

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

**ATIK SU ARITMA ÇAMURLARINDAN BİYOPOLİMER GERİ**  
**KAZANIMI VE NANOFİBER ÜRETİMİ**

**TÜLİN YILMAZ NAYIR**  
**DOKTORA TEZİ**  
**ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**GEBZE**  
**2023**

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

**ATIK SU ARITMA ÇAMURLARINDAN**  
**BİYOPOLİMER GERİ KAZANIMI VE**  
**NANOFİBER ÜRETİMİ**

**TÜLİN YILMAZ NAYIR**  
**DOKTORA TEZİ**  
**ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI**  
**DOÇ. DR. SERDAR KARA**

**GEBZE**  
**2023**

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

**BIOPOLYMER RECOVERY FROM**  
**ACTIVATED SLUDGE AND NANOFIBER**  
**SYNTHESIS**

**TÜLİN YILMAZ NAYIR**  
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF**  
**DOCTOR OF PHILOSOPHY**  
**DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING**

**THESIS SUPERVISOR**  
**ASSOC. PROF. DR. SERDAR KARA**

**GEBZE**  
**2023**



## DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 09/03/2023 tarih ve 2023/18 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 14/03/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Tülin YILMAZ NAYIR'ın tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

### JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr.Serdar KARA

ÜYE

: Prof.Dr.Bülent KESKİNLER

ÜYE

: Prof.Dr. Güçlü İNSEL

ÜYE

: Prof. Dr. Bünyemin ÇOŞUT

ÜYE

: Prof.Dr. Erkan ŞAHİNKAYA

### ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

Bu çalışmada, mikroorganizmaların yaşam döngülerinde depoladıkları hücre içi granüler polihidroksialkanaotların (PHA) yenilikçi ekstraksiyon yöntemleri ile hücre dışına çıkarılması ve PHA-biyopolimerinin nanofiber üretiminde kullanılması süreci değerlendirilmiştir.

Maya endüstrisi atık su arıtma tesisi aktif çamur prosesinden alınan aktif çamurun laboratuvar ortamında, aynı endüstrinin atık suyu ile beslenmesi sonucu mikroorganizmaların depoladıkları PHA'nın hücre dışına çıkarılması için 3 farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır: Solvent ekstraksiyonu, karışık mikrobiyal kültürden PHB ekstraksiyonu için ilk defa kullanılan süperkritik CO<sub>2</sub> prosesi ve PHA ekstraksiyonu için ilk defa kullanılan hidrodinamik kavitasyon prosesi.

Ekstraksiyon çalışmaları verim, saflık ve molekül ağırlığı parametreleri bakımından karşılaştırıldığında kullanılan ekstraksiyon yönteminin, proses verimini ve biyopolimerlerin fiziksel ve termokimyasal özelliklerini etkilediği görülmektedir. En yüksek ekstraksiyon verimi ve elde edilen polimer malzemenin özellikleri bakımından diğer proseslere göre daha üstün polimerin elde edildiği sCO<sub>2</sub> prosesinde ekstrakte edilen biyopolimer kullanılarak nanofiber üretim çalışmaları yapılmıştır.

sCO<sub>2</sub> ile ekstraksiyon prosesinde elde edilen ortalama 78% PHB saflığındaki biyopolimer elektroğirme prosesinde nanofiber üretiminde kullanılmıştır. Üretilen nanofiberlerin morfolojik, kimyasal, termal ve mekanik özellikleri araştırılmıştır. SEM analizlerinde nanofiberlerin mikrometre mertebesinde ince uzun ipliksi şeklinde yapıları gözlemlenmiştir.

Atıklar kullanılarak biyopolimer bazlı yeni ürün elde edilmesi sürecinde karışık mikrobiyal kültürde PHA üretimi, üretilen PHA'nın hücreden ekstraksiyonu ve elde edilen PHA-biyopolimerinden nanofiber malzeme üretimi aşamalarındaki proses parametreleri incelenmiş olup, bir atık değerlendirme prosesi yürütülmüştür.

**Anahtar Kelimeler: Biyopolimer, PHA, Nanofiber, Hidrodinamik Kavitasyon, Süperkritik Ekstraksiyon.**

## SUMMARY

In this study, the extraction of intracellular granular polyhydroxyalkanoates (PHA) stored by microorganisms in their life cycle by innovative extraction methods and the use of PHA-biopolymer in nanofiber production were evaluated.

The biomass for the extraction experiments was obtained from a PHA production reactor where activated sludge was fed with anaerobically pretreated yeast industry wastewater. Three different extraction methods were used for extraction of PHA stored by microorganisms: solvent extraction, supercritical CO<sub>2</sub> process and hydrodynamic cavitation process.

When the extraction studies are compared in terms of yield, purity and molecular weight parameters, it has been evaluated that the used extraction method effects the process yield and the physical and thermochemical properties of the biopolymers. Nanofiber production studies were carried out using the PHA-biopolymer which was extracted in the sCO<sub>2</sub> process, where the highest extraction yield and best polymer properties were obtained.

The biopolymer with an average purity of 78% obtained in the extraction process with sCO<sub>2</sub> was used in nanofiber production in the electrospinning process. Morphological, chemical, thermal and mechanical properties of the nanofibers were investigated. In SEM analysis, nanofibers were observed to have micrometer sized fine long fibers and it was concluded that it was a successful production.

In the process of obtaining new biopolymer-based products using wastes, the process parameters in the PHA production, extraction and nanofiber material production stages were examined and a waste valorization process was carried out.

**Key Words: Biopolymer, PHA, Nanofiber, Hydrodynamic Cavitation, Supercritical Extraction.**

## TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez konusunun geliştirilmesinde bana olan güveni ve tez çalışmalarım boyunca sağladığı motivasyon ve katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Serdar KARA'ya,

Proje fikrinin geliştirilmesi ve çalışmalarımın her aşamasında gösterdikleri destekten ötürü Prof.Dr.Bülent KESKİNLER ve Prof.Dr.Güçlü İNSEL'e,

Çalışmalarımın bir bölümünü yürüttüğüm GTÜ Kimya laboratuvarında yardımlarını ve bilgi paylaşımını esirgemeyen Prof.Dr. Bünyemin ÇOŞUT ve Burcu TOPALOĞLU AKSOY'a,

Tez çalışmalarımın her aşamasında hep yanımda olan çalışkanlığı ile hiçbir yardımını esirgemeyen Selver KONUK'a, bilgisi, tecrübesi ve samimiyetiyle bana her zaman ilham veren Hilal YILMAZ'a, çalışma zamanlarını keyifli hale getiren ofis arkadaşlarım Yusuf KÜÇÜKAĞA ve Dilara ÖZTÜRK'e,

119Y027 nolu “Atık Su Arıtma Çamurlarından Biyopolimer Elde Edilmesi için Ekstraksiyon Yöntemleri Geliştirilmesi ve Atıktan Geri Kazanılan Biyopolimerden Nanofiber Üretimi” isimli 1001 projesi ile tez çalışmalarımı destekleyen TÜBİTAK'a, teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, doktora tezimi kızım Neva'ya ve çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ithaf ediyorum...

# İÇİNDEKİLER

|                                                                          | <b><u>Sayfa</u></b> |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| ÖZET                                                                     | v                   |
| SUMMARY                                                                  | vi                  |
| TEŞEKKÜR                                                                 | vii                 |
| İÇİNDEKİLER                                                              | viii                |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ                                           | xi                  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                                          | xiii                |
| TABLolar DİZİNİ                                                          | xvi                 |
| <br>                                                                     |                     |
| 1. GİRİŞ                                                                 | 1                   |
| 1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği                                     | 2                   |
| 2. BİYOPOLİMER ÜRETİMİ                                                   | 3                   |
| 2.1. Giriş                                                               | 3                   |
| 2.2. Metodoloji                                                          | 7                   |
| 2.2.1. PHA biriktirme çalışmalarında SKR işletilmesi                     | 7                   |
| 2.2.2. Analiz yöntemleri                                                 | 9                   |
| 2.2.2.1. Biyokütlede PHB tayini                                          | 9                   |
| 2.2.2.2. Bakteriyel tanımlama                                            | 10                  |
| 2.2.3. Hesaplamalar                                                      | 11                  |
| 2.3. Sonuçlar ve Tartışma                                                | 11                  |
| 3. BİYOPOLİMER EKSTRAKSİYONU                                             | 14                  |
| 3.1. Giriş                                                               | 14                  |
| 3.1.1. Solvent ekstraksiyonu                                             | 14                  |
| 3.1.2. Süperkritik CO <sub>2</sub> destekli ile ekstraksiyon             | 16                  |
| 3.1.3. Hidrodinamik kavitasyon (HK) destekli ekstraksiyon                | 17                  |
| 3.2. Metodoloji                                                          | 20                  |
| 3.2.1. Solvent ekstraksiyonu için deney koşulları                        | 20                  |
| 3.2.2. Süperkritik CO <sub>2</sub> destekli ekstraksiyon deney koşulları | 21                  |
| 3.2.3. Hidrodinamik kavitasyon destekli ekstraksiyon deney koşulları     | 23                  |
| 3.2.4. Analiz yöntemleri                                                 | 25                  |
| 3.2.4.1. Biyopolimerlerin PHB saflığı                                    | 25                  |

|         |                                                                                                |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.4.2 | Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)                                             | 25 |
| 3.2.4.3 | Termogravimetrik analiz (TGA)                                                                  | 25 |
| 3.2.4.4 | Molekül ağırlığı tayini                                                                        | 25 |
| 3.2.5.  | Kullanılan kimyasal maddeler                                                                   | 26 |
| 3.2.6.  | Hesaplamalar                                                                                   | 26 |
| 3.3.    | Sonuçlar ve Tartışma                                                                           | 28 |
| 3.3.1.  | Solvent ekstraksiyonu ile aktif çamurdan PHA ekstraksiyonu                                     | 28 |
| 3.3.2.  | sCO <sub>2</sub> prosesi ile aktif çamurdan PHA ekstraksiyonu                                  | 29 |
| 3.3.3.  | sCO <sub>2</sub> prosesi ile aktif çamurdan ekstrakte edilen biyopolimerlerin karakterizasyonu | 34 |
| 3.3.4.  | HK prosesi ile aktif çamurdan PHA ekstraksiyonu                                                | 37 |
| 3.3.5.  | HK prosesi ile aktif çamurdan ekstrakte edilen biyopolimerlerin karakterizasyonu               | 43 |
| 3.3.6.  | Aktif çamurdan biyopolimer ekstraksiyonu yöntemlerinin karşılaştırılması                       | 45 |
| 4.      | BİYOPOLİMERDEN NANOFİBER ÜRETİMİ                                                               | 47 |
| 4.1.    | Giriş                                                                                          | 47 |
| 4.2.    | Metodoloji                                                                                     | 49 |
| 4.2.1.  | Elektroeğirme yöntemi deney koşulları                                                          | 49 |
| 4.2.2.  | Analiz yöntemleri                                                                              | 50 |
| 4.2.2.1 | Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)                                                        | 50 |
| 4.2.2.2 | Temas açısı                                                                                    | 51 |
| 4.2.2.3 | Taramalı elektron mikroskobu (SEM)                                                             | 51 |
| 4.2.2.4 | Çekme testleri                                                                                 | 51 |
| 4.3.    | Sonuçlar ve Tartışma                                                                           | 51 |
| 4.3.1.  | Ticari PHB kullanılarak nanofiber üretimi                                                      | 51 |
| 4.3.2.  | sCO <sub>2</sub> destekli ekstraksiyon ile elde edilen PHB kullanılarak nanofiber üretimi      | 55 |
| 4.3.3.  | Elde edilen nanofiberlerin karakterizasyonu                                                    | 60 |
| 4.3.3.1 | Temas açısı                                                                                    | 60 |
| 4.3.3.2 | Nanofiberlerin termal özellikleri                                                              | 60 |
| 4.3.3.3 | Nanofiberlerdeki fonksiyonel gruplar                                                           | 61 |
| 4.3.3.4 | Nanofiberlerin mekanik özellikleri                                                             | 62 |
| 5.      | SONUÇ ve ÖNERİLER                                                                              | 64 |

|           |    |
|-----------|----|
| KAYNAKLAR | 67 |
| ÖZGEÇMİŞ  | 77 |
| EKLER     | 78 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler ve

