

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MAYA ENDÜSTRİSİ ATIK SUYUNDAN
POLİHİDROKSİALKANOAT (PHA) ÜRETİMİNİN TAM
FAKTÖRİYEL YÖNTEMİ İLE GELİŞTİRİLMESİ

SELVER KONUK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MAYA ENDÜSTRİSİ ATIK SUYUNDAN
POLİHİDROKSİALKANOAT (PHA)
ÜRETİMİNİN TAM FAKTÖRİYEL
YÖNTEMİ İLE GELİŞTİRİLMESİ

SELVER KONUK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. SERDAR KARA

GEBZE
2023

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

DEVELOPMENT OF
POLYHYDROXIALKANOAT (PHA)
PRODUCTION FROM THE YEAST
INDUSTRY WASTE WATER BY FULL
FACTORIAL METHOD

SELVER KONUK

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING

THESIS SUPERVISOR
ASSOC. PROF. DR. SERDAR KARA

GEBZE

2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 31/01/2023 tarih ve 2023/08sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 15/02/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Selver KONUK'un tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç.Dr. Serdar KARA

ÜYE

: Prof. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE

:Prof. Dr. Hayrettin Güçlü İNSEL

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

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

ÖZET

Polihidroksialkanoatlar (PHA'lar), çeşitli biyolojik olarak parçalanabilen biyopolimerler arasında geleneksel petrokimyasal plastiklere bir alternatif olarak görülmektedir. Polihidroksialkanoatlar (PHA'lar), farklı mikroorganizmalar tarafından hücre içi karbon ve enerji rezervi olarak karbon kaynakları bol olduğunda ve büyüme en az bir diğer besin eksikliği ile sınırlandırıldığında üretilen bir grup biyolojik olarak parçalanabilir polimerdir. Doğrusal zincir yapıları nedeniyle oldukça kristalli olan polihidroksibutirat (PHB), izole edilen ve üzerinde çalışılan ilk PHA polimeridir. Aktif çamur tarafından uçucu yağ asitlerinden (UYA) PHA üretimi esas olarak çamur tutma süresi (SRT), organik yükleme oranı (OLR) ve döngü uzunluğundan (CL) etkilenir. Proses parametreleri arasındaki etkileri ve etkileşimleri belirlemek, bunların PHA üretimindeki önemini değerlendirmek ve optimal operasyonel parametreleri bulmak için üç seviyeli, üç faktörlü (3^3) tam faktöriyel bir tasarım uygulandı. Büyüme ortamı olarak kullanılan maya atık suyundan maksimum PHA üretimi için SRT (2–6 gün), OLR (0.5-2 g KOİ/L.gün) ve CL'nin (12–48 saat) en iyi potansiyel kombinasyonları araştırıldı. PHA üretimi. %57,62 (g PHB/g UAKM) ile en yüksek PHA içeriği SRT 4 gün, OLR 2 g KOİ/L.gün ve CL 48 saatte üretildi. Mikroorganizmaların PHB depolamasında biyokütle konsantrasyonu, UAKM/AKM oranı, tüketilen KOİ/biyokütle oranı ve bayram/kıtlık (F/F) oranı ile model sonuçları incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyopolimer, PHA, Maya Atıksuyu, Tam Faktöriyel Tasarım, Karışık Mikrobiyal Kültür.

SUMMARY

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are viewed as an alternative to conventional petrochemical plastics among the various biodegradable biopolymers. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are a group of biodegradable polymers that are produced by different microorganisms as an intracellular carbon and energy reserve when carbon resources are abundant, and growth is limited by a lack of at least one other nutrient. Polyhydroxybutyrate (PHB) that are highly crystalline because of their linear chain structure was the first PHA polymer to be isolated and studied. PHA production from volatile fatty acids (VFA) by activated sludge is mainly influenced by the sludge retention time (SRT), organic loading rate (OLR), and cycle length (CL). A three-level, three-factor (3^3) full factorial design was implemented to determine the effects and interactions among process parameters, to assess their significance to PHA production, and to find the optimal operational parameters. The best potential combinations of SRT (2–6 days), OLR (0.5-2 g COD/l.d), and CL (12–48 h) for maximum PHA production from yeast wastewater (YWW) used as a growth medium were investigated for PHA production. The highest PHA content of 57,62% (g PHB/g VSS) was produced at SRT 4d, OLR 2 g COD/L.d, and CL 48 h. The model results were examined with biomass concentration, the MLVSS/MLSS ratio, the consumed COD/biomass ratio, and the feast/famine (F/F) ratio in the PHB storage of microorganisms.

Key Words: Biopolymer, PHA, Yeast Wastewater, Full Factorial Design, Mixed Microbial Culture.

TEŞEKKÜR

Öncelikle çıktığım bu yolda kendisinden çok Őey öğrendiğim saygı değer hocam Doç. Dr. Serdar KARA'ya,

Tüm çalışmalarımnda bilgi birikimleriyle yanımda olan ve destek veren hocam Dr. Tülin YILMAZ NAYIR'a,

Laboratuvar çalışmalarını sırasında her anlamda destek olan, proje arkadaşlarım Havva Nur ÇİFTCİ, Berfin KÜÇÜK'e ve beraber çalışma imkânı bulduğum proje deneyiminden yararlandığım arkadaşım Dilara ÖZTÜRK'e,

Desteęini her daim hissettiğim, tüm süreci benimle yaşayan ve hep destek olan Metin KARACABEY'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma 119Y027 nolu TUBİTAK 1001 projesi kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. LİTERATÜR ÇALIŞMALARI	4
2.1. Petrol Türevli Plastikler ve Plastik Atık Sorunu	4
2.2. Biyoplastik ve Biyopolimer	6
2.2.1. PHAs (Polidroksialkanoat)	7
2.2.2. PHA Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar	9
2.2.3. PHA Üretiminde Kullanılan Atık Sular	13
2.2.4. Maya Endüstrisi	16
2.2.5. Maya Endüstrisi Atık Suyundan PHA Üretimi	17
2.3. PHA Üretimine Stres Koşullarının Etkisi	18
2.3.1. Çamur Yaşı Etkisi (SRT)	18
2.3.2. Döngü Süresi Etkisi	19
2.3.3. Bolluk/Kıtlık Fazı Etkisi	20
2.3.4. Organik Yükleme Hızı Etkisi (OLR)	21
2.3.5. pH Etkisi	22
2.4. Deneysel Tasarım	23
2.4.1. İstatiksel Deney Tasarımı	23
2.4.1.1. Varyans Analizi	23
2.4.1.2. Tam Faktöriyel Deney Tasarımı	24
2.4.1.3. Cevap Yüzey Yöntemi (RSM)	25
2.4.1.4. Merkezi Kompozit Yüzey Tasarımı (Central Composite Design, CCD)	26

3. MATERYAL ve YÖNTEM	28
3.1. Atık su ve Çamur Karakterizasyonu	28
3.2. Deney Düzenegi	29
3.2.1. Ardışık Kesikli Reaktör (AKR)	29
3.3. Proses Takip Parametreleri	31
3.3.1. Kimyasal Oksijen İhtiyacı(KOİ)	32
3.3.2. Askıda Katı Madde (AKM) ve Uçucu Askıda Katı Madde (UAKM) Tayinleri	33
3.3.3. Toplam Azot (TN) ve Toplam Fosfor (TP)	33
3.3.4. Uçucu Yağ Asitleri (UYA)	34
3.3.5. Polihidroksibütirat Tayini (PHB)	34
3.3.6. PHB Ekstraksiyonu	36
3.4. Faktöryel tasarım	37
3.4.1. İstatistiksel analiz	37
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	39
4.1. PHB Geri Kazanımı İçin Deney Tasarımı	39
4.1.1. PHB Üretiminde SRT'nin Etkisi	43
4.1.2. PHB Üretiminde OLR'nin Etkisi	44
4.1.3. PHB Üretiminde CL'nin Etkisi	44
4.2. AKM/UAKM Etkisi	45
4.3. F/M Etkisi	48
4.4. Bolluk / Kıtlık Fazı Etkisi	50
5. SONUÇLAR	53
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
ΣN	: Toplam Azot
ΣP	: Toplam Fosfor
dk	: Dakika
g	: Gram
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
L	: Litre
AAR	: Anaerobik Asidejonik Reaktör
AKM	: Askıda Katı Madde
AKR/SBR	: Ardışık Kesikli Reaktör
ASPR	: Aktif Çamur Üretim Reaktörü
CSTR	: Tam Karışimli Tank Reaktör
CL	: Döngü Uzunluğu
HDPE	: Yüksek Yoğunluklu Polietilen
KOİ	: Kimyasal Oksijen İhtiyacı
LDPE	: Düşük Yoğunluklu Polietilen
MMC	: Karışık Mikrobiyal Kültür
OLR	: Organik Yükleme Oranı
PE	: Polietilen
PET	: Poli Etilen Tereftalat
PHA	: Polihidroksialkanoat
PHAR	: PHA Sentez Reaktörü
PHB	: Polihidroksibütirat
PLA	: Polilaktik Asit
PP	: Polipropilen
PS	: Polistiren
PVC	: Polivinil Klorür
RSM	: Cevap Yüzey Metodu
SRT	: Çamur Yaşı

UAKM	:	Uçucu Askıda Katı Madde
UASB	:	Anaerobik Çamur Blanket Reaktör
UYA	:	Uçucu Yağ Asidi
YWW	:	Maya Atık Suyu



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Başlangıç monomerleri ve tekrar birim yapıları ile termoplastiklerin temsili örnekleri.	5
2.2: Plastik hammadde üretimi.	6
2.3: Biyopolimerler türlerinin sınıflandırılması.	7
2.4: PHA sentezinde yer alan metabolik yollar.	8
2.5: Cupriavidus necator türünün PHA bakımından zengin hücreleri.	10
2.6: Karışık mikrobiyal kültürlerle sahip gıda endüstrisi atıklarından PHA üretimi için akış şeması.	13
2.7: Tipik ekmek mayası üretim akış şeması.	17
2.8: Merkezi kompozit tasarımının gösterimi.	26
3.1: PAKMAYA atıksu arıtma tesisi.	28
3.2: Laboratuvarında işletilen aerobik sistem.	29
3.3: Karışık mikroorganizma kültüründen PHB eldesi.	30
3.4: KOİ tayini için termoreaktörü.	31
3.5: Spektrofotometre cihazı.	33
3.6 : Liyofilizatör cihazı.	34
3.7: Liyofilize edilmiş çamur.	34
3.8: Gaz Kromatografi cihazı.	35
3.9: DMC ekstraksiyonu sonrası polimer.	36
4.1: PHA optimisasyonu tahmin edilen değer ve gerçek değer sonuç grafiği.	42
4.2: SRT'nin PHB geri kazanımına etkisi.	43
4.3: OLR'nin PHB geri kazanımına etkisi.	44
4.4: CL'in PHB geri kazanımına etkisi.	44
4.5: OLR 0.5 g KOİ/L.gün için SRT ile değişen AKM ve UAKM/AKM değerleri.	45
4.6: OLR 0.1 g KOİ/L.gün için SRT ile değişen AKM ve UAKM/AKM değerleri.	46

4.7:	OLR 2 g KOİ/L.gün için SRT ile değişen AKM ve UAKM/AKM değerleri.	47
4.8:	OLR 0.5 g KOİ/L.gün için SRT ile değişen KOİtüketilen/AKM ve F/M oranı.	48
4.9:	OLR 1 g KOİ/L.gün için SRT ile değişen KOİtüketilen/AKM ve F/M oranı.	48
4.10:	OLR 2 g KOİ/L.gün için SRT ile değişen KOİtüketilen/AKM ve F/M oranı.	49
4.11:	CL'lara bağlı olarak değişen SRT (2, 4, 6 gün) ve OLR (0.5, 1, 2 g KOİ/L.gün) değerleri.	51



TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Bazı bakteri türlerinin hangi tür PHA depoladığını.	12
2.2: Farklı zenginleştirme stratejileri altında elde edilmesi.	15
2.3: Ekmek mayasının yaklaşık olarak bileşimi.	16
3.1: Maya endüstrisi anaerobik atıksu karakterizasyonu.	29
3.2: Tam faktöriyel tasarımdan faktörler ve seviyeleri.	36
4.1: Tam faktöriyel tasarımdan faktörleri ve seviyeleri.	38
4.2: PHB geri kazanımı için deney tasarımı ve sonuçları.	39
4.3: Uygulanan modelin ANOVA sonuçları.	41
4.4: PHA üretiminin seçilen faktöriyel modeli için ANOVA.	41

1. GİRİŞ

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Sanayinin gelişmesi ve dünya nüfusundaki artış beraberinde üretimde plastik kullanımı arttırmaktadır. Plastiklerin üretimine paralel olarak tüketim miktarı da giderek arttırmaktadır. Dünyada her yıl milyonlarca ton plastik içeren atıklar oluşmakta ve bunların bir miktarı geri dönüştürülerek tekrar kullanılabilirken geri dönüştürülemeyen kısmı doğaya bırakılmaktadır. Geleneksel petrokimyadan türetilen plastik ürünler günlük yaşam kalitesini kolaylaştırmış olsa da çevreye bırakılan bu plastik atıklar doğada kendiliğinden çözünmediği gibi içeriğindeki petrol türevleri nedeniyle çevre kirliliğine sebep olmaktadır ve buna bağlı olarak birçok canlının yaşamını tehdit etmektedir.

İnsan faaliyetleri nedeniyle dünya çapında atıksu ve atıksu arıtma çamurlarının sürekli artmasıyla karşı karşıya kalmaktayız, bu da çevreyi olumsuz etkilemekte olup bu atıkların bertaraf edilmesi için yeni stratejiler gerekli olabilir. Piyasada bulunan plastik malzemelerin çoğu petrol endüstrisinden gelmektedir ve tipik olarak biyolojik olarak parçalanamazlar, bu nedenle çevrede uzun süre kalarak ciddi endişelere yol açabilirler. Bununla birlikte, paketlemeden medikal sektöre kadar çok çeşitli uygulamalarda geleneksel plastiklerin (PE, PP, PS vb.) yerini alabilen özelliklere sahip bir polyester ailesini temsil eden PHA (Polihidroksialkanoatlar) olarak bilinen bir grup biyopolimer vardır. PHA genellikle hücre içinde PHA granüllerindeki karbon kaynağını spesifik enzimlerin sentezi ile dönüştürebilen spesifik mikroorganizmaların (*Escherichia coli* rekombinant, *Cupriavidus necator* vb.) saf kültürlerinin kültivasyonu sırasında elde edilir. Saf kültürlerin kullanımı, hücre içi PHA içeriğinin %75'ine (a/a) ulaşma avantajı sunar [Kourmentza et al., 2007], ancak kontaminasyonu önlemek için steril koşulların gerekliliğini gerektirir, bu da nihai sonucu güçlü bir şekilde etkiler. Bununla birlikte, üretim maliyetini azaltmak için bir alternatif, steril koşullar gerektirmeyen ve atık hammaddelerle beslenebilen karışık mikrobiyal kültürlerin (MMC) kullanılmasıdır.

PHA üretimi için MMC'yi içeren süreç, MMC ile PHA üretimi için doğrudan substratlar olan VFA açısından zengin bir akış üretmek için besleme stoğunun

asitogenik fermantasyonunu içeren farklı aşamaları içerir [Valentino et al., 2015]. Ayrıca, PHA depolayan mikroorganizmalarda aktif çamuru zenginleştirmek için bir seçim aşaması ve seçilen kültürün hücre içi PHA içeriğini en üst düzeye çıkarmak için PHA biriktirme aşaması gereklidir. Bu üç aşama arasında mikrobiyal seçim aşaması önemli bir rol oynar. Geleneksel olarak, seçim işlemi, bayram ve kıtlık rejimi olarak adlandırılan belirli bir büyüme koşulunun gerçekleştirildiği bir SBR'de (sıralı kesikli reaktör) gerçekleşir. Bu rejim, dış karbon kaynağının varlığı (bayram) ve yokluğu (kıtlık) arasındaki değişimden oluşur. İkincisi, kıtlık evresi sırasında mikrobiyal büyüme için hücre içi karbon kaynağı olarak kullanılmak üzere bayram evresinde depolanır [Johnson et al., 2009]. Biyokütle hacimsel üretkenliğini artırmak için SBR, yüksek bir OLR, yüksek bir giriş substrat konsantrasyonu ve kısa bir hidrolik tutma süresi (HRT) ile çalıştırılmalıdır [Villano et al., 2014]. Çeşitli araştırmalar, düşük bir ziyafet/kıtlık (F/F) oranı ve verimli PHA depolayan mikroorganizma seçimine 8.5 g KOİ/L'de ulaşılabilirliğini göstermektedir [Villano et al., 2010]. Ancak daha yüksek OLR, istikrarsız veya zayıf verimliliği ortaya çıkardı [Dionisi et al., 2005]. Döngü uzunluğu (CL) ve çamur tutma süresi (SRT), PHA sentezini etkileyen diğer önemli parametrelerdir. Bayram/kıtlık (F/F) zamanı CL tarafından değiştirilir. Uzun bir kıtlık süresinin ardından bakterinin çevresine yüksek miktarda karbon girdiğinde, bakterinin büyümesini sağlayan enzim hücre büyümesini sürdürmek için yetersiz kalır ve hücre gelen karbon ve amonyağı depolamaya başlar [Lemos et al., 2008] F/F oranı (ekolojik seçim ve fizyolojik adaptasyon) ve MMC üzerindeki ayıklama etkisi (fiziksel seçim), SRT'nin PHA biriktiren kültürlerin zenginleştirme sürecini etkilediği iki ek yoldur [Albuquerque et al., 2010], [Beccari et al., 1998], [Chen et al., 2017]. Aktif çamurda PHA oluşumunun iyileştirilmesi için çok önemli olarak tanımlanan ek faktörler arasında karbon kaynağı, pH, sıcaklık, manyetik alan yoğunluğu ve besin sınırlamaları (özellikle nitrojen ve fosfor) bulunur [Hong et al., 2009]. Geleneksel olarak, PHA sentez işlemi, gıda-mikroorganizma oranı (F/M oranı) [Dionisi et al., 2004], [Dionisi et al., 2006] gibi bir bileşenin varyasyonu uygulanarak OLR optimize edilmiştir. [Dionisi et al., 2001] substrat karbon-azot oranı (C/N oranı) [Suresh, et al., 2004], HRT [Yu and Si, 2001] ve SRT [Chua et al., 2003] ve yanıt tek bir parametrenin bir fonksiyonuydu. Faktöriyel tasarım ve yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM) dahil olmak üzere istatistiksel deneysel stratejiler, istatistiksel yöntemler kullanarak çeşitli parametrelerin etkileşim etkilerini incelemek için sistematik ve verimli bir araştırma stratejisi sağlar [Hong et al., 2009a]. Son yıllarda PHA üretiminde uygulanmaktadır

[Hong et al., 2009],[Liu et al., 2011], [Shahid et al., 2021], [Macagnan et al., 2017], [Kavitha et al., 2016]. Bu çalışmalarda sentetik besiyeri kullanılarak pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, N konsantrasyonu, manyetik alan şiddeti, HRT, SRT, anoksik-oksik döngü, C/N oranı vb. değişkenler kullanılmıştır.

Escherichia coli'nin biyoyakıt ve biyoplastik üretimi için mikroalg bazlı substratlar üzerinde kültürlenebileceği gösterilmiştir [Hoover, et al.2011, Rahman, et al. 2014]. *E. coli* kolayca kültürlenebilir ve hızlı bir ikiye katlanma süresine sahiptir, bu da onu rekombinant biyoürünlerin üretimi için ideal bir aday yapar. Polihidroksibütiratlar (PHB'ler), *E. Coli* [Rehm, 2010] ve siyanobakterilerde [Opgenorth, 2014] rekombinant olarak üretilen biyoplastiklerdir. PHB potansiyel olarak yararlı bir polimerdir, tamamen biyolojik olarak parçalanabilir olmasının yanı sıra polipropilen ve polistiren gibi geleneksel petrokimyasal olarak türetilmiş plastiklere benzer özelliklere sahiptir *E. coli*'de asetil-CoA'nın PHB'ye dönüşümü için üç gen gereklidir. pBHR 68 plazmiti, kısa zincir uzunluğu (scl) polimer PHB'nin üretimi için gerekli olan lac promotörünü ve üç geni (phaA, phaB ve phaC) içerir [Spiekermann, 1999].

