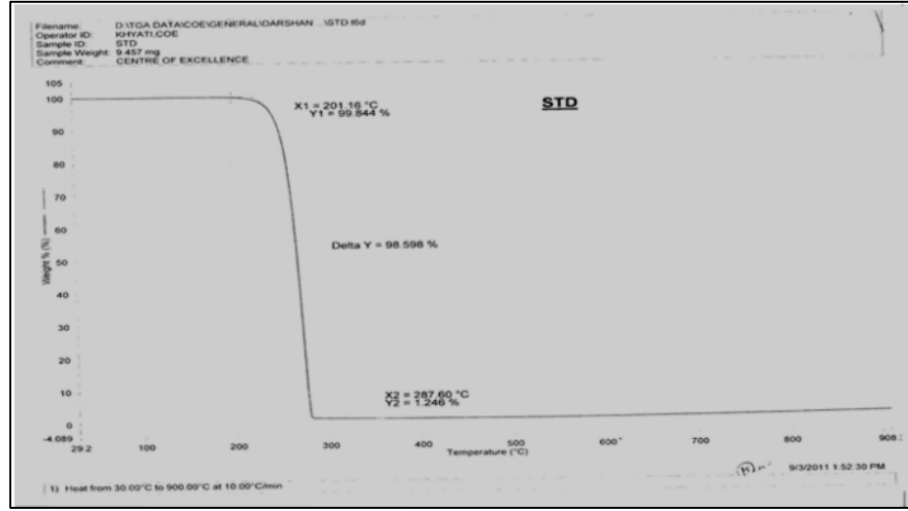
4.7.4. Termogavimetrik Analiz

Yapılan termogavimetrik analizine (TGA) göre elde edilen ürünün dekadasyonu 274 °C'de başlayıp 300 °C'de bitmektedir. Bu sıcaklık arasında maddenin % 92,84'ü bozunmuştur, buna göre maddemiz yaklaşık olarak % 93 oranında saftır (Şekil 4.16). Marjadi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, PHB kloroform ile ekstrakte edilmiştir. Bu analiz neticesinde bozunma sıcaklık aralığının 250 ile 300 °C arasında olduğunu gözlemlemişlerdir [51]. Bu bozunma sıcaklık aralığı bizim çalışmamızı desteklemektedir.



Şekil 4.16: PHB'nin TGA analizi.

Marjadi ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışma sonucunda Şekil 4.17’de verilen TGA spektrumu ürünümüzün doğruluğunu desteklemektedir.



Şekil 4.17: Marjadi ve Arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki TGA analizi.

5. SONUÇLAR ve YORUMLAR

Bu tez çalışmasında, *Wautersia eutropha* NRRL B-2804 suşunun poli-β-hidroksibütirat (PHB) üretimini gerçekleştirdiği bulundu ve PHB üretiminde verim artışı için yeni metotlar üzerinde çalışıldı. PHB üretiminde verim artışı için karbon kaynağı (glukoz-fruktoz karışımı ve hidrolize melas) ve elektro-aktif suların (asidik ve bazik) etkileri çalışıldı. Asidik ve bazik aktif sular glukoz-fruktoz karışımı ve hidrolize melas içeren besiyerlerinin hazırlanmasında kullanıldı. Elektro-aktif sularla gerçekleştirilen denemelerde, besiyerleri hazırlanırken pH değerlerinin distile suyla önemli bir farklılık ($7.00 \pm 0,05$) göstermediği belirlendi. Literatürde, elektro-aktif suların üretiminde çeşitli tuzlar kullanılabilir [54]. Bu durumda üretilen asidik aktif suların mikroorganizmaların inaktivasyonunu sağladığı çalışmalar mevcuttur [55]. Tez çalışmasında kullanılan aktif suların üretiminde herhangi bir tuz kullanılmadı ve üretilen asidik aktif sular için mikroorganizmanın inaktivasyonu açısından herhangi bir etkisi görülmedi.