### Kisaltmalar

### Açıklamalar

|                 |                                                 |
|-----------------|-------------------------------------------------|
| $Y_{HK}$        | : Hidrodinamik kavitasyon proses verimi         |
| $Y_{SC}$        | : sCO <sub>2</sub> proses verimi                |
| $\varepsilon_b$ | : Kırılmadaki uzama                             |
| $\sigma$        | : Çekme mukavemeti                              |
| $\sigma_b$      | : Kopma gerilmesi                               |
| E               | : Çekme modülü                                  |
| AKM             | : Askıda Katı Madde                             |
| CDW             | : Hücre kuru ağırlığı                           |
| CO              | : Çözünmüş Oksijen                              |
| DMC             | : Dimetil karbonat                              |
| DSC             | : Diferansiyel taramalı kalorimetri             |
| FTIR            | : Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi   |
| GC-FID          | : Alev iyonlaştırma detektörlü Gaz Kromatografi |
| HK              | : Hidrodinamik kavitasyon                       |
| HV              | : 3-hidroksivalerat                             |
| KMK             | : Karışık mikrobiyal kültür                     |
| KOİ             | : Kimyasal Oksijen İhtiyacı                     |
| Lcl-PHA         | : Uzun zincir uzunlugundaki PHA                 |
| MAS             | : Maya endüstrisi atık suyu                     |
| Mcl-PHA         | : Orta zincir uzunluğundaki PHA                 |
| MDa             | : Mega dalton                                   |
| Mt              | : Milyon Ton                                    |
| Mv              | : Viskozimetrik molekül ağırlığı                |
| NPCM            | : Biyokütle kalıntıları                         |
| PAN             | : Poliakrilonitril                              |
| PE              | : Polietilen                                    |
| PHA             | : Polihidroksialkanoatlar                       |
| PHB             | : Poli(3-hidroksibütirat)                       |
| PHBV            | : 3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat        |

|                            |                                                     |
|----------------------------|-----------------------------------------------------|
| PLA                        | : Polilaktik asit                                   |
| PP                         | : Polipropilen                                      |
| PU                         | : Poliüretan                                        |
| PVA                        | : Polivinil alkol                                   |
| PVC                        | : Polivinilklorür                                   |
| PVDF                       | : Polivinilflorit                                   |
| Scl-PHA                    | : Kısa zincirli uzunluğundaki PHA                   |
| sCO <sub>2</sub>           | : Süperkritik karbondioksit prosesi                 |
| sCO <sub>2</sub> -<br>MeOH | : Metanol ilaveli süperkritik karbondioksit prosesi |
| SEM                        | : Taramalı Elektron Mikroskobu                      |
| SKR                        | : Sıralı Kesikli Reaktör                            |
| stdPHB                     | : Ticari PHB                                        |
| TGA                        | : Termogravimetrik analiz                           |
| UAKM                       | : Uçucu askıda katı madde                           |
| UYA                        | : Uçucu yağ asitleri                                |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <b><u>Şekil No:</u></b>                                                                                                | <b><u>Sayfa</u></b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1.1: Tez kapsamında yapılan çalışmalar için akım şeması.                                                               | 2                   |
| 2.1: PHA'ların genel yapısı ve türleri.                                                                                | 3                   |
| 2.2: PHA üretiminde kullanılan reaktör düzeneği.                                                                       | 9                   |
| 2.3: PHA'ların metanolizi ile elde edilen GC'de tespit edilen PHA markacı.                                             | 10                  |
| 2.4: Bakteriyel toplulukların reaktörde bulunma oranları.                                                              | 12                  |
| 2.5: PHA üretim reaktöründe $\text{CO}$ , $\text{KOİ}$ ve PHB takibi.                                                  | 12                  |
| 2.6: PHA üretim reaktöründen hasat edilen biyokütlelerdeki PHB içeriği dağılımı.                                       | 13                  |
| 3.1: Bakterilerde hücre duvarının yapısı a) Gram negatif b) Gram pozitif.                                              | 14                  |
| 3.2: Saf $\text{CO}_2$ için faz diyagramı.                                                                             | 17                  |
| 3.3: Kavitasyon sırasında oluşan termal, kimyasal ve mekanik etkiler.                                                  | 18                  |
| 3.4: Hidrodinamik kavitasyonda akış ve basınç değişimi.                                                                | 19                  |
| 3.5: Bir ventürde akış.                                                                                                | 19                  |
| 3.6: Orifis plakasının kullanıldığı bir hidrodinamik kavitasyon düzeneği şematik diyagramı.                            | 20                  |
| 3.7: Solvent ekstraksiyonu deney düzeneği.                                                                             | 21                  |
| 3.8: Süperkritik karbondioksit reaktörü.                                                                               | 22                  |
| 3.9: Süperkritik karbondioksit destekli ekstraksiyon deney düzeneği.                                                   | 23                  |
| 3.10: Hidrodinamik kavitasyon destekli ekstraksiyon deney düzeneği.                                                    | 24                  |
| 3.11: Orifis plakaları.                                                                                                | 24                  |
| 3.12: Solvent ekstraksiyonu prosesi ile elde edilen biyopolimerlerin ticari PHB ile karşılaştırmalı FTIR spektrumları. | 29                  |
| 3.13: Solvent ekstraksiyonu prosesi ile elde edilen biyopolimerlerin ticari PHB ile karşılaştırmalı TGA termogramları. | 29                  |
| 3.14: Proses parametrelerinin PHB salım verimine etkisi a) Kuru biyokütle b) Süre c) Basınç d) Sıcaklık.               | 31                  |
| 3.15: $\text{MeOH-sCO}_2$ prosesinde PHB salım verimi.                                                                 | 31                  |

|       |                                                                                                                                                            |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.16: | Farklı sCO <sub>2</sub> koşullarında elde edilen biyopolimer miktarları ve PHB saflığı a) Kuru biyokütle b) Süre c) Basınç d) Sıcaklık.                    | 32 |
| 3.17: | MeOH-sCO <sub>2</sub> prosesinde elde edilen biyopolimer miktarı ve PHB saflığı.                                                                           | 33 |
| 3.18: | sCO <sub>2</sub> prosesi ile PHA ekstraksiyonunda kullanılan biyokütlenin a) ekstraksiyon öncesi (x5000) b) ekstraksiyon sonrası SEM görüntüleri (x20000). | 34 |
| 3.19: | sCO <sub>2</sub> prosesi ile elde edilen biyopolimerler.                                                                                                   | 35 |
| 3.20: | sCO <sub>2</sub> prosesi ile elde edilen biyopolimerlerin ticari PHB ile karşılaştırmalı FTIR spektrumları.                                                | 36 |
| 3.21: | sCO <sub>2</sub> prosesi ile elde edilen biyopolimerlerin ticari PHB ile karşılaştırmalı TGA termogramları.                                                | 37 |
| 3.22: | HK prosesi ile PHA ekstraksiyonun proses mekanizması.                                                                                                      | 38 |
| 3.23: | Biyokütle çözeltisi katı yükünün HK destekli ekstraksiyon verimine etkisi.                                                                                 | 39 |
| 3.24: | Orifis-17 ile HK prosesinde basıncın ekstraksiyon verimine etkisi.                                                                                         | 40 |
| 3.25: | Orifis-1 ile HK prosesinde basıncın ekstraksiyon verimine etkisi.                                                                                          | 40 |
| 3.26: | HK destekli ekstraksiyon prosesinde kavitasyon sayısı.                                                                                                     | 41 |
| 3.27: | HK destekli PHA ekstraksiyonunda kullanılan biyokütlenin a) ekstraksiyon öncesi (x5000) b) ekstraksiyon sonrası SEM görüntüleri (x10000).                  | 42 |
| 3.28: | HK destekli ekstraksiyon çalışmalarında elde edilen biyopolimerler.                                                                                        | 43 |
| 3.29: | HK prosesi ile elde edilen biyopolimerlerin ticari PHB ile karşılaştırmalı FTIR spektrumları.                                                              | 44 |
| 3.30: | HK prosesi ile elde edilen biyopolimerlerin ticari PHB ile karşılaştırmalı TGA termogramları.                                                              | 44 |
| 4.1:  | Elektroeğirme deneyi için tipik bir düzenek.                                                                                                               | 48 |
| 4.2:  | Nanofiber üretiminde kullanılan elektroeğirme cihazı.                                                                                                      | 50 |
| 4.3:  | PHB-1 kodlu numunenin SEM görüntüleri a) x250, b) x500, c) x1000                                                                                           | 53 |

|       |                                                                                                                               |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4:  | PHB-2 kodlu numunenin SEM görüntüleri a) x250, b) x500, c) x1000                                                              | 53 |
| 4.5:  | PHB-3 kodlu numunenin SEM görüntüleri a) x250, b) x500, c) x1000                                                              | 54 |
| 4.6:  | PHB-3 kodlu nanofiberin görüntüsü.                                                                                            | 54 |
| 4.7:  | PHB-1,2,3 nanofiberlerinin FTIR spektrumları.                                                                                 | 55 |
| 4.8:  | PHB-R1 Nanofiberinin a) Fotoğrafı b) SEM görüntüsü x250 c) SEM görüntüsü x2000 d) nanofiberin ortalama $\varnothing$ grafiği. | 58 |
| 4.9:  | PHB-R2 Nanofiberinin a) Fotoğrafı b) SEM görüntüsü x250 c) SEM görüntüsü x2000 d) nanofiberin ortalama $\varnothing$ grafiği. | 58 |
| 4.10: | PHB-R5 Nanofiberinin a) Fotoğrafı b) SEM görüntüsü x250 c) SEM görüntüsü x2000 d) nanofiberin ortalama $\varnothing$ grafiği. | 59 |
| 4.11: | PHB-R5 Nanofiberinin a) Fotoğrafı b) SEM görüntüsü x250 c) SEM görüntüsü x2000 d) nanofiberin ortalama $\varnothing$ grafiği. | 59 |
| 4.12: | Temas açısı a) PHB-3 b) PHB-R2.                                                                                               | 60 |
| 4.13: | PHB-R2 ve PHB-3 'ün termal özellikleri a) DSC b) TGA termogramı.                                                              | 61 |
| 4.14: | PHB-R2 ve PHB-3'ün FTIR spektrumu.                                                                                            | 62 |
| 4.15: | Nanofiberlerin çekme mukavemeti-uzama grafiği.                                                                                | 63 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