Bu çalışmada, zenginleştirme reaktöründe PHB üretiminin artırılması için çamur tutma süresi, organik yükleme hızı ve döngü uzunluğunun etkisi incelenmiştir. PHB üretimini etkileyen faktörler, deney tasarımı için önemli bileşenlerin kombinasyonunu tanımlayarak matematiksel bir model oluşturan tam faktöriyel bir tasarım kullanılarak tarandı. Anaerobik olarak arıtılmış maya endüstrisi atıksuyu, PHA üretimi kriterlerini karşılayan UYA gibi yüksek karbon içeriği nedeniyle besleme akışı olarak seçilmiştir. Sonuçlar, deneysel tasarım deneylerinde kullanılan her koşul için biyokütle konsantrasyonu, UYA/AKM oranı, tüketilen KOİ'nin biyokütleyle oranı ve bayram/kıtlık oranı ile incelenmiştir. Böylece SRT, OLR ve CL parametrelerinin her birinin PHB üretimi üzerindeki etkisi ortaya konmuştur.





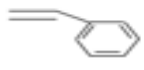
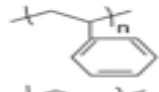


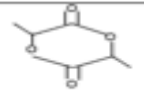
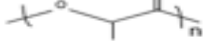




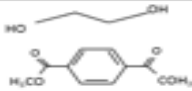
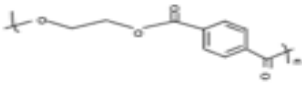
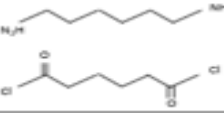
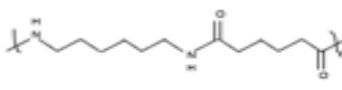
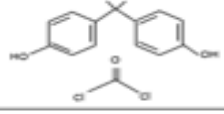
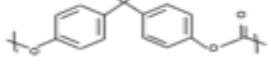
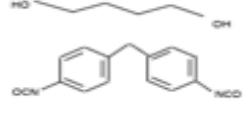
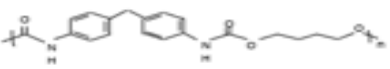
2. LİTERATÜR ÇALIŞMALARI

2.1. Petrol Türevli Plastikler ve Plastik Atık Sorunu

Plastik; karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O), azot (N) ve diğer organik ya da inorganik elementlerin oluşturduğu monomer adı verilen; basit yapıdaki molekülü gruplardaki bağın koparılarak polimer adı verilen uzun ve zincirli bir yapıya dönüştürülmesi ile elde edilen malzemelere verilen isimdir [Millet et al., 2018].

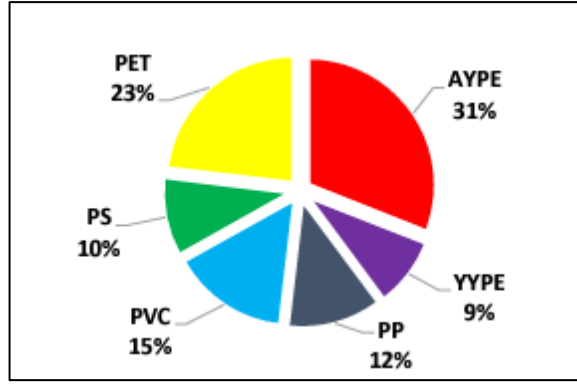
Plastik kelimesi, "şekillendirilebilen veya kalıplanabilen" anlamına gelen Yunanca plastikos ve "kalıplanmış" anlamına gelen plastos kelimesinden türetilmiştir. Malzemenin üretim sırasında şekillendirilebilirliği veya kalıplanabilirliği sayesinde dökülmesine, basılmasına yahut film, lif, tabak, tüp, şişe, kutu ve daha birçok şekilde günlük hayatta plastiklerle karşılarız.

İki yaygın plastik malzeme kategorisi bulunur; termoplastikler ve termosetler. Termoplastikler ısıtılarak şekillendirilebilmekte ve tekrar kullanılabilirler. Termosetler kimyasal olarak polimerize edilememekte ve tekrar şekillendirilememektedirler. Fakat termoset plastiklere de eritildikten sonra şekil verilebilir. Ancak sıvı haldeyken bir şekle kavuştuktan sonra katı durumda kalırlar ve termoplastikler gibi yeniden eritilemezler. (Mim. Ceyda VATAN). Termoplastiklerin temsili örnekleri, poliolefinler (polietilen (PE); düşük yoğunluklu polietilen (LDPE: dallı yapı), yüksek yoğunluklu polietilen (HDPE: doğrusal yapı); polipropilen (PP), polistiren (PS), poli(vinil klorür) (PVC)), poliesterler (polilaktid (PLA), poli(etilen tereftalat) (PET)), poliamidler (nylon-6 ve nylon-6,6), polikarbonatlar ve poliüretanlar. Listelenen termoplastiklerin başlangıç monomerleri ve tekrar birim kimyasal yapıları Şekil 2.1'de gösterilmektedir. Geleneksel termosetlerden bazıları, fenol ve formaldehit (Bakalit), melamin ve formaldehit ve epoksi reçinesinin sertleştiricilerle (aminler) reaksiyon ürünleridir [Millican and Agarwal, 2021].

Monomerler	Makromoleküler tekrar birimi	Polimerin adı
		Polietilen (PE)
		Polipropilen (PP)
		polistiren (PS)
		<u>Poli(vinil klorür) (PVC)</u>
		<u>Polilaktit (PLA)</u>
		Polikaprolakton (PCL)
		Naylon-6
		<u>Poli(etilentereftalat) (PET)</u>
		Naylon-6,6
		Polikarbonat (PC)
		Poliüretan (PU)

Şekil 2.1: Başlangıç monomerleri ve tekrar birim yapıları ile termoplastiklerin temsili örnekleri.

2021 yılının ilk yarısında toplam plastik hammadde üretiminin 557 bin ton civarında gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Şekil 2.2’de Türkiye’de söz konusu dönemde üretilen toplam plastik hammaddenin %31’ini AYPE, %9’unu YYPE, %15’ini PVC, %12’sini PP, %10’unu PS, %23’ünü de PET oluşturmuştur. Küresel plastik üretiminin 2015 yılında 300 milyon tondan 2050’de 1800 milyon tona yükselmesi beklenmektedir [Ryan, 2015].



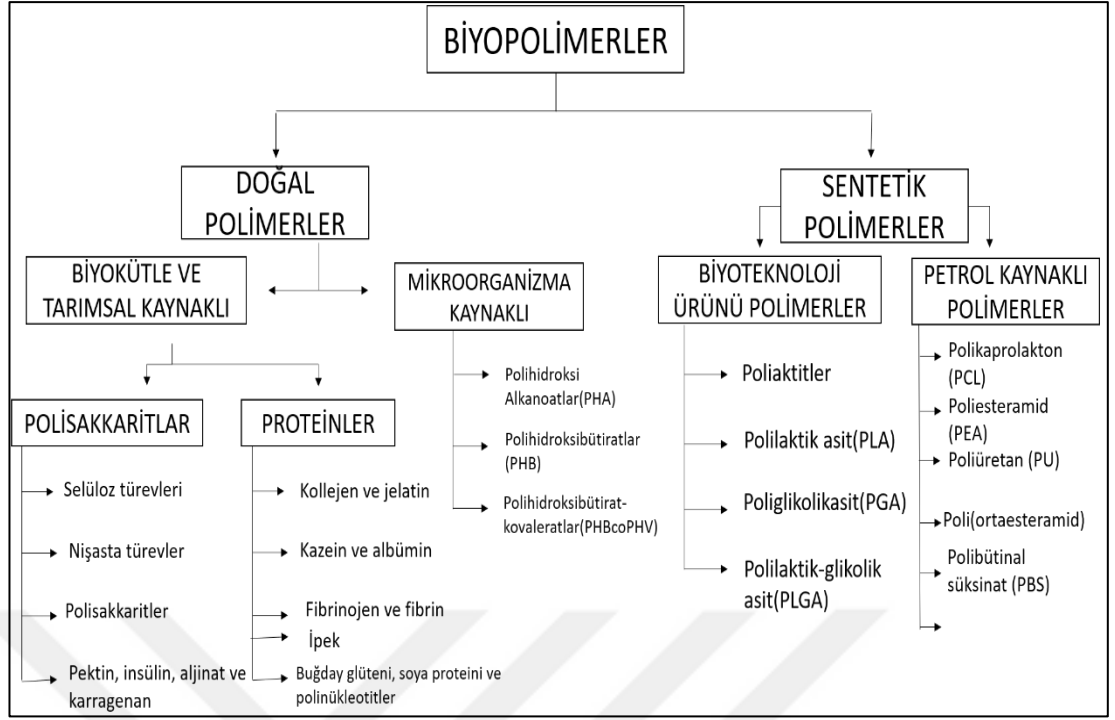
Şekil 2.2: Plastik hammadde üretimi.

Petrol ve türevlerinden elde edilen sentetik plastiklerin neden olduğu çevre kirliliği, toksik madde birikimi ve yenilenemeyen bir kaynak olan fosil yakıtlardaki fiyat dalgalanmaları nedeniyle oluşan ekonomik problemleri minimize edebilmek için petrol türevli plastiklerin yerini alabilecek biyolojik olarak parçalanabilen alternatif malzemelerin araştırma ve geliştirme çalışmaları son yıllarda büyük önem kazanmakta olup Petrol türevli termoplastiklerin yerini alabilecek alternatif malzemelerden birisi de yenilenebilir kaynaklardan elde edilen biyoplastiklerdir [Biron, 2018].

2.2. Biyoplastik ve Biyopolimer

Son zamanlarda plastik atık sorunu gittikçe büyümekte olup doğada kendiliğinden parçalanarak yok olan polimer türü üzerine çalışmalar artmaktadır. Yeşil polimer olarak da biline bu polimer türleri iki ana gruba ayrılmaktadır. Şekil 2.3'de biyopolimer türlerinin sınıflandırılması yapılmış olup biyopolimerler 4 ana başlıkta incelenmektedir;

- i) biyokütle ve tarımsal kaynaklardan elde edilen polimerler;
- ii) mikroorganizmalar ve genetiği değiştirilmiş bakterilerden elde edilen polimerler;
- iii) biyokaynaklı monomerlerin kimyasal polimerizasyonu ile elde edilen polimerler;
- iv) petrol kaynaklı ürünlerden elde edilen alifatik ve aromatik polimerler [Yoruç and Uğraşkan, 2017].



Şekil 2.3: Biyopolimerler türlerinin sınıflandırılması.

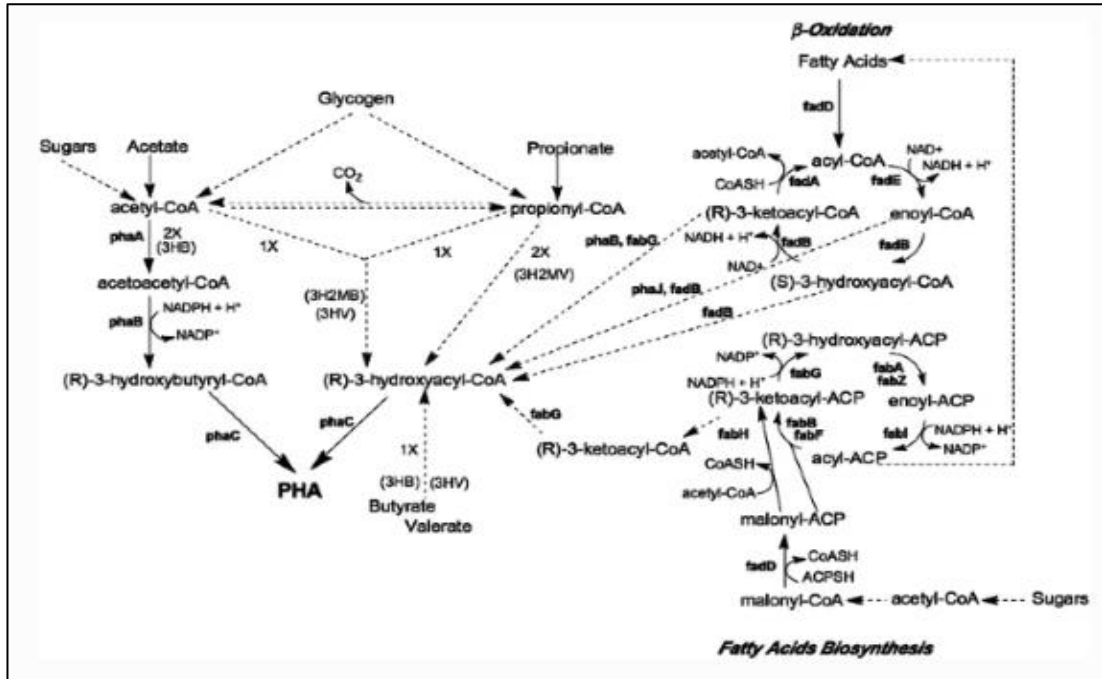
Petrokimyasallardan üretilen polimerlere en iyi alternatif biyolojik kaynaklardan sentezlenen biyopolimerlerdir. Polimerlerin senteze bağlı sınıflandırılması Şekil 2.3'deki sınıflandırmaya göre, biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, kökenlerine bağlı olarak tarımsal kaynaklı polimerler (polisakaritler, proteinler) ve mikrobiyal PHA'lar olarak sınıflandırılabilir. Bu polimerler PLA gibi biyo-bazlı monomerler ve kimyasal olarak sentezlenmiş monomerler kullanılarak kimyasal olarak da sentezlenebilir [Gurunathan et al., 2015].

2.2.1. PHAs (Polidroksialkanoat)

Polihidroksialkanoatlar (PHA'lar), çeşitli biyobozunur biyopolimerler arasında geleneksel petrokimyasal plastiklere bir alternatif olarak görülmektedir [Takabatake et al., 2000]. Polihidroksialkanoatlar (PHA'lar), bazı uygulamalarında potansiyel olarak petrokimyasal türevli plastiklerin yerini alabilen yenilenebilir, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyo-bazlı biyopolimerler sınıfına girmektedir [Kourmentza et al., 2017]. Kimyasal olarak, PHA molekülü tipik olarak 600 ila 35.000 (R)-hidroksi yağ asidi monomer biriminden oluşur. Bir PHA monomerindeki toplam karbon atomu sayısına bağlı olarak PHA, kısa zincirli PHA (SCL-PHA; 3 ila 5 karbon atomu), orta

zincirli PHA (MCL-PHA; 6 ila 14 karbonlu)) veya uzun zincirli PHA (LCL-PHA; 15 veya daha fazla karbon atomu) atomları olarak sınıflandırılabilir [Tan ,2014].

PHA sentezi için metabolizma, saf mikrobiyal kültürler için iyi bir şekilde belirlenirken, karışık kültürler için sadece birkaç metabolik çalışma rapor edilmiştir [Serafim et al., 2008]. Karışık kültürlerdeki PHA metabolizmasının, aynı karbon substratı kullanan saf kültürler için bildirilene benzer olduğu varsayılmaktadır. Her VFA'nın PHA'ya dönüştürülmesi için gereken enerji miktarı (ATP) farklıdır. PHA üretiminin metabolizması, Şekil 2.4'de belirtildiği gibi substrat bileşimine bağlıdır. Hem asetat hem de bütirat asetil-CoA'ya, ardından PHB'ye dönüştürülür. Propiyonat, propiyonil-CoA'ya, ardından diğer VFA'lardan üretilen asetil-CoA ile bağlanarak veya propiyonil-CoA'dan dekarboksilasyon yoluyla bağlanarak PHV'ye veya 2 propiyonil-CoA'yı birleştirerek PH2MV'ye dönüştürülür. Valat, hem asetil-CoA'ya hem de propiyonil-CoA'ya, ardından PHV'ye dönüştürülür [Lemos et al., 2008] , [Pardelha et al., 2012]. VFA'ların her bir molü, PHA sentezi için 2 mol ATP'ye ihtiyaç duyar: aktif taşıma için 1 mol ATP ve hücre içi dönüşüm için başka bir mol ATP [Serafim et al., 2008]. Bu nedenle, bütirat ve valerat gibi daha uzun karbon zincirlerine sahip VFA'lar, asetat ve propiyonata kıyasla bir C-mol PHA üretmek için daha az ATP'ye ihtiyaç duymaktadır [Zhang et al., 2020].



Şekil 2.4: PHA sentezinde yer alan metabolik yollar.

Her VFA'nın PHA'ya dönüştürülmesi için gereken enerji miktarı (ATP) farklıdır. PHA üretiminin metabolizması, Şekil 2.4'de belirtildiği gibi substrat bileşimine bağlıdır. Hem asetat hem de bütirat asetil-CoA'ya, ardından PHB'ye dönüştürülür.

PHA sentezinde yer alan metabolik yolların bilgisi, polimer bileşiminin (polimerin yapısal ve mekanik özellikleri ve dolayısıyla olası uygulamalarla ilgili olan) önceden tahmin edilmesini ve bu bilgiye dayalı olarak, karışık kültürler tarafından PHA üretiminin metabolik modellerinin malzeme dengelerini gerçekleştirmesini sağlar. AN/AE süreçlerinde Oehmen ve diğerleri tarafından gözden geçirilmiştir. [Oehmen et al., 2007] veya aerobik süreçlerde Dias ve diğerleri tarafından gözden geçirilmiştir [Pardelha et al., 2012].

PHA'lar paketlenme ve paketlenme filmlerinde, kaplarda ve kâğıt kaplamalarda kullanılabilir. PHA'lar biyolojik olarak parçalanabilir bir ilaç, hormon, böcek ilacı ve herbisit taşıyıcısı olarak uygulanmıştır [Mokhtarani et al., 2012]. Doğası gereği biyoyumlu olan PHA ve özellikle MCL-PHA, doku mühendisliğinde ve greftlerde ve cerrahi sütürlerde kullanılabilir. PHA'lar, boya sistemlerini kurutmak için bağlayıcı olarak da kullanılabilir [Valentino et al., 2015].

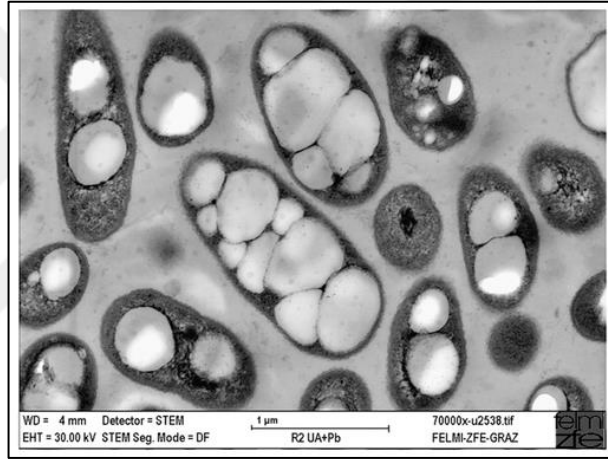
Polihidroksialkanoatlar (PHA'lar), farklı mikroorganizmalar tarafından hücre içi karbon ve enerji rezervi olarak karbon kaynaklarının bol olduğu ve büyümenin en az bir besin eksikliği ile sınırlı olduğu durumlarda yapılan bir grup biyolojik olarak parçalanabilen polimerdir [Keenan et al., 2006].

2.2.2. PHA Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Bakteriler gibi prokaryotik mikroorganizmalar, çeşitli işlevleri ve ekosistem hizmetlerini yerine getiren çok çeşitli hücre dışı ve hücre içi biyopolimerler üretebilir [Rehm, 2010]. Polihidroksialkanoatlar (PHA), hidroksialkanoik asitlerin polioksoesterleridir ve bakterilerdeki varlıkları ilk olarak onlarca yıl önce Lemoigne [Borror et al., 2018] tarafından rapor edilmiştir. PHA'nın, olumsuz koşullar altında karbon ve enerji kaynağı olarak hizmet etmek üzere hücre içi depolama bileşikleri olarak bakteriler ve bazı arkeler tarafından sentezlendiği iyi bilinmektedir [Macagnan et al., 2017]. PHA üreten mikroorganizmalar, besin maddelerinin değişken mevcudiyeti ve sınırlaması olan ortamlarda depolama bileşiklerini biriktirme yeteneklerinden yararlanabilirler. PHA üreten bakteriler hem

su hem de karasal ortamlarda bulunmuştur. Şekil 2.5’de, sürekli bir yetiştirme işlemi sırasında tek karbon kaynağı olarak glikoz üzerinde yetiştirilen, iyi bilinen PHA üreten *Cupriavidus necator* türünün PHA bakımından zengin hücrelerini göstermektedir [Atli et al., 2011].