Distile suyla hazırlanan besiyerlerinde karbon kaynağı olarak glukoz-fruktoz karışımı yerine hidrolize melas kullanıldığında kuru hücre başına düşen PHB veriminin % 22,3 oranında arttığı gözlemlendi. Ayrıca bu verimi daha fazla arttırmak amacıyla distile su yerine asidik ve bazik elektro-aktif sular kullanıldı. Aşağıda değişik deneylerde elde edilen gram kuru hücre başına üretilen PHB miktarları verilmiştir:

- Glukoz-fruktoz karışımı kullanıldığında;
 - Asidik aktif su: 0,1339 g
 - Bazik aktif su: 0,1441 g
 - Distile su: 0,1048 g
- Hidrolize melas kullanıldığında;
 - Asidik aktif: 0,1662 g
 - Bazik aktif: 0,1835 g
 - Distile su: 0,1282 g

Çalışma sonunda elde edilen veriler incelendiğinde, karbon kaynağı olarak glukoz-fruktoz karışımı yerine hidrolize melas kullanımının kuru hücre ağırlığında

asidik aktive için % 24,1, bazik aktive için % 24,2 ve distile su için % 25,6 verim artışı gösterirken, gram kuru hücre başına (g) düşen PHB miktarında (g) ise asidik aktive, bazik aktive ve distile su için sırasıyla % 24,1, % 27,2 ve % 22,3 oranında artış belirlendi. Karbon kaynağı olarak glukoz-fruktoz karışımı ve elektro-aktive su kullanılarak hazırlanan besiyeri ortamında distile suyla hazırlanan besiyerine göre elde edilen kuru hücre miktarı asidik aktive için % 25,6, bazik aktive için % 44,2 iken; PHB miktarında asidik aktive ve bazik aktive için sırasıyla % 27,8 ve % 37,5 verim artışı görüldü. Karbon kaynağı olarak hidrolize melas ile hazırlanan besiyerinde elektro aktive su kullanımı, distile suya göre; kuru hücre miktarı (g) açısından asidik aktive için % 24,7, bazik aktive için % 42,6 artış sağladığı bulundu. Ayrıca gram kuru hücre başına düşen PHB miktarında ise asidik aktive ve bazik aktive için sırasıyla % 29,6 ve % 43,1 olacak şekilde artış sağladığı tespit edildi. Sonuç olarak, karbon kaynağı olarak hidrolize melas ile hazırlanan besiyerinde bazik elektro-aktive su kullanılmasının kuru hücre ve PHB verimine olumlu etkisinin olduğu saptandı. Literatürde, melas kullanarak PHB üreten farklı mikroorganizmalarla yüksek verimler elde edilen çalışmalar mevcuttur. Aşağıda gram kuru hücre başına düşen PHB miktarları verilmiştir: Ali ve arkadaşları, şeker pancarı melası kullanarak *Ralstonia eutropha* PTCC1615 suşuyla gerçekleştirdiği çalışmada 0,07 g [56], Wu ve arkadaşlarının *Bacillus* sp. Jma5 suşu kullanarak melasla yaptıkları çalışmada 0,25 [57], Beaulieu ve arkadaşları *A.eutrophus* DSM 545 suşu ve şeker pancarı ile yaptıkları çalışmada yaklaşık 0,21 g PHB elde etmişlerdir [46]. Diğer metotlara alternatif olabilecek bu tez çalışmasında, literatürdeki verilerin bir kısmından iyi olan *Wautersia eutropha* B-2804 suşunun veriminin daha da artırılması sağlandı.

Elektro-aktive suyun üretiminden sonra bekletilmeden hazırlanan glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyerindeki büyüme değerleri 9. saatte asidik aktive su için 2,117, bazik aktive su için 2,237 değerine ulaşmış olmalarına rağmen distile suyla hazırlanan besiyerinin türbidite değerinin 2,074 seviyesine ancak 45. saatte sahip olduğu tespit edildi. Hidrolize melas ile hazırlanan besiyerindeki büyüme değerleri asidik aktive ve bazik aktive su için 9. saatte sırasıyla 2,148 ve 2,256 türbidite değerlerine ulaşmalarına rağmen distile suyla hazırlanan besiyerinde ise 45. Saatte 2,130 değerine ulaştığı gözlemlendi. Büyüme eğrilerinden görüldüğü gibi elektro-aktive su ile hazırlanan besiyerlerinde su molekül kümelerinin küçülmesinin difüzyonu arttırdığı ve besinlerin mikroorganizmaya daha hızlı yayılmasını sağlayarak

büyüme hızlandırdığı düşünülebilir. Asidik ve bazik elektro-aktif sularla yapılan denemelerde, besiyerlerinin pH değerleri ve su molekül kümelerinin aynı seviyede olmasına rağmen ORP değerlerindeki değişimin verim farklılıklarına neden olduğu düşünülebilir.