| <b><u>Tablo No:</u></b>                                                                        | <b><u>Sayfa</u></b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2.1: PHA'ların sınıflandırılması ve fiziksel özellikleri.                                      | 4                   |
| 2.2: PHA'ların araştırılması ve üretimi ile ilgilenen uluslararası şirketler.                  | 5                   |
| 2.3: Maya endüstrisi atık suyu karakterizasyonu.                                               | 8                   |
| 3.1: Mikroorganizmalardan PHA ekstraksiyonu için kullanılan solventler.                        | 15                  |
| 3.2: Ekstraksiyon çalışmalarında elde edilen sonuçların karşılaştırılması.                     | 46                  |
| 4.1: Standart PHB ile nanofiber üretimi deney seti parametreleri.                              | 52                  |
| 4.2: sCO <sub>2</sub> ile ekstrakte edilen PHB polimeri ile nanofiber üretimi deney koşulları. | 56                  |
| 4.3: PHB kullanılarak üretilen nanofiberlerin üretim ve ürün özelliklerinin karşılaştırılması. | 57                  |
| 4.4: PHB-R2 Nanofiberinin çekme testi sonuçları.                                               | 63                  |

# 1. GİRİŞ

Günümüzde her alanda kullanılan plastiklerin aslında yaygınlaşmaya başlaması yakın geçmişe, 1950'lere dayanmaktadır [1]. Plastiklerin hammaddesi fosil hidrokarbonlar olması sebebiyle doğada biyolojik olarak parçalanamazlar. Düzenli depolama sahalarında ya da yakma işlemleri ile bertaraf edilebilirler. Bertaraf edilmeyen plastik atıklar ise doğaya saçılmaktadır. Plastik kullanımının günümüze kadar olan artış hızı ile devam edeceği düşünüldüğünde 2050 yılında 9050 Mt plastik atık geri dönüştürüleceği, 12.000 Mt yakılacağı ve 12.000 Mt düzenli depolama sahalarında depolanacağı ya da doğaya yayılacağı tahmin edilmektedir[1]. Son zamanlarda geri dönüşüm proseslerine verilen önem ve toplumda farkındalık oluşmasına rağmen kullanılmaktan vazgeçilemeyen plastikler için doğaya dost alternatifler bulunması gereklidir. Bu kapsamda biyopolimerler ön plana çıkmaktadır.

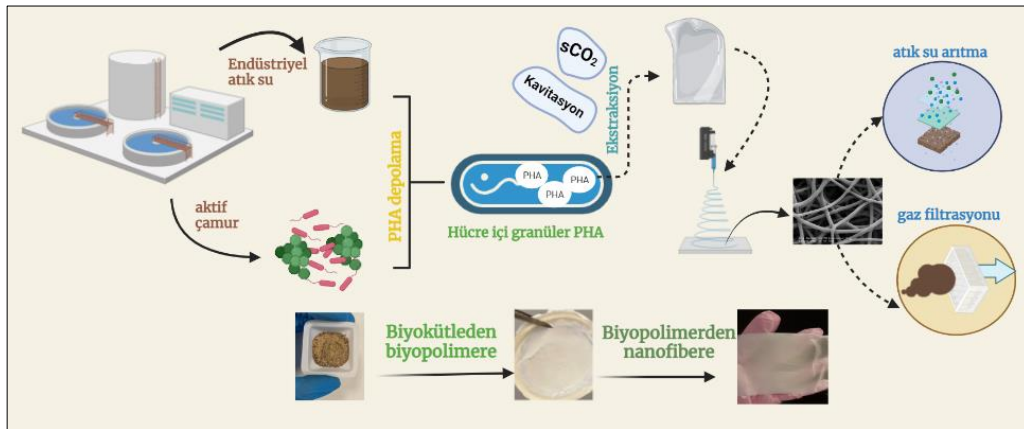
Biyopolimerler temel olarak biyo-bazlı ve/veya biyobozunur olarak sınıflandırılır. Tüm biyo-bazlı plastikler biyo-bozunur değildir ve benzer şekilde tüm biyo-bozunur plastikler de biyo-bazlı değildir. Karbon yapı taşına göre biyo-bazlı olarak adlandırılırken, doğru çevre koşullarında ve mikroorganizmalar tarafından parçalanabildiklerinde biyo-bozunur olarak adlandırılırlar. Örneğin; polietilen (PE), polipropilen (PP) ve polivinilklorür (PVC) gibi petrol bazlı üretilen ve küresel anlamda çok yaygın kullanıma sahip ticari plastikler de yenilenebilir kaynaklardan elde edilmektedir fakat biyo-bozunur değildir. Biyo-bazlı ve biyo-bozunur plastikler sınıfında ise nişasta ve selüloz türevleri, polilaktik asit (PLA) ve polihidroksialkanoatlar (PHA) ön plana çıkmaktadır [2].

PHA'lar petrol türevli olan polimerlere benzerlikleri ile dikkat çekmektedir ve biyomedikal implantlarda, biyokompozitlerde, tekstilde ve paketleme malzemelerinde uygulama alanı bulmaktadır [3]. Buna rağmen, PHA üretiminin, petrol türevli plastiklerin üretiminden daha pahalı olması (PHA için 2,2–5 €/kg iken petrol türevi polimerler için < 1 €/kg) sebebiyle kullanım alanları kısıtlı kalmaktadır [4]. Üretim maliyetinin fazla olmasındaki en önemli sebeplerden biri glukoz, fruktoz, propiyonik asit gibi saf substratların kullanılmasıdır [5], [6]. Üretim maliyetini azaltmak için atıkların değerlendirilmesi ön plana çıkmaktadır ve bu sayede PHA üretim maliyeti %40-50 oranında azaltılabilmektedir [3]. PHA'ların elde edilme prosesindeki diğer önemli basamak ise hücrede sitoplazmada granüler halde bulunan PHA'nın

ekstraksiyon/safılaştırma aşamasıdır. Bu aşamada da maaliyet gereksinimleri ve elde edilmek istenen ürünün uygulama alanına göre saflığı da gözönüne alınarak yönlendirilen çalışmalar devam etmektedir. Elde edilen PHA'ların mekanik özelliklerinin, PHA bazlı nanofiberler elde edilerek iyileştirilmesi, bu malzemelerin daha geniş kullanım alanı bulmasına da katkı sağlamaktadır. Atıkların değerlendirilerek PHA üretilmesi ve bu polimerler kullanılarak nanofiber elde edilmesi çalışmaları da sürdürülebilir biyoekonomi çerçevesinde, sürdürülebilir bir gelecek için önemli sonuçlar ortaya çıkarmaktadır.

## 1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tezin amacı, mikroorganizmaların depoladıkları PHA'yı hücre dışına çıkarabilmek için, solvent ekstraksiyonuna alternatif olarak kullanılabilecek yenilikçi yöntemler geliştirilmesidir. Atık değerlendirme konseptinden yola çıkarak, aktif çamur sisteminden alınan karışık kültür mikroorganizma, maya endüstrisi atık suyu ile uygun koşullarda beslenerek PHA depolayan biyokütle hasat edilmiş ve kurutulularak bu çalışma kapsamındaki ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılmıştır. Ekstraksiyonda, yeşil teknoloji kapsamında olan süperkritik karbondioksit destekli ekstraksiyon ve hidrodinamik kavitasyon destekli ekstraksiyon yöntemleri ile bu yöntemlere referans olması aşıısından solvent ekstraksiyonu uygulanmıştır. Elde edilen biyopolimerler ile nanofiber üretimi yapılmıştır. Üretilen nanofiberlerin malzeme karakterizasyonu yapılarak, kullanılabilecek uygulama alanları değerlendirilmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmalar için akım şeması şekil 1.1'de verilmiştir.



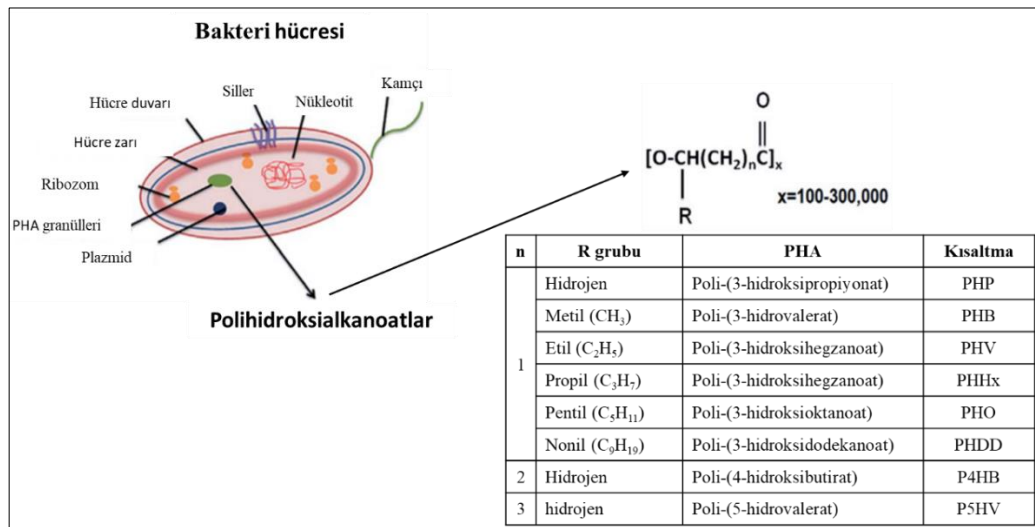
şekil 1.1 : Tez kapsamında yapılan çalışmalar için akım şeması.

## 2. BİYOPOLİMER ÜRETİMİ

### 2.1. Giriş

Birçok endüstriyel süreç, atıkları değerli ürünlere veya enerji kaynaklarına dönüştürmeye çalışmaktadır. Atık değerlendirme ürünleri olarak en çok araştırılan biyopolimerler PHA'lardır [7], [8]. PHA'lar çeşitli mikrobiyal türler tarafından üretilir ve genellikle nütrient eksikliği koşullarında karbon rezervleri olarak biriktirilir. Nütrient ihtiyacı sağlandığında ise biriken PHA hücreler tarafından büyümeleri için kullanılır. PHA'lar hücrelerin içinde granüller halinde birikir ve miktarları hücre kuru ağırlığının (CDW) %1 ila %90'ı arasında değişebilir [9].