PHA elde edilmesinde kullanılan bakteriler, sentez için gereken kültür şartlarına bağlı olarak iki gruba ayrılabilir: Birinci grup bakteriler PHA sentezi için karbon kaynağının fazlalığına ve azot, fosfor, magnezyum, kükürt gibi temel besinlerin sınırlandırılmasına ihtiyaç duyarken (örneğin; *A. eutrophus*), ikinci grup bakteriler PHA sentezi için besin sınırlandırılmasına ihtiyaç duymamakta ve gelişme boyunca polimer biriktirebilmektedir (örneğin; *A. vinelandii* mutant suşu) [Khanna and Srivastava, 2005].



Şekil 2.5: *Cupriavidus necator* türünün PHA bakımından zengin hücreleri.

PHA'ların bakteriyel sentezi 300'den fazla türde tanımlanmıştır. Bununla birlikte, PHA'ların endüstriyel üretimi için uygun mikroorganizmaların seçiminden önce çeşitli faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Hücrenin çok pahalı olmayan karbon kaynakları üzerinde büyüebilme yeteneği, büyüme hızı veya oranı, polimerin sentez oranı ve mevcut substrata göre hücre tarafından biriken maksimum olası polimer. Birkaç çalışma, ön hesaplamalar için oldukça yararlı olabilecek, kullanılan karbonun fonksiyonunda PHA verimini tahmin etmek için denklemler önermiştir [Prados and Maicas, 2016].

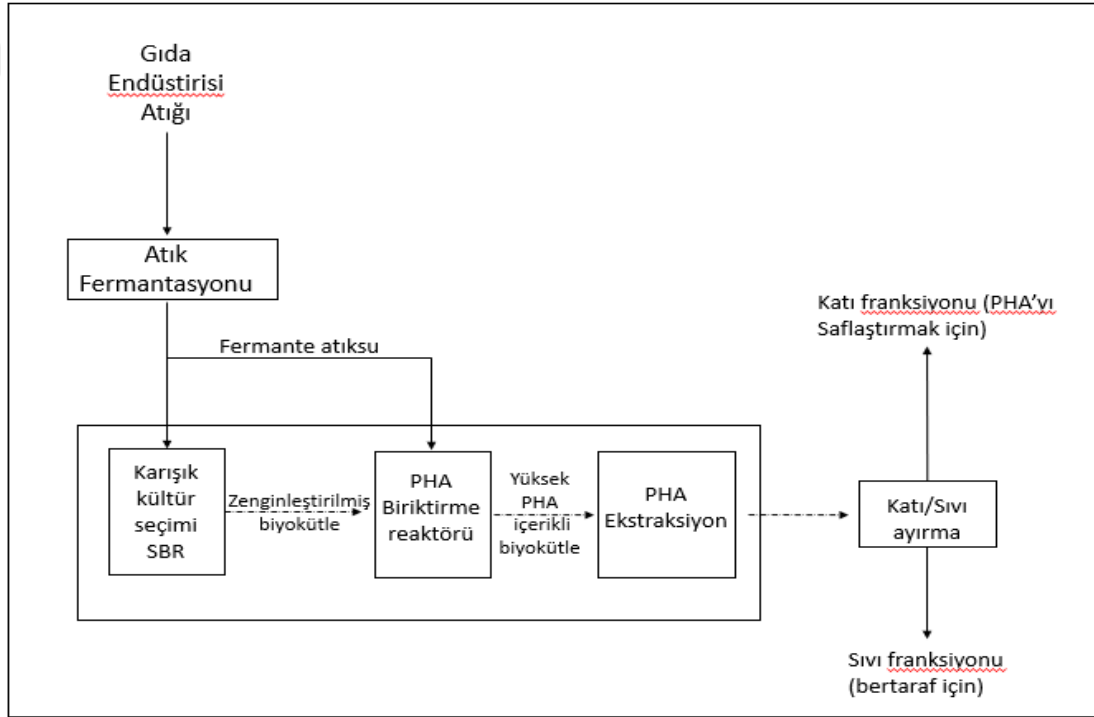
Tablo 2.1’de bazı bakteri türlerinin hangi tür PHA depoladığı listelenmiştir. Buna göre PHA’lar *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Aeromonas* ve *Rhodobacter* gibi cinslere ait gram-negatif bakteriler ve gram-pozitif bakteriler tarafından sentezlenir. Şimdiye kadar, sadece birkaç bakteri türü optimal PHA üretim kriterlerini karşılamıştır. En önemlileri *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas oleovorans* veya *Pseudomonas putida*’dır [Szacherska et al., 2021]. PHA’ların üretimi için kullanılan mikroorganizmaların her birinin izolasyonu, doğal veya rekombinant olmasıyla doğrudan ilişkilidir [Prados and Maicas, 2016]. Örneğin, 3-hidroksibutirat (3HB) ve 3-hidroksivaleratın (3HV) kopolimeri olan P(3HB-co-3HV), *Ralstonia eutropha* kullanılarak saf kültür fermantasyon işlemiyle ticari olarak üretilmiştir ve elde edilen PHA içeriği, hücre kuru ağırlığının %80’inden fazladır [Moralejo et al., 2013]. *Alcaligenes latus* ve rekombinant *Escherichia coli* tarafından elde edilen PHA içeriğinin sırasıyla hücre kuru ağırlığının %88’ine [Wang, 1997] ve %76’sına [Lee et al., 1994] ulaştığı bildirilmiştir.

Tablo 2. 1: Bazı bakteri türlerinin hangi tür PHA depoladığının listesi.

Mikroorganizma	Karbo Kaynağı	PHA	PHA İçeriği (% w/w)
<i>A.eutrophus</i>	Glukonat	PHB	46-85
	Propiyonat	PHB	26-36
	Oktanoat	PHB	38-45
<i>Bacillus megaterium</i> <i>QMB1551</i>	Glukoz	PHB	20
Rekombinant <i>Klebsiella</i> <i>aerogenes</i>	Molaz	PHB	65
<i>Methylobacterium</i> <i>rhodesianum MB 1267</i>	Fruktoz/Metanol	PHB	30
<i>Methylobacterium</i> <i>extorquens(ATCC55366)</i>	Metanol	PHB	40-46
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	Sütleğen ve hint yağı	PHB	20-30
<i>P.denitrificans</i>	Metanol	P(3HV)	0,02
	Pentanol	P(3HV)	55
<i>P.oleovorans</i>	Glükonoat	PHB	1,1-5
	Oktanoat	PHB	50-68
<i>Pseudomonas putida</i> <i>GPP104</i>	Oktanoat	PHB	14-22
<i>P.putida</i>	Palm çekirdeği yağı	PHA	37
	Laurik asit	PHA	25
	Miristik asit	PHA	28
	Oleik asit	PHA	19
<i>Sphaerotilus natans</i>	Glukoz	PHB	40

2.2.3. PHA Üretiminde Kullanılan Atık Sular

Henüz endüstriyel ölçekte yaygın olmasa da karışık mikrobiyal kültürler kullanılarak PHA üretimi steril koşulları sürdürmeyi gerektirmediği, tarımsal-endüstriyel atıklar gibi düşük maliyetli hammaddelerin kullanımını kolaylaştırdığı için umut verici görünmektedir. Fakat karışık mikrobiyal kültür bazlı PHA üretim süreci, atık akışının kirletici yükünü eşzamanlı olarak azaltma avantajını ortaya çıkarmakta olup Şekil 2.6'da görüldüğü gibi birbirine bağlı farklı aşamalar gerektirmektedir [Villano et al., 2014].



Şekil 2.6: Karışık mikrobiyal kültürlerle sahip gıda endüstrisi atıklarından PHA üretimi için akış şeması.

PHA üretimi için birçok atık su türü kullanılabilirse de yüksek konsantrasyonlarda fermente edilebilir KOİ, nispeten düşük nitrojen ve katı konsantrasyonları ve düşük toksisite proses fizibilitesini artırır. Bu açıdan, gıda ve kâğıt endüstrisi atık suları, atık bazlı PHA üretimi için en uygun substratlar olarak kabul edilebilir [Tamis et al., 2014]. Şeker fabrikalarının, petrol fabrikalarının, odun fabrikalarının, kâğıt fabrikalarının veya belediye atıklarının atık sularından biyoplastik üretmenin fizibilitesi incelenmiştir. Bununla birlikte, bu araştırmalardan elde edilen PHA depolama kapasitesi, sentetik hammaddeler üzerinde seçilen mikrobiyal zenginleştirmelerden

önemli ölçüde daha düşüktü. Bu çalışmaların çoğu kuru ağırlığın yaklaşık %55'i kadar PHA içeriği bildirmiştir [Zheng et al., 2021].

Amaro ve arkadaşlarının çalışmasında, peynir altı suyu, mikrobiyal büyüme için açıkça uygun olan zengin bir ortamdır. Bununla birlikte, peynir altı suyunda büyürken verimli bir şekilde PHA'lar üreten mikroorganizmaları bulmanın son derece zorlu olduğu gösterilmiştir. Ne yazık ki, en iyi tanımlanmış PHA üreten mikrobiyal türlerden bazılarının peynir altı suyundan doğrudan PHA üretmediği gösterilmiştir [Macagnan et al., 2017]. Tablo 2.2'de ardışık kesikli reaktör kullanılarak karışık mikrobiyal kültür ile yapılan PHA biriktirme çalışmalarının bazıları verilmektedir [Çiftci, 2021].

Literatürde karışık mikrobiyal kültür, gerçek ve sentetik hammaddeler ve farklı zenginleştirme stratejileri (çökelme içeren ve içermeyen birleştirilmiş ve ayrılmamış sistemler) kullanılarak araştırılmıştır. Aktif çamur kullanılarak PHA üretimi fikri, PHA'nın aktif çamur prosesinde bir ara metabolik ürün olarak işletilmesi düşünülmüştür. PHA'nın özellikle anaerobik-aerobik aktif çamur işleminde veya Gelişmiş Biyolojik Fosfor Uzaklaştırma (EBPR) işleminde en önemli karbon depolama malzemelerinden biri olduğu kabul edilmiştir [Chua et al., 2003].

Tablo 2. 2: Farklı zenginleştirme stratejileri altında elde edilen biyokütle ile gerçekleştirilen biriktirme denemeleri.

MMC Kaynağı Ve Zenginleştirme stratejisi	Hammadde	Sonuçlar ^a
Aktif çamur, Çökmeden ADF	VFA karışımı ve laktat	Y _{PHA / S} : 0,05–0,45
Aktif çamur, Çökmeden ADF	Sodyum asetat	Maks. PHA: 69.00– 89.00
Bir nehir halicinden gelen su, ADF + deşarjdan önce çöktürme	Sodyum asetat, glikoz veya nişasta	Y _{PHA / S} : 0.60 Sodyum asetat / 0.54 Glikoz / 0.30 nişasta; Maks. PHA: 64.70 Sodyum asetat /60.50 Glikoz / 23.70 nişasta
Aktif çamur, Bolluk aşamasından sonra çökme olmadan ve çökme ile ADF	Sodyum asetat ve metanol karışımı	Maks. PHA: 48.00 yerleşmeden / 58.00- 70.00 yerleşmeden
Aktif çamur, ADF +bolluk aşamasından sonra çökme	Besin maddeleri açısından zengin fermente çamur	Y _{PHA / S} : 0,25–0,27; Maks. Alan sayısı Aşama: 17.00–39.00
Aktif çamur, ADF ayrıştırılmamış C ve N besleme stratejisi + bolluk aşamasından sonra çökme+ deşarjdan önce çöktürme	Endüstriyel meşrubat atıksu	Maks. PHA: 13.80

^a (Y_{PHA / S} (Cmmol_{PHA} / Cmmol_S); Maks. PHA'lar (ağırlıkça%); q_{PHA} (Cmmol_{PHA} / (Cmmol_X • h))).

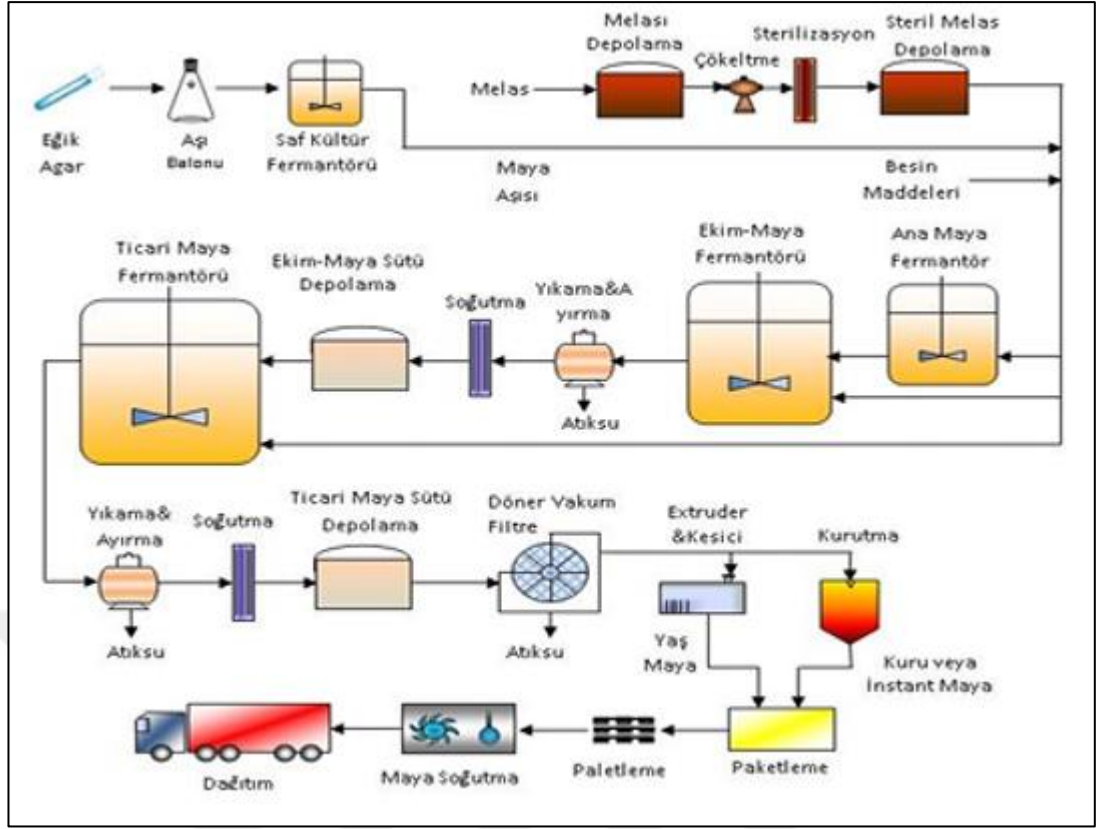
2.2.4. Maya Endüstrisi

İnsanların temel gıda maddesi olarak ekmeğe artan talep, destek maya endüstrisini geliştirmiştir. Maya endüstrisinde ana hammadde olarak şeker pancarı pekmezi kullanılmaktadır. Bu melaslar %45-50 artık şeker, %15-20 şeker olmayan organik maddeler, %10-15 kül (mineraller) ve yaklaşık %20 su içerir [Kalyuzhnyi, 2005]. Maya fermantasyonu sırasında pekmezin içerdiği şekerler karbon ve enerji kaynağıdır [Kobyas and Delipinar, 2008]. Ekmek mayasının yaklaşık olarak bileşimi tablo 2.3’de verilmiştir [Stone, 1998].

Tablo 2. 3: Ekmek mayasının yaklaşık olarak bileşimi.

Nem	% 2 -5
Ham Protein	% 50-52
Protein	% 42-46
Nükleik Asitler	% 6-8
Mineraller	% 7-8
Lipidler	% 4-7
Karbonhidratlar	% 30-37

Ekmek mayası üretiminde kullanılan başlıca hammaddeler saf kültür ve melas olup tipik bir ekmek mayası üretim fabrikası proses akış şeması Şekil 2.7’de verilmiştir.



Şekil 2.7: Tipik ekmek mayası üretim akış şeması.

2.2.5. Maya Endüstrisi Atık Suyundan PHA Üretimi

PHA üretimi için birçok atık su türü kullanılabilir de yüksek konsantrasyonlarda fermente edilebilir KOİ, nispeten düşük nitrojen ve katı konsantrasyonları ve düşük toksisite proses fizibilitesini artırır. Bu açıdan, gıda ve kâğıt endüstrisi atık suları, atık bazlı PHA üretimi için en uygun substratlar olarak kabul edilebilir [Tamis, et al., 2014].

Polihidroksibutirat (PHB), izole edilen ve üzerinde çalışılan ilk PHA polimeridir. Hem amorf hem de kristal fazları içeren doğrusal zincir yapıları nedeniyle, PHB'ler oldukça kristallidir. Saf polimerler veya kopolimerlerin ve karışımların bileşenleri olarak bulunabilirler [McAdam et al., 2020]. PHA üretimi esas olarak sentetik atık su kullanan sıralı kesikli reaktörlerde (SBR) yapılmıştır ve PHA'nın karışık kültürlerle sentezi ilk olarak biyolojik fosfor giderimi ile atıksu arıtma tesislerinde tespit edilmiştir [Serafim et al., 2008]. Daha sonra hem gerçek atık sular hem de sentetik ortam ve çeşitli zenginleştirme prosesleri kullanılarak, karışık mikrobiyal kültürler, konsolide ve ayrıştırılmamış sistemlerde, çökeltili ve çökeltisiz

olarak incelenmiştir [Yan and Row, 2006], [Phasakanon et al., 2014], [Argiz et al., 2020], [Bhalerao et al., 2020], [Albuquerque et al., 2010], [Chakravarty et al., 2010], [Khardenavis et al., 2007], [Tamang et al., 2019]. Bu çalışmalarda kuru biyokütle ağırlığının %72,6'sına kadar varan yüksek verimler elde edilmiştir [Tamang et al., 2019]. Bhalerao ve ark., mikrobiyal karışık kültür (MMC) ile PHA üretimi için maya atık suyunu (YWW) kullanmıştır. Evsel atık suyu, zenginleştirme reaktöründe sodyum asetat içeren sentetik bir ortamda aşılama olarak kullanmış olup ardından biriktirme reaktöründe YWW kullanarak kesikli ve sürekli beslemede sırasıyla %72 ve %65 PHA üretilmiştir [Bhalerao et al., 2020].

2.3. PHA Üretimine Stres Koşullarının Etkisi

PHA akümülatörlerinin zenginleştirilmesi, seçim reaktörüne uygulanan çalışma koşullarına bağlıdır. pH [[Villano et al., 2010] , organik yükleme oranları (OLR'ler) [Dionisi et al., 2006] ve besleme gibi çalışma koşullarının kültür seçimi ve PHA birikimi üzerindeki etkisini araştırmak için son yıllarda birçok çalışma sürdürülmektedir. [Villano et al., 2014], [Li et al., 2021]. Bu çalışma koşullarıyla karşılaştırıldığında, oksijen girişi, aerobik süreç boyunca büyük miktarda enerji gerektiğinden, PHA üretimi süreç maliyetiyle daha doğrudan ilişkilendirilmektedir [Hao et al., 2017].

Çoklu UYA'lar (asetat, propiyonat, bütirat ve valerat) içeren fermente endüstriyel atık suyun yaygın kullanımıyla, substrat bileşimi, mikrobiyal toplulukların zenginleştirilmesini ve PHA üretim performansını belirleyen çok önemli bir faktör haline gelmektedir [Hao et al., 2017].

2.3.1. Çamur Yaşı Etkisi (SRT)

Çamur yaşı teorik olarak ortalama mikrobiyal yaşam süresini ve dolayısıyla mikrobiyal popülasyonu belirler. Kısa SRT çamurunun daha yüksek PHA üretim kabiliyetine sahip olmasının yanı sıra, PHA üretim amacı için kısa SRT ile çamur aklımasyonu da tercih edilebilir. Bunun nedeni, daha kısa bir SRT altındaki çamur veriminin, daha uzun bir SRT'dekinden daha yüksek olmasıdır. Bu nedenle, kısa bir

SRT ile çalıştırılan aktif çamur prosesi, uzun bir SRT'ye kıyasla PHA üretimi için yeterli miktarda çamur sağlayabilir [Chua et al., 2003].