Karbon kaynağı olarak glukoz-fruktoz karışımı kullanılan denemelerde kuru hücre miktarları; asidik aktive su için 1,62 g/L, bazik aktive su için 1,86 g/L ve distile su için 1,29 g/L olarak belirlendi. Karbon kaynağı olarak hidrolize melas kullanıldığında ise asidik aktive, bazik aktive ve distile su için kuru hücre ağırlıkları sırasıyla 2,02 g/L, 2,31 g/L ve 1,62 g/L olarak tespit edildi. Khanna ve arkadaşları, biyoreaktör içerisinde *Wautersia eutropha* NRRL B14690 suşu ve karbon kaynağı olarak fruktozu kullanarak (60 saat, 7L, pH 7.0, 10g/L fruktoz) PHB üretimi gerçekleştirdikleri çalışmada toplam kuru hücre miktarı 19.68 g/L olarak tespit etmişlerdir [58]. Loo ve arkadaşları, *Wautersia eutropha* DSM 541 suşu ve karbon kaynağı olarak palm yağı kullanarak gram kuru hücre başına düşen PHA miktarını 0,87 g ve toplam kuru hücre ağırlığını 4,3 g/L olarak rapor etmişlerdir [59].

Elektro-aktif suların depolama kararlılığını belirlemek için buzdolabında (4 °C'de) 5 gün ve 10 gün bekletilerek denemeler gerçekleştirildi. Denemelerde karbon kaynağı olarak glukoz-fruktoz karışımı içeren besiyeri kullanıldı. 5 gün depolanan elektro-aktif suların saf suya göre % 10 daha yüksek türbidite değerine sahip olduğu gözlenirken, 10 gün depolanan elektro-aktif suların herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. Saf su ve 5 gün depolanan elektro-aktif sularla yapılan inkübasyon denemelerinde litre başına düşen kuru hücre miktarları asidik aktive için 2,12 g; bazik aktive için 2,11 g ve distile su için 2,02 g olarak belirlendi. Çalışma sonunda elde edilen sonuçlar, g kuru hücre başına düşen PHB miktarı olarak aşağıda verilmiştir:

- Asidik aktive su: 0,1072 g
- Bazik aktive su: 0,1088 g
- Distile Su: 0,1041 g

Saf su ve 10 gün depolanan elektro-aktif sularla yapılan inkübasyon denemelerinin sonunda litre başına düşen kuru hücre ağırlıkları asidik aktive için

1,89 g; bazik aktive için 2,03 g ve distile su için 2,02 g olarak tespit edildi. Çalışma sonunda, kuru hücre başına düşen PHB miktarları aşağıda verilmiştir:

- Asidik aktive su: 0,1055 g,
- Bazik aktive su: 0,1058 g,
- Distile su: 0,1029 g