PHA'lar 3-, 4-, 5- ve 6-hidroksialkanoik asitlerin polyesterleridir ve genel yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir [10]. PHA'lar zincirdeki karbon sayılarına göre kısa, orta ve uzun (scl, mcl, lcl) zincirli olmak üzere 3 sınıfta incelenmektedir 5 karbondan az olanlar scl, 5-14 karbonlular mcl, 14 karbondan fazla olanlar ise lcl olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 2.1) [11]. 3-hidroksivalerat ve 3-hidroksibütirat scl-PHA'ya, 3-hidroksidekanoat mcl-PHA'ya örnek verilebilir [12]. Mcl-PHA'lar ve scl-PHA'ların özellikleri birbirinden farklıdır. scl-PHA'lar kırılğan ve erime noktaları 173-180°C arasında iken mcl-PHA'ların erime noktaları daha düşük 39-61°C ve kristallikleri daha düşük olduğundan scl-PHA'lara göre daha esnektirler [13].



Şekil 2.1:PHA'ların genel yapısı ve türleri.

PHA'ların en yaygın temsilcisi poli(3-hidroksibütirat) veya PHB'dir. PHB yüksek oranda kristal yapıdadır ve yüksek kırılgenanlığı nedeniyle zayıf mekanik özellikleri olması birçok uygulamada kullanımını engellenmektedir. Öte yandan, tüm PHA kopolimerleri arasında en umut verici malzemelerden biri, PHB biyopolimerine 3-hidroksivalerat (HV) birimlerinin eklenmesinden kaynaklanan ve genellikle PHBV veya PHBHV olarak kısaltılan poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) biyopolimeridir[10]. PHA'ların araştırılması ve üretimi ile ilgilenen uluslararası şirketlerden bazıları Tablo 2.2'de özetlenmiştir [10], [14].

Tablo 2.1: PHA'ların sınıflandırılması ve fiziksel özellikleri.

| <b>Tür</b>                            | <b>C atomu sayısı</b> | <b>Fiziksel özellik</b>                |
|---------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------|
| scl-PHA (kısa zincirli PHA)           | 3-5                   | Termoplastik, sert kırılgen ve kristal |
| mcl-PHA (orta uzunlukta zincirli PHA) | 6-14                  | Esnek ve düşük kristallik              |
| lclPHA (uzun zincirli PHA)            | >14                   | -                                      |

Tablo 2.2: PHA'ların araştırılması ve üretimi ile ilgilenen uluslararası şirketler.

| Ürün adı | PHA türü                 | Firma adı                            | Uygulama                   |
|----------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| Biopol   | P(3HB-co-3HV)            | Matabolix, ABD                       | Paketleme                  |
| Nodax    | P(3HB-co-3HHx)           | Procter&Gamble, ABD                  | Paketleme                  |
| ENMAT    | P(3HB-co-3HV)            | Tianan Biologic Material, Çin        | Hammadde                   |
| -        | -                        | Tepha, ABD                           | Medikal implant            |
| -        | P(3HB)                   | Chemie Linz, Avusturya               | Paketleme ve ilaç taşınımı |
| Biomer   | P(3HB)                   | Biotechnology Co., Almanya           | Paketleme ve ilaç taşınımı |
| Biogreen | P(3HB)                   | Mitsubishi GAS Chemical, Japonya     | Paketleme                  |
| -        | -                        | Bio-On, İtalya                       | Hammadde                   |
| -        | P(3HB),<br>P(3HB-co-3HV) | BASF, Almanya                        | Ecoflex ile karışım        |
| Biocycle | P(3HB)                   | PHB Industrial S/A company, Brezilya | Hammadde                   |
| -        | P(3HB-co-4HB)            | Tianjin Green Bioscience, Çin        | Hammadde ve Paketleme      |

PHA üretim süreci temel olarak üç adımdan oluşmaktadır: 1) Fermentasyon aşaması; PHA üretimi için en çok tercih edilen substratlar olan uçucu yağ asitlerinin (UYA) üretimi, 2) Zenginleştirme: organik karbon giderme işlemi yoluyla PHA biriktiren mikroorganizmaların çoğaltıldığı aşama 3) Biriktirme: PHA açısından zengin biyokütlenin hasat edildiği aşama [15]. Zenginleştirme aşamasının işleyişi PHA birikim verimliliğini etkilemektedir ve temel amacı, PHA depolayan kültürü mümkün olan en yüksek verimlilikte çalıştırmaktır [16]. Bu aşamada genellikle bolluk/kıtlık prensibi uygulanır. Substrat varlığında mikroorganizmalar bu substratı depolama ya da üreme amaçları için kullanabilirler. Eğer ortam koşulları üreme için uygun değilse, örneğin; gerekli nütrientler ya da enzimler ortamda yoksa, substratı depolamaya başlarlar. Tüm substrat kaynakları bittiğinde ise depoladıklarını kullanmaya başlarlar. Çalışmalar aerobik şartlarda bolluk/kıtlık rejimi uygulanarak bakterilerin PHA depolama kapasitelerinin arttığını göstermiştir [17]. Kıtlık döneminde üreme için gerekli hücre içi bileşenler ve enzimler azalır ve bu dönemin ardından gelen bolluk döneminde ise fazla substratı hemen bünyelerine alırlar. Ama üreme için gerekli hücre içi bileşenler hala maksimuma ulaşmadıkları için üreme olmaz bunun yerine depolanan substrat hücre büyümesi ve gelişimi için kullanılır. Bu sebeple bolluk/kıtlık rejiminde işletilen bir proseste mikroorganizmaların PHA depolamaları arttırılmaktadır.

Polimer depolama verimi reaktörde işletme şartlarına (substrat konsantrasyonu, organik yükleme hızı, karbon/azot oranı, çamur bekletme süresi, pH ve sıcaklık) göre farklılık göstermektedir. Substrat konsantrasyonu ve PHA depolama veriminin doğru orantılı olduğu [18], [19] ve kısa çamur bekletme sürelerinin uzun sürelerle göre daha verimli olduğu [20] yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bunun yanında bazı çalışmalarda kısıtlı nütrient ortamında (C/N oranı yüksek) PHA depolama veriminin daha yüksek olduğu görülürken [21] bazı çalışmalarda ise bu oranın pek de etkili olmadığı görülmüştür [22]. Depolama verimini ve biyopolimerin özelliklerini etkileyen parametrelerden biri de substrat türüdür. Ucuz karbon kaynakları (peyniraltı suyu, nişasta, malt, soya atıkları) kullanılarak PHA'lar depolanabilir. Fakat şekerli hammaddeler hücrelerde doğrudan PHA olarak depolanamadığından öncelikle fermante edilmeleri gereklidir. Mikroorganizmalar karbonu bünyelerine uçucu yağ asitlerinden alarak PHA depolarlar. Bu da yapılan birçok çalışmada neden organik asitlerin kullanıldığının bir göstergesidir [23].

Literatürde yer alan çalışmaların çoğunda, biyopolimer üretimi için asetat, valerat, propiyonat, bütirat veya laktat gibi organik asitlerden oluşan sentetik substratlar ve saf mikroorganizma kültürleri kullanılmaktadır [24], [25]. Sentetik substratlar ve saf mikrobiyal kültürler ile yüksek PHA içeriği elde edilse de endüstriyel atık sular ve aktif çamur, PHA üretimi için düşük maliyetli alternatifler olarak gündemdedir.

PHA'ların üretiminde *Cupriavidus sp*, *Ralstonia eutropha*, *Bacillus cereus*, ve *Bacillus megaterium* gibi birçok saf kültür kullanılmıştır [26].Yapılan çalışmalar, karışık mikrobiyal kültürün (KMK) saf kültürle benzer PHA içerikleri (%30-80) ürettiğini göstermiştir [27], [28]. Bununla birlikte, zenginleştirme için atık su kullanılan çalışmalardan narenciye atık suyu ile %38 PHA, [29] şarap atık su ile %23 PHA [30] ve ahşap hidrolizatları ile %27 PHA [31] içeriği elde edilmiştir. Ayrıca, Bhalerao ve arkadaşları [24] zenginleştirme reaktöründe sentetik ortam ve biriktirme reaktöründe maya endüstrisi atık suyu kullanarak %72 PHA biriktirme verimi elde etmiştir. Ospina-Betancourth ve arkadaşları ise [32] maya endüstrisi aktif çamuru ile hem zenginleştirme hem de biriktirme reaktörlerinde sentetik ortam kullanarak %17 PHB biriktirme verimi elde etmiştir.

Tez çalışmasının bu bölümünde, ekstraksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere gerekli olan PHA depolamış biyokütlenin elde edilmesi için, tek aşamalı reaktör sistemi kullanılmıştır. Zengin UYA içeriği nedeniyle anaerobik olarak arıtılmış bir maya endüstrisi atık suyu (MAS) besleme akışı olarak kullanılmıştır.

## **2.2. Metodoloji**

### **2.2.1. PHA biriktirme çalışmalarında SKR işletilmesi**

Çalışmalarda kullanılan aktif çamur Kocaeli'de bulunan bir maya üretim endüstrisi atık su arıtma tesisinin havalandırma tankından alınmıştır. Substrat olarak ise aynı tesisin anaerobik arıtma tankından alınan çıkış suyu kullanılmıştır. Atık su karakterizasyonu Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3: Maya endüstrisi atık suyu karakterizasyonu.