Coats ve ark., 2017 yılında Kâğıt hamuru ve kâğıt fabrikası kondense suyu ile yapılan bir çalışmada, 4 veya 6 günlük SRT ile aerobik bolluk-kıtlık AKR'leri beslenmiş ve 4 günlük SRT'de zenginleştirilmiş kültürün ortalama PHA içeriği 6 günlük SRT'dekinden daha yüksek olduğu bulunmuştur [Coats et al., 2007]. Yüksek biyokütle verimlerine ulaşmak için potansiyel bir ticari PHA üretim sürecinde SRT'nin daha düşük olması uygundur. 1 günlük SRT daha önce başarıyla uygulanmıştır [Dionisi et al., 2006] ve ayrıca bu SRT, PHB üreten bir kültürü zenginleştirmek için de uygun görülmüştür [Johnson et al., 2009]. 0,5 günlük SRT'de nitrojenle sınırlı kültür, önemli biyofilm oluşumu nedeniyle sorunlara neden olmakta ve zamanla PHB depolama kapasitesinin çoğunu kaybetmektedir. Karbon sınırlama koşulları altında 0,5 günlük SRT'de bir AKR'yi çalıştırmak için daha sonraki bir aşama için girişimde bulunulduğunda da zenginleştirilmiş kültür çok düşük bir PHB depolama kapasitesi gösterebilmektedir [Johnson et al., 2010].

PHA üretiminde önemli olan mikroorganizmaların depolama ve büyüme hızlarını kontrol edebilmektir. Çamur yaşı doğrultusunda PHA depolama miktarları değişmektedir. Birçok çalışmada çamur yaşı 10 gün olarak ayarlanmıştır [Serafim et al., 2008] [Albuquerque et al., 2010]. Fakat çamur yaşının yüksek olması yeni biyokütle üretiminin azalmasına sebep olmuştur. Yüksek çamur yaşlarında çalışan sistemlerin, düşük çamur yaşlarında çalışan sistemlere göre daha düşük depolama verimine sahip olduğunu göstermiştir [Chua et al., 2003]. Chua ve ark. 2003 yılında yaptıkları çalışmada evsel atıksuların PHA biyopolimerlerini depolama verimlerinin çamur yaşı 3 günde çamur yaşı 10 günden daha iyi olduğunu göstermiştir [Chua et al., 2003]. Çalışmalar kapsamında farklı çamur yaşlarının kullanılacak sisteme ve atıksuya uygunluğu araştırılmaktadır. Çamur yaşının optimizasyonu PHA biyopolimerlerinin maksimum üretiminin ve sistem enerjisinin optimizasyonu için önemlidir.

2.3.2. Döngü Süresi Etkisi

Sabit bir SRT ile birlikte, uzun bir döngü uzunluğu, ziyafet aşamasının sonunda daha yüksek bir PHB içeriği ile sonuçlanır. Buna katkıda bulunan iki faktör vardır: Bir yandan, döngü başına beslenen substrat miktarı artar ve reaktörde döngü

başlangıcındaki biyokütle konsantrasyonu, döngü uzunluğunun uzatılmasıyla (veya SRT başına döngü sayısının en aza indirilmesiyle) azalır. Sonuç olarak, substratın biyokütleyle oranı artar ve daha fazla PHB sentezine yol açar. Öte yandan, kıtlık aşaması uzar. Hücreler, uzun süreli kıtlık evresinde hayatta kalabilmek için daha fazla PHB'ye ihtiyaç duyar. Her iki yön de, yüksek substrat alım hızına ve yüksek depolama kapasitesine sahip mikroorganizmaların seçimini yoğunlaştırır. Bu nedenle, SRT başına döngü sayısı, bir mikrobiyal topluluğun etkili bir şekilde zenginleştirilmesi için yararlı bir seçim baskısı olarak önerilmektedir. [Chua et al., 2003] Döngü uzunluğunun PHA üretimi üzerindeki etkisi seyrek olarak incelenmiştir. Çoğu grup, deneylerinde SRT başına nispeten çok sayıda döngü kullanır, bu da ziyafet aşamasında düşük miktarda PHB birikmesine yol açar [Villano et al., 2010].

Zheng ve diğerleri, yaptıkları çalışmada döngü sürelerini (CL) 12, 24 ve 48 saat olacak şekilde belirlemişler ve en yüksek PHB depolamasının 48 saatlik döngü süresinde gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca MLSS konsantrasyonunun, diğer CL'lere kıyasla CL 48 saat olduğunda daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. CL değerleri F/F değerlerinden etkilendiği için CL değerleri artarken F/F değerlerinin düşmesi PHA sentezini etkileyen önemli bir parametre olarak görülmektedir [Vjayan and Vadivelu, 2017], [Huang et al., 2018]. Zheng ve diğerleri (2021) tarafından yapılan çalışmalarda da aynı sonuçlara ulaşılmış ve mikroorganizma karışımlarının lifsi olmayan bakterilerinin şişmesi nedeniyle PHA dönüşüm oranı ve PHA içeriğinin 12 saatte hep düşük seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Öte yandan CL, bakteri kültürü davranışını etkileyebilmektedir [Freches and Lemos, 2017], daha kısa döngü uzunluğunun karbon depolamasını değiştirdiğini belirtmiş ve glikoz biyopolimeri biçimindeki karbon depolamanın HB birikiminden 2 kat daha yüksek verim elde edilmesi ve 3 kat daha hızlı birikim oranı daha kısa döngü uzunluklarında gıdanın mikroorganizmalara (F/M) oranındaki düşüşün PHB'den ziyade glukoz biyopolimerini arttırdığını da bulmuşlardır [Kleerebezem et al., 2012].

2.3.3. Bolluk/Kıtlık Fazı Etkisi

Yapılan çalışmalar sonucunda aerobik atıksu arıtma tesislerinde önemli derecede PHA depolama kapasitesi fark edilmiştir. Fakat bu ortamlarda çalışan mikroorganizmaların PHA'yı normal koşullarda saklaması mümkün değildir. Bununla

birlikte, substratı sınırlayarak bakteriler stres koşulları oluşturulduğunda PHA depoladıkları görüldüğü için daha fazla karbon verilerek daha az kıtlık koşulları sağlanmaktadır [Lemos et al., 2008]. Uzun süre substrat yokluğu olan bakterilerde hücre büyümesini sağlayan enzim ve RNA sayısında azalma olmaktadır. Uzun bir kıtlık evresinden sonra, büyük miktarda karbon bakterinin ortamına girdiğinde, bakterilerin büyümesini sağlayan enzim, hücre büyümesine izin vermek için yeterli gelmemekte ve hücre, gelen karbon ve amonyağı depolamaya başlamaktadır. PHA depolama, enzim veya RNA eksikliği nedeniyle bakteri hücrelerinde başlamaktadır. Bu duruma bolluk fazı olarak adlandırılmaktadır. Besin miktarındaki azalma, kıtlık fazının başladığına işaret etmekte olup daha önce depolanan PHA bu süreçte tüketilmeye başlamaktadır [Serafim et al., 2008].

Bolluk ve kıtlık döneminin uzunluğu arasındaki oran (F/F oranı), seçim aşamasının performansını etkileyen çok önemli bir parametredir [Liu et al., 2011]. Genel olarak, düşük F/F oranı, karışık mikrobiyal kültürde PHA depolayabilen mikroorganizmaların seçilmesini ve bolluk aşamasında PHA sentezine fizyolojik adaptasyonunu sağlamaktadır [Albuquerque et al., 2010].

Bolluk ve kıtlık koşulları altında seçilen bakterilerin yüksek PHA depolama kapasitesi, son 10 yılda yayınlanan çok sayıda çalışmada tartışmasız bir şekilde kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, bazı çalışmalar PHA'nın karışık kültürler tarafından depolanmasının herhangi bir dış veya iç büyüme sınırlaması olmaksızın gerçekleştiğini göstermiştir [Dionisi et al., 2004]. Birçok çalışmada bu gerçeği desteklemek için fazla besinler ve fizyolojik hücre adaptasyonu için yeterli deney zamanı kullanıldı. PHA biriktirme kapasitesine sahip bakteriler seçildikten sonra, eş zamanlı olarak PHA'yı depolayabildikleri bilinmektedir. PHA'nın eşzamanlı depolanması ve harici bir sınırlama olmaksızın büyüme, *Alcaligenes latus* [Grothe et al., 1999] ve *Azotobacter vinelandii* UWD [Macagnan et al., 2017] gibi saf kültürlerde yaygın olarak bulunur.

2.3.4. Organik Yükleme Hızı Etkisi (OLR)

Seçim aşamasının diğer bir amacı, PHA depolayan kültürü mümkün olan en yüksek verimlilikte çalıştırmak, yani reaktörün birim hacmi ve birim zamanda üretilen biyokütle miktarını elde etmektir [Villano et al., 2014]. Organik yükleme hızı yapılan

çalışmalarda PHA depolama sürecini belirli bir seviyeye kadar arttıran bir etken olarak görülmüştür. Biyokütlenin daha yüksek hacimsel üretkenliklere ulaşabilmesi için, AKR 'nin mümkün olduğunca yüksek organik yük oranında (OLR) çalıştırılması gerekir, bu da yüksek giriş substratı konsantrasyonuna ve kısa hidrolik tutma süresine (HRT) karşılık gelir [Villano et al., 2014].

Yapılan bazı çalışmalar, düşük F/F oranının ve iyi PHA depolayan mikroorganizma seçiminin 8.5 g KOİ/L.gün'e kadar yüksek OLR'de istikrarlı bir şekilde elde edilebileceğini göstermiştir [Villano et al., 2010]. Bu durumda prensip olarak, yüksek oranda uygulanan OLR, zeytinyağı değirmeni atıksuları [Bertin et al., 2010] gibi yüksek KOİ içeriğine sahip atıksuyun çok az seyreltme veya hiç seyreltme olmaksızın hammadde olarak kullanılmasını mümkün kılar. Buna karşın daha yüksek OLR'de kararsız veya zayıf performans gözlemlendiği de gösterilmiştir [Dionisi et al., 2006]. Başka bir çalışmada da beslenen 1,165 mgKOİ/L için her bir günlük çevrimde %20-27 g KOİ/g UAKM kadar KOİ eşdeğeri PHA üretim potansiyeli gözlenirken, aynı çalışmada konsantre beslenen akımda 18,560 mgKOİ/L için günlük çevrimde %8,6 g KOİ/g UAKM kadar KOİ eşdeğeri PHA üretim potansiyeli olduğu görülmüştür [Güventürk, 2019].

2.3.5. pH Etkisi

pH yapılan biyolojik çalışmalarda devamlı kontrol edilmesi gereken bir parametre olmuştur. Gelen atıksuyun içeriği bakımından asidik şartların oluşması sistem performansı için istenmeyen bir durumdur. Bu sebeple pH yapılan tüm deneylerde nötral seviyelerde tutulmuştur [Chen et al., 2013].

Çamurun PHA üretim kapasitesi üzerindeki pH etkilerine ilişkin daha fazla fikir edinmek için daha fazla araştırma yapılması beklenmektedir. Adeline ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada SBR-B1(pH 7) çamuru, çamur kuru ağırlığının yaklaşık %26–30'una kadar PHA biriktirirken, SBR-B2 (pH 8) çamuru %24–32'ye kadar PHA içeriği elde etmiştir [Chua et al., 2003]. Bununla birlikte, seçilen bir aktif çamur prosesinin pH'ının 7 ile 8 arasında olması durumunda, PHA biriktiren mikroorganizmaların zenginleştirilmesinde pH kontrolünün kritik olmadığı sonucu çıkarılabilir [Villano et al., 2010]. Bizim çalışmamızda pH'a müdahale edilmeden kendi pH (7-9) aralığında aerobik sistem çalıştırılmıştır.

2.4. Deneysel Tasarım

2.4.1. İstatiksel Deney Tasarımı

Varyans analizinde önemli olan çok seviyeli modellerde birçok değişkene bağlı deneysel sonuçların bir arada yorumlanmaktadır. Kısaca ANOVA olarak bilinen varyans analizi, nicel ölçümleri kapsayan ve deneysel verilerin analizinin bir tekniği olmaktadır. ANOVA ile elde edilen önem seviyeleri (anlamlılık düzeyi) sayesinde verilerin ne oranda güvenilir olduğu hakkında bilgi verilmektedir. Bununla anlamlılık düzeyleri deneylerden önce belirlenebilmektedir [Dargahi et al., 2017]. ANOVA’da anlamlılık düzeyinin 0.05 ve 0.01 aralığında olması tercih edilmekte bu da hata yapma olasılığı %1-5 aralığında olduğunu göstermektedir. ANOVA’da kurulan modele ait keyfi bir anlamlılık düzeyi seçilmekte (tahin edilen) ve anlamlılık düzeylerine göre hazırlanmış F tablolarında serbestlik derecelerinin kesişim noktasında bulunan F oranı değerleri ile kıyaslanmaktadır. F oranı, ANOVA tablosunda model varyansının hata varyansına oranını ifade etmektedir. Modelin geçerliliği hesaplanan ve Ftablo değerleriyle kıyaslama yapılmaktadır. Modelin geçerli olabilmesi için $F_{hesaplanan} > F_{tablo}$ olmalıdır [Çebi, 2018].

2.4.1.1. Varyans Analizi

Varyans Analizi (veya ANOVA, İngilizce ANalysis Of VARIance sözcüklerinin kısaltması) istatistik bilim dalında, grup ortalamaları ve (gruplar içi ve gruplar arası varyasyon gibi) bunlara bağlı olan işlemleri analiz etmek için kullanılan bir istatistiksel modeller bütünüdür [Ever, 2005]. Varyans Analizi kullanılmaktayken belirlenmiş bir değişkenin gözlemlenen varyansı farklı değişim kaynaklarına dayandırılabilen varyans bileşenine ayrılmaktadır. En basit şekliyle varyans analizi birkaç grubun ortalamalarının birbirine eşit mi eşit değil mi olduğunu sınamak için bir çıkarımsal istatistik sınaması olmakta ve bu sınama iki grup için yapılan t-test sınamasını çoklu gruplar için genelleştirmektedir. Eğer, çoklu değişkenli analiz için birbiri arkasından çoklu iki örneklemlerle t-testi yapmak istenirse bunun I. tip hata yapma olasılığını artırma sonucu doğurmaktadır. Bu nedenle, üç veya daha fazla sayıda gruplar veya değişkenler

için ortalamaların istatistiksel anlaşılabilirliğini sınama ile karşılaştırılması için Varyans Analizlerinin daha faydalı olacağı bilinmektedir [Borrer et al., 2018].

Dengeli veriler için klasik varyans analizi üç değişik şeyi aynı anda yapmayı amaçlamaktadır;

- Veri açıklama analizi: Varyans analizi toplamalı verilerin ayrışımın organize edilmesidir. Bunun karesel toplamı ayrışımın her bileşenin varyansını (yahut eşit anlamalı olarak bir lineer modelin terimlerini) göstermektedir.
- Ortalama karelerin karşılaştırılması: F-sınamaları ile... modellerin iç-içine geçmiş ardışıklık olarak sınanmasını sağlama.
- Varyans analizi ile çok yakın ilişkili olarak bir lineer modelin katsayı kestirimleri ve standart hataları ile verilere uygulanması [Islam et al., 2014].

2.4.1.2. Tam Faktöriyel Deney Tasarımı

Deneyisel çalışmalarda, belirlenen parametrelerin en az deney sayısı ile sonuç değişken üzerine etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacıyla deneyel tasarım teknikleri kullanılmaktadır. Bağımlı değişkeni etkilediği düşünülen bağımsız değişkenler farklı seviyelerde ele alınarak etkileri incelenmektedir. İyi bir deney tasarımı, temel ilkelere bağlı bir şekilde basit, esnek, sağlam ve tasarlanan modelin uygunluğunu denetleyen kontrollere sahip olmalıdır [Din et al., 2014].

Deneyisel çalışmalarda birden çok faktörün farklı seviyelerde ele alınarak etkilerinin incelenebildiği tasarımlardır. Tam faktöriyel yöntemine göre deney sayısı,

$$N = n^k \quad (2.1)$$

(N: deney sayısı, n: seviye sayısı, k: parametre, faktör, değişken sayısı)

2.1 eşitliğindeki formülde hesaplanmaktadır. Tam faktöriyel deney tasarımı; çok boyutlu bir yöntem olması, fonksiyonların lineerliğinin araştırılması ve faktörlerin karşılıklı etkileşimlerinin bağımlı değişkene olan etkisinin bulunarak sistem üzerinde ekonomik yönden değerlendirme yapma olanağı sağlaması yönünden avantajlı bir tasarım yöntemi olmaktadır. Bununla birlikte proseslerin maliyetlerinin azaltılması, kalitenin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi sağlanabilmektedir. Aynı zamanda tam

faktöriyel tasarımda yüksek seviyeli etkileşimler istenmediği durumlarda ya da sadece düşük seviye etkileşimler ve temel etkiler incelenmek istendiğinde daha az sayıda deney yapılması uygun görüldüğünde kesirli faktöriyel tasarımlar kullanılabilir [Philip et al., 2007].

2.4.1.3. Cevap Yüzey Yöntemi (RSM)

RSM, optimizasyon metodunun temeli ilk olarak 1951 yılında Box ve Wilson tarafından ortaya atılmaktadır. Box ve Wilson RSM' nin temelini oluşturan eleme (screening), bölge araştırma (steepest ascent), ürünün karakterize edilmesi ve optimizasyonunu kapsayan bir seri deneme felsefesini ortaya koymaktadır.

RSM bilimsel ve endüstriyel alanlarda en çok kullanılan yöntem olarak ön plana çıkmakta olup bu yöntemle istatistiksel ve matematiksel veriler birlikte değerlendirilmekte ve optimum deney şartları belirlenmektedir. [Uzunoğulları, 2010]. Sonuçlar üç boyutlu grafik halinde veya kontur haritası şeklinde ifade edilmektedir. Az sayıda deneysel kombinasyonla gerçekte test edilmeyen faktör değeri ve bunların kombinasyonları hakkında tahmin yapılabilmektedir [Myers and Montgomery, 1995].

RSM'nin ilk aşamasında, birtakım fikirler öne sürülmekte ve sistemi karakterize edebilecek performans ölçüleri (cevap) ve cevaplar üzerinde etkili olan faktörler belirlenmektedir. Bu faktörlerin çok olması halinde ön denemelerde faktörlerin istatistiksel olarak en önemli olanları seçilmektedir. Bu işlem "eleme (screening)" olarak adlandırılmakta ve ilerleyen aşamalarda daha fazla deney yapılmasını engellemektedir. Böylece zaman ve maliyet kazanımı sağlanmış olmaktadır.

İki basamaktan oluşan RSM'nin birinci basamağında cevabın değişkenlere bağlı fonksiyonu birinci dereceden bir polinomu ifade etmektedir [Myers and Montgomery, 2002].

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_kx_k + \varepsilon \quad (2.2)$$

Formülde yer alan y = cevap (bağımlı değişken), β_1 = regresyon katsayısı, x_1 = bağımsız değişken ve ε = deneysel hata değerlerini ifade etmektedir.

RSM'nin ikinci aşamasında ise, bağımsız değişkenlerin deneme bölgesi (region of interest) içerisinde belirlenen seviyelerinin sistemin cevabında oluşturdukları

değerin, optimum noktaya yakın sonuçları verip vermediği amaçlanmaktadır. Optimum noktaya yaklaştıkça, oluşturulan cevap yüzeydeki eğrilik daha belirgin hale gelmektedir.

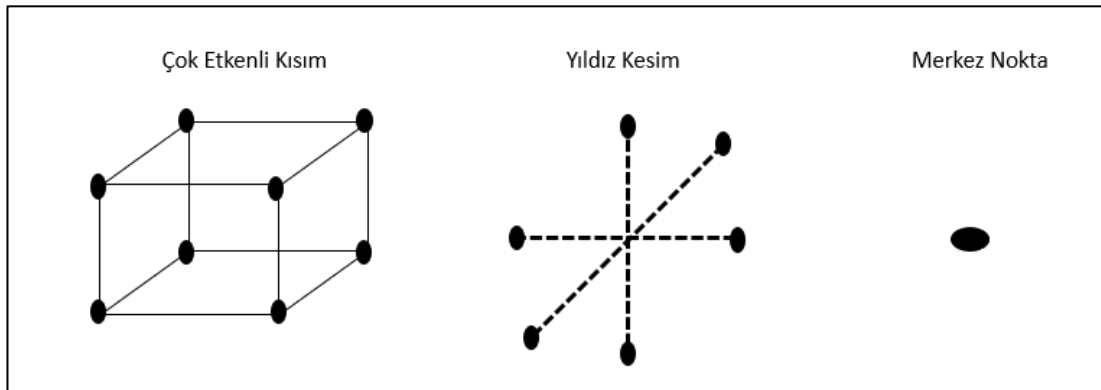
2.4.1.4. Merkezi Kompozit Yüzey Tasarımı (Central Composite Design, CCD)

Merkezi kompozit deneysel tasarım modeli yönteminde iki faktöriyel nokta mevcut olup bunlar, aksel noktalar (α) ve merkez noktalarıdır. Yöntemin iki faktöriyel noktaları, bir faktörün + (en yüksek) veya - (en düşük) düzeylerinden oluşur. Aksel noktalar, deneycinin belirlediği iki düzey noktalarının daha ötesinde olan program tarafından eşitlik 2.3 ile belirlenen $+\alpha$ ve $-\alpha$ değerlerdir.

$$A = 2k/4 \quad (2.3)$$

Formülde k çalışılan değeri bağımsız değişken sayısını ifade etmektedir. Merkezi kompozit tasarım modeli üç kısımdan oluşmaktadır. Şekil 2.8' de merkezi kompozit tasarımının kısımları verilmiştir [Subaşı, 2010,].

