



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



SENTEZ GAZ FERMANTASYONU İLE BİYOETANOL ÜRETİMİNDE İMMOBİLİZE BİYOREAKTÖRLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Doktora Tezi

Simge SERTKAYA KÖYBAŞI

Çevre Bilimleri Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**SENTEZ GAZ FERMANTASYONU İLE BİYOETANOL
ÜRETİMİNDE İMMOBİLİZE BİYOREAKTÖRLERİN
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Simge SERTKAYA KÖYBAŞI

Danışman: Prof. Dr. Nuri AZBAR
İkinci Danışman: Doç. Dr. Tuğba KESKİN GÜNDOĞDU

Çevre Bilimleri Anabilim Dalı
Çevre Bilimleri Doktora Programı

İzmir
2022

Simge SERTKAYA KÖYBAŞI tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Sentez Gaz Fermantasyonu ile Biyoetanol Üretiminde İmmobilize Biyoreaktörlerin Etkisinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 15/11/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Nuri AZBAR	
Raportör Üye	: Prof. Dr. Armağan KINAL	
Üye	: Prof. Dr. İlgi KARAPINAR	
Üye	: Doç. Dr. Sait SARGIN	
Üye	: Doç. Dr. Serpil ÖZMIHÇI	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Sentez Gaz Fermantasyonu ile Biyoetanol Üretiminde İmmobilize Biyoreaktörlerin Etkisinin İncelenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

15/ 11 / 2022

Simge SERTKAYA KÖYBAŞI

ÖZET

SENTEZ GAZ FERMANTASYONU İLE BİYOETANOL ÜRETİMİNDE İMMOBİLİZE BİYOREAKTÖRLERİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

SERTKAYA KÖYBAŞI, Simge

Doktora Tezi, Çevre Bilimleri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nuri AZBAR

İkinci Danışman: Doç. Dr. Tuğba KESKİN GÜNDOĞDU

Kasım 2022, 212 sayfa

Hayatımızın her alanında fosil bazlı yakıtların kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan karbon salımları küresel bazda iklim değişikliklerine ve takibinde iklim krizine neden olan yegâne sebep olmuştur. Bu bağlamda, sürdürülebilir, temiz, güvenli, alternatif yenilenebilir enerji kaynaklarının bulunması kaçınılmaz hale gelmiş, bu konuda literatürde yapılmış çalışmalar eksponansiyel artış göstermiştir. Alternatif temiz enerji kaynakları arasında biyoetanol gelecek vaat eden kaynaklardan birisi olarak literatürde yerini almıştır. Son yıllarda sentez gazın bakterilerle temiz bir enerji kaynağına dönüştürülmesinde çalışmalar başlamıştır. Biyoteknolojik olarak sentez gazın özgün biyoproses sisteminin kullanılmasına dayalı bu doktora çalışmasıyla ulusal ve uluslararası ölçekte çözüm önerileri getirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında sentez gaz fermantasyonunda en çok kullanılan *Clostridium ljungdahlii* ve *Clostridium ragsdalei* suşları kullanılmıştır. Çalışma, işletim parametrelerinin belirlenmesi, iz element optimizasyonu, kesikli ve sürekli beslemeli biyoreaktör çalışmaları olarak dört kısımdan oluşmaktadır.

Clostridium ljungdahlii'yle biyoetanol üretiminde Plackett-Burman istatistiksel deneysel tasarım yöntemi kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasında etanol üretim performansında sentez gaz ve saf CO kullanılarak sırasıyla 2.5 ve 3.5 kat iyileşme sağlanabileceği görülmüştür.

Optimum ortam bileşimiyle iz element çözeltisinin maliyetinin sentez gaz için %18 oranında azaltılabileceği hesaplanmıştır.

Clostridium ljungdahlii'yle sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretim performansının incelendiği çalışmada birbirine çok yakın biyoetanol üretimleriyle sonuçlandığı gözlenmiştir.

İmmobilize materyal olarak kullanılan seramik top, ponza ve zeytin çekirdeği biyokömürünün incelendiği SEM verilerine göre her üç materyalin de yapısal deformasyona uğramadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde immobilize materyaller üzerine tutunan bakterilerin de yapısında bozulma gözlemlenmemiştir. Buna göre; immobilize materyalin sahip olması gereken fiziksel, kimyasal ve biyolojik kararlılığa sahip olma özelliğini her üç materyal de taşımaktadır. Fakat gerçekleştirilen adsorpsiyon çalışmalarına göre zeytin çekirdeğinden elde edilen biyokömürün etanolü adsorbe etmesi nedeniyle uygun bir immobilize materyal olarak görülmemektedir. Çalışmalara daha kararlı performans gösteren seramik topla devam edilmiştir.

Kesikli beslemeli çalışmalarda *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium ljungdahli* suşuna göre 760 mg/L etanol üretimiyle 1.36 kat yüksek performans göstermiştir. Besleme hızlarına baktığımızda her iki suş için 0.1 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızı, 0.2 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızına göre yüksek performans göstermiştir. Askıda kültür sistemle immobilize kültür sistemi karşılaştırıldığında *Clostridium ljungdahli* 0.1 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızında 3.6 kat, 0.2 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızında 2.4 kat yüksek performans sergilerken; *Clostridium ragsdalei* 0.1 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızında 3 kat, 0.2 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızında 1.7 kat yüksek performans göstermiştir.

Sürekli beslemeli çalışmalarda *Clostridium ljungdahli*, *Clostridium ragsdalei* suşuna göre 503 mg/L etanol üretimiyle 2.2 kat yüksek performans göstermiştir. Besleme hızlarına baktığımızda *Clostridium ljungdahli*, 9.6 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızında 4.8 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızına göre 2.1 kat, *Clostridium ragsdalei* 1.1 kat yüksek performans göstermiştir. Askıda kültür sistemle immobilize sistem karşılaştırıldığında, immobilize biyoreaktör *Clostridium ljungdahli* için 4.8 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızında 1.6 kat, 9.6 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızında askıda sisteme göre 2.5 kat yüksek performans sergilemiştir. *Clostridium ragsdalei* 4.8 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızında askıda sisteme göre 1.7 kat, 9.6

$\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{g}^{\text{}}\text{^n}$ besleme hızında 1.8 kat yüksek performans göstermiştir. Ayrıca *Clostridium ragsdalei* kullanılarak saf CO ile $28.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{g}^{\text{}}\text{^n}$ besleme hızında 1376 mg/L etanol elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasıyla iklim krizine karşı çevre dostu yenilenebilir bir enerji kaynağı olan biyoetanolün üretimine immobilize biyoreaktörlerle ekonomik olarak proses verimlerinin artırılması ve baca gazlarından karbon yakalayarak katma değeri yüksek bir ürün elde edilmesi konusunda yeni bir yaklaşım getirilmiş, literatüre gelecek çalışmalar için katkı sağlanmıştır.

Anahtar sözcükler: İklim krizi, küresel ısınma, karbon yakalama, biyoetanol, sentez gaz fermentasyonu, *clostridium*, yenilenebilir enerji, immobilize biyoreaktör



ABSTRACT**ASSESSMENT OF THE EFFECT OF IMMOBILIZED BIOREACTORS ON
BIOETHANOL PRODUCTION BY SYNGAS FERMENTATION**

SERTKAYA KOYBASI, Simge

PhD in Environmental Sciences

Supervisor: Prof. Nuri AZBAR

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Tugba KESKIN GUNDOGDU

November 2022, 212 pages

Carbon emissions resulting from the use of fossil-based fuels in every aspect of our lives have been the sole cause of global climate change and subsequent climate crisis. In this context, it has become inevitable to find sustainable, clean, safe, alternative renewable energy sources and studies in the literature on this subject have increased exponentially. Among the alternative clean energy sources, bioethanol has taken its place in the literature as one of the promising sources. In recent years, studies have begun on the conversion of syngas into a clean energy source with bacteria. It is aimed to propose solutions on a national and international scale with this doctoral study based on the use of the unique bioprocess system of synthesis gas biotechnologically.

Within the scope of this study, *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium ragsdalei* strains, which are the most used strains in synthesis gas fermentation, were used. The study consists of four parts as determination of the operating parameters of the system, trace element optimization studies, batch fed and continuous fed bioreactor studies.

In the optimization study conducted using the Plackett-Burman method in the production of bioethanol with *Clostridium ljungdahlii*, it was seen that 2.5 and 3.5 times improvement could be achieved in ethanol production by using syngas and pure CO, respectively. It has been calculated that the cost of the trace element solution can be reduced by 18% for the syngas with the optimum media composition.

It was observed that the study examining the bioethanol production performance from syngas and pyrolysis gas with *Clostridium ljungdahlii* resulted in very close bioethanol productions.

According to SEM data in which ceramic ball, pumice and olive seed biochar used as immobilized material were examined, it was observed that all three materials did not undergo deformation. Similarly, no deterioration was observed in the structure of bacteria attached to the immobilized materials. According to this, all three immobilized materials have the physical, chemical, and biological stability that an immobilized material should have. However, according to the adsorption studies carried out, olive seed biochar is not seen as a suitable immobilized material because it adsorbs ethanol. The studies were continued with the ceramic ball which shows more stable performance.

In batch fed studies, *Clostridium ragsdalei* showed 1.36 times higher performance than *Clostridium ljungdahlii* with 760mg/L ethanol production. When we consider the feed rates, the $0.1\text{m}^3\text{gas}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{day}$ feed rate for both strains showed higher performance compared to the $0.2\text{m}^3\text{gas}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{day}$ feed rate. When the suspended culture system is compared with the immobilized culture system, *Clostridium ljungdahlii* performed 3.6 times higher at $0.1\text{m}^3\text{gas}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{day}$ feed rate and 2.4 times higher at $0.2\text{m}^3\text{gas}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{day}$ feed rate; *Clostridium ragsdalei* showed 3 times higher performance at $0.1\text{m}^3\text{gas}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{day}$ feed rate and 1.7 times higher at $0.2\text{m}^3\text{gas}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{day}$ feed rate.

In continuous fed studies, *Clostridium ljungdahlii* showed 2.2 times higher performance than *Clostridium ragsdalei* with 503mg/l ethanol production. When we consider the feed rates, *Clostridium ljungdahlii* showed 2.1 times and *Clostridium ragsdalei* showed 1.1 times higher performance at $9.6\text{m}^3\text{gas}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{day}$ feed rate compared to $4.8\text{m}^3\text{gas}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{day}$ feed rate. When the suspended culture system is compared with the immobilized system, the immobilized bioreactor performed 1.6 times higher at $4.8\text{m}^3\text{gas}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{day}$ feed rate and 2.5 times higher performance than the suspended system at $9.6\text{m}^3\text{gas}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{day}$ feed rate for *Clostridium ljungdahlii*. *Clostridium ragsdalei* showed 1.7 times higher performance at $4.8\text{m}^3\text{gas}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{day}$ feed rate and 1.8 times higher performance at $9.6\text{m}^3\text{gas}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{day}$ feed rate compared to the suspended system. In addition, using *Clostridium ragsdalei*, 1376mg/L ethanol was obtained with pure CO at a feed rate of $28.8\text{m}^3\text{gas}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{day}$.

With this dissertation study, a new approach has been brought to the production of bioethanol, an environmentally friendly renewable energy source against the climate crisis, to increase the process efficiency economically with immobilized reactors and to obtain a high value-added product by capturing carbon from the flue gases, contributing to the literature for future studies.

Keywords: Climate crisis, global warming, carbon capture, bioethanol, syngas fermentation, *clostridium*, renewable energy, immobilized bioreactor



ÖNSÖZ

“Sentez Gaz Fermantasyonu ile Biyoetanol Üretiminde İmmobilize Biyoreaktörlerin Etkisinin İncelenmesi” başlıklı tez çalışması ile biyoetanol üretimine yeni bir yaklaşım getirilmiştir. Tez çalışması kapsamında küresel ısınma ile mücadelede, sadece ülkemiz için değil Dünya çapında atmosfere salınmak üzere açığa çıkan zararlı gazların sentez gaz fermantasyonu yoluyla kullanılabilirliğini incelenerek katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesinde ortam maliyetlerinin düşürülmesi ve yenilikçi immobilize biyoreaktör uygulamalarıyla verimlerin artırılması adına olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışma sera gazı emisyonlarının düşürülmesine büyük oranda katkı sağlayarak atık gazların değerlendirilmesine yönelik bir araştırma olması açısından önem taşımaktadır.

Doktora çalışmalarım süresince edindiğim deneyimler gerek kişisel gelişimin ve gerekse akademik tecrübemin artmasını sağlamıştır. Daha donanımlı ve daha öz güvenli bir birey olmamda emeği geçen tüm değerli hocalarıma şükranlarımı sunuyorum.

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde TÜBİTAK ÇAYDAG 118 Y 305 numaralı proje ile finansman desteği sağlayarak çalışmaların yapılabilmesine destek sağlamanın yanı sıra, TÜBİTAK BİDEB 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında verdikleri destek ile yaptığı katkılardan dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik araştırma Grubu’na teşekkür ederim. Ayrıca, FDK-2020-22039 numaralı doktora tez projesi ile maddi destek veren Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

15/11/2022

Simge SERTKAYA KÖYBAŞI

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	viii
ÖNSÖZ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ	xxiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xxv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 İklim Değişikliği	3
2.2 Sentez Gaz ve Sentez Gaz Fermantasyonu	4
2.3 Biyoetanol ve Sentez Gazdan Biyoetanol Üretimi	6
2.4 CO, CO ₂ , CH ₄ ve Diğer C1 Gazlarının Değerli Son Ürünlere Dönüşümü	12
2.5 Sentez Gaz Fermantasyonunda Mikrobiyoloji ve Biyokimya	14
2.6 Sentez Gazın Etanole Biyolojik Dönüşümünü Etkileyen Parametreler	17
2.6.1 pH etkisi	17
2.6.2 Sıcaklık etkisi	18
2.6.3 Gaz bileşiminin etkisi	20
2.6.4 Ortam kompozisyonunun etkisi	20
2.6.5 Kütle transferi	22
2.6.6 Substrat olarak gaz kısmi basıncının etkisi	27
2.7 Sentez Gaz Fermantasyonunda Kullanılan Biyoreaktör Konfigürasyonları	28
2.8 Hücre İmmobilizasyonu ve İmmobilize Kültürlü Biyoreaktörler	36
2.9 Ticari Ölçekte Sentez Gazı Fermantasyonu	41
2.10 <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile Yapılan Literatür Çalışmaları	43
2.11 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile Yapılan Literatür Çalışmaları	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM	49
3.1 Analitik Yöntemler	49
3.1.1 OD (optik yoğunluk) ölçümü	49
3.1.2 pH ölçümleri	49
3.1.3 Askıda katı madde (AKM) tayini	50
3.1.4 Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile etanol-asetik asit analizi	50

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

3.1.5 Gaz kromatografisi (GC) ile tepe gazı analizi	52
3.1.6 İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometrisi (ICP MS) ile iz element analizi	54
3.1.7 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ölçümleri	55
3.1.8 XRF analizi.....	59
3.1.9 EBCT (Empty Bed Contact Time)	59
3.1.10 GHSV (Gas Hourly Space Velocity).....	60
3.1.11 Etkin yüzey alanı	60
3.1.12 Gram boyama	60
3.2 Saf CO Gazı ve Sentez Gaz Karışımı Hazırlanması.....	61
3.3 Piroлиз Gazı Eldesi İşlemleri.....	62
3.4 Çalışmalarda Kullanılan İmmobilize Materyaller	63
3.5 <i>Clostridium ljungdahlii</i> ve <i>Clostridium ragsdalei</i> Liyofilizasyon İşlemleri.....	65
3.6 Kesikli Beslemeli Biyoreaktörlerin Hazırlanması.....	67
3.7 <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile Yapılan Kesikli Biyoreaktör Çalışmaları.....	67
3.7.1 <i>Clostridium ljungdahlii</i> 'nin büyütülmesi ve stoklanması	67
3.7.2 <i>Clostridium ljungdahlii</i> 'nin büyüme eğrisinin çıkarılması	70
3.7.3 <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile biyoetanol üretiminde optimum CO miktarının belirlenmesi	71
3.7.4 <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile biyoetanol üretiminde iz element etkilerinin incelenmesi ...	72
3.7.5 İleri istatistiki deneysel tasarım	74
3.7.6 <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile en iyi koşullarda sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretimi.....	75
3.8 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile Yapılan Kesikli Biyoreaktör Çalışmaları	76
3.8.1 <i>Clostridium ragsdalei</i> 'nin büyütülmesi ve stoklanması.....	77
3.8.2 <i>Clostridium ragsdalei</i> 'nin büyüme eğrisinin çıkarılması.....	77
3.8.3 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile biyoetanol üretiminde optimum CO miktarının belirlenmesi.	78
3.8.4 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile en iyi koşullarda sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretimi.....	78
3.9 Kesikli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Düzenekleri.....	79
3.10 Sürekli Beslemeli İmmobilize Reaktör Düzenekleri	81

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

3.10.1 <i>Clostridium ljungdahli</i> ile seramik top dolgulu sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör.....	82
3.10.2 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile seramik top dolgulu sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör	83
3.10.3 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile biyokömür dolgulu sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör	85
3.11 Adsorpsiyon İzoterm Çalışması.....	87
4. BULGULAR	88
4.1 <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile Yapılan Kesikli Biyoreaktör Denemeleri.....	88
4.1.1 <i>Clostridium ljungdahlii</i> 'nin büyüme eğrisi	88
4.1.2 <i>Clostridium ljungdahli</i> ile biyoetanol üretiminde optimum CO miktarının belirlenmesi	92
4.1.3 <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile sentez gazdan biyoetanol üretiminde iz element optimizasyonu	95
4.1.4 <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile saf CO kullanılarak biyoetanol üretiminde iz element optimizasyonu.....	106
4.1.5 <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile en iyi koşullarda sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretimi.....	111
4.2 <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile Kesikli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Denemeleri.....	113
4.3 <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile Kesikli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Numunelerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleme Sonuçları	119
4.4 <i>Clostridium ljungdahli</i> ile İmmobilize Malzeme Olarak Seramik Top Kullanan Sürekli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Denemeleri	122
4.5 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile Yapılan Kesikli Biyoreaktör Denemeleri	129
4.5.1 <i>Clostridium ragsdalei</i> 'nin büyüme eğrisi.....	129
4.5.2 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile biyoetanol üretiminde optimum CO miktarının belirlenmesi.....	129
4.5.3 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile en iyi koşullarda sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretimi.....	131
4.6 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile Kesikli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Denemeleri (Seramik Top, Ponza, Askıda)	132

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

4.7 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile Kesikli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleme Sonuçları.....	137
4.8 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile İmmobilize Malzeme Olarak Seramik Top Kullanan Sürekli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Denemeleri	140
4.9 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile İmmobilize Malzeme Olarak Biyokömür Kullanılan Sürekli Beslemeli Biyoreaktör Denemeleri	147
4.10 <i>Clostridium ragsdalei</i> ile İmmobilize Malzeme Olarak Biyokömür Kullanılan Sürekli Beslemeli Biyoreaktör Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleme Sonuçları.....	151
4.11 Biyokömür İçin Mineral Analiz Sonuçları	152
4.12 Biyokömürün Etanol Adsorpsiyon İzoterm Modeli	154
5. TARTIŞMA.....	157
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	165
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	178
TEŞEKKÜR	200
ÖZ GEÇMİŞ.....	202

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Wood Ljungdahl yol izi ile asetojenik bakterilerde CO, H ₂ ve CO ₂ için metabolizma akış şeması	9
2.2. Asetojenlerin Wood Ljungdahl yolu ve metabolik son ürünleri	15
2.3. Gaz-sıvı dispersiyonlarında karşılaşılan kütle transfer dirençleri	23
2.4. Sürekli karıştırmalı tank biyoreaktörü	33
2.5. Kabarcıklı kolon biyoreaktör	34
2.6. Damlatmalı filtre yataklı biyoreaktör	35
2.7. Membran biyoreaktörler	36
2.8. Adsorpsiyon veya kovalent bağlanma	37
2.9. Hareketsizleştirilmiş hücre biyoreaktörlerinin çeşitli türleri	41
3.1. <i>Clostridium</i> suşları için optik yoğunluk ölçümü	49
3.2. pH ölçümlerinde kullanılan pH metre	50
3.3. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)	51
3.4. Yüksek performans sıvı kromatografisi	51
3.5. CO analizinde kullanılan Gaz Kromatografisi (GC)	52
3.6. CO ₂ analizinde kullanılan Gaz Kromatografisi (GC)	53
3.7. CH ₄ -CO-CO ₂ -H ₂ -N ₂ analizinde kullanılan Gaz Kromatografisi (GC)	53
3.8. İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometrisi (ICP-MS)	55
3.9. SEM analizi için akış şeması	55
3.10. Kritik nokta kurutma cihazında kurutulmak üzere hazırlanmış numuneler	56
3.11. Kritik nokta kurutucu Leica EM CPD300	57
3.12. a) Kritik nokta kurutucu işlem düzeneği, b) Kritik nokta kurutucu cihazı numune tutucuları	57
3.13. Kaplama cihazı Leica EM ACE600	58
3.14. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Thermo Scientific Apreo S	59
3.15. Kullanılan saf CO gazı tüpü	61
3.16. Kullanılan hazır sentez gaz tüpü	62
3.17. Piroliz reaktörü	63
3.18. (a)Piroliz öncesi ve sonrası solda ayçiçek parçaları sağda biyokömür, (b) Tedlar bag içerisinde piroliz gaz	63

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

3.19. Seramik top.....	64
3.20. Ponza taşı.....	64
3.21. Zeytin çekirdeği biyokömürü	65
3.22. Skim Milk ile bakterilerin liyofilizasyon işlemi için hazırlanması	65
3.23. Liyofilizasyon işlemi a) Liyofilizatör, b)Liyofilizatör vakum pompası, c)Liyofilizatör numune haznesi, d) Liyofilizatör ekranı.....	66
3.24. Liyofilizasyon işlemi sonrası hazırlanmış liyofilize bakteriler	66
3.25. Laminar akışlı kabinde reaktörlerin hazırlanması	67
3.26. Liyofilize mikroorganizmayı canlandırma işlemi	68
3.27. <i>Clostridium ljungdahlii</i> 'nin canlandırma ve stoklanması	69
3.28. <i>Clostridium ljungdahlii</i> 'nin inkube edilmesi.....	69
3.29. İnokule edilmiş ve edilmemiş ortamlar	70
3.30. (a) Büyüme ortamları sırası ile DSMZ, Modifiye ATCC1, Modifiye ATCC2, <i>Clostridium</i> Broth, (b) Kabin içerisinde steril Stok Na-resazurin, L-cysteine, Trace ilave edilmiş, tıpa ve alüminyum yüzük ile ağızları kapatılmış, azot gazı ile anaerobikleştirilmiş büyüme ortamları, (c) <i>Clostridium ljungdahlii</i> büyümesinin gözlemlendiği ortamlar sırası ile DSMZ, Modifiye ATCC1, Modifiye ATCC2, <i>Clostridium</i> Broth,.....	71
3.31. Optimum CO miktarının belirlenmesi denemesi.....	72
3.32. <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile iz element denemesi.....	73
3.33. <i>Clostridium ljungdahlii</i> en iyi sonuçlar denemesi.....	75
3.34. Liyofilize stoktan canlandırma işlemi	76
3.35. Aktif <i>Clostridium ragsdalei</i> suşları	77
3.36. <i>Clostridium ragsdalei</i> büyüme eğrisi düzeneği.....	78
3.37. <i>Clostridium ragsdalei</i> ile biyoetanol üretiminde optimum CO miktarının belirlenmesi deney düzeneği	78
3.38. <i>Clostridium ragsdalei</i> en iyi sonuçlar denemesi	79
3.39. Sterilizasyon işleminde kullanılan Hirayama marka otoklav	80
3.40. (a)Kesikli beslemeli biyoreaktörler seramik top ve ponza taşı, (b)Kesikli beslemeli biyoreaktörler deney düzeneği	80
3.41. Biyokömürün immobilize materyal olarak kullanıldığı kesikli beslemeli immobilize biyoreaktör düzeneği	81
3.42. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör sistemi	81

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

3.43. Sürekli beslemeli biyoreaktör deney düzeneği.....	82
3.44. Kütle akış kontrol cihazı.....	83
3.45. Sterilizasyon işleminde kullanılan Raypa marka otoklav	84
3.46. Kütle akış kontrol cihazı.....	84
3.47. Sürekli beslemeli biyoreaktör deney düzeneği.....	84
3.48. Biyokömür için sürekli besleme hareketsizleştirilmiş biyoreaktör kurulumu.....	86
3.49. Islak tip gaz akış ölçer cihazı.....	86
3.50. pH kontrolörü (Mettler-Toledo AG- Undorf, İsviçre) ve prob (Hamilton).....	87
3.51. Serum şişelerinde adsorpsiyon izoterm çalışması	87
4.1. <i>Clostridium ljungdahlii</i> büyüme eğrisi.....	88
4.2. DRCM <i>Clostridium</i> Broth ortamı ile DSMZ ortamlarında etanol ve asetik asit üretim performansı.....	90
4.3. DRCM <i>Clostridium</i> Broth ortamı ile DSMZ ortamlarında <i>Clostridium ljungdahlii</i> büyüme grafiği	90
4.4. Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal seramik top SEM görüntüsü, a) 2mm ölçek, 50 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 35000 kat büyütme	91
4.5. DRCM ortamında seramik top üzerine immobilize olmuş <i>Clostridium ljungdahlii</i> tutunumu SEM görüntüsü, a) 20µm ölçek, 5000 kat büyütme, b) 5µm ölçek, 25000 kat büyütme) 2µm ölçek, 50000 kat büyütme.....	91
4.6. DSMZ ortamında seramik top üzerine immobilize olmuş <i>Clostridium ljungdahlii</i> tutunumu SEM görüntüsü, a) 2µm ölçek, 50000 kat büyütme, b) 1µm ölçek, 100000 kat büyütme.....	92
4.7. <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile optimum CO miktarının belirlenmesi denemesi OD değerleri	93
4.8. <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile optimum CO miktarının belirlenmesi denemesi etanol ve asetik asit üretim değerleri.....	94
4.9. Farklı deneysel denemelerde elde edilen biyokütle.....	97
4.10. Farklı deneysel denemelerde formik asit üretimi	98
4.11. Farklı deneysel denemelerde etanol üretimi	99
4.12. İz metallerin (a) etanol ve (b) biyokütle üretimi üzerindeki etkisine ilişkin Pareto Grafikleri	101
4.13. (a) Etanol (mg/L) ve (b) Biyokütle (mg/L) üretimi için ana etkiler grafiği	102

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.14. Optimize edilmiş 1 numaralı reçete ortamı ile DSMZ ortamlarında etanol ve asetik asit üretim performansı	104
4.15. Optimize edilmiş 1 numaralı reçete ortamı ile DSMZ ortamlarında <i>Clostridium ljungdahlii</i> büyüme grafiği	104
4.16. Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal seramik top SEM görüntüsü, a) 2mm ölçek, 50 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 35000 kat büyütme	105
4.17. Optimize edilmiş 1 numaralı reçete ortamında seramik top üzerine immobilize olmuş <i>Clostridium ljungdahlii</i> tutunumu SEM görüntüsü, a) 20µm ölçek, 5000 kat büyütme, b) 5µm ölçek, 25000 kat büyütme, c) 1µm ölçek, 100000 kat büyütme.....	106
4.18. DSMZ ortamında seramik top üzerine immobilize olmuş <i>Clostridium ljungdahlii</i> tutunumu SEM görüntüsü, a) 1µm ölçek, 50000 kat büyütme, b) 500nm ölçek, 100000 kat büyütme	106
4.19. İz element optimizasyonu deneylerinden etanol konsantrasyonları	107
4.20. İz element optimizasyonu deneylerinden 600 nm’de OD değerleri	108
4.21. <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile iz element optimizasyonunda belirtilen yüzde etki değerlerinin Placket Burman Pareto Chart Grafiği.....	110
4.22. <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile en iyi koşullarda hazır sentez gaz ve piroliz gazı ile etanol üretimi.....	111
4.23. <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile en iyi koşullarda hazır sentez gaz ve piroliz gazı ile asetik asit üretimi.....	112
4.24. <i>Clostridium ljungdahlii</i> immobilize materyale tutunma performansı	113
4.25. Ponza taşı ve seramik top dolgulu immobilize biyoreaktörde immobilize ve askıda biyokütle (<i>Clostridium ljungdahlii</i>) oranları	114
4.26. İmmobilize biyoreaktörde ve askıda sistemde sentez gazdan etanol üretim performansları (1) 0,1m ³ gaz/m ³ _R /gün +fruktoz, (2) 0.1m ³ gaz/m ³ _R /gün -fruktoz, (3) 0.2m ³ gaz/m ³ _R /gün -fruktoz	115
4.27. İmmobilize biyoreaktörde ve askıda sistemde sentez gazdan asetik asit üretim performansları. (1) 0.1m ³ gaz/m ³ _R /gün +fruktoz, (2) 0.1m ³ gaz/m ³ _R /gün -fruktoz, (3) 0.2m ³ gaz/m ³ _R /gün -fruktoz.....	116
4.28. İmmobilize biyoreaktörde ve askıda sistemde OD değerleri. (1) 0.1m ³ gaz/m ³ _R /gün +fruktoz, (2) 0.1m ³ gaz/m ³ _R /gün -fruktoz, (3) 0.2m ³ gaz/m ³ _R /gün -fruktoz	117

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.29. Zeytin çekirdeği biyokömürü dolu biyoreaktörde <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile etanol ve asetik asit üretim performansı pH:4.5-5	118
4.30. Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal ponza SEM görüntüsü, a) 2µm ölçek, 65 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 25000 kat büyütme	119
4.31. İmmobilize materyal ponza yüzeyi üzerine <i>Clostridium ljungdahlii</i> tutunumu SEM görüntüsü, a) 5µm ölçek, 25000 kat büyütme, b) 5µm ölçek, 15000 kat büyütme.....	120
4.32. Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal seramik top SEM görüntüsü, a) 2µm ölçek, 50 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 35000 kat büyütme	121
4.33. İmmobilize materyal seramik top yüzeyi üzerine <i>Clostridium ljungdahlii</i> tutunumu SEM görüntüsü, a) 2µm ölçek, 50000 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 35000 kat büyütme.....	121
4.34. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde etanol ve asetik asit üretim performansları (1) 9.6 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz, (2) 2.4 m ³ gaz/m ³ V _{RS} /gün besleme -fruktoz	122
4.35. Kontamine olan biyoreaktör sıvı sirkülasyon hattı.....	123
4.36. Kontamine olmamış (a) ve kontamine olmuş (b) biyoreaktörden alınan sıvı numunelerin mikroskop altındaki görüntüleri	124
4.37. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde pH değişimleri (1) 9.6 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz, (2) 2.4 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz	125
4.38. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde OD değerleri (1) 9.6 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz, (2) 2.4 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz	125
4.39. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde etanol üretim performansları (1) 9.6 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz, (2) 4.8 m ³ gaz/m ³ V _{RS} /gün besleme -fruktoz.....	126
4.40. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde asetik asit üretim performansları (1) 9.6 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz, (2) 4.8 m ³ gaz/m ³ V _{RS} /gün besleme -fruktoz.....	127
4.41. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde OD değerleri (1) 9.6 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz, (2) 4.8 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz	127
4.42. <i>Clostridium ragsdalei</i> büyüme eğrisi	129
4.43. <i>Clostridium ragsdalei</i> ile optimum CO miktarının belirlenmesi denemesi OD değerleri	130
4.44. <i>Clostridium ragsdalei</i> ile optimum CO miktarının belirlenmesi denemesi etanol üretim değerleri.....	130
4.45. <i>Clostridium ragsdalei</i> ile en iyi koşullarda hazır sentez gaz ve piroliz gazı ile etanol üretimi.....	131

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.46. <i>Clostridium ragsdalei</i> ile en iyi koşullarda hazır sentez gaz ve piroliz gazı ile asetik asit üretimi.....	132
4.47. <i>Clostridium ragsdalei</i> immobilize materyale tutunma performansı	133
4.48. Ponza taşı ve seramik top dolgulı immobilize biyoreaktörde immobilize ve askıda biyokütle (<i>Clostridium ragsdalei</i>) oranları.....	133
4.49. İmmobilize biyoreaktörde ve askıda sistemde sentez gazdan etanol üretim performansları. (1) 0.1m ³ gaz/m ³ _R /gün +fruktoz, (2) 0.1m ³ gaz/m ³ _R /gün -fruktoz, (3) 0.2m ³ gaz/m ³ _R /gün -fruktoz	135
4.50. İmmobilize biyoreaktörde ve askıda sistemde sentez gazdan asetik asit üretim performansları. (1) 0.1m ³ gaz/m ³ _R /gün +fruktoz, (2) 0.1m ³ gaz/m ³ _R /gün -fruktoz, (3) 0.2m ³ gaz/m ³ _R /gün -fruktoz.....	136
4.51. İmmobilize biyoreaktörde ve askıda sistemde OD değerleri. (1) 0.1m ³ gaz/m ³ _R /gün +Fruktoz, (2) 0.1m ³ gaz/m ³ _R /gün -fruktoz, (3) 0.2m ³ gaz/m ³ _R /gün -fruktoz	136
4.52. Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal ponza SEM görüntüsü, a) 2µm ölçek, 65 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 25000 kat büyütme	137
4.53. İmmobilize materyal ponza yüzeyi üzerine <i>Clostridium ragsdalei</i> tutunumu SEM görüntüsü, a) 5µm ölçek, 20000 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 35000 kat büyütme.....	138
4.54. Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal seramik top SEM görüntüsü, a) 2µm ölçek, 50 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 35000 kat büyütme	139
4.55. İmmobilize materyal seramik top yüzeyi üzerine <i>Clostridium ragsdalie</i> tutunumu SEM görüntüsü, a) 5µm ölçek, 15000 kat büyütme, b) 2µm ölçek, 50000 kat büyütme.....	139
4.56. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde etanol üretim performansları (1) 9.6 m ³ gaz/m ³ _R /gün besleme -fruktoz, (2) 4.8 m ³ gaz/m ³ _{Rs} /gün besleme -fruktoz.....	140
4.57. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde asetik asit üretim performansları (1) 9.6 m ³ gaz/m ³ _R /gün besleme -fruktoz, (2) 4.8 m ³ gaz/m ³ _{Rs} /gün besleme -fruktoz.....	141
4.58. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde OD değerleri (1) 9.6 m ³ gaz/m ³ _R /gün besleme -fruktoz, (2) 4.8 m ³ gaz/m ³ _R /gün besleme -fruktoz	141
4.59. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde etanol ve asetik asit üretim performansları (1) +fruktoz, (2) 48 m ³ gaz/m ³ _R /gün besleme -fruktoz, (3) +fruktoz, (4) 28.8 m ³ gaz/m ³ _R /gün besleme -fruktoz	143

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.60. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde pH değişimleri (1) +fruktoz, (2) 48 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz, (3) +fruktoz, (4) 28.8 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz	144
4.61. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde OD değerleri (1) +fruktoz, (2) 48 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz, (3) +fruktoz, (4) 28.8 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz	145
4.62. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör tepe gazı CO içerikleri (1) +fruktoz, (2) 48 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz, (3) +fruktoz, (4) 28.8 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz	146
4.63. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör tepe gazı CO ₂ içerikleri (1) +fruktoz, (2) 48 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz, (3) +fruktoz, (4) 28.8 m ³ gaz/m ³ V _R /gün besleme -fruktoz	146
4.64. Sürekli beslenen immobilize biyoreaktörde etanol, asetik asit ve formik asit üretim performansları.....	148
4.65. Biyoreaktörde tüketilen günlük CO miktarı	149
4.66. Sürekli beslenen immobilize biyoreaktördeki pH değişiklikleri	149
4.67. Sürekli beslenen hareketsiz biyoreaktördeki OD değerleri	150
4.68. Zeytin çekirdeği biyokömürü SEM görüntüleri; 1) Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal seramik top SEM görüntüsü, a) 2mm ölçek, 50 kat büyütme, b) 20µm ölçek, 5000 kat büyütme. 2) İmmobilize materyal seramik top yüzeyi üzerine <i>Clostridium ragsdalei</i> tutunumu SEM görüntüsü, a) 5µm ölçek, 25000 kat büyütme, b) 2µm ölçek, 50000 kat büyütme.....	152
4.69. Biyokömür eklenmiş serum şişesindeki etanol konsantrasyonu	154
4.70. Langmuir izoterm grafiği	155
4.71. Freundlich izoterm grafiği.....	155
6.1. <i>Clostridium ragsdalei</i> ve <i>Clostridium ljungdahli</i> suşu ile seramik top kullanılarak gerçekleştirilen kesikli beslemeli çalışmalarım maksimum etanol değerleri	172
6. 2. <i>Clostridium ragsdalei</i> ve <i>Clostridium ljungdahli</i> suşu ile seramik top kullanılarak gerçekleştirilen sürekli beslemeli çalışmalarım maksimum etanol değerleri.....	173

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Sentez gazdan biyoetanol üretiminde kullanılan mikroorganizmalar	16
2.2. Sentez gazını fermente eden mikroorganizmaların büyüme sıcaklıkları.....	19
2.3. Farklı tipte sentez gazı fermantasyon biyoreaktörleri	29
2.4. Sentez gaz fermantasyonunda kullanılan bazı biyoreaktör tipleri ve performansları	30
2.5. Askıda hücre ve immobilize hücre fermantasyonları arasındaki karşılaştırma	40
3.1. ICP-MS uygulama parametreleri.....	54
3.2. İz element içerikleri için optimizasyon deney tasarımı değerleri.....	73
4.1. İnokulumun ICP analiz sonucu (İnokulumda gözlenen iz element miktarları).....	95
4.2. İnokulumdan miktarları dahil edildikten sonra kesikli biyoreaktörlerde g/L olarak sunulan stok iz element konsantrasyonları.....	96
4.3. <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile sentez gaz kullanılarak biyoetanol üretiminde iz element optimizasyonunda Plackett-Burman tarafından hazırlanan ANOVA analiz raporu.	100
4.4. Stok solüsyonda bulunan <i>Clostridium ljungdahlii</i> tarafından biyoetanol üretimi için iz elementin (g/L) optimal kombinasyonu, istatistiksel yöntem kullanılarak belirlenir.....	103
4.5. <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile saf CO kullanılarak biyoetanol üretiminde iz element optimizasyonunda Plackett Burman tarafından hazırlanan Anova analiz raporu.....	109
4.6. Literatür ve reçete verileri	110
4.7. <i>Clostridium ljungdahlii</i> ile en iyi koşullarda sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretimi çalışmasında kullanılan iz element reçetesi	111
4.8. <i>Clostridium ljungdahlii</i> tutunma denemesinde askıda katı madde değerleri	113
4.9. Zeytin çekirdeği biyokömürü kullanılan biyoreaktörde <i>Clostridium ljungdahlii</i> tutunma denemesinde askıda katı madde değerleri	117
4.10. Biyoreaktöre ait performans parametreleri.....	126
4.11. Biyoreaktöre ait performans parametreleri.....	128
4.12. <i>Clostridium ragsdalei</i> ile tutunma denemesinde askıda katı madde değerleri.....	132
4.13. Biyoreaktöre ait performans parametreleri.....	147
4.14. Biyoreaktöre ait performans parametreleri.....	151
4.15. Biyokömür element içeriğinin DSMZ ve ATCC ortamlarının element içerikleri ile karşılaştırılması.....	153

TABLolar DİZİNİ (devam)

4.16. Biyokömürün etanole adsorpsiyonu için izoterm parametreleri (Koşullar; temas süresi: 720 dakika, biyokömürün ön kurutma süresi: 24 saat, adsorban miktarı: 18.5 g, sıvı hacmi: 42 mL, sıcaklık: 30°C, karıştırma hızı: 150 rpm).....	156
--	-----



KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AKM	Askıda Katı Madde
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BSE	Geri Saçılım Dedektörü
CO	Karbonmonoksit
CFeSP	Korrinoid Demir Sülfür Proteini
CODH/ACS	Karbonmonoksit Dehidrojenaz/Asetil-CoA Sentaz
DSMZ	Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu
EtOH	Etanol
EBIC	Elektron Işını İndüklenen Akım
EDS	Enerji Dağıtıcı Dedektör
FEG	Alan Emisyon Tabancası
HAc	Asetik Asit
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
ICP	İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Spektrometrisi
IPCC	Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli
LVD	Geniş Hacim Dedektörü
OD	Optik Yoğunluk
PTFE	Politetrafloroetilen
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopi
STEM	Taramalı İletim Elektron Mikroskopi
SDD	Silikon Sürüklenme Dedektörü
TCD	Termal İletkenlik Dedektörü
THF	Tetrahidrofolat
VOC	Uçucu Organik Bileşikler

1. GİRİŞ

Küresel olarak insanoğlunun önlenemeyen nüfus artışı ve buna bağlı enerji taleplerinin (ulaşım, ısıtma, soğutma, elektrik, taşımacılık vb.) fosil yakıtlardan sağlanıyor olmasına bağlı olarak atmosferdeki karbon dioksit konsantrasyonları alarm veren seviyelere kadar tırmanmış ve küresel ısınma iklim krizi haline dönüşmüştür. Beraberinde baca gazlarının neden olduğu hava kirliliği ise canlı yaşam kalitesini doğrudan etkileyen ve kronik solunum hastalıklarına neden olan olumsuz çevre faktörleri olarak canlı yaşamını tehdit eden bir unsur olarak karşımıza çıkmıştır. Atmosferde bulunan başta karbondioksit, metan, florlu gazlar, su buharı vb. sera gazları yeryüzüne ulaşan Güneş ışınlarının yansyarak geri dönüşünü engelleyerek sera etkisi yaratmaktadır. Sanayi devriminden önceki yıllara göre kritik bir şekilde yükselişe geçen bu gazlar yerkürenin ısınmasına ve iklim anomalilerinin canlı yaşamını tehdit eder şekilde artmasına neden olmaktadır. Küresel ısınma Dünya üzerinde birçok etkiye sebep olur. Bu etkilerin en büyüğü iklim değişikliğidir. İklim değişikliğinin biyolojik çeşitlilik ve doğal ekosistemler üzerindeki etkileri dünyanın her yerinde mevcuttur ve konuyla ilgili veriler Hükümetler Arası İklim Değişikliği Paneli (IPCC)'nde sunulmuştur. Hem iklim değişikliğini hafifletmek için sera gazı emisyonlarını azaltmak hem de iklim değişikliğine uyum sağlamak için gerçekleştirilen çalışmalar tüm dünyada hızlanmıştır.

Tüm dünya gibi ülkemizde de iklim değişikliğiyle mücadele kapsamında hava kirletici parametrelerin yoğunluklarının düşürülmesi, güvenli, sürdürülebilir ve alternatif yenilenebilir enerji kaynaklarına yönelim öncelikler arasında yerini almıştır. 2015 Paris Anlaşması hedeflerine ulaşmak ve iklim değişikliğinin etkilerinden kaçınmak için yenilenebilir enerjiyi bugün bulunduğu yerden en az on kat artırmamız gerekmektedir.

Yenilenebilir enerji kaynaklarının en önemlilerinden biri biyoyakıtlardır. Biyoyakıtlar arasındaysa biyoetanol gelecek vaat eden en önemli ürünlerden biridir. Yakıt etanol oksijenlenmiş, susuz ve yüksek oktanlı değerli bir alkoldür. En büyük avantajlarından biri benzine ilave edilerek kullanılabilmesidir. Oksijenat olarak yakıtlarda oktan değerini artırmada kullanılan Metil Tersiyer Bütil Eter'e alternatif olabilecek bir yakıttır. Günümüzde %10, 15, 20 (E10, E15, E20) oranlarında karıştırılarak kullanılabilmektedir. Biyoetanolün en önemli özelliği biyobozunur ve çevre dostu bir biyoyakıt olmasıdır. Biyoetanol birinci nesil

kaynaklardan (şeker pancarı, mısır, glikoz) direk fermantasyonla, ikinci nesil kaynaklardan (kentsel katı atıklar, çimen, tarla atıkları gibi lignoselülozik atıklar) kimyasal ve ön işlemlerle şekerler açığa çıkarıldıktan sonra üretilmektedir. Biyokütleden ön işlemlerle biyoetanol üretimine alternatif olarak geliştirilen teknolojiler gazlaştırma ve pirolizdir. Piroliz işlemi sonucunda açığa çıkan sentez gazı içeriği CO, CO₂, N₂, H₂ ve CH₄ olan bir gaz karışımıdır. İçeriğindeki CO nedeniyle toksik gaz olarak bilinmektedir. *Clostiridium ljungdahlii*, *Clostiridium ragsdalei*, *Clstiridium autoethanogenum* gibi türler anaerobik koşullar altında Wood-Ljungdahl yolizi ile C1 gazlarından (CO, CO₂ gibi) etanol ve asetik asit üretimini gerçekleştirebilirler. Bu konuda çeşitli biyoreaktör konfigürasyonlarında biyoetanol üretimi çalışmaları literatürde mevcuttur.

Bu tez çalışması kapsamında sentez gaz fermantasyonunda önemli iki bakteri türü olan *Clostiridium ljungdahlii* ve *Clostiridium ragsdalei* kullanılarak biyoetanol üretiminde maliyetlerin düşürülmesi ve üç yeni (seramik top, ponza taşı, zeytin çekirdeği biyokömürü) materyalin kullanıldığı immobilize biyoreaktörlerde verimin artırılması üzerine çalışmalar yapılmıştır. Ortam maliyetlerinin düşürülmesinde ileri istatistiki deneysel tasarım yöntemiyle konsantrasyon ve tarama çalışmaları yapılmıştır. Yukarı akışlı immobilize biyoreaktörlerdeyse askıda sistemlerle karşılaştırmalı olarak sentez gazın biyoetanole dönüşüm verimleri incelenmiştir. Aynı zamanda piroliz gaz kullanılarak gerçekleştirilen denemelerle etanol üretiminde önemli sonuçlar elde edilmiştir. Bu kapsamda kömür kullanan endüstrilerde açığa çıkabilen sentez gazın iklim kriziyle mücadelede sentez gaz fermantasyonuyla katma değeri yüksek ürünlere dönüşmesi konusunda literatüre katkı sağlayacak önemli sonuçlar elde edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İklim Değişikliği

Atmosferde bulunan karbondioksit, su buharı, metan ve diğer gazlar yeryüzüne ulaşan Güneş ışınlarının yeryüzünden yansıyarak uzaya geri dönüşünü engeller. Bu olaya sera etkisi denir. Atmosferde bulunan karbondioksit ve diğer sera gazlarının miktarının (özellikle fosil yakıtların çeşitli amaçlar için yanması sonucu) artması ile sera etkisi de artar. Bunun sonucunda ise küresel ısınma meydana gelir. Küresel ısınma Dünya üzerinde birçok farklı etkiye sebep olur. Bu etkilerin en büyüğü iklim değişikliğidir.

Küresel iklim değişikliği son 2000 yılda olduğundan daha hızlı bir şekilde artmaktadır (Letzter, 2019). Küresel iklim değişimi, çevreyi etkileyerek buzulların küçülmesine, deniz seviyesinin yükselmesine, kar örtüsünün azalmasına, daha fazla ısı dalgalanmalarına, yağış miktarlarındaki değişkenliklere, okyanusların ısınmasına ve küresel sıcaklık artışına neden olmaktadır (Shaftel, 2020). Bu etkilerin yoğunluğu, çevresel sistemin değişime uyum sağlama yeteneği nedeniyle zaman içinde değişkenlik göstermektedir (Shaftel, 2020; Stocker et. al., 2013).

İklim değişikliği 30 yılı aşkın bir süredir uluslararası, ulusal ve yerel olarak ele alınmaktadır. Yine de küresel sera gazı emisyonları yıldan yıla artmaya devam etmektedir (Le Quéré et. al.,2020). 1992’de kabul edilen Birleşmiş Milletler İklim Değişikliği Çerçeve Sözleşmesi (UNFCCC), 1997 Kyoto Protokolü ve 2015 Paris Anlaşması kapsamındaki uluslararası iklim müzakereleri, sera gazı emisyonlarına bağlı İklim değişikliği krizine yönelik atılan önemli adımlardır.

İklim değişikliği tehdidine küresel tepkinin güçlendirilmesi, sürdürülebilir kalkınma ve yoksulluğu ortadan kaldırma çabaları bağlamında, sanayi öncesi seviyelerin 1,5 °C üzerindeki küresel ısınmanın etkileri ve ilgili küresel sera gazı emisyon yolları hakkında IPCC özel bir rapor hazırlamıştır (IPCC Special Report, 2018). Raporda ısınmanın 1,5°C ile sınırlandırılmasının, iyileştirilmiş enerji güvenliği ile sinerjik bir şekilde başarılacağı ve iyileştirilmiş hava kalitesi yoluyla milyonlarca erken ölümü önleyerek büyük halk sağlığı

yararları sağlanabileceği belirtilmiştir. Bununla birlikte, biyoenerji gibi belirli hafifletme önlemlerinin önemine değinilmiştir.

2.2 Sentez Gaz ve Sentez Gaz Fermantasyonu

Küresel nüfusun sürekli artması ve endüstriyel faaliyetlerin yoğunlaşması nedeniyle küresel enerji ihtiyacının paralel olarak artması, yenilenebilir enerji kullanımını gerekli kılmaktadır (Roy et al., 2015; Li et al., 2016).

Sadece fosil yakıt rezervlerinin kademeli olarak tükenmesi nedeniyle değil, aynı zamanda da insanlığın sera etkisi ve bunun sonucunda ortaya çıkan küresel ısınma gibi büyük sorunla yüz yüze olması sebebi ile yenilenebilir enerji kullanımı gereklidir (Christophe et al., 2015; Hansen et al., 2013; Friedlingstein et al., 2014).

Bu doğrultuda, sentez gaz fermantasyonu ile biyoyakıt eldesi, son yıllarda yenilenebilir enerji üretimi için alternatif bir metodoloji olarak bilimsel arenada ilgi kazanmıştır (Grimalt-Alemany et al., 2018; Redl et al., 2017; Phillips et al., 2017; Wainaina et al., 2017; Liew et al., 2016; Molitor et al., 2016; Acharya et al., 2015; Latif et al., 2014; Debabov et al., 2013; Daniell et al., 2012; Mohammadi et al., 2011; Munasinghe et al., 2010;).

Sentez gaz, biyokütlenin gazlaştırılması ve pirolizi ile elde edilen, içeriği CO, CO₂, N₂, H₂ ve CH₄ olan bir gaz karışımıdır. Her bir gazın oranı, hammadde olarak kullanılan biyokütlenin tipine, gazlaştırıcının konfigürasyonuna ve gazlaştırma işleminin operasyonel parametrelerine bağlıdır (Molino et al., 2016). İçeriğindeki CO nedeniyle toksik gaz olarak bilinmektedir.

Çelik endüstrisi, yağ rafinerileri, kömür kullanan endüstrilerde açığa çıkabilirler. Avrupa Birliği, 1990 yılına kıyasla sera gazı emisyonlarını % 80-95 oranında azaltmak için 2050 yılına kadar uzun vadeli bir hedef belirlemiştir (European Commission, 2011) ve bunu başarmak için inorganik karbon kaynaklarının kullanılmasının önemi büyüktür.

Fermantasyon süreçlerinin en büyük avantajlarından olan düşük enerji ve düşük altyapı maliyetlerinin yanında biyokatalizör olarak adlandırdığımız mikroorganizmaların ucuz olması da bir avantajdır. Kullanılan mikroorganizmalar sabit gaz oranları talep etmezler. Proses

kokusuzdur. Ek olarak, sağlığı tehdit eden evre kirliliğinin belirgin şekilde azalmasına da yardımcı olur (Abubackar et al., 2011).

Sentez gaz fermantasyon prosesinin temel hedeflenen ürünü, yüksek oktan sayısı nedeniyle ulaşım sektöründe yakıt karışımlarında kullanılmasına izin verilen biyoetanoldr. Günümüzde biyoetanol, esas olarak mısır, şeker kamışı, şeker pancarı ve buğdaydan elde edilen karbonhidratların fermantasyonu yoluyla ticari ölçekte üretilmektedir. Ancak açlığı giderememiş bir dünyada gıda kaynağı da olabilecek bu mahsullerin enerji amaçlı biyoetanol üretiminde önemli bir rol oynaması enerji-gıda çatışmasına neden olmaktadır. Bu çelişki, gıda kaynağı olarak kullanılamayan lignoselülozik biyokütleden üretilen ikinci nesil biyoetanol konusunda kapsamlı araştırmaları gündeme getirmiştir (Perego et al., 2010).

İkinci nesil biyoetanol üretimi için kilit adım, lignoselülozik yapıyı parçalamak ve selüloz ve hemiselülozu sonraki enzimatik hidroliz adımına daha uygun hale getirmek için biyokütlenin ön işleme tabi tutulmasıdır. Biyokütlenin tipine bağlı olarak, birçok farklı ön arıtma yaklaşımı çalışılmıştır (en yaygın olanları: asit ön arıtma, alkali ön arıtma, ıslak oksidasyon, biyolojik arıtmadır) bunların her biri ekonomik ve çevresel zorluklarla karşı karşıyadır (Alvira et al., 2010).

Termokimyasal - biyolojik işlemenin ana avantajı, lignoselülozik biyokütlenin (lignin ve hemiselüloz dahil) tüm organik maddesinin hidrojen, karbon dioksit ve karbon monoksit dönüştürülebilmesi ve daha sonra biyoetanole fermente edilmesidir. Oysa hidroliz yoluyla ikinci nesil biyoetanol üretimde lignin ve hemiselülozun bir fraksiyonundaki karbon (toplam hammadde karbonunun %25-30'u) kullanılamaz ve dolayısıyla işlem daha düşük verimle sonuçlanır. Glukoz kadar etkin olarak kullanılmasa da ksilozdan biyoyakıt üretmenin mümkün olduğu literatürde yerini almıştır. Buna ek olarak, sentez gazı fermantasyonu, kirletici kaynaklardan gelen atık gazları aynı anda işleyebildiği için daha esnektir (Kennes et al., 2016).

Etanolün yanı sıra, sentez gazının fermantasyonundan elde edilen diğer önemli ürünler metan (Grimalt-Alemany et al., 2018), asetik asit (Phillips et al., 2017), butanol (nxela et al., 2017; Dürre et al., 2016; Luk et al., 2016) ve uçucu yağ asitleridir (Wainaina et al., 2017). Metan, enerji depolamak için değerli bir molekül olup, ısı ve elektrik üretimi için yakıt olarak ve ulaşım sektöründe doğal gazlı araçlarda kullanılabilir. Asetik asit, yapıştırıcıların, mürekkeplerin, boyaların ve kaplamaların üretimi için önemli bir öncüdür. Ayrıca, rneğin

Pseudomonas enfeksiyonlarına karşı bir antiseptik olarak tıbbi uygulamaları vardır. Propiyonik asit gibi daha yüksek karbon zincirli uçucu yağ asitleri ve bütirik asit, endüstriyel olarak yüksek katma değerli kimyasalların üretimi için yapı taşları olarak ve gıdaların korunması için katkı maddeleri olarak kullanılırken, bütanol birçok endüstriyel uygulamada bir çözücü olarak kullanılır. Yukarıda bahsedilen kimyasallar, esas olarak kimyasal yöntemlerle fosil kaynaklardan üretilir ve bu nedenle, sentez gaz fermantasyonu yoluyla sürdürülebilir biyolojik üretim olasılığına yüksek bilimsel ilgi vardır.

2.3 Biyoetanol ve Sentez Gazdan Biyoetanol Üretimi

Biyoetanol, alternatif biyoyakıtlar arasında kullanımı en kolay olanlarından biridir. Yakıt olarak kullanılan etanol, su içermeyen, oksijenli ve yüksek oktanlı bir alkoldür. Benzine alternatif bir yakıt olarak literatürde bahsedilmektedir (AdvancedBiofuelsUSA.org, 2011). Bir katkı maddesi ve bir oksijenat olarak ve ayrıca oktan sayısını yükseltmek için kullanılan Metil Tersiyer Bütil Eter (MTBE)'nin yerini alabilir. MTBE'nin bilinen en önemli olumsuz etkisi yeraltı sularına karışması halinde yaratacağı toksik etkidir. Günümüzde etanol, E10, E15 ve E20 olarak adlandırılan %10, %15 ve %20 oranlarında benzine ilave edilerek kullanılabilir. Alternatif bir yakıt halinde en saf haliyle de kullanılabilir (E85). %10 etanol karışımı kullanarak petrol yanmasını %25-30 oranında düşürebilmektedir. CO, CO₂, uçucu organik karbonlar ve NO_x gibi zararlı gaz emisyonlarının da belirli oranda düşmesi sağlanmaktadır. Buna ek olarak, biyoetanol biyolojik olarak parçalanabilir ve %35 oksijen içerir, bu da geleneksel yakıtlara kıyasla yanma sırasında partikül ve NO_x emisyonlarını azaltır. Biyoetanol, şeker, nişasta veya lignoselülozik malzemeler gibi yenilenebilir hammaddelerden üretilmektedir. Halihazırdaki işlemler, şekerlerin doğrudan ya da dolaylı fermantasyonunu içerir. Direkt fermantasyonda şeker bazlı kaynaklar (pancar, sorgum, kamış vb.) veya nişasta bazlı bitkiler (mısır, buğday, arpa, patates vb.) mayalar veya bazı bakteriler tarafından alkollere dönüştürülür (Adıgüzel et al., 2013). Şu anda biyoetanol üretiminin çok büyük bir oranı, birinci nesil teknoloji olarak bilinen şekerleri veya nişasta ürünlerini fermente ederek gerçekleştirilmektedir. Bu bitkilerin hem insan tüketimi için hem de hayvancılık için bir gıda maddesi olarak yüksek değeri ve hektar arazi başına düşük kullanım verimliliği sorunu, bu teknolojinin fizibilitesinin sorgulanmaya başlamasına neden olmuştur. İkinci nesil teknoloji olarak bilinen bu konularda olası bir çözüm, tarımsal veya belediye atıkları, odun, saman, çimen ve bitki kalıntıları gibi lignoselülozik atıkların kullanılmasıdır (Dürre and Eikmanns, 2015).

Dolaylı fermantasyonda, ağaçlardan ve otlardan kaynaklanan selülozik ve hemiselülozik biyokütle kimyasal olarak veya enzimatik olarak basit şekerlerle hidroliz edilir. Mevcut şekerler daha sonra etanol üretmek için fermente edilir. Çoğunlukla saman ve odunda bulunan selüloz ve hemiselülozla birlikte büyük oranda lignin mikrobiyal saldırıya karşı çok dirençlidir. Bu nedenle son zamanlarda CO içerikli sentez gazların fermantasyonu büyük önem kazanmıştır (Zheng et al., 2014).

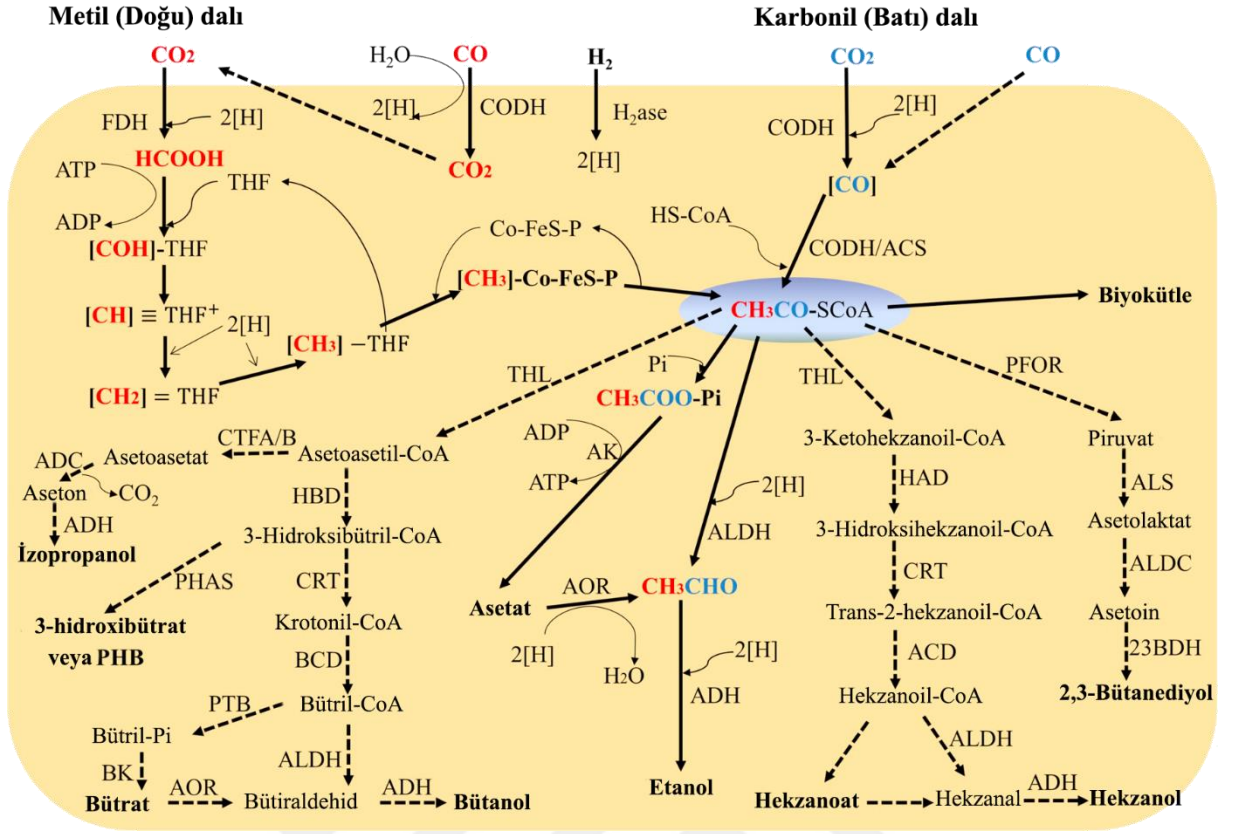
Birçok ülkedeki nüfus artışı ve buna bağlı olarak hızlanan sanayileşme ile birlikte, Dünya'daki enerji talebi oranı da artmıştır. Geçen yüzyılda Dünya çapında enerji tüketiminde 17 kat artış olduğu görülmüştür. Bu enerji talebi öncelikle tükenme eşiğinde olan petrol rezervlerini kullanarak üstesinden gelmeye çalışılmaktadır ancak bu kaynakların da önümüzdeki 50 yıl içinde tükeneceği düşünülmektedir. Bu fosil yakıtların kullanılması çevreye ve insan sağlığına zararlı, kirlетici olan zehirli gazların salınmasına sebep olmaktadır. Bu gazların konsantrasyonunun artması, şiddetli seller ve kuraklıklar, yükselen deniz seviyeleri ve aşırı hava koşulları gibi olumsuz etkilere neden olmaktadır. Küresel ısınmaya ilişkin artan endişe, insanları sürdürülebilir ve daha güvenli alternatif yenilenebilir yakıtlar aramaya yönlendirmiştir (Dürre and Eikmanns, 2015).

Fosil yakıtlar, sera gazı etkisine neden olan ve tükenmekte olan kaynaklar olmasından dolayı alternatif yakıt arayışları devam etmektedir. Bu konuda ilgiyi, mikrobiyal temelli prosesler ve selülozik biyokütle çekmektedir. Ancak biyokütleden biyoyakıt üretimi hala araştırmaya açık ve maliyetli bir prosestir (Phillips et al., 2017). Ototrofik asetojenik, karboksidotrofik ve metanotrofik bakteriler CO, CO₂ ve CH₄'ü tutarak bu karbon kaynaklarını alternatif yakıtlara çevirebilirler (Lennartsson et al., 2014). Sentez gaz fermantasyonu ekonomik, temiz ve sürdürülebilir endüstriyel yakıt ve katma değeri yüksek kimyasal üretimi için kullanılabilecek en önemli yöntemlerden biridir. Endüstri ve toplumlar için yiyecek olarak kullanılmayan kaynaklardan kimyasal maddelerin üretilmesi ve aynı zamanda sera gazı emisyonlarının düşürülmesi önemlidir. Günümüzde kimyasal ve enerji üretiminde fosil yakıtlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak fosil yakıtlar tükenmektedir ve kullanımları çevre kirliliğine yol açmaktadır. Biyoteknolojik uygulamalar ve fermantasyon, fosil kaynak temelli üretimlere alternatif olabilecek en doğa dostu ve enerji verimli proseslerdir (Devarapalli and Atiyeh, 2015). Biyoyakıt üretiminde bugüne kadar kullanılan teknolojilerin pek çoğu kolaylıkla ulaşılabilen karbonhidratların (şeker, nişasta vb.) ve bitkilerin (şeker kamışı veya mısır şurubu) kullanımına yöneliktir. Bu tip uygulamalarda hammadde maliyeti toplam maliyetin %60'ını

oluşturmaktadır. Bu durumun etkisinde düşük maliyetli hammadde arayışları büyük önem kazanmıştır. Bu nedenle yaygın olarak araştırılan bir diğer konu lignoselülozik hammadde kullanımıdır. Bu konuda ise en büyük dezavantaj ihtiyaç duyulan etkili ön işlem ve sonrasında maliyetli hidrolitik enzim işlemleridir. Bir biyoproseste dikkat edilmesi gereken en önemli konulardan biri üretimin toplam maliyetidir. Bu sorunlara karşı en yaratıcı çözümlerden biri atık gazların hammadde olarak kullanılabildiği proseslerdir. Gaz fermantasyonu endüstriyel atık gazların, kömürün, biyokütlenin veya kentsel atıkların yakıt ve kimyasala dönüştürülmesinde kullanılan bir teknolojidir. Gaz fermente edebilen mikroorganizmalar C1 (CO, CO₂, CH₄) bileşiklerini metabolize edebilirler (Dürre and Eikmanns, 2015). Bu gazlar çelik endüstrisi, yağ rafinerileri, kömür ve doğal gaz kullanan endüstrilerde açığa çıkabilen beslenme amaçlı kullanılamayacak atıklardır. Ya da bu gazlar sentez gaz olarak (CO/CO₂/CH₄/H₂/N₂) karışımları şeklinde biyokütle veya evsel ve tarımsal atıklardan üretilirler. Bu önemli avantaj kimyasalların ve yakıtların herhangi bir coğrafyada rahatlıkla üretilbildiklerini göstermektedir. Dahası atmosfere salınmak üzere açığa çıkan bu gazları kullanılabilişliği sera gazı emisyonlarının düşürülmesine de büyük oranda katkı sağlayacaktır. C1 karbonlarının fiksasyonunda 6 önemli yolak vardır (Zong et al., 2009).

- 1- İndirgeyici pentoz fosfat döngüsü
- 2- İndirgeyici acetyl CoA döngüsü (Wood-ljungdahl)
- 3- İndirgeyici sitrat döngüsü
- 4- Hidroksipropiyonat döngüsü
- 5- Dikarboksilat/4 hidroksi bütirat döngüsü
- 6- 3 hidroksi propiyonat/4 hidroksi bütirat döngüsü

Bu yöntemler arasında 2 numaralı Wood-ljungdahl döngüsü en verimli üretim prosesi olarak bilinmektedir. Wood ljungdahl yol izinde anaerobik olarak CO'in etanole dönüşümü detaylı olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.1).

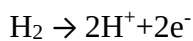


Şekil 2. 1. Wood Ljungdahl yol izi ile asetojenik bakterilerde CO, H₂ ve CO₂ için metabolizma akış şeması (Sun et al., 2019b)

Şekil 2.1’de kırmızı renk, metil dalındaki karbon akışını gösterir. Mavi renk karbonil dalındaki karbon akışını göstermektedir.

Ototrofik anaerobların etanol üretimi için genellikle izlediği yol, asetil-CoA biyokimyasal yolu veya Wood-Ljungdahl yoludur (Ragsdale and Pierce, 2007). Bu yol, homoasetojenik bakteriler ve metanojenik arke dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda mevcuttur (Ljungdahl, 2009). Doğu kolu, asetil-CoA’nın metil grubunu üretmek için CO₂’nin indirgendiği birkaç indirgeyici adımdan oluşmaktadır. Anaeroblarda benzersiz olan batı kolu, ya CO₂’den CO üretir ya da doğrudan CO’i ortamdan alır ve bu daha sonra asetil-CoA sentezi için karbonil grubu olarak hizmet eder.

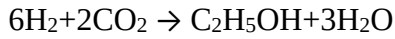
İşlem için indirgeyici eşdeğerler, hidrojenaz enzimleri tarafından H₂’den üretilir (Hedderich, 2004).



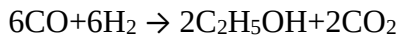
H₂ yetersiz ise veya hidrojenaz enziminin inhibisyonu meydana gelir ise (Acosta et al., 2003, Tibelius and Knowles 1984), karbon monoksit dehidrojenaz (CODH) kullanılarak CO'nun CO₂'ye oksidasyonu yoluyla indirgeyici eşdeğerler üretilir (Ragsdale et al., 1983).



Sentez gaz dönüşümü sırasında H₂/CO oranını ayarlamak için kullanılan su gazı kaydırma reaksiyonu meydana gelir. Etanol sentezi için karbon kaynağı olarak CO'nun miktarı bu nedenle azalır, bu da aşağıdaki reaksiyonlar kullanılarak yorumlanabilir.



Yukarıdaki iki reaksiyondan birincisinden mevcut karbon kaynağının (CO) sadece üçte birinin teorik olarak etanole dönüştürülebildiği görülebilmektedir. Bunun nedeni, CO'nun, H₂'nin yokluğunda veya hidrojenaz enziminin inhibisyonu durumunda CODH yoluyla CO₂'ye oksidasyon yoluyla indirgeyici eşdeğerleri üretmek için kullanılmasıdır. Ayrıca, ikinci reaksiyondan sentez gazında H₂ varsa, etanol yapmak için CO₂'nin kullanılabileceği sonucuna varılabilmektedir.



Son olarak yukarıdaki denklemden bir eş molar CO ve H₂ karışımı için, karbon substratının (CO) üçte ikisinin etanole dönüştürülebildiği görülmektedir.

Bir biyoyakıt olarak etanol, istenen metabolit olarak kabul edilir ve üretim performansını arttırmak için prosesin optimize edilmesi gerekir. Daha sonra istenen ürün, damıtma, özütleme ya da her ikisinin bir kombinasyonu veya herhangi bir başka verimli geri kazanım işlemi ile proses ortamından geri kazanılır. Sentez gaz fermantasyonu, yavaş bir reaksiyon hızı ile karakterize edilmesine rağmen, geleneksel kimyasal katalitik prosese göre birçok avantajı vardır. Kullanılan biyokatalizör ucuzdur, kükürte karşı yüksek toleransa sahiptir (Vega et al., 1990) ve katran gibi kirleticilere uyum sağlama yeteneğine sahiptir (Ahmed et al., 2006).

Böylece, fermantasyon öncesi maliyetli gaz saflaştırma adımlarına duyulan ihtiyaç ortadan kaldırılabilir. Bununla birlikte, gaz karışımında bulunan bazı toksik bileşiklerin engelleyici etkilerini ortadan kaldırmak için uygun bir filtreleme sistemi kullanılabilir. Biyolojik dönüşüm sabit bir H_2/CO oranı gerektirmez. Son olarak, biyokatalizör genellikle havaya maruz kaldığında ölür, süreç kokusuzdur, herhangi bir sağlık tehlikesi oluşturmaz ve daha az çevre kirliliği oluşturur. Reaksiyon prosesi, gaz halindeki substratların ortama kütle transferinin yanı sıra oldukça steril anaerobik koşulların muhafaza edilmesi ihtiyacı ile sınırlıdır. Biyodönüşüm sürecinin verimliliğini artırmak için sürekli bir besin kaynağına ihtiyaç vardır. Petrol rafinasyonu, çelik öğütme, kok, amonyak ve metanol üretme gibi belirli endüstriyel işlemler, doğrudan veya yakma yoluyla atmosfere başlıca CO ve H_2 içeren çok büyük miktarlarda atık gaz salımı gerçekleştirir. Biyokatalizörler, sentez gaz fermantasyonu ile bu atık gazları kimyasallara ve örneğin etanol gibi yakıtlara dönüştürmek için kullanılabilir (Gaddy et al., 2000).

Gazifikasyon ve piroliz işlemleri sonucu açığa çıkan gazlar katalitik gaz dönüşümü ile yakıt ve türevli kimyasallara dönüştürülebilir.

Katalitik gaz dönüşüm proseslerinin dezavantajları:

- 1) H_2S ve karbonil sülfid gibi bileşiklerin uzaklaştırılması gerekir ki bu maliyetli bir işlemdir.
- 2) Sentez gaz kompozisyonu değişkenlik gösterir ve sistem bu durumdan etkilenebilir.
- 3) Uygulanan yüksek sıcaklık ve basınç enerji açısından olumsuz koşullardır.

Uygulama açısından sentez gaz fermantasyonu katalitik gaz dönüşüm proseslerine göre daha sürdürülebilir ve ekonomik bir yöntemdir.

Sentez gaz fermantasyonunun avantajları:

- 1) Mikroorganizmalar H_2S gibi kontamine edici gazları tolere edebilir.

- 2) Biyoreaktöre verilecek gaz kompozisyonunun değişkenlik gösteriyor olması önemli değildir.
- 3) Fermantasyon uygun sıcaklık ve basınç değerlerinde gerçekleşir.
- 4) Fermantasyonun son ürünleri toksik olmayan ürünlerdir (Abubackar et al., 2012).

2.4 CO, CO₂, CH₄ ve Diğer C1 Gazlarının Değerli Son Ürönlere Dönüşümü

Gaz substratların farklı son ürönlere dönüşümü 1900’lü yıllara dayanmaktadır (Geinitz et al., 2020). Farklı oranlarda CO, H₂ ve CO₂ içeren ve ayrıca azot ve CH₄ gibi diğer gazların yanı sıra az miktarda nitrojen ve kükört bileşikleri ve hafif hidrokarbonlar da içerebilen bir gaz karışımı sentez gaz olarak adlandırılır. Bunlar ağırlıklı olarak kömür, doğal gaz, petrol artıkları ve biyokütle (gıda dışı lignoselülozik malzemeler, algler, 2’nci nesil etanol üretiminden elde edilen kalıntılar, evsel katı atık vb.) gibi fosil kaynaklarından termokimyasal işlemlerle üretilir (Mondal et al., 2011). Kömürle çalışan tesislerden, imento endüstrisinden vb. çıkan atık gazlar, sentez gaz ile ürün üretimi için gelecek vaat eden bir başka hammaddedir. Bu gaz karışımları temelde CO₂ ve CO’dan oluşur ve termal, fotokimyasal, biyokimyasal ve elektrokimyasal işlemlerle katma değerli kimyasallar elde etmek için doğrudan bir karbon kaynağı olarak kullanılabilir (Yaashikaa et al., 2019). Buna karşılık, elik endüstrisinden çıkan çıkış gazı, doğrudan sentez gaz olarak kullanılabilen önemli miktarda CO ve H₂ içerir. Kömür ve petrol gazlaştırma, doğal gazın buhar dönüştürme işlemi yoluyla sentez gazına dönüştürüldüğü sistemler sentez gaz üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında gazlaştırma, ticari bazda en eski teknolojilerden biridir ve sentez gaz talebinin çoğu kömür gazlaştırma ile karşılanmaktadır (Acharya et al., 2015). Bununla birlikte, hammadde olarak kömürün kullanılmasının, yüksek kül içeriğı ile ilgili birçok dezavantajı vardır ve bu da katı atık oluşumuna neden olur (Frazão et al., 2020). Kömüre kıyasla, petrol kalıntıları yüksek karbon içeriğine sahiptir, ancak gazlaştırma reaktivitesi daha düşüktür, bu da sentez gaz elde etmek için yüksek gazlaştırma sıcaklıkları gerektirir. Ayrıca, petrol kalıntılarından üretilen sentez gaz, temizleme işlemi sırasında çıkarılması giderilmesi gereken önemli miktarda kükört bileşiğı içerir. Kömür ve petrol kalıntılarına yenilenebilir bir alternatif olarak biyokütle, gazlaştırma işlemi yoluyla sentez gaza da dönüştürülebilir. Son yıllarda, biyokütle gazlaştırma süreçlerini endüstriyel ölçekte geliştirmek ve uygulamak için birçok girişim olmuştur (Molino et al., 2016). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, biyokütle pirolizinin bir ürünü olan biyokömürün

heterojenlik, yüksek nem içeriği, düşük sabit karbon içeriği ve düşük enerji yoğunluğu gibi biyokütlenin istenmeyen özelliklerinden kaynaklanan işletme zorluklarını azaltabileceğini göstermiştir (Yip et al., 2010). Ayrıca biyokütle yerine biyokömür kullanımı, ekipmanda tıkanmaları, kirlenmeyi ve düşük dönüşüm verimliliğine neden olan katran oluşumunu azaltabilir. Sentez gaz bileşimi ve gazlaştırma verimliliği, hammadde türüne, gazlaştırma maddesine, gazlaştırıcı tasarımına ve sıcaklık, katalizör gibi işlem koşullarına bağlı olarak değişir.