Elde edilen verilerden görüldüğü gibi elektro-aktive suyun depolanarak kullanılmasının, ilk gün hazırlanan su ile gerçekleştirilen denemelere göre kuru hücre ağırlığı ve PHB verimi açısından etkisinin olmadığı tespit edildi.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında yeni bir mikroorganizmanın (*Wautersia eutropha* NRRL B-2804) ticari önemi olan PHB'nin üretiminde kullanılabileceği bulundu. Yapılan çalışmada karbon kaynağı olarak melas kullanımının glukoz-fruktoz karışımına göre daha avantajlı olduğu görüldü. İlave olarak elektro-aktive suyun kullanımının, hücrenin büyümesini hızlandırarak hem kuru hücre miktarını hem de gram kuru hücre başına düşen PHB miktarını arttırdığı tespit edildi. Hidrolize melas kullanılmasının avantajına ek olarak, besiyeri ortamında distile su yerine bazik aktive su kullanımı, ürünün veriminde artış (% 75) ve proses süresinde azalmayı (% 80) sağladığı tespit edildi. Bulunan bu sonuçlar, özellikle elektro-aktive suların besiyeri hazırlanmasında endüstriyel açıdan kullanımının verimli olacağını göstermektedir. Tez çalışmasında yapılan verilere ek olarak, elektro-aktive suyla yapılan denemelerde türbidite değerinin maksimum düzeye geldiği zamanlarda kültür ekstrakte edilerek, PHB miktarının zamana göre değişimi incelenebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Page William J., (1995), "Bacterial polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future", Canadian Journal of Microbiology, 41 (13), 1-3.
- [2] Philip S., Keshavarz T., Roy I., (2007), "Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications", Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 82 (3), 233-247.
- [3] Lemoigne M., (1926), "Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide β -oxybutyrique", Bull Soc Chim Biol, 8 (1), 770-782.
- [4] Carlozzi P., Sacchi A., (2001), "Biomass production and studies on *Rhodospseudomonas palustris* grown in an outdoor, temperature controlled, underwater tubular photobioreactor", Journal of Biotechnology, 88 (3), 239-249.
- [5] Taguchi S., Nakamura H., Kichise T., Tsuge T., Yamato I., Doi Y., (2003), "Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase", Biochemical Engineering Journal, 16 (2), 107-113.
- [6] Kato N., Konishi H., Shimao M., Sakazawa C., (1992), "Production of 3-hydroxybutyric acid trimer by *Bacillus megaterium* B-124", Journal of Fermentation and Bioengineering, 73 (3), 246-247.
- [7] Lee S. Y., (1996), "Bacterial polyhydroxyalkanoates", Biotechnology and Bioengineering, 49 (1), 1-14.
- [8] Stewart K. M., (2009), "Physical properties of water", Encyclopedia of Inland Waters, 1 (1) 148-154.
- [9] Lehninger A. L., (1970), "Biochemistry: The Molecular Basis Of Cell Structure And Function", 6th Edition, Worth public Inc.
- [10] Stumm W., Morgan J.J., (1996), "Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria And Rates In Natural Waters", 2nd Edition, New York Inc.
- [11] Stryer L., (1995), "Biochemistry", 4th Edition, WH Freeman and Company.
- [12] Shaposhnik V. A., Kesore K., (1997), "An early history of electro dialysis with permselective membranes", Journal of Membrane Science, 136 (1-2), 35-39.
- [13] Prilutsky V., Bakhir V., (1997), "Electrochemically actuating water: anomalous characteristics, mechanism of biological action", 2nd Edition, VNIIMT Inc.

- [14] Evdokimov S., (2000), "Mechanism of chlorine evolution-ionization on dimensionally stable anodes", *Russian Journal of Electrochemistry*, 36 (3), 227-230.
- [15] Cai Z., Hou C., Yang G., (2012), "Characteristics and bending performance of electroactive polymer blend made with cellulose and poly (3-hydroxybutyrate)", *Carbohydrate Polymers*, 87 (1), 650-657.
- [16] Stoner G. E., Cahen Jr G. L., Sachyani M., Gileadi E., (1982), "The mechanism of low frequency a.c. electrochemical disinfection", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 9 (3), 229-243.
- [17] McPherson LL., (1993), "Understanding ORP's role in the disinfection process", *Water Eng Manage*, 140 (22), 29-31.
- [18] Thorn R., Lee S., Robinson G., Geenman J., Reynolds D., (2012), "Electrochemically activated solutions: evidence for antimicrobial efficacy and applications in healthcare environments", *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31 (5), 641-653.
- [19] IY P., VI L., (2001), "Nonequilibrium state of electrochemically activated water and its biological activity", *Biofizika*, 46 (3), 389-401.
- [20] Nakagawara S., Goto T., Nara M., Ozawa Y., Hotta K., Arata Y., (1998), "Spectroscopic Characterization and the pH Dependence of Bactericidal Activity of the Aqueous Chlorine Solution", *Analytical Sciences*, 14 (4), 691-698.
- [21] Tanaka N., Fujisawa T., Daimon T., Fujiwara K., Tanaka N., Yamamoto M., Abe T., (1999), "The effect of electrolyzed strong acid aqueous solution on hemodialysis equipment", *Artificial Organs*, 23 (12), 1055-1062.
- [22] Aider M., Gnatko E., Benali M., Plutakhin G., Kastyuchik A., (2012), "Electro-activated aqueous solutions: Theory and application in the food industry and biotechnology", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 15 (0), 38-49.
- [23] Yakimenko L. M. , (1977), "Electrode Materials In Applied Chemistry", 1st Edition, Khimiya.
- [24] Tanaka N., Fujisawa T., Daimon T., Fujiwara, Yamamoto M., Abe T., (1999), "The cleaning and disinfecting of hemodialysis equipment using electrolyzed strong acid aqueous solution", *Artificial Organs*, 23 (4), 303-309.
- [25] Shimada K., Ito K., Murai S., (2000), "A comparison of the bactericidal effects and cytotoxic activity of three types of oxidizing water, prepared by electrolysis, as chemical dental plaque control agents", *International Journal of Antimicrobial Agents*, 15 (1), 49-53.