Eşitlik 2.3'de k faktör sayısı olmak üzere $2k$ faktöriyel ya da $2k-m$ kesirli faktöriyel tasarımı ifade etmektedir. Faktör seviyeleri -1 ve $+1$ değeri ile kodlanmaktadır. Bu tasarımın faktöriyel parçası olarak adlandırılmakta olup n_0 adet merkez noktası ($n_0 \geq 1$) ve her bir tasarım değişkeninin akseni üzerinde, merkeze uzaklığı α olan iki yıldız veya aksel noktası bulunmaktadır. Bunlara da yıldız parçası veya aksel parçası denilmektedir.



Şekil 2 8: Merkezi kompozit tasarımının gösterimi.

Burada toplam tasarım noktası sayısı $N=2k + 2k + n_0$ ifadesi ile hesaplanır. Deneysel tasarım için kaç tane deneyin yapılacağı aşağıdaki eşitliklere göre belirlenir.

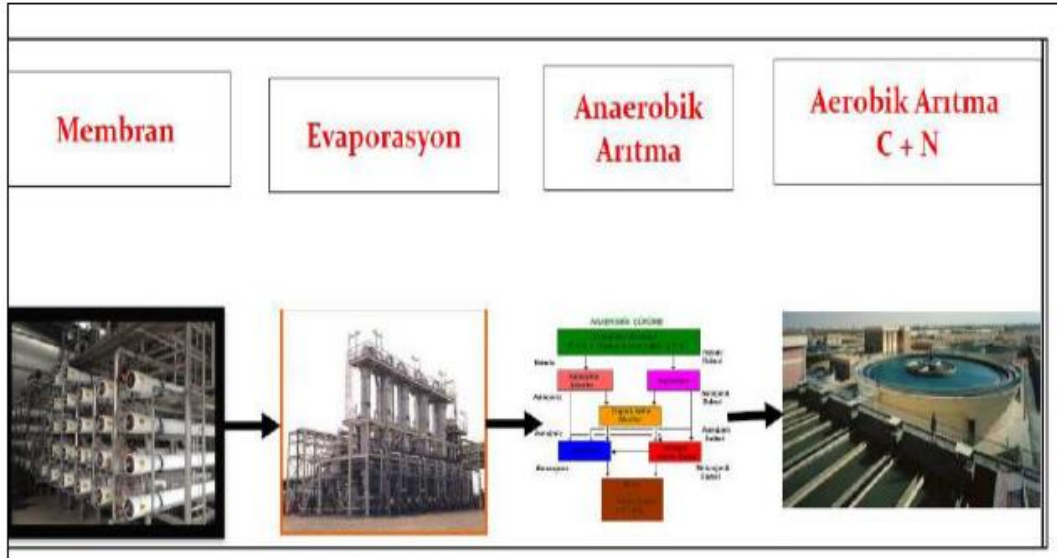
Bu eşitliklerde; N = deney sayısını, n_0 = merkezdeki deney sayısı ve k = bağımsız değişken sayısını göstermektedir [Youssef, 1994].



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Atık su ve Çamur Karakterizasyonu

Laboratuvar ortamında yürütülen deneysel çalışmada aşı için kullanılan aktif çamur ve karbon kaynağı olarak kullanılan atıksu; Kocaeli’nde bulunan PAKMAYA maya üretim fabrikasının aerobik arıtma tesisinden karışık mikroorganizma içeren aktif çamur ve anaerobik arıtma tesisinden karbon kaynağı olarak kullanılmak üzere atıksu, alınmıştır. PAKMAYA atıksu arıtım tesisindeki arıtma sistemleri Şekil 3.1’de gösterilmektedir [Çiftçi, 2021]. Anaerobik arıtmalarda hidroliz, asidogenez ve metan evresi olmak üzere 3 aşama gerçekleşen anerobik sistemin yani fermantasyon sisteminin asidogenez evresi yüksek uçucu yağ asitlerine sahip olup bu organik karbonlu yapılar aktif mikroorganizmalar tarafından besin olarak kullanılır ve mikroorganizmalar hücresel faaliyetleri dışındaki fazla karbonu PHB olarak depolarlar. Bu sebeple laboratuvar ortamında fermantasyon ünitesi kurulmamış olup PAKMAYA tesisinden alınan anaerobik atıksu polimer üretimi için mikroorganizmalar tarafından besin kaynağı olarak kullanılarak atıksudan polimer geri kazanımı sağlanmıştır.



Şekil 3.1: PAKMAYA atıksu arıtma tesisi.

Maya endüstrisi anaerobik atıksuyunun tercih edilme sebebi yüksek değerli KOİ ve UYA konsantrasyonları içermesidir. Kullanılan atıksu konsantrasyonu Tablo 3.1 'de verilmiştir.

Tablo 3. 1: Maya endüstrisi anaerobik atıksu karakterizasyonu.

Parametre	Birim	Değer
pH		7,5-7,88
KOİ	mg/L	2500-3430
ΣN	mg/L	100-200
PO_4^{-3}	mg/L	20-40,6
ΣP	mg/L	6,7-21,9
AKM	mg/L	450-500
ΣUYA	mg/L	950-1000

3.2. Deney Düzenegi

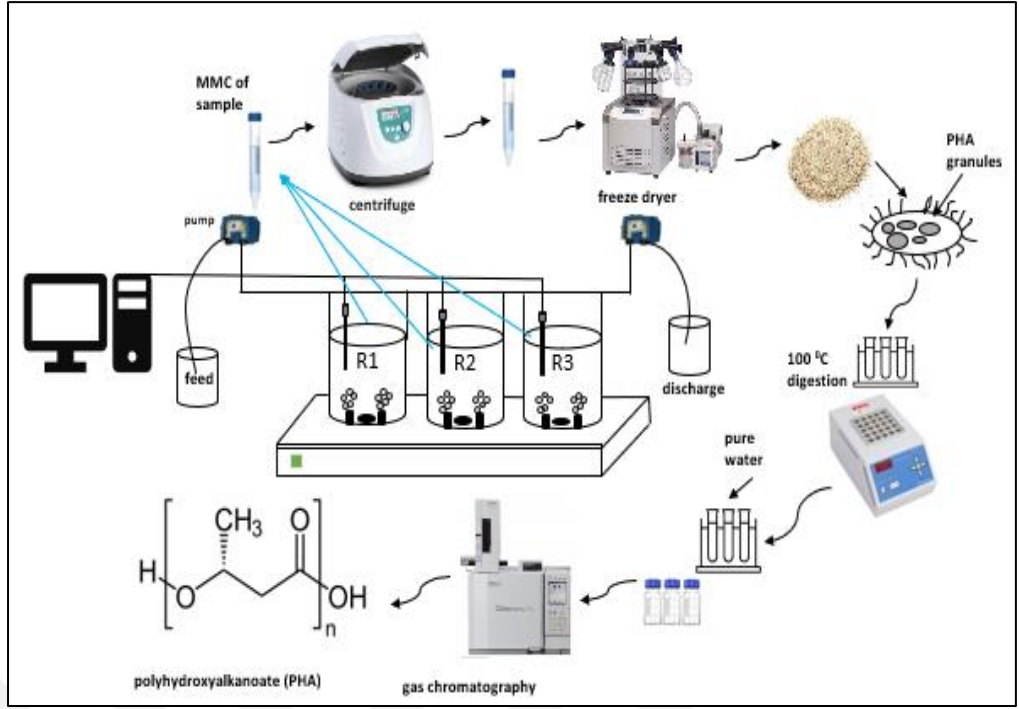
3.2.1. Ardışık Kesikli Reaktör (AKR)

Mikroorganizmanın uçucu yağ asitlerini bünyelerinde polihidroksialkanoatlara dönüştürebilmesi için zenginleştirme ve biriktirme aşamalarından geçmesi gerekmektedir. Bunun için laboratuvar ortamında ilk aşamada karışık mikroorganizma kültüründe PHB depolayan türün zenginleştirilmesi Şekil 3.2'de 800 mL hacimde 6 günlük çamur yaşında 3 tane eş zamanlı ardışık kesikli reaktörün 90 gün işletilmesi ile gerçekleşmiştir. Şekil 3.3'te PHB üretim aşaması şematize edilmiştir.



Şekil 3.2: Laboratuvarda işletilen aerobik sistem.

Şekil 3.3’de 3 farklı reaktör eş zamanlı çalıştırılmış olup 24 saatlik bir döngüde 6 günlük çamur yaşı ve günlük organik yükleme miktarı 0,5 g/L olacak şekilde sıralı kesikli reaktörde 90 gün boyunca dengeye gelene kadar işletilmiştir. AKR sisteminin işletimi her bir sistem için besleme, havalandırma, son çöktürme ve boşaltma olmak üzere 4 kısımdan oluşmakta olup bu işlemler manuel yapılmıştır. Besleme ve boşaltma pompaları (SİSTOZ PRS 2) ve havalandırma laboratuvar ortamındaki hava hatlarından gelen havanın difüzörler yardımıyla sisteme verilmesiyle sağlanırken son çöktürme olayı sistemdeki manyetik karıştırıcı (marka) ve havanın manuel kapatılmasıyla gerçekleşmiştir. Reaktörlerde çözülmüş oksijen (Hamilton, VisiWater DO P Arc 120 FC10) ve pH propları otomatik olarak ölçülmüştür. AKR sistemi dengeye gelene kadar her gün 3 dk 0,5 g/L besin içeren atıksuyla beslendikten sonra 1407 dk havalandırılarak işletilen sistem günün sonunda çökelme süresi 30 dk olacak şekilde işletilmiştir.



Şekil 3.3: Karışık mikroorganizma kültüründen PHB eldesi.

AKR sistemi 90 günün sonunda dengeye gelmiş ve biriktirme aşamasında mikroorganizmalar için optimum PHB depolama kapasitesinin belirlenmesinde 3 farklı parametre; SRT (2, 4, 6 gün), OLR (0.5, 1.0, 2.0 g/L.gün) ve döngü (0.5, 1.0, 2.0) çalışılıp sistemin modellenmesi STAT-EASE sürüm 11(Inc., Minneapolis, ABD) yapılmıştır.

Her sistemden ne kadar aktif çamur atılacağı çamur yaşına bağlı olarak eşitlik 3.1'de hesaplanmıştır.

$$Hacim (L) = \frac{KOİ \text{ konsantrasyonu } \frac{g}{L} \times debi \frac{L}{gün}}{OLR \frac{g}{L.gün}} \quad (3.1)$$

3.3. Proses Takip Parametreleri

Proses takip parametrelerine bağlı olarak çamur yaşını ayarlamak için farklı hacimler hesaplanıp sistem havalanırken birkaç farklı süreden biyokütle alınmış ve alınan numunelerin AKM, UAKM, KOİ, TN, TP, UYA ve PHB parametrelerine bakılmıştır. Çözünmüş oksijen takibine bağlı olarak kıtlık/bolluk süreleri hesaplanmış

ve kıtlık evresinin başında PHB depolama kapasitesinin maksimum olduğu görülmüştür.

3.3.1. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ)

Kimyasal Oksijen İhtiyacı tayinleri kapalı reflux titrimetrik metodu ile yapılmıştır. Gerekli seyreltmeler uygulanarak 2,5 mL numune hacmi ile çalışılmıştır. Numuneye 1,5 mL Standart potasyum dikromat çözeltisi ve 3,5 mL Sülfürik asit reaktifi eklenerek karışımın reaksiyona girmesi için Şekil 3.4'te görülen termoreaktörde 150°C sıcaklıkta 2 saat bekletilmiştir.



Şekil 3.4: KOİ tayini için termoreaktörü.

Oda sıcaklığına getirilen numuneler birkaç damla Ferroin indikatör çözeltisi eklendikten sonra 0,025 N Standart demir amonyum sülfat çözeltisi ile titre edilerek sarfiyat not edilmiştir ve Eşitlik 3.2 ile hesaplama yapılmıştır.

$$KOİ \text{ (mg/L)} = \frac{(A-B) \times M \times 8000}{\text{numune hacmi (mL)}} \quad (3.2)$$

- A: Şahit için demir amonyum sülfat sarfiyatı.
- B: Numune için demir amonyum sülfat sarfiyatı.
- M: Demir amonyum sülfat çözeltisinin molaritesi.

3.3.2. Askıda Katı Madde (AKM) ve Uçucu Askıda Katı Madde (UAKM) Tayinleri

Askıda Katı Madde ve Uçucu Askıda Katı Madde tayinleri için 1,20 µm gözenek çapı olan GVS marka filtreler kullanılmıştır. AKM deneyinde önceden darası alınan filtre kâğıdından geçirilen numuneler etüvde 1 saat 105°C de kurutulup sonrasında 10 dakika desikatörde bekletildikten sonra tekrar tartılarak hesaplamalar yapılmıştır. UAKM deneyinde ise AKM tayini yapılan filtre kâğıtları kül fırınında 1 saat 550°C de yakılarak tartılmış ve sonuçlar not edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki formüller (Eşitlik 3.3 ve Eşitlik 3.4) ile hesaplanmıştır. Böylece reaktör içindeki askıda katı maddelerin ne kadarının canlı organizma olduğu tespit edilmiştir.

$$AKM \text{ (mg/L)} = \frac{B - A(\text{mg})}{V(\text{mL})} \times 1000 \quad (3.4)$$

$$UAKM \text{ (mg/L)} = \frac{C - D(\text{mg})}{V(\text{mL})} \times 1000 \quad (3.5)$$

- A: filtrenin tartımı (mg).
- B: 105°C de 1 saat yakma sonrası filtrenin tartımı (mg).
- C: B + tartım kabı (mg).
- D: 550°C’de 1 saat yakma sonrası kalıntı + tartım kabı (mg).
- V: süzülen numunenin hacmi (ml).

3.3.3. Toplam Azot (TN) ve Toplam Fosfor (TP)

Toplam Azot ve Toplam Fosfor tayinleri için hazır deney kitleri kullanılmıştır. Analizler Şekil 3.5’teki Merck Spectroquant® Prove 300 Uv/Vıs Spektrofotometre cihazında ve aynı markanın test kitleri ile yapılmıştır.



Şekil 3.5: Spektrofotometre cihazı.

3.3.4. Uçucu Yağ Asitleri (UYA)

Uçucu yağ asidi ölçümleri Gaz Kromatografi-Alev İyonlaştırma Detektörü (GC-FID) (AGILENT) cihazında yapılmıştır. Reaktörlerden zamana bağlı numuneler alındı ve santrifüjlenen bu numunelerin duru fazı 0,22 μm 'lik şırınga filtreden geçirildi. Filtrelenen numunelerin üzerine %4'lük HCl çözeltisi ve internal çözeltisi olarak kullanılan pentanolden 0,1 mL ilave edildi. 1,5 mL'lik viallerin içinde hazırlanan numuneler karbon wax kolonunda (QUADREX 007-CW-30V-1,0 240 $^{\circ}\text{C}$), başlangıç fırın sıcaklığı 110 $^{\circ}\text{C}$ 'den 240 $^{\circ}\text{C}$ 'ye 15 dakikada çıkacak şekilde 2 rampadan oluşan sıcaklık derecelerinde gaz kromatografisinde analiz edildi.

3.3.5. Polihidroksibütirat Tayini (PHB)

PHB tayini için gaz kromografisi ve solvent ekstraksiyonu olmak üzere 2 farklı analiz yöntemi kullanılmıştır. Analiz için çözünmüş oksijen takibiyle paralel olarak oksijen doygunluğuna ulaştığı zamana kadar ilk yarım saat 15 dakikada bir sonraki 1 saat 30 dakikada bir sonrasında ise 60 dakikada bir olmak üzere 15 ml'lik numuneler alındı ve santrifüjde 9000 RPM'de 5 dakika çöktürülmüştür. Duru faz rutin analizler için ayrılarak kalan çamur buzlukta bekletilmiştir. Daha sonra soğutulan çamurlar CHRIST- ALPHA 1-2 LD marka liyofilizatörde (Şekil 3.6) 1 gün boyunca -55 $^{\circ}\text{C}$ 'de soğuk hava basıncı ile kurutulmuştur. Yüksek ısının polimer yapısına zarar vereceği düşünüldüğü için etüvde kurutmak yerine bu yöntem tercih edilmiştir.



Şekil 3.6: Liyofilizatör cihazı.

Liyofilizatörde tamamen kurumuş olan çamur Şekil 3.7’de kuru biyokütle dediğimiz kuruluğa gelmiş ve Gaz Kromatografisi cihazında analiz edilmek üzere hazırlanmıştır. 5 mg tartılan kuru biyokütleler sızdırmaz cam tüplere alınarak üzerine 2 mL kloroform ve 2 mL parçalama çözeltisi eklenmiştir.



Şekil 3.7: Liyofilize edilmiş çamur.

Hazırlanan tüpler 100°C termoreaktörde 3,5 saat reaksiyona sokulmuştur [Tamang, 2019]. Oda sıcaklığına gelen numunelere 2 mL ultra deiyonize su eklendi ve vortekte 1 dk karıştırıldıktan sonra faz ayırımının oluşması beklendi. Faz ayırımından sonra altta kalan faz cam pastör pipetleri yardımıyla süzdürülerek viallere aktarılmıştır.

Viallere alınan numuneler AGİLENT 6890, (United States) marka FID dedektörlü Carbon Wax Kolon kullanılarak Şekil 3.8’de Gaz Kromatografi cihazında oluşturulan PHB ölçüm metoduyla okunmuştur.



Şekil 3.8: Gaz Kromatografi cihazı.

3.3.6. PHB Ekstraksiyonu

PHB, dimetil karbonat ekstraksiyon protokolü (DMC) kullanılarak biyokütleden ekstrakte edildi [Samori ve diğeri, 2015]. Kapalı bir tüp içinde 90 °C'de 1 saat boyunca 100 mg dondurularak kurutulmuş biyokütleyi çıkarmak için 4 mL DMC kullanıldı. Çözeltilerin filtrasyonu, santrifüjlemeden sonra 0,45 µm gözenekli polipropilen membran filtreler kullanılarak yapıldı.

Şekil 3.9'da işlem sonrasında polimerin görüntüsü verilen geri kazanılan polimeri çözücünden ayırdıktan sonra 24 saat kurutmak için çeker ocak kullanıldı.



Şekil 3.9: DMC ekstraksiyonu sonrası polimer.

3.4. Faktöryel tasarım

Maya atıksuyu ile maksimum PHB üretimi için SRT, CL ve OLR optimizasyonu tam fabrika tasarımı ile yapılmıştır. PHB üretimi için deneysel parametrelerin tasarımında tasarım uzmanı paketi, sürüm 11 (STAT-EASE Inc., Minneapolis, ABD) kullanıldı. Üç kategorik değişkenin yani SRT (d), OLR (g KOİ/l.d) ve CL (h)'nin etkilerini değerlendirmek için 27 deneyden oluşan bir set gerçekleştirildi ve her biri üç farklı düşük (-1), orta (0) ve yüksek (+1) mikroorganizmalarda PHB birikimi olarak yanıt olarak (%). Üç değişkenin aralıkları ve seviyeleri Tablo 3.2'de sunuldu.

Tablo 3. 2: Tam faktöriyel tasarımdan faktörler ve seviyeleri.