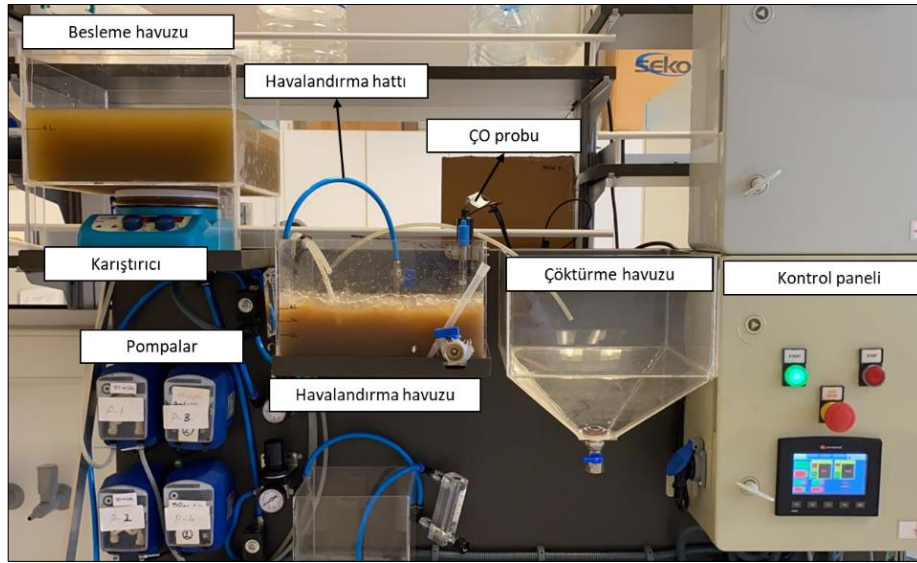
| Parametre                              | Değer     |
|----------------------------------------|-----------|
| pH                                     | 7.5-7.88  |
| Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) (mg/L) | 2500-3430 |
| $\Sigma N$ (mg/L)                      | 100-200   |
| $\Sigma P$ (mg/L)                      | 6.7-21.9  |
| Askıda katı madde (AKM) (mg/L)         | 450-500   |
| $\Sigma$ UYA (mg/L)                    | 950-3000  |
| Asetik asit                            | 90%       |
| Bütirik asit                           | 3%        |
| Izobütirik asit                        | 2%        |
| i-valerik asit                         | 1%        |
| Valerik asit                           | 1%        |

Bu doktora tezinin yürütüldüğü çalışma grubunun öncü çalışmalarında, farklı çamur yaşları ve organik yüklemeler ile yapılan biriktirme denemelerinde çamur yaşı 4 gün ve organik yükleme hızı 2 g KOİ/L.gün olan reaktörde en yüksek PHB depolama verimi elde edilmiştir [33]. Bu sebeple, bu çalışma kapsamında gerekli olan PHA depolamış biyokütlenin elde edilmesi için çamur yaşı 4 gün olan reaktör işletilmeye ve çamur hasat edilmeye devam edilmiştir.

Şekil 2.2’de görülen reaktör düzeneğinde, besleme zamanı geldiğinde, atık su besleme tankına doldurularak pompalar yardımıyla havalandırma havuzuna beslenmiştir. Havalandırma havuzu 2 g KOİ/L.gün organik yüküyle 24 saatlik döngü süresinde çalıştırılmıştır. Besleme, aerobik ve çamur deşarjı aşamalarından oluşan reaktör işletimi süresince çöktürme aşaması gerçekleştirilmemiş ve fazla biyokütle karışık likör ile uzaklaştırılmıştır. Havalandırma reaktöründe çözünmüş oksijen (ÇO), bir ÇO probu (Hamilton, VisiWater DO P Arc 120 FC10) kullanılarak gerçek zamanlı olarak izlenmiştir. Pompalar substrat beslemesi ve atık su/çamur deşarjı için kullanılmıştır. Reaktörü substrat konsantrasyonundaki dalgalanmalardan korumak ve sabit bir KOİ sağlamak için, atık suya, beslemeden önce gerekli miktarda sodyum asetat takviyesi yapılmıştır. MAS’ın UYA konsantrasyonunun %90 oranında asetik aside bağlı olduğu göz önüne alınmıştır. İşlem sırasında, MAS’daki karbon, azot ve

fosfor oranı (360/15/1) mikrobiyal büyüme için yeterli olduğundan ekstra besin maddesi veya eser element eklenmemiş veya takibi yapılmamıştır.

Mikroorganizma konsantrasyonu, askıda ve uçucu askıda katı madde analizleri ile (AKM ve UAKM) takip edilmiştir. Ayrıca, her döngüde substrat tüketimini analiz etmek için KOİ tayini yapılmıştır. Bolluk döneminin sonunu da işaret eden substrat tükenme zamanı, ÇO profili ile tespit edilmiştir. Bolluk süresinin sonunda alınan biyokütlede PHB içeriği analiz edilmiştir.



Şekil 2.2: PHA üretiminde kullanılan reaktör düzeneği.

## 2.2.2. Analiz yöntemleri

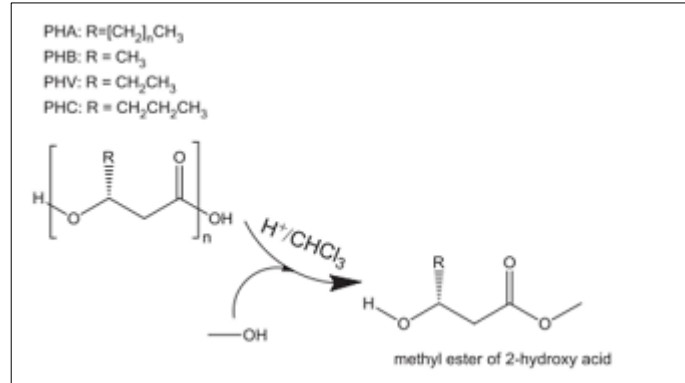
Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ), askıda katı madde (AKM) ve uçucu askıda katı madde (UAKM) standard metot prosedürüne göre yapılmıştır [34].

### 2.2.2.1 Biyokütlede PHB tayini

GC-FID’de PHB tayini için metanoliz yöntemi kullanılmıştır. Metanoliz, granüler polimer ya da liyofilize biyokütlenin asidik metanol çözeltisi (%1-4 w/v) ile solvent olarak kloroform varlığında 4-8 saat ısıtılıp işlem görmesine, ardından faz ayrımında su kullanılarak organik fazın analiz edilmesi işlemine dayanır. Şekil 2.3’de PHA’ların metanolizi ile elde edilerek GC’de analiz edilebilen tür görülmektedir [35].

Bu analizde uygulanan yöntem şu şekildedir: %3 (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 25 mg benzoik asit metanolde hazırlanarak, parçalama çözeltisi elde edilir. 10 mg kuru biyokütle 5 mL'lik basınca dayanıklı bir viale koyulur. Üzerine 2 mL parçalama çözeltisi ve 2 mL kloroform eklenir. Kapağı kapatılan vial 100 C'de 3,5 saat ısıtılır. Termal işlem sonrasında vial oda sıcaklığına geldikten sonra 2 mL distile su eklenir ve vial çalkalanır. Vial birkaç dk faz ayrımı için bekletilir. Son olarak organik faz GC vialine alınarak analize hazır hale gelmiş olur. GC sıcaklık metodu ise literatürde kullanılan birçok metot ile benzer çalışmalar yapıldıktan sonra belirlenmiş olup, şu şekildedir: Fırın başlangıç sıcaklığı 80°C (1 dk), 20°C/dk yükselişle 160°C'ye (1 dk), 10°C/dk yükselişle 240°C'ye (2 dk). GC-FID'de Carbowax kolon (30 m, 0,53 mm) kullanılmıştır.

GC-FID'de PHB kalibrasyon aralığı 1-8 mg olarak belirlenmiştir. Buna göre standartlar parçalamanın yapılacağı tüplere 1-2-4-6-8 mg olacak şekilde tartılarak 2 mL parçalama çözeltisi ve 2 mL kloroform eklendikten sonra 105°C'de 3,5 saat ısıtıl işlem uygulanmıştır. Tüpler, çeker ocak içinde oda sıcaklığına geldikten sonra 2 mL saf su ekleyip çalkalanmış ve faz ayrımı için bırakılmıştır. Faz ayrımı görülünce, altta kalan organik faz pastör pipeti ile GC viallerine aktarılmış ve analiz edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi ve analiz detayları Ek C'de verilmiştir.



Şekil 2.3: PHA'ların metanolizi ile elde edilen GC'de tespit edilen PHA markacı.

## 2.2.2.2 Bakteriyel tanımlama

En yüksek PHB depolama veriminin alındığı durumda ortamdaki baskın bakteri türünü tanımlamak amacıyla bakteriyolojik analiz yapılmıştır.

Mikroorganizmaların izolasyonu, izolatların korunması ve aktivasyonu, DNA izolasyonu, 16S/ITS PCR ve filogenetik analiz Aquatayf Biyoteknoloji Laboratuvarlarında (İTÜ Teknokent, İstanbul, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Türleri ayırt etmek için Sanger dizilemesinden elde edilen Forward ve Reverse dizileri NCBI BLAST ile karşılaştırılmış ve BioEdit dizi hizalama editörü v7.2.5 (12/11/2013) ile hizalanmıştır. Filogenetik ağaç inşası, MEGA-X sürüm 11.0.8'de (TamuraNixon, 202113 Rossi RJ, 2018) 1000 bootstrap replikasyonu ile Maksimum Olabilirlik-Likelihood yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Filogenetik analizler Aquatayf Biyoteknoloji Laboratuvarları, İstanbul, Türkiye tarafından tamamlanmıştır. Sanger dizilimi NCBI BLAST ile karşılaştırılmış ve BioEdit dizi hizalama editörü v7.2.5 (12/11/2013) ile hizalanmıştır. MEGA-X sürüm 10.2.2. Filogenetik analiz için komşu-birleştirme yöntemi ve 1000 bootstrap değeri kullanılmıştır.

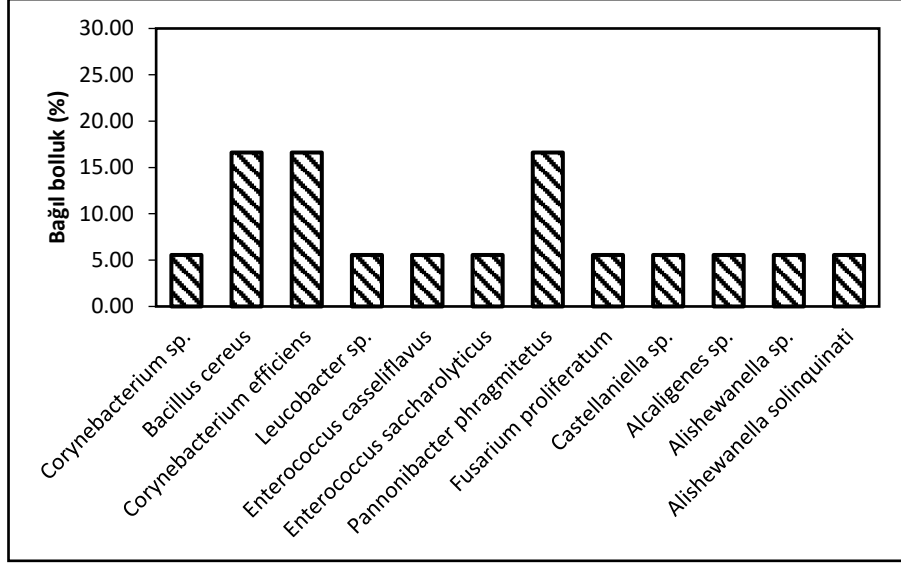
### 2.2.3. Hesaplamalar

Biyokütlerdeki PHB içeriği Eşitlik 2.1'e göre hesaplanmıştır. Burada  $m_{PHB}$ ; GC'de tayin edilen PHB ve  $m_{biyokütle}$ ; GC'de analiz için parçalama reaksiyonunda kullanılan biyokütle miktarıdır (10 mg).

$$PHB \text{ içeriği (\%)} = \frac{m_{PHB}}{m_{biyokütle}} \times 100 \quad (2.1)$$