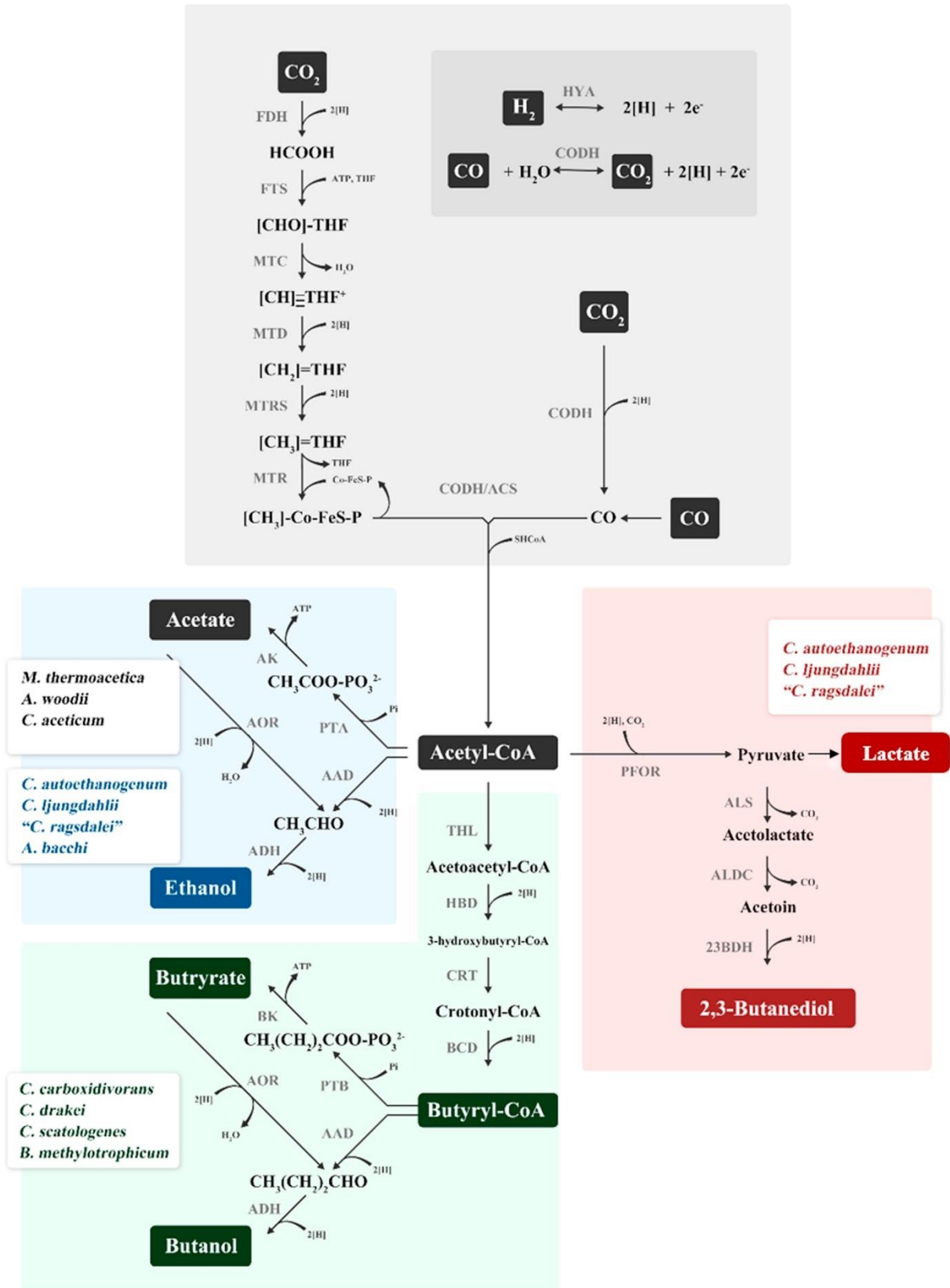
Sentez gazın, etanol (Arslan et al., 2019), bütanol (Chakraborty et al., 2019), hekzanol (Sun et al., 2019) ve değerli asitlere dönüşümü; asetik asit ve bütirat gibi, asetojenik karboksidotrofların kullanıldığı biyoproses teknolojisi ile sentez gaz fermantasyonu olarak adlandırılır. *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei* ve *Clostridium autoethanogenum* gibi asetojenik bakteriler, Wood-Ljungdahl yolunu kullanarak sentez gazı etanol ve asetik aside dönüştürebilir. Sentez gaz fermantasyonu, düşük işletme maliyeti, biyokatalizörlerin sentez gaz safsızlıklarına kimyasal katalizörlere göre daha az duyarlı olması, yüksek seçicilik ve spesifik katma değerli kimyasalların üretilmesi gibi avantajları nedeniyle dikkat çekmektedir (Abubackar et al., 2016). Bununla birlikte, gaz substratların kütle transfer sınırlamaları ve yüksek üretim maliyetleri gibi dezavantajlar vardır. Ayrıca sentez gaz, 2,3-butandiol ve poli-3-hidroksibitoyrat gibi değerli ürünlere dönüştürülebilir. Asetojen ve metabolitlerinin büyümesini etkileyen en kritik parametre, fermantasyon ortamının pH'ıdır. Asetojenlerin asetojenik faz ve solventojenik faz olmak üzere iki metabolik fazı vardır. Asetojenik faz sırasında (optimal büyüme pH'ında), büyüme ve asetik asit üretimi eşzamanlı olarak gerçekleşir ve üretilen asitlerin karşılık gelen alkollere dönüşümü, solventojenik faz sırasında (optimal büyüme pH'ından daha düşük pH'ta) gerçekleşir. Bu nedenle, fermantasyon pH'ını uygun şekilde ayarlayarak, sentez gaz fermantasyonundan elde edilen ürün spektrumu, istenen ürünü elde etmek için önemli ölçüde daraltılabilir (Sun et al., 2019).

Proses verimini artırmak için bir diğer önemli yaklaşım, ortam optimizasyonu ve katkı maddeleri kullanmaktır. Fermantasyon ortamındaki vitaminler, mineraller ve iz elementler gibi besinlerin hücre büyümesini ve fermantasyon verimliliğini artırdığı, ancak üretim maliyetinde artışa neden olduğu raporlanmıştır. Ayrıca, fermantasyon ortamına farklı tipte nanopartiküllerin dahil edilmesi, silika nanopartiküller ile gaz-sıvı kütle transferinin sınırlamasını azaltmak için test edilmiştir (Thi et al., 2020; Keskin-Gundogdu et al., 2019; Sun et al., 2019; Kim et al., 2014; Gao et al., 2013; Maddipati et al., 2011).

Sentez gaz fermantasyon işlem veriminin iyileştirilmesi için en önemli parametrelerden biri de verimli bir biyoreaktör konfigürasyonu kullanılmasıdır. Laboratuvar ölçekli ve endüstriyel ölçekli uygulamalar için en çok kullanılan biyoreaktör tipi CSTR ve kesikli biyoreaktörlerdir. CSTR sistemlerinin kütle transferi sınırlamaları, farklı pervane türleri kullanılarak veya farklı gaz dağıtım sistemleri kullanılarak iyileştirilmiştir. Sentez gaz bileşenlerinden biri olan CO'nun azaltılması için bir başka umut verici yol, su gazı kayma reaksiyonudur. Karboksidotrofik hidrojenojenik mikroorganizmalar, karbon monoksit dehidrojenaz ve hidrojenaz kullanarak elektron ve karbon kaynağı olarak CO'yu moleküler hidrojene (H₂) dönüştürebilir. Bu reaksiyona su katılması 1 mol CO₂ ve 1 mol H₂ ile sonuçlanır. Üretilen bu H₂, biyoelektrokimyasal süreçler yoluyla kimyasallar ve yakıt üretimi için bir elektron kaynağı olarak kullanılabilir.

2.5 Sentez Gaz Fermantasyonunda Mikrobiyoloji ve Biyokimya

CO'yu kullanabilen bakteriler ilk defa 1903 yılında bulunmuştur. Ancak ilk yıllarda bu mikroorganizmaların metabolit üretme yetenekleri bilinmemektedir. Daha sonraki yıllarda *Oligotropha carboxydevorans*, *De sulfuvibrio vulgaris* gibi CO çeviren sülfat indirgeyiciler, *Rhodospirillum rubrum* gibi H₂ üretebilenler ve *Methanosarcina bacherii* gibi metan üreten bakterilerin CO kullanabilme yetenekleri keşfedilmiştir.

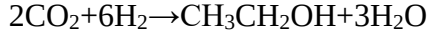


Şekil 2.2. Asetojenlerin Wood Ljungdahl yolu ve metabolik son ürünleri (Chen et al., 2016)

Tablo 2. 1. Sentez gazdan biyoetanol üretiminde kullanılan mikroorganizmalar (Dürre and Eikmanns 2015)

Tür	Son Ürün	İkilenme süresi (saat)	Kaynak
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	Asetik asit + Etanol	3.8	(Tanner et al., 1993)
<i>Clostridium ragsdaleii</i>	Asetik asit + Etanol	4	(Huhnke, et al., 2008)
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	Asetik asit + Etanol	4	(Abrini, et al., 1994)

Tablo 2.1.'de CO'yu karbon kaynağı olarak kullanarak etanol üretebilen bakteriler görülmektedir. Fermantasyon süresi açısından bakterilerin ikilenme süreleri çok önemli olduğundan bakterilerin ikilenme sürelerinin daha düşük olduğu bakterilerle yapılan çalışmalar literatürde yoğun olarak bulunmaktadır. En çok kullanılan suş *Clostridium ljungdahlii*'dir. *Clostridium ljungdahlii* gram pozitif, hareketli, rod yapılı ve sporlanabilen bir bakteridir. *Clostridium ljungdahlii* tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlar aşağıdaki gibidir:



Reaksiyonlarda görülen son ürünler esas olarak etanol ve asetik asittir. Prosesin etanol veya asetik asit üretimine yönelmesinde görev alan enzimler proses verimi için önem arz etmektedir. Bu enzimlerin aktif bölgesinde bulunan enzim ko-faktörlerinin içeriğindeki elementler ise yine proses verimlerini etkileyen parametrelerdir. En önemli ortam bileşeni maya ekstraktıdır (Fernández-Naveira et al., 2016). Metabolik yol izine göre ATP dengesi çok önemlidir. Asetik asit üretimi sırasında açığa ATP çıkarken etanol üretimi sırasında ATP harcanır. Biyokütlenin ise büyümek için ATP'ye ihtiyacı vardır. Bu nedenle asetik asit üretimi ve etanol üretimi arasında çok iyi bir denge kurularak mikroorganizma dengesinin kurulmasıyla proses verimleri

artırılmalıdır. Mikroorganizmaların büyüme ve ürün üretmek için enerji spesifik nütrientlere veya iz elementlere ihtiyacı bulunmaktadır. Se, Fe, Ni, Zn, Cu, W, Mo ve Mn CO fiksasyonunda ve etanol/asetik asit sentezinde önemli metaloenzim parçalarıdır. Bu elementlerin konsantrasyonları ekonomik şartlarda yüksek üretim verimleri eldesi için optimize edilmelidir (Van Groenestijn et al., 2013). Yüksek etanol üretim verimlerine yüksek mikroorganizma konsantrasyonu ile ulaşılacağı düşünüldüğünde biyoreaktör konfigürasyonu ve immobilizasyon çok önemli rol oynamaktadır.

2.6 Sentez Gazın Etanole Biyolojik Dönüşümünü Etkileyen Parametreler

Bir yakıt ürünü olarak biyoetanol üretiminde CO içeren sentez gazlarının veya atık gazların biyodönüşümü sırasında koşulların optimize edilmesi önemlidir. Bu çalışma koşulları; pH, sıcaklık, gaz bileşimi, ortam kompozisyonu, kütle transferi ve substrat basıncı olarak sıralanabilir.

2.6.1 pH etkisi

Diğer biyokimyasal işlemlerde olduğu gibi, fermantasyon ortam pH'ının, substratın, yani CO içeren sentez gazı veya atık gazın metabolizmasının düzenlenmesinde güçlü bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. pH, sentez gazının fermantasyonunu etkileyen en önemli faktörlerden biridir. pH ile ürün bileşimi arasında önemli bir ilişki vardır. Sentez gazı fermantasyon çalışmalarının çoğunda gözlemlenen genel bir eğilim, fermantasyon pH'ı düşerken ürün spektrumunda asidojenikten solventojenik faza kaymadır. Her organizma sınırlı bir pH aralığında metabolik olarak aktif olduğundan, pH'ın düşürülmesi hücre büyümesi üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmaktadır. Bu, sentez gazının yakıt etanolüne optimal dönüşümündeki en büyük engellerden biridir. Çünkü etanol üretmek için pH'ı düşürmek, işlemin genel üretkenliğini de azaltacaktır. Çoğu çalışmada, pH'ın düşürülmesinin, substrattan hücre kütlesine doğru elektron ve karbon akışında bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda asit üretiminde azalma gözlenmiştir (Phillips et. al., 1993; Grethlein et.al., 1990; Worden et.al., 1989).

Asetojenik bakteriler, düşük pH seviyelerinde etanol üretim seviyesinin yüksek olduğu sentez gaz fermantasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Asetik asit üretimi için optimum pH değeri 5-7 iken, etanol için 4-4.5'tir (Minhaj et. al., 2020).

Clostridium ljungdahlii ile yapılan bir çalışmada, kültür ortamının pH'ını 6.8'den 5.5'e düşürerek etanol üretiminde tahmin edilen bir artış sağlanmıştır (Cotter et. al., 2009).

2.6.2 Sıcaklık etkisi

Üretim verimini etkileyen temel faktörlerden birisidir. Spesifik mikroorganizma türü, spesifik sıcaklıkta hayatta kalır. Mezofilik mikroorganizmalar için 37°C-40°C aralığında optimum sıcaklık gereklidir. Termofilik bakteriler için ise bu değer 55°C- 80°C'dir (Acharya et. al., 2014).

Kundiyana et. al., (2011b), *Clostridium ragsdalei* suşu ile gerçekleştirdikleri çalışmada 32 °C'lik bir inkübasyon sıcaklığının, 37°C ve 42°C sıcaklıklara kıyasla daha yüksek bir asetik asit konsantrasyonu sunmuştur. Yine Kundiyana et. al., (2011b)'in gerçekleştirdikleri çalışmada, 42°C'de inkübe edilen suşlar minimal büyüme göstermişlerdir veya hiç büyüme göstermemişlerdir. 32°C'deki fermentasyonlar, 37°C'deki fermentasyonlardan daha yüksek hücre kütlesi konsantrasyonuna sahip olmuştur. Bunun nedeninin, yüksek sıcaklıkların aksine 32°C'de CO ve H₂'nin fermentasyon ortamındaki artan çözünürlüğü olabileceği ifade edilmiştir. 42°C'de gerçekleştirilen çalışmada etanol üretiminin olmadığı gözlenmiştir. 37°C'nin üzerindeki sıcaklıklar, *Clostridium ragsdalei*'nin hücre büyümesini ve performansını büyük ölçüde azaltmış ve bu da önemli ölçüde düşük etanol üretimine neden olmuştur.

Tipik olarak, asetojenik bakteriler, 37°C ile 40°C arasında optimal olarak büyüyen mezofilik bakterilerdir (Munasinghe and Khanal, 2010). Ancak Kundiyana et. al., (2011b)'in gerçekleştirdiği çalışmada, *Clostridium ragsdalei*'nin 32°C'de standart inkübasyon sıcaklığı olan 37°C'ye kıyasla daha fazla etanol üretme ve hücre büyüme yeteneği görülmektedir. Henry Yasasına göre, gaz çözünürlüğü sıcaklık azaldıkça artar, bu nedenle 32°C'de fermentasyon ortamındaki CO'nun çözünürlüğünün artması ile genel gaz-sıvı kütle transferi hızları iyileştirilmiş ve fermentasyon işlemi için indirgeyici eşdeğerlerin kullanılabilirliği artmıştır (Kundiyana et. al., 2011b).

Sun et. al., 2019 yılında gerçekleştirdikleri derleme makalede bazı mikroorganizmaların büyüme sıcaklıklarını aşağıdaki tabloda (Tablo 2.2.) görüldüğü şekilde bildirmişlerdir.

Tablo 2. 2. Sentez gazını fermente eden mikroorganizmaların büyüme sıcaklıkları (Sun et. al.,2019)

Mikroorganizma	Büyüme sıcaklığı (°C)
Saf kültür	
<i>Alkali bacchi</i>	15-40
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	37
<i>Clostridium karboksidivoranlar</i>	24-42
<i>Clostridium ragsdalei</i>	25-40
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	20-44
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	30-40
<i>Clostridium kluyveri</i>	30
<i>Clostridium drakei</i>	18-42
<i>Clostridium skatologenler</i>	18-42
<i>Sporomusa ovata</i>	15-45
<i>Moorella termoasetika</i>	55
<i>Moorella termoototrofika</i>	36-70
<i>Moorella stamsii</i>	50-70
<i>Moorella gliserin</i>	58
<i>Moorella perkloratiredükler</i>	37
<i>Peptostreptokok ürünü</i>	37
Karışık kültür	
<i>Alkalibaculum bacchi</i> ve <i>Clostridium propionicum</i>	37
<i>Clostridium autoethanogenum</i> ve <i>Clostridium kluyveri</i>	37
<i>Clostridium ljungdahlii</i> ve <i>Clostridium kluyveri</i>	35
Genetiği değiştirilmiş kültür	
<i>Acetobacterium woodii</i>	30
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	37
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	37
<i>Clostridium coskatii</i>	37

2.6.3 Gaz bileşiminin etkisi

Biyokütlenin gazlaştırılması ile ağırlık olarak CO, CO₂, CH₄, H₂, N₂ ve az miktarda NO_x, H₂S, C₂H₂, C₂H gibi hafif hidrokarbonlar ve kül, kömür, katran elde edilir. Ototrofik mikroorganizmalar CO, CO₂ ve H₂'den oluşan sentez gazı ortamında iyi büyüyebilirler. Bununla birlikte, gaz fermentasyonu sırasında, asetilen veya NO gibi eser miktarlarda ek bileşenlerin varlığında karbon dönüşümünün verimliliğini korumada bazen sorunlarla karşılaşabilir (Datar et. al., 2004; Ahmer et. al., 2007). Asetilen ve NO'nun, hidrojenaz enzim aktivitesinin güçlü inhibitörleri olduğu bilinmektedir (Krasna et. al., 1954; Maness et. al., 2001). Hidrojenaz aktivitesi, CO dönüştürme işlemi için elektronlar elde etmek üzere hidrojen ile reaksiyon için gerekli olduğundan, hidrojenaz enziminin inhibisyonu, hücreyi CODH enzimlerini kullanarak CO'dan elektron almaya zorlamakta ve böylece, etanol üretimi için mevcut karbon büyük ölçüde azaltılmaktadır. Bu nedenle, işlem sırasında karbon dönüşüm verimliliğinde bir düşüş görüldüğü raporlanmaktadır. *Rhodospirillum rubrum* kullanan bir çalışmada, CO bağlı hidrojenaz enzimlerinin %10 (h/h) C₂H₂ varlığında %50'lik bir inhibisyon gösterdiği bulunmuştur (Maness et. al., 2001).

2.6.4 Ortam kompozisyonunun etkisi

Sentez gazı fermentasyonu sırasında, mikroorganizmalar sentez gazı bileşenlerini karbon ve enerji kaynakları olarak tüketir; bununla birlikte, yüksek metabolik aktiviteyi sürdürmek için çeşitli mineral besinlere de ihtiyaç duyarlar. Vitaminler gibi özel bileşiklere de ihtiyaç duyulabilirler. Daha önceki çalışmalar, maya ekstraktının ortadan kaldırılmasıyla birlikte B vitaminleri konsantrasyonundaki azalmanın etanol/asetik asit oranında bir artışı desteklediğini göstermektedir (Phillips et. al., 1993). Maya ekstraktının ortadan kaldırılması, ürün oranında %300'e varan bir iyileşme sağlar. Bununla birlikte, *Clostridium ljungdahlii*'deki yapısal bütünlük için gerekli eser besin maddelerini sağlamak için minimum %0.01 maya özütü konsantrasyonu gereklidir (Barik et. al., 1988). Kültür ortamına indirgeyici ajanların eklenmesiyle daha fazla elektron sağlanması, mikroorganizmaların metabolizmasının solventogeneze doğru kaymasına yardımcı olacaktır (Vega et al., 1989). Bu durum, asetil-CoA'yı etanole dönüştürülmesinde mikroorganizmalar için daha fazla indirgeyici eşdeğerin varlığından dolayı meydana gelmektedir. Klasson et. al., (1991), sodyum tiyoglikolat, askorbik asit, metil viologen ve benzil viologen gibi farklı konsantrasyonlarda indirgeyici maddeler kullanarak *Clostridium ljungdahlii*'de etanol konsantrasyonunun yanı sıra ürün oranını

artırmanın uygulanabilirliğini incelemişlerdir. Yazarlar, büyümenin durmasına rağmen, 30 ppm benzil viologen içeren şişelerde yüksek etanol konsantrasyonunun (3,7 mmol) bulunduğunu tespit etmişlerdir (Klasson et. al., 1991). ATCC ve DSMZ tarafından çeşitli asetojenler için en sık önerilen indirgeyici ajanlar sistein-HCl ve $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ 'dur. Sentez gaz fermantasyonu sırasında iz elementler mikrobiyal büyümeyi arttırmada önemli bir rol oynar.

Fermantasyon koşullarının ve kullanılan ortamın optimize edilmesiyle sentez gaz fermantasyonundan etanol üretimi önemli ölçüde artırılabilir (Han et al., 2020; Richter et. al., 2013). Wood-Ljungdahl yolunda yer alan enzimler için kofaktör görevi gören eser metaller, biyoetanol üretiminde kritik öneme sahiptir. Format dehidrojenaz (FDH), bifonksiyonel karbon monoksit dehidrojenaz/asetil-CoA sentaz (CODH/ACS) ve hidrojenaz (H_2ase) dahil olmak üzere bu yoldaki anahtar enzimler metalloenzimlerdir (Ragsdale et. al., 2008; Appel et. al., 2013). FDH, CO_2 'nin formata indirgenmesini katalize eder. Ek olarak solvent üreten *Clostridia*, asetil-CoA'nın etanole indirgenmesinden sorumlu ana enzim olan demir ve çinko içeren alkol dehidrojenaz (ADH) içerir (Korkhin et. al., 1998). Bu eser elementlerin eksikliği veya fazlalığı, verimsiz etanol sentezine neden olabilir. Ayrıca bu elementlerin aşırı kullanımı üretim maliyetlerinin artmasına neden olacaktır. Metalloenzimler sentez gazı fermantasyonu için kritik olduğundan, büyüme ortamındaki element konsantrasyonlarını optimize etmek çok önemlidir.

Saxena and Tanner (2011), iz elementlerin (Co^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{6+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , SeO_4^{4-} ve WO_4^{4-}) *Clostridium ragsdalei*'nin büyüme ve etanol üretiminin yanı sıra CODH, FDH, H_2ase ve ADH aktiviteleri üzerine etkilerini belirlemek için bir çalışma yürütmüştür. Fermantasyon ortamında iz element konsantrasyonlarının optimize edilmesinin etanol üretim verimini önemli ölçüde artırabileceğini gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde, birçok deneysel sonuç, bu iz elementlerin *Clostridium carboxidivorans* ve *Clostridium autoethanogenum* gibi suşlar üzerinde farklı etkileri olduğunu göstermektedir (Phillips et. al., 2015, Abubackar et. al., 2015). *Clostridium ljungdahlii*, Wood-Ljungdahl yolu çalışmalarında model suş olarak kullanılan bir asetojendir. *Clostridium ljungdahlii*, ilk kez 1993 yılında tavuk atıklarından izole edilen kemolitotrofik, gram pozitif bir anaerobdur (Tanner et. al., 1993). Wood-Ljungdahl yolunu Na^+ 'ya bağımlı olmayan bir Rnf kompleksi olan ferredoksin: NAD^+ oksidoredüktaza bağlayarak enerji tasarrufu sağlar (Schuchmann et. al., 2014). Bu suş, C_1 gaz dönüşümü sırasında etanol, asetik asit ve eser miktarda 2,3-bütandiol ve laktat üretir (Köpke et. al., 2011).

Yukarıda sunulan birçok faktörün etkisini aynı anda değerlendirilmesi ileri istatistiksel deneysel tasarımlarla mümkün olmaktadır.

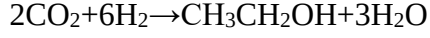
2.6.5 Kütle transferi

Sentez gaz fermantasyonu için kritik bir faktör, gazdan sıvıya kütle aktarım hızını verimli olarak sağlamaktır. Sentez gaz fermantasyonunun ticarileştirilmesi, düşük ürün verimi, yüksek ürün ayırma maliyeti ve gazdan sıvıya düşük kütle aktarım hızları gibi çeşitli zorluklarla karşı karşıyadır. Sentez gaz fermantasyonunda yüksek kütle transfer hızlarına ulaşmak, mikroorganizma için metabolik karbon ve enerji kaynakları olan sentez gaz bileşenlerinin sudaki düşük çözünürlüğü nedeniyle özellikle zordur. Farklı fermentörler arasında kütle aktarım hızının verimliliği, gaz sıvı hacimsel kütle aktarım katsayısının değerlendirilmesiyle karşılaştırılabilir. Bu parametre ayrıca biyoreaktörün hidrodinamik durumu hakkında bilgi verir. Bu nedenle biyoreaktörünün tasarımı sentez gaz fermantasyonu için çok önemlidir (Phillips et. al., 2017).

Karıştırmalı tank veya kabarcık kolon reaktörleri gibi geleneksel fermantasyon sistemlerinde kütle transferi, artan havalandırma oranları ve pervane hızları ile geliştirilebilir; ancak bu işlem genellikle enerji tüketiminde önemli artışlara neden olmaktadır. Kütle transferi iyileştirmeleri, yeni reaktör konfigürasyonlarının geliştirilmesi yoluyla da gerçekleştirilebilir (Orgil et. al., 2013; Devarapalli et. al., 2016).

Fermantasyonun gerçekleşeceği sıvı besi yeri yüksek hücre konsantrasyonu içerdiğinde, çözünürlüğü az olan gaz halindeki substratlardan CO ve H₂'nin kütle aktarımı sınırlı olmaktadır. Bu difüzyon sınırlamaları nedeniyle, mikroorganizmalar için gaz halindeki substratların ortamdaki mevcudiyeti azalmaktadır ve bu da sonunda üretkenliğin azalmasına yol açmaktadır. Sistem, hücre konsantrasyonu veya CO tüketim oranı çok düşük olduğunda meydana gelen, kinetik sınırlı koşullar altında prostesten elde edilen verim de düşmektedir (Vega et. al., 1989).

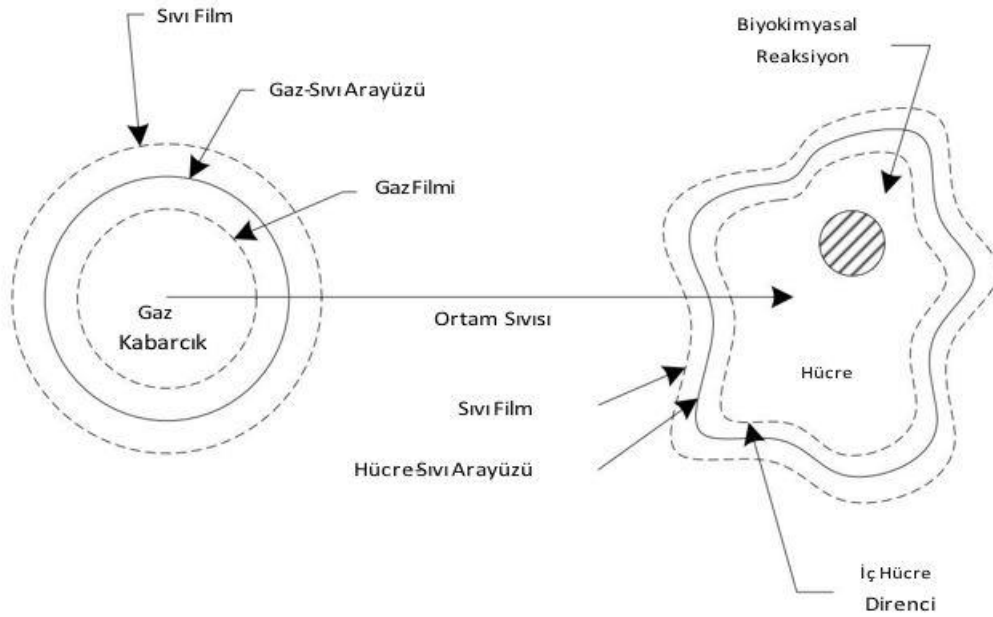
Sentez gaz fermantasyonunun 2.5 numaralı başlıkta da sunulmuş olan aşağıdaki teorik denklemlerinden, 1 mol etanol üretmek için 6 mol CO veya H₂'nin kültür ortamına aktarılması gerektiği açıkça görülmektedir.



Ayrıca, molar bazda, CO ve H₂'nin çözünürlükleri, 35°C'de oksijenin çözünürlüğüne göre sırasıyla yalnızca % 77 ve % 68'dir (Kapic et. al., 2006). Bu nedenle, verimi ve üretkenliği artırmak için tüketilen karbon eşdeğeri başına daha fazla mol sentez gaz aktarılmalıdır.

Şekil 2.3'de gösterildiği gibi, gaz kütle transferine karşı sekiz direnç bulunmaktadır. Bunlar:

1. Gaz kabarcığının içerisindeki gaz filminde,
2. Gaz-sıvı arayüzünde,
3. Gaz-sıvı arayüzündeki sıvı filmde,
4. Ortamdaki sıvı içinde
5. Hücreyi çevreleyen sıvı filmde
6. Sıvı-hücre ara yüzünde,
7. İç direnç,
8. Biyokimyasal reaksiyon bölgesinde



Şekil 2. 3. Gaz-sıvı dispersiyonlarında karşılaşılan kütle transfer dirençleri (Chisti,1989)

Çift Film Teorisinde, ince filmlerin her birindeki sıvı hareketinin durağan olduğu varsayıldığında, filmlerdeki taşınmanın yalnızca moleküler difüzyonla gerçekleştiği söylenebilir. Bu nedenle, sabit durumda, Fick'in Birinci Yasası kullanılarak, molar akının (J_A), ilgili filmdeki molar konsantrasyon gradyanıyla (ΔC) ve film kalınlığıyla (Δx) ilişkilendirilmesine izin veren doğrusal bir konsantrasyon gradyanı mevcuttur:

$$J_A = \frac{D}{\Delta x} \Delta c$$

Burada D , filmdeki moleküler difüzyondur. $D/\Delta x$ oranı, toplam kütle transfer katsayısıdır ve k olarak bilinir.

Yukarıdaki denklem gaz ve sıvı filmler için aşağıdaki gibi yeniden yazılabilir:

$$\begin{aligned} J_A &= k_G (C_G - C_{Gi}) \\ &= k_L (C_{Li} - C_L) \end{aligned}$$

Burada k_G ve k_L sırasıyla gaz ve sıvı film kütle transfer katsayılarıdır ve C_G , C_{Gi} , C_{Li} ve C_L sırasıyla gaz fazı, gaz fazı arayüzü, sıvı faz arayüzü ve sıvı faz konsantrasyonlarındaki molar konsantrasyonlardır. Ortaya çıkan kütle akışı denklemini, toplam konsantrasyon itici kuvveti cinsinden aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

$$J_A = K_L (C^* - C_L)$$

Burada K_L , sıvı filme dayalı toplam kütle transfer katsayısıdır ve C^* , sıvıdaki denge gaz konsantrasyonudur. C^* , Henry yasasını kullanan C_G ile ilgilidir (Incropera et. al., 1996):

$$C_G = H C^*$$

Burada H , Henry sabitidir (Chisti, 1989).

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{2k_L} + \frac{1}{Hk_G}$$

Oksijen, karbon monoksit ve hidrojen gibi az çözünür gazlar için H birden çok büyüktür. Ayrıca, k_G tipik olarak k_L 'den çok daha büyüktür ve gaz film kalınlığı sıvı film kalınlığından çok daha küçüktür. Bu koşullar için, yukarıdaki denklemin sağındaki ikinci terim ihmal edilebilir hale gelir:

$$\frac{1}{k_L} \cong \frac{1}{2k_L}$$

Bu, az çözünür bir gaz için kütle transferine karşı neredeyse tüm direncin, gaz-sıvı ara yüzeyindeki sıvı yan filmde meydana geldiği anlamına gelir. Başka bir deyişle, kütle transferi sıvı film kontrollüdür.

Gaz-sıvı sistemleri için, sıvı filmdeki kütle transferinin sadece difüzyonla olduğu varsayımı her zaman gerçek koşulları temsil etmez. Çünkü türbülanslı girdaplar bu filme nüfuz edebilir. Ek olarak, kütle transferinin zamanla sabit olduğu varsayımı, geçici koşullar içeren gaz-sıvı sistemlerine uygulanamayabilir. Bu nedenle, diğer kütle transfer modelleri, mobil gaz-sıvı arayüzleri için daha uygun olabilir. Bunlar, Higbie tarafından geliştirilen penetrasyon teorisini, Danckwerts'ın yüzey yenileme ve rastgele yüzey yenileme teorilerini, Toore ve Marchello'nun film penetrasyon teorisini ve sınır tabaka teorisini içerir (Chisti, 1989; Thibodeaux, 1996; Sherwood et. al., 1975; Coulson, 2000). Bu modellerin tümü, taşıma akısını bir konsantrasyon farkı ve genel bir kütle transfer katsayısı ile ilişkilendirmek için kullanılabilir. Sıvı tarafı kütle transfer katsayısı, modellerin her biri kullanılarak aşağıdaki gibi hesaplanabilir:

$$k_L = \frac{D_L}{\Delta x}$$

Çift Film Teorisi

$$k_L = \sqrt{\frac{4D_L}{\pi t_e}}$$

Penetrasyon Teorisi

$$k_L = \sqrt{D_L S}$$

Yüzey Yenileme Teorisi

$$k_L = \sqrt{\frac{D_L}{\pi t_e}} \left[1 + 2 \sum_{i=1}^{\infty} e^{-(i^2 L^2)/(D_L t_e)} \right]$$

Film Penetrasyon Teorisi

$$k_L = (D_L + E_D)$$

Sınır Tabaka Teorisi

Biyoreaktörlerde akışkan özellikleri ve çalışma sıcaklığı, bir sıvı (D_L) aracılığı ile gaz yayılımını aşağı yukarı sabitler. Bu nedenle, k 'deki herhangi bir değişiklik, reaktör hidrodinamiğinin parametreleri olan sıvı film kalınlığı (Δx), maruz kalma süresi (t_e), yüzey

yenileme hızı (s) veya girdap yayılımı (E_D) değerlerinin tümünü değiştirir. k_L , yukarıdaki denklemlerden biri kullanılarak doğrudan hesaplanamasa da, genellikle (D_L) m ile orantılıdır. Burada m, verilen fiziksel ve hidrodinamik koşullar için baskın olan kütle aktarım mekanizmasına bağlı olarak 0.5 ile 1 arasında değişebilir (Chisti,1989; Thibodeaux, 1996; Sherwood et. al., 1975; Coulson, 2000).

Kütle aktarım hızı ve molar akı şu şekilde ilişkilidir:

$$\frac{dC_L}{dt} = a_L J_A$$

Burada a_L birim sıvı hacmi başına arayüzey alanıdır. Yukarıdaki denklemlerden yola çıkarak gaz-sıvı kütle aktarım hızı aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a_L (C^* - C_L)$$

Uygulamada, $a_L = a$ ve $k_L a_L$ 'nin ayrı ayrı hesaplanmasındaki karmaşıklık nedeniyle tek bir terim ($k_L a$) belirlenmiştir. Genel hacimsel kütle transfer katsayısı ($k_L a$) tipik olarak, belirli bir biyoreaktör için gaz konsantrasyonuna karşı zaman verileri kullanılarak deneysel olarak belirlenir. Bir gaz sıvı kontaktöründe belirli bir gaz için deneysel bir $k_L a$ değeri belirlendikten sonra, benzer bir sistemdeki başka bir gaz türü için $k_L a$ 'nın belirlenebilmesi için aşağıdaki denklem kullanılır (Chisti,1989; Thibodeaux, 1996):

$$(k_L a)_B = (k_L a)_A \left(\frac{D_{LA}}{D_{LB}} \right)^n$$

Burada n, kullanılan kütle transferi teorisine bağlı olarak 0.5 ile 1 arasında değişmektedir. Tipik olarak, çift film teorisi için $n = 1$, penetrasyon, yüzey yenileme, film penetrasyon teorileri için $n = 0.5$ ve sınır tabaka teorisi için $n = 0.67$ olarak alınabilir (Chisti,1989).

Gaz-sıvı kütle transfer oranlarını arttırmak için yüzey aktif maddeler, alkol, tuzlar, katalizör ve küçük partiküller gibi çeşitli katkı maddeleri kullanılabilir.

Hickey, (2009), fermentasyon ortamındaki hacimce %1'lik etanol konsantrasyonunun, temiz suya kıyasla kütle transfer hızını 3 kata kadar arttırdığını ifade etmiştir. Bunun nedeni, yüzey geriliminde değişikliğin meydana gelmesi, küçük gaz kabarcıklarının oluşması ve buna bağlı olarak kütle transferi için daha efektif yüzey alanının oluşmasıdır (Hickey, 2009).

Zhu et. al., (2008) yaptıkları bir çalışmada, kütle transferini arttırmak için yeni bir yaklaşım olarak nanopartiküllerin kullanımı üzerinde durulmuştur. Nanopartiküller üzerindeki yüzey hidroksil ve fonksiyonel grupların CO transfer katsayısını arttırmada 1.9 katlık etkisi olduğu belirtilmiştir (Zhu et. al., 2008).

2.6.6 Substrat olarak gaz kısmi basıncının etkisi

Sentez gaz veya atık gazlardaki çeşitli bileşenlerin kısmi basıncı, mikroorganizmaların metabolizmasında çok önemli bir rol oynar. Hem CO hem de CO₂'nin kısmi basınçları, mikrobiyal büyümeyi ve ürün dağılımını önemli ölçüde etkiler. CO bir karbon kaynağı olarak kullanılır ve bazen H₂ yokluğunda karbon monoksit dehidrojenaz yoluyla indirgeyici eşdeğerler üretmek için oksitlenir. Ayrıca, CO sentez gazı veya atık gaz bileşenleri arasında genellikle en az çözünür gaz olduğundan, bu gazdan kaynaklanan kütle transfer sınırlamasının üstesinden gelmek için daha fazla dikkat gösterilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, gaz-sıvı kütle transfer sınırlamalarını azaltmanın bir yolu, gaz halindeki substratların başlangıç basıncını arttırmaktır. CODH tarafından CO'dan net elektron üretimi, CO'nun kısmi basıncındaki artışla artar ve CO₂'nin kısmi basıncındaki artışla azalır. *Clostridium carboxidivorans* P7 ile yapılan bir çalışmada, CO'nun kısmi basıncındaki artışla maksimum hücre konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir (Hurst et. al., 2010). CO'nun kısmi basıncında (1.35 ve 2 atm) yapılan deneylerin sonraki aşamalarında, etanol konsantrasyonundaki artışla birlikte asetik asit konsantrasyonunda bir azalma da rapor edilmiştir. Bunun nedeni, asetik asidin etanole dönüştürülmesi için yüksek CO'nun kısmi basıncında üretilen fazla elektronların kullanılmasıdır. Bu çalışmada CO'nun kısmi basıncında 0.35'ten 2.0 atm'ye bir artış ile hücre konsantrasyonunda 4 katlık bir artışın olduğu rapor edilmiştir. Ancak bazı mikroorganizmaların yüksek CO'nun kısmi basıncına karşı daha az dirençli oldukları rapor edilmiştir (Vega et. al., 1988). *Clostridium ljungdahlii* kullanılarak yapılan toplu deneylerde, sentez gazın başlangıç basıncının arttırılmasının gecikme fazı süresinin uzamasına neden

olacağı ve yüksek etanol verirken substrat kullanımını önemli ölçüde iyileştireceği ifade edilmiştir (Najafpour et. al., 2006; Vega et. al., 1989).

2.7 Sentez Gaz Fermantasyonunda Kullanılan Biyoreaktör Konfigürasyonları

Sentez gaz fermantasyonu ile biyoetanol üretiminde en önemli faktörlerden biri kütle aktarım sınırlamalarını azaltacak veya ortadan kaldıracak bir biyoreaktör konfigürasyonu kullanılmasıdır. Biyoreaktörlerde gereken yüksek biyokütle konsantrasyonu sağlanırken bir yandan da kütle aktarım performansının gaz-sıvı difüzyon katsayılarının maksimumunda tutulması yüksek verimlerin elde edilebilmesi açısından çok önemlidir. Sentez gaz içerisinde bulunan H_2 ve CO 'nun metabolik yol izine katılmasındaki güçlük sudaki çözünürlüklerinin düşük olmasından dolayı önemli bir sorundur (Riggs and Heindel 2006). Yüksek sentez gaz dönüşümleri için iyi bir biyoreaktör gaz sıvı reaksiyonlarının gerçekleşmesi için yüksek bir yüzey alanına ihtiyaç duymaktadır. Askıda büyüme sistemli biyoreaktörlerde kabarcık çapı en önemli parametrelerden biridir. Spesifik kütle aktarım katsayıları kabarcık çapı ile ters orantılıdır. Bu nedenle kabarcık çapını küçülten besleme stratejileri küçük kabarcıkların yavaş hareket etmesi, transfer yüzey alanının artması ve kütle transferini hızlandırması açısından önem kazanmıştır. Literatürde sentez gazdan etanol üretiminde en çok kullanılan biyoreaktör tipleri tam karışım tank biyoreaktörler, membran biyoreaktörler ve kabarcık kolon biyoreaktörlerdir. Mikroorganizmaların immobilize edildiği sistemler son yıllarda önem kazanmaya başlamış konfigürasyonlardır (Bredwell and Worden 1998). Stokiyometrik olarak saf CO fermantasyonu/etanol oranı 6:1 dir. Tam karıştırmalı tank biyoreaktörü (CSTR), kabarcık kolon biyoreaktörü, hava kaldırmalı biyoreaktör, damlatmalı filtre biyoreaktörleri CO 'dan etanol üretiminde sentez gaz fermantasyonu için yaygın olarak kullanılmış olan konfigürasyonlardır. CO transfer katsayıları dizayn ve ölçeğe çok bağımlı proses parametresi olduğundan enerji verimli bir üretim için uygun biyoreaktör konfigürasyonu ve başarılı reaksiyon parametrelerinin belirlenmesi çok önemlidir.

Mikroorganizmaların büyümesi için dikkate alınması gereken en kritik kararlardan biri, kullanılacak biyoreaktörün konfigürasyonunun yanı sıra işlemin çalışma modudur (sürekli, kesikli, yarı sürekli). Endüstriyel ölçekte birkaç faktör biyoreaktörün nihai seçimini ve çalışma modunu etkiler. Bunlar, ikincil ürünler, genetik kararsızlık, mikroorganizmaların inhibisyonu ile sonuçlanan ürünün toksisitesi vb.'dir (Williams 2022; Stanbury et. al., 2017).

Tablo 2. 3. Farklı tipte sentez gazı fermantasyon biyoreaktörleri (Acharya et. al.,2014)

Biyoreaktör Tipi	Açıklama
Sürekli Karıştırmalı Tank Biyoreaktörü (CSTR)	En çok kullanılan biyoreaktör tipidir. Gaz halindeki substratın sürekli enjeksiyonu sağlanabilir. Substrat ve mikroorganizmalar arasındaki kütle transferi karıştırıcı çarklar tarafından düzgün şekilde karıştırılarak gerçekleştirilir. Pervanelerin dönüş hızlarını artırarak kabarcıkları daha küçük boyutlara getirilebilir ve mikroorganizmaların daha kolay gaz besinleri kullanması sağlanabilir. Daha küçük kabarcıkların hızlarının yavaşlaması sulu ortamda daha uzun süre tutulmasını sağlar ve daha yüksek kütle transfer oranları elde edilir.
Kabarcık Kolon Biyoreaktörü (BCR)	Büyük çalışma hacmine sahip endüstriyel kullanımlar için uygundur. Daha büyük kütle transfer oranları elde edilebilir. Daha düşük işletme ve bakım maliyeti bulunmaktadır.
Monolitik Biyofilm Biyoreaktörleri (MBR)	Gaz halindeki substrat, bir taşıyıcı ortam yatağından geçer. Mikroorganizma kültürü biyofilm olarak ortamda bulunmaktadır. Bir biyofilm içinde bağlı mikroorganizmalar tarafından gaz halindeki substrat kullanılarak etanol, asetik asit vb. üretilir. Atmosferik basınç altında çalışır ve ekonomiktir.
Damlama Yataklı Biyoreaktör (TBR)	Sıvı kültürler destek materyal üzerinden aşağı akar. Gaz beslemesi eş-akım veya çapraz-akım yönünde gerçekleşebilir. Mekanik karıştırmaya gerek yoktur. Güç tüketimi CSTR'den daha azdır.
Membran Tabanlı Sistem Biyoreaktörü (MSR)	Kompozit içi boş fiber membran (HFM) ile kütle transferi gerçekleştirilir. Henüz sentez gazı fermantasyonunda ticari olarak kullanılmamaktadır. Membran duvarı yüzeyinde mikroorganizmaların büyümesiyle CO ve H₂'den etanol ve asetik asit üretilebilir. Daha yüksek verim, daha yüksek reaksiyon hızı, toksik elementlere karşı daha yüksek tolerans göstermektedir.

Tablo 2. 4. Sentez gaz fermantasyonunda kullanılan bazı biyoreaktör tipleri ve performansları

Biyoreaktör tipi	Sentez gaz içeriği	Mikroorganizma	Ürün	Kaynaklar
CSTR	%55 CO %20 H ₂ %10 CO ₂ %15 Ar	<i>Clostridium</i> <i>ljungdahlii</i>	Etanol: 6.5 g L ⁻¹ Asetat: 5.43 g L ⁻¹	(Mohammadi et. al.,2012)
CSTR	%55 CO %20 H ₂ %10 CO ₂ %15 Ar	<i>Clostridium</i> <i>ljungdahlii</i>	Etanol: 0.55 g L ⁻¹ Asetat: 1.3 g L ⁻¹	(Younesi et. al.,2005)
CSTR	%38 CO %28.5 H ₂ %28.5 CO ₂ %5 N ₂	<i>Alkalibaculum</i> <i>bacchi</i> ve <i>Clostridium</i> <i>propionicum</i>	Butanol: 0.4 g L ⁻¹ Propanol: 1.6 g L ⁻¹ Etanol: 1.13 g L ⁻¹	(Liu et. al.,2014a)
CSTR	%28 CO %60 H ₂ %12 N ₂	<i>Alkalibaculum</i> <i>bacchi</i> ve <i>Clostridium</i> <i>propionicum</i>	Butanol: 1.1 g L ⁻¹ Propanol: 6.0 g L ⁻¹ Etanol: 8.0 g L ⁻¹ Asetat 1.1 g L ⁻¹	(Liu et. al.,2014b)
CSTR	%20 CO %15 CO ₂ %5 H ₂ %60 N ₂	<i>Clostridium</i> <i>ragsdalei</i>	Etanol: 9.6 g L ⁻¹ Asetat: 3.4 g L ⁻¹	(Maddipati et. al., 2011)
CSTR	%100 CO	<i>Clostridium</i> <i>autoethanogenum</i>	Etanol: 0.9 g L ⁻¹ Asetat: 0.9 g L ⁻¹	(Abubackar et. al., 2015)
İki aşamalı sistem (CSTR+CSTR)	%30 CO ₂ %40 CO %30 H ₂	<i>Clostridium</i> <i>ragsdalei</i>	Etanol: 2.01 g L ⁻¹ Asetat: 1.95 g L ⁻¹	(Kundiyana et. al., 2011)

İki aşamalı sistem (CSTR+kabarcık kolon reaktörü)	%60 CO %35 H ₂ , %5 CO ₂	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	Etanol: 9.7 g L ⁻¹ Asetat: 8.6 g L ⁻¹	(Richter et. al., 2013)
Kabarcık kolon reaktörü	%60 CO %35 H ₂ , %5 CO ₂	<i>Clostridium ljungdahlii</i>	Etanol: 1.6 g L ⁻¹ Asetat: 0.4 g L ⁻¹ Butanol: 0.6 g L ⁻¹	(Rajagopalan et. al., 2002)
Atomize gaz sıvı reaktörü	%12.5 H ₂ %37.5 CO ₂ %50 CO	<i>Clostridium carboxidivorans P7</i>	Etanol: 3 g L ⁻¹ Butanol: 0.5 g L ⁻¹ Asetat: 2 g L ⁻¹ Bütirat: 0.1 g L ⁻¹	(Sathish et. al., 2019)
Dolgulu biyofilm reaktör	%20 CO %5 H ₂ %15 CO ₂ %60 N	<i>Clostridium carboxidivorans P7</i>	Etanol: 7.7 g L ⁻¹	(Shen et. al.,2017)
Damlatmalı filtre reaktörü (TBR)	%38 CO %5 N ₂ %28.5 CO ₂ %29 H ₂	<i>Clostridium ragsdalei</i>	Etanol: 4-12 g L ⁻¹ Asetat: 3-6 g L ⁻¹	(Devarapalli et. al., 2017)
Kesikli (Serum Şişesi)	%25 CO %43.9 H ₂ %10.02 CO ₂ %10.05 N ₂ %11.01 CH ₄	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	Etanol: 2.28 g L ⁻¹ Butanol: 0.74 g L ⁻¹	(Benevenuti et. al., 2020)
Sürekli ve kesikli (Serum Şişesi)	%16.5 CO %15.5 CO ₂ %5 H ₂ %56 N ₂ %4.5 CH ₄	<i>Clostridium carboxidivorans P7</i>	Etanol: 0.2-4 g L ⁻¹	(Ahmed et. al., 2006)

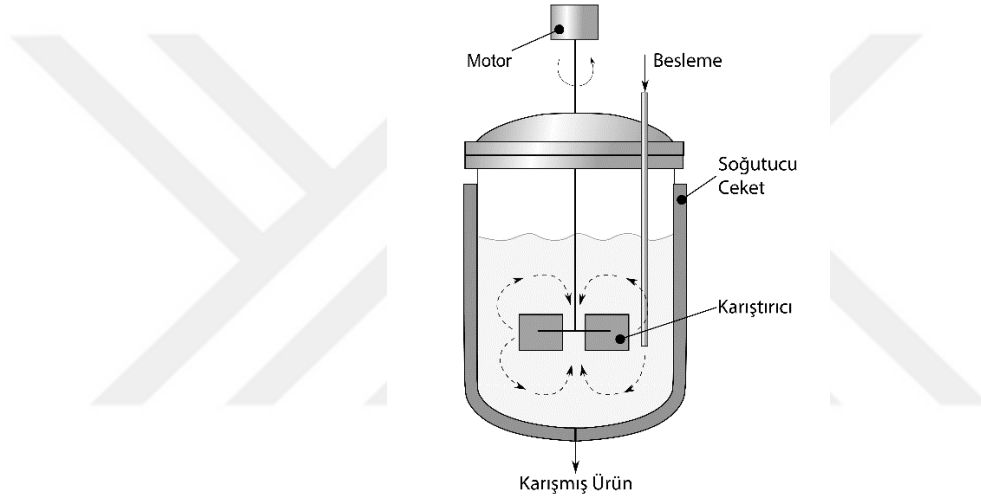
Hollow fiber membran biyofilm reaktörü HFMBR)	%40 CO %60 H ₂	<i>Karışık kültür</i>	Asetat: 4.22 g L ⁻¹ Bütirat: 1.35 g L ⁻¹ Kaproat: 0.88 g L ⁻¹	(Shen et.al., 2018)
Hollow fiber membran biyofilm reaktörü HFMBR)	%50 CO %30 H ₂ %20 CO ₂	<i>Clostridium ljudahlii</i>	Etanol: 2.01 g L ⁻¹ Asetat: 1.95 g L ⁻¹	(Lee.,2010)
Monolitik biyofilm reaktörü	%20 CO %5 H ₂ %5 CO ₂ %60 N ₂	<i>Clostridium carboxidivorans P7</i>	Etanol: 4.9 g L ⁻¹ Asetat: 3.1 g L ⁻¹	(Shen et. al., 2014a)
Kabarcık kolon reaktörü	%20 CO %5 H ₂ %5 CO ₂ % 60 N ₂	<i>Clostridium carboxidivorans P7</i>	Etanol: 3.2 g L ⁻¹ Asetat: 2.35 g L ⁻¹	(Shen et. al., 2014a)
Sürekli beslemeli kabarcık kolon reaktör	%50 CH ₄ %50 O ₂	<i>Methylosinus trichosporium</i>	Metanol: 0.95 g L ⁻¹	(Duan et. al., 2006)

Sürekli Karıştırılmalı Tank Biyoreaktörler

Sürekli karıştırılmalı tank biyoreaktörlerinin temel prensibi, biyoreaktör içerisinde homojen konsantrasyon ve sıcaklık koşullarını sağlayan karıştırma işlemidir. Bir dışlı kutusuna bağlı bir mil üzerine bir veya daha fazla karıştırıcı monte edilmiş ve dönme hızının ayarlanması amacı ile kullanılan bir motora sahiptir. Karıştırıcının dönüşü için güç girişi, biyoprosesin ekonomik sürdürülebilirliğini belirleyen çok önemli bir ekonomik parametredir (Yasin et. al., 2015).

İşletim kolaylığı avantajından dolayı literatürde en yaygın biçimde kullanılmış olan biyoreaktör tipleridir (Abubackar et. al.,2016). Bu biyoreaktör tiplerinde sentez gaz veya gaz formundaki substrat mekanik karıştırıcı yardımıyla parçalanarak gaz-sıvı difüzyon katsayıları

artırılır ancak bu karıştırmanın oluşturduğu kayma gerilimleri mikroorganizma üzerinde olumsuz etkilere sebep olabilir. Aynı zamanda artırılan karıştırma hızının sisteme ekleyeceği enerji yükü de hesaba katıldığında büyük ölçekli projeler açısından olumsuz bir uygulama olarak karşımıza çıkmaktadır. Farklı sıvı seyreltme oranları ve maya ekstraktı konsantrasyonlarında, hücre geri devirsiz 750 mL'lik bir karıştırmalı tank biyoreaktörü kullanılarak gerçekleştirilen sürekli fermantasyon çalışmaları, farklı hücre yoğunluklarına ve ürün dağılımlarına ulaşılmasını sağlamıştır. *Clostridium ljungdahlii* suşu kullanılarak bir sürekli karıştırmalı biyoreaktörde (13.5 L) hücre geri devri ile, 560 saat sonra sırasıyla 4 ve 4.8 g/L maksimum hücre ve etanol konsantrasyonları elde edilmiştir (Younesi et. al., 2005).



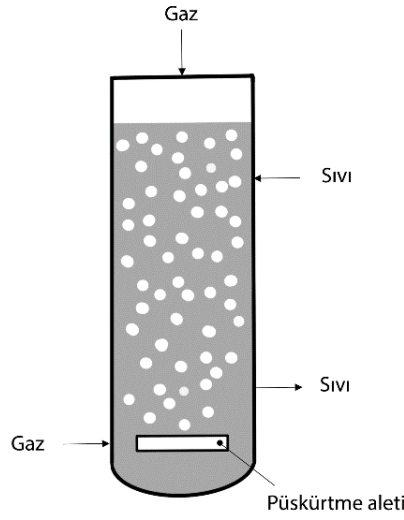
Şekil 2. 4. Sürekli Karıştırmalı Tank Biyoreaktörü

Kabarcıklı Kolon Biyoreaktörler

Kabarcıklı Kolon Biyoreaktörler gaz substratların mekanik karıştırma olmaksızın gaz yayılımıyla elde edildiği geleneksel sürekli karıştırmalı biyoreaktörlere potansiyel bir alternatif olarak görülmektedir ve tasarruf açısından ekonomik olarak uygulanabilir olduğu düşünülür. Kabarcık kolon biyoreaktörler, düşük sermaye ve operasyonel maliyetlere sahip, hareketli parçacıklar olmadığından bozulma ihtimali daha düşük ve yüksek ısı kütle transfer oranlarına sahip biyoreaktörlerdir. Karışım miktarı ve transfer katsayılarının artırılması için akış hızı artırılır. *E. limosum*KIST612 suşu kullanılarak gerçekleştirilen etanol üretim çalışmasında 0.2 µm gözenek boyutlu membran modülü hücre geri dönüşümünü sağlamak amacıyla biyoreaktöre bağlanmıştır. Bu yöntemle 4.5 g/L'ye kadar yüksek etanol verimleri elde edilmiştir. Kullanımı

kolay bir sistem olmasına rağmen düşük verimlerden ve ilave modifikasyon ihtiyaçlarından dolayı literatürde bu biyoreaktör tipiyle ilgili az örnek bulunmaktadır. *Clostridium carboxidivorans* suşu kullanılarak 4 litrelik bir kabarcık kolon biyoreaktöründe 20 gün boyunca yapılan çalışmada 6 g/l'lik etanol konsantrasyonu elde edilmiştir (Datar et. al., 2004).

Bir kabarcıklı kolonunun tasarımı için çap-uzunluk oranına ve kabarcıkları oluşturan gaz püskürtücü tipi'ne dikkat edilmelidir. Gaz, artan yoğunluk farkları tarafından yönlendirilen konvektif akış yoluyla kolonun sıvı hacminde yayılır (Lapin et. al., 1994; Doran et. al., 2013). İlave bir reaktör konfigürasyonu gaz kaldırmalı biyoreaktörlerdir. Her iki konfigürasyonda da gaz biyoreaktörün altından püskürtülür.



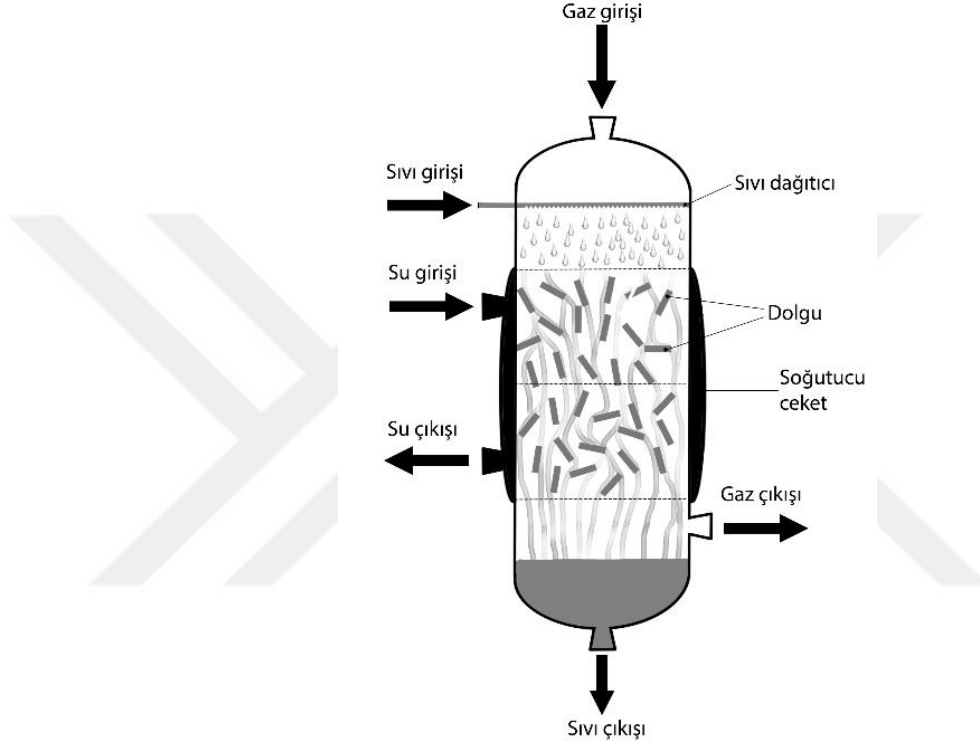
Şekil 2. 5. Kabarcıklı Kolon Biyoreaktör

Damlatmalı Filtre Yataklı Biyoreaktörler

Damlama yataklı biyoreaktörler, üzerinde biyofilmin büyüdüğü ve gaz akışının sıvı ile aynı anda veya ters yönde gerçekleştiği biyoreaktörlerdir (Cox et. al., 2001).

Damlatmalı Filtre Yataklı Biyoreaktörler, katı bir katalizör varlığında gaz-sıvı etkileşimleri oluştuğunda yaygın olarak kimyasal ve biyokimyasal proseslerde kullanılan destek malzemesi ile dolu uzun sütunlardır. Bu biyoreaktörlerde gaz ve sıvı akışı ya aynı yönde ya da çapraz akım şeklinde olabilir. Sıvı, destek malzemeyi ince bir film şeklinde sararak akar ve gaz-sıvı kütle transferi direncini azaltır. *Rhodospirillum rubrum* ve *Rubrivivax* gibi

fotosentetik bakteri kullanarak H_2 üretmek için sentez gaz fermantasyonları sırasında başarıyla kullanılmıştır. Bir diğer kullanım alanı *Methanobacterium ormicum* ve *Methanosarcina barkeri* ile metan üretim prosesleridir (Abubackar et. al., 2016). Sentez gazdan damlatmalı filtre biyoreaktörleri kullanılarak biyoetanol üretimi üzerine yayınlanmış çalışmalar az sayıdadır. Bu biyoreaktör tipi tez çalışmasında kullanılan immobilize biyoreaktör tiplerine proses olarak en çok benzeyen biyoreaktör tipleridir.



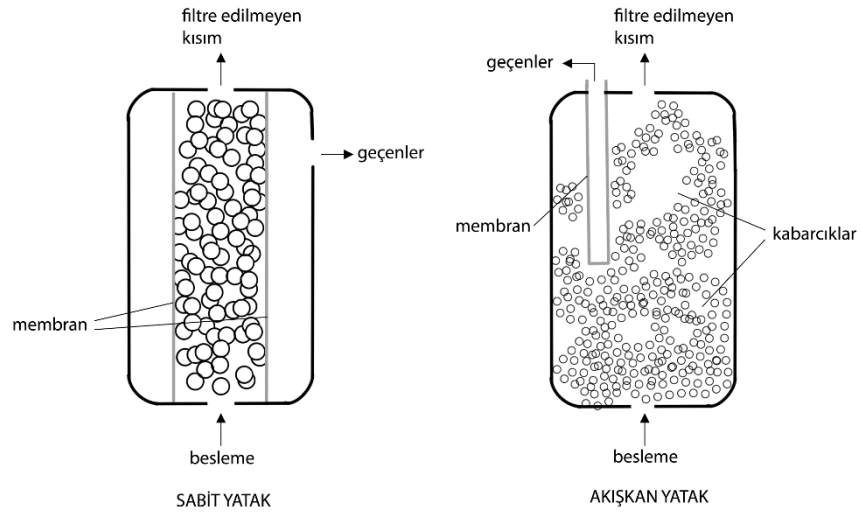
Şekil 2. 6. Damlatmalı Filtre Yataklı Biyoreaktör

Membran Biyoreaktörler

Yüksek bir spesifik yüzey alanı sağlayan sistemlerdir. Ayrıca mikrobiyal büyüme ve biyofilm oluşumu için destek işlevi görebilirler ancak biyofilmin kalınlığına özel dikkat gösterilmelidir çünkü mikrobiyal büyüme hızı yüksek olduğunda olumsuz bir etkiye de sahip olabilir (Feng et. al., 2013; Mutamim et. al., 2013). Bu etkiye biyolojik kirlenme denilmektedir. Membran biyoreaktörlerde biyolojik kirlenmeyi azaltmak için hem fiziksel hem de kimyasal yöntemleri içeren çeşitli stratejiler denenmiştir (Dolina et. al., 2015).

Uygulamaya bağı olarak, membranlar ya biyoreaktördeki sıvı ortama daldırılabilir ya da biyoreaktöre harici olarak seri şekilde bağlanabilir (Silva-Teira et. al., 2017; Lee et. al., 2012; Chang et. al., 2011).

Membran temelli biyoreaktörlerin biyoproseslerde özellikle ayırma saflaştırma basamaklarında yaygın bir kullanım alanı bulunmaktadır. Bu biyoreaktörlerde mikrobiyal hücreler biyofilm oluşturmak üzere membran yüzeyine yapışarak yüksek hücre konsantrasyonlarına ulaşılır. Proses gazı boş fiberlerin içinden akarken film tabaka üzerinde mikroorganizmalar ile tutulur ve biyoetanol üretimi gerçekleştir (Wei et. al., 2014). Etanol, uygun geri kazanım sistemleri kullanılarak geri kazanılır. Bu sistemin en büyük dezavantajlarından biri, sıvının membran boyunca basınçtaki değişiklik nedeniyle gözeneklere girebilmesi ve böylece gözenek ıslanması olarak bilinen bir duruma yol açabilmesidir. Etanol üretmek için bu tip membran biyoreaktörün performansının araştırıldığı bir çalışmada *Clostridium ragsdalei* kullanılarak 20 günlük sürekli bir işlemten sonra 10 g/L etanol konsantrasyonu elde edilmiştir (Hickey et. al., 2009).



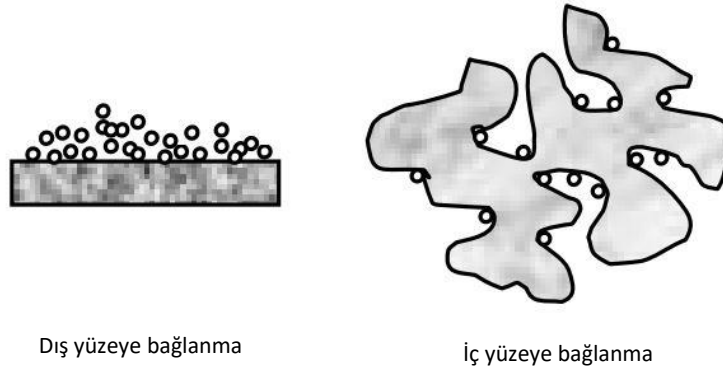
Şekil 2. 7. Membran Biyoreaktörler

2.8 Hücre İmmobilizasyonu ve İmmobilize Kültürlü Biyoreaktörler

Hücre immobilizeli biyoreaktörler yüksek mikroorganizma tutunması veya yoğunluğu sağlayan, gaz sıvı transferi için mekanik karıştırıcıya gerek duymayan, bu sebeple ekonomik sayılabilen, yüksek yüzey/hacim oranları ve yüksek kütle transfer oranına sahip

biyoreaktörlerdir. İmmobilize biyoreaktörler fermantasyon sıvı besiyeri ve biyokatalizör arasında doğrudan teması sağlar. Katı bir destek materyali üzerinde hücre immobilizasyonu, elektrostatik kuvvetler nedeniyle fiziksel adsorpsiyon veya hücre zarı ile taşıyıcı arasındaki kovalent bağlanma ile gerçekleştirilir. Çapraz bağlama veya kovalent bağlama immobilizasyonu, aktive edilmiş bir destek ile hücreler arasında bir bağlayıcı ajan varlığında kovalent bağ oluşumuna dayanır. Hücreleri desteğe bağlamak için glutaraldehit gibi bir kimyasal maddenin kullanılmasını içerir. Kimyasal reaksiyon, hücre duvarındaki hidroksil veya lipid grupları ile ambalaja uygulanan jelatin veya agar gibi dayanıklı bir kaplama arasındadır. Destek yüzeyinin kimyasal modifikasyonu, spesifik bağlanma için gereklidir. Hücre immobilizasyonu için bu yöntemin dezavantajı, hücre zarı desteğe kovalent bağlanmada yer aldığı için hücre hasarı ve aktivite kaybı riskidir. Kullanılan kimyasalların toksisitesi açıkça bu prosedürlerin genel uygulamasına sınırlamalar getirir (Zhu, 2007).

Adsorpsiyon, hücrenin desteğe fiziksel (bazen iyonik) bağlanmasıdır. Bu yöntemin, talaş gibi bir destekte yarıklara yapışabilen bazı küçük bakteriler için etkili olduğu bulunmuştur. Bu biyoreaktörlerde, mikroorganizmalar substrat ile doğrudan temas halindedir ve difüzyon direncini en aza indirir. Kullanılan destekler arasında kum, gözenekli tuğla, cam boncuklar, kil, seramikler, talaşlar, iyon değiştirici reçineler, plastik malzemeler, organik malzemeler ve aktif karbon vb. ile tarımsal malzeme (soya fasulyesi kabukları veya yulaf kabukları), polipropilenin bir karışımını içeren plastik kompozit destekler bulunmaktadır. Son zamanlarda, yüksek spesifik yüzey alanı, yüksek boşluk hacmi, düşük maliyeti, yüksek mekanik mukavemeti ve yüksek geçirgenliği nedeniyle hücre immobilizasyonu için lifli malzemeler geliştirilmiştir (Zhu, 2007).



Şekil 2. 8. Adsorpsiyon veya kovalent bağlanma (Zhu, 2007)

İmmobilize materyale bağlı hücreler büyür ve kalınlıkta birkaç hücre katmanı olabilen bir film halinde çoğalır. Yüksek hücre yoğunlukları ve düşük alıkonma süreleri mümkündür. Hücrelerin taşıyıcıya bağlanma gücü ve biyofilmin derinliği sıklıkla değişir ve kolaylıkla belirlenemez. Hücreler ve çözelti arasında herhangi bir engel bulunmadığından, adsorbe edilmiş ve serbestçe süspansiyona alınmış hücreler arasında potansiyel bir denge kurulmasıyla hücre ayrılması ve yer değiştirmesi mümkündür. Bu tip immobilizasyonda kullanılan katı malzemeler, selülozik malzemeler (DEAE-selüloz, ahşap, talaş,), inorganik malzemeler (montmorillonit, gözenekli porselen, gözenekli cam) vb.'dir. Cam veya selüloz gibi katı malzemeler polikasyonlarla da iyileştirilebilir (Norton and D'Amore, 1994; Navarro and Durand, 1977).

Hücre immobilizasyonu için ön koşullar

Aşağıdaki ön koşullar karşılandığında, hücre immobilizasyonu için taşıyıcı uygundur (Freeman, 1984; Martin, 2012; Zhu 2007):

1. Taşıyıcı, hücrelerin tutunması için fonksiyonel gruplarla birlikte geniş bir yüzey alanına sahip olmalıdır.
2. İmmobilizasyon için kullanılacak malzemenin kullanımı basit ve yenilenmesi kolay olmalıdır.
3. İmmobilize edilmiş mikroorganizmanın hücre canlılığı ve operasyonel kararlılığı yüksek olmalıdır.
4. İmmobilize edilen hücrelerin biyolojik aktivitesi immobilizasyon için kullanılacak malzemedan olumsuz etkilenmemelidir.
5. İmmobilizasyon için kullanılacak malzeme, mekanik, kimyasal, termal ve biyolojik stabiliteyi muhafaza etmeli, kolayca bozulmamalıdır.
6. İmmobilizasyon için kullanılacak malzeme ve immobilizasyon tekniği kolay, uygun maliyetli ve büyütülebilir olmalıdır.

7. İmmobilizasyon için kullanılacak malzeme gıda sınıfı saflıkta olmalıdır.
8. Materyal toksik olmamalıdır.

Hücre immobilizasyonun serbest hücre sistemlerine göre avantajları

İmmobilize sistemlerin kullanımı, aşağıdakiler dahil olmak üzere, geleneksel askıda hücre fermantasyonlarına göre birçok avantaj sunar:

1. İmmobilize desteği, pH, sıcaklık, çözücüler ve hatta ağır metallerin fizikokimyasal etkilerine karşı koruyucu bir ajan görevi görebilir. Bu da biyokatalizörün uzun süreli aktivitesine ve kararlılığına olanak sağlar.
2. Biyoreaktör hacmi başına daha yüksek hücre konsantrasyonuna, buna bağlı olarak yüksek hacimsel üretime, daha kısa fermantasyon sürelerine yol açar.
3. Artan substrat alımı ve buna bağlı verim artışı sağlanır.
4. Yüksek substrat konsantrasyonuna karşı artan tolerans ve azaltılmış son ürün inhibisyonu sağlanır.
5. Gelişmiş ürün kalitesine yol açan düşük sıcaklıkta fermantasyon fizibilitesi sunar.
6. Ayırma ve filtrasyon gereksinimlerinin azaltılması yoluyla daha kolay ürün geri kazanımı sağlar ve böylece ekipman ile enerji taleplerinin maliyetini düşürür.
7. Toplu işlemlerde biyoreaktörden ayırmadan biyokatalizörün uzun süreler için rejenerasyonu ve yeniden kullanımına olanak sağlar.
8. Yüksek hücre yoğunlukları ve fermantasyon aktivitesi nedeniyle mikrobiyal kontaminasyon riskini azaltır.
9. Basitleştirilmiş proses tasarımlarıyla daha küçük biyoreaktörleri kullanma ve dolayısıyla sermaye maliyetlerini düşürme yeteneği vardır.

10. Bazı ürünler için olgunlaşma sürelerinin azaltılmasını sağlar.

Tablo 2.5. Askıda hücre ve immobilize hücre fermantasyonları arasındaki karşılaştırma (Zhu, 2007)

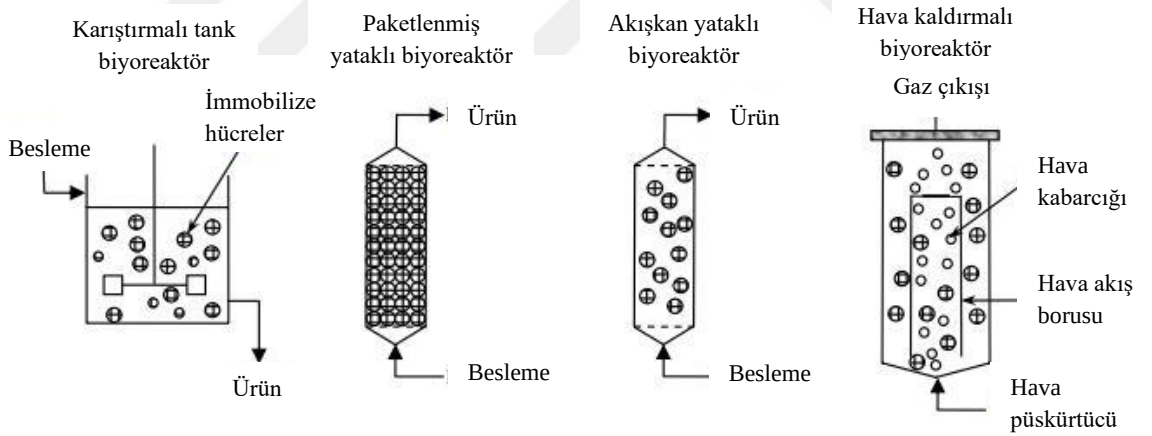
	İmmobilize hücre fermantasyonu	Askıda hücre fermantasyonu
Hücre büyümesi	Daha hızlı fermantasyon	Daha yavaş fermantasyon
	Yüksek hücre yoğunluğu	Düşük hücre yoğunluğu
Üretim işlemi	Yüksek substrat konsantrasyonu	İnhibisyonu önlemek için düşük substrat konsantrasyonu
	Yüksek hücre üretkenliği	Düşük hücre üretkenliği
	Yüksek ürün verimi	Düşük ürün verimi
	Yüksek nihai ürün konsantrasyonu Hücrelerin inhibitör substratlara veya ürünlere karşı geliştirilmiş direnci	Ürün inhibisyonu, genellikle elde edilen düşük nihai ürün konsantrasyonu ile sonuçlanır
Proses operasyonu	İmmobilize biyoreaktörde kesikli beslemeli, yarı kesikli beslemeli veya sürekli beslemeli çalışma modu	Karıştırmalı tank biyoreaktörü kullanılarak kesikli beslemeli veya yarı kesikli beslemeli fermantasyon
	Yüksek seyreltme hızında bile sürekli fermantasyonda hücre yıkanması olmaz	Hücre yıkaması nedeniyle sürekli işlemi gerçekleştirmek zor
	Yüksek hücre yoğunluğu nedeniyle küçük fermentör boyutu yeterli	Büyük fermentör gerekli
	Ürünlerin ve hücrelerin ayrılması nedeniyle basitleştirilmiş süreç tasarımı	Sonraki işlemlerde etkili ayırma ve konsantrasyon adımları gereklidir
	Hücre yenilenmesi nedeniyle hücrelerin uzun süre yeniden kullanılması	Hücreler yeniden kullanılamaz
	Uzun vadeli operasyonel istikrar ve sabit ürün kalitesi	Ürün kalitesi lota göre değişir
	Mikrobiyal kontaminasyon için azaltılmış risk	Kirlenmeye daha yatkın

Hücre immobilizasyonu için kullanılan çeşitli destekler organik, inorganik, doğal destekler ve membran sistemleri olarak sınıflandırılır. Doğal destekler esas olarak gıda sınıfı

saflıktadır ve ahşap, talaş, meyve parçaları vb. gibi minimum ön işleme veya ön işlemsiz kullanılır (Kourkoutas et. al., 2004).