Değişkenler		Seviyeler		
		-1	0	+1
A	SRT (d)	2	4	6
B	CL (h)	48	24	12
C	OLR (g COD/l.d)	0,5	1	2

3.4.1. İstatistiksel analiz

Deneysel verileri analiz etmek ve önerilen modelin istatistiksel önemini belirlemek için Varyans Analizi (ANOVA) yapılmıştır. Genel faktöriyel deneysel tasarımlardan elde edilen sonuçlar, SRT, OLR ve CL'nin PHA üretimi üzerindeki etkilerini belirlemek için analiz edildi. PHA üretim verileri aşağıdaki eşitlik 3.6 modelinde kullanılarak incelenmiştir:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{13}x_1^2x_3 + \beta_{13}x_1x_3^2 + \beta_{13}x_1^2x_3^2 \quad (3.6)$$

Y = PHA yüzdesi cinsinden bir yanıt.

X1 = SRT için kodlanmış seviye (-1, 1).

X2 = OLR için kodlanmış seviye (-1, 1).

$X_3 = CL$ için kodlanmış seviye (-1, 1).

β_0 = model kesişimi; ve

β_s = ana faktörlerin (bağımsız değişkenler) her birinin etkilerinin büyüklüğünü ve bunların ilgili etkileşimlerini gösteren regresyon katsayıları.

Modelin uyum iyiliğini bulmak için regresyon katsayısı (R^2) hesaplanmıştır. Bireysel değişken faktör parametrelerinin etkileşimli etkileri ve yanıt üzerindeki etkisi, her bir SRT, OLR ve CL için yanıt yüzey grafikleri çizilerek görselleştirildi [Kavitha et al., 2016].



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. PHB Geri Kazanımı İçin Deney Tasarımı

Maya atıksuyu ile maksimum PHB üretimi için SRT, CL ve OLR optimizasyonu tam faktöriyel tasarımı ile yapılmıştır. PHB üretimi için deneysel parametrelerin tasarımında tasarım uzmanı paketi, sürüm 11 (STAT-EASE Inc., Minneapolis, ABD) kullanıldı. Üç kategorik değişkenin yani SRT (gün), OLR (g KOİ/L.gün) ve CL (sa)'nin etkilerini değerlendirmek için 27 deneyden oluşan bir set gerçekleştirildi ve her biri üç farklı düşük (-1), orta (0) ve yüksek (+1) mikroorganizmalarda PHB birikimi olarak yanıt olarak (%). Üç değişkenin aralıkları ve seviyeleri Tablo 4.1'de sunuldu.

Tablo 4. 1: Tam faktöriyel tasarımdan faktörleri ve seviyeleri.

Değişkenler		Seviyeler		
		-1	0	+1
A	SRT (gün)	2	4	6
B	CL (sa)	48	24	12
C	OLR (g COD/L.gün)	0.5	1	2

Tablo 4.2'de üç kategorik değişkenin yani SRT (gün), OLR (g KOİ/L.gün⁻¹) ve CL (sa)'nin etkilerini değerlendirmek için 27 deneyden oluşan bir sıralı setin sonuçları verilmektedir.

Tablo 4. 2: PHB geri kazanımı için deney tasarımı ve sonuçları.

Deney	Faktörler			Sonuçlar
	A	B	C	%PHB/UAKM
1	6	24	1	13.26
2	2	24	1	23.33
3	2	24	0.5	5.82
4	4	12	0.5	4.8
5	4	24	1	26.99
6	6	12	2	12.3
7	2	48	0.5	11.51
8	6	48	0.5	13.96
9	2	12	1	17.34
10	4	48	2	34.12
11	2	24	2	17.34
12	4	48	1	32.53
13	2	48	2	4.03
14	6	24	0.5	8.26
15	4	24	0.5	10.92
16	6	48	2	37.47
17	4	24	2	57.62
18	6	12	0.5	1.2
19	6	24	2	14.79
20	4	12	2	18.93
21	2	48	1	26.57
22	4	12	1	11.66
23	2	12	2	3.46
24	2	12	0.5	0.86
25	6	12	1	14.79
26	4	48	0.5	15.35
27	6	48	1	26.04

$$\begin{aligned}
 PHB \text{ üretimi, \%} = & 3,86 - 0,6471A + 0,6944B - 1,21C - \\
 & 0,2395AC + 0,7537A^2 + 0,3477B^2 + 0,7029C^2 + 0,2650A^2C + \\
 & 0,8019AC^2 - 0,5438A^2C^2
 \end{aligned} \quad (4.1)$$

A, B ve C, sırasıyla SRT, CL ve OLR gibi üç değişken için kodlanmış terimlerdir. Eşitlik 4.1'den de görüldüğü gibi, doğrusal parametre olarak B, ikinci

dereceden parametreler (A2, B2 ve C2) ve AC'nin etkileşimli parametreleri PHB üretimi için sinerjik etkiye sahiptir.

Uygulanan modelin ve seçilen faktöriyel modelin ANOVA sonuçları sırasıyla Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te verilmiştir. Modelin p değeri <0.0001 bulundu, bu da modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. Modelin yeterliliği, düzeltilmiş R² değerleri ve belirleme katsayısına göre belirlenir. Modelin R² ve düzeltilmiş R² değerleri, Tablo 4.3'ten görüldüğü gibi sırasıyla 0,8365 ve 0,7343 olarak bulunmuştur. Bu yüksek değerler, bu modelin veri dalgalanmalarının çoğunu açıklayabildiğini ve düzeltilmiş değerler arasındaki benzerlik nedeniyle modellerin anlamlı olduğunu göstermektedir. R² ve R² değerleri. Modelin uygulanabilirliğini değerlendirmek için kullanılan ek ilgili katsayılar, varyasyon katsayısı (CV) değerlerini ve uygun kesinlik (AP) katsayısını içerir. CV, modelin ne kadar tekrar üretilebilir olduğunu ifade etmek için kullanılır ve %10'dan düşük bir sayı, modelin oldukça tekrarlanabilir olduğunu gösterir. Düşük tekrarlanabilirlik gösteren CV değeri %20,83 olarak bulundu ancak biyolojik sistemlerde tekrarlanabilirliğin pH, çamur tutma süresi, sıcaklık ve atık su özellikleri gibi birçok faktöre bağlı olduğu söylenebilir. Önceden belirlenecek bir model için sinyal- gürültü oranı ve AP değeri 4'ün üzerinde olmalıdır ve bu model için 10.57 olarak bulunmuştur. Modelin F değeri, 10'dan 8.18 daha düşük bulundu; bu, modeldeki değişkenliğin çoğunun, matematiksel modeli istatistiksel olarak doğrulayan regresyondan kaynaklandığını gösterir. Sonuç olarak, bu süreçte PHB üretimi için en uygun koşulları tahmin etmek ve bulmak için doğrusal regresyon modelleri kullanılabilir.

Tablo 4. 3: Uygulanan modelin ANOVA sonuçları.

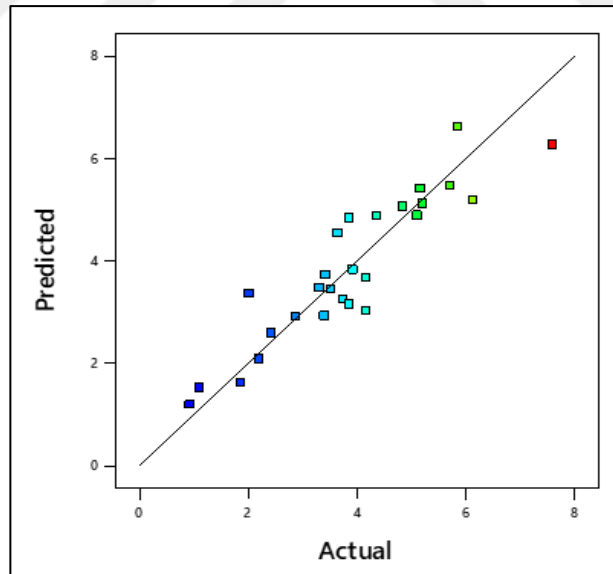
Model	Std. Dev.	R ²	Adj. R ²	CV, %	SS	MS	F Value	p Value	AP
PHB üretimi	0.8038	0.8365	0.7343	20.83	52.88	5.29	8.18	<0.0001	10.57

Tablo 4.4'te görüldüğü gibi, p değerleri 0.0005'ten küçük olduğu için tüm lineer parametrelerin PHB üretimi üzerinde önemli etkisi vardır. Aynı zamanda SRT\OLR etkileşimli parametresinin önemli bir etkiye sahip olduğu görülebilir.

Tablo 4. 4: PHA üretiminin seçilen faktöriyel modeli için ANOVA sonuçları.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
A-SRT	8.98	2	4.49	6.95	0.0067
B-CL	15.20	2	7.60	11.76	0.0007
C-OLR	19.92	2	9.96	15.41	0.0002
AC	8.78	4	2.19	3.40	0.0342
Residual	10.34	16	0.6461		
Cor Total	63.22	26			

DeneySEL ve tam faktöriyel denklemi kullanılarak elde edilen tahmini PHA değerlerinin gerçek değerlere Şekil 4.1’de görüldüğü gibi uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Bu, modelde kullanılan square root regresyon modelinin deney tasarımındaki herhangi bir değişkendeki yanıt faktörlerini hesaplamak için uygun olabileceğini göstermektedir.

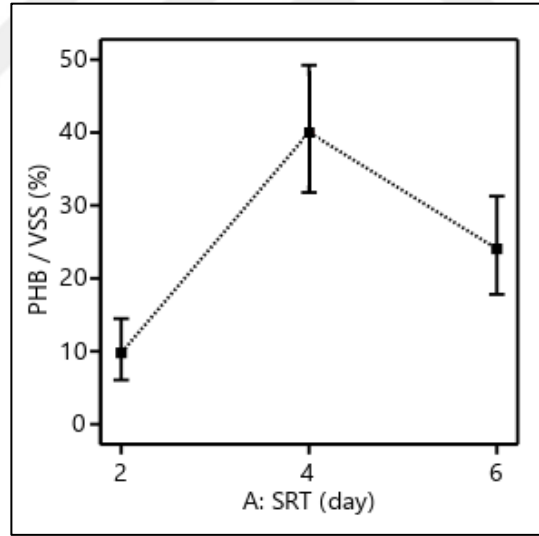


Şekil 4.1: PHA optimizasyonu tahmin edilen değer ve gerçek değer sonuç grafiği.

SRT, CL ve OLR bağımsız değişkenlerinin PHB üretim hızı (PHB/UAKM) üzerindeki etkisi programdan elde edilmiştir. OLR için SRT ile değişen AKM, UAKM/AKM ve $KO\dot{I}_{tüketilen}/AKM$, F/M değerleri 0.5, 1 ve 2 g $KO\dot{I}/L.gün$ değerleri sırasıyla 4.2 ve 4.3 konu başlıklarında verilmiştir.

4.1.1. PHB Üretiminde SRT'nin Etkisi

PHB verimi, Şekil 4.2'de görüldüğü gibi, SRT'nin 2 günden 4 güne çıkarılmasıyla hemen hemen aynı bulundu, ancak SRT 4'ten 6 güne çıkarıldığında azaldı. SRT'deki azalma ve PHB depolama kapasitesindeki artış, birçok çalışmanın bulgularıyla uyumludur. Ancak bu modelin sonuçlarında SRT 4 günden 2 güne düşürüldüğünde PHB verimi artmadı. Tablo 4.2'de verilen PHB verimleri incelendiğinde, OLR'nin 0.5 ve 2 g KOİ/L.gün değerlerinde mikroorganizmaların SRT 2 gün'de diğer SRT'lere göre daha az PHB depoladıkları görülmektedir. Dolayısıyla bu durumun PHB'nin SRT 2 gün'de depolanmasından ziyade mikroorganizmaların substratı üretim için kullanmaları sonucu ortaya çıktığını söylemek mümkündür. Lee ve diğerlerinin yaptığı çalışmada da desteklendiği gibi, daha hızlı büyüyen organizmaların daha az PHB biriktirdiğini gözlemledi [Lee et al., 2012].

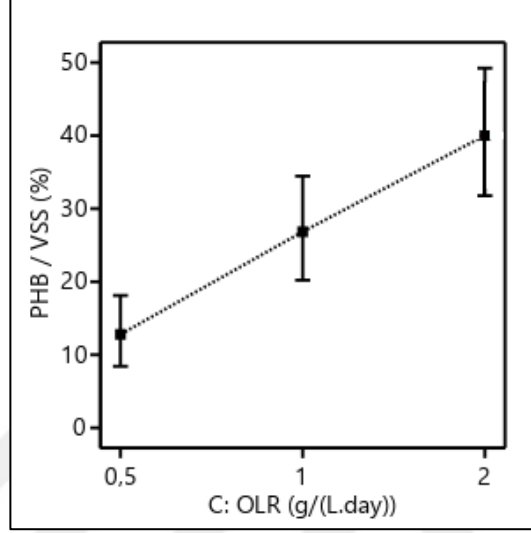


Şekil 4.2: SRT'nin PHB geri kazanımına etkisi.

Aksine SRT'nin 4 günden 6 güne çıkmasıyla PHB verimi azalmıştır. Bu durum, SRT'nin uzunluğuna bağlı olarak değişen organik yükün biyokütleyle oranının reaktörde daha yüksek bir biyokütle konsantrasyonu ile sonuçlanmasıyla açıklanabilir [Chua et al., 2003].

4.1.2. PHB Üretiminde OLR'nin Etkisi

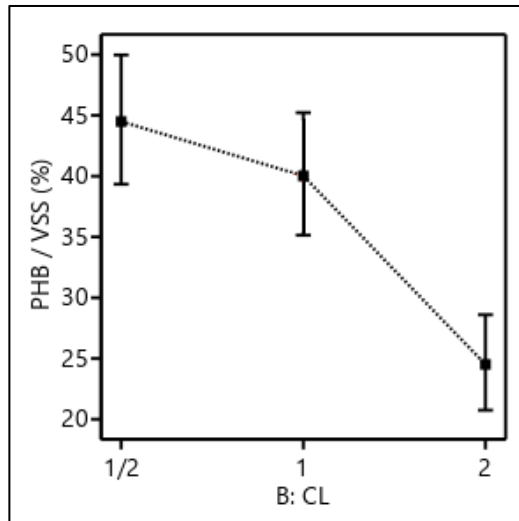
Şekil 4.3'te OLR'nin PHB verimi üzerindeki etkisi incelendiğinde, OLR 0,5'ten 2 g KOİ/L.gün'e yükseltildiğinde PHB depolama verimliliğinin arttığı gösterilmiştir.



Şekil 4.3: OLR'nin PHB geri kazanımına etkisi.

4.1.3. PHB Üretiminde CL'nin Etkisi

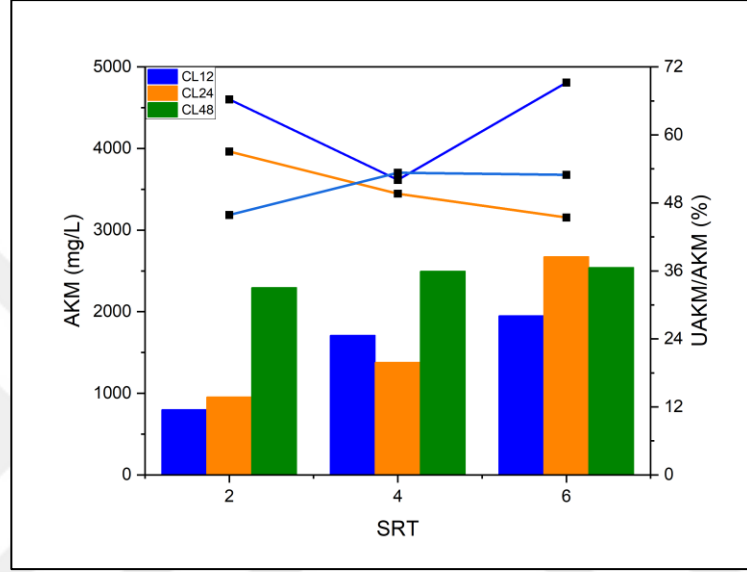
CL'nin PHB verimi üzerindeki etkisine Şekil 4.4'te bakıldığında en yüksek PHB verimi CL 48 saat olduğunda elde edilmiştir. CL değeri 12 saate düştüğünde PHB veriminin düştüğü görülmektedir.



Şekil 4.4: CL'nin PHB geri kazanımına etkisi.

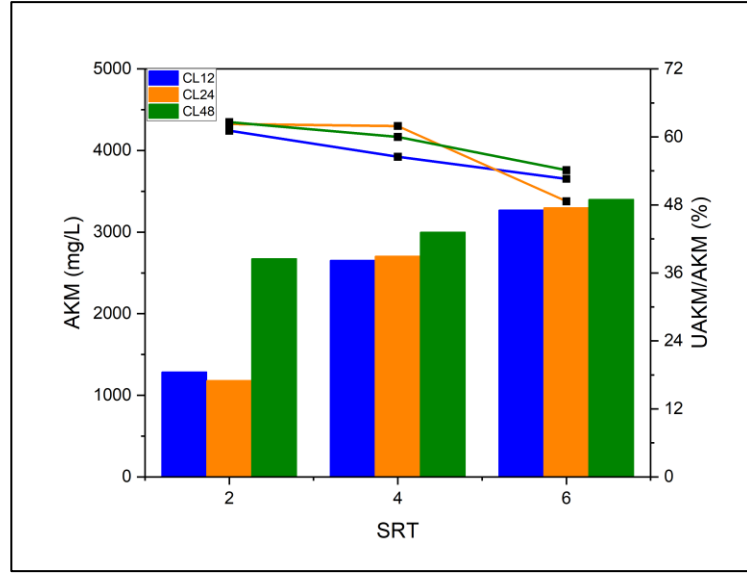
4.2. AKM/UAKM Etkisi

Şekil 4.5'de gösterildiği gibi, SRT 4d için UAKM/AKM değerleri %50 civarındayken SRT 6d için OLR 0.5 g KOİ/L.gün için CL'ye göre %45-70 arasında değişmektedir. CL 12 saat ve 24 saat için $KOİ_{tüketilen}/AKM$ ve F/M değerleri artan çamur yaşı ile azalırken, CL 48 saat için artmaktadır.



Şekil 4.5: OLR 0,5 g KOİ/L.gün için SRT ile değişen AKM ve UAKM/AKM değerleri.

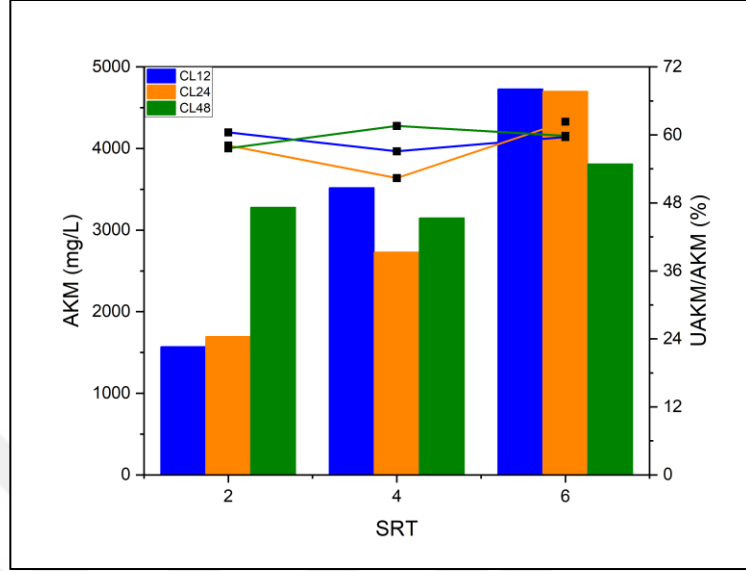
Şekil 4.6'da OLR 1 g KOİ/L.gün için SRT 4 günden 6 güne çıkarıldığında, AKM konsantrasyonu artar ancak UAKM/AKM oranı düşer. OLR 2 g KOİ/L.gün için UAKM/AKM oranları %60'ta, ancak CL 48 saat için SRT 4 gün'deki AKM konsantrasyonu SRT 6 gün'den daha yüksek çıkmaktadır.



Şekil 4.6: OLR 1 g KOİ/L.gün için SRT ile değişen AKM ve UAKM/AKM değerleri.