### 2.3. Sonuçlar ve Tartışma

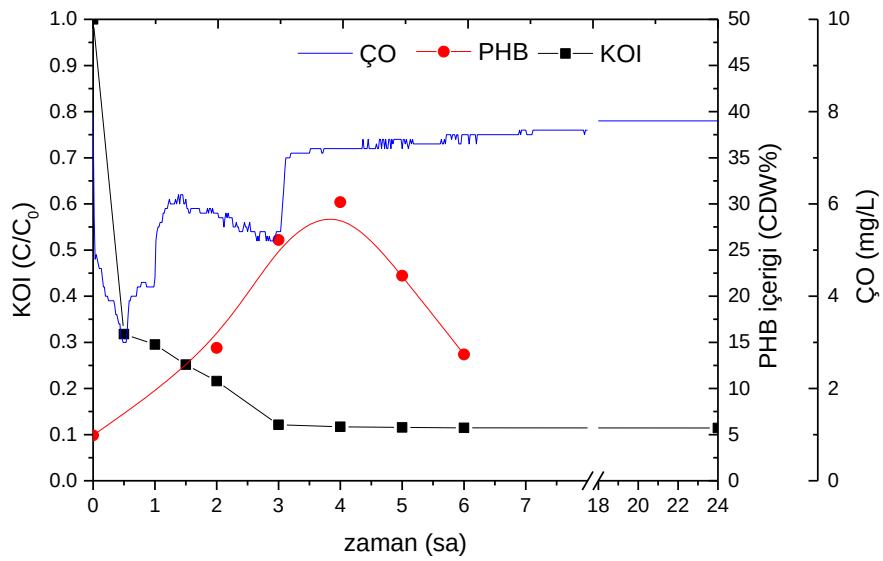
Bu çalışmada en yüksek PHB içeriğine sahip biyokütlerdeki mikrobiyal topluluğun kompozisyonunu tanımlamak için çamur yaşı 4 gün olan 2 g KOİ/L.gün organik yükleme koşullarında çalışan reaktörde, 3 aylık işletme süresinden sonra bakteri topluluğu analizi yapılmıştır. Reaktördeki bakteri dağılımına göre (Şekil 2.4) *Bacillus cereus*, *Corynebacterium efficiens* ve *Pannonibacter phragmitetus* olmak üzere üç farklı baskın tür elde edilmiştir. Reaktörün bu üç bakteri ile yaklaşık %45 oranında zenginleştirildiği söylenebilir (her biri reaktörde %15 bolluكتadır).



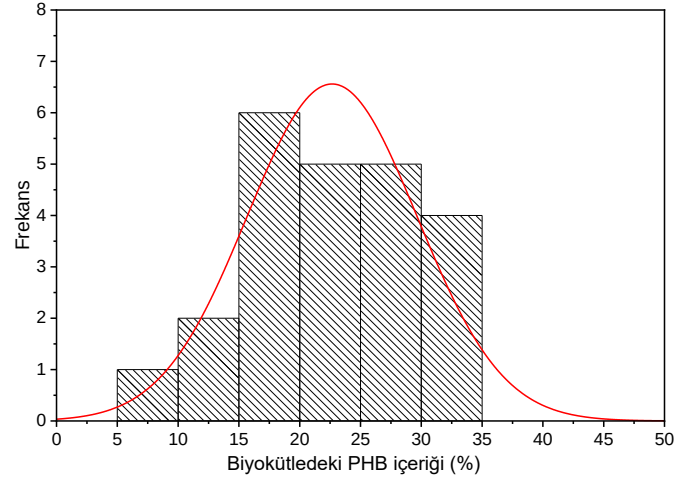
Şekil 2.4: Bakteriyel toplulukların reaktörde bulunma oranları.

Şekil 2.5’de KOİ ve AKM bakımından dengeye gelmiş reaktörde, ÇO, KOİ ve PHB içeriğinin 24 saatlik döngü boyunca değişimi görülmektedir. AKM’nin 2730 mg/L, UAKM’nin 1430 mg/L olduğu reaktörde PHB içeriği %30,18 olarak elde edilmiştir.

PHA üretim çalışmalarının devam ettiği süre boyunca reaktörden hasat edilen ve PHB içeriği dağılımı Şekil 2.6’da verilen çamurlar liyofilizasyon yöntemi ile kurutularak muhafaza edilmiş ve ekstraksiyon çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 2.5: PHA üretim reaktöründe ÇO, KOİ ve PHB takibi.

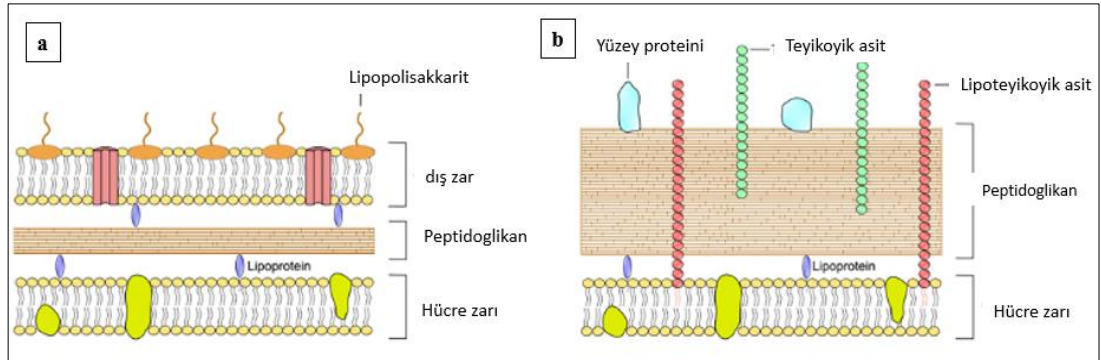


Şekil 2.6: PHA üretim reaktöründen hasat edilen biyokütlelerdeki PHB içeriği dağılımı.

## 3. BİYOPOLİMER EKSTRAKSİYONU

### 3.1. Giriş

PHA ekstraksiyonu, hücrede depolanan PHA'nın hücre dışında çıkarılması için uygulanan ayırma prosesleridir. Bu proses PHA depolamada kullanılan mikroorganizma türüne ve substrat çeşidine farklılıklar göstermektedir [11]. Hücre içinde granüler yapıda olan PHA'yı hücre dışında çıkarabilmek için öncelikle hücrenin parçalanması ve sonra da parçalama sonrası ortaya çıkan diğer bileşenlerden PHA'nın ayrılması gerekir. Hücrenin yapısı polipeptitler, DNA, RNA ve peptidoglikandan oluştuğu için hücrenin parçalanması ile ortama PHA ile birlikte bu bileşenler de salınmaktadır (Şekil 3.1). [36]. PHA haricindeki bu maddeler literatürde biyokütle kalıntıları (NPCM) olarak adlandırılmaktadır [11]. PHA'yı bu bileşenler arasından ayırmak için ise iki yöntem vardır: PHA'nın çözündürülmesi ve biyokütle kalıntılarının çöktürülmesi [37]. Ekstraksiyon metotları da bu yöntemler üzerine yoğunlaşmaktadır.



Şekil 3.1: Bakterilerde hücre duvarının yapısı a) Gram negatif b) Gram pozitif.

Bu tez kapsamında kullanılan ekstraksiyon yöntemleri aşağıda özetlenmiştir:

#### 3.1.1. Solvent ekstraksiyonu

Solvent ekstraksiyonunda amaç önce hücre membranı geçirimsizliğini değiştirmek sonra da PHA'yı çözmektir. Bu amaçla kloroform gibi halojenli solventler, sikloheksan,  $\gamma$ -butirolaktan gibi halojensiz solventler ve etilen karbonat, dimetil karbonat gibi yeşil solventler kullanılmaktadır (Tablo 3.1). PHA ekstraksiyonu

sonrası, yüksek saflıkta polimerin çöktürülmesi için de düşük molekül ağırlıklı alkoller (metanol, etanol gibi) kullanılmaktadır.

Tablo 3.1: Mikroorganizmalardan PHA ekstraksiyonu için kullanılan solventler.

| Solvent                | Ekstrakte edilen kültür | PHA içeriği (%) | Geri kazanım verimi (%) | PHA saflık (%) | Mw (MDa)  | Ref. |
|------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------|----------------|-----------|------|
| DMC                    | KMK                     | 50              | 50                      | 97             | -         | [38] |
| DMC                    | <i>C.necator</i>        | 50              | 86                      | 98             | 1,2       | [38] |
| DMC                    | <i>E. coli</i>          | -               | 69 (PHB)                | 88 (PHB)       | 0,23      | [39] |
| Kloroform              | <i>E. coli</i>          | -               | 69 (PHB)                | 80 (PHB)       | 0,35      | [39] |
| NaOH                   | KMK                     | 70              | 100                     | 102            | 0,245     | [40] |
| NaClO                  | KMK                     | 70              | 100                     | 99             | 0,245     | [40] |
| Etilen karbonat        | <i>C. necator</i>       | -               | 99 (PHB)                | 98 (PHB)       | 1,3       | [41] |
| Kloroform              | <i>C. necator</i>       | -               | 96 (PHB)                | 99 (PHB)       | 1,0       | [42] |
| Bütil asetat           | <i>C.necator</i>        | -               | 96 (PHB)                | 99 (PHB)       | 1,4       | [42] |
| NH4-Laurate            | KMK                     | 52 (PHB)        | 75 (PHB)                | 100 (PHB)      | 0,09-0,14 | [6]  |
| Propilen karbonat      | <i>C.necator</i>        | 71              | 95                      | 84             | 0,22-0,74 | [43] |
| Kloroform              | <i>C.necator</i>        | 71 (PHB)        | 96 (PHB)                | 95(PHB)        | 1,0       | [43] |
| Kloroform              | <i>C.necator</i>        | 82              | -                       | -              | 0,22      | [44] |
| Siklohegzan            | <i>C.necator</i>        |                 | 95                      |                | 0,21      | [44] |
| $\gamma$ -butirolaktan | <i>C.necator</i>        |                 | 50                      |                | 0,21      | [44] |

Kloroform yukarıda bahsedilen solventler arasında, yüksek PHA ekstraksiyon verimi sağlaması sebebiyle en çok kullanılan solventtir. Kloroform ile yapılan birçok çalışmada geri kazanım verimi %95'e ulaşmaktadır. Fakat kloroformun toksik özellikleri sebebiyle, alternatif olabilecek solventler araştırılmaktadır. Bunlar arasında dimetil karbonat (DMC), çözücü olarak çok yönlülüğü ve insan sağlığı için düşük toksisitesi nedeniyle kimya endüstrisinde giderek daha önemli hale gelmiştir [45]. DMC biyolojik olarak parçalanabilir, tahriş edici değildir ve fotokimyasal duman oluşumunda ihmal edilebilir bir reaktiviteye sahiptir. Bu nedenle uçucu organik bileşikler listesinden çıkarılmıştır [39]. Bu özelliklerinden dolayı DMC, PHB

ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılan kloroforma alternatif bir çözücü olarak seçilmiştir.