- [26] Middleton A. M., Chadwick M. V., Sanderson J. L., Gaya H., (2000), "Comparison of a solution of super-oxidized water (Sterilox®) with glutaraldehyde for the disinfection of bronchoscopes, contaminated in vitro with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* in sputum", *Journal of Hospital Infection*, 45 (4), 278-282.
- [27] Tanaka N., Fujisawa T., Daimon T., Fujiwara K., Tanaka N., Yamamoto M., Abe T., (1999), "The effect of electrolyzed strong acid aqueous solution on hemodialysis equipment", *Artificial Organs*, 23 (12), 1055-1062.
- [28] Inoue Y., Endo S., Kondo K., Ito H., Omori H., Saito K., (1997), "Trial of electrolyzed strong acid aqueous solution lavage in the treatment of peritonitis and intraperitoneal abscess", *Artificial Organs*, 21 (1), 28-31.
- [29] Bakhir V. M., Zadorozhny Y., Fem G., (1999), "Flow-Through Electrochemical Modular And Rfe Reactor In Technical Electrochemical Systems. , In Second International Conference. Electrochemical Activation In Medicine", 5th Edition, Agriculture and Industry.
- [30] Hammitt F. G., Yilmaz E., Ahmed O., Bhatt N. R., Mikielewicz J., (1974), "Effects of magnetic and electric fields upon cavitation in conducting and non-conducting liquids", NASA STI/Recon Technical Report No: 75 22643, Department of Chemical Engineering, Michigan University, USA.
- [31] Chernikov F. R., Prilutsky V. I., Dmitriyev N. N., (1999), " Studying The Properties Of Eca Solutions With The Method Of Dynamic Molecular Light Scattering, In Electrochemical Activation In Medicine", 1st Edition, Agriculture and Industry.
- [32] Hanaoka K., (2001), "Antioxidant effects of reduced water produced by electrolysis of sodium chloride solutions", *Journal of Applied Electrochemistry*, 31 (12), 1307-1313.
- [33] Antonchenko V. Y., Davydov A. S., Illiin V. V., (1991), "Fundamentals of The Water Physics", 1st Edition, Moscow Inc.
- [34] Pastukhov V., Morozov V., (2000), "Raman scattering of light by the electroactivated water", *Optics and Spectroscopy*, 88 (1), 35-37.
- [35] Clark R. J. H., Hester R. E., (1985), "Advances In Infrared and Raman Spectroscopy", 2nd Edition, Wiley-Heyden London.
- [36] Janoschek R., Weidemann E. G., Pfeiffer H., Zundel G., (1972), "Extremely high polarizability of hydrogen bonds", *Journal of the American Chemical Society*, 94 (7), 2387-2396.
- [37] Delimarskii Y. K., (1982), "Electrolysis: theory and practise", Technical Report No: DBBT5.40, Eds Tekhnika, Kiev, Ukraine.
- [38] Gášková D., Sigler K., Janderova B., Plášek J., (1996), "Effect of high-voltage electric pulses on yeast cells: factors influencing the killing efficiency", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 39 (2), 195-202.