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi diğer CL değerlerinde artan SRT ile MLSS konsantrasyonu artıyor. Tüketilen $KOİ_{tüketilen}/AKM$ ve F/M oranları incelendiğinde, SRT 4d’den SRT 6d’ye yükseldiğinde azaldığı, OLR 2 g KOİ/L.gün için her ikisinin de arttığı görülmüştür. AKM, $KOİ_{tüketilen}/AKM$ ve F/M değerleri göz önüne alındığında, SRT 4 günden 6 güne çıktıkça PHB depolama verimliliğinin artacağı varsayılır, ancak model verileri PHB üretiminde düşüş olduğunu gösterir. Bu, kısa bir SRT’nin neden olduğu daha güçlü ayıklama etkisinin PHA depolayan organizmaların büyüme avantajını artıracak ve sonuç olarak daha yüksek gözlemlenen spesifik reaksiyon hızlarına yol açacağı için ayıklama etkisi nedeniyle açıklanabilir [Huang et al., 2017]. Ayrıca SRT 4 gün, SRT 6 gün altında seçilenden daha büyük PHA üretim kapasitesine sahip mikrobiyal topluluğu seçebilir [Chua et al., 2003]. Çalışmalar, PHB üretiminin SRT ile değiştiğini göstermiştir. SRT bazı atıksularda düşük olduğunda daha iyi performans gösterirken, bazılarında yüksek olduğunda daha iyi performans gösterir [Mokhtarani et al., 2012] %40 UYA ve sükrozdan PHA üretimine 5, 10 ve 15 günlük SRT için çalışmışlardır. 5 ve 10 günlük SRT’nin, 25 C/N oranında 15 gün’den daha iyi PHA depolama kapasitesine sahip olduğunu buldular. SRT 10 gün, diğer SRT’lere kıyasla 10 C/N oranında daha iyi performans gösterdi. [Johnson et al., 2010] 0.5, 1 ve 4 günlük kısa SRT’lerde PHB üretimi için asetat kullandı. SRT 1 ve 4 gün için PHB depolamanın nitrojen fazlalığı koşulunda daha iyi olduğunu keşfettiler. [Chen et al., 2017] 5 ve 10d SRT’de şeker kamışı pekmezi ile araştırıldı. 5 gün

SRT'nin, karbon ve ilk biyokütle konsantrasyonundan çok fazla etkilenmeden, operasyonel kararlılık ve PHA depolama yeteneği açısından 10 gün'e göre en iyi performansı ürettiğini gözlemlerler.



Şekil 4.7: OLR 2 g KOİ/L.gün için SRT ile değişen AKM ve UAKM/AKM değerleri.

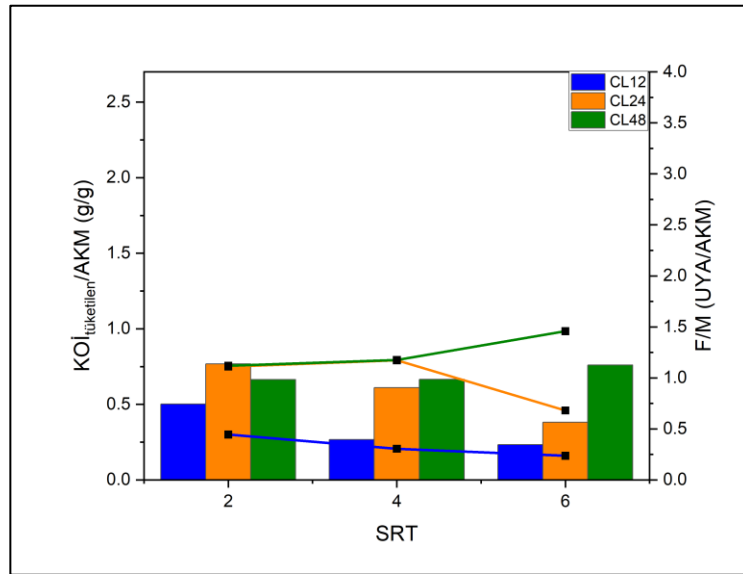
Matos ve diğerleri, 2021, 4 gün SRT'nin daha hızlı depolanan PHA üzerinde büyüyen 2 gün SRT'den daha iyi depolama kinetiğine ve üretkenliğe sahip olduğunu doğruladı. Jayakrishnan et al., 2022, pirinç fabrikası atık suyu için SRT'nin (5 ve 10 gün) aktif çamur ile PHB'ye biyodönüşümü artırmadaki etkisini araştırdı. 10 günlük SRT için maksimum PHB birikiminin %29,5 olduğu gözlemlendi, bu da PHB verimini gösterir ve spesifik depolama hızları, 10 günlük SRT için 5 gün SRT'den daha yüksekti. Coats et al., 2007 farklı çamur yaşlarında besin açısından sınırlı atık suyu incelediler ve 4 günlük SRT'de zenginleştirilmiş kültürün ortalama PHA içeriğinin 6 günlük SRT'den daha yüksek olduğunu buldular, bu da 4 günlük SRT'deki SBR'nin muhtemelen daha güçlü besin maddesi olduğunu gösterdi. Farklı SRT'lerin bir sonucu olarak 6 günlük SRT'de SBR'den daha sınırlıdır. Serafim et al., 4 günlük SRT'deki bir kültürün, aynı ortam C/N oranına sahip 10günlük SRT'deki kültürden daha güçlü nitrojen sınırlı olmasının beklendiğini buldu; bu, daha düşük SRT'ler kullanıldığında nitrojen sınırlamalarının daha da güçlendiğini doğrular. Dahili nitrojen (N) veya fosfor (P) sınırlaması da birçok araştırmacı tarafından maksimum depolama kapasitesine

ulaşmak için bir tetikleyici olarak gözlemlenmiştir [Korkakaki et al., 2017], [Valentino et al., 2015].

Şekil 4.5, 4.6, 4.7 'de farklı OLR yüklemeleri için maksimum PHB depolamasının sağlandığı SRT 4 gün verileri incelendiğinde CL değeri arttıkça AKM konsantrasyonunun arttığı görülmektedir. AKM değerleri OLR 0.5 g KOİ/L.gün'den OLR 2 g KOİ/L.gün'e yükseldiğinde CL 12 saat için 1700, 2655 ve 3520 mg/l, CL 24 saat için 1380, 2705 ve 2730 mg/l ve CL 48 saat için sırasıyla 2489.5, 3080, 3150 mg/L bulundu. OLR 0.5 g KOİ/L.gün ve OLR 1 g KOİ/L.gün için fazla değişmez ve OLR 0.5 g KOİ/L.gün için %50 ve OLR 1 g KOİ/L.gün için %60 UAKM/AKM değerleri civarındadır. OLR 2 g KOİ/L.gün için, UAKM/AKM değerleri sırasıyla CL 48 saat için %61,59, ardından CL 12 saat için %57,1 ve CL 24 saat için %52,38 ile en yüksektir.

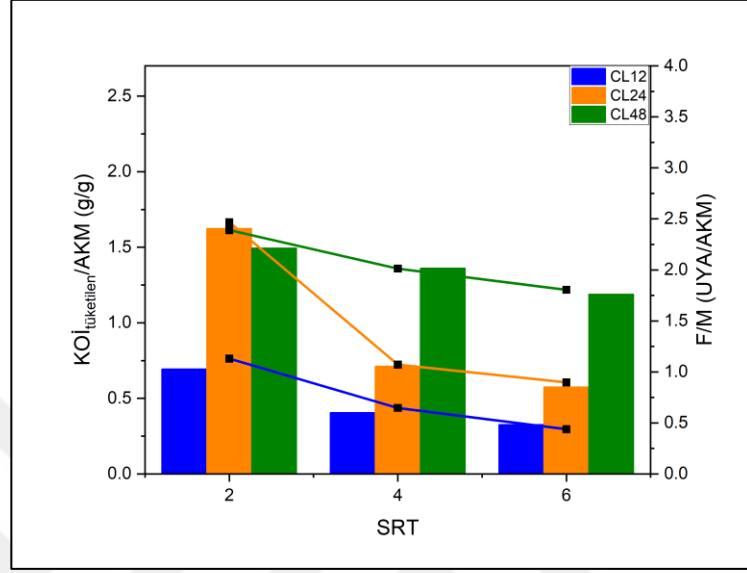
4.3. F/M Etkisi

Şekil 4.8'de görüldüğü gibi tüketilen $KOİ_{tüketim}/AKM$ değerleri OLR 0.5 g KOİ/L.gün'e bağlı CL 12, 24, 48 saat için sırasıyla 0.27, 0.61, 0.46 g KOİ / g UAKM ve F/M değerleri CL 12,24,48 için sırasıyla 0.31, 0.65, 0.81 g UYA/g UAKM bulunmuştur.



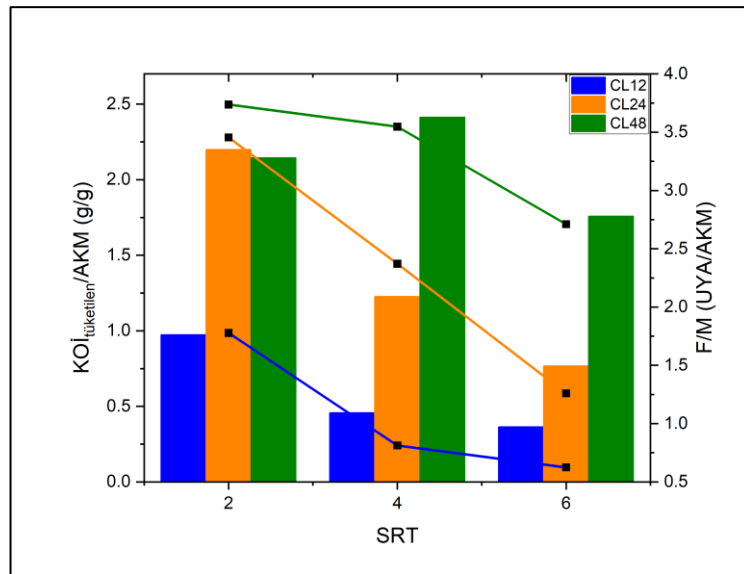
Şekil 4.8: OLR 0,5 g KOİ/L.gün için SRT ile değişen $KOİ_{tüketim}/AKM$ ve F/M oranı.

Şekil 4.9’da verilen tüketilen $KO\dot{I}_{tüketilen}/AKM$ değerleri OLR 0.1 g $KO\dot{I}/L.gün$ ’e bağlı CL 12, 24, 48 saat için sırasıyla 1.17, 1.07, 2.37 g $KO\dot{I}_{tüketilen}/g$ AKM ve F/M değerleri CL 12,24,48 için sırasıyla 0.31, 0.65, 0.81 g UYA/g AKM bulunmuştur.



Şekil 4.9: OLR 1 g $KO\dot{I}/L.gün$ için SRT ile değişen $KO\dot{I}_{tüketilen}/AKM$ ve F/M oranı.

Şekil 4.10’da verilen tüketilen $KO\dot{I}_{tüketilen}/AKM$ değerleri OLR 1 g $KO\dot{I}/L.gün$ ’e bağlı CL 12, 24, 48 saat için sırasıyla 1.17, 2.01, 3.55 g $KO\dot{I}_{tüketilen}/g$ AKM ve F/M değerleri CL 12,24,48 için sırasıyla 0.31, 0.65, 0.81 g UYA/g AKM bulunmuştur.



Şekil 4.10: OLR 2 g $KO\dot{I}/L.gün$ için SRT ile değişen $KO\dot{I}_{tüketilen}/AKM$ ve F/M oranı.

Tüketilen $KO\dot{I}_{tüketilen}/AKM$ ve F/M değerleri, şekillerde görüldüğü gibi her bir OLR değeriyle birlikte CL değerleri arttıkça artar. Görüldüğü gibi CL değerleri arttıkça hem $KO\dot{I}_{tüketilen}/AKM$ hem de F/M değerleri artmaktadır. Bu durumda mikroorganizmaların daha fazla PHB depolaması beklenir. Zheng ve diğerleri, 2021 yaptıkları çalışmada benzer sonuçları 12, 24 ve 48 saat CL'de bulmuşlar ve en yüksek PHB depolamasının CL 48 saat olduğunda gerçekleştiğini beyan etmişlerdir. Ayrıca MLSS konsantrasyonunun, diğer CL'lere kıyasla CL 48 saat olduğunda daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

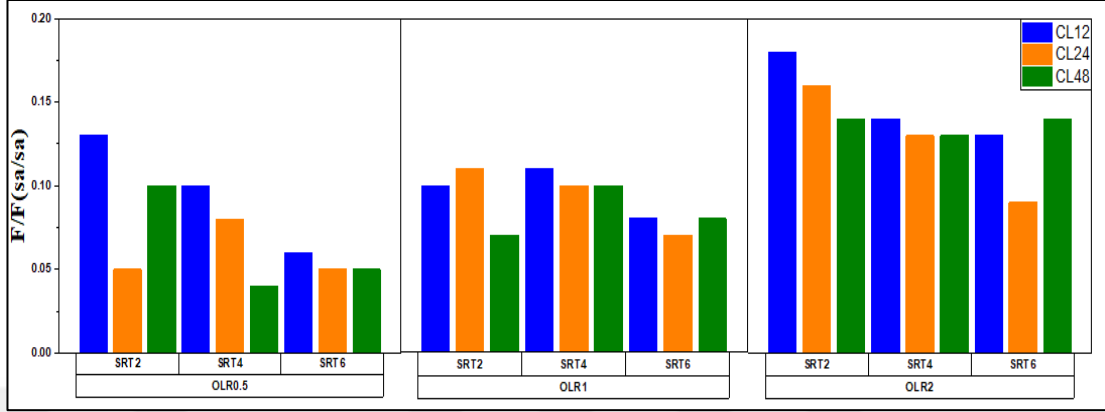
Bütün sonuçlar incelendiğinde, OLR değerlerinden bağımsız olarak, SRT arttıkça MLSS konsantrasyonlarının arttığı bulundu. OLR'nin 0,5 g $KO\dot{I}/L.gün$ ve CL'nin 48 saat olduğu SRT 6 gün dışında ve OLR'nin 2 g olduğu SRT 4 gün dışında, SRT arttıkça $KO\dot{I}_{tüketilen}/AKM$ ve F/M değerlerinin düştüğü görülmüştür. $KO\dot{I}/L.gün$ ve CL 48 saattir. SRT ile artan tüketilen $KO\dot{I}_{tüketilen}/AKM$ ve F/M değerlerindeki azalma, mikroorganizmaların PHB'yi depolamak için kullandıkları substrat miktarının azaldığını göstermiştir. Öte yandan çamur tutma süresi arttıkça reaktörde biriken biyokütle miktarı da artmakta, bu da mikroorganizmalar tarafından tüketilen UYA miktarının ve depolanan PHB miktarının aynı OLR değerleri gibi azalmasına neden olmuştur.

$KO\dot{I}_{tüketilen}/AKM$ etkisinde verilen şekillerde görülebileceği gibi, OLR'de 0,5'ten 2 g $COD/L.gün$ 'e bir artış görülmektedir. AKM konsantrasyonlarında artışa neden olur. Ek olarak, tüketilen $KO\dot{I}_{tüketilen}/AKM$ ve F/M oranları da artmaktadır. F/M etkisindeki grafiklerde SRT 4d ve CL 48h sırasında incelendiğinde, tüketilen $KO\dot{I}_{tüketilen}/AKM$ değerlerinin 0,67 g $KO\dot{I}_{tüketilen}/g$ AKM değerinden 2,41 g $KO\dot{I}/g$ AKM değerine yükseldiği görülmektedir. Bu, AKM konsantrasyonunun 2495 mg/L'den 3150 mg/l'ye yükselmesinin sonucuydu. F/M oranı 1,17'den 3,55 g UYA /g AKM'ye değişmektedir. Bu grafiklerden de görülebileceği gibi, OLR'deki bir artış, sistem içindeki VFA arzının artmasına neden olur ve bu da mikroorganizmalar tarafından üretilen PHB miktarının artmasına neden olmaktadır.

4.4. Bolluk / Kıtlık Fazı Etkisi

CL değerleri için F/F oranları Şekil 4.11'de verilmiş olup bu şekilden de görülebileceği gibi, CL 48 saat olduğunda hem OLR hem de SRT değerlerinde daha

düşük F/F değerleri görülmektedir. CL değerleri F/F değerlerinden etkilendiği için CL değerleri artarken F/F değerlerinin düşmesi PHA sentezini etkileyen önemli bir parametre olarak görülmektedir [Vjayan, 2017], [Huang et al., 2018].



Şekil 4.11: CL'lara bağlı olarak değişen SRT (2, 4, 6 gün) ve OLR (0,5, 1, 2 g KOİ/L.gün) değerleri.

Zheng ve diğerleri tarafından yapılan çalışmalarda da aynı sonuçlara ulaşılmış ve karışık mikroorganizmalar lifsi olmayan bakterilerinin şişmesi nedeniyle PHA dönüşüm oranı ve PHA içeriğinin 12 saatte hep düşük seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Öte yandan CL, bakteri kültürü davranışını etkileyebilir [Freches and Lemos, 2017]. Daha kısa döngü uzunluğunun karbon depolamasını değiştirdiğini belirtmiş ve glikoz biyopolimeri biçimindeki karbon depolamanın HB birikiminden 2 kat daha yüksek verim sunduğunu bulmuş ve 3 kat daha hızlı birikim oranı [Moralejo et al, 2013] daha kısa döngü uzunluklarında gıdanın mikroorganizmalara (F/M) oranındaki düşüşün PHB'den ziyade glukoz biyopolimerini arttırdığını da bulmuşlardır. Böylece mikroorganizmaların değişen davranışları nedeniyle CL'nin 48 saatten 12 saate düşmesiyle PHB üretiminin azaldığı söylenebilir. Aksine, bazı çalışmalar yüksek PHB içeriği elde etmek için CL'nin düşürülmesi gerektiğini göstermiştir. Özdemir ve diğerleri, aktif çamur karma kültüründen aerobik mikroorganizmaların 12, 8, 4 ve 2 saatlik döngülerden sonra sırasıyla %16, %18, %42 ve %55 PHB içeriği depoladığını bildirmiştir. Amulya ve diğerleri, gıda atıklarından PHA üretimi için 12 saatlik ve 24 saatlik iki CL'yi inceledi ve CL 12h işleminde VFA gideriminin yanı sıra daha yüksek polimer geri kazanımı elde edildiğini buldu. Bu araştırmalardan, yetiştirme uzunluğunun PHB üretkenliği ve verimi üzerindeki etkisinin mikrobiyal popülasyona ve reaktör konfigürasyonuna bağlı olduğu sonucuna

varılabilir [Amadu et al, 2021]. PHA'nın hücre içinde birikmesi, üretilen biyokütle miktarı ile doğru orantılı olan biyopolimer üretkenliğinde bir artışa yol açar. OLR'deki bir artış, SBR'deki biyokütle konsantrasyonunun artmasına neden olduğundan, OLR, zenginleştirme performansında önemli bir rol oynar. Bu nedenle zenginleştirme aşaması, substrat inhibisyonuna veya oksijen sınırlamasına neden olmadan kararlı çalışmayı ve düşük F/F oranlarını korurken mümkün olan en yüksek OLR'de çalışacak şekilde optimize edilmiştir [Oliveira et al., 2019], [Dionisi, et al., 2004].



5. SONUÇLAR

Mevcut çalışmada, çok düzeyli kategorik tasarımla yapılan maya atık suyuyla maksimum PHB üretiminin optimizasyonunu değerlendirildi. Mikroorganizmalarda PHB birikiminin modelde yanıt olacak şekilde belirlenerek (PHB/VSS, %) üç kategorik değişkenin, yani SRT (2, 4 ve 6 gün), OLR (0.5, 1 ve 2 g KOİ/L.gün) ve CL'nin (12, 24 ve 48 saat) etkilerini değerlendirmek için 27 deneyden oluşan bir set gerçekleştirildi. p değeri <0.0001 olduğu için model istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Modelin R^2 ve düzeltilmiş R^2 değerlerinin sırasıyla 0.8365 ve 0.7343 bulunması, bu modelin veri dalgalanmalarının çoğunu açıklayabildiğini ve aralarındaki benzerlikten dolayı modellerin anlamlı olduğunu göstermektedir. PHB verimi, SRT'nin 2 günden 4 güne çıkarılmasıyla hemen hemen aynı bulunmuş, ardından SRT 4'ten 6 güne çıkarıldığında azalmıştır. AKM, UAKM/AKM, F/M ve $KOİ_{tüketilen}/AKM$ dışında C/N oranı gibi diğer sınırlayıcı faktörlerden kaynaklanabilecek PHB verimi SRT 2 gün ve SRT 6 güne göre SRT 4 günde en yüksek bulunmuştur. En yüksek PHB verimi, CL 48 saat olduğunda elde edildi, çünkü artan CL, PHA sentezini etkileyen önemli bir parametre olan F/F değerlerini düşürdü. PHB depolama verimliliği, OLR 0.5'ten 2 g KOİ/L.gün'ye yükseltildiğinde artar, çünkü OLR'deki bir artış sistem içinde artan bir VFA arzına yol açar, bu da mikroorganizmalar tarafından üretilen PHB miktarında bir artışa yol açar. Modelin sonuçları, maya endüstrisi atık suyundan elde edilen VFA'lar ile karma kültürde PHB sentezi için optimum işlem koşullarının, SRT 4 gün, CL 48 saat ve OLR 2 g KOİ/L.gün olduğunda %57,62 olarak elde edildiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

Albuquerque M. G. E., Torres C. A. V., Reis M. A. M., (2010), "Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production by a Mixed Microbial Culture Using Sugar Molasses: Effect of The Influent Substrate Concentration on Culture Selection", *Water Research*, 44(11), 3419-3433.