İçilebilir veya yakıt amaçlı etanol üretimi için immobilize hücreler kullanan çeşitli biyoreaktör konfigürasyonları literatürde bulunmaktadır. Bu çalışmaların çoğunda kullanılan yaygın konfigürasyonlar kesikli, sürekli, akışkan yataklıdır. Çeşitli biyoreaktör konfigürasyonları arasında bir karşılaştırmanın yapıldığı çalışmada her durumda kontaminasyon, endüstriyel ölçekte sürekli süreçlerin uygulanmasını engelleyen ana nedenlerinden biri olarak sunulmuştur (Vega et. al., 1988; Virkajarvi et. al., 2001).

İmmobilize edilen hücrelerin kullanıldığı biyoreaktör seçimi, immobilizasyon tekniğine, hücre metabolizmasına, kesme hızına ve kütle transfer gereksinimine bağlıdır. Çeşitli uygulamalar için kullanılan en popüler immobilize hücre biyoreaktörleri arasında karıştırmalı tank biyoreaktör, paketlenmiş yataklı biyoreaktör, akışkan yataklı biyoreaktör ve hava kaldırmalı biyoreaktör bulunmaktadır.



Şekil 2. 9. Hareketsizleştirilmiş hücre biyoreaktörlerinin çeşitli türleri (Zhu 2007)

2.9 Ticari Ölçekte Sentez Gazı Fermantasyonu

C1 gazlarından yakıt ve kimyasal üretimi 20. yy. başlarından beri önemli bir araştırma konusu olmuştur. Paris İklim Anlaşması uyarınca, ülkelerin 2050 yılına kadar başta CO₂ olmak üzere sera gazı emisyonlarını azaltmaları ve karbon nötr olma hedefi öngörülmüştür. Bu hedefe ulaşmak için hem akademi hem de endüstri tarafından çok sayıda teknoloji önerilmiştir. Buna göre, sentez gaz fermantasyonunu ticarileştiren öncü şirket, Yeni Zelanda'da kurulan ve şu anda

ABD’de merkezi bulunan LanzaTech’dir (LanzaTech, 2021). Şirket, 2009 yılından bu yana, C1 gaz fermantasyonu ile ilgili 100’den fazla verilmiş patente sahiptir. Etanol, etilen, 2,3-butandiol, laktik asit, asetik asit, H₂, lipidler, izobutilen esterler, fermantasyon ortamı bileşimi, fermantasyon sırasında karbon tutulması, elektroliz, operasyonel parametrelerin iyileştirilmesi dahil olmak üzere çeşitli biyoreaktör uygulamaları, rekombinant mikroorganizmalar vb. konularda çalışmaları bulunmaktadır (LanzaTech, 2021). Şirket, döngüsel bir ekonomi için CarbonSmart markasını oluşturmuştur. Bu bağlamda, Çin’deki ilk büyük ölçekli ticari tesisinde 150 gün boyunca sürekli biyoetanol üretiminin 100.000 ton CO₂’yi azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, sentez gazın çelik endüstrilerinin atık gazı olması sebebiyle Asya ve Avrupa’nın en büyük çelik üreticileri olan Baosteel (Çin) ve Arcelor Mittal (Belçika) ile ortak çalışmalar başlatmıştır. Ekim 2020’de Total ve L’Oréal ile yapılan bir başka iş birliği ile biyoetanol destekli biyo bazlı ambalaj üretiminin adımları atılmıştır. Eylül 2020’de, Mangalore Rafinerisi ve Petrochemicals Limited (Hindistan) ile bir başka güncel entegrasyonla, tarımsal atıkların Ankur Scientific’in (Hindistan) gazlaştırma teknolojisi ile biyokömür ve sentez gaza dönüştürülmesi üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. LanzaTech’in yanı sıra, Coskata, Inc (ABD), fermantasyon yoluyla C1 gazlarının dönüştürülmesi için birkaç patent almış olan başka bir şirkettir (Justia Patents, 2021). Ancak, şirket 2015 yılında kapanmıştır ve teknolojisi Synata Bio şirketi tarafından satın alınmıştır (Biofuelsdigest 2016).

Patent literatür veri tabanına bakıldığında ilk patentin Prof. James Gaddy tarafından Arkansas Üniversitesi’nde alındığı görülmektedir. Bu patent alanında yapılan akademik çalışmalar ile gaz fermantasyon şirketi olan Bioengineering Researchers (BR) firması ABD’de kurulmuştur. 2003 yılında pilot ölçek olarak başlatılan bu çalışmanın 2008 yılında hakları satın alınarak Florida eyaletinde INEOS Bio firması 30.3 milyon L etanol üretimi ve 6 MW yenilenebilir enerji üretimi gerçekleştirmiştir. INEOS Bio, 2008 yılında kurulmuş bir şirkettir ancak biyoetanol projesi 2001 yılında başlamıştır (Ineos Bio Technology Platform, 2016). Şirket, etanole karşı yüksek seçiciliğe sahip ve gazlaştırma sürecinde üretilen çoğu safsızlığa toleranslı, tescilli, doğal olarak oluşan biyokatalizörler kullanmıştır (Ineos Bio Technology Platform, 2016). Üretilen etanol, benzin ile karıştırılabilecek %99.7 saflığa sahiptir. Ancak, tesis 2015 yılında âtıl kalmıştır ve Eylül 2016’da şirket, ABD etanol pazarındaki stratejik hedeflerine uymayan değişiklikler nedeniyle etanol üretim faaliyetlerini devretme kararını açıklamıştır (Voegelé, 2016).

Henüz ülkemizde bu alanda çalışan büyük ölçekli kurum bulunmamaktadır. Sentez gaz fermantasyonunda patent araştırması Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Merkezi Patent destek merkezi tarafından yapılmıştır. Anaerobik mikroorganizmaların CO'dan etanol üretimi üzerine alınan pek çok sayıda patent mevcuttur. Örneğin US 5173426 numaralı patentte *Clostridium ljungdahlii*'nin sentez gazdan etanol ve asetik asit üretimini, US 5807722 numaralı patentte atık gazlardan organik asit ve alkol üretimini, US 6136577 numaralı patentte *Clostridium ljungdahlii*'nin atık gazlardan etanol üretimi üzerine detaylı bilgiler yer almaktadır. 2011 yılından itibaren yayınlanmaya başlayan patentlerde günümüze kadar kütle transfer katsayısı artırmak (US 20150717), mikroorganizma canlılık süresini uzatmak (ZA201400158) veya etanolün inhibe etkisini azaltma amaçlı biyoreaktör modifikasyonları üzerine patentler (US 20110406) mevcuttur. Yapılan bu araştırmalarda immobilize biyoreaktör kullanımı ile patente rastlanmadığı belirtilmiştir. Son yılların konusu olan immobilize biyoreaktörlerle çalışmaların azlığını gösteren bu konu tez çalışmasındaki yönelimin ticarileşme kapasitesini de göstermektedir.

2.10 *Clostridium ljungdahlii* ile Yapılan Literatür Çalışmaları

Clostridium ljungdahlii, seyrek olarak sporlanan gram pozitif, hareketli, çubuk şeklinde bir anaerobik bakteridir. *Clostridium ljungdahlii* anaerobik şartlarda 4-6 pH aralığında etanol ve asetik asit üretir.

Najafpoura et. al., (2006), karbon kaynağının sıvı yakıt oluşumu üzerindeki etkisini anaerobik bir ototrofik bakteri olan *Clostridium ljungdahlii* ile araştırmıştır. Etanol ve asetik asit üretimi için, karbon kaynağı olarak CO veya CO₂ / H₂ kullanılmıştır.

Etanol üretimi aşağıdaki stokiyometrik denklem temelinde tanımlanmıştır:



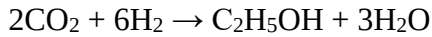
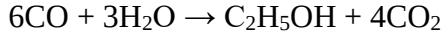
Gelecek nesil için alternatif bir enerji kaynağı olarak kabul edilen biyoetanol, kesikli biyoreaktör denemelerinde biyolojik işlemle sentez gazından çok çeşitli gaz basınçlarında (0.8-1.8 atm) çalışılarak elde edilmiştir. Maksimum etanol üretimi 108 saat inkübasyon süresinde sırasıyla 1.6 ve 1.8 atm basınçta 11 ve 12 mg/L olarak elde edilmiştir. Üretilen etanol

konsantrasyonunun, 60 saat fermentasyondan sonra yaklaşık olarak sabit kaldığı gözlenmiştir (Najafpour and Younesi, 2006).

Cotter et. al., (2009a) yapmış oldukları çalışmada sürekli sentez gaz fermentasyonu sırasında anaerobik teknikler kullanılarak hazırlanan ve 20 dakika (121°C, 15 psig) otoklavlanan sıvı büyüme ortamının pH'ının ve gaz akış hızının, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC 55383) alınıp modifiye edilmiş ortamda canlandırılan *Clostridium ljungdahlii* üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sentez gaz (%50 N₂, %20 CO, %20 CO₂, %10 H₂), 5, 7.5 ve 10 mL/dak debilerde kullanılmıştır. *Clostridium ljungdahlii* için, pH 5.5 (378 mg/L) ile karşılaştırıldığında pH 6.8'de (579 mg/L) daha yüksek hücre yoğunlukları elde edilmiştir. pH 6.8'deki etanol konsantrasyonu, pH 5.5'tekinden % 110 daha yüksek olduğu görülmüştür.

Cotter et. al., (2009a), birincil karbon kaynağı olarak CO'nun kullanıldığını ve CO₂'nin ikincil karbon kaynağı olarak kullanıldığını, kültürün büyümesi yavaşlarken bile CO₂'nin *Clostridium ljungdahlii* tarafından kullanıldığını belirtmektedir.

Ototrofik büyüme sırasında etanol ve asetik asit üretimi için CO ve CO₂ + H₂ kullanımı ile ilgili aşağıdaki denklemlerin kullanıldığını bildirmiştir (Cotter et. al., 2009a).



Clostridium ljungdahlii'nin farklı büyüme ortamları ve farklı gaz karışımları ile yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Xie et. al., (2015) yapmış oldukları çalışmada *Clostridium ljungdahlii* kullanarak, 5 L'lik bir biyoreaktörde 0.16 MPa'lık %20 CO₂ ve %80 CO gaz bileşimi ile fermentasyon işlemi gerçekleştirmişlerdir. *Clostridium ljungdahlii* genel olarak 37°C ve 200 rpm'de modifiye

edilmiş (fruktoz ve maya özü olmadan) bir DSMZ 879 ortamında büyütülmüştür. Maksimum etanol üretimi 0.8-1g/L olarak elde edilmiştir (Xie et al., 2015).

Cotter et. al., (2009) tarafından yapılan çalışmada, *Clostridium ljungdahlii*, ATCC 1754 PETC ortamında agarsız, ilave tuzlar, vitaminler ve iz elementler ile modifiye bir ortam üzerinde büyütülmüştür. *Clostridium ljungdahlii* ile yapılan deneylerde, %73 CO, %10 CO₂, %15 H₂ ve %2 CH₄ içeriğine sahip gaz ile sürekli gaz fermantasyonu yapılarak sırasıyla 7 ve 1 g/L'lik etanol ve asetik asit üretimi gerçekleştirilmiştir (Cotter et. al., 2009b).

Aghbashlo et. al., (2016) gerçekleştirdikleri çalışmada ise 37°C'de 2 L çalışma hacmine sahip biyoreaktör kullanılmıştır. *Clostridium ljungdahlii*'nin saf kültürü Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC 55383) tedarik edilmiştir. *Clostridium ljungdahlii* bir inkübatör çalkalayıcısında 24 saat boyunca 37°C'de ATCC ortamında büyütülmüş, ardından %55 CO, %20 H₂, %15 Ar ve %10 CO₂ gaz karışımı biyoreaktöre sürekli olarak beslenmiştir. Gaz akış hızı, 14 mL/dk'da sabitlenmiştir. İlk 168 saatlik fermantasyon sonrasında yaklaşık 5.5 g/L etanol elde edilmiştir (Aghbashlo et. al., 2016).

Köpke et.al.,(2011) yapmış oldukları çalışmada % 44 CO, % 32 N₂, % 22 CO₂ ve % 2 H₂ içeren sentez gazının fermantasyonu sırasında ana ürünleri 1.8 g/L asetik asit, 0.9 g/L etanol olarak elde etmişlerdir (Köpke et. al., 2011).

Sentez gazın *Clostridium ljungdahlii* kullanılarak etanole biyodönüşüm işlemine farklı bir yaklaşım olarak Richter et. al., (2013) iki aşamalı bir sistem önermişlerdir. CSTR (1L) ve kabarcık kolon biyoreaktörü (4L) ile bir sistem geliştirmişlerdir. Sistem %60 CO, %35 H₂, %5 CO₂ gaz karışımı ile beslenmiştir. Amerikan Kültürü Koleksiyonundan (ATCC 55383) temin edilen saf *Clostridium ljungdahlii* kültürü kullanılarak etanol üretimi 9.7 g/L konsantrasyonda gerçekleşmiştir (Richter et. al., 2013).

Mohammadi et. al., (2012) Amerikan Kültürü Koleksiyonundan (ATCC 55383), saf *Clostridium ljungdahlii* kültürü temin ederek inkübatör çalkalayıcıda 37°C'de zengin ATCC ortamında anaerobik olarak büyütüp CSTR (2L) biyoreaktöre %55 CO, %20 H₂, %10 CO₂, %15 Ar gaz karışımı beslenerek 6.5 g /L etanol, 5.43 g/L asetik asit üretimi (Mohammadi et. al., 2012) ve Younesi et. al.,(2006) aynı şekilde CSTR (2L) biyoreaktöre %70 CO gazı beslenerek 11 g /L maksimum ürün üretimi elde etmiştir (Younesi et. al., 2006).

Acharya et. al., (2019), etanol üretimi için, %100 CO ile %60 CO, %35 H₂ ve %5 CO₂ içeriğine sahip sentez gaz karışımı sahip iki farklı substrat kaynağı kullanmıştır. Çalışmada 2L çalışma hacmi ne sahip 3L'lik sürekli karıştırılmış tank biyoreaktörü (CSTBR) kullanılmıştır. Kütle transfer katsayısı, sentez gaz fermantasyonu sırasında CO fermantasyonundan daha iyi performans göstermiştir. Biyoreaktörde CO fermantasyonu sonucunda 0.17-1.33 g/L etanol ve 8.92-23.67 g/L asetik asit üretilirken, sentez gaz fermantasyonu sonucunda 0.85-3.75 g/L etanol ve 8.89-14.97 g/L asetik asit üretimi gözlenmiştir (Acharya et. al., 2019).

Gaz - sıvı kütle transfer hızının yavaş olması verimi olumsuz etkilemektedir. Bu sorunun üstesinden gelmek için, biyoreaktörlerin iyileştirilmesi üzerine çalışılmış ve CO'nun kısmi basıncını yükselterek sıvı fazda CO konsantrasyonunun artırılması veya gaz ve sıvı faz arasındaki yüzeyleri büyütmek için nanoparçacıkların kullanılması ile ilgili çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu konu üzerine yapılan bir çalışmada, asetojenik bakteri türü olan *Clostridium ljungdahlii* (ATCC 55383), Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilmiştir. Çalışmada, *Clostridium ljungdahlii* tarafından sentez gazının fermantasyonunda biyoetanol üretimini arttırmak için nanopartiküller kullanılmıştır. Altı çeşit nanopartikül test edilmiştir: karbon üzerinde paladyum, alümina üzerinde paladyum, silika, hidroksil fonksiyonlu tek duvarlı karbon nanotüpler, alümina ve demir (III) oksit. Bunlardan ağırlıkça %0.3 konsantrasyondaki silika nanoparçacıkları, gaz-sıvı kütle transferini arttırmada en iyisi olarak belirlenmiştir. %20 CO, %20 CO₂, %5 H₂ ve %55 N₂ içeren gaz karışımı kullanılarak yapılan çalışmada biyokütle, etanol ve asetik asit üretiminde sırasıyla %34.5, %166.1 ve %29.1 düzeylerinde önemli artışlara neden olmuştur (Kim et. al., 2014).

2.11 *Clostridium ragsdalei* ile Yapılan Literatür Çalışmaları

Sun et. al. (2019), sentez gaz fermantasyonunda kullanılan mikroorganizmaların gerekli besin maddesinin biyokömürlerden sağlanabileceğini düşünerek yüksek besin maddesi ve iz elementleri içeren kümes hayvanlarının atıklarını (PLBC) biyokömür olarak kullanılmıştır. Kullanılan PLBC, maya ekstrakt ile karşılaştırıldığında etanol üretim miktarının daha fazla olduğu gözlenmiştir. Fermantasyon 3L CSTR'de, 10g/L PLBC ile başlatılmış ve etanol üretiminin maya ekstraktına oranla fazla olduğu net bir şekilde gözlenmiştir. Fermantasyon sırasında üretilen asetik asitin etanole dönüşerek verimi arttırdığı görülmüştür (Sun et. al., 2019).

El-Gammal et. al., (2017) etanol ve uçucu yağ asitlerinin (VFA) maksimum miktarda üretimi için ortam optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Bunun için farklı gaz kompozisyonları (CO, H₂ ve sentetik gaz karışımı), asetik asitli ve asetik asitsiz ortam, saf ve karışık kültürler kullanarak denemeler yapılmıştır. Sonuç olarak asetik asitin inokulum tipinden bağımsız baskın ortam olduğu gözlemlenmiştir. Maksimum VFA ve etanol konsantrasyonunun eldesinde saf kültür olan *Clostridium ragsdalei* ile en uygun gaz bileşiminin %100 CO olduğu gözlenmiştir (El-Gammal et. al., 2017).

Devarapalli et. al., (2016) sentez gazdan sürekli etanol üretimi için 1L'lik Trickle-Bed Biyoreaktörde *Clostridium ragsdalei* ile etanol üretimi gerçekleştirmişlerdir. Seyreltmenin ve gaz akış hızının ürün oluşumunda etkisi ve verimliliği incelenmiştir. Sonuçlar gaz akış hızı 1.5-2.8 mL/dk olarak belirlendiğinde, CO ve H₂ dönüşümünün %90 olduğunu tespit edilmiştir (Devarapalli et. al., 2016).

Saxena and Tanner (2011a) gerçekleştirdikleri çalışmada iz element iyonlarının (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn, SeO₄⁻ ve WO₄⁻) *Clostridium ragsdalei* asetonjenik bakterinin büyümesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda Ni elementinin bakteri üzerinde gerekli olduğu fakat Cu⁺² elementinin etanol üretimi üzerinde negatif etkisi olduğu saptanmıştır (Saxena and Tanner, 2011a). Saxena and Tanner (2011b) yaptıkları bir diğer çalışmada *Clostridium ragsdalei* ile sentez gaz fermantasyonu için pahalı olmayan mısır şurubu kullanılmıştır. Mg⁺², NH₄⁺ ve PO₄³⁻ kullanmayarak oluşturdukları ortamda üretilen etanol miktarının düşük olduğunu, Na⁺, Ca²⁺, and K⁺ kullanmayarak ya da Ca⁺², Mg⁺², K⁺, NH₄⁺ ve PO₄³⁻ miktarları artırılarak hazırlanan ortamda ise etanol üretiminin değişmediği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra Na⁺ konsantrasyonunun artırılmasının büyümeyi inhibe ederek etanol üretimini negatif yönde etkilediğini, maya ve iz elementlerin ise *Clostridium ragsdalei* büyümesi için gerekli olduğunu, sadece mısır şurubunun büyüme için yeterli olmadığını ilave olarak iz elementlerle birlikte kullanıldığında büyümeyi desteklediği gözlenmiştir. Sonuç olarak mısır şurubu, maya, vitamin ve minerallerin (NH₄⁺ hariç) yerine kullanılabildiği yaptıkları deneyde tespit edilmiştir (Saxena and Tanner, 2011b).

Patankar et. al., (2021) Genom Karıştırma yöntemi ile *Clostridium ragsdalei*'nin etanol ve asetik asit üretim performansını arttırmaya yönelik çalışmalarda bulunmuştur. Genom karıştırma (GS)'nin, klasik gerinim iyileştirme yöntemlerine bir alternatif olduğunu ve hem

prokaryotlarda hem de ökaryotlarda suş iyileştirmesi için kullanılan basit bir teknik olduğunu ifade eden araştırmacılar, 1.92 g/L etanol konsantrasyonu elde etmişlerdir (Patankar et. al., 2021). GS, tüm genom seviyesinde özyinelemeli rekombinasyon yoluyla bir organizmanın yönlendirilmiş evrimine izin verir (Zhank et. al., 2002). Bu teknik, protoplast füzyonu yoluyla tüm genomların rekombinasyonu ile DNA karıştırmanın izin verdiği çok ebeveynli çaprazlamanın avantajını birleştirir (Patnaik et. al., 2002). Çalışmanın temel amacı, geliştirilmiş etanol ve asetik asit toleransına sahip genom-karıştırılmış *Clostridium ragsdalei* (DSM 15248) suşlarını elde etmektir. Seçilen karıştırılmış suşların sentez gazı fermantasyon performansının bir değerlendirmesi de yapılmıştır. Gerçekleştirdikleri bu çalışmada, *Clostridium ragsdalei* (DSM 15248) ana suş, etil-metil sülfonat (EMS) ve ultraviyole (UV) radyasyonu ve ardından GS kullanılarak rastgele mutajenez tabi tutulmuştur. İstenen mutantların seçimi, etanol ve asetik asit toleransına dayalı olarak gerçekleştirilmiştir (Patankar et. al., 2021).

Gungormusler et. al., (2022), iz elementlerin ve maya ekstraktının varlığının veya yokluğunun, C1 gazının baskın olduğu sentez gazı (%60 CO, %10 CO₂, %10 CH₄, %10 H₂, %10 N₂) ile büyütülen *Clostridium ragsdalei*'nin büyüme ve etanol üretimi üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Düşük maliyetli malzemeler olarak peynir altı suyu tozu ve glikoz şurubunun karşılaştırılması, sentez gazından önemli ölçüde daha yüksek verimle etanol üretmek için daha uygun maliyetli bir ortam formülasyonunun geliştirilmesine yardımcı olmuştur ve sentez gazı ve glikoz şurubunun birlikte kullanılmasıyla 3.8 kata kadar iyileştirme elde edilmiştir ve fermantasyon ortamının maliyetinde %15.6'lık bir azalma sağlanmıştır (Gungormusler et. al.,2022).

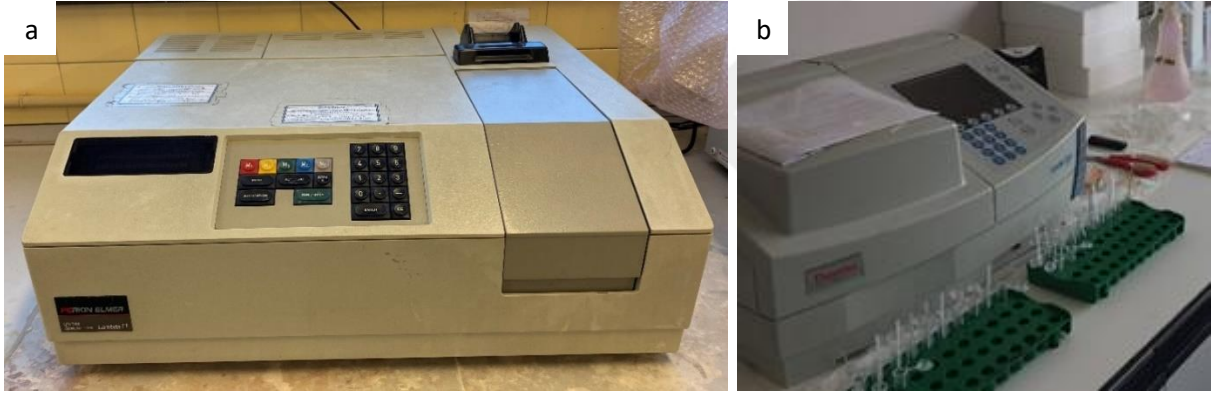
Etanol üretimi için düşük maliyetli bir ortamın geliştirilmesi, proses fizibilitesi için kritik öneme sahiptir ve bu konuda Gao et. al., (2013) yaptıkları çalışma ile *Clostridium ragsdalei* için pahalı besinlerin azaltılması, elimine edilmesi ve değiştirilmesiyle bir büyüme ortamı oluşturmuşlardır. Fermantasyonlar sentez gazı (%20 CO, %15 CO₂, %5 H₂ ve %60 N₂) kullanılarak 250 mL'lik şişelerde gerçekleştirilmiştir. Sonuçların istatistiksel analizi, pahalı bir kimyasal olan morfolinoetan sülfonik asitin çıkarılmasının hücre büyümesini ve etanol üretimini etkilemediğini göstermiştir (Gao et. al., 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Analitik Yöntemler

3.1.1 OD (optik yoğunluk) ölçümü

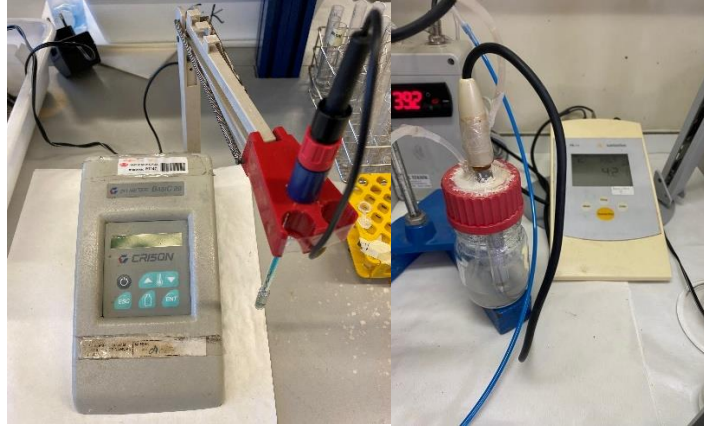
Her iki suşun büyümeleri 600 nm’de Optik Yoğunluk (OD) ölçümleri ile takip edilmiştir. İşlemler İspanya La Coruna Üniversitesi Kimya Mühendisliği Laboratuvarında PERKIN ELMER UV/VIS spektrofotometrede (Şekil 3.1a) ve Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Çevre Teknolojisi Laboratuvarında ThermoScience UV spektrofotometrede (Şekil 3.1b) 600 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kör olarak saf su kullanılmıştır.



Şekil 3. 1. *Clostridium* suşları için optik yoğunluk ölçümü

3.1.2 pH ölçümleri

Ortam pH değerleri ve günlük pH değişimleri CRISON marka pH Metre ve Sartorius marka pH metre ya da pH kağıdı (Merck 0-14) ile takip edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. pH ölçümlerinde kullanılan pH Metre

3.1.3 Askıda katı madde (AKM) tayini

AKM analizi Standart Methods 2540.D'ye göre gerçekleştirilmiştir (APHA; AWWA, 2021). 0.45 mm gözenek boyutuna sahip filtre kâğıdı sabit tartıma getirilmiştir. Süzme işlemi gerçekleştirilmeden önce filtre kâğıdı hassas terazide tartılmıştır. Hacmi bilinen numune vakum pompası yardımı ile filtre kağıdından geçirilerek süzölmüştür ve temiz bir cımbız yardımı ile alınan filtre kâğıdı 105°C sıcaklıktaki inkübatöre yerleştirilerek kurutulmuştur. Kuruyan filtre kâğıdı tartım öncesi desikatöre alınmıştır. Soğuyan filtre kâğıdı hassas terazi yardımı ile tartılmıştır. AKM miktarının hesaplanabilmesi için aşağıda görülen formül kullanılmıştır.

$$AKM \text{ (mg/L)} = \frac{(A-B) \cdot 1000}{\text{Numune Hacmi, (mL)}}$$

A: Filtre kağıdının son ağırlığı (mg)

B: Filtre kağıdının ilk ağırlığı (mg)

3.1.4 Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile etanol-asetik asit analizi

İspanya La Coruna Üniversitesi Kimya Mühendisliği Laboratuvarında yapılan çalışmalarda, HPLC cihazı HP1100, Agilent Co., ABD'dir (Şekil 3.3). Refraktif İndeks Dedektör (RID) kullanılmıştır. Kolon olarak Agilent Hi-Plex H (300 x 7.7 mm) kullanılmıştır. Taşıyıcı sıvı 0.005 M H₂SO₄ olarak belirlenmiştir. Akış hızı 0.80 mL/dk, sıcaklık 45°C'dir. HPLC analizine tabi tutulmadan önce örnekler ependorflara alınıp 7000 rpm'de 10 dakika boyunca mikrosantrifüjde (ELMI Skyline Ltd CM 70 M07) çöktürülmüştür. Ardından 0.22

mikronluk PTFE şırınga filtresinden (Labbox, Barselona, İspanya) süzülerek HPLC viallerine aktarılmıştır.



Şekil 3. 3. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)

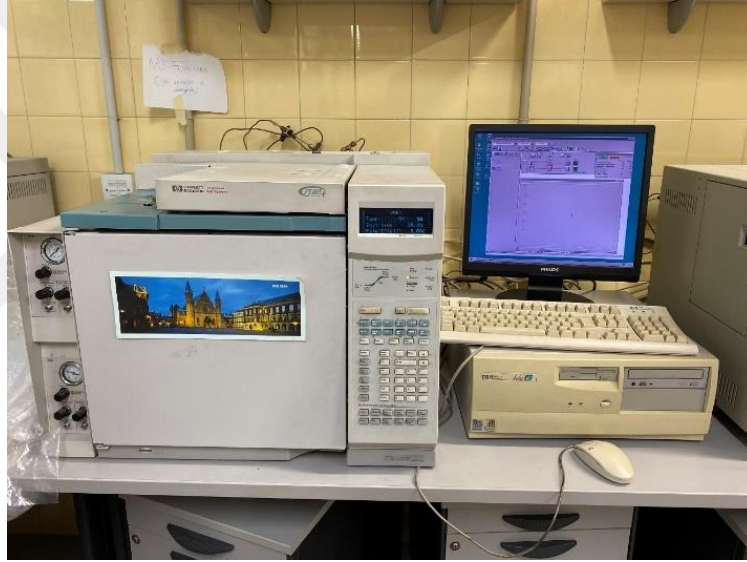
Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Çevre Teknolojisi Laboratuvarında yapılan çalışmalarda, HPLC cihazı ThermoScience Ultimate 3000 UHPLC+'dır (Şekil 3.4). Refraktif İndeks Dedektör (RID) kullanılmıştır. Kolon olarak HyperREZXP Carbohydrate +H 8 nm (30 x 2.5 x 8) kolon kullanılmıştır. Taşıyıcı sıvı 10 mM H₂SO₄ olarak belirlenmiştir. Akış hızı 1 mL/dak, basınçlar 70-80 bar, sıcaklık 50°C'dir. HPLC analizine tabi tutulmadan önce örnekler ependorflara alınıp 10000 rpm'de 10 dakika boyunca mikrosantrifüjde çöktürülmüştür. Ardından 0.20 mikronluk şırınga filtresinden süzülerek HPLC viallerine aktarılmıştır.



Şekil 3. 4. Yüksek performans sıvı kromatografisi

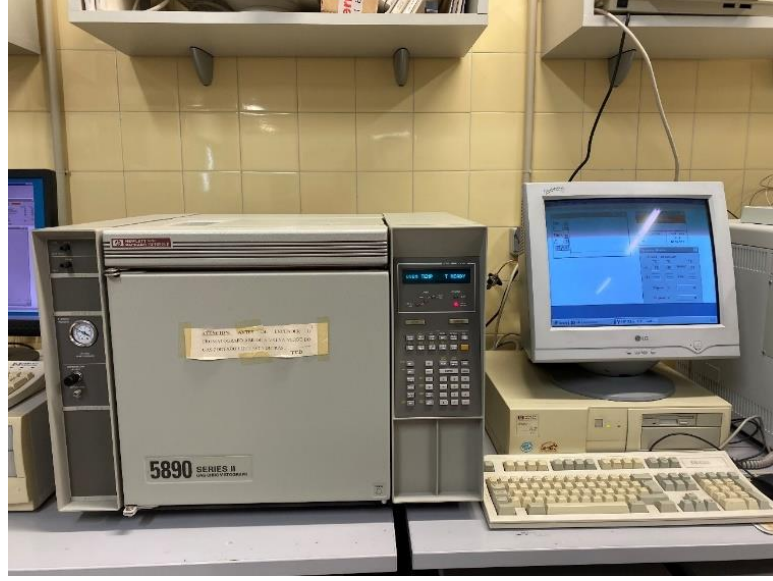
3.1.5 Gaz kromatografisi (GC) ile tepe gazı analizi

İspanya La Coruna Üniversitesi Kimya Mühendisliği Laboratuvarında yapılan çalışmalarda, CO konsantrasyonları, bir termal iletkenlik detektörü (TCD) ile bir HP 6890 gaz kromatografisi (GC) kullanılarak ölçülmüştür. Kolon olarak, 15 m'lik bir HP-PLOT Molecular Sieve 5A kolonu (ID: 0.53 mm, film kalınlığı: 50 μm) kullanılmıştır. Fırın sıcaklığı başlangıçta 50°C'de 5 dakika sabit tutulmuştur ve daha sonra 90°C'lik bir nihai sıcaklığa ulaşmak için 2 dakika 20°C dk⁻¹'e yükseltilmiştir. Enjeksiyon portunun ve dedektörün sıcaklığı 150°C'de sabit tutulmuştur. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5. CO analizinde kullanılan Gaz Kromatografisi (GC)

Benzer şekilde, CO₂ konsantrasyonları bir termal iletkenlik detektörü (TCD) ile donatılmış bir HP 5890 gaz kromatografi üzerinde analiz edilmiştir. Enjeksiyon, fırın ve algılama sıcaklıkları sırasıyla 90, 25 ve 100°C'de tutulmuştur. Kolon olarak HP-5 ms sütunu (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm film kalınlığı) kullanılan bir Thermo Scientific ISQ™ tekli dört kutuplu GC-MS sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3. 6. CO₂ analizinde kullanılan Gaz Kromatografisi (GC)

Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Çevre Teknolojisi Laboratuvarında yapılan çalışmalarda, 6890N Agilent Technologies Network GC System model ve markalı cihazda, Termal Kondüktivite Detektörü (TCD) ile ve Hayesep D 80/100 dolgulu kolon (ALLTECH) ile çalışılmaktadır. GC gaz metotta “front inlet ve back detector” değerleri 150°C iken “oven” değeri 35°C’ye ayarlı olarak çalıştırılmaktadır. Taşıyıcı gaz olarak 40 mL/dak akım debili Argon gazı kullanılmıştır. GC’de gaz kalibrasyonu denemesi için hidrojen, metan karbondioksit, azot ve karbonmonoksit (%10 H₂, %10 CH₄, %10 CO₂, %10 N₂ ve %60 CO) içeren gaz karışımı kullanılmıştır.



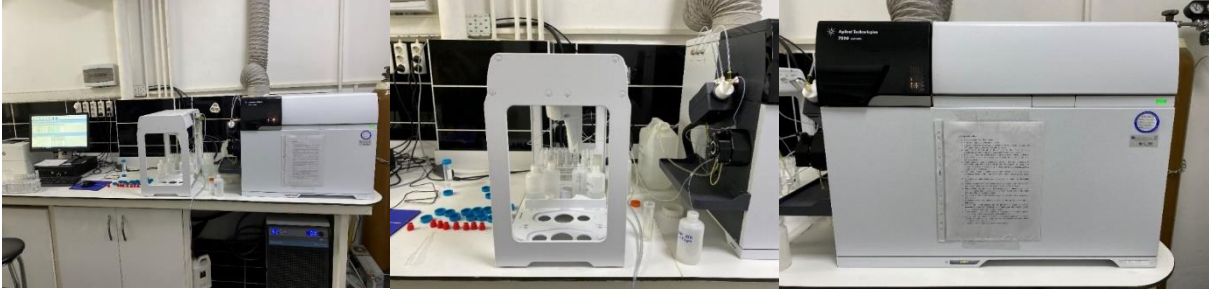
Şekil 3. 7. CH₄-CO-CO₂-H₂-N₂ analizinde kullanılan Gaz Kromatografisi (GC)

3.1.6 İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometrisi (ICP MS) ile iz element analizi

İz elementler APHA 3125 standardına uygun olarak ICP-MS (Coupled Plasma-Mass Spectrometry) cihazında Ege Üniversitesi Kimya Bölümü ICP-MS Laboratuvarında analiz edilmiştir. ICP-MS ölçümleri Agilent 7900 model ICP-MS Cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ICP-MS yazılımında mevcut olan genel amaçlı plazma ve He modları kullanılmıştır. Analitik ölçümlerden önce, cihaz Agilent Technologies'den alınan Ce, Co, Li, Tl, Y içeren bir ayar çözeltisi ile optimize edilmiştir ve yaklaşık yarım saat boyunca hacimce %2'lik HNO₃ ile yıkama modunda stabilize edilmiştir. Çoklu element kalite kontrol (QC) kalibrasyon standardı Redoks Lab'dan temin edilmiştir ve hacimce %2'lik HNO₃ çözeltisinde hazırlanmıştır. ICP-MS performansını arttırmak için Agilent Technologies'den alınan Bi, Ge, In, Li, Lu, Rh, Sc ve Tb içeren bir iç standart çözeltisi (IS) kullanılmıştır. Diğer tüm uygulama koşulları Tablo 3.1'de listelenmiştir (Şekil 3.8).

Tablo 3. 1 ICP-MS uygulama parametreleri

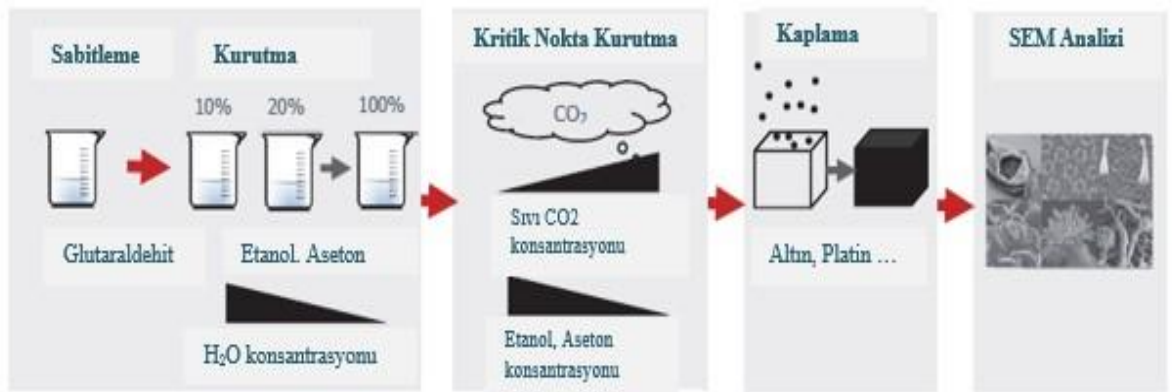
Uygulama belirteçleri	Parametreler
RF gücü (W)	1300
Plazma modu	Genel Amaçlı, He
Omega lens (V)	8.8
Sapma lensi (V)	0.0
Hücre gazı akış hızı (mL dk ⁻¹)	4.3
Enerji ayırımı (V)	5.0
Örnek alımı (mL dk ⁻¹)	0.5
Peristaltik pompa dönme hızı (rpm)	20.0
Analitik kütleler (amu)	⁵⁵ Mn, ⁵⁶ Fe, ⁶⁰ Ni, ¹¹ B, ²⁴ Mg, ⁴⁰ Ca, ⁵⁹ Co, ⁶⁴ Cu, ⁶⁵ Zn, ⁹⁶ Mo



Şekil 3. 8. İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometrisi (ICP-MS)

3.1.7 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ölçümleri

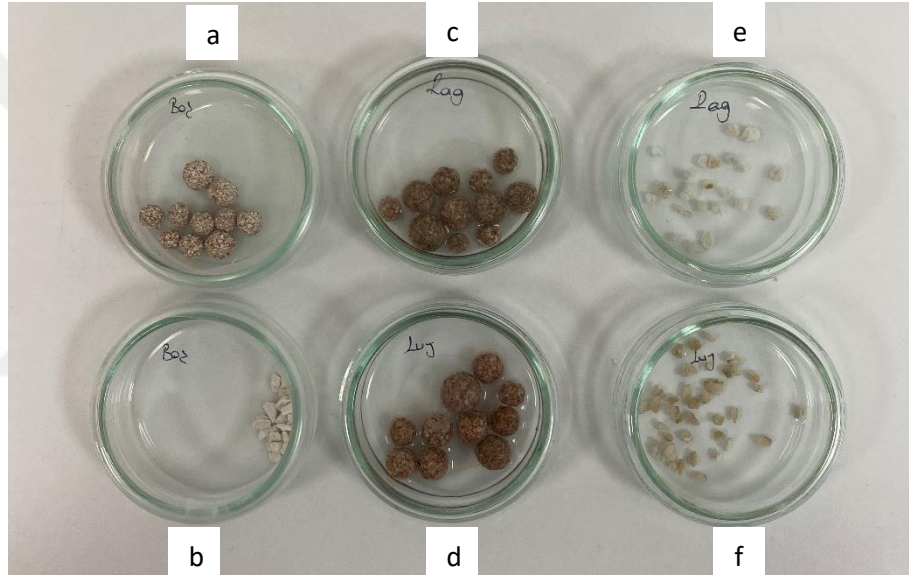
Tez çalışmasında kullanılan saf kültürlerin (*Clostridium ljungdahlii* ve *Clostridium ragsdalei*) üç farklı immobilizasyon materyali (seramik top, ponza ve zeytin çekirdeği biyokömürü) üzerine tutunmalarını gözlemlemek amacıyla SEM ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Thermo Scientific Apreo S cihazında Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (MATAL) Görüntüleme ve İç Yapı Analiz Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Analizi yapılacak olan numunede, mekanik ve termal kararlılığı arttırmak için proteinleri çapraz bağlamak amacı ile sabitleme işlemi yapılmıştır. Ardından kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kritik nokta kurutması ile numune görüntülemeye hazır hale getirilerek kaplama işlemi ile iletken hale getirilmiştir ve SEM Analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 9. SEM Analizi için Akış Şeması

Numune Hazırlık

İmmobilize materyal üzerine tutunmuş olan bakterileri görüntüleyebilmek için numuneler öncelikle sabitleme işlemine tabi tutulmuştur. 1 saat boyunca oda sıcaklığında steril fosfat tampon çözeltisi (PBS: Phosphate Buffer Solution) ile hazırlanmış %4'lük glutaraldehid ile sabitleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Numuneler etanol serisinden (%20, %30, %50, %70, %90, %100) geçirilmeden önce bir gece 4°C'de bekletilmiştir (Bajracharya et. al., 2015). Numuneler, EGEMATAL Elektron Mikroskopi Hizmet Birimi bünyesindeki SEM numune hazırlama laboratuvarlarında bulunan Leica EM CPD300 Kritik Nokta Kurutma Cihazında kurutulmadan hemen önce etanol serisinden geçirilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3. 10. Kritik nokta kurutma cihazında kurutulmak üzere hazırlanmış numuneler

a) Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal seramik top, b) Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal ponza, c) *Clostridium ragsdalei* ile yapılmış çalışmada kullanılan immobilize materyal seramik top, d) *Clostridium ljungdahlii* ile yapılmış çalışmada kullanılan immobilize materyal seramik top, e) *Clostridium ragsdalei* ile yapılmış çalışmada kullanılan immobilize materyal ponza, f) *Clostridium ljungdahlii* ile yapılmış çalışmada kullanılan immobilize materyal.

Kritik Nokta Kurutucu Leica EM CPD300

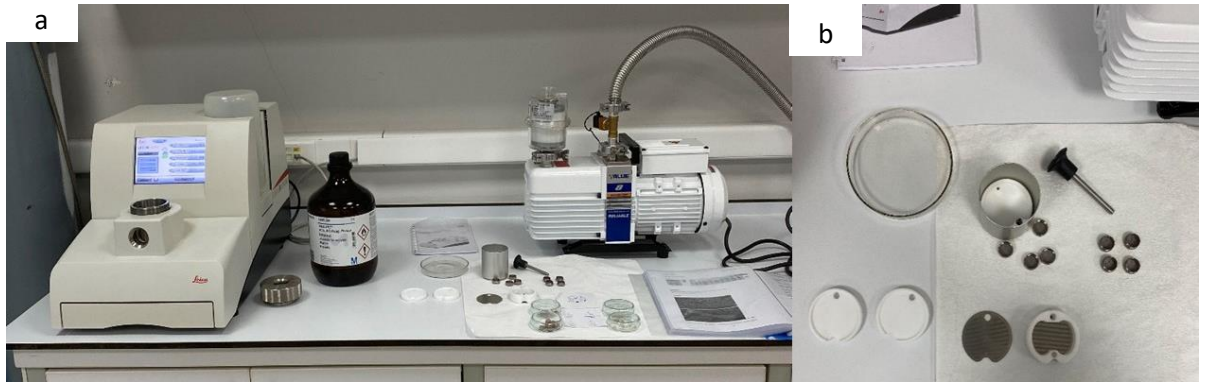
Biyolojik örneklerdeki SEM kullanımında, incelenecek olan numunenin dehidrasyonu, cihazın vakum özelliğine uygun olması ve numune yüzeyinden verimli görüntü alınabilmesi adına çok önemlidir. Biyolojik numunelerin oda koşullarında veya evaporasyon ile kurutulması

numune morfolojisine zarar vermektedir. Bu sebeple, kritik nokta kurutması numune morfolojisinin korunması adına SEM görüntülemeye başvurulmuş örnek hazırlama metodudur.

Bu metod için Leica EM CPD300 marka Automated Critical Point Dryer (Otomatik Kritik Nokta Kurutucu) kullanılmıştır. Cihazda İnce gözenekli (0.5 mm) küçük numune tutucu ve bunların içine yerleşebileceği büyük bir ince gözenekli numune tutucu mevcuttur. Otomatik kritik nokta kurutucu, biyolojik örneklerdeki suyun, basınç altında sıvı CO₂ ile yer değiştirmesi prensibine bağlı olarak çalışır. Bu süreçte etanol ya da aseton gibi bir ara değişim sıvısının desteği kullanılmaktadır. Daha sonra sıvı CO₂ gaz fazına geçirilerek numunenin kurutulması tamamlanmış olup ve görüntülemeye hazır hale gelmektedir.



Şekil 3. 11. Kritik nokta kurutucu Leica EM CPD300



Şekil 3. 12. a) Kritik nokta kurutucu işlem düzeneği, b) Kritik nokta kurutucu cihazı numune tutucuları

EGEMATAL Elektron Mikroskopi Hizmet Birimi bünyesindeki SEM numune hazırlama laboratuvarlarında bulunan Leica EM CPD300 Kritik Nokta Kurutma Cihazı ile numuneler kurutularak SEM görüntülemelerinin yapılması için kaplama işlemine hazır hale getirilmiştir.

Kaplama Cihazı Leica EM ACE600

Kaplama cihazında argon gazı ve küçük bir elektrik alan kullanmaktadır. Numune vakumlu olan küçük bir odaya yerleştirilmiştir. Argon gazı atomları pozitif yüklü olması için yani iyon haline getirmek için bir elektriksel alan yardımıyla bir elektronun argon atomlarından uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından iyonlar negatif yüklü bir altın-paladyum folyo parçasına çekilir. Ar iyonları, bir kumlama makinesinden çıkan kum tanesi gibi hareket eder ve folyo yüzeyinden altın atomlarını vururlar. Bu altın atomları numune yüzeyine yerleşir ve bir altın kaplama oluşturur. %80 Au ve %20 Pd içeren hedef plaka ile 5 nm - 15 nm kalınlığında yüzey kaplama işlemi yapılmıştır.



Şekil 3. 13. Kaplama cihazı Leica EM ACE600

Numuneler iletkenliğin sağlanması için Leica EM ACE600 kaplama cihazı ile altın/paladyum (Au/Pd) ile kaplanarak SEM görüntülemelerinin yapılması için hazır hale gelmiştir (Şekil 3.13).

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Thermo Scientific Apreo S

Taramalı elektron mikroskobu, alan emisyonlu (FEG) tabancadan çıkan elektronların incelenecek malzeme yüzeyine gönderilmesi sonucu oluşan etkileşimlerden yararlanılması

esasına dayanır. Bir taramalı elektron mikroskopunda görüntü oluşumu temel olarak; elektron demetinin incelenen örneğin yüzeyi ile yaptığı fiziksel etkileşmelerin sonucunda ortaya çıkan sinyallerin toplanması ve incelenmesi prensibine dayanır. Cihaz ETD (SE), T1 (In-Column BSE)- T2 (In-Column SE), geri çağrılabilen BSE, EBIC, STEM, LVD, EDS dedektörlerine sahiptir. Numune haznesi iç çapı: 340 mm'dir. Schottky FEG elektron tabancası kullanılmıştır (Şekil 3.14).



Şekil 3. 14. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Thermo Scientific Apreo S

3.1.8 XRF analizi

Ölçümler, Mineral kompozisyon X-ışını floresan spektrofotometresi (Rigaku, Nex CG, Almanya) kullanılarak Pd anot x-ray tüpü, SDD dedektör ile atmosferik koşullarda, ikincil hedef otomatik seçilerek Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (MATAL) Kromatografi ve Spektroskopi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.9 EBCT (Empty Bed Contact Time)

Beslenen gazın biyoreaktörden aynı hızda geçtiği varsayılarak, kullanılacak gazın biyoreaktör içerisindeki muamele ortamı ile temas halinde olduğu sürenin bir ölçüsüdür. Reaktan gazların biyoreaktörde kaldığı ortalama süre hakkında bilgi sağlar. EBCT, boş biyoreaktör hacminin akış hızına bölünmesi ile hesap edilir.

$$\text{EBCT (saat)} = \frac{V_R \text{ (mL)}}{\text{Gaz Besleme Hızı} \left(\frac{\text{mL}}{\text{saat}} \right)}$$

V_R : Biyoreaktör boş hacmi

3.1.10 GHSV (Gas Hourly Space Velocity)

GHSV, gaz akış hızının biyoreaktör hacmiyle ilişkilendirilmesi için bir yöntemdir. GHSV genellikle standart sıcaklık ve basınçta ölçülür. Katalitik gaz akış reaksiyonunu ifade eder. Biyoreaktör performanslarının karşılaştırılması için kullanılmaktadır.

$$\text{GHSV (saat}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Gazın Hacimsel Akış Hızı} \left(\frac{\text{mL}}{\text{saat}} \right)}{\text{Reaktör Hacmi (mL)}}$$

3.1.11 Etkin yüzey alanı

Gaz-sıvı kütle transferi için etkin yüzey alanı, reaksiyon hacmi ile reaksiyonun gerçekleştiği yüzey alanı arasındaki ilişki olarak tanımlanır (Thema et. al.,2019)

$$a_{\text{eff}} \text{ (m}^{-1}\text{)} = \frac{A}{V}$$

A: Reaksiyonun gerçekleştiği yüzey alanı (m^2)

V: Reaksiyon hacmi (m^3)

3.1.12. Gram boyama

Bir bakteri örneğinin gram pozitif ya da gram negatif ayrımının yapılarak türün belirlenmesinde kullanılan ilk aşama olan gram boyama tekniği kontamine olduğu düşünülen biyoreaktörlerden alınan numuneler üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Boya olarak kristal viyoleto (mor), gram iyodür (sarı), etil alkol ve safranin (kırmızı) kullanılmıştır. Kontaminasyonun engellenmesi için ateş başında steril lam üzerine örnek öze yardımı ile yayılmıştır. Örnek ateşten geçirilerek fikse edilmiştir. Ateşten geçirme işlemi uzun süre gerçekleşirse preparattaki bakterinin hücre çeperi bozulacaktır. Bu sebeple fiksasyon

işlemi sırasında ateşe tutma işlemi saniyelik olmalıdır. Örnek lam üzerinde kuruduktan sonra kristal viyole pasteur pipet yardımı ile örnek üzerine dökülmüştür. 1 dakika beklendikten sonra lam üzerinden saf su geçirilmiştir. Ardından gram iyodür 1 dakika süre ile, etanol 15 sn süre ile, safranin 30 sn süre ile lam üzerinden geçirilmiştir. Ardından kuruyan lam mikroskop altında incelenmek üzere hazır hale gelmiştir.

Prosedürde Kristal viyole gram pozitif bakterilerin boyanmasını sağlarken gram iyodür kristal viyolenin gram pozitif bakterilerin hücre çeperlerine fiksasyonunu sağlamaktadır. Etil alkol hücre çeperinin içerisindeki boyaların çözülerek hücre dışına dağılmasını sağlar. Safranin gram negatif bakterilerin boyanmasını sağlar.

3.2 Saf CO Gazı ve Sentez Gaz Karışımı Hazırlanması

Saf CO Tüpü 10 L hacmindedir ve krom CO için özel regülatöre sahiptir (Şekil 3.15).



Şekil 3. 15. Kullanılan saf CO gazı tüpü

Hazır sentez gaz Linde Gaz A.Ş firmasına literatürde kullanılan gaz içerikleri örnek alınarak hazırlanmıştır. Gazın içeriği %60 CO, %10 CO₂, %10 N₂, %10 CH₄ ve %10 H₂ şeklindedir. Tüp 690 L hacmindedir ve krom CO için özel regülatöre sahiptir (Şekil 3.16).



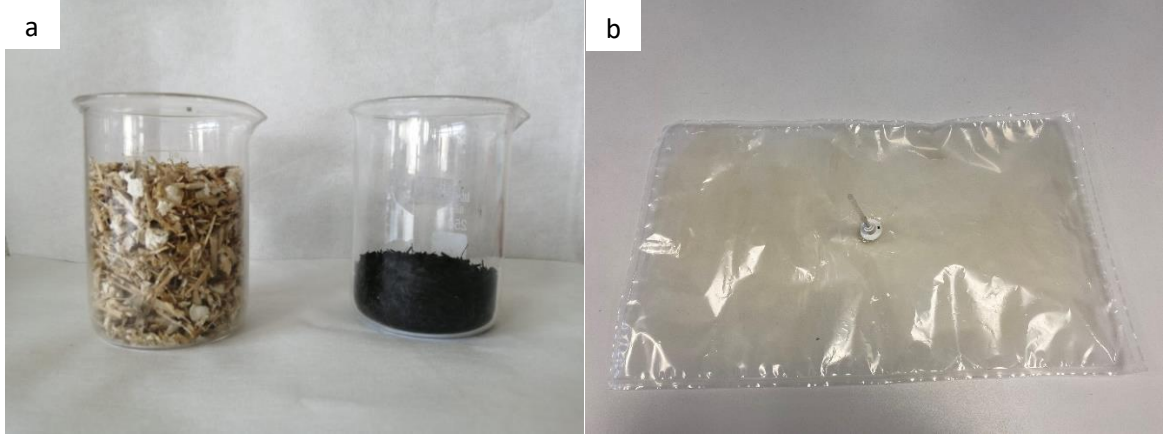
Şekil 3. 16. Kullanılan hazır sentez gaz tüpü

3.3 Piroliz Gazı Eldesi İşlemleri

Piroliz gazı eldesi laboratuvar tipi sabit yatak piroliz reaktöründe ($V=1L$) Ege Üniversitesi Kimya Bölümü Endüstriyel Organik Laboratuvarında Doç. Dr. Gözde DUMAN yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 50 g kurutulmuş ayçiçek parçaları yüklenen reaktör dikey fırına yerleştirilmiştir (Şekil 3.17). Reaktör çıkışı su buz banyosuyla soğutulan tuzaklara bağlandıktan sonra reaktör $10\text{ }^{\circ}\text{C/dk}$ ısıtma hızıyla 350°C kadar ısıtılmış ve bu sıcaklıkta 1 saat bekletilmiştir. Piroliz deneyleri sırasında ortamdan oksijeni uzaklaştırmak amacı ile 200°C 'ye kadar sistemden azot gazı geçirilmiştir. 200°C sonra azot gazı kesilerek piroliz kendi ürettiği gaz ortamında gerçekleştirilmiştir. Piroliz sırasında oluşan uçucu bozunma ürünleri buz-su ile soğutulan tuzaklardan geçirilip sıvı ürün yoğunlaştırılmıştır. Etanol üretimi için kullanılacak olan gazlar ise azot gazının kesildiği andan itibaren “Tedlar bag” içinde toplanmıştır (Şekil 3.18b) Gazın içeriği %20 CO, % 49.73 CO₂, % 29.4 N₂ ve % 0.06 H₂ şeklindedir Tedlar bag içerisinde piroliz gazı en iyi sonuçlara göre hazırlanan reaktörlerin üzerine çeker ocak içerisinde basılmıştır.



Şekil 3. 17. Piroliz reaktörü



Şekil 3. 18. (a)Piroliz öncesi ve sonrası solda Aycicek parçaları sağda biyokömür, (b) Tedlar bag içerisinde piroliz gaz

3.4 Çalışmalarda Kullanılan İmmobilize Materyaller

Kullanılan Seramik Top (Eheim Filter Media Substrat Pro) küre şekilli sinterit cam malzemeden imal edilmiş bir üründür. Küre şeklindeki yapısı sayesinde biyoreaktörü en etkin biçimde doldurur ve bakteri oluşumunu optimum oranda tutmaya yardımcı olur. Bakterilerin yaşama ve üreme ortamlarının oluşturulmasına imkân sağlar. Uzun süre deforme olmadan tekrar ve tekrar yıkanarak kullanılmaya imkân sağlayan bir yapısı vardır. Yüzey alanı 450 m²/L'dir ve 720 gr/L ağırlığı bulunmaktadır. Biyoreaktör içerisinde yaklaşık 190 gr (540 adet) seramik top kullanılmıştır.



Şekil 3.19. Seramik top

Kullanılan ponza taşı ülkemize özgü bir doğal taştır. Ülkemizde oldukça fazla oranlarda çıkan ve bu sebeple temini kolay olan bu taş düşük maliyetli ve yüzey alanı geniş olan bir malzemedir. Yüzey alanı $0.76\text{m}^3/\text{gr}$ 'dır. Biyoreaktör içerisinde yaklaşık 100 gr ponza taşı kullanılmıştır.



Şekil 3.20. Ponza taşı

Kullanılan zeytin çekirdeği biyokömürü S.S. Marmara Zeytin Tarım Satış Kooperatifleri Birliği'nden temin edilmiştir. Biyoreaktör içerisinde yaklaşık 112 gr (840 adet) Zeytin çekirdeği biyokömürü kullanılmıştır. Yüzey alanı ölçümü gerçekleştirilmemiştir.



Şekil 3. 21. Zeytin çekirdeği biyokömürü

3.5 *Clostridium ljungdahlii* ve *Clostridium ragsdalei* Liyofilizasyon İşlemleri

Çalışamlarda kullanılan *Clostridium ljungdahlii* ve *Clostridium ragsdalei* bakterileri İzmir Ekonomi Üniversitesi Analitik Kimya Laboratuvarı'nda Liyofilize edilerek İspanya La Coruna Üniversitesi Kimya Mühendisliği Laboratuvarına götürülmüştür.

Bakteriler liyofilizasyon işlemi için Skim Milk ile hazırlanmıştır. 100 gr Skim Milk 1L saf suda çözündürülmüş ve elde edilen çözelti 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Serum şişeleri içerisinde 1/1 oranında inokulum ile karıştırılmıştır. Numuneler -80°C'de 24 saat dondurulmuştur (Şekil 3.22). Dondurulan numuneler Labcoco marka liyofilizatörde -50°C'de ve 0.06 mbar vakum basıncıyla 24 saat süre ile kurutulmuştur (Şekil 3.23). Hazırlanan liyofilize bakterilerin bir kısmı serum şişelerinden ependorflara aktarılmıştır (Şekil 3.24).



Şekil 3. 22. Skim Milk ile bakterilerin liyofilizasyon işlemi için hazırlanması



Şekil 3.23. Liyofilizasyon işlemi a) Liyofilizatör, b) Liyofilizatör vakum pompası, c) Liyofilizatör numune haznesi, d) Liyofilizatör ekranı



Şekil 3. 24. Liyofilizasyon işlemi sonrası hazırlanmış liyofilize bakteriler

3.6 Kesikli Beslemeli Biyoreaktörlerin Hazırlanması

Satın alınmış olan liyofilize stokların açılmasının ardından stoklama amaçlı pasajlama işlemi haftalık olarak devam ettirilmiştir. Kesikli biyoreaktör denemeleri laminar hava akışlı kabinde (TELSTAR II) steril koşullarda gerçekleştirilmiştir. 100 mL hacme sahip cam biyoreaktörler kullanılmıştır. 50 mL çalışma hacmine göre bütün hesaplamalar yapılmıştır. %10 inokülasyon yapılarak 5 mL inokulum biyoreaktör ortamına eklenmiştir. 24-48 saat boyunca 30-37°C’de 150 rpm karıştırılmalı inkübatörde bekletilmiştir. Böylelikle aktiveleştirme işlemi gerçekleştirilerek mikroorganizmanın devamlılığı sağlanmaktadır (Şekil 3.25).

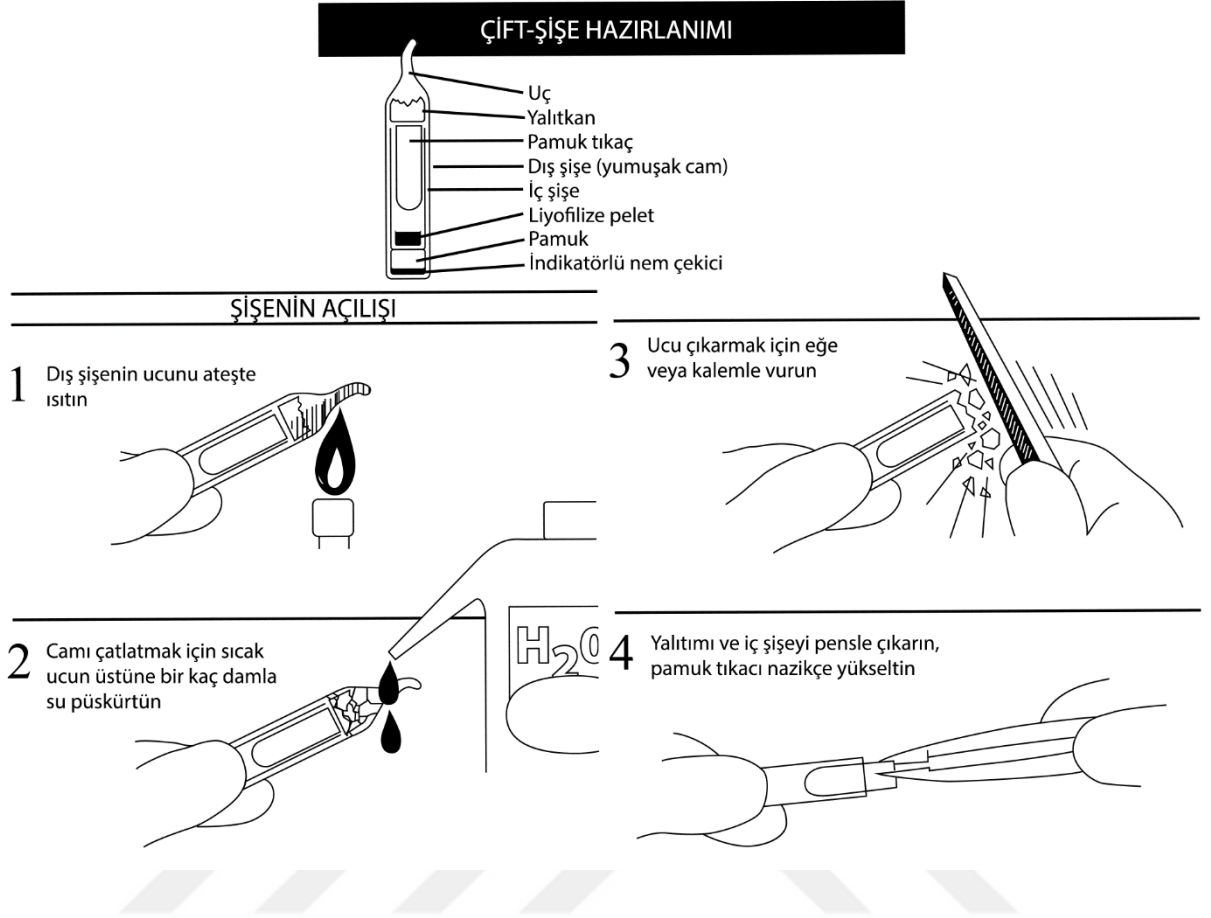


Şekil 3.25. Laminar akışlı kabinde reaktörlerin hazırlanması

3.7 *Clostridium Ljungdahlii* ile Yapılan Kesikli Biyoreaktör Çalışmaları

3.7.1 *Clostridium ljungdahlii*’nin büyütülmesi ve stoklanması

Kullanılacak *Clostridium ljungdahlii* bakterisi German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) şirketinden satın alınmıştır. Bakteri liyofilize stoktan canlandırılmıştır. Bunun için mikroorganizma ile birlikte gelen reçete kullanılmıştır.



Şekil 3. 26. Liyofilize mikroorganizmayı canlandırma işlemi

DSMZ'den satın alınarak gelen vial tüpü steril koşullarda bek alevinde ısıtılmıştır. Daha sonra talimatlarda belirtildiği üzere üzerine birkaç damla saf su damlatılmıştır ve kılcal boru çatlatılmıştır. Üzerine sert bir cisimle vurularak cam kırılmıştır ve steril cımbız yardımı ile pamuk kısmı çekilerek liyofilize mikroorganizma örneklerine ulaşılmıştır. Ardından tüp içerisindeki katı formda bulunan mikroorganizma örnekleri üzerine mikroorganizma için özel olarak hazırlanmış olan besin ortamı eklenerek karıştırılmıştır. Mikroorganizma ile karışmış olan besin ortamı steril şırınga ile çekilerek daha önce hazırlanmış olan petri ortamlarına dökme veya çizgi ekim metodu ile ekilmiştir. Aynı zamanda sıvı kültür tüplerine ve sıvı kültür reaktörlerine de ekim işlemi gerçekleştirilmiştir.

Canlandırma işleminde DSMZ tarafından önerilen ortam kullanılmıştır. 100 ml'lik cam şişelerde sıvı ortamın hazırlanmasının ardından kauçuk tıpa ile kapatılmış ve alüminyum yüzük ile tıplar sıkıştırılmıştır. Tüm kültürlerde anaerobik ortam saf azot gazı ile sağlanmıştır. Canlandırma sonrasında tüpte katı kültür, petride katı kültür ve sıvı kültüre aktarım yapılmıştır.

(Şekil 3.27). İnkübasyon işlemi petriler için anaerobik jar içine konularak 37°C etüvde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.28).



Şekil 3. 27. *Clostridium ljungdahlii* 'nin canlandırma ve stoklanması



Şekil 3. 28. *Clostridium ljungdahlii* 'nin inkube edilmesi



Şekil 3. 29. İnokule edilmiş ve edilmemiş ortamlar

3.7.2 *Clostridium ljungdahlii*'nin büyüme eğrisinin çıkarılması

Literatüre bakıldığında *Clostridium ljungdahlii* bakterisinin büyüme ortamlarının farklılık gösterdiği görülmektedir. DSMZ'den alınan bakterilerin önerilen reçete dışında farklı reçeteler kullanılarak büyüme performansları karşılaştırılmıştır.

DSMZ Ortamı için NH_4Cl (1 g/L), KCl (0.1 g/L), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g/L), NaCl (0.8 g/L), KH_2PO_4 (0.1 g/L), $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0.02 g/L), Maya ekstraktı (1 g/L) çözeltisi serum şişelerine 45'er mL paylaştırılmıştır. Kabin içerisinde %10'luk Stok Na-resazurin (500 $\mu\text{L/L}$), NaHCO_3 (10mL/L), L-cysteine (3 mL/L), $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ (10 mL/L), iz element (10 mL/L) çözeltileri ilave edilmiştir. Ortamın anaerobikleştirilmesi azot gazı ile sağlanmıştır. Sterilizasyon 121°C'de 20 dakika yapılmıştır. Sterilizasyon sonrası biyoreaktörlere fruktoz (50 mL/L) ve vitamin çözeltisi (10 mL/L) ilave edilmiştir. Biyoreaktörler %10'luk inokülasyon yapılarak 37°C çalkalamalı etüve aktarılmıştır. Her gün alınan numunelerde OD_{600} ile bakterinin büyüme grafiği oluşturulmuştur.

Modifiye ATCC1 Ortamı için Proteoz Pepton (10 g/L), Et ekstraktı (10 g/L), Maya ekstraktı (3 g/L) çözeltisi serum şişelerine 45'er mL paylaştırılmıştır. Kabin içerisinde %10'luk Stok Na-resazurin (500 $\mu\text{L/L}$), L-cysteine (3 mL/L), İz element (10 mL/L) ve tuz (50 mL/L) çözeltisi ilave edilmiştir. Ortamın anaerobikleştirilmesi için şişelerden azot gazı geçirilmiştir. 121°C'de 20 dakika sterilizasyon yapılmıştır. Soğuyan şişelere Fruktoz (50 mL/L) ve Vitamin (10 mL/L) ilave edilmiştir. Ardından %10'luk inokülasyon yapılarak 37°C çalkalamalı etüve konulmuştur. Her gün alınan numunelerden bakılan OD_{600} ile bakterinin büyüme grafiği oluşturulmuştur.

Modifiye ATCC2 Ortamı, Modifiye ATCC1 ortamından pahalı bir kimyasal olan Proteoz Pepton çıkarılarak oluşturulmuştur.

DRCM *Clostridium* Broth Ortamı için 27.5 g/L DRCM *Clostridium* Broth çözeltisi serum şişelerine 45'er mL paylaştırılmıştır. Kabin içerisinde %10'luk Stok Na-resazurin (500 µL/L), L-cysteine (3 mL/L), İz element (10 mL/L) ve tuz (50 mL/L) çözeltisi ilave edilmiştir. Ortamın anaerobikleştirilmesi Azot gazı ile sağlanmıştır. 121°C'de 20 dakika sterilizasyon yapılmıştır. Soğuyan şişelere Fruktoz (50 mL/L) ve Vitamin çözeltisi (10 mL/L) ilave edilmiştir. Ardından %10'luk inokulasyon yapılarak 37°C çalkalamalı etüve konulmuştur. Her gün alınan numunelerden bakılan OD₆₀₀ ile bakterinin büyüme grafiği oluşturulmuştur.



Şekil 3. 30. (a) Büyüme ortamları sırası ile DSMZ, Modifiye ATCC1, Modifiye ATCC2, *Clostridium* Broth, (b) Kabin içerisinde steril Stok Na-resazurin, L-cysteine, Trace ilave edilmiş, tıpa ve alüminyum yüzük ile ağızları kapatılmış, azot gazı ile anaerobikleştirilmiş büyüme ortamları, (c) *Clostridium ljungdahlii* büyümesinin gözlemlendiği ortamlar sırası ile DSMZ, Modifiye ATCC1, Modifiye ATCC2, *Clostridium* Broth,

3.7.3 *Clostridium ljungdahlii* ile biyoetanol üretiminde optimum CO miktarının belirlenmesi

Optimizasyon çalışmalarında kullanılacak karbon monoksit miktarı belirlenmesi için bir seri çalışma gerçekleştirilmiştir. Bunun için çalışma ortamlarına 5 mL, 10 mL ve 20 mL karbon monoksit (CO) eklenerek denemeler gerçekleştirilmiştir. 50 mL çalışma hacmi olan biyoreaktörler 2 tekrarlı hazırlanmıştır. Her gün OD, etanol ve asetik asit üretimleri incelenmiştir (Şekil 3.31).



Şekil 3. 31. Optimum CO miktarının belirlenmesi denemesi

3.7.4 *Clostridium ljungdahlii* ile biyoetanol üretiminde iz element etkilerinin incelenmesi

Sentez gazdan biyoetanol üretiminde kullanılacak bazal ortamların bileşenleri yüksek saflıkta ve pahalı kimyasallar olduğundan literatürdeki önerilen değerlerden daha düşük konsantrasyonlardaki değerlerin kullanılabilecek olması proses maliyetlerinin düşürülmesine önemli katkı sağlayacaktır. Bu çalışmada en etkili iz elementlerin seçimi ve etkilerinin belirlenmesi için Plackett Burman istatistiksel tasarım yöntemi kullanılmış ve deneme deseni oluşturulmuştur. Kullanılan iz elementlerin konsantrasyon aralıklarına literatüre göre karar verilmiştir. Bu çalışmada kullanılan iz elementlerin maksimum değerleri; Fe (0,8 g/ L); Co 0,2 g/ L); Cu (0.1 g/ L); Mn (1 g/ L), Mo (0.02 g/ L), Ni (0.02/ L), Ca (0.1 g/ L), W (0.02 g/ L), Zn (0.2 g/ L), B (0.01 g/ L) ve Mg (3 g/ L) (Najafpour et al., 2006; Cotter et al., 2009; Kim et al., 2014; Aghbashlo et al., 2015; Xie et al., 2015; Aghbashlo et al., 2016) şeklinde ve minimum değerleri 0 mg/L olarak belirlenmiştir. Plackett-Burman tasarımında her deneysel çalışma için önerilen konsantrasyon kombinasyonları Tablo 3.2’de listelenmiştir.

Tablo 3. 2 İz element içerikleri için optimizasyon deney tasarımı değerleri

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Factor 8	Factor 9	Factor 10	Factor 11	Response 1
Std	A:NaMoO4.2H2O	B:Na2WO4*2H2O	C:FeSO4*7H2O	D:ZnSO4*7H2O	E:NiCl2*6H2O	F:MgSO4*7H2O	G:MnSO4*H2O	H:CoCl2*6H2O	J:CaCl2H2O	K:CuCl2*2H2O	L:H3BO3	EtOH
	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	mg/L
1	0.02	0.02	0.00	0.20	0.02	3.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	
2	0.00	0.02	0.80	0.00	0.02	3.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.01	
3	0.02	0.00	0.80	0.20	0.00	3.00	1.00	0.20	0.00	0.00	0.00	
4	0.00	0.02	0.00	0.20	0.02	0.00	1.00	0.20	0.10	0.00	0.00	
5	0.00	0.00	0.80	0.00	0.02	3.00	0.00	0.20	0.10	0.10	0.00	
6	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	3.00	1.00	0.00	0.10	0.10	0.01	
7	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	1.00	0.20	0.00	0.10	0.01	
8	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	3.00	0.00	0.20	0.10	0.00	0.01	
9	0.02	0.02	0.80	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.10	0.10	0.00	
10	0.00	0.02	0.80	0.20	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	0.10	0.01	
11	0.02	0.00	0.80	0.20	0.02	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.01	

DSMZ 879 *Clostridium ljungdahlii* reçetesine göre hazırlanan iz element çözeltisi içerisindeki Ni, Mg, Ca, Mn, Co, Cu, B, W, Zn, Fe ve Mo'nun miktarları oluşturulan deneme desenine göre değiştirilmiştir ve 11 farklı iz element çözeltisi oluşturulmuştur. Tüm biyoreaktörlere 1.5 gr/L nitriloasetik asit ve 1 gr/L NaCl sabit olarak eklenmiştir. Kesikli biyoreaktör denemeleri 2 paralel halinde tekrarlanmıştır (Anggraini et al., 2018). Biyoreaktörler %10'luk (v/v) inokülasyon ile hazırlanmıştır. Bakterilerin büyüdüğünün gözlemlendiği üçüncü günde substrat olarak kullanılmak üzere optimum miktar olarak belirlenen 10 mL sentez gaz ve başka bir deney setine de 10 mL saf CO enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir (Gunay et al., 2020). Enjeksiyon sonrasında şişelerden OD ve etanol analizi için ateş başında numune alınmıştır. Analizler numunenin alındığı gün gerçekleştirilmiştir. Aynı gün gerçekleştirilemeyen etanol analizleri için numuneler -4°C'de muhafaza edilmiştir. Deney setlerinin sonuçları Design Expert 7.0, (StatEase®, ABD) programı kullanılarak analiz edilmiştir. (Şekil 3.32).