Solvent ekstraksiyonu için alternatif kimyasal madde araştırılması çalışmaları devam ederken, aslında ekstraksiyon için (biyokütlenin 20 katına varan oranlarda) ve PHA'nın saflaştırılması için (PHA'nın 10 katına varan oranlarda) yüksek miktarlarda solvent kullanılması gerekliliği ve laboratuvar koşullarında kullanılan sokslet ekstraktörünün endüstriyel boyutlarda kullanımının uygun olmaması, solvent ekstraksiyonun kullanımını kısıtlamaktadır [46].

### 3.1.2. Süperkritik CO<sub>2</sub> destekli ekstraksiyon

Akışkanlar kritik sıcaklık ve basınç koşulları altında süperkritik akışkanlar haline gelirler. Süperkritik akışkanlar (SKA) bu şartlar altında sıvı-gaz özellikleri gösterirler ve karakteristik özellikleri değişir. SKA gazlara göre yüksek yoğunluklu ve sıvılara göre ise daha düşük viskoziteye sahiptirler [47]. Ayrıca yüksek difüzyon hızları nedeniyle katı maddelerin içine kolayca nüfuz ederek çözünmelerini sağlar[48]. Basıncıdaki küçük değişiklikler SKA'nın yoğunluğunda ve çözünürlüğünde önemli değişikliklere yol açabilir [49]. Bu özellikleri sebebiyle süperkritik akışkanlar, ekstraksiyonda kullanıma uygundur. SKA reaktörleri de süperkritik koşullara ulaşmak için gereken sıcaklığı kritik sıcaklığın üzerinde tutmak için bir ısıtıcı ve kritik basıncını sağlamak için gerekli bir pompadan oluşurlar.

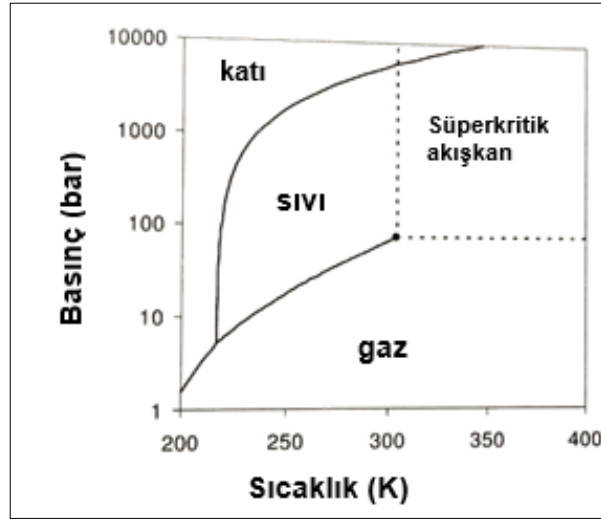
Klasik ekstraksiyon yöntemi olan solvent ekstraksiyonunda organik çözücü gerekliliği, ekstraksiyon süresinin uzun olması ve maliyetinin fazla olması gibi dezavantajları, daha çevreci bir yöntem olarak tanımlanabilecek olan SKA ekstraksiyon teknolojisinin ön plana çıkmasını sağlayan özellikleridir.

Süperkritik akışkan fazında kullanılan solventlerden bazıları; karbondioksit, metanol, etanol, n-bütanol, su, aseton, sikloheksan ve propanol [48]. Süperkritik akışkanlar ile ekstraksiyonda ise CO<sub>2</sub>, düşük toksisitesi, kritik sıcaklık ve basıncının kolay ayarlanabilmesi ve düşük maliyet özellikleri sebebiyle tercih edilmektedir. Şekil 3.2'de saf CO<sub>2</sub>'nin kritik sıcaklık ve basınç değerlerini gösteren faz diyagramı görülmektedir (CO<sub>2</sub>'in kritik koşulları 31,1°C ve 71,9 bar).

Süperkritik karbondioksitin (sCO<sub>2</sub>) genellikle esansların ve çeşitli yağların ekstraksiyonunda kullanıldığı bazı çalışmalar; ilaç hammaddelerinin ekstraksiyonu, [50] kahve çekirdeklerinden yağ ekstraksiyonu [51], mango çekirdeğinden yağ

ekstraksiyonu [52], domatesten likopen ve beta karoten ekstraksiyonu [53], lavantadan esansiyel yağ ekstraksiyonu [54], mikroalglerden yağ ekstraksiyonu [55], [56] ve pomelo meyvesinden antioksidan bileşenlerin ekstraksiyonu [57] şeklinde sıralanabilir.

Literatürde PHA'ların sCO<sub>2</sub> ile ekstraksiyonu ile ilgili makaleler az sayıdadır. Bunlardan biri, sCO<sub>2</sub> ile *Ralstonia eutropha* biyokütlesinden 40°C sıcaklıkta, 200 atm basınç altında 100 dk uygulanmasıyla maksimum PHB geri kazanımı (%89) elde edilen çalışmadır [58]. Diğeri ise PHA'nın saflaştırılması üzerine [59] tarafından yapılan 50°C ve 150 bar basınç altında %70 saflıkta PHA elde edilen, ilave bir miktar solvent kullanılarak ise bu değerin %93'e çıkarıldığı çalışmadır.

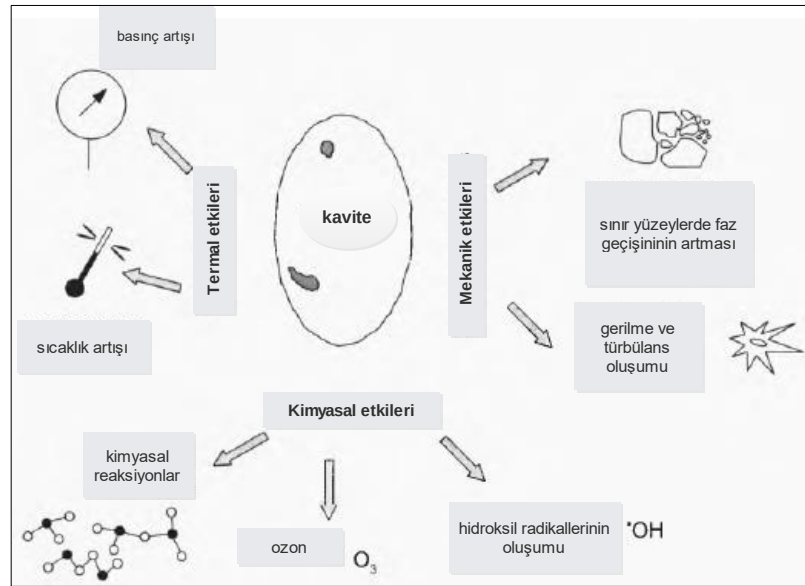


Şekil 3.2: Saf CO<sub>2</sub> için faz diyagramı.

### 3.1.3. Hidrodinamik kaviteasyon (HK) destekli ekstraksiyon

Kaviteasyon, proses süresini, kütle transfer hızını ve biyolojik parçalanmayı arttırmak amacıyla pek çok uygulama alanı bulmaktadır. Kaviteasyon sıvı ya da katı/sıvı ara yüzeyinde milyonlarca buhar kabarcığının (kavite) oluşmasıdır. Bir reaktörde kaviteasyon sırasında, bu kabarcıkların bozulmasıyla yerel yüksek basınç ve sıcaklık koşulları (100-5000 atm ve 500-15000 K) oluşurken diğer kısımlarda atmosferik koşullar hakimdir. Böylece gerçekleşmesi zor olan fiziksel veya kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi sağlanır. Ayrıca kaviteasyon sırasında serbest radikallerin oluşması kimyasal reaksiyon mekanizmasını değiştirirken, oluşan yerel türbülanslar

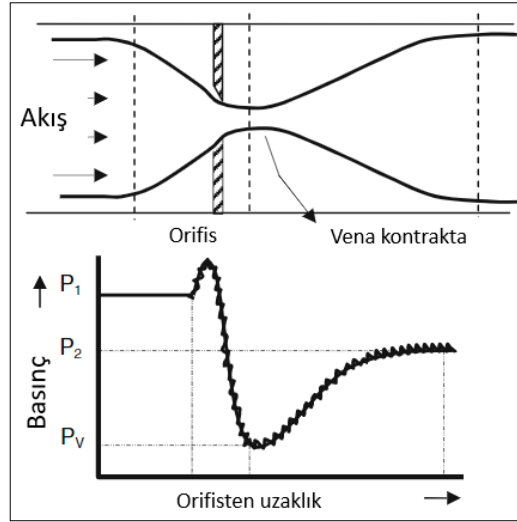
proses transfer hızlarını artırır [60]. Kaviteasyon sırasında gerçekleşen termal, kimyasal ve mekanik etkiler Şekil 3.3’de gösterilmiştir [61].



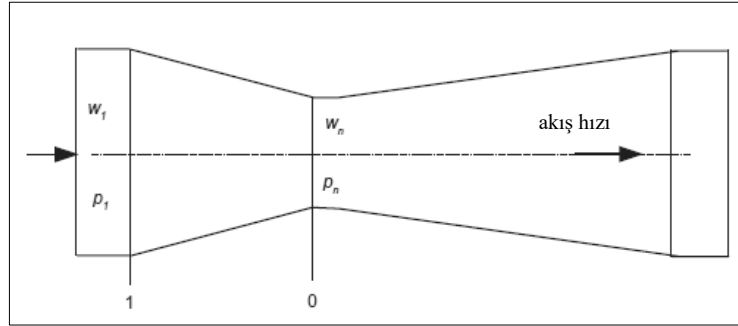
Şekil 3.3: Kaviteasyon sırasında oluşan termal, kimyasal ve mekanik etkiler.

Kaviteasyon; akustik ve hidrodinamik olarak iki türe ayrılır. Aradaki temel fark, yerel basıncın düşmesine neden olan mekanizmadır. Akustik kaviteasyon durumunda, sıvıyı parçalamak ve kaviteasyon oluşturmak için gerekli düşük basınçlar akustik dalgaların yayılmasıyla elde edilir. Bu, genellikle 20 kHz ve üzeri yüksek akustik frekanslar gerektirir [36].

Hidrodinamik kaviteasyonda ise basınç azalmasına, akış olan bir orifiste, ventüride veya bir kısma vanasında akış hızının artması sebep olur. Şekil 3.4’de [62] görüldüğü gibi buralardaki daralma sıvının hız ve kinetik enerjisinin artmasına, basıncın azalmasına sebep olur. Basıncın, ortamın buhar basıncının altına düşmesiyle kaviteler oluşur. Daha sonra basıncın normale dönmesiyle kaviteler bozulmaya başlar. Şekil 3.5’de bir ventürideki akış gösterilmiştir. Burada  $P$  basıncı,  $W$  akış hızını,  $\rho$  akışkanın yoğunluğunu göstermektedir.