Argiz L., Fra-Vázquez A., Del Río Á. V., Mosquera-Corral A. (2020), "Optimization of an Enriched Mixed Culture to Increase PHA Accumulation Using Industrial Saline Complex Wastewater as a Substrate", *Chemosphere*, 247, 125873.

Atlić, A., Koller, M., Scherzer, D., Kutschera, C., Grillo-Fernandes, E., Horvat, P., Braunegg, G. (2011), "Continuous production of poly ([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade", *Applied microbiology and biotechnology*, 91, 295-304.

Beccari M., Majone M., Massanisso P., Ramadori R., (1998), "A Bulking Sludge With High Storage Response Selected Under Intermittent Feeding", *Water Research*, 32(11), 3403-3413.

Bertin L., Lampis S., Todaro D., Scoma A., Vallini G., Marchetti L., Majone M., Fava F., (2010), "Anaerobic Acidogenic Digestion of Olive Mill Wastewaters in Biofilm Reactors Packed With Ceramic Filters or Granular Activated Carbon", *Water Research*, 44(15), 4537-4549.

Bhalerao A., Banerjee R., Nogueira R., (2020), "Continuous Cultivation Strategy for Yeast Industrial Wastewater-Based Polyhydroxyalkanoate Production", *Journal of Bioscience And Bioengineering*, 129(5), 595–602.

Borror C. M., Montgomery D. C., Myers R. H., Borror C. M., Montgomery D. C., Myers R. H., Borror C. M., Montgomery D. C., Myers R. H., (2018), "Involving Noise Variables Evaluation of Statistical Designs For Experiments Involving Noise Variables", *Journal of Quality Technology*, 34(1), 54-70.

Chakravarty P., Mhaisalkar V., Chakrabarti T., (2010), "Study on Poly-Hydroxyalkanoate (PHA) Production in Pilot Scale Continuous Mode Wastewatertreatment System", *Bioresource Technology*, 101(8), 2896–2899.

Chen H., Meng H., Nie Z., Zhang M., (2013), "Bioresource Technology Polyhydroxyalkanoate Production From Fermented Volatile Fatty Acids : Effect of Ph And Feeding Regimes", *Bioresource Technology*, 128, 533–538.

Chen Z., Huang L., Wen Q., Zhang H., Guo Z., (2017), "Effects of Sludge Retention Time, Carbon and Initial Biomass Concentrations on Selection Process: From Activated Sludge to Polyhydroxyalkanoate Accumulating Cultures", *Journal of Environmental Sciences*, (China), 52, 76–84.

Chua A. S. M., Takabatake H., Satoh H., Mino T., (2003), "Production of Polyhydroxyalkanoates (PHA) by Activated Sludge Treating Municipal Wastewater: Effect of Ph, Sludge Retention Time (SRT), and Acetate Concentration in Influent", *Water Research*, 37(15), 3602–3611.

Çebi Ş. E., (2018), "Gıda endüstrisi atık suyunun Al elektrot kullanarak elektrokoagülasyon prosesi ile arıtımının incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi.

Çiftçi H. N., (2021), "Biyopolimer Üretiminde Maya Endüstrisi Atıksularının Kullanılması", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

Coats E. R., Loge F. J., Smith W. A., Thompson D. N., Wolcott M. P., (2007), "Functional Stability of a Mixed Microbial Consortium Producing PHA From Waste Carbon Sources", in *Applied Biochemistry And Biotechnology: The Twenty-Eighth Symposium Proceedings of The Twenty-Eight Symposium On Biotechnology for Fuels and Chemicals Held April 30–May 3, 2006, In Nashville, Tennessee* (Pp. 909-925).

Dargahi A., Mohammadi M., Amirian F., Karami A., Almasi, A., (2017), "Phenol Removal From Oil Refinery Wastewater Using Anaerobic Stabilization Pond Modeling And Process Optimization Using Response Surface Methodology (RSM)", *Desalination And Water Treatment*, 87(May), 199-208.

De Oliveira G. H. D., Niz M. Y. K., Zaiat M., Rodrigues J. A. D., (2019), "Effects of The Organic Loading Rate on Polyhydroxyalkanoate Production From Sugarcane Stillage By Mixed Microbial Cultures", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189(4), 1039–1055.

Dionisi D., Majone M., Papa V., Beccari M., (2004), "Biodegradable Polymers From Organic Acids By Using Activated Sludge Enriched By Aerobic Periodic Feeding", *Biotechnology And Bioengineering*, 85(6), 569–579.

Dionisi D., Majone M., Tandoi V., Beccari M., (2001), "Sequencing Batch Reactor: Influence of Periodic Operation on Performance of Activated Sludges in Biological Wastewater Treatment", *Industrial And Engineering Chemistry Research*, 40(23), 5110–5119.

Dionisi D., Majone M., Vallini G., Di Gregorio S., Beccari M., (2006), "Effect of The Applied Organic Load Rate on Biodegradable Polymer Production by Mixed Microbial Cultures in a Sequencing Batch Reactor", *Biotechnology and Bioengineering*, 93(1), 76–88.

Tjur T., (2005), "Analysis Of Variance: Why It is More Important Than Ever: Discussion", *The Annals of Statistics*, 33(1), 31-33.

Freches A., Lemos P. C., (2017), "Microbial Selection Strategies For Polyhydroxyalkanoates Production From Crude Glycerol: Effect of OLR and Cycle Length", *New Biotechnology*, 39, 22–28.

Grothe E., Moo-Young M., Chisti Y., (1999), “Fermentation Optimization for The Production of Poly (B-Hydroxybutyric Acid) Microbial Thermoplastic”, *Enzyme and Microbial Technology*, 25(1-2), 132-141.

Gurunathan T., Mohanty S., Nayak S. K., (2015), “A Review Of The Recent Developments in Biocomposites Based On Natural Fibres And Their Application Perspectives”, *Composites Part A: Applied Science And Manufacturing*, 77, 1-25.

Hao J., Wang X., Wang H., (2017), “Overall Process of Using A Valerate- Dominant Sludge Hydrolysate to Produce High-Quality Polyhydroxyalkanoates (PHA) in a Mixed Culture”, *Scientific Reports*, July, 1–11.

Hazar Yoruç A. B., Uğraşkan V., (2017), “Green Polymers And Applications”, *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences And Engineering*, 17(1), 318–337.

Hong C., Hao H., Haiyun W., (2009), “Process Optimization for PHA Production by Activated Sludge Using Response Surface Methodology”, *Biomass and Bioenergy*, 33(4), 721–727.

Hoover S. W., Marnier W. D., Brownson A. K., Lennen R. M., Wittkopp T. M., Yoshitani J., Pflieger B. F., (2011), “Bacterial Production of Free Fatty Acids From Freshwater Macroalgal Cellulose”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 435-446.

Huang L., Chen Z., Wen Q., Lee D. J., (2017), “Enhanced Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Microbial Culture with Extended Cultivation Strategy”, *Bioresource Technology*, 241, 802–811.

Huang L., Chen Z., Wen Q., Zhao L., Lee D. J., Yang L., Wang Y., (2018), “Insights into Feast-Famine Polyhydroxyalkanoate (PHA)-Producer Selection: Microbial Community Succession, Relationships With System Function and Underlying Driving Forces”, *Water Research*, 131, 167–176.

Islam S., Goormachtigh L., Garcia-Gonzalez L., Wever H. De Volcke E. I. P., (2014), “Bioresource Technology Modeling Pure Culture Heterotrophic Production of Polyhydroxybutyrate (PHB)”, *Bioresource Technology*, 155, 272–280.

Jayakrishnan U., Ghosh D., Deka D., Das G., (2022), “Effect of Sludge Retention Time and Feeding Strategy on Polyhydroxybutyrate Production From Rice Mill Effluent Using Activated Sludge”, *Biomass Conversion And Biorefinery*, 1-23.

Johnson K., Jiang Y., Kleerebezem R., Muyzer G., Van Loosdrecht M. C., (2009), “Enrichment of a Mixed Bacterial Culture With a High Polyhydroxyalkanoate Storage Capacity”, *Biomacromolecules*, 10(4), 670-676.

Johnson K., Kleerebezem R., Van Loosdrecht M. C. M., (2010), “Influence of The C/N Ratio on The Performance of Polyhydroxybutyrate (PHB) Producing Sequencing Batch Reactors at Short Srts”, *Water Research*, 44(7), 2141–2152.

Kavitha G., Kurinjimalar C., Sivakumar K., Kaarthik M., Aravind R., Palani P., Rengasamy R., (2016), "Optimization of Polyhydroxybutyrate Production Utilizing Waste Water as Nutrient Source by *Botryococcus Braunii* Kütz Using Response Surface Methodology", *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 534–542.

Keenan T. M., Nakas J. P., Tanenbaum S. W., (2006), "Polyhydroxyalkanoate Copolymers From Forest Biomass", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7), 616.

Khanna S., Srivastava A. K., (2005), "Recent Advances in Microbial Polyhydroxyalkanoates", *Process Biochemistry*, 40(2), 607-619.

Khardenavis A. A., Suresh Kumar M., Mudliar S. N., Chakrabarti T., (2007), "Biotechnological Conversion of Agro-Industrial Wastewaters into Biodegradable Plastic, Poly B-Hydroxybutyrate", *Bioresource Technology*, 98(18), 3579–3584.

Moralejo-Gárate H., Kleerebezem R., Mosquera-Corral A., Van Loosdrecht M. C., (2013), "Impact of Oxygen Limitation on Glycerol-Based Biopolymer Production By Bacterial Enrichments", *Water Research*, 47(3), 1209-1217.

Koby M., Delipinar S., (2008), "Treatment Of The Baker's Yeast Wastewater By Electrocoagulation", *Journal of Hazardous Materials*, 154(1-3), 1133-1140.

Korkakaki E., Van Loosdrecht M. C. M., Kleerebezem R., (2017), "Impact Of Phosphate Limitation On PHA Production In A Feast-Famine Process", *Water Research*, 126, 472– 480.

Kourmentza C., Plácido J., Venetsaneas N., Burniol-Figols A., Varrone C., Gavala H. N., Reis M. A., (2017), "Recent Advances and Challenges Towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production", *Bioengineering*, 4(2), 55.

Lee K. E., Morad N., Teng T. T., Poh B. T., (2012), "Factorial Experimental Design For Reactive Dye Flocculation Using Inorganic-Organic Composite Polymer", *APCBEE Procedia*, 1, 59-65.

Kim B. S., Lee S. C., Lee S. Y., Chang H. N., Chang Y. K., Woo S. I., (1994), "Production of Poly (3-Hydroxybutyric Acid) By Fed-Batch Culture of *Alcaligenes Eutrophus* With Glucose Concentration Control", *Biotechnology and Bioengineering*, 43(9), 892-898.

Lemos P. C., Levantesi C., Serafim L. S., Rossetti S., Reis M. A., Tandoi V., (2008), "Microbial Characterisation of Polyhydroxyalkanoates Storing Populations Selected Under Different Operating Conditions Using a Cell-Sorting RT-PCR Approach", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 351-360.

Li J., Hao X., Gan W., Van Loosdrecht M. C., Wu Y., (2021), "Recovery Of Extracellular Biopolymers From Conventional Activated Sludge: Potential, Characteristics And Limitation", *Water Research*, 205, 117706.

Liu H. Y., Vander Gheynst J. S., Darby J. L., Thompson D. E., Green P. G., Loge F. J., (2011), “Factorial Experimental Designs For Enhancement of Concurrent Poly (Hydroxyalkanoate) Production and Brewery Wastewater Treatment”, *Water Environment Research*, 83(1), 36–43.

Macagnan K. L., Alves M. I., Rodrigues A. Á., Furlan L., Da Silva Rodrigues R., Diaz De Oliveira P., Da Silveira Moreira A., (2017), “Complete Factorial Design to Adjust Ph And Sugar Concentrations in The Inoculum Phase Of *Ralstonia Solanacearum* to Optimize P (3HB) Production”, *Plos One*, 12(7), E0180563.

Mcadam B., Brennan Fournet M., Mcdonald P., Mojicevic M., (2020), “Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting its Chemical and Mechanical Characteristics”, *Polymers*, 12(12), 2908.

Md. Din M. F., Ponraj M., Van Loosdrecht M., Ujang Z., Chelliapan S., Zambare V., (2014), “Utilization of Palm Oil Mill Effluent for Polyhydroxyalkanoate Production and Nutrient Removal Using Statistical Design”, *International Journal of Environmental Science And Technology*, 11, 671-684.

Millican J. M., Agarwal S., (2021), “Plastic Pollution: a Material Problem?”, *Macromolecules*, 54(10), 4455-4469.

Mokhtarani N., Ganjidoust H., Vasheghani Farahani E., (2012), “Effect of Process Variables on The Production of Polyhydroxyalkanoates by Activated Sludge”, *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 9, 1-7.

Moralejo-Gárate H., Palmeiro-Sánchez T., Kleerebezem R., Mosquera-Corral A., Campos J. L., Van Loosdrecht M. C. M., (2013), “Influence of The Cycle Length on The Production of PHA and Polyglucose From Glycerol by Bacterial Enrichments in Sequencing Batch Reactors”, *Biotechnology And Bioengineering*, 110(12), 3148–3155.

Oehmen A., Lemos P. C., Carvalho G., Yuan Z., Keller J., Blackall L. L., Reis M. A., (2007), “Advances in Enhanced Biological Phosphorus Removal: From Micro to Macro Scale”, *Water Research*, 41(11), 2271-2300.

Öztürk D., (2020), “Turşu Endüstrisi Atıksularının Biyopolimer Üretim Potansiyelinin Belirlenmesi”, *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi*.

Pardelha F., Albuquerque M. G. E., Reis M. A. M., Dias J. M. L., Oliveira R., (2012), “Flux Balance Analysis Of Mixed Microbial Cultures: Application to The Production of Polyhydroxyalkanoates From Complex Mixtures of Volatile Fatty Acids”, *Journal of Biotechnology*, 162(2–3), 336–345.

Phasakanon J., Chookietwattana K., Dararat S., (2014), “Polyhydroxyalkanoate Production From Sequencing Batch Reactor System Treating Domestic Wastewater

Mixed With Glycerol Waste”, *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 8(Caas 2013), 161–166.

Philip S., Keshavarz T., Roy I., (2007), “Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Polymers With a Range of Applications”, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 82(3), 233-247.

Prados E., & Maicas S., (2016), “Bacterial Production of Hydroxyalkanoates (PHA)”, *Universal Journal of Microbiology Research*, 4(1), 23-30.

Rehm B. H., (2010), “Bacterial Polymers: Biosynthesis, Modifications and Applications”, *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 578-592.

Rahman A., Anthony R. J., Sathish A., Sims R. C., Miller C. D., (2014), “Effects of Wastewater Microalgae Harvesting Methods on Polyhydroxybutyrate Production”, *Bioresource Technology*, 156, 364-367.

Ryan P. G., (2015), “How Quickly Do Albatrosses and Petrels Digest Plastic Particles?”, *Environmental Pollution*, 207, 438-440.

Rehm B. H., (2010), “Bacterial Polymers: Biosynthesis, Modifications and Applications”, *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 578-592.

Serafim L. S., Lemos P. C., Albuquerque M. G. E., Reis M. A. M., (2008), “Strategies for PHA Production by Mixed Cultures and Renewable Waste Materials”, in *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 81, Issue 4, Pp. 615–628).

Serafi L. S., Lemos, P. C., Oliveira R., Reis M. A. M., (2004), “Optimization of Polyhydroxybutyrate Production by Mixed Cultures Submitted to Aerobic Dynamic Feeding Conditions”, *Biotechnology and Bioengineering*, 87(2), 145–160.

Shahid S., Corroler D., Mosrati R., Amiel C., Guillard J. L., Noreen S., Bilal M., (2021), “Optimization of Growth Conditions for The Biosynthesis of Medium-Chain Length Polyhydroxyalkanoates From *Bacillus Megaterium* DSM 509: Experimental Analysis Statistical Modelling, and Characterization”, *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-16.

Suresh Kumar M., Mudliar S. N., Reddy K. M. K., Chakrabarti T., (2004), “Production Of Biodegradable Plastics From Activated Sludge Generated From A Food Processing Industrial Wastewater Treatment Plant”, *Bioresource Technology*, 95(3), 327–330.

Szacherska K., Oleskowicz-Popiel P., Ciesielski S., Mozejko-Ciesielska J., (2021), “Volatile Fatty Acids as Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates Production”, *Polymers*, 13(3), 321.

Takabatake H., Satoh H., Mino T., Matsuo T., (2000), “Recovery of Biodegradable Plastics From Activated Sludge Process”, *Water Science and Technology*, 42(3-4), 351-356.

Tamang P., Banerjee R., Köster S., Nogueira R., (2019), “Comparative Study of Polyhydroxyalkanoates Production From Acidified and Anaerobically Treated Brewery Wastewater Using Enriched Mixed Microbial Culture”, *Journal of Environmental Sciences (China)*, 78, 137–146.

Tamis J., Lužkov K., Jiang Y., Van Loosdrecht M. C., Kleerebezem R., (2014), “Enrichment of *Plasticicumulans Acidivorans* At Pilot-Scale For PHA Production on Industrial Wastewater”, *Journal of Biotechnology*, 192, 161-169.

Valentino F., Karabegovic L., Majone M., Morgan-Sagastume F., Werker A., (2015), “Sciencedirect Polyhydroxyalkanoate (PHA) Storage Within a Mixed-Culture Biomass With Simultaneous Growth as a Function of Accumulation Substrate Nitrogen and Phosphorus Levels”, *Water Research*, 77, 49–63.

Villano M., Beccari M., Dionisi D., Lampis S., Micheli A., Vallini G., Majone M., (2010), “Effect Of Ph on The Production of Bacterial Polyhydroxyalkanoates by Mixed Cultures Enriched Under Periodic Feeding”, *Process Biochemistry*, 45(5), 714–723.

Villano M., Valentino F., Barbetta A., Martino L., Scandola M., Majone M., (2014), “Polyhydroxyalkanoates Production With Mixed Microbial Cultures : From Culture Selection to Polymer Recovery in a High-Rate Continuous Process”, *New Biotechnology*, 31(4), 289–296.

Vjayan T., Vadivelu V. M., (2017), “Effect of Famine-Phase Reduced Aeration on Polyhydroxyalkanoate Accumulation in Aerobic Granules”, *Bioresource Technology*, 245, 970–976.

Yan H., Row K. H., (2006), “Characteristic And Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer”, *International Journal of Molecular Sciences*, 7(5), 155-178.

Yu J., Si Y., (2001), “A Dynamic Study And Modeling of The Formation of Polyhydroxyalkanoates Combined With Treatment of High Strength Wastewater”, *Environmental Science and Technology*, 35(17), 3584–3588.

Zhang Q., Lu Y., Zhou X., Wang X., Zhu J., (2020), “Effect of Different Vegetable Wastes on The Performance of Volatile Fatty Acids Production By Anaerobic Fermentation”, *Science of The Total Environment*, 748, 142390.

Zheng Y., Guo L., Liu Y., She Z., Gao M., Jin C., Zhao Y., (2021), “Effects of Chemical Oxygen Demand Concentration, Ph and Operation Cycle on Polyhydroxyalkanoates Synthesis With Waste Sludge”, *Environmental Technology (United Kingdom)*, 42(12), 1922–1929.

ÖZGEÇMİŞ

Selver KONUK, 2014 yılında başladığı Bursa Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümünü 2019 yılında başarıyla tamamlayarak aynı yıl yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında başladı ve 119Y027 kodlu TÜBİTAK 1001 projesinde aktif olarak 2,5 sene çalıştı.