Sekil 3. 32. *Clostridium ljungdahlii* ile iz element denemesi

3.7.5. İleri İstatistikî Deneyisel Tasarım

İstatistiğin uygulanması, zamanla yapılan çalışmalar ile geliştirilmiştir ve bu geliştirilmiş alanlardan birisi deneyisel tasarımıdır. Deneyisel tasarımı, en az sayıda analiz ile maksimum miktarda bilgi toplamaya olanak sağlamaktadır. Bir süreci optimize etmek ve tekrar edilebilirliğini sağlamak için tarama çalışmaları gerçekleştirilir. Plackett-Burman deneyisel tasarımı bu tarama çalışmalarından biridir. 1946'da R.L. Plackett ve J.P. Burman tarafından geliştirilmiştir (Plackett et. al., 1946). Plackett-Burman tasarımı, ana etkileri analiz ederek bir yanıt parametresinin üretimindeki önemli değişkenleri tanımlayan ve tek bir deneyde birden fazla faktörün taranmasına izin veren bir tarama prosedürüdür (Vanaja et. al., 2007). Geleneksel deney tasarımı yaklaşımlardan daha az zaman ve daha az maliyet sunan etkin bir alternatiftir. İleri deneyisel tasarımıda Plackett-Burman yöntemi, yaygın olarak kullanılan bir tarama tekniğidir. Plackett ve Burman tarafından geliştirilen iki seviyeli bir kısmi faktöriyel tasarımı olan Plackett-Burman tasarımı için çalıştırma sayısı 4'ün katına eşittir. Plackett-Burman tasarımı, N deney sayısında $n = N-1$ 'e kadar faktörü inceleyebilir. Başka bir değişle örneğin 11 faktör için 12 adet deney yapılması gerekir. Tahmin edilen modelin varyans analizine (ANOVA) dayanarak, önemli faktörler tanımlanabilir (Wang et. al., 2009). Plackett-Burman tasarımıdan elde edilen deneyisel sonuçlara dayalı olarak, çeşitli faktörlerin etkilerini tanımlamak için aşağıdaki model kullanılır.

$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^k (\beta_i x_i)$$

y = yanıtıdır,

β_0 sabittir

β_i doğrusal katsayıdır

x_i belirlenen faktör seviyeleridir.

Üretim verimlerine eşit katkıda bulunmayabilecek çok çeşitli farklı kimyasalları içeren fermantasyon ortamı, önce sınırlı sayıda test kullanılarak verimli bir şekilde taranabilir (Benevenuti et. al., 2020; Keskin Gundogdu et. al., 2016). Plackett-Burman tekniği 11, 19, 20, 24 ve 31 faktörlü deneyisel tasarımlara sahiptir. Bu çalışmada en verimli iz elementler seçilmiştir ve biyokütle ve metabolit sentezi üzerindeki etkileri 11 faktörlü bir yaklaşım kullanılarak belirlenmiştir. Deney tasarımıda iz elementler için konsantrasyon aralıkları, literatürde bildirilen miktarlara göre belirlenmiştir.

3.7.6 *Clostridium ljungdahlii* ile en iyi koşullarda sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretimi

Clostridium ljungdahlii büyüme ortamı üzerinde çalışılarak elde edilen en iyi koşullar baz alınarak sentez gaz ve piroliz gaz uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

Deneme setlerinin ilki; DSMZ Ortamı için NH_4Cl (1 g/L), KCl (0.1 g/L), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g/L), NaCl (0.8 g/L), KH_2PO_4 (0.1 g/L), $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0.02 g/L), Maya ekstraktı (1 g/L) çözeltisi serum şişelerine 45'er mL paylaştırılmıştır. Kabin içerisinde %10'luk Stok Na-resazurin (500 $\mu\text{L/L}$), NaHCO_3 (10mL/L), L-cysteine (3 mL/L), $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ (10 mL/L), iz element (10 mL/L) çözeltileri ilave edilmiştir. Ortamın anaerobikleştirilmesi azot gazı ile sağlanmıştır. Sterilizasyon 121°C 'de 20 dakika yapılmıştır. Sterilizasyon sonrası biyoreaktörlere fruktoz (50 mL/L) ve vitamin çözeltisi (10 mL/L) ilave edilmiştir. Biyoreaktörler %10'luk inokülasyon yapılarak 37°C çalkalamalı etüve aktarılmıştır. Büyümenin tamamlandığı 48. saatte serum şişelerine şahitli olarak ayrı ayrı sentez gaz ve piroliz gazı 20 mL olarak uygulanmıştır. 20 mL hacmin belirlenmesinde saf CO ile yapılan denemede en iyi koşulların 10 mL olması ve sentez gazda %60 oranında CO bulunmasından faydalanılmıştır. Her gün alınan numunelerde etanol analizi yapılmıştır.

Sentez gaz için optimum iz element çalışması ile elde edilen reçete kullanılarak (0.02 g/L $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0.09 g/L $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) büyüme ortamları hazırlanmıştır. Büyümenin tamamlandığı 48. saatte serum şişelerine şahitli olarak ayrı ayrı sentez gaz ve piroliz gazı daha önceki çalışmalarda belirlenen optimum gaz miktarı ile beslenmiştir. Her gün alınan numunelerde etanol ve asetik asit analizi yapılmıştır. (Şekil 3.33).



Şekil 3. 33. *Clostridium ljungdahlii* en iyi sonuçlar denemesi

3.8 *Clostridium ragsdalei* ile yapılan kesikli biyoreaktör çalışmaları

Clostridium ragsdalei (ATCC-BAA-622) Amerikan kültür koleksiyonu olan ATCC (American Type Culture Collection)' den temin edilmiştir. Liyofilize halde temin edilen suşun canlandırılması *Clostridium ljungdahlii* ile aynı yöntemle ATCC ortamında 30°C'de 24 saat bekletilerek aktive edilmiştir (Şekil 3.34).

Kültürler ATCC ortamında %10 aktif kültürle inokule edilmiştir. Bu işlem bakterilerin canlılığını korumak için 2 haftada bir tekrarlanmıştır. ATCC ortamının içeriği 1 L için; 1 g NH_4Cl , 0.1 g KCl , 0.2 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.8 g NaCl , 0.1 g KH_2PO_4 , 0.02 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g yeast extract (maya ekstraktı), 10 mL iz element çözeltisi, 0.5 mL Na-resazurin çözeltisi (0.1% w/v), 1 g NaHCO_3 , 5 g D-Fruktoz, 10 mL vitamin çözeltisi, 0.3 g L-sistein.HCl $\times \text{H}_2\text{O}$, 0.3 g $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$. İz element çözeltisi (1 L için): 1.5 g nitriloasetik asit, 3 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 1 g NaCl , 0.1 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.18 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g H_3BO_3 , 0.3 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0.4 mg $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Vitamin çözeltisi (1 L için): 2 mg biotin, 2 mg folik asit, 10 mg pyridoxine-HCl, 5 mg Thiamin-HCl, 5 mg Riboflavin, 5 mg nicotinic asit, 5 mg D-Ca panthanoate, 0.1 mg Vitamin B12, 5 mg p-aminobenzoik asit, 5 mg lipoik asit. pH değeri 6.9 olarak ayarlanmıştır.



Şekil 3. 34. Liyofilize stoktan canlandırma işlemi

3.8.1 *Clostridium ragsdalei*'nin büyütülmesi ve stoklanması

Satın alınan liyofilize mikroorganizmayı canlandırma işleminden sonra aktif hale getirilen kültür tekrar aktifleştirme işlemi gerçekleştirilmek için her yeni deneme öncesinde 1754 PETC besin ortamında biyoreaktör şişelerine inokülasyonu yapılmıştır ve bu işlemten sonra yeni tarihli aşı kültürleri deney için kullanılmıştır. Laminer hava akışlı kabinde steril koşullarda işlemler gerçekleştirilmiştir. 100 mL hacme sahip cam biyoreaktörler kullanılmıştır. 50 mL çalışma hacmine göre bütün hesaplamalar yapılmıştır. %10 inokülasyon yapılarak 5 mL inokulum biyoreaktör ortamına eklenmiştir. 1-2 gün boyunca 30°C'de inkübatörde bekletilmiştir. Böylelikle aktifleştirme işlemi gerçekleştirilerek mikroorganizmanın devamlılığı sağlanmaktadır (Şekil 3.35).



Şekil 3. 35. Aktif *Clostridium ragsdalei* suşları

3.8.2 *Clostridium ragsdalei*'nin büyüme eğrisinin çıkarılması

Saf kültür OD çalışmaları spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kör olarak saf su kullanılmıştır. 2 mL'lik spektrofotometre küvetlerine 1 mL biyoreaktör içerisinden alınan sıvı örnek eklenerek analiz gerçekleştirilmiştir. *Clostridium ragsdalei*'nin büyüme eğrisinin çıkarılmasında 500 mL'lik biyoreaktörlerde aşağıdaki düzenekler kullanılmıştır. Büyüme ortamı koyulan biyoreaktörlerde N₂ ile anaerobikleştirme sağlanmıştır. 2 saatte bir örnek alınarak OD değerlerine bakılmıştır (Şekil 3.36).



Şekil 3. 36. *Clostridium ragsdalei* büyüme eğrisi düzeneği

3.8.3 *Clostridium ragsdalei* ile biyoetanol üretiminde optimum CO miktarının belirlenmesi

Biyoreaktörde kullanılacak karbon monoksit miktarı belirlenmesi için bir seri çalışma gerçekleştirilmiştir. Bunun için çalışma ortamlarına 5 mL, 10 mL ve 20 mL karbon monoksit (CO) eklenerek denemeler gerçekleştirilmiştir. Günlük olarak alınan örneklerde OD, pH, etanol ve asetik asit analizleri yapılmıştır (Şekil 3.37).



Şekil 3. 37. *Clostridium ragsdalei* ile biyoetanol üretiminde optimum CO miktarının belirlenmesi deney düzeneği

3.8.4 *Clostridium ragsdalei* ile en iyi koşullarda sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretimi

Clostridium ragsdalei büyüme ortamı üzerinde çalışılarak elde edilen en iyi koşullar baz alınarak sentez gaz ve piroliz gaz uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

Clostridium ragsdalei için önerilen ATCC 1754 PETC ortam içeriği kullanılmıştır. Ortamın anaerobikleştirilmesi azot gazı ile sağlanmıştır. Sterilizasyon 121°C'de 20 dakika

yapılmıştır. Biyoreaktörler %10'luk inokulasyon yapılarak 30°C çalkalamalı etüve aktarılmıştır. Büyümenin tamamlandığı 24. saatte serum şişelerine şahitli olarak ayrı ayrı sentez gaz ve piroliz gazı daha önceki çalışmalarda belirlenen optimum gaz miktarı ile beslenmiştir. Her gün alınan numunelerde etanol analizi yapılmıştır.

Sentez gaz için daha önceki çalışmalarda elde edilmiş olan optimum iz element reçetesi kullanılarak (0.5 g/L $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.09 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1.45 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.32 g/L $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0.08 g/L $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L H_3BO_3) büyüme ortamları hazırlanmıştır. Büyümenin tamamlandığı 48. saatte serum şişelerine şahitli olarak ayrı ayrı sentez gaz ve piroliz gazı daha önceki çalışmalarda belirlenen optimum gaz miktarı ile beslenmiştir. Her gün alınan numunelerde etanol analizi yapılmıştır. (Şekil 3.38).



Şekil 3. 38. *Clostridium ragdalei* en iyi sonuçlar denemesi

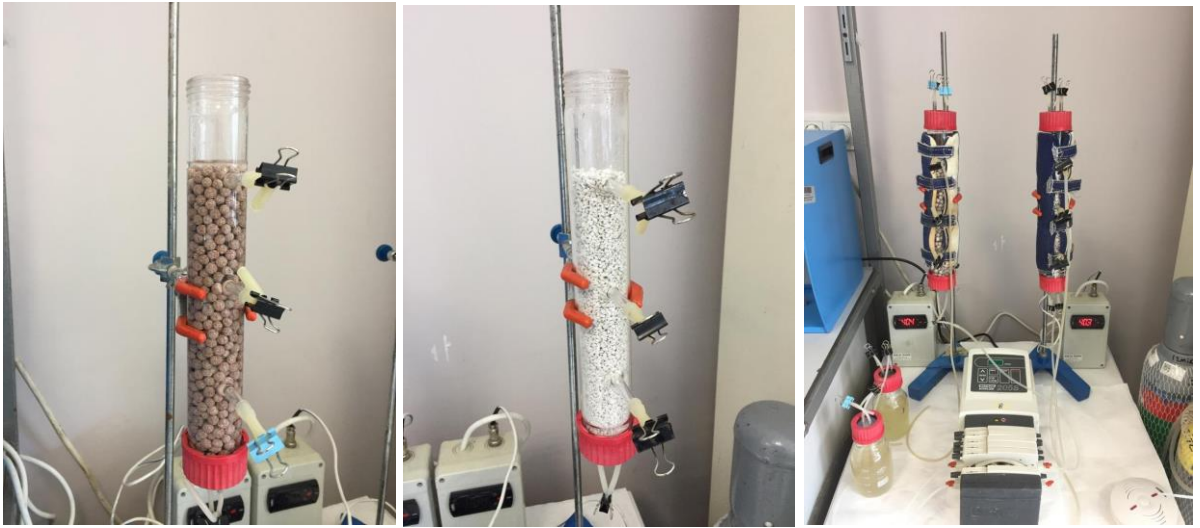
3.9 Kesikli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Düzenekleri

Kesikli beslemeli immobilize biyoreaktör denemeleri 300 mL hacimli cam biyoreaktörlerde 150 ml sıvı çalışma hacmi ile gerçekleştirilmiştir. Seramik top, ponza ve zeytin çekirdeği biyokömürünün immobilize materyal olarak kullanıldığı sistemler paralel olarak çalıştırılmıştır. Kesikli beslemeli biyoreaktör denemelerine her iki bakteri türünün kullanılacak malzemelere tutunma kapasiteleri incelenerek başlanmıştır. Bu amaçla yıkanmış immobilize malzemeler biyoreaktör içerisine doldurulmuş ve otoklav içerisinde sterilize edilmiştir (Şekil 3.39). Optimum bazal ortamın eklendiği inokulum çözeltisi aşağıdan yukarı akışla peristaltik

pompa aracılığı ile beslenmiştir ve giriş - çıkış sularından numune alınmıştır. Çevrim 48 saat aralıksız devam ettirilmiştir. Biyoreaktör sıcaklığı ısıtma ceketini ile sabit tutulmuştur. Günlük askıda katı madde değerleri ölçülerek tutunma kapasiteleri incelenmiştir. Tutunmanın sağlanmasının ardından biyoreaktörlere artan hacimlerde ($0.1 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ - $0.2 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$) sentez gaz beslemeleri yapılarak biyoetanol üretim performansları incelenmiştir. İmmobilize biyoreaktörlerle karşılaştırma yapmak amacıyla immobilize materyal içermeyen bir yukarı akış biyoreaktör de paralel olarak çalıştırılmış ve sonuçlar karşılıklı olarak incelenmiştir.



Şekil 3. 39. Sterilizasyon işleminde kullanılan Hirayama marka otoklav

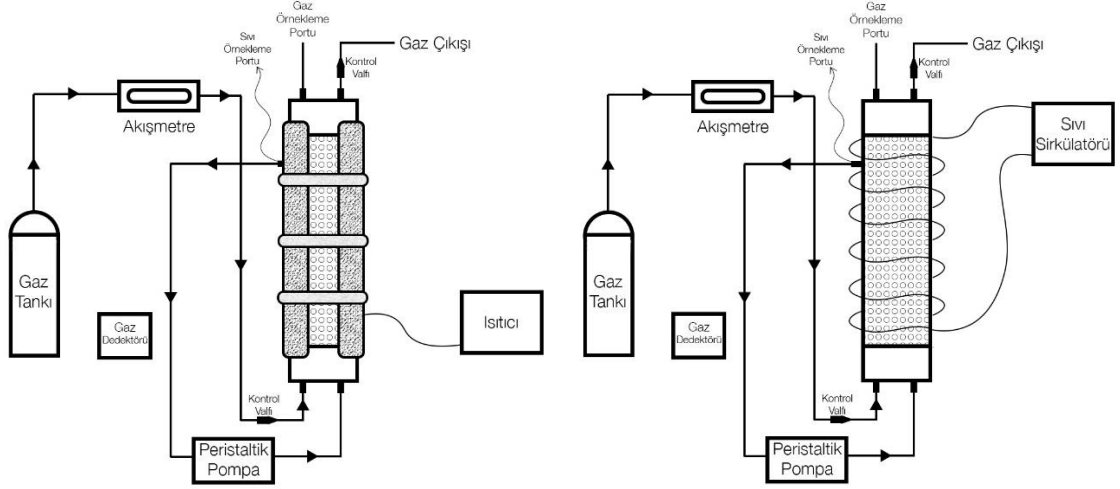


Şekil 3.40. (a) Kesikli beslemeli biyoreaktörler seramik top ve ponza taşı, (b) Kesikli beslemeli biyoreaktörler deney düzeneği



Şekil 3. 41. Biyokömürün immobilize materyal olarak kullanıldığı kesikli beslemeli immobilize biyoreaktör düzeneği

3.10 Sürekli Beslemeli İmmobilize Reaktör Düzenekleri



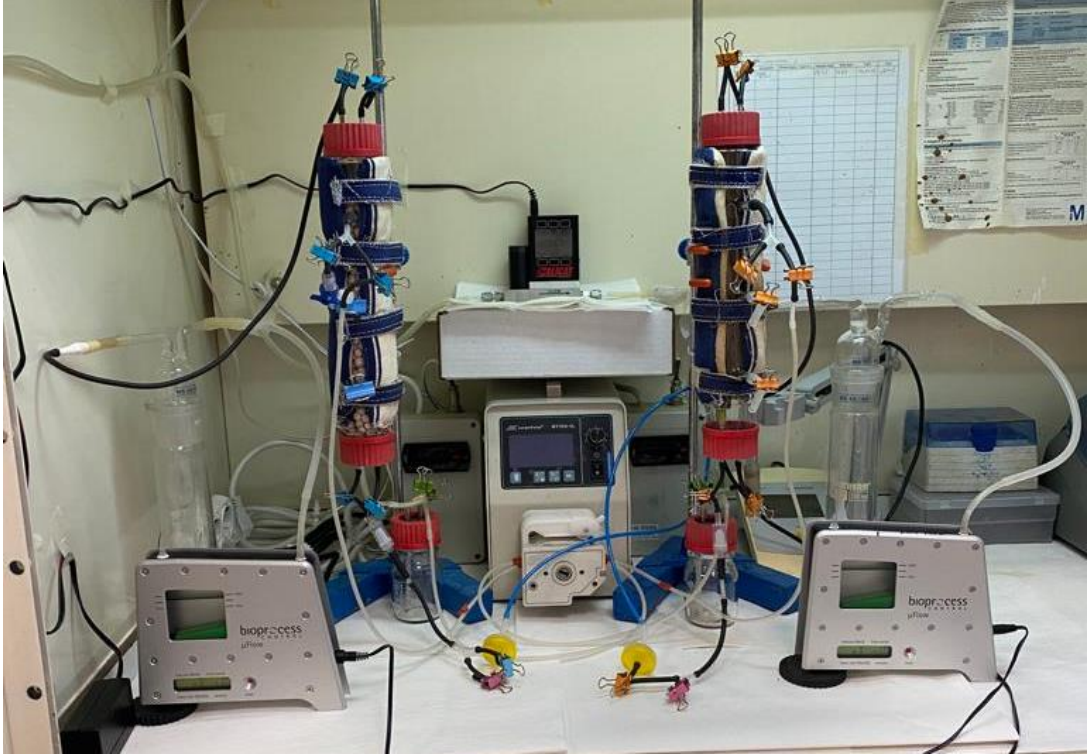
Şekil 3. 42. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör sistemi

Biyoeaktörün şematik açıklaması Şekil 3.42’de gösterilmiştir. Fermantasyon, anaerobik koşullar altında Wood-Ljungdahl yolu ile sürekli beslenen saf CO’dan ve sentez gaz

karışımından etanol üretebilen *Clostridium ragsdalei* ve *Clostridium ljungdahli* suşları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.10.1 *Clostridium ljungdahli* ile seramik top dolgulu sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör

Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör denemeleri 300 mL hacimli cam biyoreaktörlerde 150 mL sıvı çalışma hacmi ile gerçekleştirilmiştir. Yıkanmış, kurutulmuş, desikatörde bekletildikten sonra tartılmış immobilize malzeme (Seramik Top) biyoreaktör içerisine doldurulmuş ve otoklav içerisinde sterilize edilmiştir (Şekil 3.39). Optimum bazal ortamın eklendiği inokulum çözeltisi aşağıdan yukarı akışla peristaltik pompa aracılığı ile beslenmiştir ve giriş- çıkış sularından numune alınmıştır. Çevrim 48 saat aralıksız devam ettirilmiştir. Biyoreaktör sıcaklığı ısıtıcı ceketler ile sabit tutulmuştur (Şekil 3.43). Biyoreaktör içerisindeki fruktoz miktarının tükenmesinin ardından biyoreaktörlere $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3V_R/\text{gün}$ ve $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3V_{Rs}/\text{gün}$ sentez gaz besleme hızında Alicat marka kütle akış kontrol cihazı (Şekil 3.44) yardımı ile yapılarak biyoetanol üretim performansı incelenmiştir.



Şekil 3. 43. Sürekli beslemeli biyoreaktör deney düzeneği



Şekil 3.44. Kütle akış kontrol cihazı

3.10.2 *Clostridium ragsdalei* ile seramik top dolgulu sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör

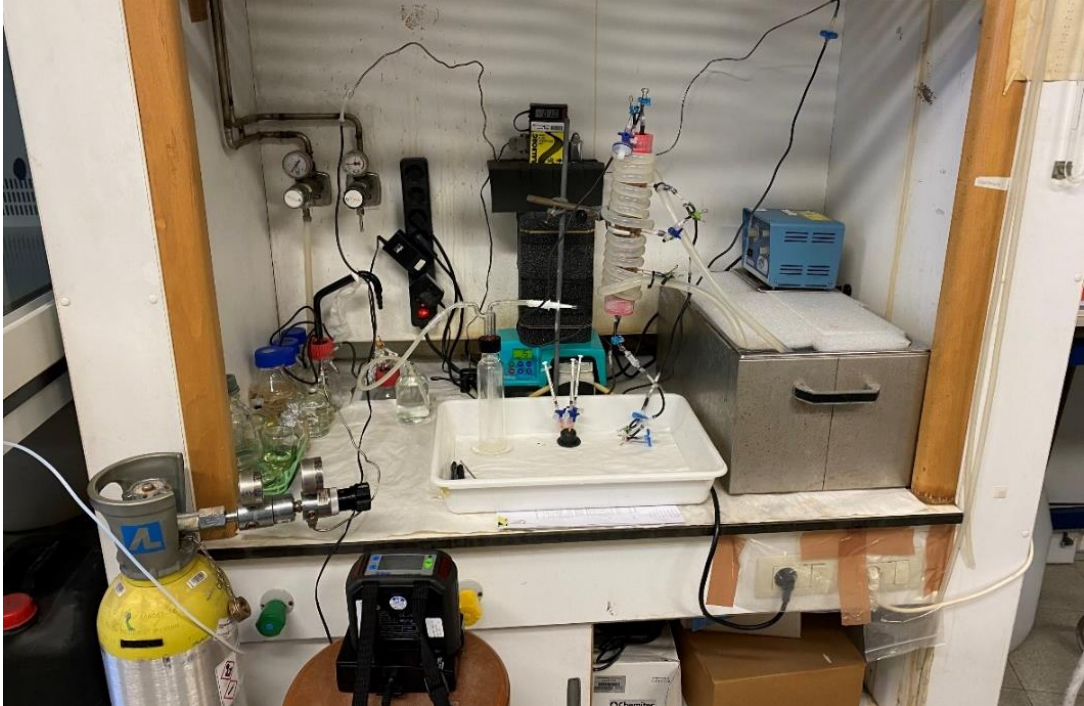
İspanya La Coruna Üniversitesi Kimya Mühendisliği Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör denemeleri 300 mL hacimli cam reaktörlerde 150 mL sıvı çalışma hacmi ile gerçekleştirilmiştir. Yıkanmış, kurutulmuş, desikatörde bekletildikten sonra tartılmış immobilize malzeme (Seramik Top) biyoreaktör içerisine doldurulmuş ve otoklav içerisinde sterilize edilmiştir (Şekil 3.45). Optimum bazal ortamın eklendiği inokulum çözeltisi aşağıdan yukarı akışla peristaltik pompa aracılığı ile beslenmiştir ve giriş - çıkış sularından numune alınmıştır. Çevrim 48 saat aralıksız devam ettirilmiştir. Biyoreaktör sıcaklığı sıvı sirkülatörü ile sabit tutulmuştur (Şekil 3.47). Biyoreaktör içerisindeki fruktoz miktarının tükenmesinin ardından biyoreaktörlere azalan besleme hızlarında ($48 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ ve $28.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$) saf CO gazı beslemesi Aalborg marka kütle akış kontrol cihazı (Şekil 3.46) yardımı ile yapılarak biyoetanol üretim performansı incelenmiştir.



Şekil 3.45. Sterilizasyon işleminde kullanılan Raypa marka otoklav



Şekil 3.46. Kütle akış kontrol cihazı

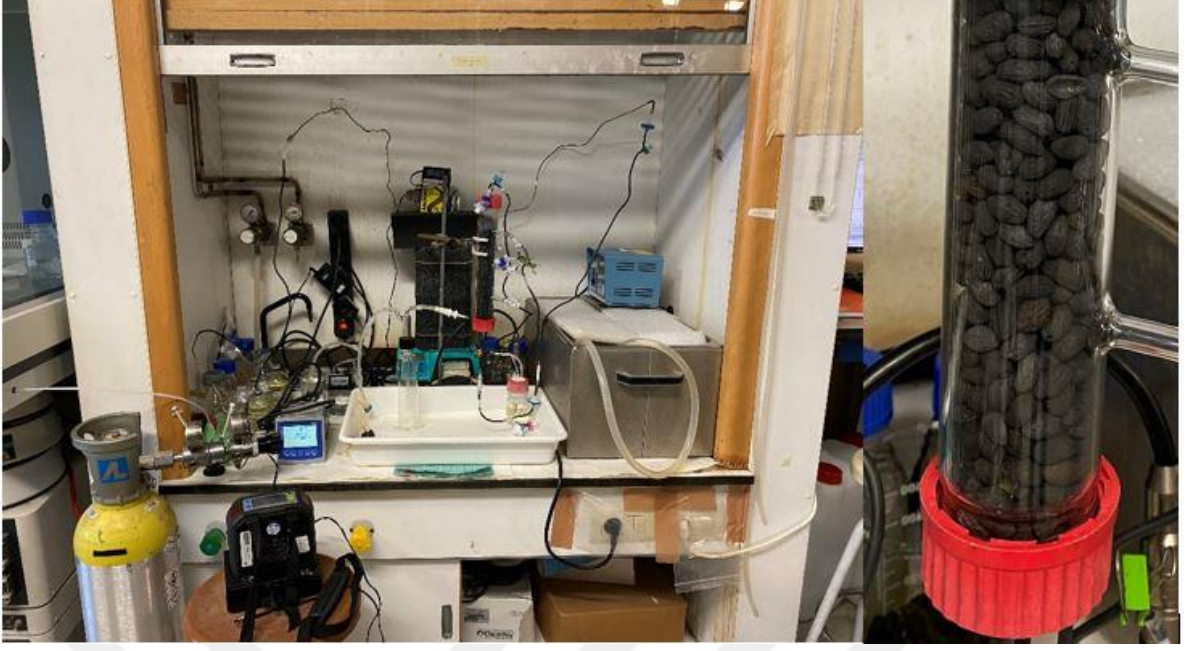


Şekil 3. 47. Sürekli beslemeli biyoreaktör deney düzeneği

Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Çevre Teknolojisi Laboratuvarında gerçekleştirilen sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör denemeleri 300 mL hacimli cam biyoreaktörlerde 150 mL sıvı çalışma hacmi ile gerçekleştirilmiştir. Yıkanmış, kurutulmuş, desikatörde bekletildikten sonra tartılmış immobilize malzeme (Seramik Top) biyoreaktör içerisine doldurulmuş ve otoklav içerisinde sterilize edilmiştir (Şekil 3.39). Optimum bazal ortamın eklendiği inokulum çözeltisi aşağıdan yukarı akışla peristaltik pompa aracılığı ile beslenmiştir ve giriş- çıkış sularından numune alınmıştır. Çevrim 48 saat aralıksız devam ettirilmiştir. Biyoreaktör sıcaklığı Şekil 3.43’de olduğu şekilde ısıtıcı ceketler ile sabit tutulmuştur. Biyoreaktör içerisindeki fruktoz miktarının tükenmesinin ardından biyoreaktörlere $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ ve $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz besleme hızında Alicat marka kütle akış kontrol cihazı (Şekil 3.44) yardımı ile yapılarak biyoetanol üretim performansı incelenmiştir.

3.10.3 *Clostridium ragsdalei* ile biyokömür dolgulu sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör

İspanya La Coruna Üniversitesi Kimya Mühendisliği Laboratuvarında gerçekleştirilen sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör denemeleri, çalışma hacmi 150 mL olan 300 mL hacimli, 4.5 cm çapında ve 30 cm yüksekliğinde, cam biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Yıkanıp kurutulduktan sonra tartılan immobilize materyal biyoreaktöre doldurulmuştur ve otoklavda sterilize edilmiştir (Şekil 3.45). Bazal ortamın eklendiği aşı çözeltisi peristaltik pompa ile aşağıdan yukarıya doğru beslenerek giriş ve çıkış sularından numuneler alınmıştır. Döngü, ara vermeden 48 saat sürdürülmüştür. Sıvı sirkülatörü ile biyoreaktör sıcaklığı 30°C ’de sabit tutulmuştur (Şekil 3.48). Biyoreaktördeki fruktoz miktarı tükendikten sonra, kütle akış kontrol cihazı yardımıyla biyoreaktöre $28.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ besleme hızında saf CO gazı beslenmiştir. Biyoetanol ve asetik asit üretim performansları incelenmiştir.



Şekil 3. 48. Biyokömür için sürekli besleme hareketsizleştirilmiş biyoreaktör kurulumu

Biyoreaktör ilk önce zeytin çekirdeği biyokömürü ile doldurulmuştur ve otoklavda (Raypa, Barselona-İspanya) 121°C’de 20 dakika sterilize edilmiştir. İnokulum ilavesinden hemen önce ve hemen sonra anaerobik ortam, biyoreaktördeki oksijeni uzaklaştırmak için en az 2 saat %99 saf azot ile yıkanmıştır. İnokulum çözeltisi peristaltik bir pompa ile aşağıdan yukarıya doğru beslenmiştir, giriş ve çıkıştan örnekler alınmıştır.

Biyoreaktörde tüketilen CO miktarını belirlemek için gaz çıkış noktasına ıslak tip gaz akış ölçer cihazı eklenmiştir (Şekil 3.49).



Şekil 3. 49. Islak tip gaz akış ölçer cihazı

Biyokömürün immobilize materyal olarak kullanıldığı biyoreaktör sistemine bir pH kontrolörü eklenmiştir. pH 4.7-5.3 arasında sabit tutulmuştur (Şekil 3.50).



Şekil 3. 50. pH kontrolörü (Mettler-Toledo AG- Undorf, İsviçre) ve prob (Hamilton)

3.11 Adsorpsiyon İzoterm Çalışması

Zeytin çekirdeği biyokömürünün etanol adsorpsiyon potansiyelini belirlemek için bir dizi serum şişesinde adsorpsiyon izoterm çalışması yapılmıştır.



Şekil 3.51. Serum şişelerinde adsorpsiyon izoterm çalışması

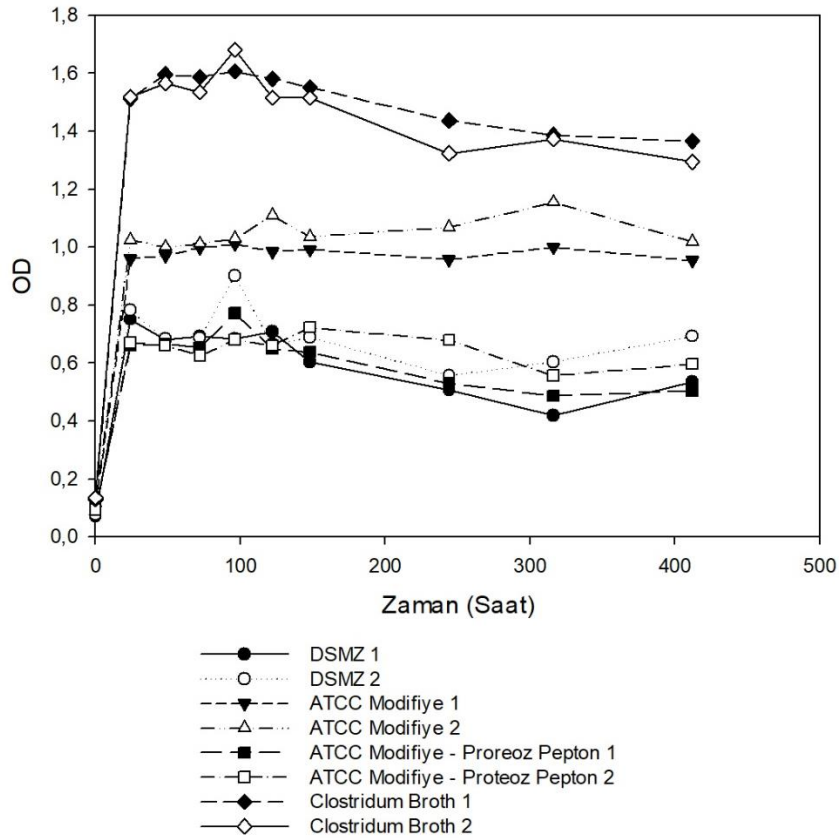
Bilinen konsantrasyondaki (1000 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L, 100 mg/L, 50 mg/L) etanol çözeltileri 42 mL olarak 18.5 g biyokömür içeren 100 mL'lik serum şişelerine eşit olarak eklenmiştir. Şişeler, 30°C'lik bir şartlandırma odasında 150 rpm'de çalkalanmıştır. Deney 1440 dakika (24 saat) sonra sonlandırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 *Clostridium ljungdahlii* ile Yapılan Kesikli Biyoeaktör Denemeleri

4.1.1 *Clostridium ljungdahlii*'nin büyüme eğrisi

Yapılan çalışmada dört farklı ortam içeriği iki paralel olacak şekilde çalışılmıştır ve çalışılan biyoreaktörler paralelleri ile yakın davranışlar sergilenmiştir.



Şekil 4. 1. *Clostridium ljungdahlii* büyüme eğrisi

Clostridium ljungdahlii için en fazla büyümenin gözlemlendiği ortam DRCM *Clostridium* Broth ortamı olup 48. saatte logaritmik fazı sonlandırıp durağan faza geçmiştir. Pahalı bir

kimyasal olan Proteoz Pepton ilave edilmemiş ATCC ortamı DSMZ ortamı ile yakın performans göstermiştir. Çalışmalara *Clostridium ljungdahlii*'nin temin edildiği Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kùltürleri Koleksiyonu şirketinin DSMZ besin ortamı (makro-mikro besin çözeltileri ve vitamin çözeltisi) ile devam edilmiştir.

Bakteri büyüme performansının en yüksek olduğu DRCM *Clostridium* Broth ortamı ile bakteri büyüme performansının en düşük olduğu DSMZ ortamlarında etanol üretim performansının karşılaştırılması için kesikli beslemeli immobilize biyoreaktör çalışması gerçekleştirilmiştir.

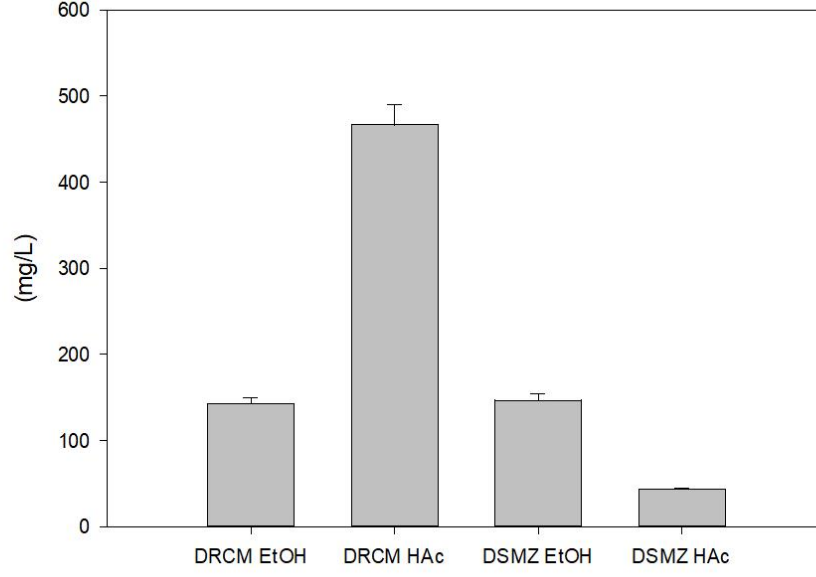
300 mL sıvı hacmine sahip biyoreaktör immobilize materyal olarak seramik top ile doldurulmuştur. Çalışma hacmi 150 mL olan biyoreaktöre $0,1\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz beslemesi gerçekleştirilmiştir.

Biyoreaktörden alınan sıvı numunelerdeki bakteri konsantrasyonu DRCM *Clostridium* Broth ortamında DSMZ ortamına göre daha fazla olsa da (Şekil 4.3) etanol üretim değerleri 144 saat boyunca birbirine yakın trendde ilerlemiştir. 144. saatten sonra DSMZ ortamındaki etanol değeri stabil kalırken Broth ortamındaki etanol değerinde keskin bir düşüş gözlenmiştir.

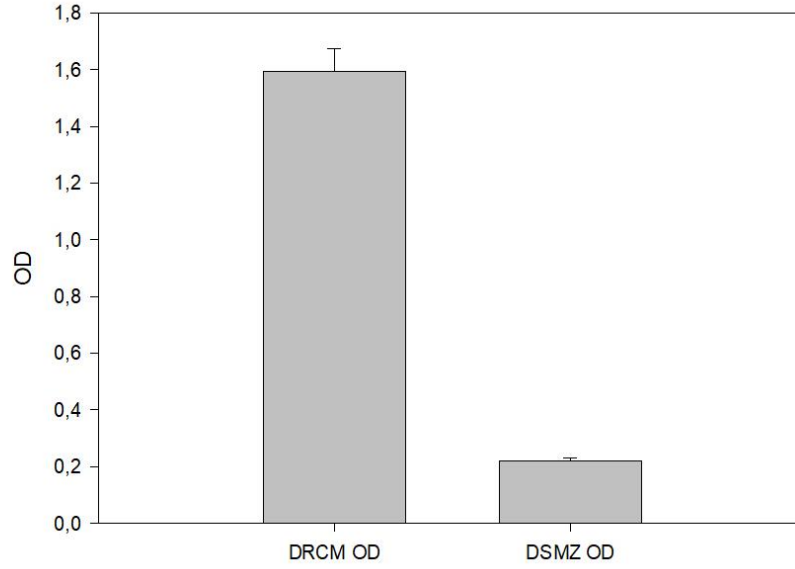
DRCM ortamında maksimum etanol değeri 143 mg/L, DSMZ ortamında 147 mg/L olarak elde edilmiştir.

Şekil 4.2'de görülen DSMZ ortamına göre DRCM *Clostridium* Broth ortamında ölçülen yüksek asetik asit değerinin, DRCM *Clostridium* Broth ortamı içeriğinde halihazırda bulunan asetik asit miktarı nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Çalışmalara *Clostridium ljungdahlii*'nin temin edildiği DSMZ besin ortamı ile devam edilmiştir

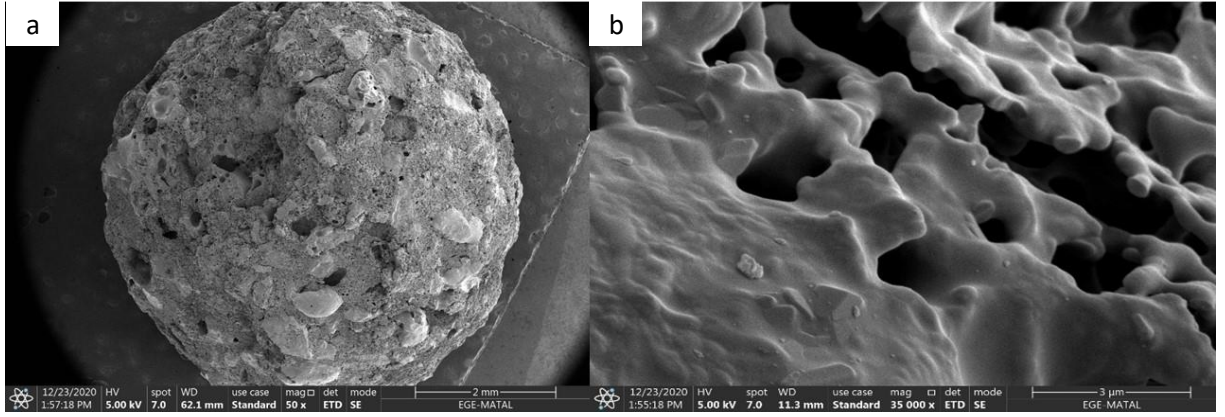


Şekil 4. 2. DRCM *Clostridium* Broth ortamı ile DSMZ ortamlarında etanol ve asetik asit üretim performansı

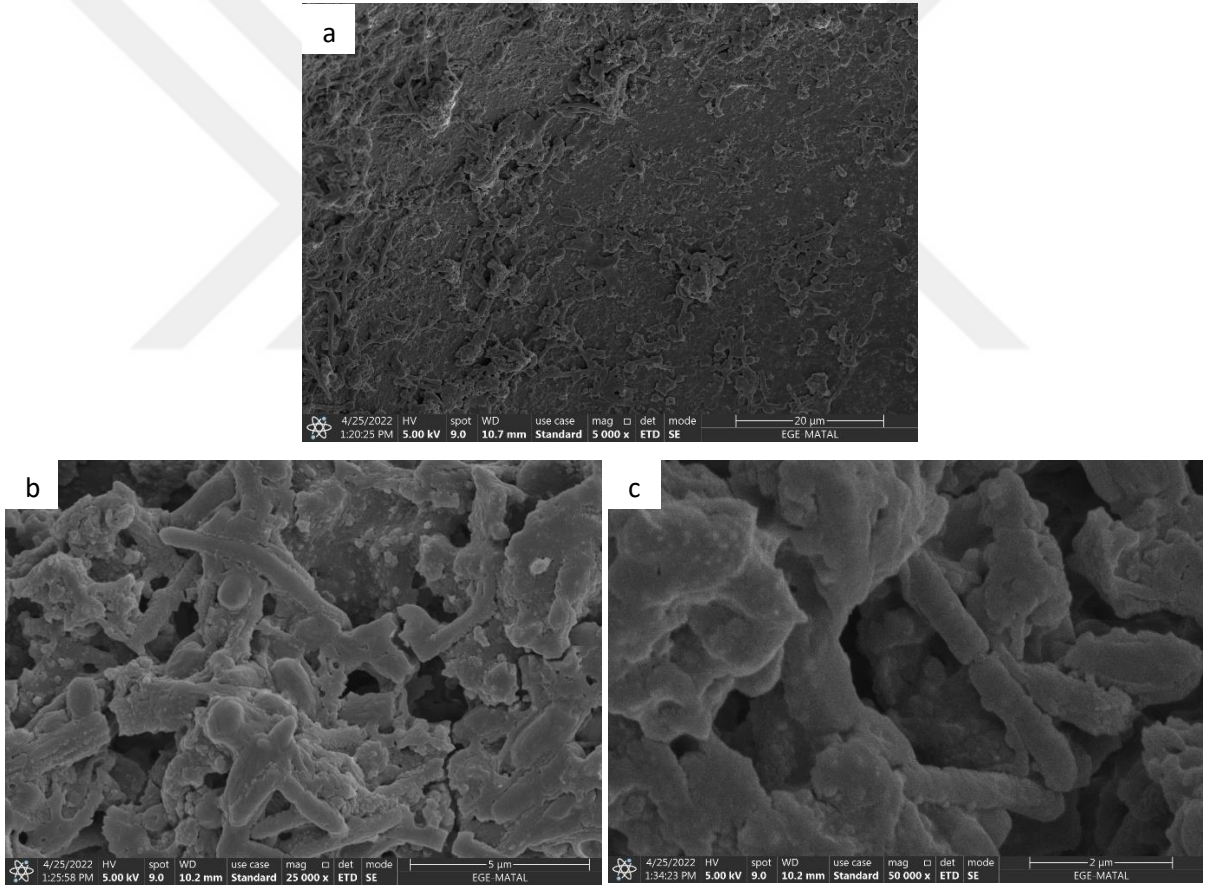


Şekil 4. 3. DRCM *Clostridium* Broth ortamı ile DSMZ ortamlarında *Clostridium ljungdahlii* büyüme grafiği

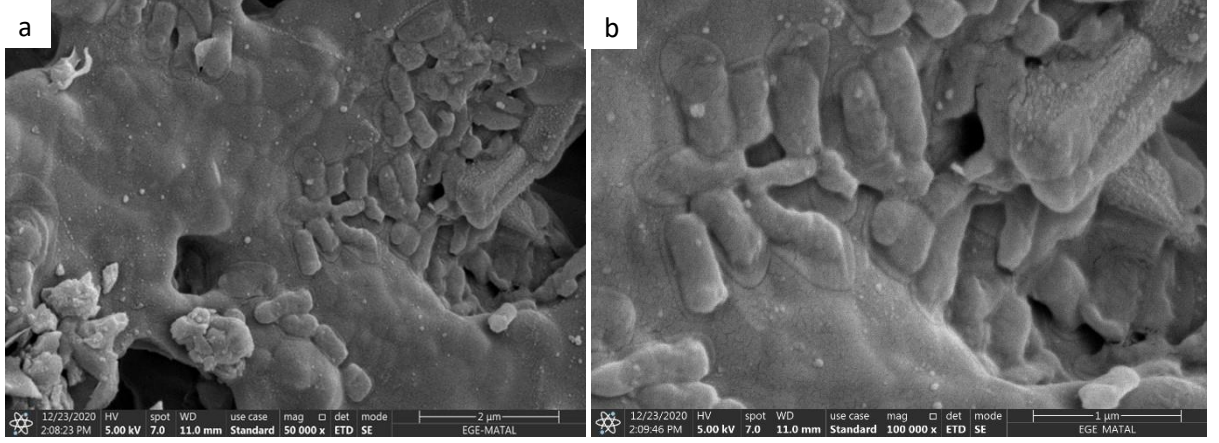
Seramik top öncelikle bakteri ile temas etmemiş hali ile “Taramalı Elektron Mikroskobu”nda görüntülenmiştir. Görüntüleme sonucu bakterinin tutunmasını kolaylaştırıcı pürüzlü yüzey gözlenmiştir (Şekil 4.4). Ardından DRCM ortamı ve DSMZ ortamı ile çalışılmış biyoreaktörlerden alınan seramik top örnekleri “Taramalı Elektron Mikroskobu”nda görüntülenmiştir (Şekil 4.5-Şekil 4.6).



Şekil 4. 4. Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal seramik top SEM görüntüsü, a) 2mm ölçek, 50 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 35000 kat büyütme



Şekil 4. 5. DRCM ortamında seramik top üzerine immobilize olmuş *Clostridium ljungdahlii* tutunumu SEM görüntüsü, a) 20µm ölçek, 5000 kat büyütme, b) 5µm ölçek, 25000 kat büyütme) 2µm ölçek, 50000 kat büyütme

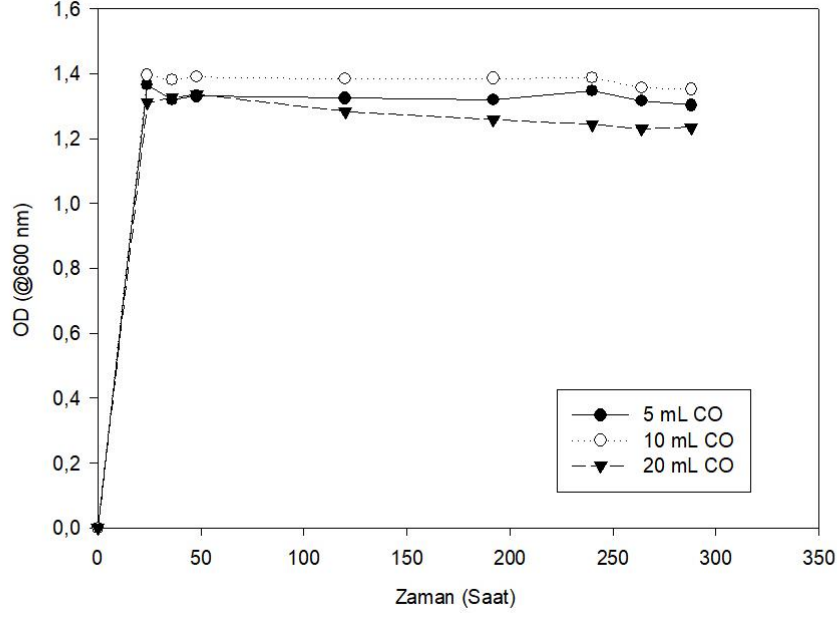


Şekil 4. 6. DSMZ ortamında seramik top üzerine immobilize olmuş *Clostridium ljungdahlii* tutunumu SEM görüntüsü, a) 2µm ölçek, 50000 kat büyütme, b) 1µm ölçek, 100000 kat büyütme

DRCM ortamında ve DSMZ ortamında bakterilerin immobilize materyale tutunma şekillerine bakıldığında DRCM ortamında bakterilerin ağsı bir yapı oluşturarak değişim gösterdikleri görülmektedir.

4.1.2 *Clostridium ljungdahli* ile biyoetanol üretiminde optimum CO miktarının belirlenmesi

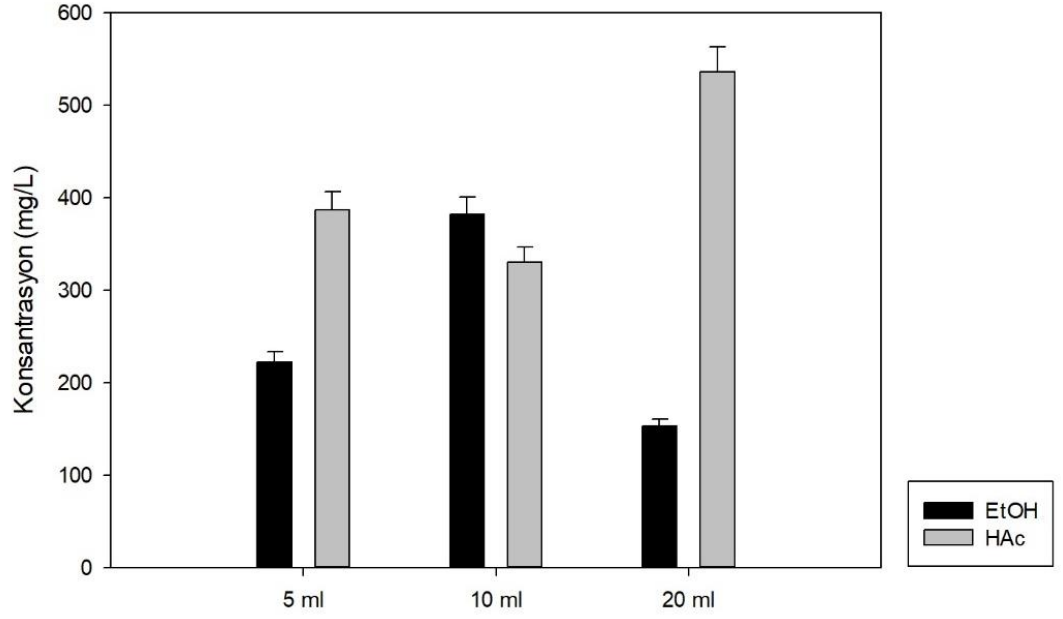
Karbon monoksit miktarının belirlenmesi için 2 tekrarlı anaerobik kesikli biyoreaktörlere hacimce %10 inokülasyon yapılmıştır ve 2 gün boyunca 37°C’de 100 rpm’de karıştırılarak inkübasyona bırakılmıştır. Biyoreaktörlerde büyüme miktarının sabitlendiği gözlemlendikten sonra (48. saat) 5 mL, 10 mL, 20 mL karbon monoksit gazı eklenerek karbon monoksitin etkisi incelenmiştir. Reaksiyonun ilk gününde pH 7.5 gözlemlenirken deneme bittiğinde pH 5.5 olarak gözlemlenmiştir. Tüm biyoreaktörlerde günlük olarak etanol ve asetik asit analizleri yapılmıştır.



Şekil 4. 7. *Clostridium ljungdahlii* ile optimum CO miktarı çalışması OD değerleri

Optik yoğunluk sonuçlarına göre, CO gazı eklenmiş biyoreaktörlerde logaritmik fazın 48 saatte tamamlanıp durağan faza geçildiği gözlenmiştir. 5 mL, 10 mL ve 20 mL CO gazı eklenmiş biyoreaktörlerde birbirine yakın değerler kaydedilmiştir. 20 mL CO gazı eklenmiş biyoreaktör durağan fazı diğer biyoreaktörlere göre önce bitirip ölüm fazına geçmiştir. Karbon monoksit miktarındaki artışın bakteri kültürünü strese soktuğu düşünülmektedir. *Clostridium ljungdahlii* hızlı bir şekilde logaritmik faza geçtikten sonra yaklaşık 192 saat durağan fazda kalmaktadır ve 240. saatten sonra ölüm fazına giriş yapmaktadır. Bu deneme toplamda 288 saat sürmüştür.

Etanol, asetik asit gibi asit ve alkoller sekonder metabolit olarak mikroorganizmanın durağan fazda açığa çıkardığı metabolitlerdir. Bu yüzden durağan faz etanol üretiminin en verimli olduğu fazdır ve bu nedenle mikroorganizmanın hızlı bir şekilde logaritmik fazı atlayıp durağan fazda uzun süreli aktivite göstermesinden dolayı DSMZ besin ortamı ve *Clostridium ljungdahlii* bakterisi etanol üretiminde tercih edilmiştir. Etanol ve asetik asit miktarları HPLC cihazında tespit edilmiştir.



Şekil 4. 8. *Clostridium ljungdahlii* ile optimum CO miktarı çalışması etanol ve asetik asit üretim değerleri

Clostridium ljungdahlii ile optimum CO miktarının belirlenmesi çalışmasında en verimli değerler 10 mL karbon monoksit ile sentez gaz fermantasyonu gerçekleşen biyoreaktörlerde 382 mg/L EtOH olarak gözlemlenmiştir. 20 mL ve daha fazla CO gazının mikroorganizma üzerinde toksik etki oluşturarak etanol üretimini baskıladığı düşünülmektedir. 20 mL CO ile 153 mg/L etanol üretimi gözlenmiştir. 5mL CO gazı eklenmiş biyoreaktörlerde 222 mg/L EtOH üretimi gözlemlenmiştir. Optimum CO miktarı 10 mL CO/100 mL biyoreaktör hacmi olarak kabul edilmiştir. Çalışmanın ilerleyen bölümlerinde bu miktar kullanılmıştır (Şekil 4.8).

Clostridium ljungdahlii'nin etanol üretim yol izine bakıldığında asetik asit üretimi ile etanol üretiminin birbiri ile bağlantılı olduğu görülmektedir. Buna göre bakiye asetik asit konsantrasyonu biyoreaktör içinde sağlanan pH kontrolü ile etanole dönüştürülebileceği için asetik asit konsantrasyonlarının da ölçülmesi çok önemlidir. Şekil 4.8'de yer alan asetik asit üretim değerlerine bakıldığında en yüksek asetik asit konsantrasyonunun 20 mL CO beslenen kesikli biyoreaktörlerde 536 mg/L olduğu gözlenmiştir.

4.1.3 *Clostridium ljungdahlii* ile sentez gazdan biyoetanol üretiminde iz element optimizasyonu

Sentez gazından biyoetanol üretiminde kullanılan bazal ortam bileşenleri çok saf ve pahalı kimyasallardır. Etanol üretimini iyileştirirken bu kimyasalların daha düşük konsantrasyonlarına sahip optimize edilmiş bir ortam, proses maliyetinin düşmesine önemli ölçüde katkıda bulunacaktır. Kullanılan istatistiksel program (Design Expert 7.0, StatEase®, ABD), Plackett-Burman tekniği 11, 19, 20, 24 ve 31 faktörlü deneysel tasarımlara sahiptir. Bu çalışmada en verimli iz elementler seçilmiştir ve biyokütle ile metabolit sentezi üzerindeki etkileri 11 faktörlü bir yaklaşım kullanılarak belirlenmiştir.

Deney tasarımında iz elementler için konsantrasyon aralıkları, literatürde bildirilen miktarlara göre belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan iz elementler için maksimum değerler şu şekildedir: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,8 g/L); $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g/L); $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g/L); $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (1 g/L), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0.02 g/L), $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (0.02/L), $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g/L), $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0.02 g/L), $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g/L), H_3BO_3 (0.01 g/L) ve $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (3 g/L). En düşük değerler 0 g/L olarak ayarlanmıştır. İnokulumdaki iz elementlerin etkisini ortadan kaldırmak için, bu elementlerin konsantrasyonları ICP analizi kullanılarak belirlenmiştir. İnokulumdaki iz element miktarları Tablo 4.1’de listelenmiştir.

Tablo 4. 1. İnokulumun ICP analiz sonucu (İnokulumda gözlenen iz element miktarları)

	Mo	W	Fe	Zn	Ni	Mg	Mn	Co	Ca	Cu	B
g/L	1.3×10^{-5}	-	1.3×10^{-5}	1.35×10^{-4}	7×10^{-6}	2.17×10^{-2}	2.66×10^{-4}	5.6×10^{-5}	2.75×10^{-3}	0	3.7×10^{-5}

İnokulumdan ortama taşınan miktarları dahil ettikten sonra her biyoreaktörde bulunan iz elementlerin miktarı Tablo 4.2’de gösterilmektedir. Bu değerler, *Clostridium ljungdahlii*’nin büyümesi ve metabolit üretimi üzerindeki her iz elementin önemini anlamak için istatistiksel analiz için dikkate alınmıştır.

Tablo 4. 2. İnokulumdan miktarları dahil edildikten sonra kesikli biyoreaktörlerde g/L olarak sunulan stok iz element konsantrasyonları.

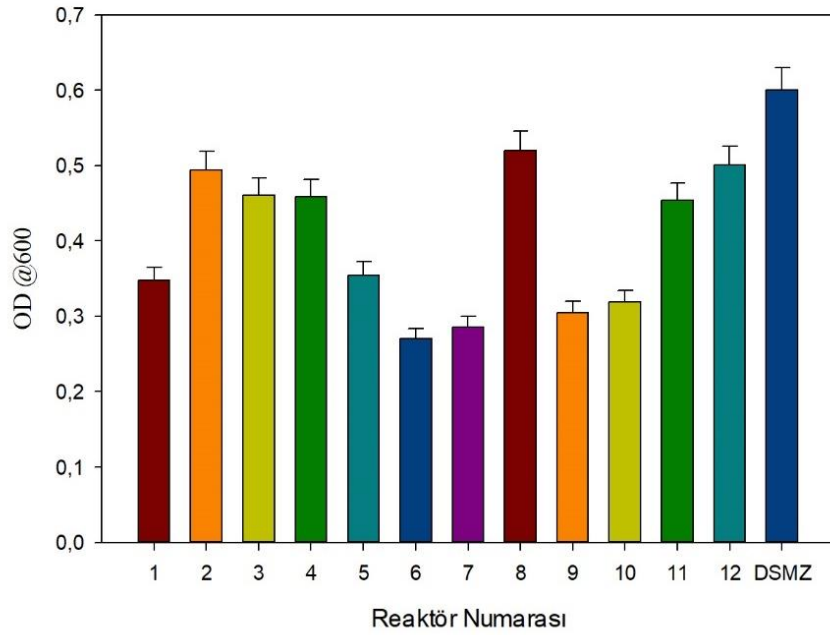
Reaktör Numarası	Na_2MoO_4 $\times 2\text{H}_2\text{O}$	Na_2WO_4 $\times 2\text{H}_2\text{O}$	FeSO_4 $\times 7\text{H}_2\text{O}$	ZnSO_4 $\times 7\text{H}_2\text{O}$	NiCl_2 $\times 6\text{H}_2\text{O}$	MgSO_4 $\times 7\text{H}_2\text{O}$	MnSO_4 $\times \text{H}_2\text{O}$	CoSO_4 $\times 7\text{H}_2\text{O}$	CaCl_2 $\times 2\text{H}_2\text{O}$	CuSO_4 $\times 5\text{H}_2\text{O}$	H_3BO_3
1	0.02003	0.02	0.00055	0.20059	0.02003	3.21996	0.00082	0.00027	0.01009	0.10000	0.00021
2	0.00003	0.02	0.80055	0.00059	0.02003	3.21996	1.00082	0.00027	0.01009	0.00000	0.01021
3	0.02003	0.00	0.80055	0.20059	0.00003	3.21996	1.00082	0.20027	0.01009	0.00000	0.00021
4	0.00003	0.02	0.00055	0.20059	0.02003	0.21996	1.00082	0.20027	0.11009	0.00000	0.00021
5	0.00003	0.00	0.80055	0.00059	0.02003	3.21996	0.00082	0.20027	0.11009	0.10000	0.00021
6	0.00003	0.00	0.00055	0.20059	0.00003	3.21996	1.00082	0.00027	0.11009	0.10000	0.01021
7	0.02003	0.00	0.00055	0.00059	0.02003	0.21996	1.00082	0.20027	0.01009	0.10000	0.01021
8	0.02003	0.02	0.00055	0.00059	0.00003	3.21996	0.00082	0.20027	0.11009	0.00000	0.01021
9	0.02003	0.02	0.80055	0.00059	0.00003	0.21996	1.00082	0.00027	0.11009	0.10000	0.00021
10	0.00003	0.02	0.80055	0.20059	0.00003	0.21996	0.00082	0.20027	0.01009	0.10000	0.01021
11	0.02003	0.00	0.80055	0.20059	0.02003	0.21996	0.00082	0.00027	0.11009	0.00000	0.01021

Her iz element çözeltisi, Plackett-Burman tekniği ile gerçekleştirilen tarama çalışmasına göre 1 L saf su içinde 1.5 g nitrilotriasetik asit ve 1 g sodyum klorür kullanılarak hazırlanmıştır. İz element içermeyen DSMZ büyüme ortamı kimyasal bileşime sahip 50 mL’lik bir ortam hazırlanmıştır ve daha sonra her şişeye 0.5 mL spesifik stok iz element çözeltisi ilave edilmiştir. Kontrol olarak, DSMZ 879 ortamında *Clostridium ljungdahlii* için önerildiği gibi modifiye edilmiş bir Wolin mineral solüsyonu kullanılmıştır. Ek bir deney seti, iz elementler (biyoreaktör 12) dahil edilmeden gerçekleştirilmiştir. Her kesikli biyoreaktör deneyi iki paralel halinde gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktörler, DSMZ 879 ortamında büyütülen aktif stok kültürlerden %10 (v/v) oranında bakteri ile aşılanmıştır. 48 saat sonra, steril bir şırınga kullanılarak biyoreaktörlerin üst boşluğuna 10 mL sentez gazı (%60 CO, %10 CO₂, %10 H₂, %10 CH₄ ve %10 N₂) enjekte edilmiştir. Gerekğinde pH’ı değiştirmek için 2 M HCl veya 2 M NaOH kullanılmıştır. Her 24 saatte bir, metabolitleri, biyokütleyi ve pH’ı analiz etmek için her şişeden 0.75 mL numune alınmıştır. Örnekler biyokütle tayini için hemen analiz edilmiştir ve bir kısmı metabolit analizine kadar -4°C’de saklanmıştır. Plackett-Burman denemelerinin sonuçları (biyokütle ve metabolit üretimi), Design Expert 7.0 yazılımında bulunan araçlar kullanılarak değerlendirilmiştir.

Sentez gazın substrat olarak kullanıldığı fermantasyon işlemi ile etanol üretim potansiyeli üzerindeki iz element etkileri 384 saat süren kesikli biyoreaktör denemeleri ile araştırılmıştır. Kullanılan anaerobik kesikli biyoreaktörlerdeki iz element konsantrasyonları Tablo 4.2’ye göre

hazırlanmıştır. İz element miktarları değiştirilmemiş büyüme ortamının bulunduğu bir kesikli biyoreaktör de performansların karşılaştırılabilmesi için hazırlanmıştır.

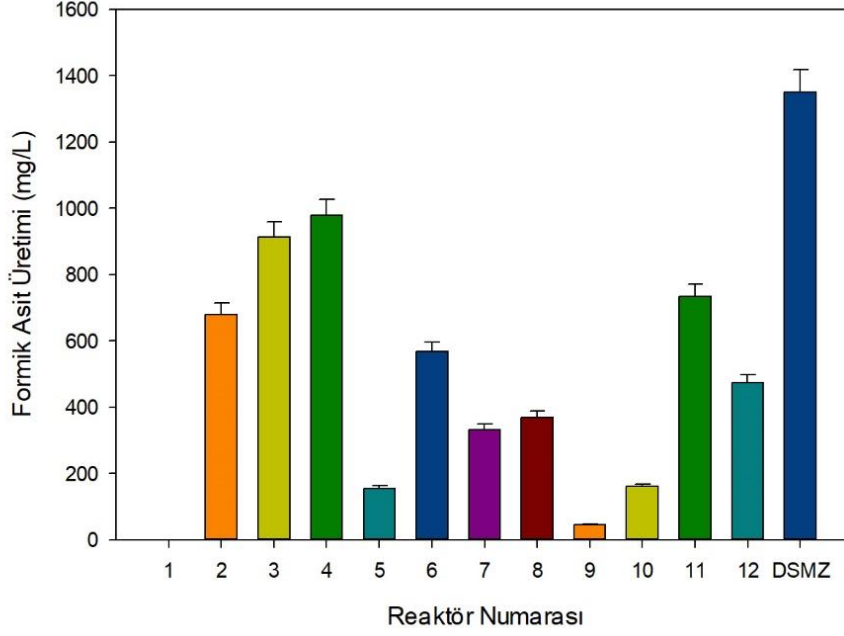
Deneyler, etanol üretimi stabilize olana kadar (384 saat) sürmüştür. DSMZ ortamıyla maksimum 209 mg/L (0.6 OD) biyokütle bulunmuştur (Şekil 4.9). Biyoreaktör 8, 183 mg/L'ye ulaşan ikinci en yüksek biyokütleyle sahiptir. Tüm deneysel denemelerde 100 mg/L'ye yakın bir biyokütle bulunmuştur. Daha sonra belirtildiği gibi, en yüksek etanol konsantrasyonuna ve en düşük formik asit konsantrasyonuna sahip biyoreaktör 1, 128 mg/L'lik (0.3480 OD) bir biyokütleyle ulaşmıştır. Biyoreaktör 12'ye iz elementler eklenmeden, 177 mg/L'lik (0.5010 OD) bir biyokütle elde edilmiştir. İz elementler dahil edilmeden büyüme, mikrobiyal hücrelerin gelişimi ve bakımı için gerekli olan temel bileşenleri içerebilen maya özütü gibi besinlerin varlığına bağlanabilir.



Şekil 4. 9. Farklı deneysel denemelerde elde edilen biyokütle

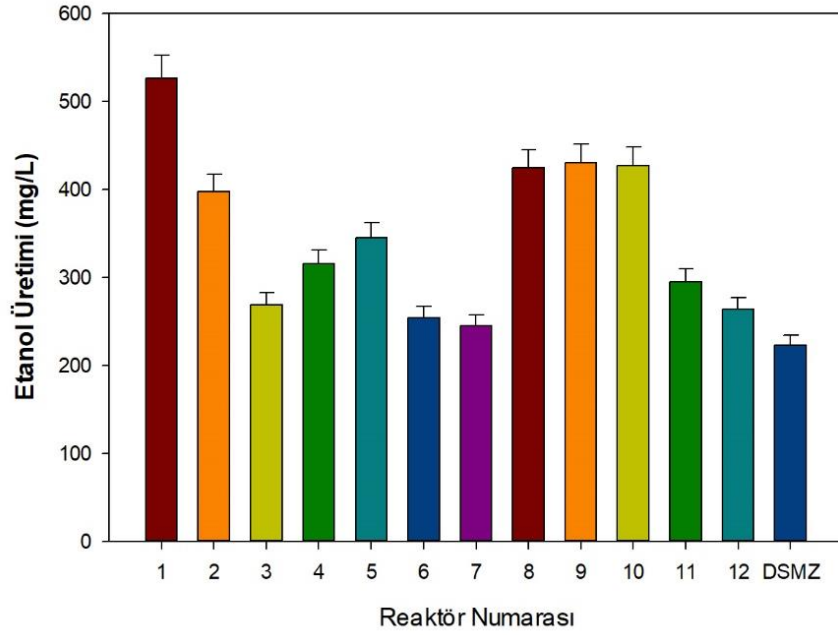
DSMZ iz element çözeltisi ile en yüksek formik asit üretimi 1350 mg/L olmuştur (Şekil 4.10). Biyoreaktör 1'de hiçbir formik asit saptanmamıştır ve biyoreaktör 9'da eser miktarda (45 mg/L) formik asit saptanmıştır. Her iki biyoreaktör de en yüksek etanol üreten biyoreaktörlerdir. Biyoreaktör 1 ve 9'daki düşük formik asit konsantrasyonları ve rapor edilen yüksek etanol konsantrasyonları, iz elementlerin asetojenler tarafından üretilen metabolitler

üzerindeki dikkate değer etkisini doğrulamaktadır. Bakteri, üretilen formik asidi kullanabilir ve etanole dönüştürebilir, böylece bu tür biyoreaktörlerde nihai etanol titresini yükseltebilir (Sun et al., 2019b).



Şekil 4. 10. Farklı deneysel denemelerde formik asit üretimi

DSMZ ortamına kıyasla, test edilen tüm iz element konsantrasyon kombinasyonları için etanol üretiminde bir artış bulunmuştur (Şekil 4.11). DSMZ ortamı kullanılarak 210 mg/L etanol üretimi gözlemlenirken, istatistiksel bir yaklaşım kullanılarak tasarlanan ortam içeriğinin değiştirilmesi sonucunda etanol üretimi 240 ile 530 mg/L arasında değişmiştir. Maksimum etanol üretiminin 1. biyoreaktörde 530 mg/L ve 9. biyoreaktörde 430 mg/L olduğu gözlenmiştir. Çeşitli eser element kombinasyonları etanol üretim performansını 1.2 ila 2.5 kat arttırmıştır. DSMZ ortamına kıyasla biyoreaktör 12’de etanol üretimi de artmıştır. Bu da belirli iz element konsantrasyonlarının etanol üretimini önleyici bir etkisi olduğunu göstermektedir.



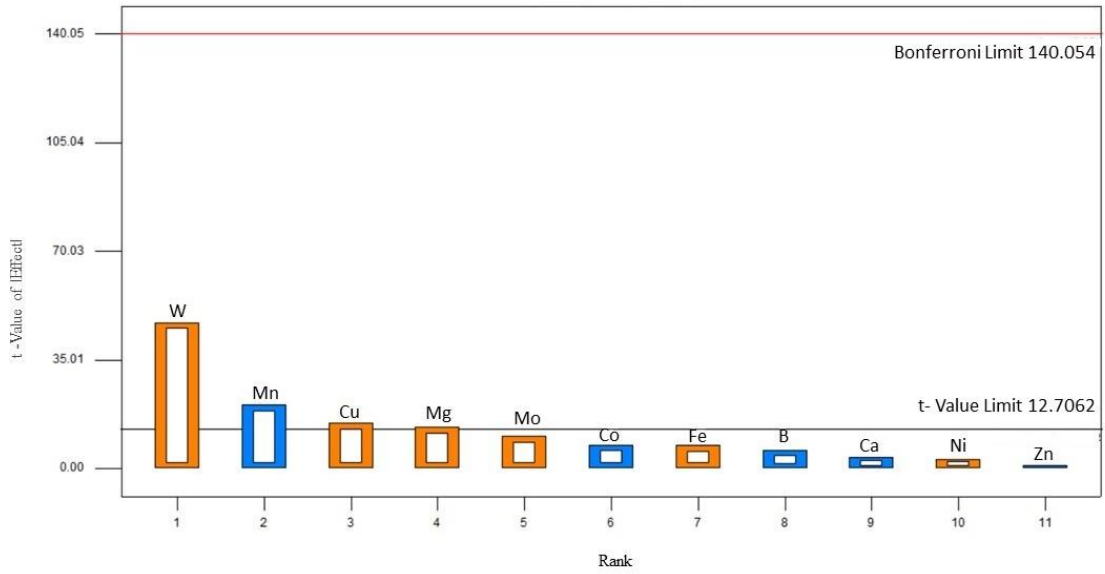
Şekil 4. 11. Farklı deneysel denemelerde etanol üretimi

Design Expert 7.0 yazılımı kullanılarak gözlemlenen etanol üretim değerleri incelenmiştir. Çalışma, Design Expert'te geliştirilen deney tasarımı kullanılarak yapılan denemelerin sonuçlarına dayanarak, Zn etkisinin önemsiz olduğu ($p = 1.27 > 0.05$) ve modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p = 0.0427 < 0.05$) varsayımı altında gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.3). $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ($p = 0.0135$), $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ($p = 0.0309$), $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ($p = 0.0433$) ve $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ($p = 0.0477$) bu modelde önemli iz elementler olarak belirlenmiştir.

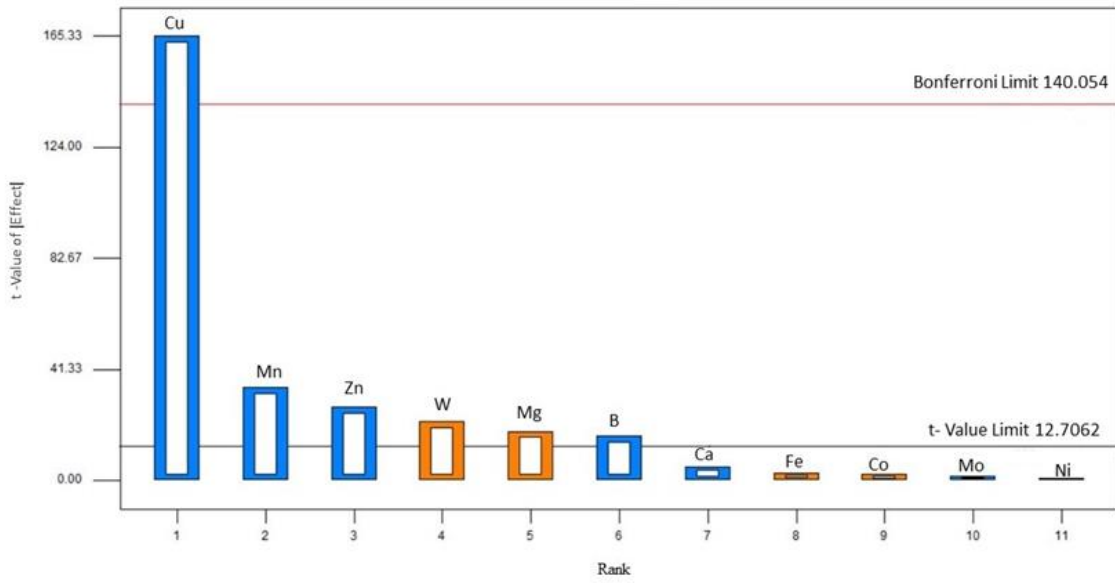
Tablo 4. 3. *Clostridium ljungdahlii* sentez gaz kullanılarak biyoetanol üretiminde iz element optimizasyonunda Plackett-Burman tarafından hazırlanan ANOVA analiz raporu.

Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F Değeri	p-value Prob>F	
Model	89600.67	10	8960.07	331.85	0.0427	Anlamlı
A-Na ₂ MoO ₄ xH ₂ O	2945.33	1	2945.33	109.09	0.0608	
B-Na ₂ WO ₄ x2H ₂ O	59925.33	1	59925.33	2219.46	0.0135	
C-FeSO ₄ x7H ₂ O	1541.33	1	1541.33	57.09	0.0838	
E-NiCl ₂ x6H ₂ O	261.33	1	261.33	9.68	0.1980	
F-MgSO ₄ xH ₂ O	4800.00	1	4800.00	177.78	0.0477	
G-MnSO ₄ xH ₂ O	11408.33	1	11408.33	422.53	0.0309	
H-CoCl ₂ x6H ₂ O	1633.33	1	1633.33	60.49	0.0814	
J-CaCl ₂ x2H ₂ O	341.33	1	341.33	12.64	0.1745	
K- CuSO ₄ x5H ₂ O	5808.00	1	5808.00	215.11	0.0433	
L-H ₃ BO ₃	936.33	1	936.33	34.68	0.1071	
Residual	27.00	1	27.00			
Cor Total	89627.67	11				

Pareto grafiği, öğelerin önem değerlerine göre soldan sağa doğru azalan bir şekilde sıralanması için bir tekniktir. *Clostridium ljungdahlii*'de etanol/biyokütle üretimi üzerinde olumlu etkisi olan iz elementler turuncu bir barla gösterilirken, zararlı bir etkiye sahip olanlar mavi bir barla gösterilmiştir. Grafikte iki yatay çizgi gösterilmektedir: üst düzeydeki pembe çizgi Bonferroni sınırını ve alt koldaki mavi çizgi t değeri sınırını gösterir. Her ikisi de güven aralıklarına eşdeğer istatistiksel olarak kabul edilen sınırlardır. Şekil 4.12, etanol ve biyokütle için Pareto çizelgelerini göstermektedir. Turuncu renkli barla gösterildiği gibi, W ile birlikte Cu'nun etanol üretimi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Buna karşın Cu'nun değeri mavi barla gösterildiği gibi Bonferroni limitinden fazladır. Bu sebeple Cu'nun *Clostridium ljungdahlii*'nin büyümesi üzerinde önemli ölçüde olumsuz etkiye sahip olduğunu da söyleyebiliriz (Şekil 4.12b).



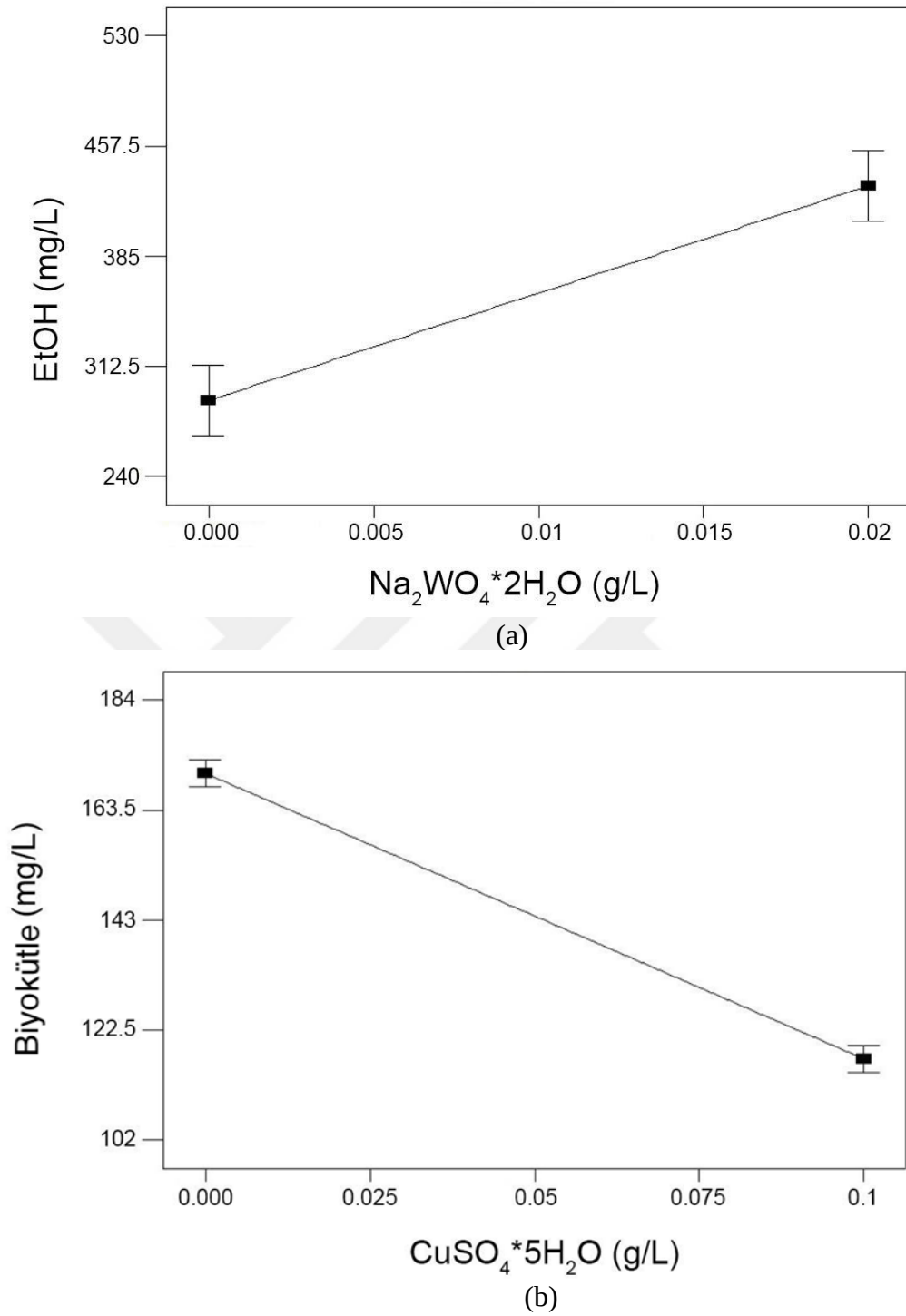
(a)



(b)

Şekil 4. 12. İz metallerin (a) etanol ve (b) biyokütle üretimi üzerindeki etkisine ilişkin Pareto Grafikleri

Şekil 4.13, ortamdaki tungsten ve bakırın varlığı göz önüne alındığında sırasıyla etanol ve biyokütle üzerindeki etki grafiğini göstermektedir. Bu grafikler her bir tasarım parametresi seviyesindeki ortalama tepki değerlerini belirtmek için kullanılır. Ortalama tepki, faktör düzeyi boyunca değiştiğinde, bir ana etkinin var olduğu kabul edilir. -1 ve +1 tungsten takviyesi altında, etanol üretimi 280 mg/L'den 418 mg/L'ye yükselmiştir. Bakır takviyesi, çalışılan -1 ve +1 koşulları altında biyokütleyi 171'den 118 mg/L'ye düşürmüştür.



Şekil 4. 13. (a) Etanol (mg/L) ve (b) Biyokütle (mg/L) üretimi için ana etkiler grafiği

İz elementlerin Wood-Ljungdahl yolu üzerindeki etkisi, son yıllarda çok dikkat çeken kritik bir konudur. Kullanılan iz element türünden ayrı olarak, iz element konsantrasyonlarının sentez gaz fermantasyon prosesi üzerinde etkisi vardır. Birkaç araştırma da büyüme ortamının maliyetli bileşenlerinin ikamesine odaklanmıştır (Gunay et. al., 2020; Sun et. al., 2019). Tablo

4.4, etanol üretim performansını iyileştirebilecek istatistiksel bir yaklaşımla tanımlanan üç potansiyel optimal ortam bileşimini (#1, #2 ve #3) özetlemektedir.

Optimum ortam bileşimleri #1, #2 ve #3 için iz element çözeltisinin maliyeti sırasıyla %18, %18, %22 oranında azaltılacaktır (Hesaplamalar Merck ve Sigma fiyatlarından alınan değerlere göre yapılmıştır).

Bu düşüş, daha büyük ölçekte endüstriyel biyoreaktörlerle uğraşırken operasyonları büyütmek için önemlidir.

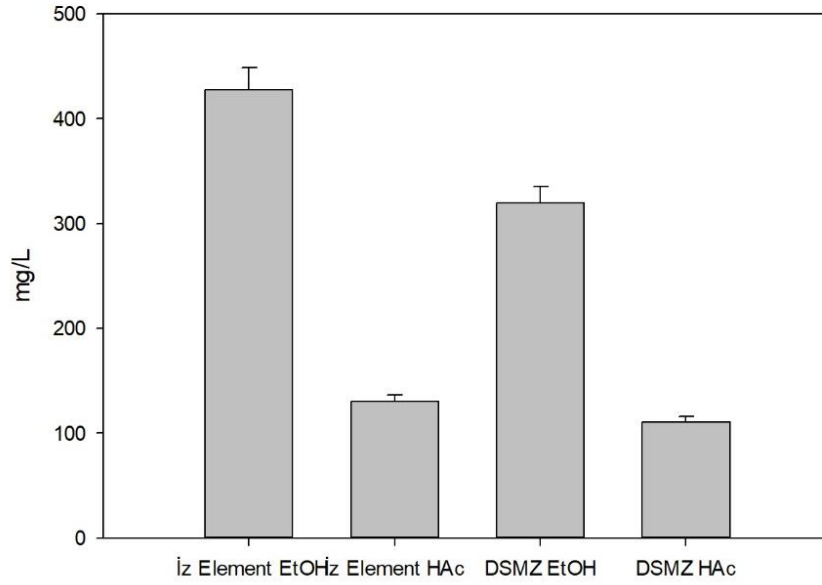
Optimize edilmiş ortam, sırasıyla ortam #1, #2 ve #3 için iz element kombinasyonu ile 526 mg/L, 526 mg/L ve 515 mg/L biyoetanol üretiminin elde edilebileceğini göstermektedir.

Tablo 4. 4. Stok solüsyonda bulunan *Clostridium ljungdahlii* tarafından biyoetanol üretimi için iz elementin (g/L) optimal kombinasyonu, istatistiksel yöntem kullanılarak belirlenir.

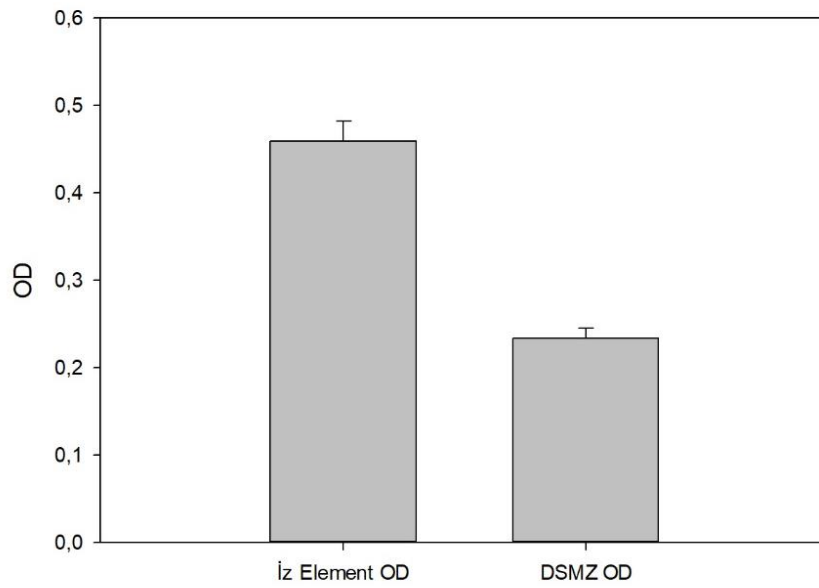
İz Element Çözeltisi											
Çözelti No	CaCl ₂ ×2H ₂ O g/L	Na ₂ WO ₄ ×2H ₂ O g/L	FeSO ₄ ×7H ₂ O g/L	Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O g/L	NiCl ₂ ×6H ₂ O g/L	MgSO ₄ ×7H ₂ O g/L	MnSO ₄ ×H ₂ O g/L	CoSO ₄ ×7H ₂ O g/L	ZnSO ₄ ×7H ₂ O g/L	CuSO ₄ ×5H ₂ O g/L	H ₃ BO ₃ g/L
#1	0.0277	0.0196	0.7991	0.0157	0.0199	2.9978	0.1611	0.0013	0.0743	0.0999	0.0000
#2	0.0240	0.02	0.7561	0.019999	0.0090	2.7713	0.0000	0.0069	0.1610	0.0881	0.0026
#3	0.0239	0.0199	0.6306	0.0199	0.0102	2.9999	0.0000	0.0713	0.0439	0.1000	0.0073
DSMZ*	0.1000	0.0040	0.1000	0.0100	0.0300	3.0000	0.5000	0.1800	0.1800	0.0100	0.0100

İz element optimizasyon çalışması sonucunda önerilen 1 numaralı reçete ile DSMZ ortamlarında etanol üretim performansının karşılaştırılması için kesikli beslemeli immobilize biyoreaktör çalışması gerçekleştirilmiştir.

300 mL sıvı hacmine sahip biyoreaktör immobilize materyal olarak seramik top ile doldurulmuştur. Çalışma hacmi 150 mL olan biyoreaktöre 0.1 m³gaz/m³_R/gün sentez gaz beslemesi gerçekleştirilmiştir. DSMZ Ortamında maksimum etanol değerine 319 mg/L olarak ulaşılmış, önerilen 1 numaralı reçete ile hazırlanmış ortam kullanılarak maksimum 427 mg/L olarak ulaşılmıştır.



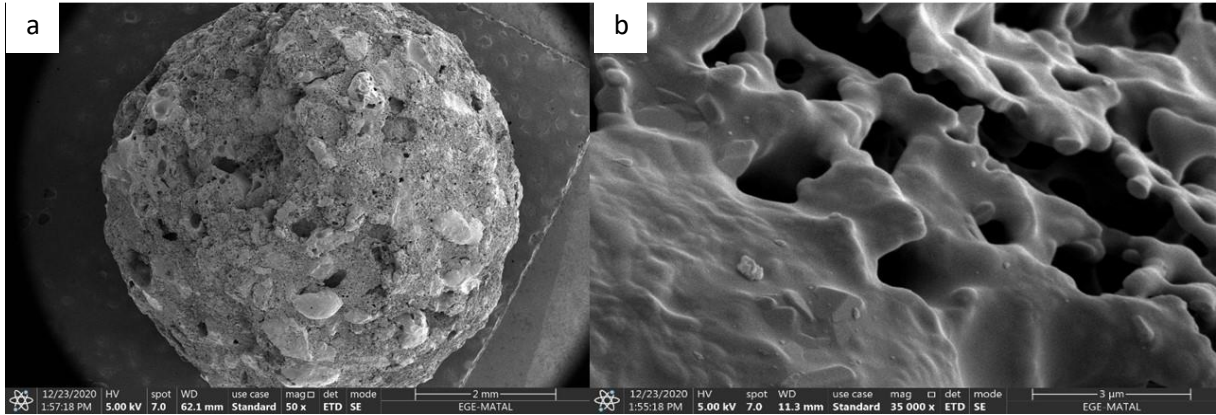
Şekil 4. 14. Optimize edilmiş 1 numaralı reçete ortamı ile DSMZ ortamlarında etanol ve asetik asit üretim performansı



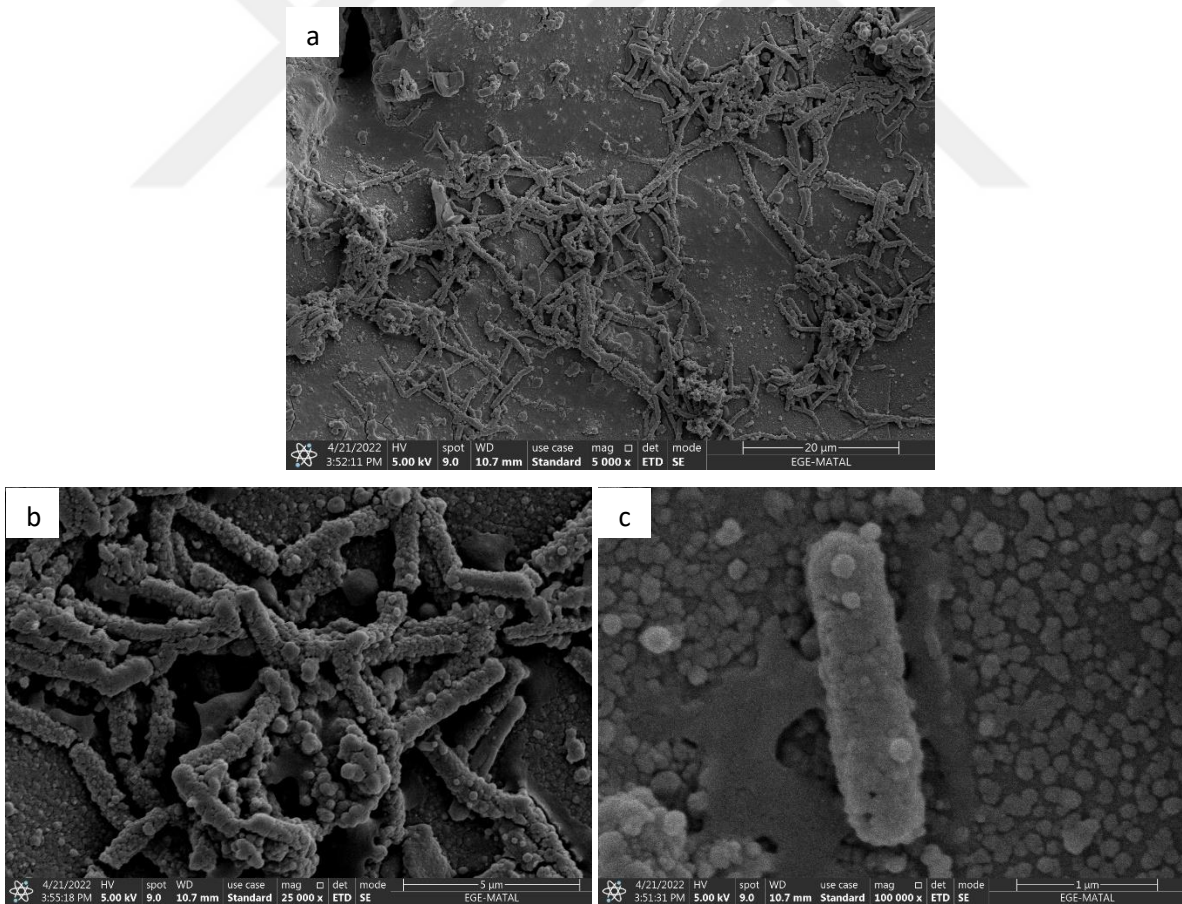
Şekil 4. 15. Optimize edilmiş 1 numaralı reçete ortamı ile DSMZ ortamlarında *Clostridium ljungdahlii* büyüme grafiği

Seramik top öncelikle bakteri ile temas etmemiş hali ile Taramalı Elektron Mikroskopunda görüntülenmiştir. Görüntüleme sonucu bakterinin tutunmasını kolaylaştırıcı pürüzlü yüzey gözlenmiştir (Şekil 4.16). Ardından DRCM ortamı ve DSMZ ortamı ile

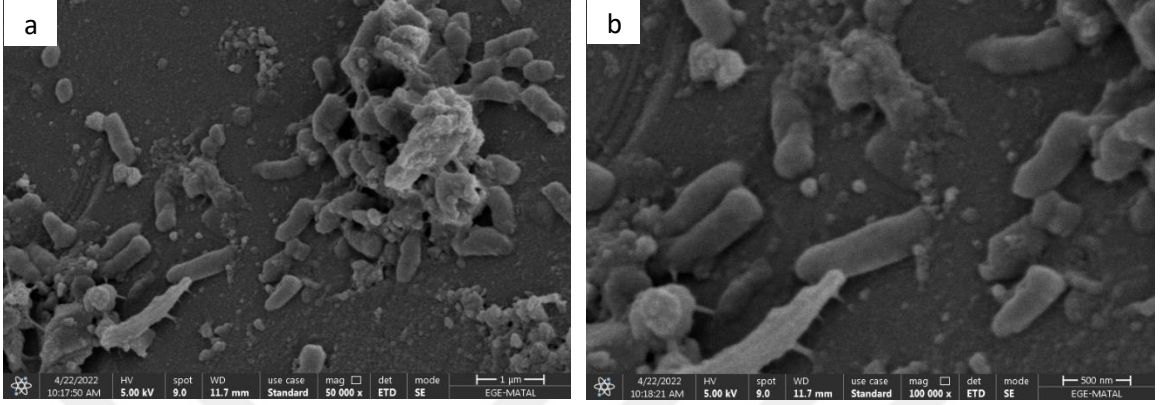
alışılmış biyoreaktörlerden alınan seramik top örnekleri “Taramalı Elektron Mikroskobu”nda görüntülenmiştir (Şekil 4.17-Şekil 4.18).



Şekil 4. 16. Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal seramik top SEM görüntüsü, a) 2mm ölçek, 50 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 35000 kat büyütme



Şekil 4. 17. Optimize edilmiş 1 numaralı reçete ortamında Seramik top üzerine immobilize olmuş *Clostridium ljungdahlii* tutunumu SEM görüntüsü, a) 20µm ölçek, 5000 kat büyütme, b) 5µm ölçek, 25000 kat büyütme, c) 1µm ölçek, 100000 kat büyütme



Şekil 4. 18. DSMZ ortamında Seramik top üzerine immobilize olmuş *Clostridium ljungdahlii* tutunumu SEM görüntüsü, a) 1µm ölçek, 50000 kat büyütme, b) 500nm ölçek, 100000 kat büyütme

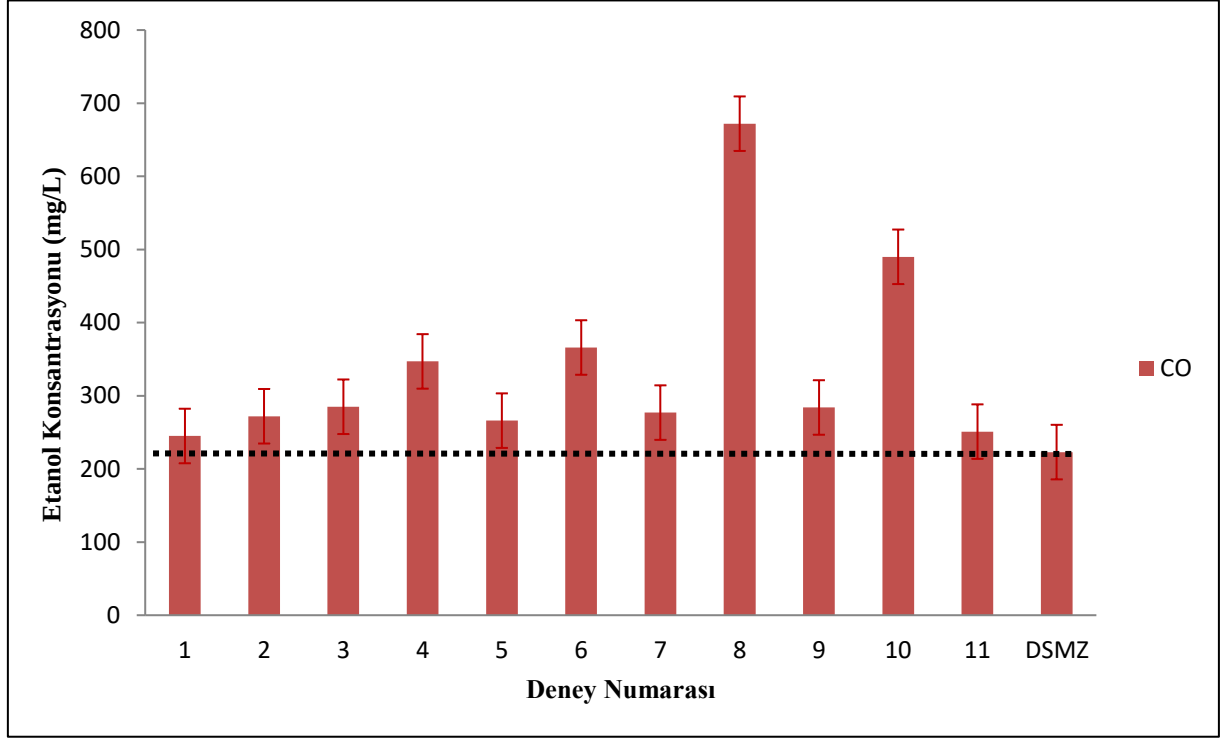
Optimize edilmiş 1 numaralı reçete ortamında ve DSMZ ortamında bakterilerin immobilize materyale tutunuma şekillerine bakıldığında Optimize edilmiş 1 numaralı reçete ortamında bakterilerin ağısı bir yapı oluşturarak değişim gösterdikleri görülmektedir.

4.1.4 *Clostridium ljungdahlii* ile saf CO kullanılarak biyoetanol üretiminde iz element optimizasyonu

Sentez gaz içeriğinde en fazla oranda bulunan gaz olan CO'nin substrat olarak kullanıldığı fermantasyon işlemi ile etanol üretim potansiyeli üzerindeki iz element etkileri 384 saat süren kesikli biyoreaktör denemeleri ile araştırılmıştır. Kullanılan anaerobik kesikli biyoreaktörlerdeki iz element konsantrasyonları Tablo 3.2'ye göre hazırlanmıştır. İz element miktarları değiştirilmemiş büyüme ortamının bulunduğu bir kesikli biyoreaktör de performansların karşılaştırılabilmesi için hazırlanmıştır.

Etanol konsantrasyon değerlerine bakıldığında 11 farklı ortam kompozisyonlarının hepsinde DSMZ ortamına göre daha fazla miktarda etanol üretimi olduğu görülmektedir. DSMZ ortamı ile 200 mg/L etanol üretimi gözlenirken ortam içeriğinin istatistiksel yöntem ile değiştirilmesi sonucunda 240-650 mg/L arasında değişen etanol üretimi gözlenmiştir.

Maksimum etanol üretimi 8 numaralı ortam içeriği ile 650 mg/L olarak gözlenmiştir bunu 550 mg/L ile 10 numaralı ortam içeriği takip etmektedir. Şekil 4.19, yapılan kesikli biyoreaktör denemelerinde iz elementlerin farklı konsantrasyonlarda kullanılması ile etanol üretimi üzerindeki etkiyi göstermektedir. Uygun oranlarda iz element kullanımının etanol üretim performansını yaklaşık 3.5 kat arttırdığı görülmektedir.

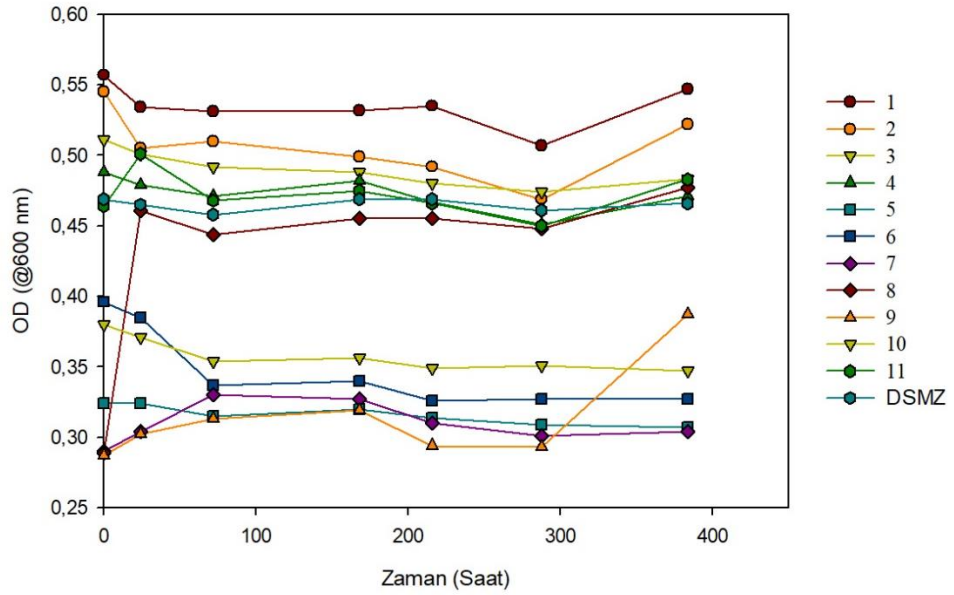


Şekil 4. 19. İz Element Optimizasyonu Deneylerinden Etanol Konsantrasyonları

Günlük olarak alınan örneklerde OD değerlerine bakılacak olursa inokulasyon işlemi gerçekleştirildikten 48 saat sonra üstel büyümenin (logaritmik faz) sonlandığı gözlenmiş ve fermentasyonun tek karbon kaynağı olan saf CO ile durağan fazda toplamda 384 saat boyunca çalışılmıştır. Hücre yoğunluğu OD_{600nm}'de ölçülmüş ve deney süresince mikroorganizma ölüm fazına geçmemiştir (Şekil 4.20). Tüm ortam içeriklerinde OD değerlerinde benzer bir eğilim gözlenirken 8 numaralı ortam içeriğine sahip biyoreaktörde OD'de 48. saatte hızlı bir artış gözlenmiştir. En fazla etanol üretiminin de gözlemlendiği bu biyoreaktörde bakteri aktivitesi ile etanol üretim performansı ilişkisi görülmektedir. Biyokütle büyümesini ve metabolitlerin üretimini etkilemesi nedeni ile pH kontrolü önem arz etmektedir. Biyokütle pH 4.5'da herhangi bir gecikme fazı olmadan anında büyümeye başlarken, pH 4.5-5 arasında meydana gelen değişiklikler OD'de bakteri konsantrasyonunda salınımlara neden olmuştur (Şekil 4.20). Bu

durum organizma üzerinde pH sapmalarının olumsuz etkisi ile yorumlanabilir. Etanol biyokütle büyümesinin erken aşamasında üretilmeye başlasa da etanol miktarının çoğu durağan fazda üretilmektedir ve bakterinin durağan faz aşamasında uzun süre kalabilmesi CO'nun sıvı fazdaki çözünürlüğü, sulu ortama kütle aktarımı ve pH ile bağlantılıdır. Beslenen CO'nun önemli bir kısmı, pH da meydana gelen değişikliklere bağlı olarak bakteri konsantrasyonuna bakılmaksızın Wood-Ljungdahl yolundaki asetik asit üretimine yönlendirilmiş olabilmektedir.

1 numaralı ortam içeriğinde OD değerlerinin en fazla olduğu görülmektedir. Başlangıç bakteri konsantrasyonunun yüksek olduğu bu biyoreaktörde etanol üretimi açısından DSMZ ortamına benzer bir performans gözlenmiştir. 5 ve 9. biyoreaktörlerde başlangıç bakteri konsantrasyonlarının düşük oldukları görülmektedir. Bu biyoreaktörlerde etanol üretimi açısından da benzer değerler gözlenmektedir. 10 numaralı ortam içeriğine sahip biyoreaktörde ise başlangıç bakteri konsantrasyonu ortalama seviyede olmasına rağmen etanol üretimi açısından DSMZ ortamına göre daha yüksek bir performans gözlenmiştir.



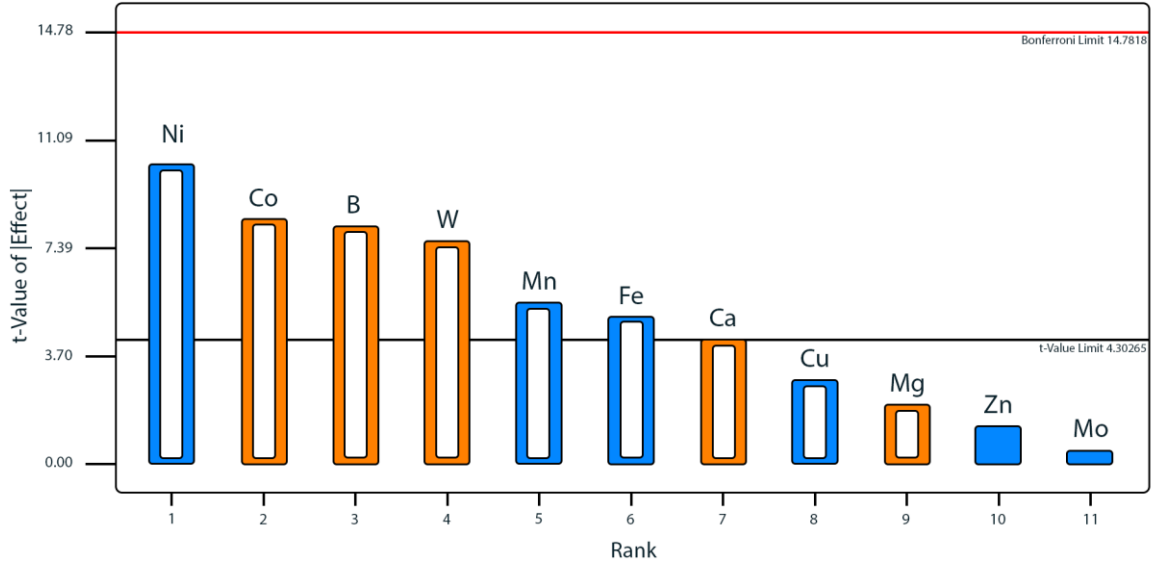
Şekil 4. 20. İz Element Optimizasyonu Deneylerinden 600 nm'de OD Değerleri

Gözlenen etanol üretim değerleri Design Expert 7.0 programında analiz edilmiştir. Design Expert 7.0 programında oluşturulan deney desenine göre yapılan deneylerin sonuçlarına bağlı olarak Zn ve Mo etkilerinin ihmal edilebilir olduğu ve oluşturulan modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p = 0.0228 < 0.05$) görülmüştür (Tablo 4.5). Analize modelin anlamlı (significant) olduğu değerlerle devam edilmiştir.

Tablo 4. 5. *Clostridium ljungdahlii* ile saf CO kullanılarak biyoetanol üretiminde iz element optimizasyonunda Plackett Burman tarafından hazırlanan anova analiz raporu

Seçilen faktöriyel model için ANOVA						
Varyans tablosunun analizi						
Kaynak	Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F Değeri	p-değeri Prob > F	
Model	1,707E+005	9	18965,41	43,30	0,0228	Anlamlı
B-Na ₂ WO ₄ ×2H ₂ O	25761,33	1	25761,33	58,82	0,0166	
C-FeSO ₄ ×7H ₂ O	11285,33	1	11285,33	25,77	0,0367	
E-NiCl ₂ ×6H ₂ O	46625,33	1	46625,33	106,45	0,0093	
F-MgSO ₄ ×H ₂ O	1825,33	1	1825,33	4,17	0,1780	
G-MnSO ₄ ×H ₂ O	13467,00	1	13467,00	30,75	0,0310	
H-CoCl ₂ ×6H ₂ O	31008,33	1	31008,33	70,80	0,0138	
J-CaCl ₂ ×H ₂ O	7905,33	1	7905,33	18,05	0,0512	
K-CuCl ₂ ×2H ₂ O	3605,33	1	3605,33	8,23	0,1030	
L-H ₃ BO ₃	29205,33	1	29205,33	66,68	0,0147	
Residual	876	2	438			
Toplam	1,716E+005	11				

Plackett Burman tasarımı ile elde edilen model ile yapılan analiz sonucunda etkili faktör değerlendirmesinde Pareto Chart grafiği kullanılmaktadır. Şekil 4.21’de sonuçlara bakıldığında etanol üretimi üzerinde olumlu etkisi açısından önemli elementler Co, B ve W olarak belirlenmiştir. Ni elementinin olumsuz etkiye sahip olduğu görülmektedir. Deneme sonuçlarımızda etkili olarak gözlenen elementler literatürde daha önce yapılan çalışmalarda etkili olduğu ifade edilen elementler olarak gözlenmektedir (Abubackar et. al.,2011).



Şekil 4. 21. *Clostridium ljungdahlii* ile iz element optimizasyonunda belirtilen yüzde etki değerlerinin Placket Burman Pareto Chart Grafiği

Etanol üretimi için optimum iz element kombinasyonu; 0,02 g/L $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/L $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,77 g/L $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/L $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,92 g/L $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,20 g/L $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L H_3BO_3 olarak %99 ($R^2=0.9949$) model anlamlılığı ile belirlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 4. 6. Literatür ve reçete verileri

	Çözeltiler										
	CaCl_2 $\times \text{H}_2\text{O}$	Na_2WO_4 $\times 2\text{H}_2\text{O}$	FeSO_4 $\times 7\text{H}_2\text{O}$	NaMoO_4 $\times 2\text{H}_2\text{O}$	NiCl_2 $\times 6\text{H}_2\text{O}$	MgSO_4 $\times 7\text{H}_2\text{O}$	MnSO_4 $\times \text{H}_2\text{O}$	CoCl_2 $\times 6\text{H}_2\text{O}$	ZnSO_4 $\times 7\text{H}_2\text{O}$	CuCl_2 $\times 2\text{H}_2\text{O}$	H_3BO_3
	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
Max	0,10	0,02	0,80	0,02	0,02	3,00	1,00	0,20	0,20	0,10	0,01
Literatür											
Değerleri											
Önerilen	0,02	0,02	0,77	0,00	0,02	0,00	0,92	0,20	0,00	0,01	0,01
Reçete											

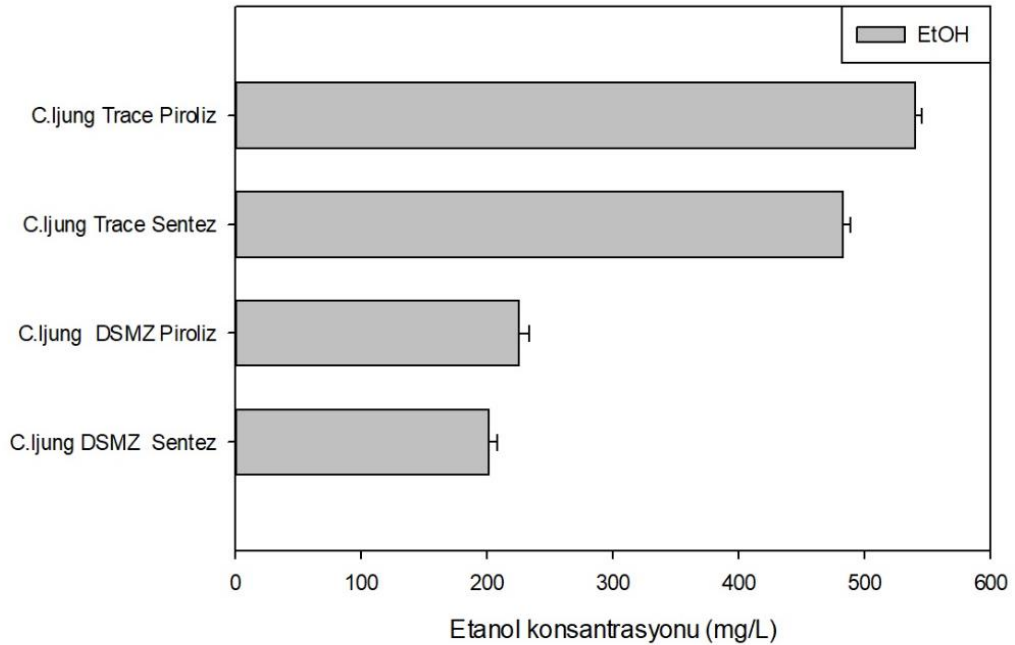
Literatürde yer alan ortam kompozisyonlarına bakıldığında NaMoO_4 , MgSO_4 ve ZnSO_4 'ün kullanılmayabileceği, CaCl_2 'nin 0,1 g/L yerine 0,02 g/L, FeSO_4 'ün 0,80 g/L yerine 0,77 g/L, MnSO_4 'ün 1 g/L yerine 0,92 g/L, CuCl_2 'nin 0,1 g/L yerine 0,01 g/L olarak kullanılabileceği gözlenmiştir. Optimizasyon çalışmasına bakıldığında proseste ölçek büyütme durumunda ekonomik olarak değerlerin önemli oranda düşürülebileceği görülmektedir.

4.1.5 *Clostridium ljungdahlii* ile en iyi koşullarda sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretimi

Clostridium ljungdahlii ile en iyi koşullarda sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretiminde tez çalışması süresince yapılan ön denemelerde elde edilen en iyi sonuçlarda CO yerine hazır sentez gaz içeriği (%60 CO, %10 CO₂, %10 CH₄, %10 H₂, %10 N₂) ve Ayçiçek parçalarının biyokömüre dönüştürülmesi sonucunda açığa çıkan gazın (%20.73 CO, %49.20 CO₂, %29.74 N₂, %0.06 H₂) beslenmesi ile biyoetanol üretimleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

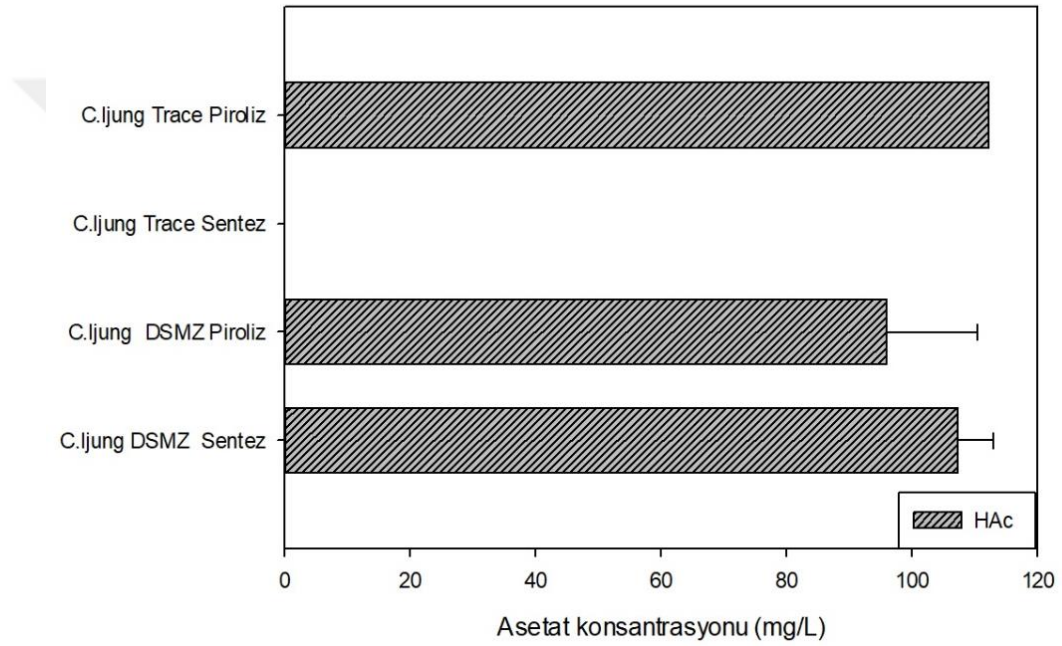
Tablo 4. 7. *Clostridium ljungdahlii* ile en iyi koşullarda sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretimi çalışmasında kullanılan iz element reçetesi

	Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	Na ₂ WO ₄ × 2H ₂ O	FeSO ₄ × 7H ₂ O	ZnSO ₄ × 7H ₂ O	NiCl ₂ × 6H ₂ O	MgSO ₄ × 7H ₂ O	MnSO ₄ × H ₂ O	CoSO ₄ × 7H ₂ O	CaCl ₂ × 2H ₂ O	CuSO ₄ × 5H ₂ O	H ₃ BO ₃
g/L	0	0.02	0	0	0	3	1	0	0	0.9	0



Şekil 4. 22. *Clostridium ljungdahlii* ile en iyi koşullarda hazır sentez gaz ve piroliz gazı ile etanol üretimi

Şekil 4.22’de yer alan sonuçlara bakıldığında ilk olarak göze çarpan sonuç piroliz gazı ile hazır sentez gaz içeriklerinin birbirine çok yakın biyoetanol üretimleri ile sonuçlandığı, piroliz gazının ise her denemede %10 daha yüksek değerler verdiğidir. Bu sonucun ana nedeni hazır sentez gazda %60 oranında CO %10 oranında CO₂ yani toplamda %70 oranında C1 gazlarının bulunmasıdır. Piroliz gazında ise %20.73 oranında CO ve %59.20 oranında CO₂ bulunmaktadır. Wood-Ljungdahl yolizinde kullanılan bu gazların oranlarının toplamda aynı olması benzer etanol üretimlerini destekleyen bir durumdur. En yüksek sonuçlar piroliz gaz için 540 mg/L, sentez gaz için 482 mg/L olarak iz element çalışması içeriğinde elde edilmiştir.



Şekil 4. 23. *Clostridium ljungdahlii* ile en iyi koşullarda hazır sentez gaz ve piroliz gazı ile asetik asit üretimi

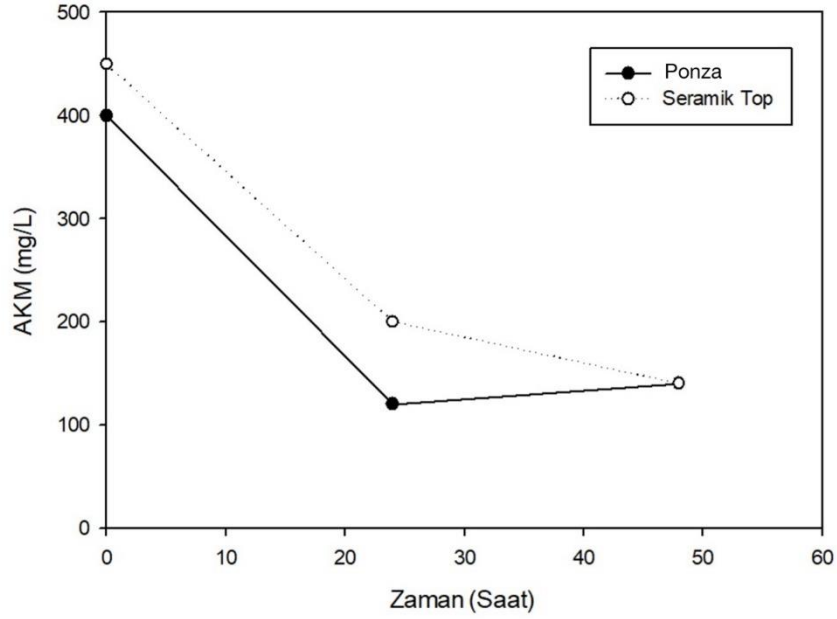
Asetik asit (asetat) üretimleri Wood-Ljungdahl yolizinde etanol üretimlerinin kapasitesinin anlaşılması açısından çok önemlidir. Yüksek asetik asit konsantrasyonları proses içerisinde yapılacak müdahalelerle etanole çevrilecek potansiyel metabolitler olarak görülmektedir. İz element kombinasyonu hariç tüm biyoreaktörlerde yine sentez gaz ve piroliz gazı ilavesinin benzer asetik asit (asetat) üretimleri ile sonuçlanmış olduğu görülmektedir (Şekil 4.23).

4.2 *Clostridium Ljungdahlii* ile Kesikli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Denemeleri

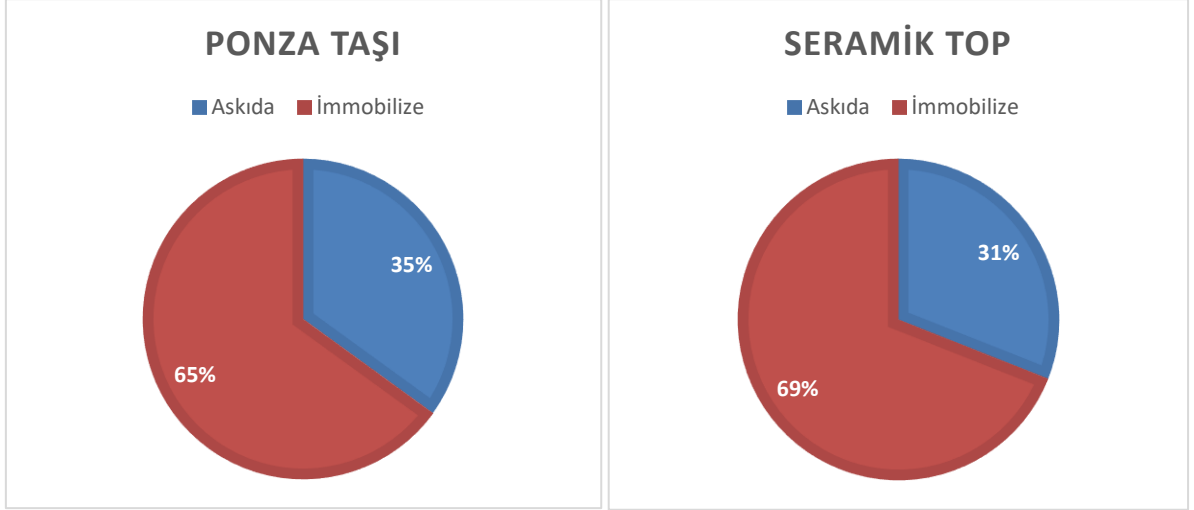
Tablo 4. 8. *Clostridium ljungdahlii* tutunma denemesinde askıda katı madde değerleri

Gün	Ponza taşı	Seramik top
0	400 mg/L	450 mg/L
1	120 mg/L	200 mg/L
2	140 mg/L	140 mg/L

Tablo 4.8'deki değerler incelendiğinde 24 saat içerisinde ponza taşında tutunmadan askıda kalan değerlerin 400 mg/L'den 120 mg/L'ye düştüğü, seramik topta ise 450 mg/L'den 200 mg/L'ye düştüğü gözlenmiştir. Ponza taşında seramik topa göre daha efektif tutunmanın olduğu gözlenmiştir. 24 saat sonunda tutunma miktarında yüksek anlam ifade eden değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 4. 24. *Clostridium ljungdahlii* immobilize materyale tutunma performansı



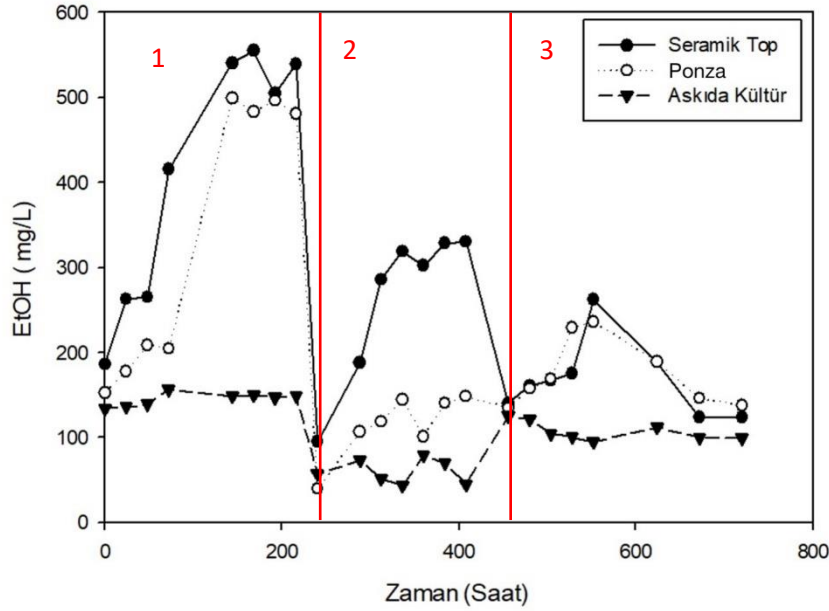
Şekil 4. 25. Ponza taşı ve seramik top dolgulu immobilize biyoreaktörde immobilize ve askıda biyokütle (*Clostridium ljungdahlii*) oranları

48. saatin sonunda biyoreaktör içerisinden alınan sıvı örnekler üzerinde yapılan askıda katı madde (AKM) analizi sonucunda başlangıçtaki mikroorganizma miktarının %65'inin ponza taşı üzerinde ve %69'unun ise seramik top üzerinde tutunduğu ölçülmüştür.

İnokulumun en az %50 sinin biyoreaktör içinde immobilize materyale tutunmasının ardından biyoreaktör boşaltılmış ve sisteme kesikli denemelerde belirlenen optimum konsantrasyonlarda bazal ortam eklenmiştir. Eş zamanlı olarak biyoreaktörden N_2 veya Ar gazı geçirilerek ortam anaerobikleştirilmiştir. Mikroorganizmaların tutunmasının sağlanmasının ardından optimum konsantrasyonda sentez gaz çalışmaya uygun akış kontrol cihazı olmadığı için her 24 saatte bir enjektör yardımı ile biyoreaktöre beslenmiştir. Biyoreaktör çıkış suyundan sıvı örneklemeleri ve biyoreaktörün işletim parametrelerinin kontrolü sağlanmıştır. Aynı şekilde biyoreaktör boş olarak da çalıştırılmış ve immobilize materyalin etkisinin olup olmadığı incelenmiştir.

Şekil 4.26'da immobilize biyoreaktör üzerinde çalışılmış 3 farklı şart görülmektedir. 1. bölgede immobilize biyoreaktörün içerisinde inoküle edilmiş ortam doldurulmuş ve tutunmanın gerçekleşmesi için biyoreaktörde aşağıdan yukarıya olacak şekilde peristaltik pompalar yardımı ile çevrim gerçekleştirilmiştir. Tutunma sağlandıktan sonra biyoreaktör içerisine enjektör yardımı ile $0.1 \text{ m}^3 \text{ gaz/m}^3 \text{ R/gün}$ sentez gaz beslenmiştir. Her 24 saatte bir $0.1 \text{ m}^3 \text{ gaz/m}^3 \text{ R/gün}$ sentez gaz beslemesi gerçekleştirilmiştir. Etanol üretimi 144. saatten 216. saate kadar anlamlı artış göstermemiştir. 2. bölgede 216. saatten sonra biyoreaktör içerisindeki sıvı boşaltılmış ve

fruktoz içermeyen bazal ortam ile biyoreaktör tekrar doldurulmuştur. 24 saat sonra biyoreaktöre $0.1\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz beslenmiştir. Çalışma süresince etanol üretim performansı incelendiğinde birinci bölge ile aynı performansta olmasa da yakın etanol üretim performansı sergilendiği görülmüştür. 3. bölgede biyoreaktör içerisindeki sıvı boşaltılıp fruktoz içermeyen bazal ortam ile doldurulmuştur ve 24 saat sonra biyoreaktöre $0.2\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz beslemesi yapılmıştır. Her 24 saatte bir $0.2\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz beslenmiştir. 2. bölge ile kıyaslandığında etanol üretim performansının düşük olduğu gözlenmektedir. CO optimizasyon çalışması ile paralel bir sonuç olarak sentez gazının miktarının artışı bakteri üzerinde strese sebebiyet vererek verimin düşmesine neden olmaktadır.

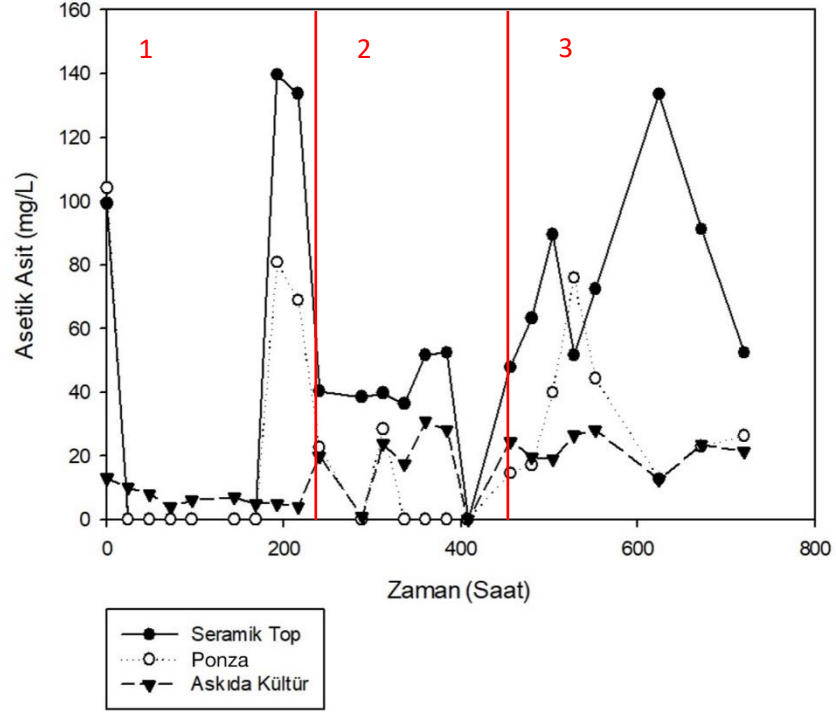


Şekil 4. 26. İmmobilize biyoreaktörde ve askıda sistemde sentez gazdan etanol üretim performansları (1) $0,1\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ +Fruktoz, (2) $0,1\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ -Fruktoz, (3) $0,2\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ -Fruktoz

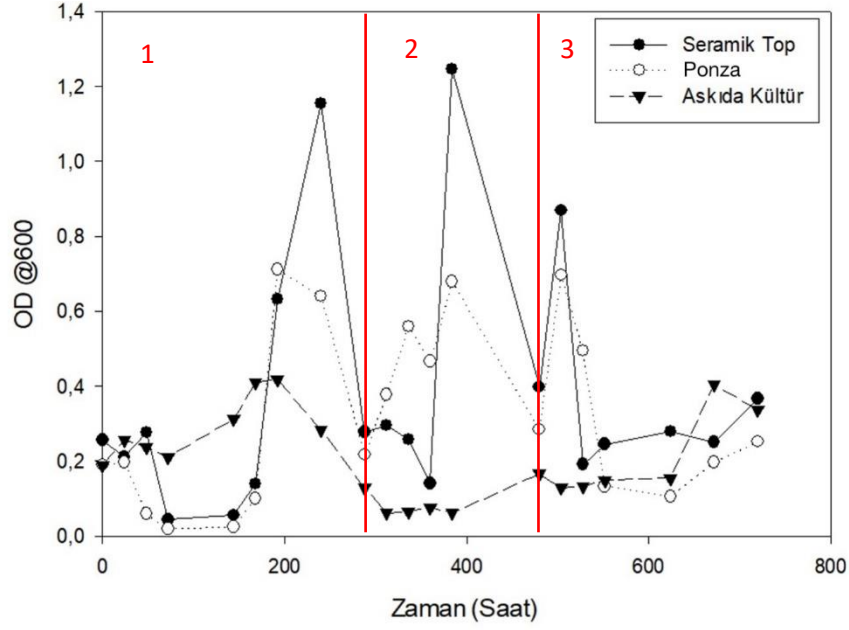
Seramik top ile ponzanın bulunduğu biyoreaktör çalışmaları ile immobilize materyal bulunmayan askıda sistem biyoreaktör çalışması karşılaştırıldığında $0,1\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz beslemesi ile etanol üretimindeki performans artışı seramik top için yaklaşık 4 kat, ponza için yaklaşık 3 kat olmuştur.

Seramik top, ponza ve askıda sistem için elde edilen maksimum etanol değerleri sırası ile 555 mg/L, 500 mg/L, 156 mg/L'dir.

Şekil 4.26 ve Şekil 4.27 incelendiğinde etanol konsantrasyonundaki artış ile azalan asetik asit konsantrasyonu CO'nun metabolik yolizindeki davranışı konusunda bize bilgi vermektedir. Artan asetik asit konsantrasyonunda metabolik yolizinde yapılacak müdahalelerle etanol üretim kapasitesinin artırılabilceği düşünölmektedir.



Şekil 4. 27. İmmobilize biyoreaktörde ve askıda sistemde sentez gazdan asetik asit üretim performansları. (1) 0.1m³gaz/m³_R/gün +fruktoz, (2) 0.1m³gaz/m³_R/gün -fruktoz, (3) 0.2m³gaz/m³_R/gün -fruktoz



Şekil 4. 28. İmmobilize biyoreaktörde ve askıda sistemde OD değerleri. (1) 0.1m³gaz/m³R/gün +fruktoz, (2) 0.1m³gaz/m³R/gün -fruktoz, (3) 0.2m³gaz/m³R/gün -fruktoz

Şekil 4.28'deki OD verileri incelendiğinde askıda sistemde OD değerlerinde sürekli bir artış görülmektedir. İmmobilize materyallerin bulunduğu biyoreaktörlerde OD değerlerindeki yükseliş bakteri konsantrasyonundaki artış ve OD değerlerindeki kayıp ise bakterinin immobilize materyale tutunması ile açıklanabilmektedir.

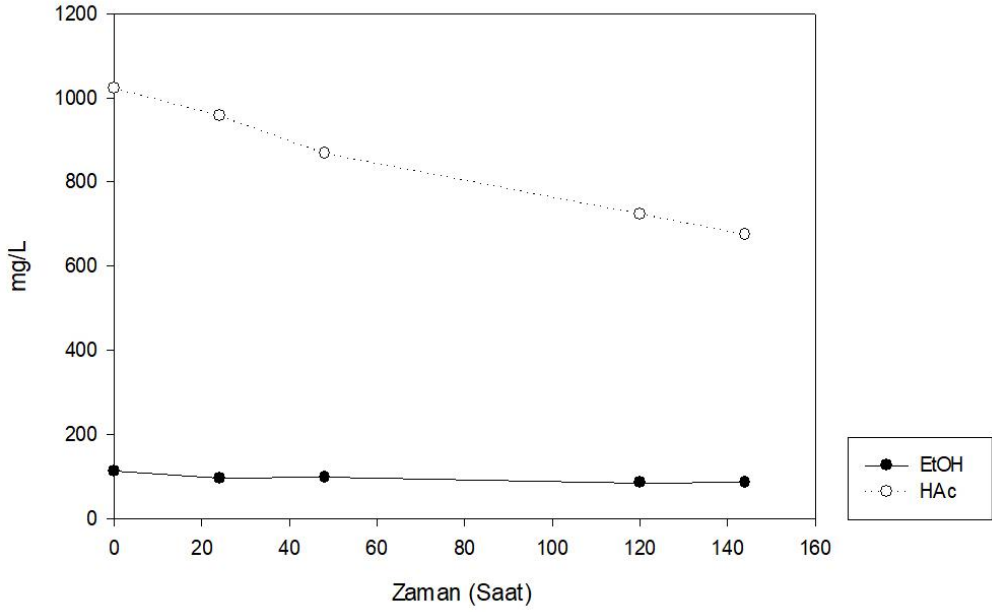
Tablo 4. 9. Zeytin çekirdeği biyokömürü kullanılan biyoreaktörde *Clostridium ljungdahlii* tutunma denemesinde askıda katı madde değerleri

Günler	Biyokömür
0	50 mg/L
1	210 mg/L
2	220 mg/L
3	620 mg/L

Tablo 4.9'daki değerler incelendiğinde 24 saat içerisinde askıda katı madde değerinin 50 mg/L'den 210 mg/L'ye yükseldiği ve askıda katı madde değerindeki artışın devam ettiği görülmektedir. Bakterinin immobilizasyonu için kullanılan zeytin çekirdeği biyokömürünün immobilize materyal olarak kullanılıp kullanılamayacağı konusunda anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Mikroorganizmanın biyokömüre tutunup tutunmadığı tam olarak tespit edilememiş olsa da sentez gazının optimum konsantrasyonu 24 saatte bir enjektör yardımıyla biyoreaktöre beslenmiştir.

Biyoreaktör çıkış suyundan sıvı örnekleme ve biyoreaktörün çalışma parametrelerinin kontrolü sağlanmıştır.



Şekil 4. 29. Zeytin çekirdeği biyokömürü dolu biyoreaktörde *Clostridium ljungdahlii* ile etanol ve asetik asit üretim performansı pH:4.5-5

Şekil 4.29 incelendiğinde etanol üretimi 10. saatten 144. saate kadar önemli bir artış göstermemiştir. Aksine bir düşüş gözlemlenmiştir.

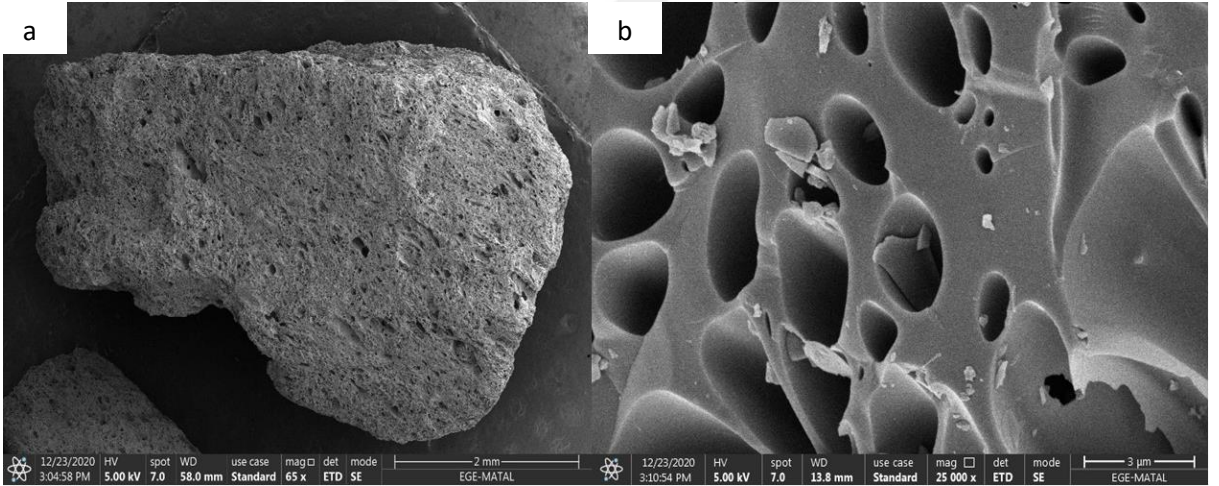
Asetik asit miktarındaki azalmanın metabolik yolizine bağlı olarak etanol miktarında artış ile paralel davranış göstermesi beklenirken etanol miktarında artış gözlenmemiştir. Bu durum etanolün biyokömür tarafından adsorpsiyonu ile açıklanabilir.

4.3 *Clostridium Ljungdahlii* ile Kesikli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Numunelerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleme Sonuçları

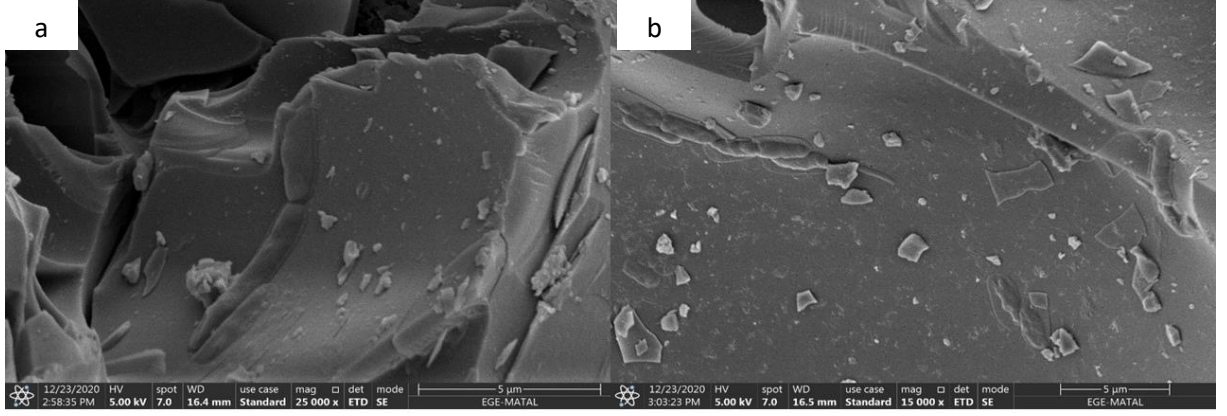
Tez çalışmasında sentez gaz fermantasyonunu gerçekleştirmek amacı ile kullanılan *Clostridium ljungdahlii* suşunun, immobilizasyon malzemesi olarak kullanılan seramik top ve ponza taşı materyalleri üzerine tutunmalarını gözlemlemek amacıyla “Taramalı Elektron Mikroskobu”nda görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen görseller bakteri tutunumu daha net ifade edilebilmiştir.

İmmobilize materyal olarak ponza

Ponza öncelikle bakteri ile temas etmemiş hali ile görüntülenmiştir. Görüntüleme sonucu bakterinin tutunmasını kolaylaştırıcı pürüzlü yüzey gözlenmiştir.



Şekil 4. 30. Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal ponza SEM görüntüsü, a) 2µm ölçek, 65 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 25000 kat büyütme



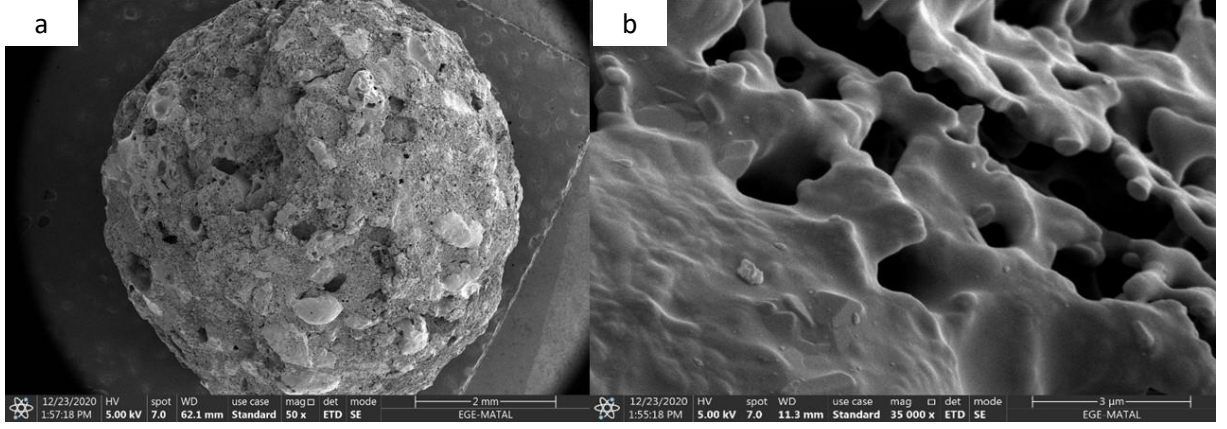
Şekil 4. 31. İmmobilize materyal ponza yüzeyi üzerine *Clostridium ljungdahlii* tutunumu SEM görüntüsü, a) 5µm ölçek, 25000 kat büyütme, b) 5µm ölçek, 15000 kat büyütme

SEM görüntüleri incelendiğinde ponzanın daha küçük bir tutunma alanı yarattığı ve ponza yüzeyinde seramik topa oranla bakterinin daha zor tutunduğu görülmektedir (Şekil 4.30-4.31).

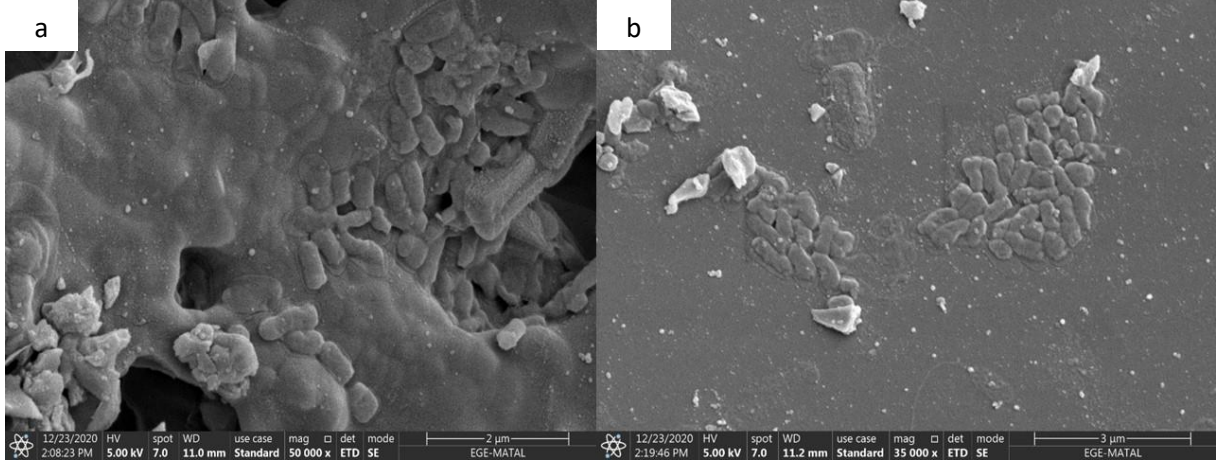
Biyoreaktör içerisinde yaklaşık 800 saat bakteri ile temas halinde olan immobilize materyal olarak kullanılan ponzanın deformasyona uğramadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde immobilize materyal olarak kullanılan ponza üzerine tutunan *Clostridium ljungdahlii* bakterisinin de yapısında bir bozulma gözlemlenmemiştir. Buna göre; bir immobilize materyalin sahip olması gereken, fiziksel, kimyasal ve biyolojik kararlılığa ve düşük toksisiteye sahip olma özelliğini ponza taşımaktadır.

İmmobilize materyal olarak seramik top

Seramik top öncelikle bakteri ile temas etmemiş hali ile Taramalı Elektron Mikroskopunda görüntülendi. Görüntüleme sonucu bakterinin tutunmasını kolaylaştırıcı pürüzlü yüzey gözlenmiştir.



Şekil 4. 32. Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal seramik top SEM görüntüsü, a) 2µm ölçek, 50 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 35000 kat büyütme

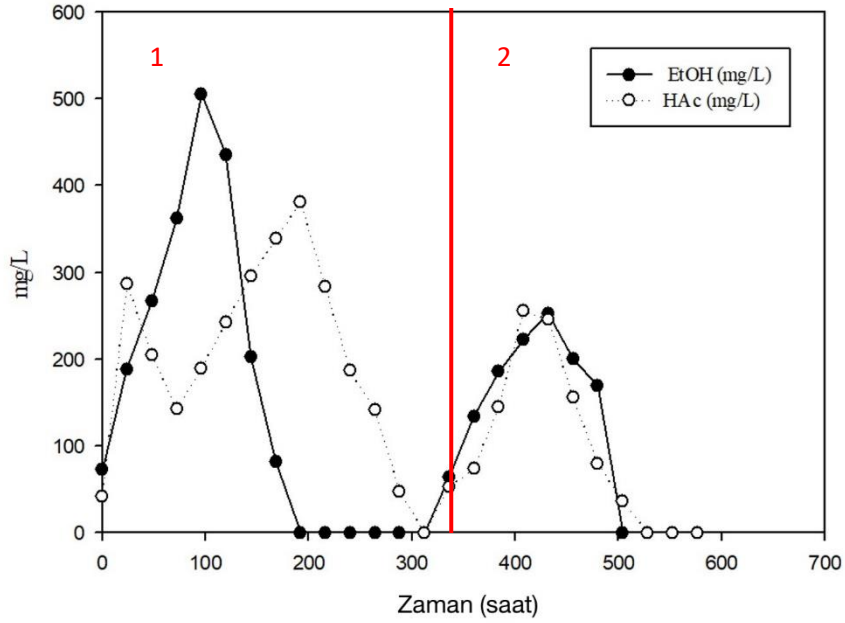


Şekil 4. 33. İmmobilize materyal seramik top yüzeyi üzerine *Clostridium ljungdahlii* tutunumu SEM görüntüsü, a) 2µm ölçek, 50000 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 35000 kat büyütme

Seramik top oldukça pürüzlü bir yapıya sahiptir ve bu yapısına bağlı olarak ponzaya oranla bakterinin daha rahat tutunduğu görülmektedir (Şekil 4.32-4.33). Biyoreaktör içerisinde yaklaşık 800 saat bakteri ile temas halinde olan seramik topun deformasyona uğramadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde immobilize materyal olarak kullanılan seramik topun üzerine tutunan *Clostridium ljungdahlii* bakterisinin de yapısında bir bozulma gözlemlenmemiştir. Buna göre; bir immobilize materyalin sahip olması gereken, fiziksel, kimyasal ve biyolojik kararlılığa ve düşük toksisiteye sahip olma özelliğini seramik top da taşımaktadır.

4.4 *Clostridium Ljungdahli* ile İmmobilize Malzeme Olarak Seramik Top Kullanan Sürekli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Denemeleri

Bazal ortamın eklendiği inokulum çözeltisi aşağıdan yukarı akışla peristaltik pompa aracılığı ile beslenmiştir ve giriş - çıkış sularından numune alınmıştır. Çevrim 48 saat aralıksız devam ettirilmiştir. Biyoreaktör sıcaklığı ısıtıcı ceket ile sabit tutulmuştur. İnokulumun en az %50'sinin biyoreaktör içinde tutunmasının ve biyoreaktör içerisindeki fruktoz miktarının tükenmesinin ardından biyoreaktörlere azalan hacimlerde $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$, $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ ve $2.4 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz besleme hızında Alicat marka kütle akış kontrol cihazı yardımı ile yapılarak biyoetanol üretim performansı incelenmiştir. Şekil 4.34'de immobilize biyoreaktör üzerinde çalışılmış 2 farklı şart görülmektedir.