- [39] Aider M., Gnatko E., Benali M., Plutakhin G., Kastyuchik A., (2012) "Electro-activated aqueous solutions: theory and application in food industry and biotechnology", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 15 (1), 38-49.
- [40] Vorobjeva N., (2005), "Selective stimulation of the growth of anaerobic microflora in the human intestinal tract by electrolyzed reducing water", *Medical hypotheses*, 64 (3), 543-546.
- [41] Oda M., Kusumoto K., Teruya K., Hara T., Maki T., Kabayama S., Katakura Y., Otsubo K., Morisawa S., Hayashi H., (2002), "Electrolyzed and natural reduced water exhibit insulin-like activity on glucose uptake into muscle cells and adipocytes", In: *Animal cell technology: products from cells, cells as products*. Springer, 1 (1), 425-427.
- [42] Smirnov I. V., Vysotskii V. I., Kornilova A. A., (2005), "Introduction To The Biophysics Of Activated Water" 1st Edition, Universal Publishers.
- [43] Imamura T., Kozaki S., Kuriyama A., Yamada Y., Yano T., (1999), "Microbial Processes Using Electrolyzed Water", *Google Patents* 5, 932.
- [44] Burrows S., (1970), "Baker's yeast", *The yeasts*, 3 (1), 349-420.
- [45] Page W. J., (1992), "Suitability of commercial beet molasses fractions as substrates for polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* UWD", *Biotechnology letters*, 14 (5), 385-390.
- [46] Beaulieu M., Beaulieu Y., Melinard J., Pandian S., Goulet J., (1995), "Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate", *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (1), 165-169.
- [47] Miller G., (1959), "Determination of reducing sugar by DNS method", *Anal chem*, 31 (1), 426-428.
- [48] Chaijamrus S., Udpuay N., (2008), "Production and characterization of polyhydroxybutyrate from molasses and corn steep liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748", *Agricultural Engineering International: CIG Journal*, 10 (1), 1-12.
- [49] Bowker R., (1981), "Manual of Methods for General Bacteriology", 1st Edition, American Society for Microbiology.
- [50] Pal A., Prabhu A., Kumar A. A., Rajagopal B., Dadhe K., Ponnamma V., Shivakumar S., (2009), "Optimization of process parameters for maximum poly (-beta-) hydroxybutyrate (phb) production by *Bacillus Thuringiensis* IAM 12077", *Polish Journal of Microbiology*, 58 (2), 149-154.
- [51] Marjadi D., Dharaiya N., (2014), "Recovery and characterization of poly (3-Hydroxybutyric acid) synthesized in *Staphylococcus epidermidis*", *African Journal of Environmental Science and Technology*, 8 (6), 319-329.

- [52] Holland S. J., Tighe B. J., Gould P. L., (1986), "Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems", *Journal of Controlled Release*, 4 (3), 155-180.
- [53] Fernandez-Castillo R., Rodriguez-Valera F., Gonzalez-Ramos J., Ruiz-Berraquero F., (1986), "Accumulation of poly (β -hydroxybutyrate) by halobacteria", *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (1), 214-216.
- [54] Bakhir V. M., Zadorozhny J. G., Barabash T., (1999), "Apparatus for electrochemical treatment of water and/or water solutions", *Google Patents* 5,871,623.
- [55] Guentzel J. L., Lam K. L., Callan M. A., Emmons S. A., Dunham V. L., (2008), "Reduction of bacteria on spinach, lettuce, and surfaces in food service areas using neutral electrolyzed oxidizing water", *Food Microbiology*, 25 (1), 36-41.
- [56] Bozorg A., Vossoughi M., Kazemi A., Alemzadeh I., (2015), "Optimal medium composition to enhance poly- β -hydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* using cane molasses as sole carbon source", *Applied Food Biotechnology*, 2 (3), 39-47.
- [57] Wu Q., Huang H., Hu G., Chen J., Ho K., Chen G. Q., (2001), "Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media", *Antonie van Leeuwenhoek*, 80 (2), 111-118.
- [58] Khanna S., Srivastava A. K., (2008), "Productivity enhancement of poly-(β -hydroxybutyrate) by fed-batch cultivation of nutrients using variable (decreasing) nutrient rate by *Wautersia eutropha*", *Chemical Engineering Communications*, 195 (11), 1424-1436.
- [59] Loo C. Y., Lee W. H., Tsuge T., Doi Y., Sudesh K., (2005), "Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant", *Biotechnology letters*, 27 (18), 1405-1410.

ÖZGEÇMİŞ

Serhan ŞEN, 27.02.1987 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlk ve ortaöğrenimini, Darıca Faik Şahenk İlköğretim Okulu ve Darıca Lisesi'nde tamamladı. 2010 yılında, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu ve aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2014 yılından beri Teknoloji Yatırımları ve Danışmanlık San. ve Tic. A.Ş.'de Ar-Ge uzmanı olarak doğal renklendiriciler alanında çalışmalarını sürdürmektedir.