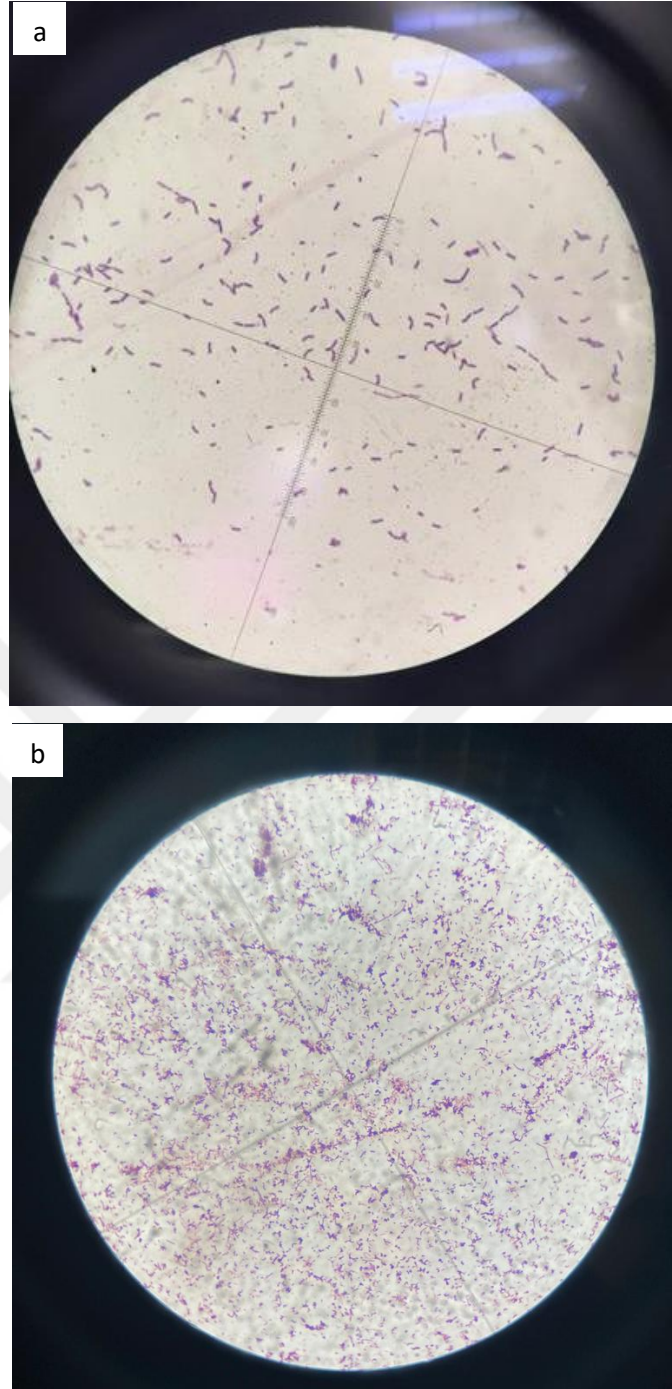
Şekil 4.34. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde etanol ve asetik asit üretim performansları (1) $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ besleme -fruktoz, (2) $2.4 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ besleme -fruktoz

1. bölgede biyoreaktör içerisine kütle akış kontrol cihazı yardımı ile $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ besleme hızında sentez gaz beslenmiştir. Bu çalışmada, başlangıçta etanol üretimi, asetik asit birikimiyle aynı anda meydana gelmiştir. Etanol konsantrasyonu artmaya devam ederken asetik asit konsantrasyonunda azalma gözlemlenmiştir. Bu durum bu suşta asetik asidin etanole dönüşümünü açıkça doğrulamaktadır. Etanol üretimi 69. saate kadar artış eğilimindeyken 192. saate kadar ani bir düşüş göstermiştir. Benzer şekilde asetik asit miktarı etanol üretimi ile ters

orantılı bir şekilde değişim gösterirken 216. dakikadan sonra etanolün tükenmesi ile beraber ani bir düşüş göstermiştir. 528. saatte biyoreaktör içerisindeki asetik asit konsantrasyonu da tükenmiştir. OD değerindeki artışın dikkat çekmesi ve biyoreaktörde meydana gelen görsel değişimler (Şekil 4.35) göz önüne alınarak biyoreaktör içerisinden alınan sıvı numune mikroskop altında incelenmiştir (Şekil 4.36). Mikroskop altında inceleme işleminden önce sıvı numunelere gram boyama yöntemi uygulanmıştır. Gram negatif olan bir bakteri ile biyoreaktörün kontamine olduğu düşünülmüştür. Gen analizi yapılmamıştır. Buna göre biyoreaktörün tam olarak oksijensizleştirilememesine ve kullanılan sistemin tam olarak sterilize edilememesine bağlı olarak kontamine olmasıyla etanol ve asetik asit konsantrasyonlarında azalmanın gözlemlendiği sonucuna varılmıştır. 2. bölgede sterilize edilen biyoreaktör içerisine kütle akış kontrol cihazı yardımı ile $2.4 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ besleme hızında sentez gaz beslemesi yapılmıştır. 1. bölge tepe gazında ölçülen CO miktarı göz önüne alınarak besleme hızı 1. bölgeye göre 4 kat azaltılmıştır. Fakat $2.4 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ besleme hızında gaz besleme hattına biyoreaktör içi sıvının dolma eğiliminde olması nedeni ile verimli gaz besleme işlemi gerçekleştirilememiştir. 1. bölge ile benzer şekilde bu çalışmada da kontaminasyon sorunu yaşanmıştır. Daha sonraki çalışmalara $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ besleme hızında, sıvı sirkülasyon hattı iptal edilerek devam edilmiştir.

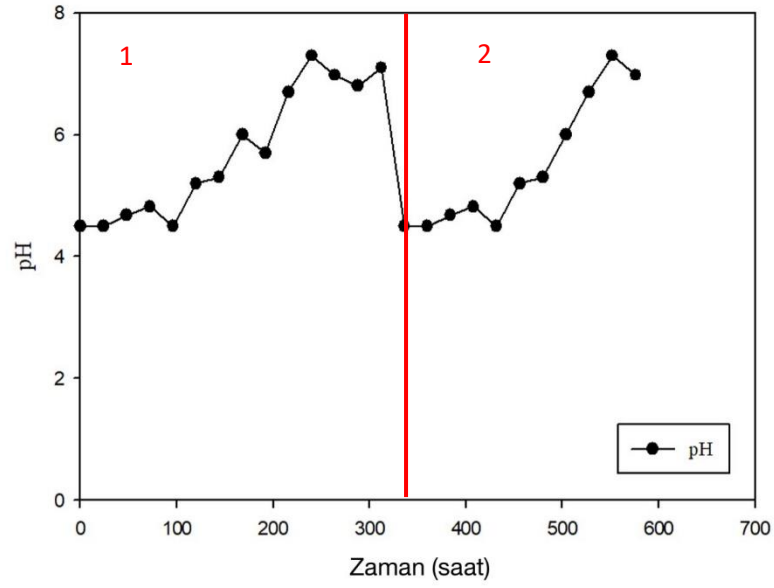


Şekil 4. 35. Kontamine olan biyoreaktör sıvı sirkülasyon hattı



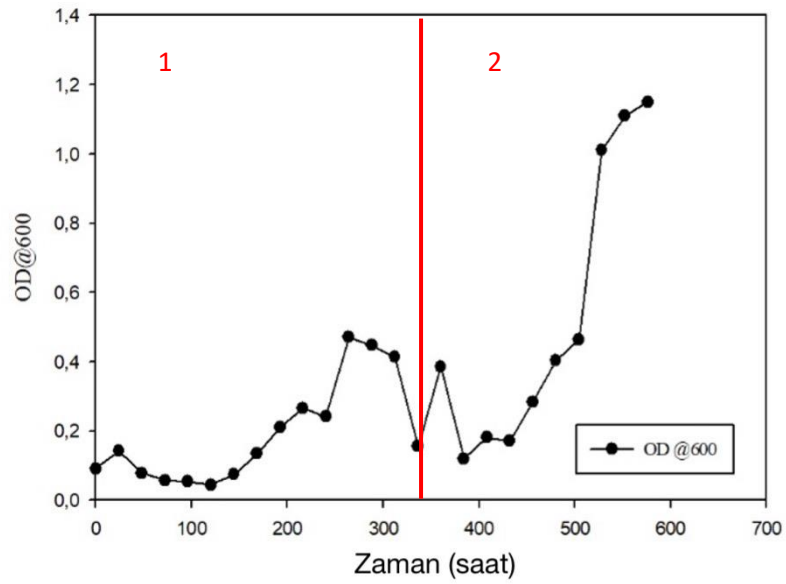
Şekil 4.36. Kontamine olmamış (a) ve kontamine olmuş (b) biyoreaktörden alınan sıvı numunelerin mikroskop altındaki görüntüleri

Fermantasyon pH'ının hücre büyümesini ve gaz fermantasyonundaki son metabolitlerin doğasını ve konsantrasyonunu etkileyen ana parametre olduğu bilinmektedir. pH değerinde sentez gaz beslemesi sırasında optimum değer gözlenirken, kontaminasyon gerçekleştiğinde pH değerinde artış gözlenmektedir (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde pH değişimleri (1) $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_R/\text{gün}$ besleme -Fruktoz, (2) $2.4 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_R/\text{gün}$ besleme -Fruktoz

Şekil 4.38'deki OD verileri incelendiğinde değerlerdeki ani artış kontaminasyona bağlı olarak bakteri konsantrasyonunda meydana gelen artış ile açıklanabilir.

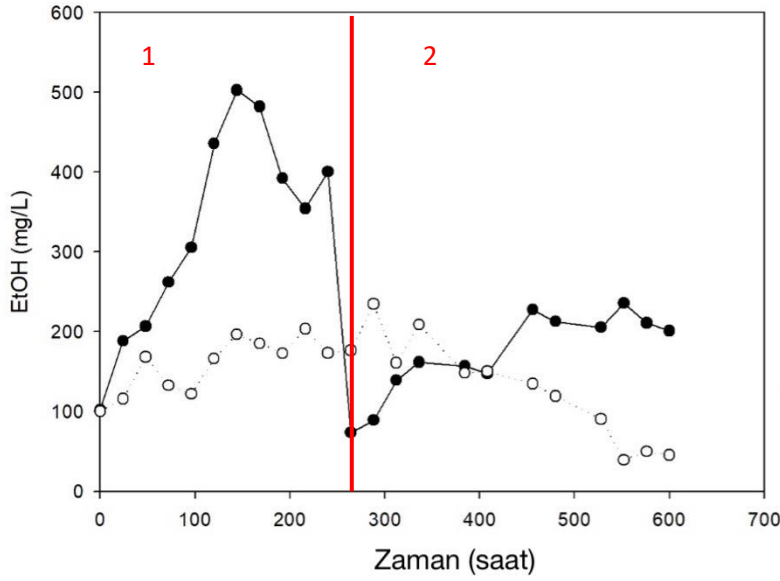


Şekil 4.38. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde OD değerleri (1) $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_R/\text{gün}$ besleme -fruktoz, (2) $2.4 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_R/\text{gün}$ besleme -fruktoz

Tablo 4. 10. Biyoreaktöre ait performans parametreleri

Mikroorganizma	İmmobilize Materyal	Gaz Kompozisyonu	Hacimsel Yükleme Hızı ($\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$)	EBCT (Empty Bed Contact Time) (Saat)	GHSV (Gas Hourly Space Velocity) (Saat^{-1})	Maksimum Etanol Üretimi (mg/L)	Etkin Yüzey Alanı (m^2)
<i>Clostridium ljugdahlii</i>	Seramik Top	%60 CO , %10 CO_2 , %10 H_2 , %10 CH_4 , %10 N_2	9.6	2.5	0.8	506	119
<i>Clostridium ljugdahlii</i>	Seramik Top	%60 CO , %10 CO_2 , %10 H_2 , %10 CH_4 , %10 N_2	2.4	10	1.2	168	119

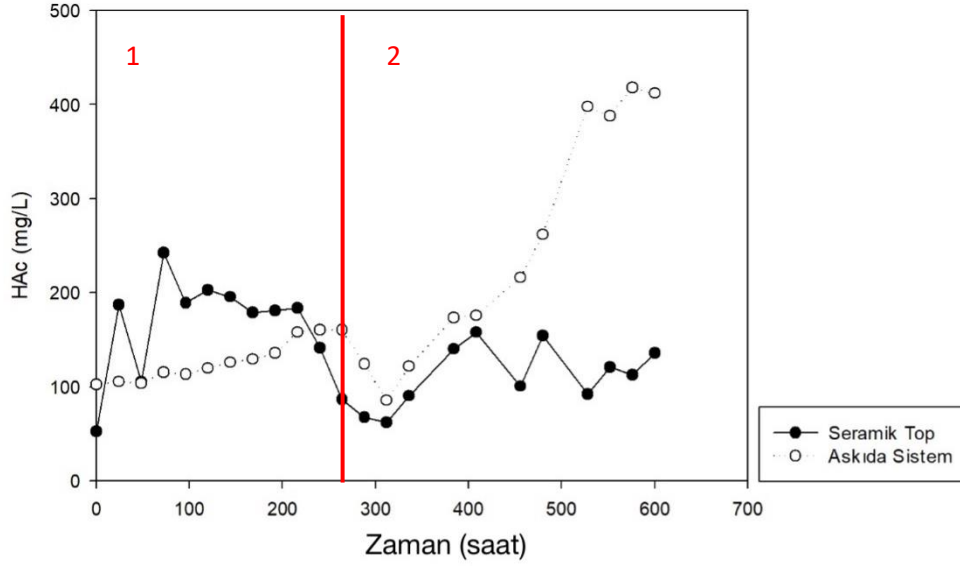
Denemeler sterilize edilmiş biyoreaktör ve immobilize materyaller ile tekrar yapılmıştır.



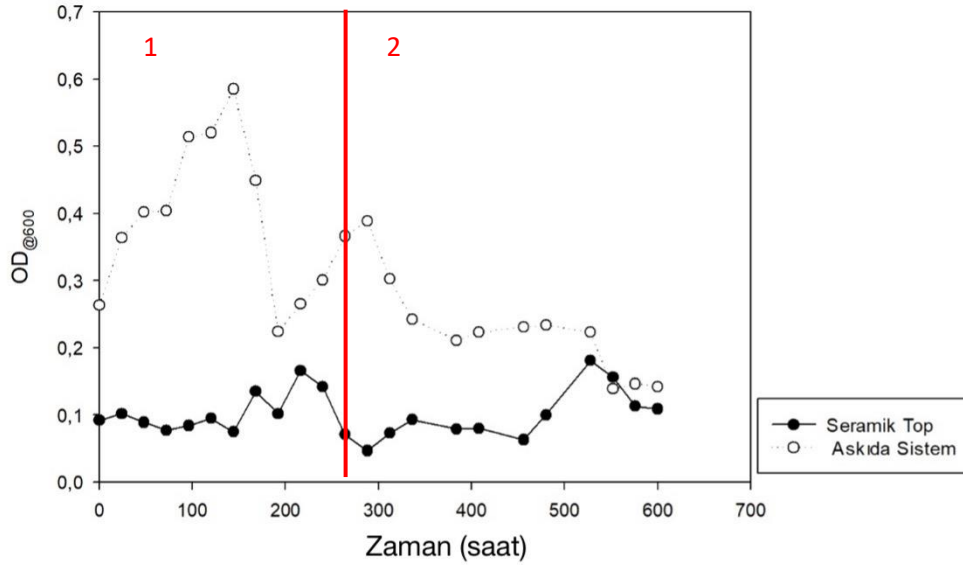
Şekil 4. 39. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde etanol üretim performansları (1) $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ besleme -fruktoz, (2) $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ besleme -fruktoz

1. bölgede biyoreaktör içerisine kütle akış kontrol cihazı yardımı ile $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ besleme hızında sentez gaz beslenmiştir. Bu çalışmada, başlangıçta etanol üretimi, asetik asit birikimiyle aynı anda meydana gelmiştir. Etanol konsantrasyonu artmaya devam ederken asetik

asetik konsantrasyonunda azalma gözlemlenmiştir. Bu durum bu suşta asetik asidin etanole dönüşümünü açıkça doğrulamaktadır. Etanol üretimi 144. saate kadar artış eğilimindeyken 168. saatte ani bir düşüş göstermiştir. Asetik asit miktarı etanol üretimi ile ters orantılı bir şekilde değişim göstermesi beklenirken 72. Saatten sonra bir düşüş ve ardından stabil değerler görülmüştür. 2. bölgede biyoreaktör içerisine kütle akış kontrol cihazı yardımı ile 4.8 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızında sentez gaz beslenmiştir. Etanol üretim performansı 1. bölgeye göre 2 kat daha az gerçekleşmiştir. Etanol üretim trendi ise 1. bölge ile benzer davranış göstermiştir



Şekil 4. 40. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde asetik asit üretim performansları (1) 9.6 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz, (2) 4.8 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz



Şekil 4. 41. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde OD değerleri (1) 9.6 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz, (2) 4.8 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz

OD grafiği incelendiğinde immobilizasyonun etkisi açıkça görülebilmektedir. Seramik topun immobilize materyal olarak kullanıldığı biyoreaktörde etanol verimi askıda sisteme göre daha fazladır ve bu üretim immobilize olmuş bakteriler tarafından gerçekleştirildiğinin bir göstergesidir.

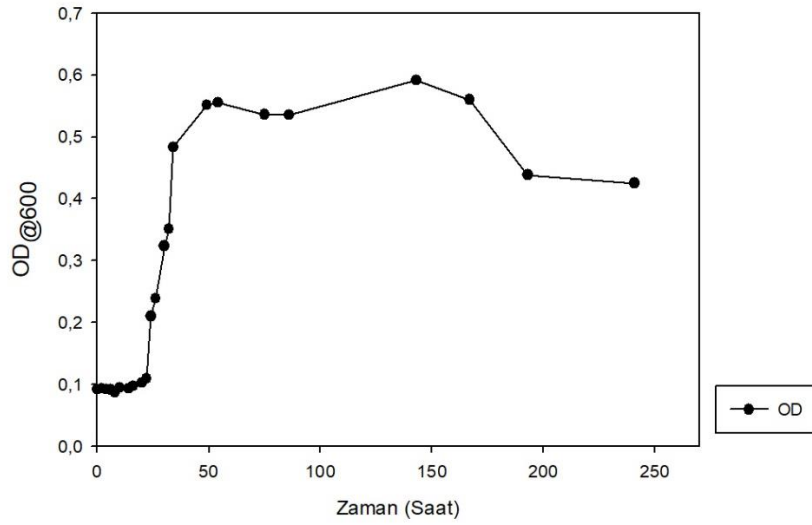
Tablo 4. 11. Biyoreaktöre ait performans parametreleri

Mikroorganizma	İmmobilize Materyal	Gaz Kompozisyonu	Hacimsel Yükleme Hızı (m ³ gaz/m ³ V _R /gün)	EBCT (Empty Bed Contact Time) (Saat)	GHSV (Gas Hourly Space Velocity) (Saat ⁻¹)	Maksimum retimi (mg/L)	Etkin Yüzey Alanı (m ²)
<i>Clostridium ljugdahlii</i>	Seramik Top	%60 CO, %10 CO ₂ , %10 H ₂ , %10 CH ₄ , %10 N ₂	9.6	2.5	0.8	503	119
<i>Clostridium ljugdahlii</i>	Seramik Top	%60 CO, %10 CO ₂ , %10 H ₂ , %10 CH ₄ , %10 N ₂	4.8	5	0.4	236	119
<i>Clostridium ljugdahlii</i>	Askıda Sistem	%60 CO, %10 CO ₂ , %10 H ₂ , %10 CH ₄ , %10 N ₂	9.6	2.5	0.8	203	-
<i>Clostridium ljugdahlii</i>	Askıda Sistem	%60 CO, %10 CO ₂ , %10 H ₂ , %10 CH ₄ , %10 N ₂	4.8	5	0.4	234	-

4.5 *Clostridium ragsdalei* ile Yapılan Kesikli Biyoreaktör Denemeleri

4.5.1 *Clostridium ragsdalei*'nin büyüme eğrisi

Clostridium ragsdalei ile ilgili yapılan literatür çalışmasında denemelerde ATCC tarafından tavsiye edilen ortam kullanılmıştır. Büyüme eğrisi denemesi de bu ortam kullanılarak ve 2 saatte bir örnek alınarak gerçekleştirilmiştir.



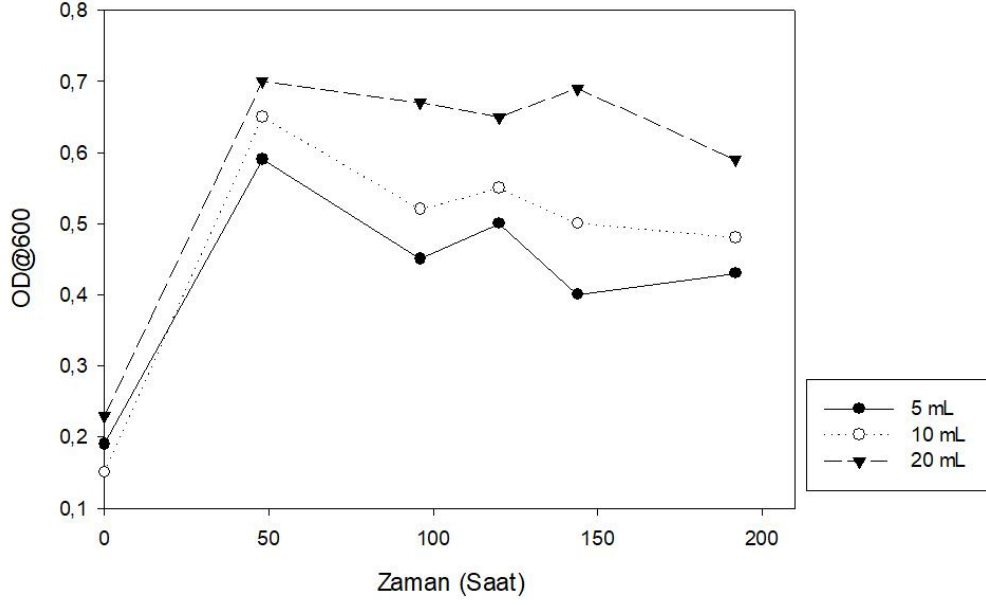
Şekil 4. 42. *Clostridium ragsdalei* büyüme eğrisi

Clostridium ragsdalei büyüme eğrisine bakıldığında bakterinin hızlı bir büyüme potansiyeli olduğu ve durağan faza hızlıca geçildiği görülmektedir. Büyüme eğrisi 24. saatten 48. saate kadar hızlı bir yükselme göstermiştir ve 48. saatten sonra durgun faza geçildiği görülmektedir. 167. saatten itibaren ölüm fazına geçiş gerçekleşmiştir. Bu grafiğe göre aktifleştirme işlemleri 48. saatte gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.42).

4.5.2 *Clostridium ragsdalei* ile biyoetanol üretiminde optimum CO miktarının belirlenmesi

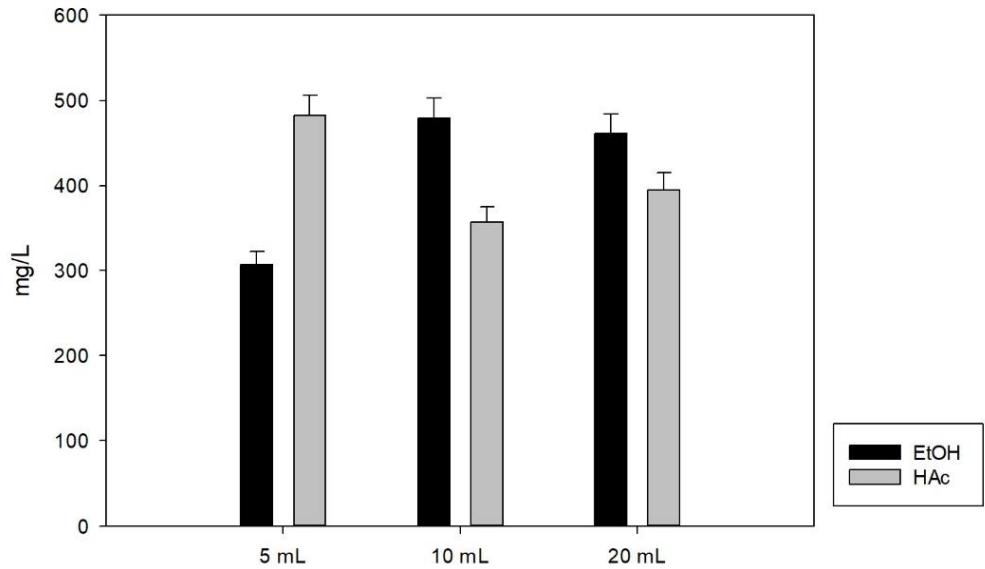
Optimum karbon monoksit miktarının belirlenmesi için 3 tekrarlı anaerobik kesikli biyoreaktörlere hacimce %10 inokülasyon yapılmıştır ve 24 saat boyunca 30°C'de 100 rpm'de karıştırılarak inkübasyona bırakılmıştır. Biyoreaktörlerde büyüme gözlemlendikten sonra 5

mL, 10 mL, 20 mL karbon monoksit gazı eklenerek etanol üretimleri incelenmiştir. Tüm biyoreaktörlerde etanol ve asetik asit analizleri yapılmıştır.



Şekil 4. 43. *Clostridium ragsdalei* ile optimum CO miktarının belirlenmesi denemesi OD değerleri

Clostridium ragsdalei ile etanol üretiminde optik yoğunluk değerlerinde her üç hacim değeri için hızlı bir büyüme gözlenmiştir (Şekil 4.43). OD değerleri bütün hacim değerlerinde 48 saatte maksimum noktalarına ulaşmış ve daha sonra durgun faza geçmişlerdir. OD değeri 20 mL, 10 mL ve 5 mL için sırasıyla 0.7, 0.65 ve 0.58 değerlerine ulaşmıştır.

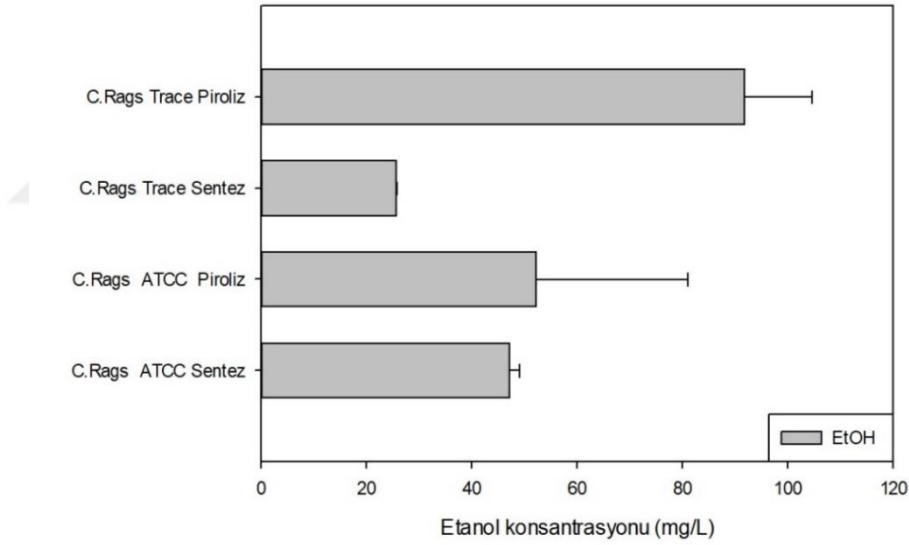


Şekil 4. 44. *Clostridium ragsdalei* ile optimum CO miktarının belirlenmesi denemesi etanol üretim değerleri

Clostridium ragsdalei ile biyoetanol üretiminde en uygun CO miktarının belirlenmesi için yapılan deneme setinde etanol üretim değerleri 5 mL, 10 mL ve 20 mL CO besleme hacimlerinde sırasıyla 307 mg/L, 479 mg/L ve 461 mg/L olarak gözlenmiştir (Şekil 4.44). 10 mL ve 20 mL ile yakın sonuçlar elde edilmiştir. Ancak *Clostridium ljungdahlii* ile yapılan denemede 10 mL hacmin en iyi sonuçlar verdiği için hem karşılaştırma yapabilmek açısından hem de 20 mL eklenmesinin oluşturabileceği toksik etki nedeniyle yapılacak optimizasyon denemelerinde 10 mL besleme hacminin kullanılmasına karar verilmiştir.

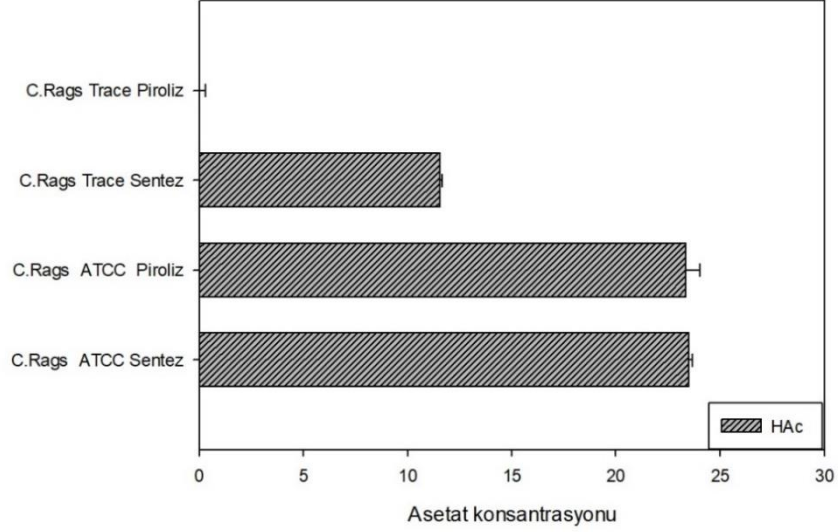
4.5.3 *Clostridium ragsdalei* ile en iyi koşullarda sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretimi

Sentez gaz ve piroliz gazı performansları karşılaştırıldığında piroliz gazın etanol üretiminde etkili olduğu gözlenmektedir.



Şekil 4. 45. *Clostridium ragsdalei* ile en iyi koşullarda hazır sentez gaz ve piroliz gazı ile etanol üretimi

Tez çalışması kapsamı dışında gerçekleştirilmiş olan optimum iz element çalışması ile elde edilen reçete kullanılarak yapılan çalışmada piroliz gaz performansının sentez gaza göre gözle görülür derecede daha yüksek olduğu ve iz element içeriğinin optimum değerlere göre değiştirilmesi ile elde edilen etanol üretim performansının sentez gaz için etkili olmasa da piroliz gaz için yaklaşık 3.5 kat arttığı gözlemlenmektedir.



Şekil 4. 46. *Clostridium ragdalei* ile en iyi koşullarda hazır sentez gaz ve piroliz gazı ile asetik asit üretimi

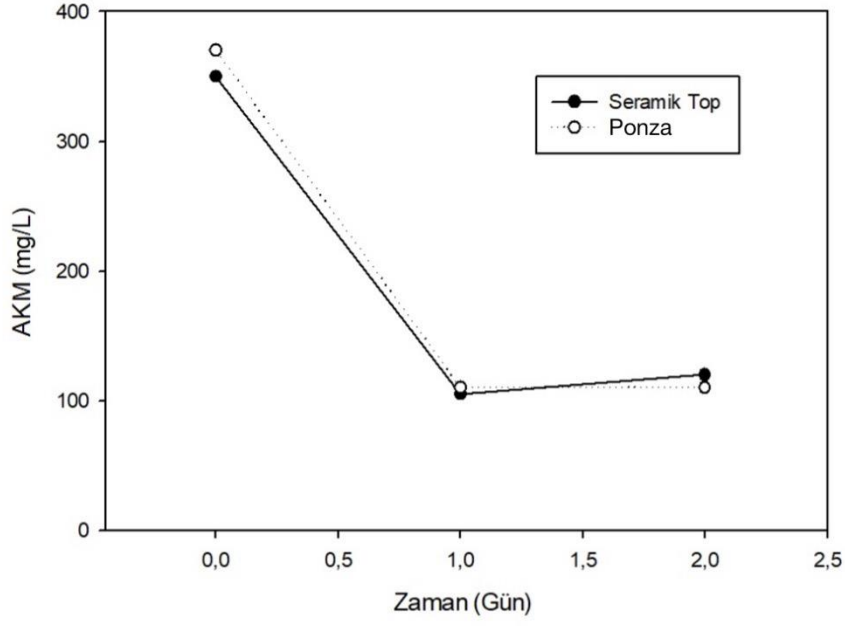
Şekil 4.46 incelendiğinde piroliz gaz beslenen biyoreaktörlerde ve sentez gaz beslenen biyoreaktörlerde asetik asit üretim performanslarının yakın olduğu gözlenmektedir.

4.6 *Clostridium Ragdalei* ile Kesikli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Denemeleri (Seramik Top, Ponza, Askıda)

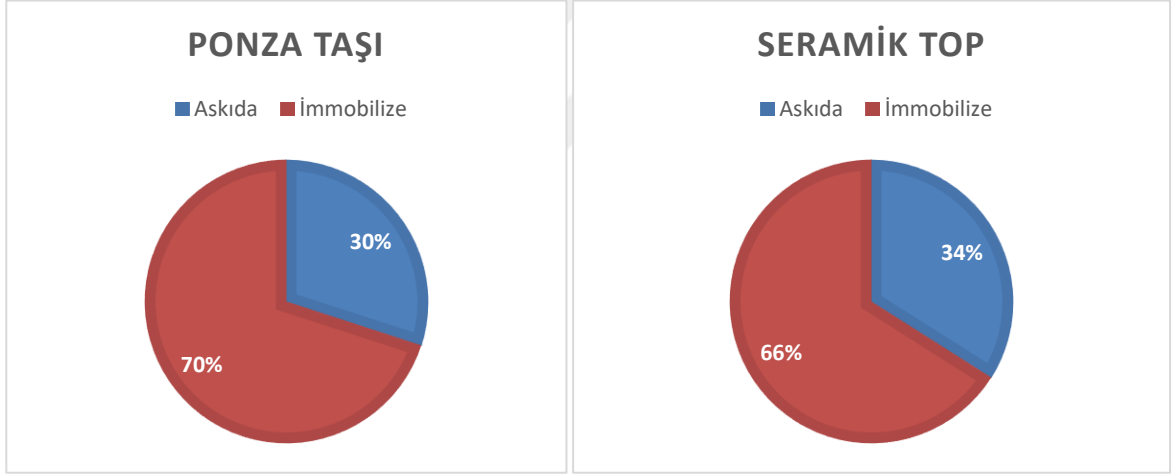
Tablo 4. 12. *Clostridium ragdalei* ile tutunma denemesinde askıda katı madde değerleri

Gün	Ponza taşı	Seramik top
0	370 mg/L	350 mg/L
1	110 mg/L	105 mg/L
2	110 mg/L	120 mg/L

Tablo 4.12'deki değerler incelendiğinde 24 saatte ponza taşında tutunmadan askıda kalan değerlerin 370 mg/L'den 110 mg/L'ye düştüğü, seramik topta ise 350 mg/L'den 105 mg/L'ye düştüğü gözlenmiştir. Ponza taşında seramik topta göre daha efektif tutunmanın olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4. 47. *Clostridium ragsdalei* immobilize materyale tutunma performansı



Şekil 4. 48. Ponza taşı ve seramik top dolgulu immobilize biyoreaktörde immobilize ve askıda biyokütle (*Clostridium ragsdalei*) oranları

48. saatin sonunda biyoreaktör içerisinde alınan sıvı örnekler üzerinde yapılan AKM analizi sonucunda başlangıçtaki mikroorganizma miktarının %70'inin ponza taşı üzerinde ve %66'sının ise seramik top üzerinde tutunduğu ölçülmüştür.

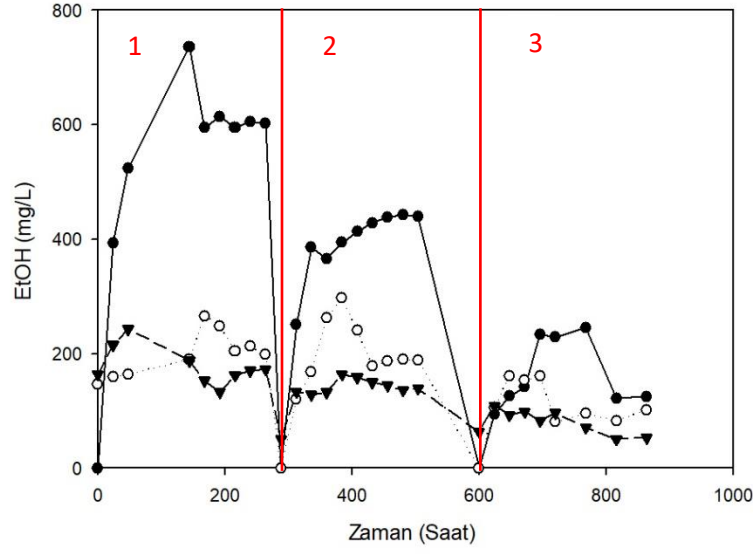
İnokulumun en az %50'sinin biyoreaktör içinde tutunmasının ardından biyoreaktör boşaltılmış ve sisteme kesikli denemelerde belirlenen optimum konsantrasyonlarda bazal ortam

eklenmiştir. Eş zamanlı olarak biyoreaktörden N_2 veya Ar gazı geçirilerek ortam anaerobikleştirilmiştir. Mikroorganizmanın tutunmasının sağlanmasının ardından optimum konsantrasyonda sentez gaz çalışmaya uygun akış kontrol cihazımız olmadığı için her 24 saatte bir enjektör yardımı ile biyoreaktöre beslenmiştir. Biyoreaktör çıkış suyundan sıvı örneklemeleri ve biyoreaktörün işletim parametrelerinin kontrolü sağlanmıştır. Aynı şekilde biyoreaktör boş olarak da çalıştırılmış ve immobilize materyalin etkisinin olup olmadığı incelenmiştir.

Şekil 4.49'da immobilize biyoreaktör üzerinde çalışılmış 3 farklı şart görülmektedir. 1. bölgede immobilize biyoreaktörün içerisinde inoküle edilmiş ortamımız doldurulmuş ve tutunmanın gerçekleşmesi için biyoreaktörde aşağıdan yukarıya olacak şekilde peristaltik pompalar yardımı ile çevrim gerçekleştirilmiştir. Tutunma sağlandıktan sonra biyoreaktör içerisine enjektör yardımı ile $0.1 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz beslenmiştir. Etanol üretimi 168. saatten 264. saate kadar anlamlı artış göstermemiştir.

2. bölgede 264. saatten sonra biyoreaktör içerisindeki sıvı boşaltılmış ve fruktoz içermeyen bazal ortam ile biyoreaktör tekrar doldurulmuştur. 24 saat sonra biyoreaktöre $0.1 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz beslenmiştir.

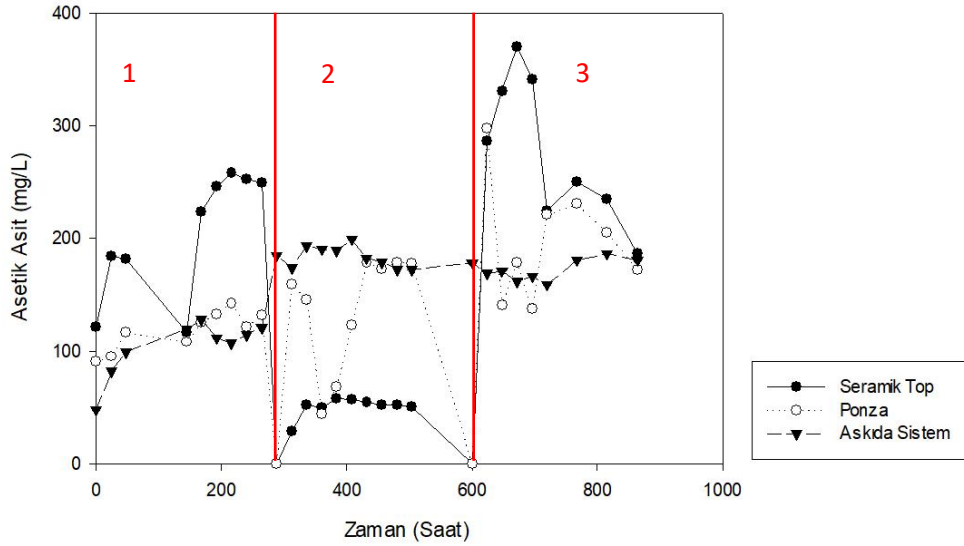
3. bölgede biyoreaktör içerisindeki sıvı boşaltılıp fruktoz içermeyen bazal ortam ile doldurulmuştur ve 24 saat sonra biyoreaktöre $0.2 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz beslemesi yapılmıştır. Her 24 saatte bir $0.2 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz beslenmiştir. 2. bölge ile kıyaslandığında etanol üretim performansının düşük olduğu gözlenmektedir. optimum CO miktarının belirlenmesi çalışması ile paralel bir sonuç olarak sentez gazının miktarının artışı bakteri üzerinde strese sebebiyet vererek verimin düşmesine neden olmaktadır.



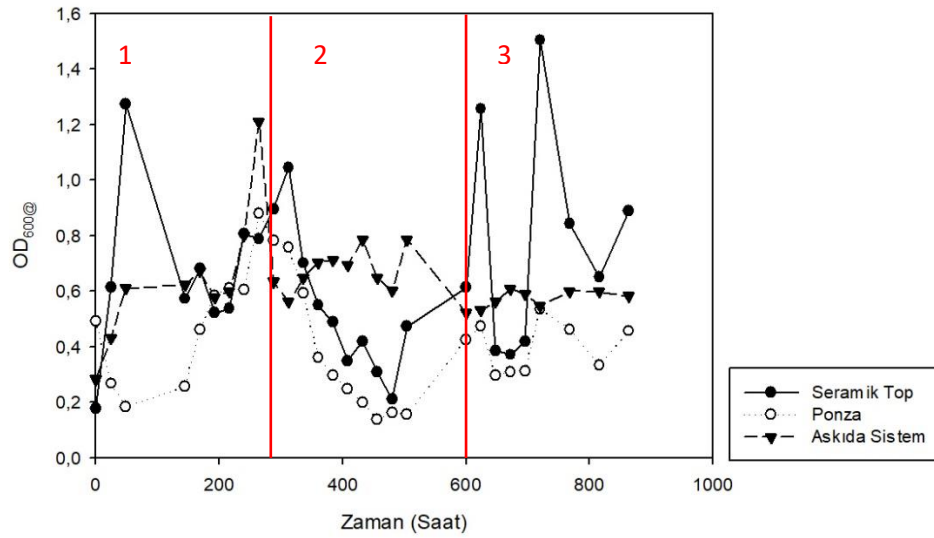
Şekil 4. 49. İmmobilize biyoreaktörde ve askıda sistemde sentez gazdan etanol üretim performansları. (1) $0.1\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün} + \text{fruktoz}$, (2) $0.1\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün} - \text{fruktoz}$, (3) $0.2\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün} - \text{fruktoz}$

Seramik top ile ponzanın bulunduğu biyoreaktör çalışmaları ile immobilizasyon malzemesi içermeyen askıda biyoreaktör çalışması karşılaştırıldığında $0.1\text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz beslemesi ile etanol üretimindeki performans artışı seramik top için yaklaşık 3 kat, ponza için yaklaşık 1.5 kat olmuştur.

Clostridium ljungdahlii ile etanol üretim çalışmasındaki elde edilen verilere benzer olarak etanol konsantrasyonu ile asetik asit konsantrasyonu arasındaki ters orantı CO'nun metabolik yolizindeki davranışı konusunda bize bilgi vermektedir. Artan asetik asit konsantrasyonunda metabolik yolizinde yapılacak müdahalelerle etanol üretim kapasitesinin arttırılabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4. 50. İmmobilize biyoreaktörde ve askıda sistemde sentez gazdan asetik asit üretim performansları. (1) 0.1m³gaz/m³R/gün +fruktoz, (2) 0.1m³gaz/m³R/gün -fruktoz, (3) 0.2m³gaz/m³R/gün -fruktoz



Şekil 4. 51. İmmobilize biyoreaktörde ve askıda sistemde OD değerleri. (1) 0.1m³gaz/m³R/gün +fruktoz, (2) 0.1m³gaz/m³R/gün -fruktoz, (3) 0.2m³gaz/m³R/gün -fruktoz

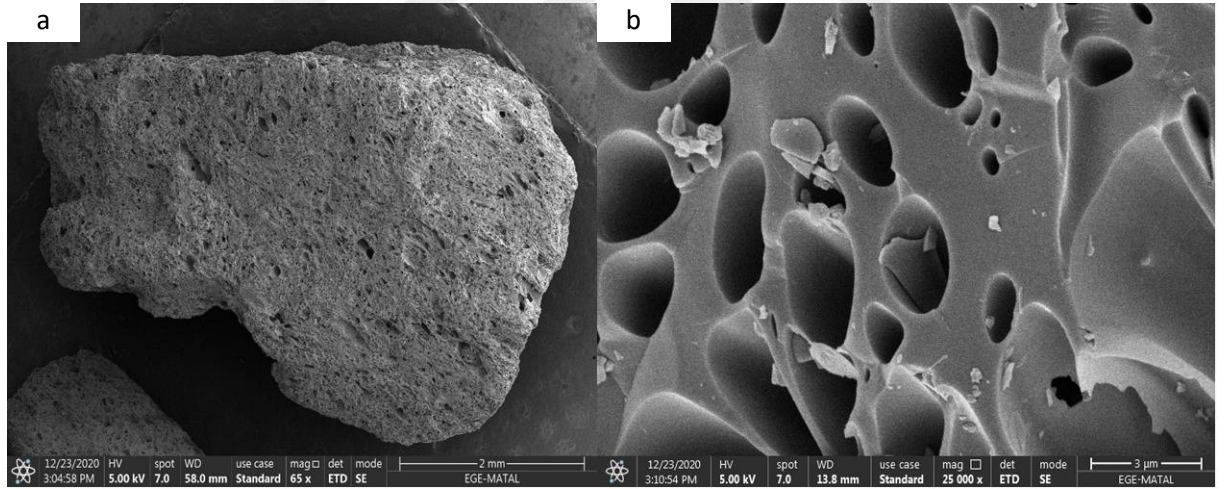
Şekil 4.51'deki OD verileri incelendiğinde *Clostridium ljungdahlii* OD verileri ile benzer şekilde askıda sistemde OD değerlerinde artış eğilimli bir trend görülmektedir. İmmobilize materyallerin bulunduğu biyoreaktörlerde OD değerlerindeki yükseliş bakteri konsantrasyonundaki artış ve OD değerlerindeki kayıp ise bakterinin immobilize materyale tutunması ile açıklanabilmektedir.

4.7 *Clostridium Ragsdalei* ile Kesikli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleme Sonuçları

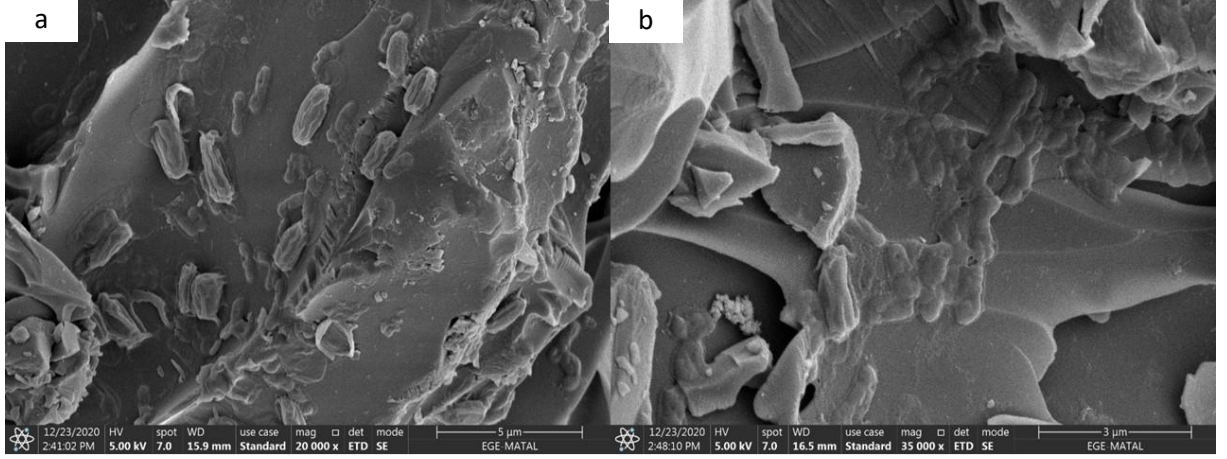
Tez çalışmasında sentez gaz fermantasyonunu gerçekleştirmek amacı ile kullanılan *Clostridium ragsdalei* suşunun, immobilizasyon malzemesi olarak kullanılan seramik top ve ponza materyalleri üzerine tutunmalarını gözlemlemek amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobunda görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen görseller bakteri tutunumu daha net ifade edilebilmiştir.

İmmobilize materyal olarak ponza

Ponza öncelikle bakteri ile temas etmemiş hali ile görüntülenmiştir. Görüntüleme sonucu bakterinin tutunmasını kolaylaştırıcı pürüzlü yüzey gözlenmiştir.



Şekil 4. 52. Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal ponza SEM görüntüsü, a) 2µm ölçek, 65 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 25000 kat büyütme

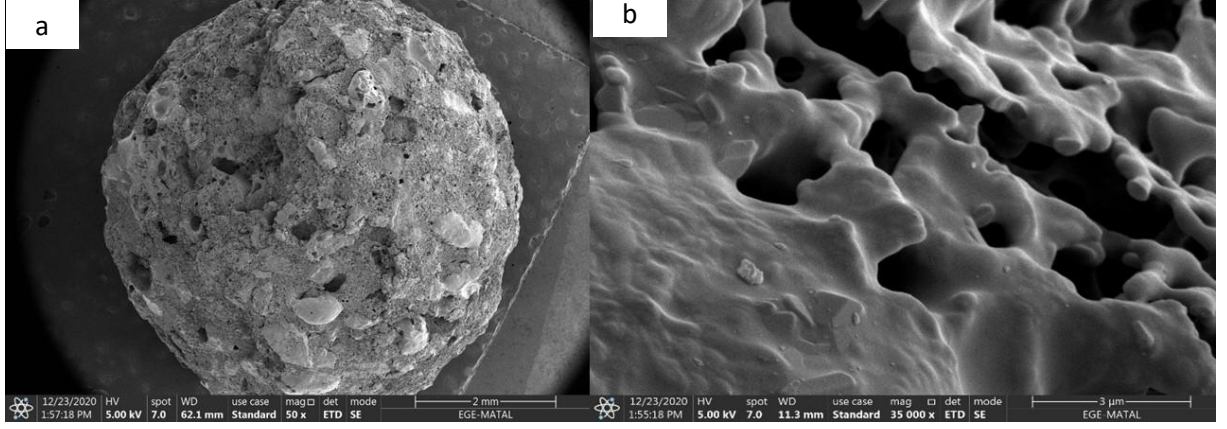


Şekil 4. 53. İmmobilize materyal ponza yüzeyi üzerine *Clostridium ragsdalei* tutunumu SEM görüntüsü, a) 5µm ölçek, 20000 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 35000 kat büyütme

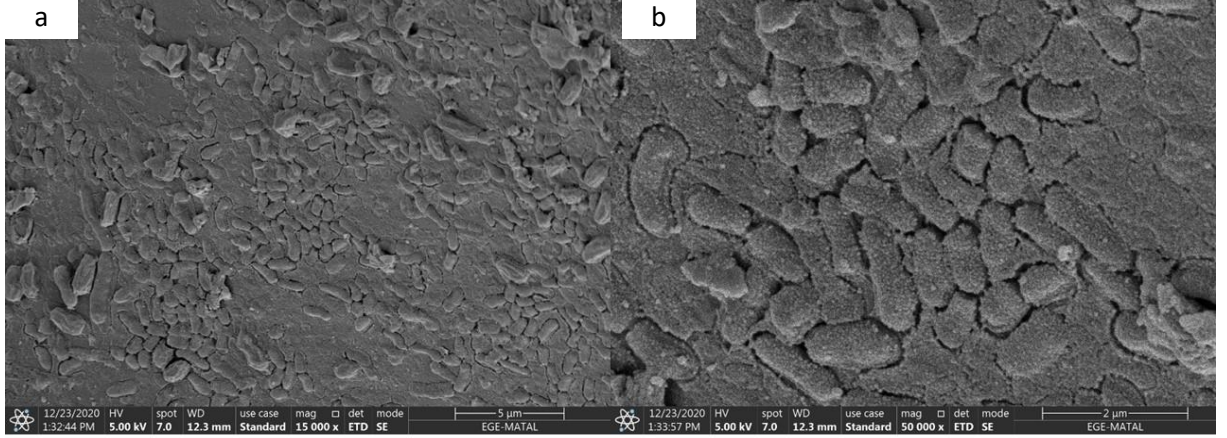
SEM görüntüleri incelendiğinde ponzanın daha küçük bir tutunma alanı yarattığı ve ponza yüzeyinde seramik topa oranla bakterinin daha zor tutunduğu görülmektedir (Şekil 4.52-4.53) *Clostridium ljungdahlii* ile yapılan çalışmaya benzer şekilde, biyoreaktör içerisinde yaklaşık 900 saat bakteri ile temas halinde olan immobilize materyalin deformasyona uğramadığı gözlenmiştir. İmmobilize materyal olarak kullanılan ponza üzerine tutunan *Clostridium ragsdalei* bakterisinin de yapısında bir bozulma gözlemlenmemiştir. Buna göre; bir immobilize materyalin sahip olması gereken, fiziksel, kimyasal ve biyolojik kararlılığa ve düşük toksisiteye sahip olma özelliğini ponza taşımaktadır.

İmmobilize materyal olarak seramik top

Seramik top öncelikle bakteri ile temas etmemiş hali ile Taramalı Elektron Mikroskobunda görüntülenmiştir. Görüntüleme sonucu bakterinin tutunmasını kolaylaştırıcı pürüzlü yüzey gözlenmiştir.



Şekil 4. 54. Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal seramik top SEM görüntüsü, a) 2µm ölçek, 50 kat büyütme, b) 3µm ölçek, 35000 kat büyütme

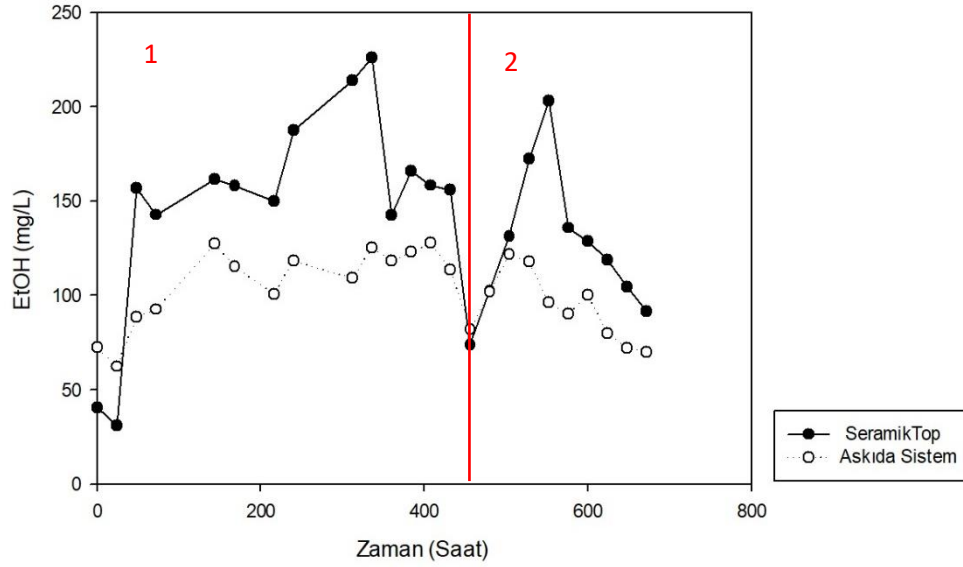


Şekil 4. 55. İmmobilize materyal seramik top yüzeyi üzerine *Clostridium ragsdalei* tutunumu SEM görüntüsü, a) 5µm ölçek, 15000 kat büyütme, b) 2µm ölçek, 50000 kat büyütme

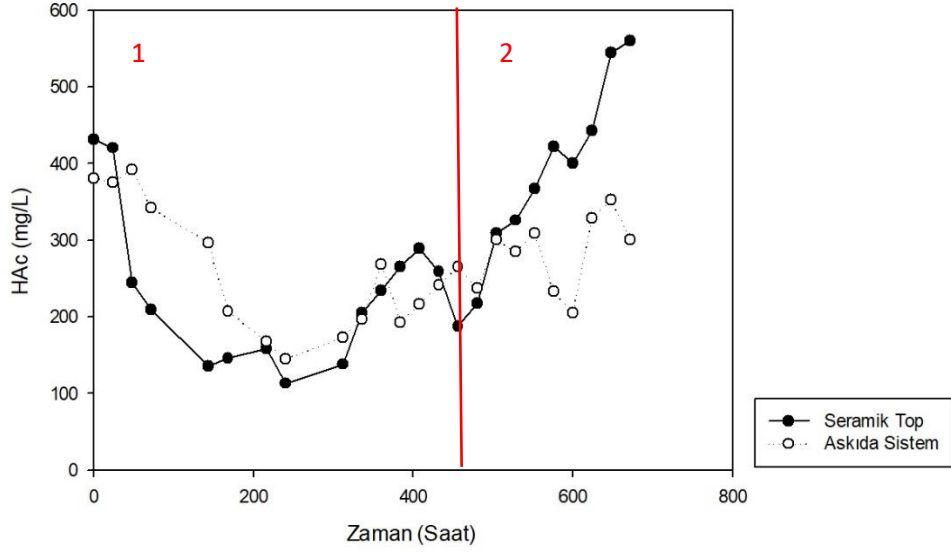
Seramik top oldukça pürüzlü bir yapıya sahiptir ve bu yapısına bağlı olarak ponzaya oranla bakterinin daha rahat tutunduğu görülmektedir (Şekil 4.54-4.55). *Clostridium ljungdahlii* ile yapılan çalışmaya benzer şekilde, biyoreaktör içerisinde yaklaşık 900 saat bakteri ile temas halinde olan seramik topun deformasyona uğramadığı gözlenmiştir. İmmobilize materyal olarak kullanılan seramik topun üzerine tutunan *Clostridium ragsdalei* bakterisinin de yapısında bir bozulma gözlemlenmemiştir. Buna göre; bir immobilize materyalin sahip olması gereken, fiziksel, kimyasal ve biyolojik kararlılığa ve düşük toksisiteye sahip olma özelliğini seramik top da taşımaktadır.

4.8 *Clostridium Ragsdalei* ile İmmobilize Malzeme Olarak Seramik Top Kullanan Sürekli Beslemeli İmmobilize Biyoreaktör Denemeleri

1. bölgede biyoreaktör içerisine kütle akış kontrol cihazı yardımı ile $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_R/\text{gün}$ besleme hızında sentez gaz beslenmiştir. Bu çalışmada, başlangıçta etanol üretimi, asetik asit birikimiyle ters yönlü olarak meydana gelmiştir. Etanol konsantrasyonu artmaya devam ederken asetik asit konsantrasyonunda azalma gözlemlenmiştir. Bu durum bu suşta asetik asidin etanole dönüşümünü açıkça doğrulamaktadır. Etanol üretimi 336. saate kadar artış eğiliminde olup etanol seviyesi 226 mg/L 'ye ulaşmışken 360. saatte ani bir düşüş göstermiştir. Asetik asit miktarı etanol üretimi ile ters orantılı bir şekilde değişim göstermeye devam etmiştir. 2. bölgede biyoreaktör içerisine kütle akış kontrol cihazı yardımı ile $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_R/\text{gün}$ besleme hızında sentez gaz beslenmiştir. Etanol seviyesi maksimum 203 mg/L 'ye ulaşmışken 1. bölgede de olduğu gibi ani bir düşüş göstermiştir.

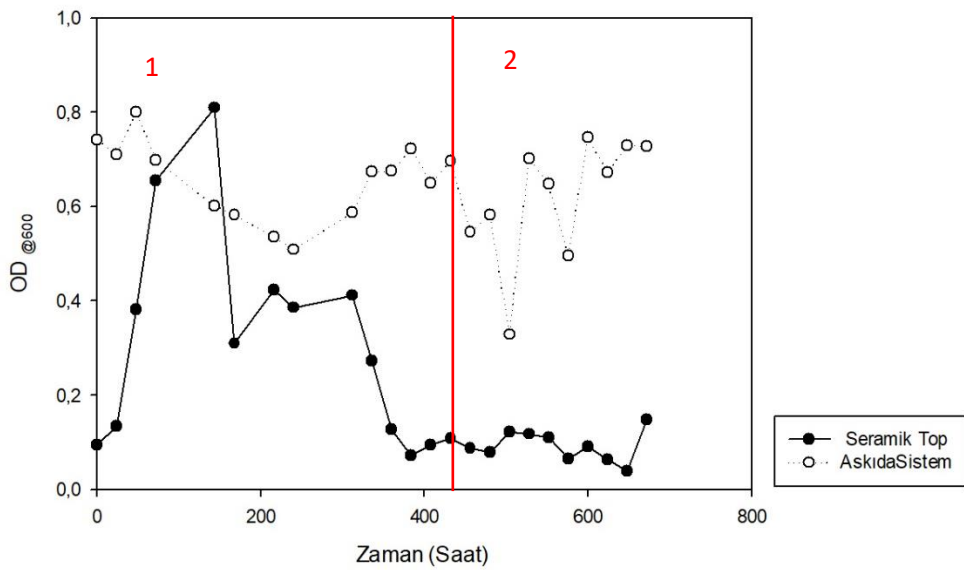


Şekil 4. 56. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde etanol üretim performansları (1) $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_R/\text{gün}$ besleme -fruktoz, (2) $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_R/\text{gün}$ besleme -fruktoz



Şekil 4. 57. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde asetik asit üretim performansları (1) $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_R/\text{gün}$ besleme -fruktoz, (2) $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_R/\text{gün}$ besleme -fruktoz

OD grafiği incelendiğinde immobilizasyonun etkisi 144. ve 168. saatler arasında açıkça görülebilmektedir. 168. saate kadar bakteri konsantrasyonu artış gösterirken 168. saatten sonra keskin bir düşüş gözlenmiştir. Benzer şekildeki düşüş 312. saatten sonra da gerçekleşmiştir. Bu durum bakterilerin immobilize materyale tutunumu ile açıklanabilmektedir. Seramik topun immobilize materyal olarak kullanıldığı biyoreaktörde etanol verimi askıda sisteme göre daha fazladır ve bu üretim immobilize olmuş bakteriler tarafından gerçekleştirildiğinin bir göstergesidir.



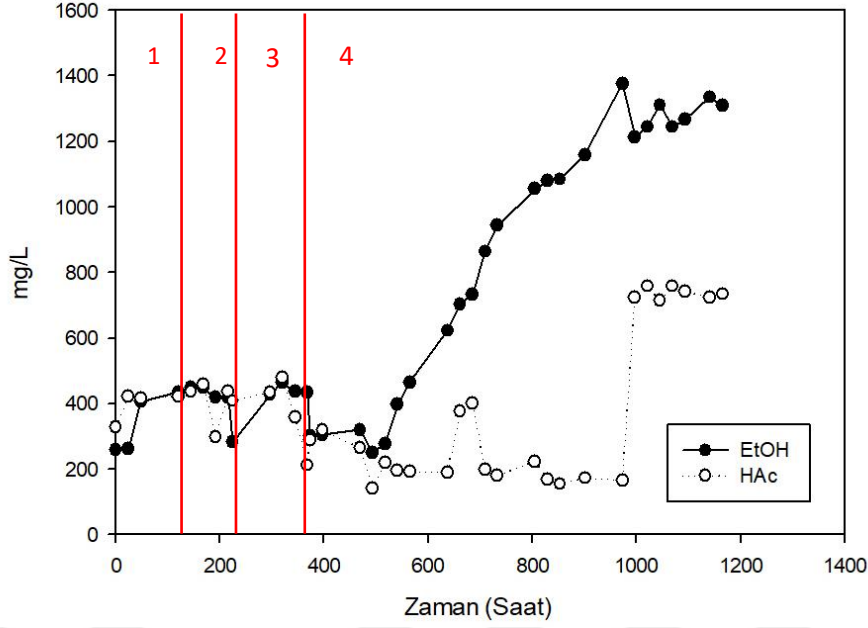
Şekil 4. 58. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde OD değerleri (1) $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_R/\text{gün}$ besleme -fruktoz, (2) $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_R/\text{gün}$ besleme -fruktoz

Tablo 4.13. Biyoreaktöre ait performans parametreleri

Mikroorganizma	İmmobilize Materyal	Gaz Kompozisyonu	Hacimsel Yükleme Hızı ($\text{m}^3 \text{gaz}/\text{m}^3 V_R/\text{gün}$)	EBCT (Empty Bed Contact Time) (Saat)	GHSV (Gas Hourly Space Velocity) (Saat^{-1})	Maksimum Üretimi (mg/L)	Etkin Yüzey Alanı (m^2)
<i>Clostridium ragsdalei</i>	Seramik Top	%60 CO, %10 CO ₂ , %10 H ₂ , %10 CH ₄ , %10 N ₂	9.6	2.5	0.8	226	119
<i>Clostridium ragsdalei</i>	Seramik Top	%60 CO, %10 CO ₂ , %10 H ₂ , %10 CH ₄ , %10 N ₂	4.8	5	0.4	203	119
<i>Clostridium ragsdalei</i>	Askıda Sistem	%60 CO, %10 CO ₂ , %10 H ₂ , %10 CH ₄ , %10 N ₂	9.6	2.5	0.8	128	-
<i>Clostridium ragsdalei</i>	Askıda Sistem	%60 CO, %10 CO ₂ , %10 H ₂ , %10 CH ₄ , %10 N ₂	4.8	5	0.4	122	-

Mikroorganizmanın en az %50'sinin biyoreaktör içinde tutunmasının ardından Saf CO gazı kütle akış kontrol cihazı yardımı ile $48 \text{ m}^3 \text{gaz}/\text{m}^3 V_R/\text{gün}$ ve $28.8 \text{ m}^3 \text{gaz}/\text{m}^3 V_R/\text{gün}$ besleme hızında İspanya La Coruna Üniversitesi Kimya Mühendisliği Laboratuvarında rektöre beslenmiştir. Biyoreaktör çıkış suyundan sıvı örneklemeleri ve biyoreaktörün işletim parametrelerinin kontrolü sağlanmıştır.

Şekil 4.59'da immobilize biyoreaktör üzerinde çalışılmış 4 farklı şart görülmektedir.



Şekil 4. 59. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde etanol ve asetik asit üretim performansları (1) +fruktoz, (2) 48 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz, (3) +fruktoz, (4) 28.8 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz

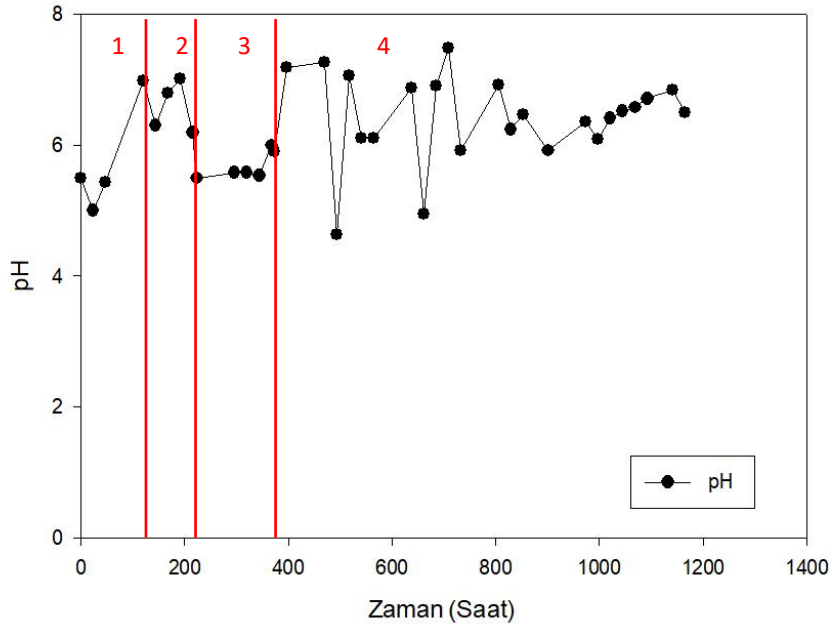
1. bölgede immobilize biyoreaktörün içerisinde inoküle edilmiş ortam doldurulmuş ve tutunmanın gerçekleşmesi için biyoreaktörde aşağıdan yukarıya olacak şekilde peristaltik pompalar yardımı ile çevrim gerçekleştirilmiştir. Tutunma sağlandıktan ve biyoreaktör içerisindeki fruktoz tükendikten sonra reaktör içerisine kütle akış kontrol cihazı yardımı ile 48 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızında saf CO gazı beslenmiştir (2. bölge). Etanol üretimi 120. saatten 216. saate kadar anlamlı artış göstermemiştir. 3. bölgede bakteri canlılığını test etmek için 216. saatten sonra biyoreaktör içerisine fruktoz ilave edilmiştir. Çalışma süresince fruktozda gözlenen azalmaya bağlı olarak etanol üretiminde artış gözlenmiştir. Biyoreaktör içerisindeki bakterilerin aktif olduğu ve kütle transferinin gerçekleşmesi için gaz besleme hızının düşürülmesi gerektiği kanısına varılmıştır. 4. bölgede biyoreaktör içerisindeki fruktoz tamamen tükendikten sonra 28.8 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızında saf CO beslemesi yapılmıştır. 2. bölge ile kıyaslandığında etanol üretim performansının daha yüksek olduğu gözlenmektedir.

Şekil 4.59 incelendiğinde etanol ile birlikte üretilen asetik asitin Wood Ljungdahl yolizine göre etanole çevrilmesi için yapılacak müdahaleler ile etanol üretim performansının artırılabilceği düşünülmektedir. Metabolik yolizine göre asetik asit üretimi ile ATP açığa çıkar. Etanol üretiminde ise ATP harcanır. ATP dengesi biyokütlenin büyümesi için çok önem

arz etmektedir. Bu nedenle asetik asit üretimi ve etanol üretimi arasında çok iyi bir denge kurularak proses verimleri artırılmalıdır.

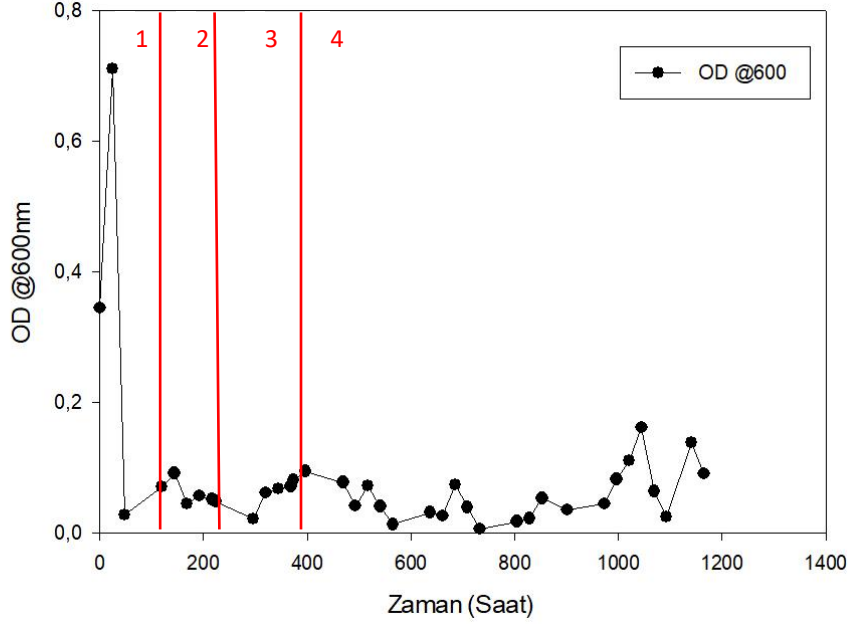
Fermantasyon pH'sının hücre büyümesini ve gaz fermantasyonundaki son metabolitlerin doğasını ve konsantrasyonunu etkileyen ana parametre olduğu bilinmektedir. pH değerinde fruktoz beslemesi sırasında optimum değer gözlenirken, CO beslemesi gerçekleştiğinde pH değerinde artış gözlenmektedir (Şekil 4.60). Etanol verilerinde karşılaşılan dalgalanma, yüksek pH değerlerinde asetik asit üretimi gerçekleşirken düşük pH değerlerinde etanol üretimi gerçekleşmesine bağlı olarak pH'ı düşürdüğümüzde etanol elde ederken pH'da meydana gelen artışla üretilen etanolün indirgeyici eşdeğeri bulma ihtiyacı nedeni ile asetik aside dönüşmesi ile açıklanmaktadır (Arslan et. al.,2019).

Bu çalışmada, başlangıçta etanol üretimi, asetik asit birikimiyle aynı anda meydana gelmiştir. Fakat 4. bölgede etanol konsantrasyonu artmaya devam ederken asetik asit konsantrasyonunda azalma gözlemlenmiştir. Bu durum bu suşta asetik asidin etanole dönüşümünü açıkça doğrulamaktadır.



Şekil 4. 60. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde pH değişimleri (1) +fruktoz, (2) 48 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz, (3) +fruktoz, (4) 28.8 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz

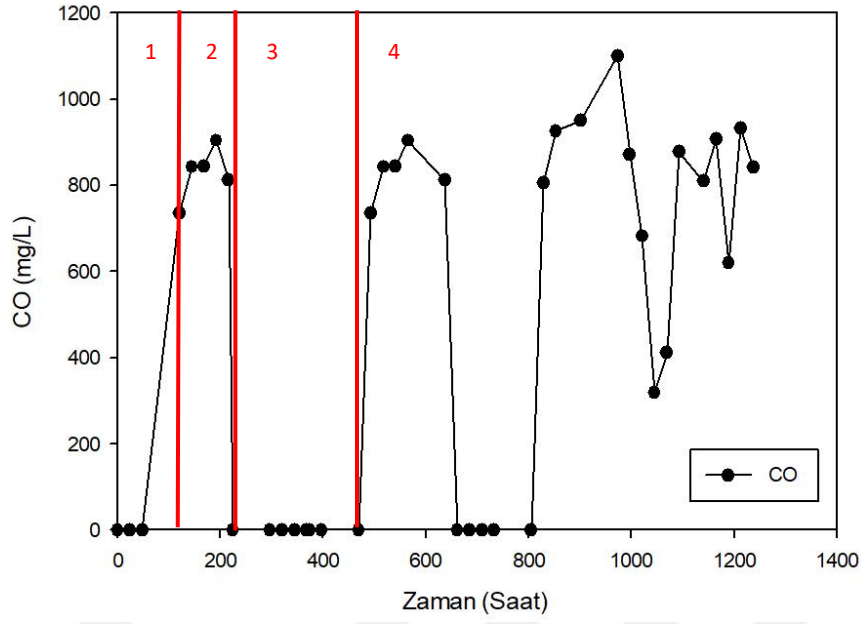
Şekil 4.61'deki OD verileri incelendiğinde immobilize materyal olarak seramik topun bulunduğu biyoreaktörlerde değerlerindeki kayıp bakterinin immobilize materyale tutunması ile değerlerde meydana gelen dalgalanma ise bakteri üretimi ve tutunma arasındaki hareketlilik ile açıklanabilmektedir.



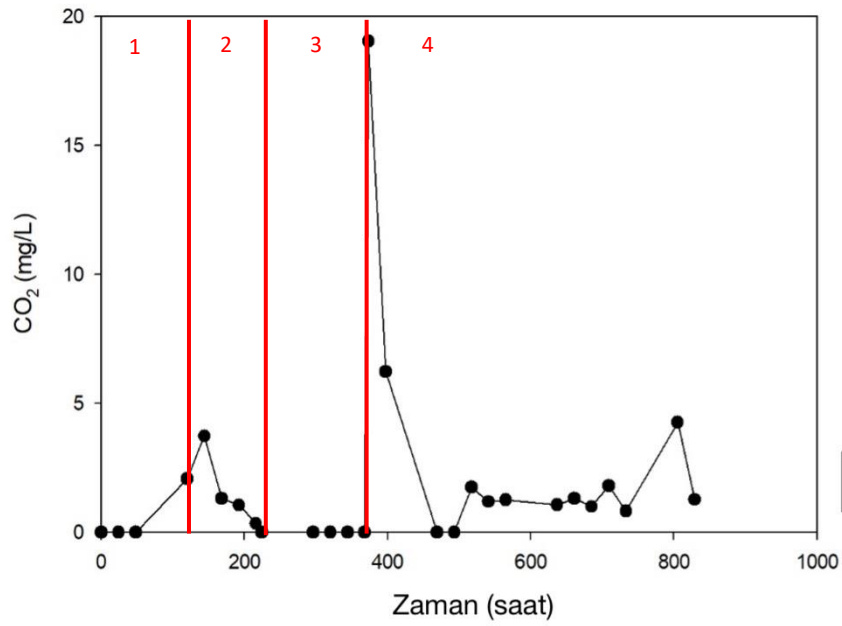
Şekil 4. 61. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktörde OD değerleri (1) +fruktoz, (2) 48 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz, (3) +fruktoz, (4) 28.8 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz

Şekil 4.62 incelendiğinde, 4. bölgede gaz beslemesinin başlandığı 144. saat itibari ile tepe gazındaki CO miktarı keskin bir şekilde azalma gösterirken Şekil 4.56 incelendiğinde gaz beslemesinin başlandığı 144. saatten itibaren benzer şekilde etanol miktarında artış gözlenmektedir.

Bölge 2 ve bölge 4'deki tepe gazı CO trendinin benzer olması, etanol üretimi için bakterinin adaptasyon süresi hakkında bize bilgi vermektedir.



Şekil 4. 62. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör tepе gazı CO içerikleri (1) +fruktoz, (2) 48 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz, (3) +fruktoz, (4) 28.8 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz



Şekil 4. 63. Sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör tepе gazı CO₂ içerikleri (1) +fruktoz, (2) 48 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz, (3) +fruktoz, (4) 28.8 m³gaz/m³V_R/gün besleme -fruktoz

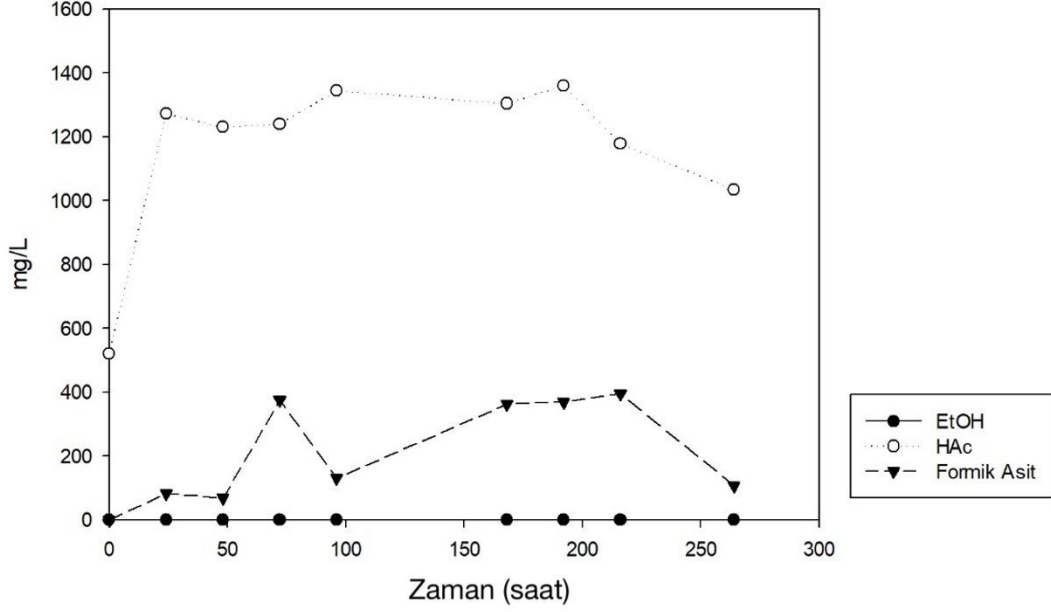
Tablo 4.14. Biyoreaktöre ait performans parametreleri

Mikroorganizma	İmmobilize Materyal	Gaz Kompozisyonu	Hacimsel Yükleme Hızı ($\text{m}^3 \text{ gaz/m}^3 V_R/\text{gün}$)	EBCT (Empty Bed Contact Time) (Saat)	GHSV (Gas Hourly Space Velocity) (Saat^{-1})	Maksimum Üretimi (mg/L)	Etkin Yüzey Alanı (m^2)
<i>Clostridium ragsdalei</i>	Seramik Top	%100 CO	48	0.5	4	450	119
<i>Clostridium ragsdalei</i>	Seramik Top	%100 CO	28.8	0.84	2.4	1376	119

4.9 *Clostridium Ragsdalei* ile İmmobilize Malzeme Olarak Biyokömür Kullanılan Sürekli Beslemeli Biyoreaktör Denemeleri

Biyoreaktör zeytin çekirdeği biyokömürü ile doldurulmuştur ve otoklavda (Raypa, Barselona-İspanya) 121°C 'de 20 dakika sterilize edilmiştir. İnokulum ilavesinden hemen önce ve hemen sonra anaerobik ortam, biyoreaktördeki oksijeni uzaklaştırmak için en az 2 saat %99 saf azot ile yıkanmıştır. İnokulum çözeltisi peristaltik bir pompa ile aşağıdan yukarıya doğru beslenmiştir, giriş ve çıkıştan örnekler alınmıştır.

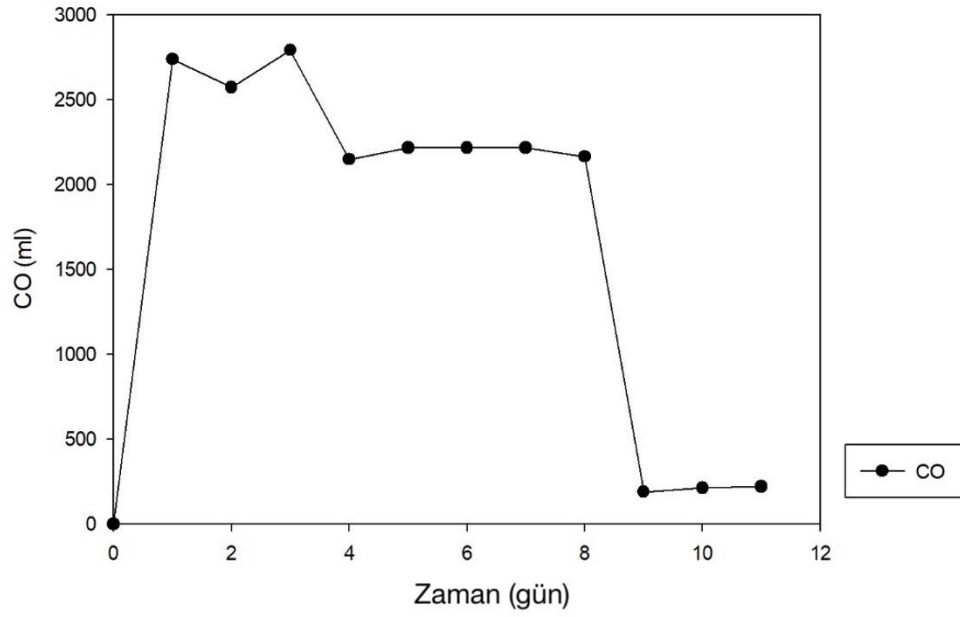
Kütle akış kontrol cihazı yardımıyla biyoreaktöre $28.8 \text{ m}^3 \text{ gaz/m}^3 V_R/\text{gün}$ saf CO gazı beslenmiştir. Şekil 4.64'de, sürekli beslenen immobilize biyoreaktörde etanol, asetik asit ve formik asit üretim performanslarını göstermektedir.



Şekil 4. 64. Sürekli beslenen immobilize biyoreaktörde etanol, asetik asit ve formik asit üretim performansları

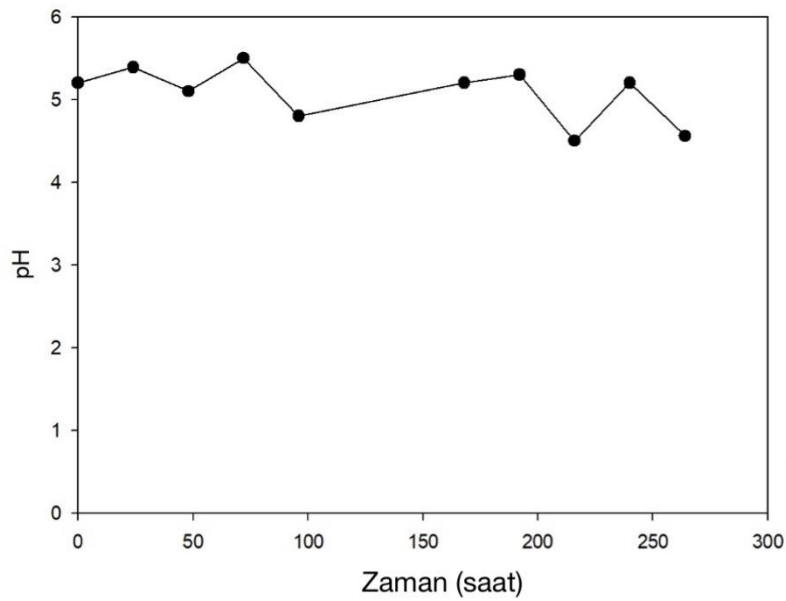
Biyoreaktörde etanol üretimi gözlenmezken, asetik asit üretiminde ani bir artış ve ardından stabil değerler gözlenmiştir (Şekil 4.64). Benzer şekilde formik asit üretimi de gözlenmiştir. Bakteriler, üretilen formik asidi kullanabilir ve etanole dönüştürebilir, böylece bu tür biyoreaktörlerde nihai etanol miktarını yükseltebilir.

Islak tip gaz akış ölçer cihazı ölçümlerine göre biyoreaktöre 8640 mL/gün CO gazı beslenir ve bu miktarın ortalama 2120 mL/gün'ü biyoreaktörde tüketilmiştir (Şekil 4.65). CO gazı kullanıldığı ve asetik asit miktarının sabit kaldığı düşünüldüğünde etanol üretiminin olmaması şüphe uyandırmaktadır.



Şekil 4. 65. Biyoreaktörde tüketilen günlük CO miktarı

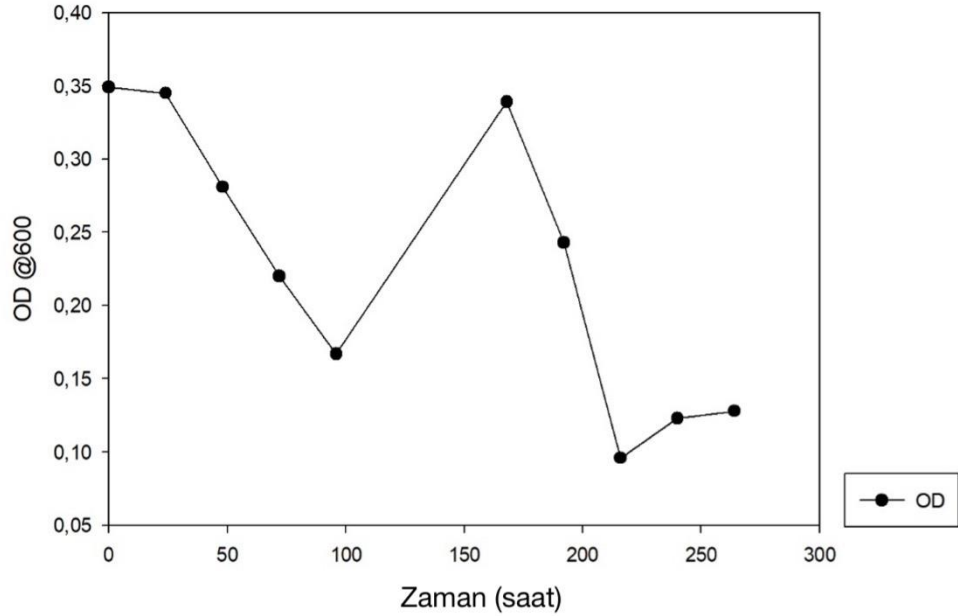
Biyokömürün immobilize materyal olarak kullanıldığı biyoreaktör sistemine bir pH kontrolörü eklenmiştir. pH 4.5-5.5 arasında sabit tutulmuştur, ancak 264 saat sonunda etanol üretimi gözlenememiştir.



Şekil 4. 66. Sürekli beslenen immobilize biyoreaktördeki pH değişiklikleri

İmmobilize biyoreaktördeki OD₆₀₀ profilleri Şekil 4.67’de gösterilmektedir. *Clostridium ragsdalei*, biyoreaktöre beslenmeden önce hacimce %10 aşılama ile büyütülmüştür ve büyüme durduktan sonra biyoreaktöre beslenmiştir.

Sıvı, biyoreaktörde 48 saat süreyle döngüye alınmıştır ve immobilize malzemeye bakteriler tutunmuştur. OD₆₀₀ değeri, sürekli gaz beslemesi 28.8 m³gaz/m³V_R/gün besleme hızıyla başlatıldığında 0.35’tir. Biyoreaktördeki hücre yoğunluğu 96 saatte 0.1670’e düşmüştür. 168. saatte OD₆₀₀ değeri 0.3390’a yükselmiştir ve ardından tekrar ani düşüşler gözlenmiştir. 216. saatte 0.0960’a düşen OD₆₀₀ değeri, 264. saate kadar tekrar yükselme eğilimi göstermiştir. Deneyler 264 saat sürmüştür. Şekil 4.67’deki OD değerlerindeki düşüşün nedeni, bakterinin malzeme üzerinde tutulması olabileceği gibi, zeytin çekirdeğinde bulunabilecek toksik maddelerden dolayı bakteri ölümleri de olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle zeytin çekirdeği biyokömürü üzerinde detaylı analizlerin yapılması gerekmektedir. Değerlerdeki dalgalanma, bakteri üretimi ve tutma/kayıp arasındaki farklılık ile de açıklanabilir.



Şekil 4. 67. Sürekli beslenen hareketsiz biyoreaktördeki OD değerleri

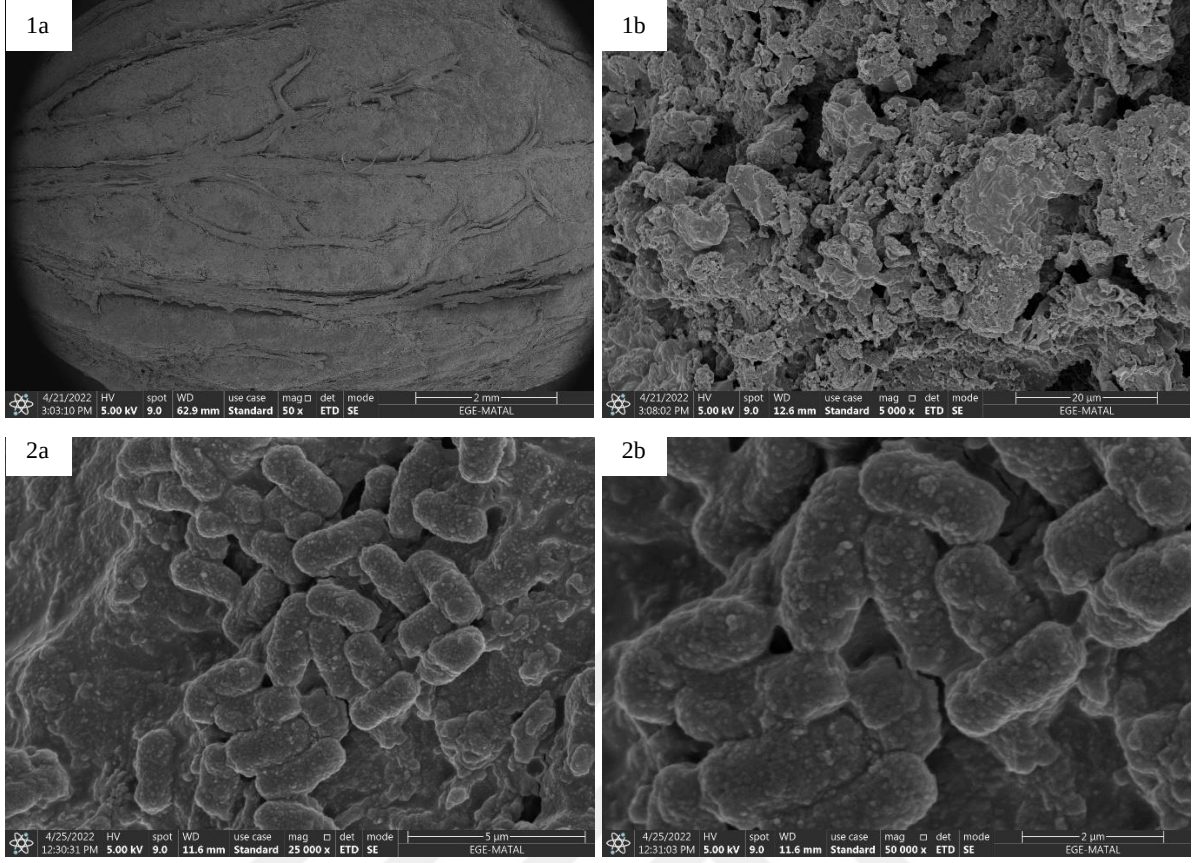
Tablo 4. 15. Biyoreaktöre ait performans parametreleri

Mikroorganizma	İmmobilize Materyal	Gaz Kompozisyonu	Hacimsel Yükleme Hızı ($\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_R/\text{gün}$)	EBCT (Empty Bed Contact Time) (Saat)	GHSV (Gas Hourly Space Velocity) (Saat^{-1})	Maksimum Etanol Üretimi (mg/L)	Etkin Yüzey Alanı (m^{-1})
<i>Clostridium ragsdalei</i>	Biyokömür	%100 CO	28.8	0.84	2.4	0	445.1

4.10 *Clostridium Ragsdalei* ile İmmobilize Malzeme Olarak Biyokömür Kullanılan Sürekli Beslemeli Biyoreaktör Örneklerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleme Sonuçları

Tez çalışmasında sentez gaz fermantasyonunu gerçekleştirmek amacı ile kullanılan *Clostridium ragsdalei* suşunun, immobilizasyon malzemesi olarak kullanılan zeytin çekirdeği biyokömürü üzerine tutunmasını gözlemlemek amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobunda görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen görseller bakteri tutunumu daha net ifade edilebilmiştir.

Şekil 4.68, çalışmada kullanılan zeytin çekirdeği biyokömürünün 50, 5000, 25000 ve 50000 kat büyütme seviyesinde SEM görüntülerini göstermektedir.



Şekil 4. 68. Zeytin çekirdeği biyokömürü SEM görüntüleri; 1) Bakteri ile temas etmemiş immobilize materyal seramik top SEM görüntüsü, a) 2mm ölçek, 50 kat büyütme, b) 20µm ölçek, 5000 kat büyütme. 2) İmmobilize materyal seramik top yüzeyi üzerine *Clostridium ragsdalei* tutunumu SEM görüntüsü, a) 5µm ölçek, 25000 kat büyütme, b) 2µm ölçek, 50000 kat büyütme

Zeytin çekirdeği biyokömürü öncelikle bakteri ile temas etmemiş hali ile Taramalı Elektron Mikroskopunda görüntülenmiştir. Biyokömürün 50 kat büyütülerek mikro yapısının gözlemi sonucu nispeten pürüzsüz bir yüzeye herhangi bir keskin açı olmaksızın zor görünen gözeneklere sahip olduğunu göstermiştir. 5000 kat büyütme görüntüde açıkça görülebilen, belirgin açık gözeneklere sahip bir yüzey gözlenmiştir. Pürüzlü yüzeyin mikroorganizmaların immobilizasyonunu kolaylaştırdığı 25000 ve 50000 kat büyütme görüntüde gözlenmiştir.

4.11 Biyokömür İçin Mineral Analiz Sonuçları

Zeytin çekirdeği biyokömürü S.S. Marmara Zeytin Tarım Satış Kooperatifleri Birliği'nden temin edilmiş ve mineral kompozisyonu X-ışını floresan spektrofotometresi (Rigaku, Nex CG, Almanya) kullanılarak Pd anot x-ray tüpü, SDD dedektör ile atmosferik

koşullarda, ikincil hedef otomatik seçilerek Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları birçok mineral varlığını göstermiştir. Zeytin çekirdeği biyokömürü, kullanılan mikroorganizmaların büyüme ortamlarında bulunan element miktarlarının çok altında değerlerle karakterize edilmiştir. Analiz sonuçları, kullanılan zeytin çekirdeği biyokömürünün mikroorganizma üzerinde toksik bir etkiye sebebiyet verecek elementel içeriğe sahip olmadığını göstermiştir. Düşük karbon içeriği biyokömürü mikroorganizmalar tarafından daha kolay biyolojik olarak bozunur hale getirir. Tez çalışmasında kullanılan zeytin çekirdeği biyokömürü içerisindeki yüksek karbon oranı biyokömürün kalitesinin yüksek olduğu hakkında bize bilgi vermektedir.

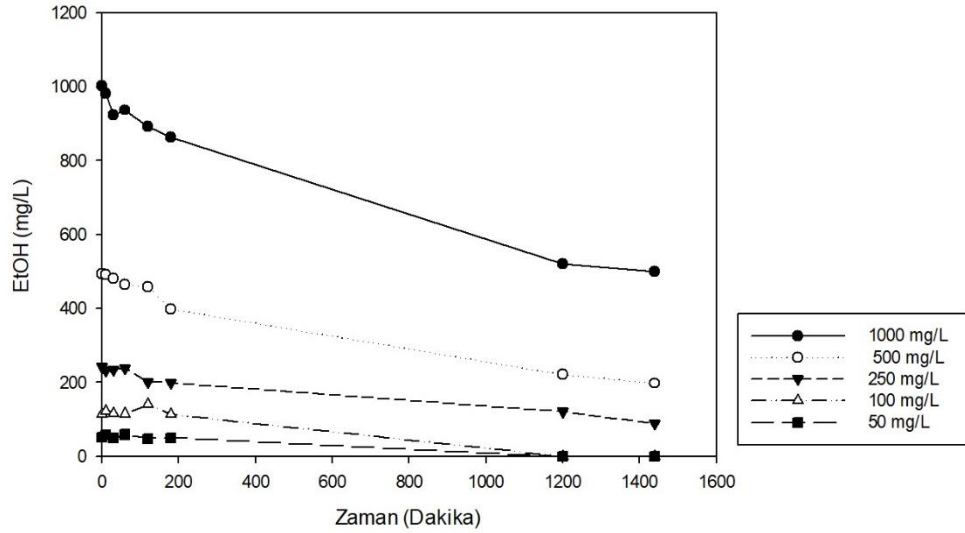
Tablo 4. 16. Biyokömür element içeriğinin DSMZ ve ATCC ortamlarının element içerikleri ile karşılaştırılması

Element	Biyokömür (wt%)	ATCC (g/L)	ATCC (wt%)	DSMZ (g/L)	DSMZ (wt%)
Mg	0.0642	0.29	0.73	0.29	1.07
Al	0.0840	0	0	0.001137	0.0042
Si	0.275	0	0	0	0
P	0.0452	0.0227	0.057	0.0227	0.08
S	0.0305	5.69	14.38	1.2506	4.6
Cl	1.51	1.894	4.79	1.937	7.12
K	0.617	8.2736	20.90	8.2736	30.42
Ca	0.261	0.005	0.013	0.027	0.1
Ti	0.0063	0	0	0	0
Cr	0.0046	0	0	0	0
Fe	0.0625	0.11	0.28	0.02	0.07
Cu	0.0017	0.007	0.018	2.54	9.33
Zn	0.0012	0.04	0.10	0.04	0.15
Na	3.12	13.69	34.6	1.238	4.55
C	93.9	-	-	-	-
W	-	1.25	3.16	0.0002	0.0007
Mo	-	7.92	20.01	3.96	14.56
Ni	-	0.005	0.013	7.41	27.24
Mn	-	0.32	0.81	0.16	0.59
Co	-	0.05	0.13	0.03	0.11
B	-	-	-	0.00174	0.0064
Se	-	0.004	0.01	-	-

Biyoreaktör içerisine 112 gr zeytin çekirdeği doldurulmuş ve 125 mL sıvı çalışma hacmi ile çalışılmıştır.

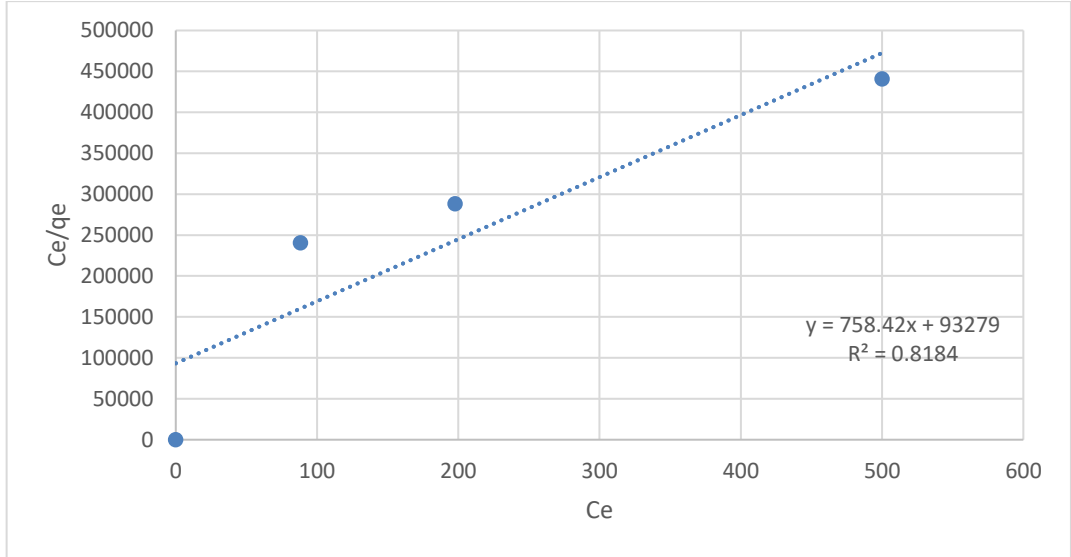
4.12 Biyokömürün Etanol Adsorpsiyon İzoterm Modeli

Biyokömürün immobilize materyal olarak kullanıldığı biyoreaktör çalışmasında etanol üretimi gözlemlenmediğinden, biyokömürün etanol adsorpsiyon potansiyelini belirlemek için bir dizi serum şişesinde adsorpsiyon izoterm çalışması yapılmıştır. Bilinen konsantrasyonlarda (1000 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L, 100 mg/L, 50 mg/L) etanol solüsyonları hazırlanmış ve biyokömür miktarı ile orantılı olarak 100 mL’lik serum şişelerinde çalışma yapılmıştır. Deney 1440 dakika sonra sonlandırılmıştır. Biyokömürün etanolü adsorbe ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.69).

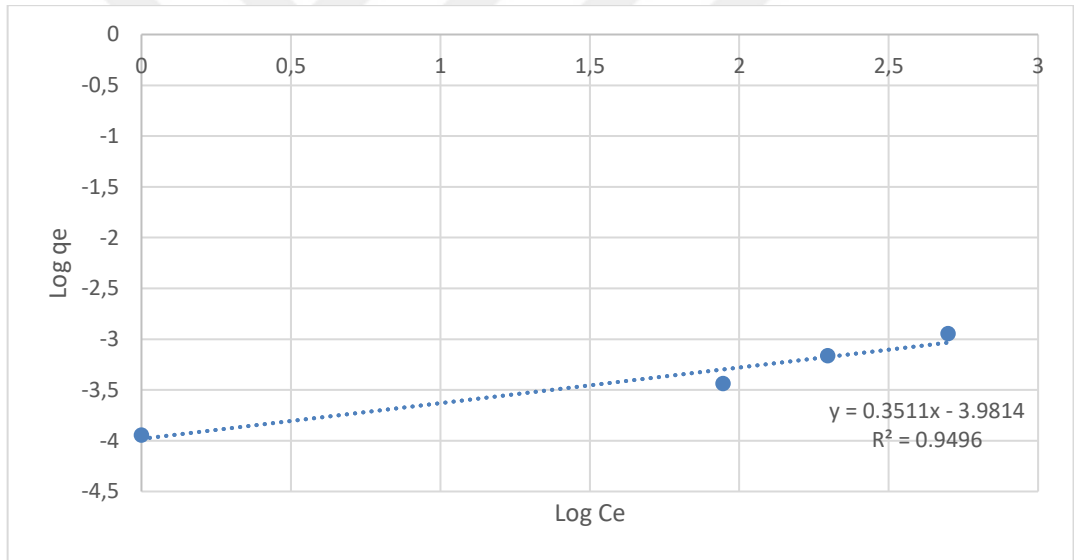


Şekil 4. 69. Biyokömür eklenmiş serum şişesindeki etanol konsantrasyonu

Çalışma sonunda R^2 değerleri Langmuir izotermi için 0.8181 ve Freundlich izotermi için 0.9496 olduğu görülmüştür (Şekil 4.70-4.71). Bu nedenle korelasyon kat sayısı değeri 1’e en yakın olan izoterm (Freundlich izotermi) tercih edilmiştir.



Şekil 4. 70. Langmuir izoterm grafiği



Şekil 4. 71. Freundlich izoterm grafiği

İzoterm denklemlerinden elde edilen korelasyon katsayıları (R^2 değerleri) kullanılarak uygulanabilirlikleri değerlendirilmiş ve her bir izoterm için elde edilen R^2 değerleri ve her bir izotermin sabitleri belirlenmiş ve bu değerler Tablo 4.17’de verilmiştir.

Tablo 4. 17. Biyokömürün etanole adsorpsiyonu için izoterm parametreleri (Koşullar; temas süresi: 720 dakika, biyokömürün ön kurutma süresi: 24 saat, adsorban miktarı: 18.5 g, sıvı hacmi: 42 mL, sıcaklık: 30°C, karıştırma hızı: 150 rpm).

İzoterm Modeli	Parametre	Değer
Langmuir	qm (mg/g)	0.001318531
	K _L (L/mg)	0.008130662
	R _L	0.109521087 (1000 mg/L için)
		0.197420469 (500 mg/L için)
		0.329742933 (250 mg/L için)
		0.710967988 (50 mg/L için)
	R ²	0.8184
Freundlich	n (g/L)	2.848191398
	K _F (L/mg)	0.6
	R ²	0.9496

n>1 değeri adsorpsiyon işleminin elverişli olduğunu göstermektedir.

Freundlich izoterm modeli aşağıdaki denklem ile ifade edilebilmektedir ve denkleme göre qe değeri 5.32 olarak hesaplanmıştır.

$$q_e = K_f \times C_e^{1/n}$$

Literatüre bakıldığında biyokömür ile yapılan çalışmalarda etanol adsorpsiyonundan hiç bahsedilmemiştir ve kullanılan biyokömürlerin verimi arttırdığı belirtilmiştir. Literatürde bulunan çalışmalarda büyüme ortamını desteklemek için az miktarlarda biyokömür kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında biyokömürün immobilize materyal olarak kullanılması amaçlanmıştır ancak biyoreaktördeki biyokömür miktarı literatürde belirtilen miktarlardan litrede yaklaşık 45-90 kat daha fazladır. Buradan yola çıkarak mikroorganizma tarafından üretilen etanolün biyokömür tutunma materyali tarafından adsorbe edildiği düşünülmektedir.

5. TARTIŞMA

İklim değışikliğı ve akabinde iklim krizi, nüfus üzerindeki sosyal, ekonomik ve sağık etkileri nedeniyle insanlığın temel endişelerinden biridir. Son yıllarda birçok bölgede hava kalitesi iyileşmiş olsa da bazı hava kirleticilerinin seviyeleri hala çoğı ülkede Dünya Sağık Örgütü (WHO) tarafından belirlenen seviyeleri aşmakta ve Dünya'daki insanların %90'ı kirlili hava solumaktadır.

Fosil yakıtların yakılması hava kirliliğine en büyük katkıyı yapmaktadır. İnsan faaliyetleri ve fosil yakıtlara bağımlılık, doğal ve antropojenik sera gazı emisyonlarının konsantrasyonlarının artmasına yol açmıştır. İklim değışikliğı, orman yangınlarını kolaylaştıran, fırtına ve sellerin yoğunluğunu artıran, mahsulleri ve gıda kalitesini etkileyen, sıcak hava dalgalarını ve kuraklığı bir araya getiriyor. Bu değışiklikler strese, zihinsel sorunlara, gıda kaynaklı, su kaynaklı hastalıklara, solunum hastalıklarına, yetersiz beslenmeye neden olmaktadır.

Genel olarak artan nüfus ve buna bağılı olarak ihtiyaçların artması ile üretimin artması CO, CO₂, SO₂, NO_x vb. kirletici gazların atmosfere salınımı hızlandırmıştır. Hava kirliliğı oluşturan atık gazların atmosfere salınımını engelleyici sistemler bulunmaktadır fakat yeterli olmamaktadır. Buna bağılı olarak da küresel ısınma sorunu ile karşı karşıya kalmaktayız. Son yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar kirletici olan bu zararlı gazların biyoyakıtlara dönüştürülebileceğini göstermiştir. Bu kirletici gazları bünyesinde bulunduran sentez gazın fermentasyonu ile biyoteknolojik yollar kullanılarak biyoetanol üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında sentez gaz fermentasyonunda önemli iki bakteri türü olan *Clostridium ljungdahlii* ve *Clostridium ragsdalei* kullanılarak biyoetanol üretiminde maliyetlerin düşürülmesi ve immobilize biyoreaktörlerde verimin artırılması üzerine çalışmalar yapılmıştır. Yukarı akışlı immobilize biyoreaktörlerde askıda sistemlerle karşılaştırmalı olarak sentez gazın biyoetanole dönüşüm verimleri incelenmiştir. Ortam maliyetlerinin düşürülmesinde istatistiksel yöntemlerle konsantrasyon ve tarama çalışmaları yapılmıştır. Yapılan denemelerde sentez gazın biyoetanole dönüştürülmesi konusunda başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Atmosfere salınan ve kirletici bir gaz olan CO'nin katma değeri yüksek olan çevre dostu biyoetanole biyoteknolojik yöntemlerle dönüşümü gelecek vaat etmektedir. Halihazırda

atmosfere salınan kirletici gazların substrat olarak kullanılması ile küresel iklim krizine neden olan faktörlerin azalmasına katkı sağlanmış olacak aynı zamanda elde edilen enerji kaynağının kullanımı ile atmosfere tekrar bir kirletici gaz salımı gerçekleşmeyecektir. İki yönlü avantajı olan bu durum ile ekonomik yollarla nötr karbon bir gelecek sağlanabilir. Bu doktora tez çalışması ile iklim krizine karşı çevre dostu yenilenebilir bir enerji kaynağı olan biyoetanolün üretimine yeni bir yaklaşım getirilmesi hedeflenmiştir.

Saf kültür veya ko-kültür çalışmaları yüksek işletme maliyetleri, suşların dejenerasyonu ve sürekli kontaminasyon riski taşımasından dolayı sentez gaz fermantasyonunda karışık kültür kullanılması oldukça önemli ve ekonomik bir alternatif olarak literatürde yer almaktadır (Shen et. al., 2014a). Fakat karışık kültürlerin kaynaklarının farklı olması ve kullanım öncesi uygulanan ön işlemlere bağlı olarak içeriklerinde farklılıklar göstermesi nedeni ile literatürde yer alan sonuçların birbirleri ile karşılaştırılması ve ortak bir kanıya varılabilmesi güç olmaktadır. Bu sebeple prosesin saf kültür kullanılarak çalıştırılması, zorluklarına rağmen daha sağlıklı sonuçlar sunmaktadır.

Sentez gaz fermantasyonunda bakteriler tarafından kullanılan Wood-Ljungdahl yol izinin en önemli son ürünleri etanol ve asetik asittir. Prosesin etanol veya asetik asite yönlendirilmesinde görev alan enzimler, bu enzimlerin aktif bölgesinde bulunan enzim ko-faktörlerinin içeriğindeki iz elementler proses verimlerini etkileyen parametrelerdir (Fernández-Naveira et. al., 2016). Büyüme ve ürün üretimi açısından enerji spesifik nütrientlere ihtiyaç duyulmaktadır. Se, Fe, Ni, Zn, Cu, W, Mo ve Mn CO fiksasyonunda ve etanol/asetik asit sentezinde içerisinde metal bulunduran enzimlerin parçalarıdır. Bu elementlerin konsantrasyonları ekonomik bir şekilde yüksek üretim verimlerinin elde edilebilmesi için optimize edilmelidir (Van Groenestijn et. al., 2013). Bu tez çalışması kapsamında ele alınan iki bakteri türünden biri olan *Clostridium ljungdahlii* suşunun büyüme ortamında iz element konsantrasyonları optimize edilmiştir. *Clostridium ljungdahlii* için CO kullanılması durumunda en önemli iz elementler Co, B ve W iken, sentez gaz kullanılması durumunda W ve Cu olarak bulunmuştur. Buna karşın Cu'nun *Clostridium ljungdahlii*'nin büyümesi üzerinde önemli ölçüde olumsuz etkiye sahip olduğunu da söyleyebiliriz. *Clostridium ragsdalei* suşu için yapılmış benzer çalışmalar literatürde yer almaktadır (Gao et. al., 2013; Kundiya et. al., 2011; Maddipati et. al., 2011; Saxena and Tanner, 2011). Bu sebeple *Clostridium ragsdalei* suşunun büyüme ortamında iz element konsantrasyonları optimize edilmemiştir.

Literatürde yapılan kesikli biyoreaktör çalışmalarında *Clostridium carboxydivarans* ile 0.48 g/L (Fernández-Naveira et. al., 2016), 0.45 g/L (Ramió-Pujol et. al., 2015), *Clostridium ljungdahlii* ile 0.15 g/L (Ramió-Pujol et. al., 2015) ve 0.337 g/L, *Clostridium ragsdalei* ile ise 0.17-1.33 g/L arasında değişen etanol üretim değerleri raporlanmıştır (Acharya et. al., 2019). Tez çalışması kapsamında kesikli biyoreaktörler ile yapılan denemelerde değerler literatür ile uyum göstermektedir. Literatürde *Clostridium ragsdalei* ve *Clostridium ljungdahlii* gibi sentez gaz fermantasyonunda verim artırılmasına yönelik pek çok ortam veya iz element çalışmaları yer almaktadır (Kundiyana et. al., 2011). Genel olarak ortam kompozisyonu üzerine yapılan çalışmalarda *Clostridium ragsdalei* daha fazla kullanıldığı gözlenmiştir (Gao et. al., 2013; Kundiyana et. al., 2011; Maddipati et. al., 2011; Saxena and Tanner, 2011). Gao et. al., (2013) tarafından *Clostridium ragsdalei* kullanılarak yapılan bir çalışmada, maliyetleri düşürmek ve etanol verimini artırmak için 10 farklı ortam bileşimi karşılaştırılmıştır. Her iki bakteri türü için etanol verimleri açısından çok geniş yelpazede sonuçlar olduğu görülmektedir. Bu durum bakterilerin aynı türden dahi olsa farklı performanslara sahip olabileceğini göstermiştir.

Shen et. al., (2014b)'nin *Clostridium carboxydivarans* suşu kullanarak yapmış oldukları bir optimizasyon çalışmasında kullanılan ortamda var olan Ni, Co, Cu, Zn ve Fe konsantrasyonlarının artırılması ile etanol/CO veriminde %47'den %89'a artış gözlendiğini ifade etmişlerdir. Mezofilik koşullara gerçekleştirilen bu çalışmada etanol konsantrasyonları ortam içeriklerine bağlı olarak 1.67-4.37 g/L arasında değişiklik göstermiştir (Shen et. al., 2014b). Bu tez çalışması kapsamında yapılan iz element çalışmasında *Clostridium ljungdahlii* ile etanol üretim değerleri 0.24-0.53 g/L arasında gözlenmiştir. İz element optimizasyonun yapıldığı deneylerde optimum konsantrasyonlarda etanol üretim değerlerinin optimize edilmemiş ortamlara göre daha yüksek oldukları gözlenmiştir. Çeşitli iz element kombinasyonları etanol üretim performansını 1.2 ila 2.5 kat arttırmıştır.

Sentez gaz fermantasyonunda önemli proses parametrelerinden bir diğeri de pH kontrolüdür (Fernández-Naveira et. al., 2016). Çoğu *Clostridium* türlerinin optimum pH aralığı 5.5-7.5 arasındadır. pH 7 civarında tutulan çalışmalarda VFA oluşumu gözlenirken pH 5 ve altı değerlerde alkol üretimi görülmektedir. pH değerinin etkisi değerdeki ani değişimin hücrelerdeki proton değişim potansiyelinin zayıflatılmasıyla kendini gösterir. Oluşan bu stres ortamında bakterinin hayatta kalması zorlaşır (Abubackar et. al., 2019b). Tez çalışması kapsamında her iki bakteri türünde OD değerleri ile birlikte pH değerleri de kontrol edilmiştir ve 7.5 ile başlayan pH değerinin kesikli beslemeli proses sonunda sisteme bağlı bir pH kontrol

sistemi bulunmadan ve manuel olarak kimyasal ilavesi olmadan yaklaşık 5-5.5 ile sonlandığı görülmüştür. Uçucu yağ asidi ve alkol üretimi için büyük ölçekli sistemlerin kullanılması durumunda avantaj sağlayacak olan bu durum sürekli beslemeli sistemlerde geçerli olmamıştır. Sürekli beslemeli sistemlerde pH değerinde sürekli bir artış eğilimi görülmüştür. Bu durum literatüre göre düşük olan etanol üretim değerlerinin nedeni olarak yorumlanmıştır.

Sentez gaz fermantasyonunda biyoreaktör tipi önem taşımaktadır. Literatürde yapılan araştırmalara bakıldığında, sürekli karıştırmalı tank biyoreaktörler ve membran biyoreaktörler göze çarpmaktadır. Asimakopoulos et. al. (2018), kesikli biyoreaktörlerde yapılan çalışmalara göre etanol üretim verimlerinin artırılması sürekli modda işletilen biyoreaktörler ile mümkün olacağını ifade etmişlerdir (Asimakopoulos et. al., 2018). Fakat tez çalışması denemelerine bakıldığında, kesikli ya da sürekli besleme yöntemlerinin biyoreaktör parametrelerine bağlı olarak verim sağladığı görülmüştür. Bredwell et. al., (1999), sürekli karıştırmalı tank reaktörlerde maliyetlerin artmasına neden olan karıştırma işlemi, yüksek gaz-sıvı kütle transferi ve buna bağlı olarak artan etanol verimleri ile dengelenebileceğini ifade etmişlerdir (Bredwell et. al., 1999). Farklı *Clostridium* türleri ile yapılan çalışmalarda kesikli biyoreaktör sistemlerinde 250 saatte etanol üretiminin durduğu belirtilmiştir (Xie et. al., 2015). Bu tez çalışmasında kesikli beslemeli immobilize biyoreaktör denemelerinde benzer şekilde 250 saat sonunda etanol üretimi dururken sürekli beslemeli biyoreaktör denemelerinde 800 saate kadar uzayan fermantasyon süreleri gözlenmiştir. Serum şişeleri ile gerçekleştirilen denemelerde ise bu süre 450 saat olarak gözlenmiştir.

Literatürde *Clostridium ljungdahlii* ile sentez gazdan etanol üretiminde en çok kullanılan biyoreaktör tipi karıştırmalı tank biyoreaktörler olup kabarcık kolon biyoreaktörler ile de yapılmış çalışma bulunmaktadır. Mikroorganizmaların immobilize edildiği sistemler son yıllarda önem kazanmaya başlamış konfigürasyonlardır ve *Clostridium ljungdahlii* ile sentez gazdan etanol üretiminde kullanılmamıştır. CO transfer katsayıları dizayn ve ölçeğe çok bağımlı proses parametresi olduğundan enerji verimli bir üretim için uygun biyoreaktör konfigürasyonu ve başarılı reaksiyon parametrelerinin belirlenmesi çok önemlidir.

Acharya et. al. (2017)'nin tam karışımli biyoreaktörde *Clostridium ljungdahlii* suşunu kullanarak saf CO ve sentez gaz (%60 CO, %35 H₂, %5 CO₂) ile yapılmış oldukları çalışmalar incelendiğinde 2 L çalışma hacminde 5-15 mL/dak gaz besleme debisi ile elde edilen maksimum etanol miktarı sırası ile CO için 0.17 g/L-1.33 g/L ve sentez gaz için 0.85-3.75 g/L

olmuştur. Sentez gaz içeriğindeki CO oranı da verimi etkileyen parametrelerden biridir (Younesi et. al., 2005). Younesi et. al., (2005) yapmış oldukları çalışmada tam karışımli biyoreaktörde sentez gaz (%10 CO₂, %15 Ar, %20 H₂, %55 CO) ve saf CO beslemesi ile *Clostridium ljungdahlii* suşu kullanılarak etanol üretim performansı incelenmiştir. Saf CO'nun substrat olarak kullanıldığı çalışmada elde edilen etanol miktarı sentez gazın substrat olarak kullanıldığı biyoreaktörde elde edilen etanol miktarının yaklaşık 1.7 kat fazladır. Buna karşın Acharya et. al. (2017)'nin yapmış oldukları çalışmada da sentez gazın substrat olarak kullanıldığı çalışmada elde edilen etanol miktarı saf CO'nun substrat olarak kullanıldığı biyoreaktörde elde edilen etanol miktarının yaklaşık 2.8 kat fazladır. Tez çalışmasında biyoetanol üretiminde optimum CO miktarının belirlenmesi amacı ile bir seri çalışma gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında 50 mL sıvı çalışma hacmine sahip serum şişeleri kullanılarak yapılan çalışmada 5 mL/gün - 10 mL/gün - 20 mL/gün CO gazı beslemesi ile sırasıyla 0.22 g/L- 0.38 g/L- 0.15 g/L etanol üretimi gözlenmiştir. Benzer şekilde *Clostridium ragsdalei* kullanılarak yapılan çalışmada sırasıyla 0.31 g/L- 0.48 g/L- 0.46 g/L etanol üretimi gözlenmiştir. CO konsantrasyonunun artışı ile bakterilerin ölüm fazına geçiş hızı artmıştır. Karbonmonoksit miktarındaki artışın bakteri kültürünü strese soktuğu düşünülmektedir. Bu sebeple biyoreaktöre beslenecek gaz miktarının belirlenmesi önem arz etmektedir. Tez çalışması kapsamında en yüksek etanol üretim değeri 1.4 g/L olarak 28.8 m³gaz/m³V_R/gün saf CO besleme hızında *Clostridium ragsdalei* ile elde edilmiştir.

Kundiyana et. al., (2010), 100 L hacminde yarı sürekli bir modda çalıştırılan tam karışımli bir fermentör kullanmışlardır ve çalışmada büyük ölçekli inokulum üretiminin zorluğunun, büyük ölçekli fermentasyonlarda kritik faktörlerden biri olduğu belirtilmiştir. İmmobilize biyoreaktörlerde küçük hacimlerde yüksek biyokütle konsantrasyonlarında çalışılabilir olması ile pilot ölçekli yüksek hacimli çalışmalarda bu sorunun önemli ölçüde minimize edileceği düşünülmektedir. Devarapalli et. al., (2017), tam karışımli biyoreaktörlere kıyasla daha fazla kütle transfer kapasitesi sağladığını belirttikleri damlatma yataklı biyoreaktörde (TBR), 1 L'lik çalışma hacminde 1.5-2.8 mL/dak sentez gaz (%38 CO %28.5 CO₂ %28.5 H₂ %5 N₂) besleme hızında, *Clostridium ragsdalei* kullanılarak maksimum 0.55 g/L etanol üretimi elde etmişlerdir. Benzer şekilde Devarapalli et. al., (2016), 0.5 L hacmine sahip TBR biyoreaktörde *Clostridium ragsdalei* kullanılarak maksimum 5.7 g /L etanol üretimi elde etmişlerdir.

Sentez gaz fermantasyonu ile etanol üretiminde biyoreaktör hacmi de üretim performansını etkileyen parametrelerden biridir. Younesi et. al., (2006) ve Mohammadi et. al., (2012) sentez gaz içeriği %55 CO %20 H₂ %10 CO₂ %15 Ar olan gaz beslemesi ile yaptıkları çalışmalarda sırası ile 20 L ve 2 L hacminde tam karışımli biyoreaktör kullanmışlardır. Her iki çalışmada da 14 mL/dak gaz besleme debisi ile çalışılmıştır. 20 L hacime sahip olan biyoreaktörde 2 L hacime sahip olan biyoreaktöre göre yaklaşık 1.7 kat fazla etanol üretimi gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında 330 mL çalışma hacmine sahip seramik topun immobilize materyal olarak kullanıldığı immobilize biyoreaktör ile yapmış olduğumuz çalışmada 0.02 mL/dak sentez gaz beslemesi ile *Clostridium ljungdahlii* kullanılarak 0.6 g/L, *Clostridium ragsdalei* kullanılarak 0.76 g/L etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. Literatürde *Clostridium ragsdalei* ile sentez gazdan etanol üretiminde biyoreaktör çalışmalarının sayısı azdır. En çok kullanılan biyoreaktör tipi karıştırmalı tank biyoreaktörler olup damlatma yataklı biyoreaktörler ile de yapılmış çalışma bulunmaktadır. Mikroorganizmaların immobilize edildiği sistemler son yıllarda önem kazanmaya başlamış konfigürasyonlardır. Gaz fermantasyon biyoreaktörleri, kullanılan mikroorganizmaların kinetik gereksinimlerini karşılayan yüksek kütle aktarım kapasiteleri sağlamalıdır. Orgill et. al., (2013), yaptıkları çalışmada biyoyakıtlar ve biyo-bazlı kimyasallar üretmek için CO ve H₂ gibi az çözünür gazların fermantasyonunda damlatmalı biyoreaktör (TBR), içi boş fiber membran biyoreaktör (HFR) ve karıştırmalı tank biyoreaktörün (STR) kullanılabilirliğine değinmişlerdir. Çalışmada, üç biyoreaktör tipinin hacimsel kütle transfer katsayısı karşılaştırılmıştır. Analiz, gaz halinde kütle transfer maddesi olarak O₂ kullanılarak gerçekleştirilmiştir. En yüksek hacimsel kütle transfer katsayısını HFR (1062 h⁻¹), ardından 6 mm'lik boncukların kullanıldığı TBR (421 h⁻¹) ve ardından STR (114 h⁻¹) sağlamıştır. Her biyoreaktördeki kütle transfer özellikleri, çalkalama hızından ve gaz - sıvı akış hızlarından etkilenmiştir. Kundiya et. al., (2011), 2 L maksimum çalışma hacmine sahip 3 L CSTR biyoreaktörde iki aşamalı olmak üzere *Clostridium ragsdalei* kullanarak sentez gaz içeriği %40 CO %30 CO₂ %30 H₂ olan gaz beslemesi ile 2 g/L etanol üretimi raporlamışlardır. Sun et. al., (2019), yaptıkları çalışmada sentez gaz fermantasyonunda kullanılan mikroorganizmaların, sentez gazı (CO, H₂ ve CO₂) çeşitli ürünlere dönüştürmek için destek besin maddelerine ihtiyaç duyduklarını ve bu temel besin maddelerinin çoğunun biyokömür tarafından sağlanabileceğini ifade etmişlerdir. 1 ila 20 g /L arasındaki biyokömür ilavelerinin sentez gaz fermantasyonu üzerindeki etkileri, 250 mL'lik serum şişelerinde çalışılarak incelenmiştir. Sonuçlar, 10 ve 20 g/L biyokömürün, standart maya özütü (YE) ortamına kıyasla

etanol üretimini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. 4-morfolinetansülfonik asit (MES) içeren ve içermeyen 10 g/L biyokömür ile çalışma hacmi 2.4 L olan 3 L hacme sahip sürekli karıştırılan bir tank biyoreaktörüne, sentez gaz içeriği %40 CO %30 CO₂ %30 H₂ olan gaz 20 cm³/d gaz akış hızı ile beslenmiş, standart ortama göre sırasıyla %64 ve %36 daha fazla etanol üretimi elde edilmiştir. Fermantasyonun başlangıcında biriken asetik asit, CSTR’de tamamen etanole dönüştürülmüştür. Çalışma sonucunda 8.1 g/L etanol üretimi gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar, ticari ölçekte potansiyel kullanım için sentez gazdan etanol üretimini artırmak için CSTR’de maliyetli MES olmadan biyokömür ortamının kullanılmasının uygulanabilirliğini göstermektedir. Bu verilerden yola çıkarak *Clostridium ragsdalei* ile immobilize malzeme olarak biyokömür kullanılan sürekli beslemeli biyoreaktör denemeleri 28.8 m³gaz/m³V_R/gün saf CO gazı beslemesi ile gerçekleştirilmiştir. Zeytin çekirdeği biyokömürü üzerinde yapılan XRF analizi sonucu malzemenin bakteri için toksik etkiye sebep olacak herhangi bir elementi bünyesinde taşımadığı ve bakteri için faydalı elementleri içerdiği tespit edilmiştir. Biyoreaktörde etanol üretimi gözlenmezken, asetik asit üretiminde ani bir artış ve ardından stabil değerler gözlenmiştir. Benzer şekilde formik asit üretimi de gözlenmiştir. Bakteriler, üretilen formik asidi kullanabilir ve etanole dönüştürebilir, böylece bu tür biyoreaktörlerde nihai etanol titresini yükseltebilir fakat gerçekleştirilen adsorpsiyon çalışması neticesinde zeytin çekirdeğinin etanolü adsorpladığı tespit edilmiştir. Bu durumla ilgili literatürde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

Sentez gaz kullanımını ve biyoetanol üretim miktarını artırmak için, daha fazla hücre konsantrasyonu sağlamak ve kullanılmayan gazı atmosfere salmadan üretime tekrar dahil etme amacı ile immobilize biyoreaktörleri kullanarak iki aşamalı biyoreaktör sistemleri ile veya diğer biyoreaktörlerle kombinasyon halinde çalışacak şekilde daha fazla araştırma çalışmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasının konusu olan sentez gaz fermantasyonu Ülkemiz için yeni ve önemli bir konudur. Sentez gaz fermantasyonunda kullanılan iki mikroorganizma türünde yapılan konsantrasyon optimizasyonu işlemleri etanol üretim verimlerinde iyileşme sağlamıştır. Tez çalışmasında kullanılan immobilize biyoreaktör konfigürasyonlarında kullanılan ve ticari olarak kolayca ulaşılabilir olan bu materyallere ise literatürde bu konuda henüz rastlanmamıştır. Literatür verileri ile karşılaştırıldığında sürekli biyoreaktörlerde gözlenen etanol üretim değerleri düşük kalmasına rağmen aynı koşullarda kurduğumuz askıda sisteme göre oldukça yüksektir. Bu yönüyle özellikle seramik topun sentez gaz fermantasyonunda kullanılabilecek

önemli bir materyal olduğu, biyokütle konsantrasyonunun biyoreaktör içinde artmasını sağladığı ve etanol üretim performansında 2-3 kat iyileşme sağladığı görülmüştür. Bu olumlu sonuçlar gerçek piroliz gazı ile de benzer şekilde elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar sanayi uygulamalarında kullanılmaları açısından umut vaat etmektedir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen önemli çıktılar ile literatürde yer alarak daha büyük ölçekli ve otomatik kontrollü sistemlerde daha yüksek etanol verimleri olan sistemler ile Ülkemizde önemli hava kirletici sektörler olan kömür işletmeleri, petrokimya endüstrileri ve çelik üretim tesisleri ile temasa geçilmesi konusunda aksiyon alınabilecektir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Artan nüfus ve sanayileşme ile birlikte iklim krizi ve buna bağlı hava kirliliği ile mücadele ülkemizde ve dünyada en önemli konulardan biri haline gelmiştir. Bu bağlamda, sürdürülebilir, güvenli, alternatif yenilenebilir enerji kaynaklarının bulunması önem arz etmektedir ve bu konuda literatürde yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Çeşitli temiz enerji kaynakları arasında biyoetanol gelecek vaat eden ve değerlendirilmesi gereken kaynaklardan biridir. Etanol biyolojik olarak (biyoetanol) birinci nesil kaynaklardan (şeker pancarı, mısır, glikoz) direk fermantasyonla, ikinci nesil kaynaklardan (kentsel katı atıklar, çimen, tarla atıkları gibi lignoselülozik atıklar) kimyasal ve ön işlemlerle şekerler açığa çıkarıldıktan sonra üretilmektedir. Birinci nesil kaynakların aynı zamanda gıda kaynakları olarak kullanılması ve ikinci nesil kaynaklarda ise uygulanacak ön işlemlerin dezavantajlarından dolayı atık gaz olan sentez gazın fermantasyonu ile etanol üretiminin ele alınması ve bu amaçla sentez gazın temiz bir enerji kaynağına dönüştürülmesinde biyolojik yöntemlerin kullanılacağı özgün biyoproses sisteminin kullanılması amacı ile gerçekleştirilen bu çalışma ile ülkemiz bazında çözüm önerileri getirilmeye çalışılmıştır.

Deneysel çalışmalarda elde edilen önemli sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- *Clostridium ljungdahlii*'nin büyüme eğrisinin çıkarıldığı çalışmada, 4 farklı büyüme ortamı üzerinde denemeler gerçekleştirilmiştir. Bunlar: DSMZ, ATCC, Modifiye edilmiş ATCC ve DRCM ortamlarıdır. *Clostridium ljungdahlii* için en fazla büyümenin gözlemlendiği ortam DRCM *Clostridium* Broth ortamı olmuştur. Pahalı bir kimyasal olan proteaz pepton ilave edilmemiş ATCC ortamı (Modifiye edilmiş ATCC), DSMZ ortamı ile yakın performans göstermiştir. Bakteri büyüme performansının en yüksek olduğu DRCM *Clostridium* Broth ortamı ile bakteri büyüme performansının en düşük olduğu DSMZ ortamında etanol üretim performansının karşılaştırılması gerçekleştirilmiş ve biyoreaktörden alınan sıvı numunelerdeki bakteri konsantrasyonu DRCM *Clostridium* Broth ortamında DSMZ ortamına göre daha fazla olsa da etanol üretim değerleri 144 saat boyunca birbirine yakın trendde ilerlemiştir. 144. saatten sonra DSMZ ortamındaki etanol değeri stabil kalırken Broth ortamındaki etanol değerinde kararsızlıklar gözlenmiştir. Bu sebeple, çalışmalara *Clostridium ljungdahlii*'nin temin edildiği German Collection of Microorganisms and Cell Cultures şirketinin DSMZ besin ortamı (makro-mikro besin çözeltileri ve vitamin çözeltisi) ile devam edilmiştir. Her bir

büyüme ortamı 48. saate kadar hızlı bir yükselme göstermiş ve 48. saatten sonra durgun faza geçildiği gözlenmiştir. Bu sebeple aktifleştirme işlemleri 48. saatte gerçekleştirilmiştir.

- *Clostridium ljungdahlii* ile biyoetanol üretiminde optimum CO miktarının belirlendiği çalışmada, 100 mL biyoreaktör hacmi ve 50 mL sıvı çalışma hacminde sahip 5 mL, 10 mL ve 20 mL CO gazı eklenmiş biyoreaktörlerde birbirine yakın değerler kaydedilmiştir. 20 mL CO gazı eklenmiş biyoreaktörde durağan fazı diğer şişelere göre önce bitirip ölüm fazına geçmiştir. CO miktarındaki artışın bakteri kültürünü strese soktuğu düşünülmektedir. *Clostridium ljungdahlii* ile CO optimizasyonunda en verimli değerler 10 mL CO ile sentez gaz fermentasyonu gerçekleşen biyoreaktörde 382 mg/L EtOH olarak gözlemlenmiştir. 20 mL CO ve 5 mL CO beslemesi yapılan biyoreaktörlerde sırası ile 153 mg/L ve 222 mg/L etanol üretimi gözlenmiştir. Optimum CO miktarı 10 mL CO/100 mL biyoreaktör hacmi olarak kabul edilmiştir.

- *Clostridium ljungdahlii* ile biyoetanol üretiminde sentez gaz kullanılarak iz element etkilerinin incelendiği çalışma *Clostridium ljungdahlii* için en etkili eser elementleri (Ni, Mg, Ca, Mn, Co, Cu, B, W, Zn, Fe ve Mo) ve bunların konsantrasyonlarını incelemek için yapılmıştır. Genel olarak, tasarlanan iz element konsantrasyonları ile etanol üretim performansında 1.5 ila 2.5 kat iyileşme sağlanabileceği görülmüştür. Tungsten ve bakırın etanol ve biyokütle üretimi üzerindeki etkilerinin sırasıyla en önemli olduğu belirlenmiştir. Geliştirilen model istatistiksel olarak anlamlıdır ve eser element çözeltilerinin maliyetini %18-22 oranında önemli ölçüde azaltma potansiyeline sahiptir. İz element optimizasyon çalışması sonucunda önerilen, etanol üretim performansını iyileştirebilecek istatistiksel bir yaklaşımla tanımlanan 1 numaralı reçete (0.027738 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.019619 g/L $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.79914 g/L $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.015796 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.019969 g/L $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 2.9978 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.16116 g/L $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0.001311 g/L $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.074341 g/L $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.099975 g/L $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0.00000373 g/L H_3BO_3) ile DSMZ ortamında (0.10 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.004 g/L $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.10 g/L $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 3.00 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0.18 g/L $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.18 g/L $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L H_3BO_3) ile etanol üretim performansının karşılaştırılması için kesikli beslemeli immobilize biyoreaktör çalışması gerçekleştirilmiştir ve önerilen reçetede DSMZ ortamına göre 1.5 kat etanol üretim performansı artışı gözlenmiştir.

- *Clostridium ljungdahlii* kullanılarak saf CO ile çeşitli iz element konsantrasyonlarındaki ortamların etkisinin incelendiği çalışmada sonuçlar, iz element miktarlarındaki değişiklikler ile daha az kimyasal kullanılarak ekonomik olarak etanol üretim veriminin arttırılabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, kullanılan her mikroorganizma için ortam şartlarına göre elde edilen reçete çalışmaya göre spesifikler. Sürece etki edecek ortam şartları dikkate alınarak bir kısım optimizasyon sürecinin gerçekleştirilmesi ile etanol üretim performansı arttırılabilir. Etanol üretim maliyetini azaltmaya yönelik yapılmış bu çalışma ile iz element miktarı optimizasyonunu başarılı bir şekilde geliştirmiş ve uygun oranlarda iz element kullanımı ile etanol üretim performansı yaklaşık 3.5 kat artırılmıştır. Sentez gazdan etanol üretiminde fermentasyonu iyileştirmek için ortam optimizasyonunun önemini vurgulanmıştır. Etanol üretimi için optimum iz element konsantrasyonları; 0,02 g/L $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/L $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,77 g/L $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/L $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,92 g/L $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,20 g/L $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L H_3BO_3 olarak belirlenmiştir. Doğrulama deneyleri ile elde edilen veriler ve modelin öngördüğü değerler arasındaki ilişkinin uyumlu olduğu gözlenmiştir.

- *Clostridium ljungdahlii* ile en iyi koşullarda sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretim performansının incelendiği çalışmada piroliz gazı ile hazır sentez gaz içeriklerinin birbirine çok yakın biyoetanol üretimleri ile sonuçlandığı gözlenmiştir. Bununla beraber piroliz gaz ile gerçekleştirilen denemelerde sentez gaza göre % 10 daha yüksek etanol üretim değeri elde edildiği görülmüştür.

- *Clostridium ljungdahlii* ile kesikli beslemeli immobilize biyoreaktör denemeleri sonucunda seramik top ile ponzanın bulunduğu biyoreaktör çalışmaları ile immobilizasyon materyali bulunmayan askıda sistem biyoreaktör çalışması karşılaştırıldığında 0.1 $\text{m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz beslemesi ile etanol üretimindeki performans artışı seramik top için yaklaşık 4 kat, ponza için yaklaşık 3 kat olmuştur. Etanol konsantrasyonundaki artış ile azalan asetik asit konsantrasyonu CO'nun metabolik yol izindeki davranışı konusunda bize bilgi vermektedir. Artan asetik asit konsantrasyonunda metabolik yol izinde yapılacak müdahalelerle etanol üretim kapasitesinin arttırılabileceği düşünülmektedir. Zeytin çekirdeği biyokömürünün bulunduğu biyoreaktör çalışmasında asetik asit miktarındaki azalmanın metabolik yol izine bağlı olarak etanol miktarında artış ile paralel davranış göstermesi beklenirken etanol

miktarında artış gözlenmemiştir. Bu durum etanolün biyokömür tarafından adsorbsiyonu ile açıklanabilir.

- *Clostridium ljungdahlii*'nin seramik top ve ponza üzerinde taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntülemeleri incelendiğinde ponzanın daha küçük bir tutunma alanı yarattığı ve ponza yüzeyinde seramik topa oranla bakterinin daha zor tutunduğu görülmektedir. Biyoreaktör içerisinde immobilize materyal olarak kullanılan ponza ve seramik topun deformasyona uğramadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde immobilize materyaller üzerine tutunan *Clostridium ljungdahlii* bakterisinin de yapısında bir bozulma gözlemlenmemiştir. Buna göre; bir immobilize materyalin sahip olması gereken, fiziksel, kimyasal ve biyolojik kararlılığa ve düşük toksisiteye sahip olma özelliğini her iki immobilize materyal de taşımaktadır.

- *Clostridium ljungdahlii* ile immobilize malzeme olarak seramik top kullanan sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör denemeleri azalan hacimlerde $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$, $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ ve $2.4 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızında gerçekleştirilerek biyoetanol üretim performansı incelenmiştir. $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızının gerçekleştirildiği seramik topun immobilize materyal olarak kullanıldığı biyoreaktör, immobilize materyal kullanılmayan askıda sistem olarak çalıştırılan biyoreaktöre göre 2.5 kat daha fazla etanol üretim performansı sergilemiştir. $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızının gerçekleştirildiği seramik topun immobilize materyal olarak kullanıldığı biyoreaktör, immobilize materyal kullanılmayan askıda sistem olarak çalıştırılan biyoreaktör ile yaklaşık etanol üretim performansı sergilemiştir. $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızı ile $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızının gerçekleştirildiği biyoreaktörler karşılaştırıldığında $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz beslemesi ile çalıştırılan biyoreaktör $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızı ile çalıştırılan biyoreaktöre göre 2 kat daha fazla etanol üretim performansı sergilemiştir. $2.4 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızı biyoreaktör içi basınca karşı koyamamıştır. Bu sebeple $2.4 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızı bu çalışma için yeterli bulunmamıştır.

- *Clostridium ragdalei*'nin büyüme eğrisinin çıkarıldığı çalışmada ATCC tarafından tavsiye edilen ortam kullanılmıştır. Büyüme eğrisi 24. saatten 48. saate kadar hızlı bir yükselme göstermiş ve 48. saatten sonra durgun faza geçildiği gözlenmektedir. 167. saatten itibaren ölüm fazına geçiş gerçekleşmiştir. Buna göre aktiveleştirme işlemleri 48. saatte gerçekleştirilmiştir.

- *Clostridium ragsdalei* ile biyoetanol üretiminde optimum CO miktarının belirlendiği çalışmada, 100 mL biyoreaktör hacmi ve 50 mL sıvı çalışma hacminde sahip 5 mL, 10 mL ve 20 mL CO gazı eklenmiş biyoreaktörlerde üretilen etanol miktarları sırasıyla 307 mg/L, 479 mg/L ve 461 mg/L olarak gözlenmiştir. 10 mL ve 20 mL ile yakın sonuçlar elde edilmiştir. 20 mL CO gaz beslemesinin oluşturabileceği olası toksik etki nedeniyle yapılacak optimizasyon denemelerinde optimum CO miktarı 10 mL CO/100 mL biyoreaktör hacmi olarak kabul edilmiştir.

- *Clostridium ragsdalei* ile en iyi koşullarda sentez gaz ve piroliz gazından biyoetanol üretim performansının incelendiği çalışmada sentez gaz ve piroliz gazı performansları karşılaştırıldığında piroliz gazın etanol üretiminde etkili olduğu gözlenmektedir. Tez çalışması kapsamı dışında gerçekleştirilmiş olan optimum iz element çalışması ile elde edilen reçete kullanılarak yapılan çalışmada piroliz gaz performansının sentez gaza göre gözle görülür derecede daha yüksek olduğu ve iz element içeriğinin optimum değerlere göre değiştirilmesi ile elde edilen etanol üretim performansının sentez gaz için etkili olmasa da piroliz gaz için yaklaşık 3.5 kat etkili olduğu gözlenmiştir.

- *Clostridium ragsdalei* ile kesikli beslemeli immobilize biyoreaktör denemeleri sonucunda seramik top ile ponzanın bulunduğu biyoreaktör çalışmaları ile immobilizasyon materyali bulunmayan askıda sistem biyoreaktör çalışması karşılaştırıldığında $0.1 \text{ m}^3 \text{ gaz/m}^3 \text{ R/gün}$ sentez gaz beslemesi ile etanol üretimindeki performans artışı seramik top için yaklaşık 3 kat, ponza için yaklaşık 1.5 kat olmuştur. Etanol konsantrasyonundaki artış ile azalan asetik konsantrasyonu CO'nun metabolik yol izindeki davranışı konusunda bize bilgi vermektedir. Artan asetik asit konsantrasyonunda metabolik yol izinde yapılacak müdahalelerle etanol üretim kapasitesinin artırılabilceği düşünülmektedir.

- *Clostridium ragsdalei*'nin seramik top ve ponza üzerinde taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülemeleri incelendiğinde biyoreaktör içerisinde immobilize materyal olarak kullanılan ponza ve seramik topun deformasyona uğramadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde immobilize materyaller üzerine tutunan *Clostridium ragsdalei* bakterisinin de yapısında bir bozulma gözlemlenmemiştir. Buna göre; bir immobilize materyalin sahip olması gereken, fiziksel, kimyasal ve biyolojik kararlılığa ve düşük toksisiteye sahip olma özelliğini her iki

immobilize materyal de taşımaktadır. Zeytin çekirdeği biyokömürü üzerinde gerçekleştirilen taramalı elektron mikroskobu görüntülemeleri incelendiğinde elde edilen görseller bakteri tutunumu daha net ifade edilebilmiştir. Biyokömürün 50 kat büyütülerek mikro yapısının gözlemi sonucu nispeten pürüzsüz bir yüzeye herhangi bir keskin açı olmaksızın zor görünen gözeneklere sahip olduğunu göstermiştir. 5000 kat büyütme görüntüde açıkça görülebilen, belirgin açık gözeneklere sahip bir yüzey gözlenmiştir. Pürüzlü yüzeyin mikroorganizmaların immobilizasyonunu kolaylaştırdığı 25000 ve 50000 kat büyütme görüntüde gözlenmiştir.

- *Clostridium ragsdalei* ile immobilize malzeme olarak seramik top kullanan sürekli beslemeli immobilize biyoreaktör denemeleri $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ ve $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızında gerçekleştirilerek biyoetanol üretim performansı incelenmiştir. $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızının gerçekleştirildiği seramik topun immobilize materyal olarak kullanıldığı biyoreaktör, immobilize materyal kullanılmayan askıda sistem olarak çalıştırılan biyoreaktöre göre 1.8 kat daha fazla etanol üretim performansı sergilemiştir. $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızının gerçekleştirildiği seramik topun immobilize materyal olarak kullanıldığı biyoreaktör, immobilize materyal kullanılmayan askıda sistem olarak çalıştırılan biyoreaktöre göre 1.7 kat daha fazla etanol üretim performansı sergilemiştir. $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızı ile $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızının gerçekleştirildiği biyoreaktörler karşılaştırıldığında $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz beslemesi ile çalıştırılan biyoreaktör $4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ sentez gaz hacimsel yükleme hızı ile çalıştırılan biyoreaktör ile yaklaşık değerde (sırası ile 226 mg/L-203 mg/L) etanol üretim performansı sergilemiştir. Saf CO gazı ile yapılan çalışmada $48 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ ve $28.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ besleme hızında sırası ile 450 mg/L ve 1376 mg/L maksimum etanol üretim değerlerine ulaşılmıştır.

- *Clostridium ragsdalei* ile immobilize malzeme olarak biyokömür kullanılan sürekli beslemeli biyoreaktör denemeleri $28.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3\text{V}_\text{R}/\text{gün}$ saf CO gazı beslemesi ile gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktörde etanol üretimi gözlenmezken, asetik asit üretiminde ani bir artış ve ardından stabil değerler gözlenmiştir. Benzer şekilde formik asit üretimi de gözlenmiştir. Bakteriler, üretilen formik asidi kullanabilir ve etanole dönüştürebilir, böylece bu tür biyoreaktörlerde nihai etanol titresini yükseltebilir.

- Biyokömür için mineral analiz sonuçları birçok mineral varlığını göstermiştir (Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Fe, Cu, Zn, Na, C). Zeytin çekirdeği biyokömürü, kullanılan

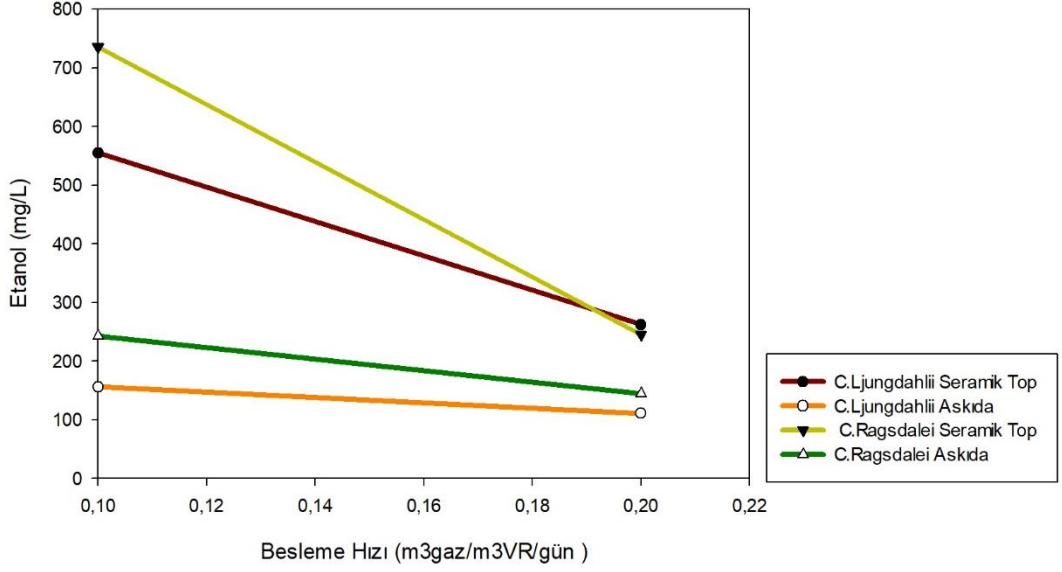
mikroorganizmaların büyüme ortamlarında bulunan element miktarlarının çok altında değerlerle karakterize edilmiştir. Analiz sonuçları, kullanılan zeytin çekirdeği biyokömürünün mikroorganizma üzerinde toksik bir etkiye sebebiyet verecek elementel içeriğe sahip olmadığını göstermiştir. Düşük karbon içeriği biyokömürü mikroorganizmalar tarafından daha kolay biyolojik olarak bozunur hale getirir. Tez çalışmasında kullanılan zeytin çekirdeği biyokömürü içerisindeki yüksek C oranı biyokömürün kalitesinin yüksek olduğu hakkında bize bilgi vermektedir.

- Biyokömürün immobilize materyal olarak kullanıldığı biyoreaktör çalışmasında etanol üretimi gözlemlenmediğinden, biyokömürün etanol adsorpsiyon potansiyelini belirlemek için bir dizi serum şişesinde adsorpsiyon izoterm çalışması yapılmıştır. Çalışma sonunda R^2 değerleri Langmuir izotermi için 0.8181 ve Freundlich izotermi için 0.9496 olduğu görülmüştür. Bu nedenle korelasyon kat sayısı değeri 1'e en yakın olan izoterm (Freundlich izotermi) tercih edilmiştir.
- Kesikli beslemeli ($0.1 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3V_R/\text{gün}$ - $0.2 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3V_R/\text{gün}$) ve sürekli beslemeli ($4.8 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3V_R/\text{gün}$ – $9.6 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3V_R/\text{gün}$) immobilize biyoreaktörler (seramik top dolgulu) ile yapılan çalışma sonuçlarını özetlersek, aşağıdaki grafikler incelendiğinde;

Kesikli beslemeli çalışmalarda *Clostridium ragsdalei* suşu *Clostridium ljungdahli* suşuna göre daha yüksek (1.3 kat) performans göstermiştir.

Besleme hızlarına baktığımızda her iki suş için $0.1 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3V_R/\text{gün}$ besleme hızı, $0.2 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3V_R/\text{gün}$ besleme hızına göre daha yüksek performans göstermiştir. Bu değer *Clostridium ljungdahli* için 2.11 kat ve *Clostridium ragsdalei* için 3 kattır.

Askıda sistem ile bakterilerin immobilize edildiği sistem karşılaştırıldığında her iki suş için immobilize sistem performansı daha yüksek olmuştur. İmmobilize biyoreaktör *Clostridium ljungdahli* için $0.1 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3V_R/\text{gün}$ besleme hızında 3.6 kat, $0.2 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3V_R/\text{gün}$ besleme hızında 2.4 kat yüksek performans sergilerken; *Clostridium ragsdalei* için $0.1 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3V_R/\text{gün}$ besleme hızında 3 kat, $0.2 \text{ m}^3\text{gaz}/\text{m}^3V_R/\text{gün}$ besleme hızında 1.7 kat yüksek performans göstermiştir.

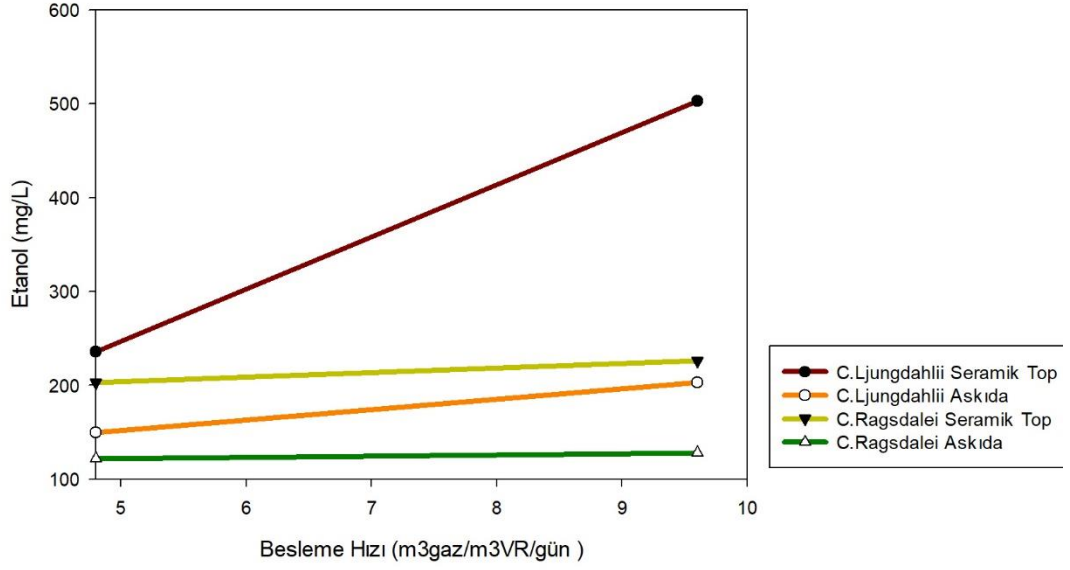


Şekil 6. 1. *Clostridium ragsdalei* ve *Clostridium ljungdahli* suşu ile seramik top kullanılarak gerçekleştirilen kesikli beslemeli çalışmaların maksimum etanol değerleri

Sürekli beslemeli çalışmalarda *Clostridium ljungdahli* suşu *Clostridium ragsdalei* suşuna göre daha yüksek (2.2 kat) performans göstermiştir.

Besleme hızlarına baktığımızda her iki suş için $9.6 \text{ m}^3\text{gaz/m}^3\text{VR/gün}$ besleme hızı, $4.8 \text{ m}^3\text{gaz/m}^3\text{VR/gün}$ besleme hızına göre daha yüksek performans göstermiştir. *Clostridium ljungdahli* için bu değer 2.1 kat ve *Clostridium ragsdalei* için 1.1 kattır.

Askıda sistem ile immobilize sistem karşılaştırıldığında her iki suş için immobilize sistem performansı daha yüksek olmuştur. Immobilize biyoreaktör *Clostridium ljungdahli* için $4.8 \text{ m}^3\text{gaz/m}^3\text{VR/gün}$ besleme hızında 1.6 kat, $9.6 \text{ m}^3\text{gaz/m}^3\text{VR/gün}$ besleme hızında 2.5 kat yüksek performans sergilemiştir. *Clostridium ragsdalei* için $4.8 \text{ m}^3\text{gaz/m}^3\text{VR/gün}$ besleme hızında 1.7 kat ve $9.6 \text{ m}^3\text{gaz/m}^3\text{VR/gün}$ besleme hızında 1.8 kat yüksek performans göstermiştir.



Şekil 6. 2. *Clostridium ragsdalei* ve *Clostridium ljungdahlii* suşu ile seramik top kullanılarak gerçekleştirilen sürekli beslemeli çalışmaların maksimum etanol değerleri

Kesikli beslemeli sistemlerde düşük besleme hızlarında daha yüksek etanol üretimi gözlenirken sürekli sistemlerde yüksek besleme hızlarında daha yüksek etanol üretimi gözlenmiştir. Kesikli beslemeli sistemlerde biyoreaktör basıncının artmasıyla CO₂'in bakteri üzerindeki toksik etkisinin arttığı düşünülmektedir. Sürekli beslemeli sistemlerde ise biyoreaktör içerisinde basınç oluşmadığı için toksik etki gözlenmemiştir. Kütle transferinin verimli gerçekleşmesi için substrat miktarının artması önemlidir fakat kullanılmadan çıkan gazın tekrar kullanılması için biyoreaktör çıkışına ilave sistemler kurulmalıdır.

Tez kapsamında yürütülen deneysel çalışmalar sonucu aydınlatılması gereken, uygulamada ihtiyaç duyulan noktalar ile ilgili öneriler aşağıda özetlenmiştir;

- Sentez gazın içeriğinde yüksek oranda bulunan CO₂'nin biyoetanol dönüşürülmesinde kullanılan biyolojik sistemlerde kütle transfer katsayılarının artırılması proses verimlerinin artışı sağlayacak olması en önemli kısım olup bu önemli konuda daha önce kullanılmamış olan seramik topların (akvaryum biyofilm malzemesi), ülkemizde oldukça fazla oranlarda çıkan ve düşük maliyetli ancak yüzey alanı geniş olan ponza taşının ve gazlaştırma prosesi sonucunda elde edilen biyokömürün, ticari ve pahalı malzemeler yerine immobilizasyon materyali olarak kullanılması bu tez çalışmasının literatüre sağladığı katkılardan olacaktır.

- Proses sonucunda elde edilecek biyoetanolün yakıt katkılarında kullanılabilecek nitelikte olması ülkemizin ve dünyanın önemli gündemlerinden olan hava kirliliği yaklaşımına yenilikçi, verimli ve endüstriyel boyutta uygulanabilir bir çözüm getirecektir.

- Biyokütle bazlı sentez gazının fermantasyonu, biyoetanol üretimi için umut verici bir teknolojidir. Biyoetanol üretimi, biyokütle ve atık organik maddeler gibi hammaddelere dayanmaktadır. Bu da ülkenin ithal fosil yakıtlara olan bağımlılığını azaltır ve böylece ekonomiye yardımcı olur. CO bakımından zengin atık gazlar (sentez gaz) da biyoetanol üretimi için kullanılabilir ve bu durum küresel ısınma problemine karşı kirletici gazların kullanılarak çevre dostu bir yakıtın üretimi için önemli bir adımdır fakat sentez gaz fermantasyon süreçleri için araştırma ve geliştirme ihtiyacı devam etmektedir.

- Sentez gaz endüstriyel faaliyetler sonucu açığa çıktığı gibi, orman kalıntıları, tarımsal atıklar, organik atıklar vb. biyokütlelerin gazlaştırma prosesine tabi tutulması ile de elde edilebilir. Hammadde özellikleri, mesela yüksek nem içeriği, gazlaştırıcıda üretilen CO fraksiyonu üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Bu gibi durumlarda, nem içeriğini %10-15 civarında tutmak için biyokütleyi kurutmak amacı ile önemli miktarda enerji gerekebilmektedir. Her biyokütle kül ve uçucu bileşikler içerir ve bu içerik bir hammaddeden diğerine değişir. Kül ve uçucu bileşikler içeren hammaddelerin gazlaştırılması sentez gazının fermantasyonunu engelleyen safsızlıkları açığa çıkarabilmektedir. Bu nedenle, biyoreaktöre beslemeden önce kapsamlı gaz temizleme adımları gerekmektedir. Ön arıtma işlemleri gerektirmeyen, etanol üretiminin daha az enerji ile gerçekleştirilebileceği ekonomik süreçlere yönelim bu açıdan önem arz etmektedir.

- Sentez gaz fermantasyonunun başarılı bir şekilde ticarileştirilmesi için, fermantasyon sıvısındaki yüksek etanol konsantrasyonunun elde edilebilmesi konusunda performans artırıcı araştırmaların yapılması gereklidir.

- Anaerobik mikroorganizmaların oksijensiz koşullar altında faaliyetlerini sürdürebilmesi için özel teknikler gerekmektedir. Bu konuda hassasiyetle çalışılması sistemin sağlıklı ilerleyişi açısından fazlası ile önemlidir.

- Sentez gazı fermente eden mikroorganizmalar üzerinde yapılacak metabolik değişiklikler ile etanol üretimini arttırması amacı ile konusunda uzman kişiler ile ortak çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Antisens-RNA, Clostron ve CRISPR-Cas gibi moleküler teknikler ve kriptik gen aktivasyonu ve alel-çift değişimi gibi yöntemler *Clostridium* türlerinde suş gelişimi ile ilgili olarak literatürde bulunmaktadır. Bu konuda yapılmış bazı çalışmalar olsa da üzerinde durulması ve çalışmaların daha ileri seviyeye taşınması için farklı yolların denenmesi çalışma ufkunu genişletecektir. Gerçekleştirilecek çalışmalarla Wood-Ijungdahl yol izinde etanol üretim yollarına müdahale edilerek asetik asit üretimine giden yol izinin baskılanması ile etanol üretim performansları arttırılabilir.

- Sentez gazı fermantasyonu sırasında karşılaşılan ana zorluklardan biri gaz-sıvı kütle transferidir. Bu konuda ticari ölçekli biyoreaktörler için daha verimli ve ekonomik kütle transfer sistemleri üzerinde çalışılmalıdır. Bu tez çalışması kapsamında bu soruna çözüm olmaya çalışılmıştır. Saf kültür kullanılan sistemlerde, ölçek büyütme için, hacimsel kütle aktarım katsayısının (KLa) net bir şekilde anlaşılması ve tahmini gereklidir. Olabilecek en az güç tüketimi ve nispeten düşük kesme oranları ile yüksek sentez gazı kütle aktarım hızının elde edilmesi, aynı zamanda anaerobik ortamın korunması ve bu esnada kontaminasyon sorununu da göz önüne alınması gerekliliği ile sentez gaz fermantasyonunun büyük ölçekli sistemlerde gerçekleştirilmesi konusunda hala daha fazla araştırma gerekmektedir.

- Fermantasyonun gerçekleştiği sıvı ortam mikrobiyal hücre, fermente edilmemiş çözünür bileşikler ve bazı safsızlıkları içerir. Bu durum etanol geri kazanımı sırasında problem yaratmaktadır. Bu nedenlerle, ekonomik ve verimli ayırma-saflaştırma yöntemlerinin sisteme dahil edilmesi önemlidir.

- Sentez gaz fermantasyonunun maliyetini etkileyen çeşitli parametreler vardır. Bunlardan biri olan seçilen saf mikroorganizmanın ihtiyaçlarının sağlanmasında meydana gelen maliyetlerdir. Mikroorganizmanın büyüme ortamının optimizasyonu ile üretilen ürün verimi arttırılırken maliyetlerin düşürülmesinin sağlanabileceği bu tez çalışmasında gözlenmiştir. Sentez gaz fermantasyonu kullanarak etanol üretmek, önemli ölçüde daha az enerji girişi gerektirmesine rağmen, kayda değer ölçüde yüksek proses verimleri elde etmek için proses modifikasyonu ve optimizasyon adımları hala gelişme

aşamasındadır. Özellikle kütle-enerji dengeleri, sistem modellemesi ve yaşam döngüsü değerlendirmesi ile ilgili çalışmalar yapılmalıdır.

- Etanol üretiminde immobilize sistemlerin kullanılmasının, artan üretim verimi oranları, azaltılmış kontaminasyon riski, mikroorganizma geri dönüşümü, hızlı ürün ayrımının sağlanabilmesi ile ürünün geri kazanılabilmesi kolaylığı gibi avantajları bulunmaktadır ve bu durum immobilize sistemlere olan ilginin artmasına neden olmuştur. Sürekli beslemeli biyoreaktör sistemlerinde yakıt ve kimyasalların endüstriyel üretiminde immobilize edilmiş mikroorganizmaların kullanımı için, ölçek büyütme ve sürecin uzun vadeli kararlılığı gibi konularda hala daha fazla mühendislik çalışması gerekmektedir.

- Biyokütle stoğunun sürdürülebilir şekilde elde edilebildiği, enerji verimli ve düşük emisyonlu piroliz tekniği kullanılarak elde edilen, düşük kirletici seviyesine sahip zeytin çekirdeği biyokömürünün immobilize materyal olarak kullanılması uygundur. Fakat ürün (etanol) adsorplama özelliği nedeni ile zeytin çekirdeği biyokömürünün immobilize materyal olarak kullanımı konusunda çalışmalara devam edilmelidir.

- Fermantasyon işlemi sırasında elde edilen ürünlere bağlı olarak pH'da meydana gelen değişimlerin kontrol altında tutulabilmesi mikroorganizmanın performansının yüksek olabilmesi için önemlidir. Bu sebeple biyoreaktöre ilave edilmiş bir pH kontrol sisteminin kullanılması, optimum pH aralığında çalışılabilmesine olanak sağlayacaktır.

- Metabolik yol izine göre asetik asit üretimi ile ATP açığa çıkar. Etanol üretiminde ise ATP harcanır. ATP dengesi biyokütlenin büyümesi için çok önem arz etmektedir. Bu nedenle asetik asit üretimi ve etanol üretimi arasında çok iyi bir denge kurularak proses verimleri artırılmalıdır.

- Bu tez çalışması kapsamında biyoreaktörler ortalama 250 saat çalıştırılmıştır. 250 saat sonrasında etanol üretiminde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu sebeple büyük ölçekli sistemlerde çalışılması düşünüldüğü takdirde bu durum göz önüne alınarak işletim planlarının (örneğin doldur boşalt sistemlerin planlanması) yapılması gerekmektedir.

- Çalışmalar çoğu endüstriyel baca gazını temsil etmesi amacı ile literatürde bulunan sentez gaz karışımları da göz önüne alınarak, özel olarak hazırlanmış bir sentetik sentez gaz ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu tez çalışmasında Ayçiçek parçalarının pirolizi ile elde edilen piroliz gaz kullanılarak gerçekleştirilen denemeler ile etanol üretiminde önemli sonuçlar elde edilmiştir. Bu kapsamda çelik endüstrisi, yağ rafinerileri, kömür ve doğal gaz kullanan endüstrilerde açığa çıkabilen sentez gazın, küresel ısınma ile mücadelede sentez gaz fermantasyonu ile katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi konusunda çalışmaların hız kazanmasının önemli olduğu düşünülmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abrini, J., Naveau, H., & Nyns, E. J.** (1994). *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. *Archives of microbiology*, 161(4), 345-351. <https://doi.org/10.1007/BF00303591>
- Abubackar, H. N., Veiga, M. C., & Kennes, C.** (2011). Biological conversion of carbon monoxide: rich syngas or waste gases to bioethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 5(1), 93-114.
- Abubackar, H. N., Veiga, M. C., & Kennes, C.** (2012). Biological conversion of carbon monoxide to ethanol: effect of pH, gas pressure, reducing agent and yeast extract. *Bioresource technology*, 114, 518-522. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.027>
- Abubackar, H. N., Veiga, M. C., & Kennes, C.** (2015). Carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum* in a bioreactor with no accumulation of acetic acid. *Bioresource technology*, 186, 122-127.
- Abubackar, H. N., Bengelsdorf, F. R., Dürre, P., Veiga, M. C., & Kennes, C.** (2016). Improved operating strategy for continuous fermentation of carbon monoxide to fuel-ethanol by clostridia. *Applied Energy*, 169, 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.02.021>
- Abubackar, H. N., Veiga, M. C., & Kennes, C.** (2019). Syngas fermentation for bioethanol and bioproducts. In *Sustainable Resource Recovery and Zero Waste Approaches* (pp. 207-221). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64200-4.00015-3>
- Acharya, B., Roy, P., & Dutta, A.** (2014). Review of syngas fermentation processes for bioethanol. *Biofuels*, 5(5), 551-564.
- Acharya, B., Dutta, A., & Basu, P.** (2019). Ethanol production by syngas fermentation in a continuous stirred tank bioreactor using *Clostridium ljungdahlii*. *Biofuels*, 10(2), 221-237. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1316143>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Acosta, F., Real, F., de Galarreta, C. R., Díaz, R., Padilla, D., & Ellis, A. E.** (2003). Toxicity of nitric oxide and peroxyxynitrite to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 15(3), 241-248.
- Adıgüzel, A. O.** (2013). Lignoselülozik materyallerden biyoetanol üretimi için kullanılan ön-muamele ve hidroliz yöntemleri. *Sakarya University Journal of Science*, 17(3), 381-397.
- AdvancedBiofuelsUSA.org**, (2011). Syngas Fermentation - The Third Pathway for Cellulosic Ethanol. Report 1–6.
- Aghbashlo, M., Tabatabaei, M., Hosseini, S. S., Younesi, H., & Najafpour, G.** (2016). Performance analysis of a continuous bioreactor for ethanol and acetate synthesis from syngas via *Clostridium ljungdahlii* using exergy concept. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 18(3), 853-865. <https://doi.org/10.1007/s10098-015-1061-3>
- Ahmed, A., Cateni, B. G., Huhnke, R. L., & Lewis, R. S.** (2006). Effects of biomass-generated producer gas constituents on cell growth, product distribution and hydrogenase activity of *Clostridium carboxidivorans* P7T. *Biomass and Bioenergy*, 30(7), 665-672. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.01.007>.
- Ahmed, A., & Lewis, R. S.** (2007). Fermentation of biomass-generated synthesis gas: Effects of nitric oxide. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(5), 1080-1086.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J.** (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4851-4861.
- Appel, A. M., Bercaw, J. E., Bocarsly, A. B., Dobbek, H., DuBois, D. L., Dupuis, M., ... & Waldrop, G. L.** (2013). Frontiers, opportunities, and challenges in biochemical and chemical catalysis of CO₂ fixation. *Chemical reviews*, 113(8), 6621-6658.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Arslan, K., Bayar, B., Abubackar, H. N., Veiga, M. C., & Kennes, C. (2019).** Solventogenesis in *Clostridium acetivum* producing high concentrations of ethanol from syngas. *Bioresource technology*, 292, 121941. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121941>
- Asimakopoulos, K., Gavala, H. N., & Skiadas, I. V. (2018).** Reactor systems for syngas fermentation processes: a review. *Chemical Engineering Journal*, 348, 732-744.
- Barik, S., Prieto, S., Harrison, S. B., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L. (1988).** Biological production of alcohols from coal through indirect liquefaction. *Applied biochemistry and biotechnology*, 18(1), 363-378.
- Benevenuti, C., Botelho, A., Ribeiro, R., Branco, M., Pereira, A., Vieira, A. C., ... & Amaral, P. (2020).** Experimental design to improve cell growth and ethanol production in syngas fermentation by *Clostridium carboxidivorans*. *Catalysts*, 10(1), 59. <https://doi.org/10.3390/catal10010059>.
- Bredwell, M. D., & Worden, R. M. (1998).** Mass-transfer properties of microbubbles. 1. Experimental studies. *Biotechnology progress*, 14(1), 31-38.
- Bredwell, M. D., Srivastava, P., & Worden, R. M. (1999).** Reactor design issues for synthesis-gas fermentations. *Biotechnology progress*, 15(5), 834-844. <https://doi.org/10.1021/bp990108m>
- Chakraborty, S., Rene, E. R., Lens, P. N., Veiga, M. C., & Kennes, C. (2019).** Enrichment of a solventogenic anaerobic sludge converting carbon monoxide and syngas into acids and alcohols. *Bioresource technology*, 272, 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.002>
- Chang, S. (2011).** Application of submerged hollow fiber membrane in membrane bioreactors: Filtration principles, operation, and membrane fouling. *Desalination*, 283, 31-39.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Chen, J., & Henson, M. A.** (2016). In silico metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii* for synthesis gas fermentation. *Metabolic engineering*, 38, 389-400.
- Chisti, M. Y.** (1989). *Airlift bioreactors* (Vol. 573). London: Elsevier Applied Science.
- Cotter, J. L., Chinn, M. S., & Grunden, A. M.** (2009a). Influence of process parameters on growth of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* on synthesis gas. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(5), 281-288. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.11.002>.
- Cotter, J. L., Chinn, M. S., & Grunden, A. M.** (2009b). Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32(3), 369-380. <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0256-y>.
- Coulson, J. M.** (2000). Coulson & Richardson Chemical Engineering, Volume 1. *disp*, 10, 32.
- Cox, H. H., & Deshusses, M. A.** (2001). Biotrickling filters. C. Kennes and M. C. Veiga (eds.) In *Bioreactors for waste gas treatment* (pp. 99-131). Springer, Dordrecht.
- Daniell, J., Köpke, M., & Simpson, S. D.** (2012). Commercial biomass syngas fermentation. *Energies*, 5(12), 5372-5417.
- Datar, R. P., Shenkman, R. M., Cateni, B. G., Huhnke, R. L., & Lewis, R. S.** (2004). Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. *Biotechnology and bioengineering*, 86(5), 587-594. <https://doi.org/10.1002/bit.20071>.
- Debabov, V. G.** (2013). Bioethanol from synthesis gas. *Applied biochemistry and microbiology*, 49(7), 619-628.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Devarapalli, M., & Atiyeh, H. K.** (2015). A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation. *Biofuel Research Journal*, 2(3), 268-280. <https://doi.org/10.18331/BRJ2015.2.3.5>.
- Devarapalli, M., Atiyeh, H. K., Phillips, J. R., Lewis, R. S., & Huhnke, R. L.** (2016). Ethanol production during semi-continuous syngas fermentation in a trickle bed reactor using *Clostridium ragsdalei*. *Bioresource technology*, 209, 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.086>
- Devarapalli, M., Lewis, R. S., & Atiyeh, H. K.** (2017). Continuous ethanol production from synthesis gas by *Clostridium ragsdalei* in a trickle-bed reactor. *Fermentation*, 3(2), 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation3020023>.
- Dolina, J., Dlask, O., Lederer, T., & Dvořák, L.** (2015). Mitigation of membrane biofouling through surface modification with different forms of nanosilver. *Chemical Engineering Journal*, 275, 125-133.
- Doran, P. M.** (2013). *Bioprocess engineering principles*. Chapter 14 - Reactor Engineering. Elsevier. pp 761-852. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-220851-5.00014-9>
- Duan, C., Luo, M., & Xing, X.** (2011). High-rate conversion of methane to methanol by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Bioresource technology*, 102(15), 7349-7353. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.096>.
- Dürre, P., & Eikmanns, B. J.** (2015). C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation. *Current opinion in biotechnology*, 35, 63-72.
- Dürre, P.** (2016). Butanol formation from gaseous substrates. *FEMS microbiology letters*, 363(6), fnw040.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- El-Gammal, M., Abou-Shanab, R., Angelidaki, I., Omar, B., Sveding, P. V., Karakashev, D. B., & Zhang, Y.** (2017). High efficient ethanol and VFA production from gas fermentation: Effect of acetate, gas and inoculum microbial composition. *Biomass and Bioenergy*, 105, 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.06.020>
- European Commission, A Roadmap for moving to a competitive low carbon economy in 2050,** Brussels, 2011. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:52011DC0112>. (Erişim tarihi: 07 Temmuz 2022)
- Feng, C. Y., Khulbe, K. C., Matsuura, T., & Ismail, A. F.** (2013). Recent progresses in polymeric hollow fiber membrane preparation, characterization and applications. *Separation and Purification Technology*, 111, 43-71.
- Fernández-Naveira, Á., Abubackar, H. N., Veiga, M. C., & Kennes, C.** (2016). Carbon monoxide bioconversion to butanol-ethanol by *Clostridium carboxidivorans*: kinetics and toxicity of alcohols. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(9), 4231-4240. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7389-8>.
- Fernández-Naveira, Á., Veiga, M. C., & Kennes, C.** (2017). H-B-E (hexanol-butanol-ethanol) fermentation for the production of higher alcohols from syngas/waste gas. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(4), 712-731.
- Frazão, C. J., & Walther, T.** (2020). Syngas and Methanol-Based Biorefinery Concepts. *Chemie Ingenieur Technik*, 92(11), 1680-1699. <https://doi.org/10.1002/cite.202000108>.
- Freeman, A.** (1984). Gel entrapment of whole cells and enzymes in crosslinked, prepolymerized polyacrylamide hydrazide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 434(1), 418-426.
- Friedlingstein, P., Andrew, R. M., Rogelj, J., Peters, G. P., Canadell, J. G., Knutti, R., ... & Le Quéré, C.** (2014). Persistent growth of CO₂ emissions and implications for reaching climate targets. *Nature geoscience*, 7(10), 709-715.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Gaddy, J. L.** (2000). Biological production of ethanol from waste gases with *Clostridium ljungdahlii* (No. US 6136577). Membrane Technology and Research, Inc., Menlo Park, CA (United States).
- Gao, J., Atiyeh, H. K., Phillips, J. R., Wilkins, M. R., & Huhnke, R. L.** (2013). Development of low cost medium for ethanol production from syngas by *Clostridium ragsdalei*. *Bioresource technology*, 147, 508-515. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.075>.
- Geinitz, B., Hüser, A., Mann, M., & Büchs, J.** (2020). Gas fermentation expands the scope of a process network for material conversion. *Chemie Ingenieur Technik*, 92(11), 1665-1679. <https://doi.org/10.1002/cite.202000086>.
- Gunay, B., Azbar, N., & Keskin, T.** (2020). The effect of corn syrup and whey on the conversion process of CO to ethanol using *Clostridium ljungdahlii*. *Chemosphere*, 261, 127734.
- Gungormusler, M., Azbar, N., & Keskin, T.** (2022). Bioethanol production from C1 gases using alternative media by syngas fermentation. *International Journal of Global Warming*, 28(1), 42-59.
- Grimalt-Alemany, A., Skiadas, I. V., & Gavala, H. N.** (2018). Syngas biomethanation: state-of-the-art review and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(1), 139-158.
- Grethlein, A. J., Worden, R. M., Jain, M. K., & Datta, R.** (1990). Continuous production of mixed alcohols and acids from carbon monoxide. *Applied biochemistry and biotechnology*, 24(1), 875-884.
- Han, Y. F., Xie, B. T., Wu, G. X., Guo, Y. Q., Li, D. M., & Huang, Z. Y.** (2020). Combination of trace metal to improve solventogenesis of *Clostridium carboxidivorans* P7 in syngas fermentation. *Frontiers in microbiology*, 11, 577266.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Hansen, J., Kharecha, P., & Sato, M.** (2013). Climate forcing growth rates: doubling down on our Faustian bargain. *Environmental Research Letters*, 8(1), 011006.
- Hedderich, R.** (2004). Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: ancestors of complex I. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 36(1), 65-75.
- Henstra, A. M., Sipma, J., Rinzema, A., & Stams, A. J.** (2007). Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 200-206.
- Hickey, R.F., Tsai, S.P., Yoon, S.H., Basu, R., & Tobey, R.E.** (2009). Submerged membrane supported bioreactor for conversion of syngas components to liquid products. US Patent 2009/0286296 A1.
- Hickey, R.** (2009). U.S. Patent Application No. 11/833,864.
- Huhnke, Raymond L., Lewis, Randy S., Tanner, R.S.** (2008). Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. Patent.
- Hurst, K. M., & Lewis, R. S.** (2010). Carbon monoxide partial pressure effects on the metabolic process of syngas fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 48(2), 159-165.
- Incropera, F. P., DeWitt, D. P., Bergman, T. L., & Lavine, A. S.** (1996). Fundamentals of heat and mass transfer (Vol. 6, p. 116). New York: Wiley.
- Infantes, A., Kugel, M., Raffelt, K., & Neumann, A.** (2020). Side-by-side comparison of clean and biomass-derived, impurity-containing syngas as substrate for acetogenic fermentation with *Clostridium ljungdahlii*. *Fermentation*, 6(3), 84. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030084>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ineos Bio Technology Platform.** (2016). <http://www.ineos.com/businesses/ineos-bio/technology> (Erişim tarihi: 24 Haziran 2022).
- IPCC Special Report, Global Warming of 1.5 °C.** (2018). <https://www.ipcc.ch/sr15/> (Erişim tarihi: 16 Ekim 2022).
- JUSTIA PATENTS.** (2021a). <https://patents.justia.com/assignee/coskata-inc>. (Erişim tarihi: 14 Şubat 2022)
- JUSTIA PATENTS.** (2021b). <https://patents.justia.com/assignee/lanzatech-new-zealand-limited> (Erişim tarihi: 14 Şubat 2022)
- Kapic, A., Jones, S. T., & Heindel, T. J.** (2006). Carbon monoxide mass transfer in a syngas mixture. *Industrial & engineering chemistry research*, 45(26), 9150-9155.
- Kennes, D., Abubackar, H. N., Diaz, M., Veiga, M. C., & Kennes, C.** (2016). Bioethanol production from biomass: carbohydrate vs syngas fermentation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(2), 304-317.
- Keskin Gündoğdu, T., Deniz, İ., Çalışkan, G., Şahin, E. S., & Azbar, N.** (2016). Experimental design methods for bioengineering applications. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 368-388.
- Keskin-Gundogdu, T.** (2019). Comparison of Conventional and Novel Pre-treatment Methods for Bioethanol Production from Fruit and Vegetable Wastes. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 33(4), 471-483. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2019.1738>.
- Kim, Y. K., Park, S. E., Lee, H., & Yun, J. Y.** (2014). Enhancement of bioethanol production in syngas fermentation with *Clostridium ljungdahlii* using nanoparticles. *Bioresource technology*, 159, 446-450. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.046>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Klasson, K. T., Ackerson, M. D., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L.** (1991). Bioreactors for synthesis gas fermentations. *Resources, Conservation and Recycling*, 5(2-3), 145-165.
- Korkhin, Y., Kalb, A. J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y., & Frolov, F.** (1998). NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. *Journal of molecular biology*, 278(5), 967-981.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. A.** (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food microbiology*, 21(4), 377-397. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005>
- Köpke, M., Mihalcea, C., Bromley, J. C., & Simpson, S. D.** (2011a). Fermentative production of ethanol from carbon monoxide. *Current opinion in biotechnology*, 22(3), 320-325. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.005>
- Köpke, M., Mihalcea, C., Liew, F., Tizard, J. H., Ali, M. S., Conolly, J. J., ... & Simpson, S. D.** (2011b). 2, 3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Applied and environmental microbiology*, 77(15), 5467-5475.
- Krasna, A. I., & Rittenberg, D.** (1954). The inhibition of hydrogenase by nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 40(4), 225-227.
- Kundiyana, D. K., Huhnke, R. L., & Wilkins, M. R.** (2010). Syngas fermentation in a 100-L pilot scale fermentor: Design and process considerations. *Journal of bioscience and bioengineering*, 109(5), 492-498.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kundiyana, D. K., Huhnke, R. L., & Wilkins, M. R.** (2011). Effect of nutrient limitation and two-stage continuous fermentor design on productivities during “*Clostridium ragsdalei*” syngas fermentation. *Bioresource technology*, 102(10), 6058-6064. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.020>.
- Kundiyana, D. K., Wilkins, M. R., Maddipati, P., & Huhnke, R. L.** (2011b). Effect of temperature, pH and buffer presence on ethanol production from synthesis gas by “*Clostridium ragsdalei*”. *Bioresource technology*, 102(10), 5794-5799.
- LanzaTech**, (2016). <http://www.lanzatech.com/> (Erişim tarihi; 24 Haziran 2022)
- LanzaTech, ABD**, <https://www.lanzatech.com/>, (Erişim tarihi: 02 Ocak 2021)
- Lapin, A., & Lübbert, A.** (1994). Numerical simulation of the dynamics of two-phase gas—liquid flows in bubble columns. *Chemical Engineering Science*, 49(21), 3661-3674. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(94\)E0121-6](https://doi.org/10.1016/0009-2509(94)E0121-6)
- Latif, H., Zeidan, A. A., Nielsen, A. T., & Zengler, K.** (2014). Trash to treasure: production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 79-87.
- Le Quéré, C., Jackson, R. B., Jones, M. W., Smith, A. J., Abernethy, S., Andrew, R. M., ... & Peters, G. P.** (2020). Temporary reduction in daily global CO₂ emissions during the COVID-19 forced confinement. *Nature climate change*, 10(7), 647-653.
- Lee, P. H.** (2010). Syngas fermentation to ethanol using innovative hollow fiber membrane. Graduate Theses and Dissertations, Paper 12377, Iowa State University, USA
- Lee, P. H., Ni, S. Q., Chang, S. Y., Sung, S., & Kim, S. H.** (2012). Enhancement of carbon monoxide mass transfer using an innovative external hollow fiber membrane (HFM) diffuser for syngas fermentation: Experimental studies and model development. *Chemical Engineering Journal*, 184, 268-277.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Lennartsson, P. R., Erlandsson, P., & Taherzadeh, M. J.** (2014). Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource technology*, 165, 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.127>.
- Letzter R.** (2019). Today's Climate Change is Worse than Anything Earth has Experienced in the Past 2,000 Years. <https://www.livescience.com/66027-climate-change-different.html> (Erişim tarihi: 26 Eylül 2022).
- Li, B., Gasser, T., Ciais, P., Piao, S., Tao, S., Balkanski, Y., ... & Zhou, F.** (2016). The contribution of China's emissions to global climate forcing. *Nature*, 531(7594), 357-361.
- Liew, F., Martin, M. E., Tappel, R. C., Heijstra, B. D., Mihalcea, C., & Köpke, M.** (2016). Gas fermentation-a flexible platform for commercial scale production of low-carbon-fuels and chemicals from waste and renewable feedstocks. *Frontiers in microbiology*, 7, 694.
- Liu, K., Atiyeh, H. K., Stevenson, B. S., Tanner, R. S., Wilkins, M. R., & Huhnke, R. L.** (2014). Continuous syngas fermentation for the production of ethanol, n-propanol and n-butanol. *Bioresource technology*, 151, 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.059>
- Ljungdahl, L. G.** (2009). A life with acetogens, thermophiles, and cellulolytic anaerobes. *Annual review of microbiology*, 63, 1-25.
- Luk, H. T., Mondelli, C., Ferré, D. C., Stewart, J. A., & Pérez-Ramírez, J.** (2017). Status and prospects in higher alcohols synthesis from syngas. *Chemical Society Reviews*, 46(5), 1358-1426.
- Maddipati, P., Atiyeh, H. K., Bellmer, D. D., & Huhnke, R. L.** (2011). Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. *Bioresource technology*, 102(11), 6494-6501. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.047>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Maness, P. C., & Weaver, P.** (2001). Evidence for three distinct hydrogenase activities in *Rhodospirillum rubrum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(5), 751-756.
- Martin, A. M. (Ed.).** (2012). *Bioconversion of waste materials to industrial products*. Springer Science & Business Media.
- McGlade, C., & Ekins, P.** (2015). The geographical distribution of fossil fuels unused when limiting global warming to 2°C. *Nature*, 517(7533), 187-190.
- Mohammadi, M., Najafpour, G. D., Younesi, H., Lahijani, P., Uzir, M. H., & Mohamed, A. R.** (2011). Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(9), 4255-4273.
- Mohammadi, M., Younesi, H., Najafpour, G., & Mohamed, A. R.** (2012). Sustainable ethanol fermentation from synthesis gas by *Clostridium ljungdahlii* in a continuous stirred tank bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(6), 837-843. <https://doi.org/10.1002/jctb.3712>
- Molino, A., Chianese, S., & Musmarra, D.** (2016). Biomass gasification technology: The state of the art overview. *Journal of Energy Chemistry*, 25(1), 10-25.
- Molitor, B., Richter, H., Martin, M. E., Jensen, R. O., Juminaga, A., Mihalcea, C., & Angenent, L. T.** (2016). Carbon recovery by fermentation of CO-rich off gases—turning steel mills into biorefineries. *Bioresource technology*, 215, 386-396.
- Mondal, P., Dang, G. S., & Garg, M. O.** (2011). Syngas production through gasification and cleanup for downstream applications—Recent developments. *Fuel processing technology*, 92(8), 1395-1410. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2011.03.021>.
- Munasinghe, P. C., & Khanal, S. K.** (2010). Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: opportunities and challenges. *Bioresource technology*, 101(13), 5013-5022.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Mutamim, N. S. A., Noor, Z. Z., Hassan, M. A. A., Yuniarto, A., & Olsson, G.** (2013). Membrane bioreactor: applications and limitations in treating high strength industrial wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 225, 109-119.
- Najafpour, G., & Younesi, H.** (2006). Ethanol and acetate synthesis from waste gas using batch culture of *Clostridium ljungdahlii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.008>
- Navarro, J. M., & Durand, G.** (1977). Modification of yeast metabolism by immobilization onto porous glass. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 4(4), 243-254.
- Norton, S., & D'Amore, T.** (1994). Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(5), 365-375.
- Orgill, J. J., Atiyeh, H. K., Devarapalli, M., Phillips, J. R., Lewis, R. S., & Huhnke, R. L.** (2013). A comparison of mass transfer coefficients between trickle-bed, hollow fiber membrane and stirred tank reactors. *Bioresource technology*, 133, 340-346.
- Pacheco, S. E.** (2020). Catastrophic effects of climate change on children's health start before birth. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(2), 562-564.
- Patankar, S., Dudhane, A., Paradh, A. D., & Patil, S.** (2021). Improved bioethanol production using genome-shuffled *Clostridium ragsdalei* (DSM 15248) strains through syngas fermentation. *Biofuels*, 12(1), 81-89.
- Patnaik, R., Louie, S., Gavrilovic, V., Perry, K., Stemmer, W. P., Ryan, C. M., & del Cardayré, S.** (2002). Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance. *Nature biotechnology*, 20(7), 707-712.
- Perego, C., & Bianchi, D.** (2010). Biomass upgrading through acid–base catalysis. *Chemical Engineering Journal*, 161(3), 314-322.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Phillips, J. R., Klasson, K. T., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L.** (1993). Biological production of ethanol from coal synthesis gas. *Applied biochemistry and biotechnology*, 39(1), 559-571.
- Phillips, J. R., Atiyeh, H. K., Tanner, R. S., Torres, J. R., Saxena, J., Wilkins, M. R., & Huhnke, R. L.** (2015). Butanol and hexanol production in *Clostridium carboxidivorans* syngas fermentation: medium development and culture techniques. *Bioresource Technology*, 190, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.043>.
- Phillips, J. R., Huhnke, R. L., & Atiyeh, H. K.** (2017). Syngas fermentation: a microbial conversion process of gaseous substrates to various products. *Fermentation*, 3(2), 28.
- Plackett, R. L., & Burman, J. P.** (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305-325.
- Ragsdale, S. W., Clark, J. E., Ljungdahl, L. G., Lundie, L. L., & Drake, H. L.** (1983). Properties of purified carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a nickel, iron-sulfur protein. *Journal of Biological Chemistry*, 258(4), 2364-2369.
- Ragsdale, S. W.** (1997). The eastern and western branches of the Wood/Ljungdahl pathway: how the east and west were won. *Biofactors*, 6(1), 3-11.
- Ragsdale, S. W., & Pierce, E.** (2008). Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(12), 1873-1898.
- Rajagopalan, S., Datar, R. P., & Lewis, R. S.** (2002). Formation of ethanol from carbon monoxide via a new microbial catalyst. *Biomass and bioenergy*, 23(6), 487-493.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ramió Pujol, S., Ganigué Pagès, R., Bañeras Vives, L., & Colprim Galceran, J.** (2014). Impact of formate on the growth and productivity of *Clostridium ljungdahlii* PETC and *Clostridium carboxidivorans* P7 grown on syngas. © International Microbiology, 2015, vol. 17, núm. 4, p. 195-204. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.222>
- Redl, S., Diender, M., Jensen, T., Sousa, D. Z., & Nielsen, A. T.** (2017). Exploiting the potential of gas fermentation. *Industrial Crops and Products*, 106, 21-30.
- Richter, H., Martin, M. E., & Angenent, L. T.** (2013). A two-stage continuous fermentation system for conversion of syngas into ethanol. *Energies*, 6(8), 3987-4000. <https://doi.org/10.3390/en6083987>
- Riggs, S. S., & Heindel, T. J.** (2006). Measuring carbon monoxide gas—liquid mass transfer in a stirred tank reactor for syngas fermentation. *Biotechnology progress*, 22(3), 903-906. <https://doi.org/10.1021/bp050352f>
- Roy, P., Dutta, A., & Deen, B.** (2015). Greenhouse gas emissions and production cost of ethanol produced from biosyngas fermentation process. *Bioresource technology*, 192, 185-191.
- Sathish, A., Sharma, A., Gable, P., Skiadas, I., Brown, R., & Wen, Z.** (2019). A novel bulk-gas-to-atomized-liquid reactor for enhanced mass transfer efficiency and its application to syngas fermentation. *Chemical Engineering Journal*, 370, 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.03.183>.
- Saxena, J., & Tanner, R. S.** (2011). Effect of trace metals on ethanol production from synthesis gas by the ethanogenic acetogen, *Clostridium ragsdalei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(4), 513-521.
- Schuchmann, K., & Müller, V.** (2014). Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 12(12), 809-821.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Shaftel, H. (2020).** Climate Change: How Do we Know?. <https://climate.nasa.gov/evidence/> (2020). (Etişim tarihi: 26 Eylül 2022)
- Shen, Y., Brown, R., & Wen, Z. (2014a).** Enhancing mass transfer and ethanol production in syngas fermentation of *Clostridium carboxidivorans* P7 through a monolithic biofilm reactor. *Applied Energy*, 136, 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.08.117>
- Shen, Y., Brown, R., & Wen, Z. (2014b).** Syngas fermentation of *Clostridium carboxidivorans* P7 in a hollow fiber membrane biofilm reactor: Evaluating the mass transfer coefficient and ethanol production performance. *Biochemical engineering journal*, 85, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.01.010>
- Shen, Y., Brown, R. C., & Wen, Z. (2017).** Syngas fermentation by *Clostridium carboxidivorans* P7 in a horizontal rotating packed bed biofilm reactor with enhanced ethanol production. *Applied Energy*, 187, 585-594. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.11.084>.
- Shen, N., Dai, K., Xia, X. Y., Zeng, R. J., & Zhang, F. (2018).** Conversion of syngas (CO and H₂) to biochemicals by mixed culture fermentation in mesophilic and thermophilic hollow-fiber membrane biofilm reactors. *Journal of Cleaner Production*, 202, 536-542. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.08.162>.
- Sherwood, T. K., Pigford, R. L., & Wilke, C. R. (1975).** Mass transfer.
- Silva-Teira, A., Sánchez, A., Buntner, D., Rodríguez-Hernández, L., & Garrido, J. M. (2017).** Removal of dissolved methane and nitrogen from anaerobically treated effluents at low temperature by MBR post-treatment. *Chemical Engineering Journal*, 326, 970-979.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017).** Design of a fermenter. In *Princ. Ferment. Technol.* (pp. 401-485). Elsevier.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Stocker, T. (Ed.).** (2014). Climate change 2013: the physical science basis: Working Group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge university press.
- Sun, X., Atiyeh, H. K., Zhang, H., Tanner, R. S., & Huhnke, R. L.** (2019a). Enhanced ethanol production from syngas by *Clostridium ragsdalei* in continuous stirred tank reactor using medium with poultry litter biochar. *Applied Energy*, 236, 1269-1279. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.12.010>
- Sun, X., Atiyeh, H. K., Huhnke, R. L., & Tanner, R. S.** (2019b). Syngas fermentation process development for production of biofuels and chemicals: A review. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100279. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100279>.
- Tanner, R. S., Miller, L. M., & Yang, D.** (1993). *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(2), 232-236. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-232>
- Thema, M., Weidlich, T., Hörl, M., Bellack, A., Mörs, F., Hackl, F., ... & Sterner, M.** (2019). Biological CO₂-methanation: An approach to standardization. *Energies*, 12(9), 1670.
- Thi, H. N., Park, S., Li, H., & Kim, Y. K.** (2020). Medium compositions for the improvement of productivity in syngas fermentation with *Clostridium autoethanogenum*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 25(3), 493-501. <https://doi.org/10.1007/s12257-019-0428-4>.
- Thibodeaux, L. J.** (1996). *Environmental chemodynamics: Movement of chemicals in air, water, and soil* (Vol. 110). John Wiley & Sons.
- Tibelius, K. H., & Knowles, R. O. G. E. R.** (1984). Hydrogenase activity in *Azospirillum brasilense* is inhibited by nitrite, nitric oxide, carbon monoxide, and acetylene. *Journal of bacteriology*, 160(1), 103-106.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Van Groenestijn, J. W., Abubackar, H. N., Veiga, M. C., & Kennes, C.** (2013). Bioethanol. Air pollution prevention and control: bioreactors and bioenergy, 431-463. <https://doi.org/10.1002/9781118523360.ch18>
- Vanaja, K., & Shobha Rani, R. H.** (2007). Design of experiments: concept and applications of Plackett Burman design. Clinical research and regulatory affairs, 24(1), 1-23.
- Vega, J. L., Holmberg, V. L., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L.** (1988a). Fermentation parameters of *Peptostreptococcus productus* on gaseous substrates (CO, H₂/CO₂). Archives of Microbiology, 151(1), 65-70.
- Vega, J. L., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L.** (1988b). Biofilm reactors for ethanol production. Enzyme and microbial technology, 10(7), 390-402.
- Vega, J. L., Prieto, S., Elmore, B. B., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L.** (1989a). The biological production of ethanol from synthesis gas. Applied Biochemistry and Biotechnology, 20(1), 781-797.
- Vega, J. L., Antorrena, G. M., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L.** (1989b). Study of gaseous substrate fermentations: carbon monoxide conversion to acetate. 2. Continuous culture. Biotechnology and bioengineering, 34(6), 785-793.
- Vega, J. L., Klasson, K. T., Kimmel, D. E., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L.** (1990). Sulfur gas tolerance and toxicity of CO-utilizing and methanogenic bacteria. Applied biochemistry and biotechnology, 24(1), 329-340.
- Voegelé E.** (2016). Ineos Bio to sell ethanol business, including Vero Beach plant. <http://biomassmagazine.com/articles/13662/ineos-bio-to-sell-ethanol-business-including-vero-beach-plant> (Erişim tarihi: 24 Haziran 2022).
- Virkajärvi, I.** (2001). Feasibility of continuous main fermentation of beer using immobilized yeast. Thesis, VTT Publications 430, Technical Research Institute of Finland, Espoo.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Wang, J., & Wan, W.** (2009). Experimental design methods for fermentative hydrogen production: a review. *International journal of hydrogen energy*, 34(1), 235-244.
- World Health Organization (WHO).** (2001). Air quality guidelines. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-SDE-PHE-OEH-06.02>. (Erişim tarihi: 10 Temmuz 2021).
- Wainaina, S., Horváth, I. S., & Taherzadeh, M. J.** (2018). Biochemicals from food waste and recalcitrant biomass via syngas fermentation: a review. *Bioresource technology*, 248, 113-121.
- Wei, P., Cheng, L. H., Zhang, L., Xu, X. H., Chen, H. L., & Gao, C. J.** (2014). A review of membrane technology for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 30, 388-400. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.10.017>.
- Williams, J. A.** (2002). Keys to bioreactor selections. *Chemical engineering progress*, 98(3), 34-41.
- Worden, R. M., Grethlein, A. J., Zeikus, J. G., & Datta, R.** (1989). Butyrate production from carbon monoxide by *Butyribacterium methylotrophicum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 20(1), 687-698.
- Xie, B. T., Liu, Z. Y., Tian, L., Li, F. L., & Chen, X. H.** (2015). Physiological response of *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 of ethanol production under different fermentation conditions. *Bioresource technology*, 177, 302-307. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.101>.
- Yaashikaa, P. R., Kumar, P. S., Varjani, S. J., & Saravanan, A.** (2019). A review on photochemical, biochemical and electrochemical transformation of CO₂ into value-added products. *Journal of CO₂ Utilization*, 33, 131-147. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.05.017>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Yasin, M., Jeong, Y., Park, S., Jeong, J., Lee, E. Y., Lovitt, R. W., ... & Chang, I. S.** (2015). Microbial synthesis gas utilization and ways to resolve kinetic and mass-transfer limitations. *Bioresource technology*, 177, 361-374.
- Yip, K., Tian, F., Hayashi, J. I., & Wu, H.** (2010). Effect of alkali and alkaline earth metallic species on biochar reactivity and syngas compositions during steam gasification. *Energy & Fuels*, 24(1), 173-181. <https://doi.org/10.1021/ef900534n>.
- Younesi, H., Najafpour, G., & Mohamed, A. R.** (2005). Ethanol and acetate production from synthesis gas via fermentation processes using anaerobic bacterium, *Clostridium ljungdahlii*. *Biochemical Engineering Journal*, 27(2), 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.015>.
- Younesi, H., Najafpour, G., & Rahman Mohamed, A.** (2003). Liquid fuel production from synthesis gas via fermentation process in a continuous tank bioreactor (CSTBR) using *Clostridium ljungdahlii*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 4(1), 45-53.
- Youngsukkasem, S., Chandolias, K., & Taherzadeh, M. J.** (2015). Rapid bio-methanation of syngas in a reverse membrane bioreactor: membrane encased microorganisms. *Bioresource technology*, 178, 334-340. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.071>.
- Zhang, Y. X., Perry, K., Vinci, V. A., Powell, K., Stemmer, W. P., & del Cardayré, S. B.** (2002). Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, 415(6872), 644-646.
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., & Li, Y.** (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in energy and combustion science*, 42, 35-53. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.01.001>
- Zhu, Y.** (2007). Chapter 14- Immobilized cell fermentation for production of chemicals and fuels. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources, New Technologies and Applications*, 373-396.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Zhu, H., Shanks, B. H., & Heindel, T. J. (2008). Enhancing CO₂– water mass transfer by functionalized MCM41 nanoparticles. *Industrial & engineering chemistry research*, 47(20), 7881-7887.

Zong, W., Yu, R., Zhang, P., Fan, M., & Zhou, Z. (2009). Efficient hydrogen gas production from cassava and food waste by a two-step process of dark fermentation and photo-fermentation. *Biomass and bioenergy*, 33(10), 1458-1463.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.06.008>



TEŞEKKÜR

Sabrı, anlayışı, pratik zekâsı ve engin tecrübesi ile bana yeni bakış açıları kazandıran, akademik hayatımda görüşlerinden ve deneyimlerinden faydalandığım, öğrencisi olmaktan dolayı onur duyduğum, danışmanım, saygıdeğer hocam Sn. Prof. Dr. Nuri AZBAR'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Doktora çalışmalarım süresince motivasyonumu arttıran, pozitif yaklaşımını benden esirgemeyen, engin bilgi birikimini benimle sınırsızca paylaşan, çalışmanın oluşturulmasında beni yönlendiren, örnek aldığım, birlikte çalışmaktan onur duyduğum, eş danışmanım, değerli hocam Sn. Doç. Dr. Tuğba KESKİN GÜNDOĞDU'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince engin tecrübelerini benden esirgemeyen ve çalışmanın şekillenmesinde bana destek veren değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. İlgi KARAPINAR'a ve Sn. Doç. Dr. Sait SARGIN'a teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım süresince edindiğim deneyimler gerek kişisel gelişimin ve gerekse akademik tecrübemin artmasını sağlamıştır. Daha donanımlı ve daha öz güvenli bir birey olmamda emeği geçen tüm değerli hocalarıma şükranlarımı sunuyorum.

Çalıştığım laboratuvarı huzurlu ve eğlenceli bir yer haline getiren, bilgilerinden dilediğim zaman faydalanabildiğim, sıkıntılı günlerimde yanımda olan kıymetli arkadaşlarım Alpcan ARIÇ, Sadık KARAGÖZ, Tuba Ceren ÖĞÜT, Cansu MAYAOĞLU AKIN ve Bensu GÜNAY'a teşekkür ederim. Her zaman yanımda olduğunu hissettiğim kıymetli dostum Özden DÜRÜSEL'e ve ailesine bana vermiş oldukları destekler için teşekkür ederim.

Doktora sürecimde Ege Üniversitesi'nde görev yapmış olduğum süre boyunca anlayışları, destekleri ve göstermiş oldukları sevgi ile bana güç veren Çevre Sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezi ailesine teşekkür ederim.

Yurtdışı çalışmamda bana destek olan Prof. Dr. Christian KENNES'e, La Coruña Üniversitesi Çevresel Biyomühendislik ve Kalite Güvencesi (BIOENGİN) araştırma grubuna ve La Coruna Üniversitesi Kimya Mühendisliği Laboratuvarı'ndaki arkadaşlarıma, İspanya'da geçirdiğim süre boyunca beni evimde hissettiren bilgisinden fazlası ile yararlandığım doktora

tez çalışmamı finansal olarak destekleyen TÜBİTAK ÇAYDAG 118 Y 305 numaralı projede danışman olarak görev almış olan Dr. Haris NALAKATH ABUBACKAR'a, 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında verdikleri destekten ötürü TÜBİTAK-BİDEB'e, 118Y305 numaralı proje ile tez çalışmamı maddi olarak destekleyen, bursiyeri olduğum TÜBİTAK-ÇAYDAG'a ve FDK-2020-22039 numaralı doktora tez projesi ile maddi destek veren Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecimin ilk anından son anına kadar yanımda olan ve tüm imkanları ile beni destekleyerek bana hep güç veren değerli eşim Erman KÖYBAŞI'ya ve benim de bir üyesi olduğum KÖYBAŞI ailesine teşekkür ederim.

Son olarak beni bu günlere getiren değerli ailem... Canım babam Sönmez SERTKAYA'ya ve canım annem Selmin SERTKAYA'ya verdikleri maddi manevi destek için, her zaman bana inandıkları ve güvendikleri için çok teşekkür ediyorum. Ayrıca abim Sümer SERTKAYA'ya, beni evlatları gibi seven teyzelerim Rengin BODUR ve Serpil BODUR'a gösterdikleri sınırsız teşvik ve ilgiden dolayı çok teşekkür ederim.

Bu tezi doktora sürecime şahit olamamış rahmetli babama ithaf ediyorum.

15/11/2022

Simge SERTKAYA KÖYBAŞI

ÖZ GEÇMİŞ

Simge SERTKAYA KÖYBAŞI, ilk ve orta öğrenimini Zonguldak'ta tamamlamıştır. 2005 yılında Zonguldak Mehmet Çelikel Anadolu Lisesi'nden, 2009 yılında Kocaeli Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümünden mezun olmuş ve Çift Anadal Programı kapsamında Kocaeli Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Jeofizik Mühendisliği bölümünü bitirmiştir. Araştırma Görevlisi olarak görev yaptığı Balıkesir Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nde 2015 yılında Yüksek Lisans tezini tamamlamıştır. 2018 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Bilimleri Anabilim Dalı doktora programına kabul edilmiştir. Doktora eğitimi süresince tez çalışmalarının bir kısmını TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında İspanya'da bulunan La Coruna Üniversitesi'nde gerçekleştirmiştir. 2021 yılında ikinci üniversite programı kapsamında Anadolu Üniversitesi Adalet Bölümü'nde eğitim almaya başlamıştır. Doktora çalışmaları sırasında Çevre Bilimleri Anabilim Dalı'nın bağlı olduğu Çevre Sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezinde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmıştır.

Görev Aldığı Projeler:

“Yağmur Bahçesi Uygulaması ile Yağmur Suyu Hasadı”, Ömer Levend Aşıkoğlu, Cahit Yerdelen, Dinçer Ayaz, Ebru Eriş, Harun Alp, Sıdika Tuğçe Dağlıoğlu, Simge Sertkaya, Ege Üniversitesi BAP, 2022 -2023

“Sentez Gaz Fermantasyonu ile Biyoetanol Üretiminde Biyokömür İmmobilize Biyoreaktörün Performansının İncelenmesi”, Simge Sertkaya, Nuri Azbar, Ege Üniversitesi BAP, 2020 -2022

“Sentez Gaz Fermantasyonu ile Biyoetanol Üretiminde İmmobilize Biyoreaktörlerin Etkisinin İncelenmesi”, Tuğba Keskin Gündoğdu, Nuri Azbar, Jale Yanık, Simge Sertkaya, Bensu Günay, Gözde Duman Taç, 118Y305, TÜBİTAK, 2018-2021

“Yeşil Kampüs Sürdürülebilir Üniversite”, Canan Fisun Abay, Dinçer Ayaz, Hacer Gökür Şişman Aydın, Nalan Kabay, Zekerya Dursun, Engin Nurlu, Hülya Yılmaz, Serdar

Gökhan Şenol, Emine Özlem Ataman, Simge Sertkaya, Sıdıka Tuğçe Dağlıoğlu, Tr31/18/Fzd/0014, Kalkınma Bakanlığı- İZKA, 2018-2020,

“Tekstil Sanayi Atıksularının Elektrooksidasyon Yöntemiyle Arıtılması”, Sabri Bicakcı, Simge Sertkaya, Eda Nur Kara, Burhanettin Farizoğlu, Süleyman Uzuner, Baybars Ali Fil, Balıkesir Üniversitesi BAP, 2017-2019

“Manisa İli Yonga Levha Atıksularının Mikrofiltrasyon Membran Reaktörde Arıtılarak Organik Madde Gideriminin İncelenmesi”, Simge Sertkaya, Burhanettin Farizoğlu, Süleyman Uzuner, Balıkesir Üniversitesi BAP, 2016-2017

“Sızıntı Suyu Karakterizasyonu ve Jet Loop Reaktörlerde Hava Sıyırma ile Amonyak Giderimi”, Burhanettin Farizoğlu, Simge Sertkaya, Süleyman Uzuner, 4.100.2013.0034, Balıkesir Üniversitesi BAP, 2013-2015

“Burhaniye Zeytin İhtisas Organize Sanayi Bölgesi İçin Uygun Arıtma Tesisi Alternatiflerinin Belirlenmesi”, Sabri Bicakcı, Simge Sertkaya, Burhanettin Farizoğlu, Süleyman Uzuner, Tr22/13/Dfd/0027, Kalkınma Bakanlığı- GMKA, 2013-2014

“Zeytin Karasuyunun Arıtımında Doğal Materyallerin Kullanım Potansiyelleri”, Burhanettin Farizoğlu, Simge Sertkaya, Süleyman Uzuner, BAP 2012/102, Balıkesir Üniversitesi BAP, 2012-2014

“Zeytin Karasuyunun Membran Reaktörlerde Aktifleştirilmiş Kil Kullanılarak Ön Arıtımı”, Burhanettin Farizoğlu, Simge Sertkaya, Süleyman Uzuner, Bap2012/26, Balıkesir Üniversitesi BAP, 2011-2013

“Süt Endüstrisi Atıksularının Jet Loop Membran Biyoreaktörde Arıtılabilirliğinin İncelenmesi”, Burhanettin Farizoğlu, Simge Sertkaya, Süleyman Uzuner, 107Y260, TÜBİTAK, 2009-2010

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

Daglioglu Sıdıka Tuğçe, Sertkaya Simge, Kinal Armagan, Bor Melike, Ayaz Dincer (2022). Waste Management of Ege University during the COVID-19 period, Journal of Sustainability Perspectives, 250-254, Doi: <https://doi.org/10.14710/jsp.2022.15519>

Sertkaya Simge, Azbar Nuri, Nalakath Abubackar Haris, Keskin Gündoğdu Tuğba (2021). Design of Low-Cost Ethanol Production Medium From Syngas: an Optimization of Trace Metals for *Clostridium Ljungdahlii*. Energies, 14(21), 6981-6981., SCI Expanded, Doi: <https://doi.org/10.3390/en14216981>

Sertkaya Simge, Keskin Gündoğdu Tuğba, Kennes Christian, Azbar Nuri (2021). Bioethanol Production Through Syngas Fermentation by a Novel Immobilized Bioreactor Using *Clostridium Ragsdalei*. Icontech International Journal of Surveys, Engineering, Technology, 5(3), Doi: <https://doi.org/10.46291/ICONTECHvol5iss3pp13-20>

Sertkaya Simge, Farizoğlu Burhanettin, Uzuner Süleyman (2014). Ammonium Removal from Balıkesir Providence Solid Waste Landfill Leachate Vie Jet Loop Reactor. Journal Of Selçuk University Natural And Applied Science, 188-197. Issn 2147-3781

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

Sertkaya Simge, Keskin Gündoğdu Tuğba, Kennes Christian, Azbar Nuri (2021). Bioethanol Production Through Syngas Fermentation by a Novel Immobilized Bioreactor Using *Clostridium Ragsdalei*. International Icontech Symposium-4 On Innovative Surveys in Positive Sciences. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum). ISBN: 978-1-955094-09-2

Sertkaya Simge, Duman Taç Gözde, Abubackar Haris Nalakth, Azbar Nuri, Yanık Jale, Keskin Gündoğdu Tuğba (2021). Biohydrogen and Bioethanol Production Routes from Pyrolysis Gas. 5 Th International Hydrogen Technologies Congress (Ihtec-2021). (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum. https://Hidrojenteknolojileri.Org/Ihtec2021/Ihtec_2021-Proceedings-V1.Pdf

Daglioglu Sıdıka Tuğçe, Sertkaya Simge, Kinal Armagan, Bor Melike, Ayaz Dincer (2021). Waste Management of Ege University during the COVID-19 period. 7th International (Virtual) Workshop on UI GreenMetric World University Rankings (IWGM 2021), (Tam metin Bildiri/Sözlü sunum)

Sertkaya Simge, Azbar Nuri, Keskin Gündoğdu Tuğba (2020). Trace Element Optimization in Synthesis Gas Fermentation. 2nd International Eurasian Conference On Science, Engineering And Technology (Eurasiansciencetech 2020). 360-366. ISBN: 978-605-69426-2-4. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)

Dağlıoğlu Sıdıka Tuğçe, Sertkaya Simge, Kinal Armağan, Bor Melike, Ayaz Dinçer (2019). The Evoluation of Green University Ranking- A Case Study Ege University, Greenmetric 2018. 1st Congress On Agricultural and Environmental Science. ss.1-421. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)

Sertkaya Simge, Farizoğlu Burhanettin, Uzuner Süleyman (2014). Ammonium Removal From Balıkesir Providence Solid Waste Landfill Leachate Via Jet Loop Reactor. 2. International Conference On Environmental Science And Technology. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).

Uzuner Süleyman, Sertkaya Simge, Yıldız Ergün, Nuhoğlu Alper, Farizoğlu Burhanettin (2013). Performance of JLMBR System at Olive Mill Wastewater. Doğunun Batısı Batının Doğusu Uluslararası Balkanlar Konferansı. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

Uzuner Süleyman, Köybaşı Erman, Sertkaya Simge (2013). Control of Laboratory Scale Jet Loop Biological Reactor Set Up. Doğunun Batısı Batının Doğusu Uluslararası Balkanlar Konferansı. (Poster Sunum)

Sertkaya Simge, Uzuner Süleyman, Farizoğlu Burhanettin (2013). Manure Wastewater Treatment Options. Doğunun Batısı Batının Doğusu Uluslararası Balkanlar Konferansı. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

Dağlıoğlu Sıdıka Tuğçe, Sertkaya Simge, Kınal Armağan, Bor Melike, Ayaz Dinçer (2019). Ege Üniversitesi Greenmetric Değerlendirmesi 2018- Ulusal UI Greenmetric Çalıştayı. (Poster sunum).

Fil Baybars Ali, Kul Sinan, Korkmaz Mustafa, Yaşar Yeliz, Sertkaya Simge, Tekin Elif, Er Eren (2015). Sentetik Katyonik Boya İçeren Atıksuların Elek Tipi Anotlar Kullanılarak Arıtılması. Sağlıklı Su Yönetimi Kongresi. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum).

Fil Baybars Ali, Sertkaya Simge, Yaşar Yeliz, Korkmaz Mustafa, Tekin Elif, Er Eren (2015). Elektrokoksiasyon Yöntemiyle Grafit Çubuk Anot Kullanılarak Sentetik Boyar Madde Giderimi Destek Elektrolit Türü ve Konsantrasyonunun Etkisi. 11. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi. (Poster sunum).

Sertkaya Simge, Farizoğlu Burhanettin, Uzuner Süleyman, Fil Baybars Ali (2015). Jet Loop Reaktörle Sızıntı Sularından Amonyak Giderimine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi. 11. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi. (Tam Metin Bildiri/Sözlü sunum).

Farizoğlu Burhanettin, Uzuner Süleyman, Sertkaya Simge (2012). Süt Endüstrisi Atık sularının Arıtıldığı Jet Loop Membran Biyoreaktörün Sürekli Arıtımı Biyolojik Katsayılarının Belirlenmesi. Türkiye’de Çevre Kirlenmesi Öncelikleri Sempozyumu VII. (Tam Metin Bildiri/Sözlü sunum).

Farizoğlu Burhanettin, Nuhoğlu Alper, Yıldız Ergün, Sertkaya Simge, Uzuner Süleyman (2012). Zeytin Karasuyunun Membran Biyoreaktörlerde Biyolojik Arıtılabilirliği. Kazdağları 3. Ulusal Sempozyumu. (Tam Metin Bildiri/Sözlü sunum).

Üniversite Dışı Deneyim

2021-2021 Researcher Ph.D. Student, University of A Coruna, İspanya, (Yurtdışı Üniversite)

Alınan Sertifika, Kurs ve Eğitimler

“İklim Değişikliğine İlişkin Ulusal ve Uluslararası Gelişmeler Hakkında Çevrimiçi Bilgilendirme Toplantısı”

2022, Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği Bakanlığı

“Birey ve Aileler için Afet Bilinci Eğitimi”

2022, İçişleri Bakanlığı Afet ve Acil Durum Yönetimi Başkanlığı

“Sürdürülebilirlik Eğitim Modülü Eğitimi”

2022, Ege Üniversitesi Kurumsal Gelişimi Planlama ve İzleme Koordinatörlüğü

“Doğada Yaşamda Kalma Eğitimi Sertifika Programı”

2022, Ege Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi

“TS EN ISO 14064-1:2019 Sera Gazı Emisyonlarının ve Uzaklaştırmalarının Kuruluş Seviyesinde Hesaplanması ve Raporlanması Eğitimi”

2022, Türk Standartları Enstitüsü Eğitim Dairesi Başkanlığı

“Ege Üniversitesi Covid-19 Özelinde İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi”

2021, Ege Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi

“Türk İşaret Dili Temel Eğitimi Sertifika Programı”

2020, Ege Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi

“R Programlama Dili ile Veri Analizi”

2019, TÜBİTAK 4005 Yenilikçi Eğitim Uygulamaları/ Yıldız Teknik Üniversitesi

“Ultra Yüksek Performanslı Likit Kromatografi Kolonlar ve İleri Uygulama Teknikleri Semineri”

2011, Ant Teknik Cihazlar Ltd. Şti. / Balıkesir Üniversitesi

“Entegre Yönetim Sistemleri (ISO 9001:2008-ISO 14001:2004-OHSAS 18001:2007) Semineri”

2009, Pozitif Dönüşüm Yönetim Sistemleri Tic. Ltd. Şti. / Kocaeli Üniversitesi

Doktora çalışmaları sırasında Çevre Sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde görev aldığı süre boyunca yapmış olduğu diğer bilimsel çalışmalar (2018-2022):

Proje;

Ege Üniversitesi Rektörlüğü, Bornova İlçe Milli Eğitim Müdürlüğü ve Orman Genel Müdürlüğü İzmir Orman Bölge Müdürlüğü arasında İş birliği Protokolü gereğince, Ege Orman Okulu Projesi’nde görev almıştır.

Ege Üniversitesi ile Bornova Kaymakamlığı İlçe Milli Eğitim Müdürlüğü arasında Sıfır Atık Eğitimleri İş birliği Protokolü gereğince, Sıfır Atık Projesinde görev almıştır.

Ege Üniversitesi Sosyal Sorumluluk Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenen Sıfır Atık Sosyal Sorumluluk Projesinde görev almıştır.

Ege Üniversitesi Sosyal Sorumluluk Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenen Ege Üniversitesi Kampüsündeki Atık İlaçların Toplanması Projesinde görev almıştır.

Ege Üniversitesi Sosyal Sorumluluk Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenen Yeşil İz Sosyal Sorumluluk Projesinde görev almıştır.

Ege Üniversitesi Sosyal Sorumluluk Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenen Hayatın Kaynağı Su Sosyal Sorumluluk Projesinde görev almıştır.

Ege Üniversitesi Sosyal Sorumluluk Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenen İkinci El Takas Pazarı Sosyal Sorumluluk Projesinde görev almıştır.

Panel/Sempozyum/Çalıştay;

Ege Üniversitesi Uluslararası Biyoçeşitlilik Günü Sempozyumu organizasyon komitesinde görev almıştır.

Ege Üniversitesi Biyoçeşitlilik Günü Paneli'nin gerçekleştirilmesinde aktif rol almıştır.

Ege Üniversitesi Dünya Okyanus Günü Paneli'nin gerçekleştirilmesinde aktif rol almıştır.

Ege Üniversitesi Dünya Çevre Günü Panelleri ve Etkinlikleri'nin gerçekleştirilmesinde aktif rol almıştır.

Ege Üniversitesi Dünya Su Günü Paneli'nin gerçekleştirilmesinde aktif rol almıştır.

Çevre ve Şehircilik Bakanlığı Çevre Yönetim Genel Müdürlüğü HEYGEL Hava Kalitesi Yönetimi Çalıştayı, (28.02.2019-01.03.2019), İzmir (Temsilci Katılımcı)

Uluslararası İklim Değişikliğine Uyum Konferansı: Dirençli Kentler İçin Yeşil Odaklı Uyarlama, (07-08.03.2019), İzmir (Temsilci Katılımcı)

Networking Workshop on Volarization of Agricultural and Animal Wastes as Energy Source and Fertilizer,(26.04.2019), Ege University, İzmir (Dinleyici)

National Symosium on Green Environment and Recyclied Products. Researcer, Master and PhD Students Symposium-2. (17.01.2022). Ege University, İzmir, Turkey (Temsilci Katılımcı)

Eğitim/Seminer;

“Sıfır Atık ve Uygulamaları Eğitimi” 2022, Ege Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi, Eğitimci olarak yer almıştır.

Ege Üniversitesi Emel Akın Meslek Yüksek Okulu “Yeşili Korumaya Doğayla Yaşam” Sosyal Sorumluluk Projesi kapsamında İklim Değişikliği semineri gerçekleştirmiştir.

BP Gelişim Seninle ve İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi ortaklığı ile gerçekleştirilen “Atmıyoruz Dönüştürüyoruz” isimli proje kapsamında Sıfır Atık semineri gerçekleştirmiştir.

Bornova Anadolu Lisesi’nin ev sahipliğinde Türkiye’nin farklı şehirleri ve Azerbaycan’dan olmak üzere 12 farklı okulun birlikte yürüttüğü "İklimi Değil Kendini Değiştir" isimli eTwinning projesi kapsamında İklim Değişikliği konulu seminer sunumu gerçekleştirmiştir.

Ege Üniversitesi ÇEVMER Perşembe Seminerleri kapsamında Sentez Gaz Fermantasyonu konulu seminer vermiştir.

Ege Üniversitesi ÇEVMER Perşembe Seminerleri kapsamında Sentez Gazdan Biyoyakıt Üretimi konulu seminer vermiştir.

Hayatın Kaynağı Su Sosyal Sorumluluk Projesi kapsamında Bornova Rota Koleji 5/C öğrencilerine seminer vermiştir.

Hayatın Kaynağı Su Sosyal Sorumluluk Projesi kapsamında Bornova Rota Koleji 6/B öğrencilerine seminer vermiştir.

İzmir Bornova Anadolu Lisesi’nin ev sahipliğini yaptığı Türkiye’nin farklı şehirlerinden ve Azerbaycan’dan olmak üzere 11 farklı okulun birlikte yürüttüğü “Düşün-Değiştir-Dönüştür (3D)” isimli eTwinning projesi kapsamında Geri Dönüşüm ve Sıfır Atık konulu seminer vermiştir.

Bornova İlçe Milli Eğitim Müdürlüğü ile gerçekleştirilen köy okulu öğrencilerini çevre konusunda bilinçlendirmek için “Sıfır Atık Gelecek Mümkün Mü?” konulu semineri Yaka Köy Şengül Mustafa Karaca İlkokulu 3.sınıf öğrencilerine vermiştir.

Bornova İlçe Milli Eğitim Müdürlüğü ile gerçekleştirilen köy okulu öğrencilerini çevre konusunda bilinçlendirmek için “Sıfır Atık Gelecek Mümkün Mü?” konulu semineri Yaka Köy Şengül Mustafa Karaca İlkokulu 4.sınıf öğrencilerine vermiştir.

Bornova Yavuz Sultan Selim Ortaokulu'nda Sıfır Atık Konulu Seminer vermiştir.

Bornova Kavaklıdere Köyü Şehit Yiğit Şahan Ortaokulu'nda Sıfır Atık Konulu Seminer vermiştir.

Bornova İmam Hatip Ortaokulu'nda Sıfır Atık Konulu Seminer vermiştir.

İzmir Şehit Polis Mehmet Çelik Ortaokulu'nda Sıfır Atık Konulu Seminer vermiştir.

Faaliyet;

Her yıl gerçekleştirilen, Ege Üniversitesi'nin "Dünya Yeşil Üniversiteler" sıralaması Greenmetric belgesini alma çalışmalarında aktif rol almıştır.

Ege Üniversitesi Çevre Sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezi "Perşembe Seminerleri" nin gerçekleştirilmesinde aktif rol almıştır.

Ege Üniversitesi Çevre Sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezi "Kariyer Yolculuğu" Seminerinin gerçekleştirilmesinde aktif rol almıştır.

Gerçekleştirilmesi planlanan Ege Üniversitesi Fikrini Yeşert Peyzaj Yarışması hazırlıklarında aktif rol almıştır.

Çevre Sorunları Uygulama Merkezinde Sosyal Sorumluluk Projeleri Temsilcisi olarak görev almıştır

Çevre ve Şehircilik Bakanlığı tarafından başlatılan "Sıfır Atık" Projesi kapsamında gerçekleştirdiği çalışmalar sonucunda Üniversitemize "Sıfır Atık Belgesi" almasında aktif rol almıştır.

TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu almaya hak kazanmıştır. Çalışmalarını Nisan 2021-Ağustos 2021 tarihleri arasında başarı ile tamamlamıştır.

21 Eylül Dünya Temizlik Günü kapsamında E.Ü. Çevre Merkezi olarak İzmir Kuş Cenneti Çamaltı Tuzlası mevkinde yer alan Flamingo Üreme Adası'nda daha temiz bir doğa için çevre temizlik çalışmasında görev almıştır.

Horizon 2020 Researchers's Night programı kapsamında gerçekleştirilen faaliyetlerde aktif rol almıştır.

Ayrıca Çevre Bilimleri Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi olarak Çevre Sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezinde aşağıdaki görevleri yürütmüştür;

- Fen Bilimleri Enstitüsü YÖKAK akreditasyon çalışmaları kapsamında, Kalite Elçileri Komisyon Üyesi
- Fen Bilimleri Enstitüsü YÖKAK akreditasyon çalışmaları kapsamında, Toplumsal Katkı Komisyon Üyesi
- Döner Sermaye Satın Alma Muayene Kom. Üyesi,
- ÇEVMER Resmî Web Sayfaları (cevremerkezi.ege.edu.tr, euatik.ege.edu.tr, ormanokulu.ege.edu.tr, sifiratik.ege.edu.tr) Sorumlusu,
- ÇEVMER Resmi Sosyal Medya Hesapları (Twitter, Facebook, Instagram) Sorumlusu,
- ÇEVMER Perşembe Seminerleri Organizasyon Sorumlusu,
- Kalite ve Bilgi Yönetim Sistemi Birim Sorumlusu (Orviks),
- Faaliyet Raporları Birim Sorumlusu,
- Çevre Bilimleri Anabilim Dalı Kariyer Temsilcisi Birim Sorumlusu,
- Birim COVID-19 Özdeğerlendirme Çalışma Grubu Üyesi,
- EGEVİDO Birim Sorumlusu Yardımcısı.