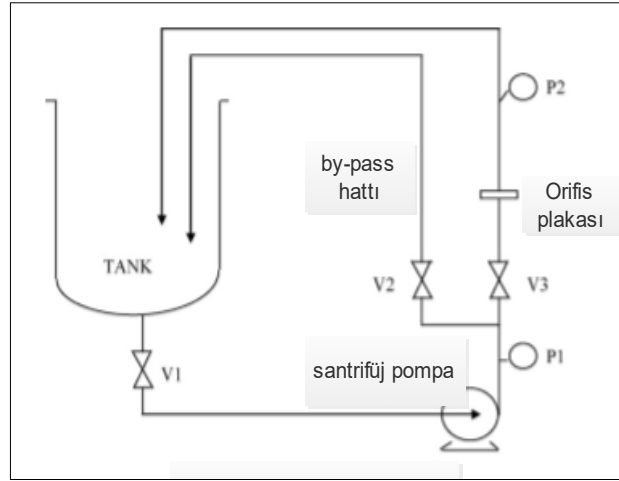


Şekil 3.4: Hidrodinamik kavitasyonda akış ve basınç değişimi.



Şekil 3.5: Bir ventüride akış.

Orifis plakasının kullanıldığı bir kavitasyon prosesinin şematik diyagramı Şekil 3.6'da verilmiştir [60]. Bu proses, orifis plakası, toplama haznesi ve pompadan oluşmaktadır. Kavitasyon verimini etkileyen parametreler; her bir ekstraksiyon döngüsünün süresi, solvent türü-konsantrasyonu, sıvı-katı oranı ve kavitasyon sayısıdır. Kavitasyondaki kabarcık oluşum ve bozulma aşamalarını kavitasyon sayısı tanımlar (Kavitasyon sayısı hesaplanması Bölüm 3.2.6'da detaylı olarak verilmiştir).



Şekil 3.6: Orifis plakasının kullanıldığı bir hidrodinamik kavitasyon düzeneği şematik diyagramı.

Hidrodinamik kavitasyon, Çevre mühendisliği uygulamalarında çamur arıtımında [63]–[65], su dezenfeksiyonunda [66] ve ileri atık su arıtımında [67] kullanılmıştır. Bir ekstraksiyon tekniği olarak hücre parçalanmasında [68] ve alglerden yağ ekstraksiyonunda [69]–[72] kullanılmıştır. Bu uygulama alanlarının her birinde amaç farklı olabilir ama proste temel prensip mikroorganizmaların parçalanmasıdır. Literatürde HK prosesi ile bakterilerin [73], [74],[75], maya ve mantarların [76] ve mikroalglerin [77] parçalanması üzerine yapılan çalışmalar bulunmaktadır.

Literatürde kavitasyon ile PHA ekstraksiyonu hakkında çalışma olmamasına rağmen benzer özelliklerde çalışan yüksek basınç homojenizatörleri ile yapılan çalışmalar mevcuttur. Yüksek basınç homojenizatöründe parçalanma, hücreleri içeren çözeltinin bir orifisten geçmesi ile meydana gelir [78]. Palmier vd (2021), yüksek basınç homojenizatörünü solvent ekstraksiyonu ile birlikte kullanarak %51 PHA ekstaksiyon verimi elde etmişlerdir [79]. Ghatnekar vd (2002) ise 400 kg/cm<sup>2</sup> basınçta %95 verim ile %80 saflıkta PHA elde etmişlerdir [80]. Başka bir çalışmada da PHA içeren *C. necator* hücrelerini parçalamak için 800 kg/cm<sup>2</sup> basınç kullanılmıştır [81].

## 3.2. Metodoloji

### 3.2.1. Solvent ekstraksiyonu için deney koşulları

Solvent ekstraksiyonu, bu tez çalışması kapsamında ilk defa uygulanacak olan ekstraksiyon prosesleriyle karşılaştırılabilmesi için literatürde kullanılan iki farklı

solvent ile yapılmıştır. Bu solventlerden biri olan DMC, yeşil solvent olarak bilinmekte ve metot biyokütlenin DMC ile 90°C’de ekstrakte edilmesi prensibine dayanmaktadır [38]. Diğer ise literatürde PHA ekstraksiyonu için en çok kullanılan solvent olan kloroformdur. Çamur numuneleri 9000 rpm’de 15 dk santrifüj edildikten sonra dipte kalan katı çamur fazı petri kabına yayılarak liyofilizatörde dondurularak kurutulmuştur. Solvent ekstraksiyonu çalışmaları kapsamında, liyofilize çamurlardan maksimum 100 mg’ı, ısıya ve basınca dayanıklı sızdırmaz kapaklı tüplerde su banyosunda 1 saat karıştırılarak ekstrakte edilmiştir (Şekil 3.7).

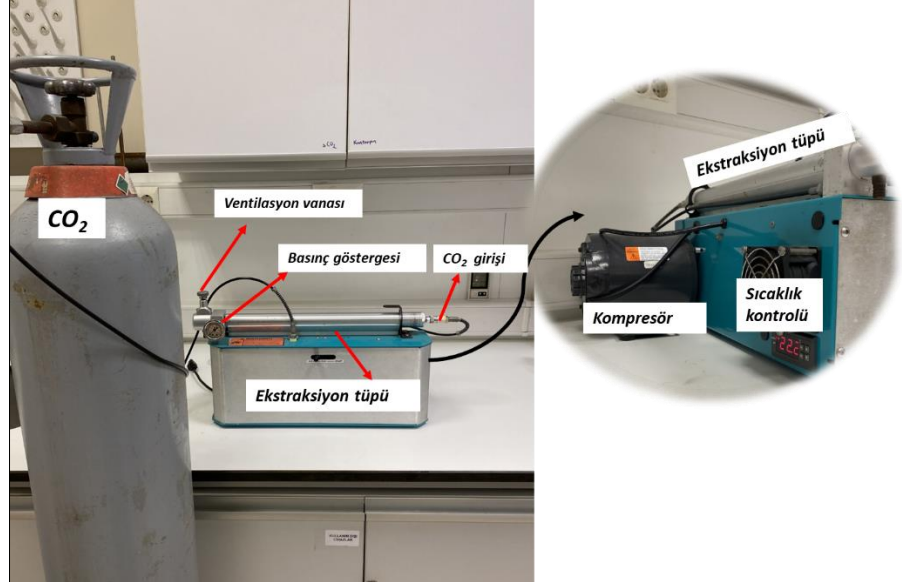


Şekil 3.7: Solvent ekstraksiyonu deney düzeneği.

### 3.2.2. Süperkritik CO<sub>2</sub> destekli ekstraksiyon deney koşulları

Aerobik reaktörden hasat edilen çamur 9000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendikten sonra biyokütle liyofilize edilmiştir. Gerekli biyokütle miktarı tartılarak 1 mL fosfat tamponu (0,1 M, pH 7) ilave edilmiştir. Metanol ilavesi de bu aşamada yapılmaktadır. Bu bulamaç, kütle transferini arttırmak için sabit miktarda cam boncuk ile karıştırılarak ekstraksiyon tüpüne (aktif hacim 35 mL) yerleştirilmiştir. Süperkritik CO<sub>2</sub> destekli ekstraksiyon sistemi bir CO<sub>2</sub> beslemesi ve kompresör, bir gösterge (basınç için), sıcaklık kontrolörü, ekstraksiyon tüpü ve gaz ventilasyon vanası içeren bir ekstraksiyon gövdesi içerir (Şekil 3.8). CO<sub>2</sub> beslemesi ekstraksiyon gövdesinin üstündedir. Biyokütleyi doldurmak-boşaltmak için çıkarılabilir bir parça olan 100 ml’lik alüminyum ekstraksiyon tüpü ekstraksiyon gövdesine yerleştirilir ve uç kapağa yüksek basınç hortumu takılır. Önce sıcaklık ayarlanır. Daha sonra CO<sub>2</sub> valfi açılır ve

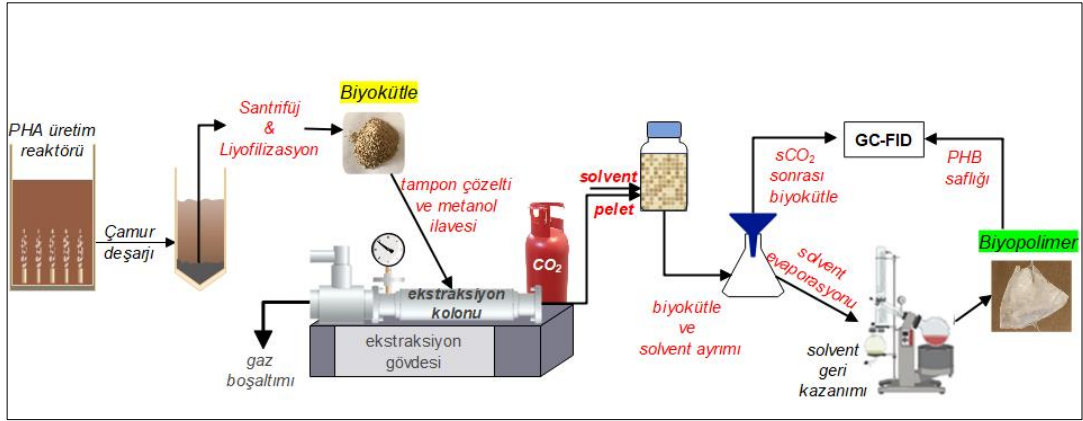
gerekli basınca ulaşana kadar CO<sub>2</sub> sıkıştırması için çalıştırılır. Ayarlanan basınç değerine ulaşıldığında proses suresi başlamış olur. Sure sonunda, sistem kapatılır ve ventilasyon vanası açılarak CO<sub>2</sub> boşaltılır.



şekil 3.8: Süperkritik karbondioksit reaktörü.

Proses sonrası ekstraksiyon tüpünde cam boncuklara tutunan biyokütle parçaları ve hücreden çıkarılan polimer bulunmaktadır. Bu NPCM arasından PHA'nın alınması için, uygun özc ile özdrme yöntemi kullanılmıştır. Ekstraksiyon tüpü bir cam şişeye boşaltılarak, (eker ocak altında) 100 mL kloroform eklenmiş ve kapağı kapatılarak çalkalanmıştır. Bu bulamaç önce kaba elekten sonra da 1.2 µm'lik filtre kağıdından süzülerek cam boncuk ve biyokütle kalıntıları ayrılmış olur. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Böylece kloroformda çözünen polimer, solventin evaporasyonu ile elde edilmiş olur. eker ocak altında bir gün kurutulduktan sonra, tartım yapılmıştır ve polimer sağlığını belirlemek için GC-FID'de PHB analizi, molekl ağırlığı tespiti için viskozite ölçümü ve malzeme karakterizasyonu için TGA ve FTIR analizleri yapılmıştır. Süperkritik karbondioksit destekli ekstraksiyon deney düzeneği şekil 3.9'da verilmiştir.

sCO<sub>2</sub> ile PHA ekstraksiyonu çalışmalarında PHA biriktirme reaktöründen alınan PHB içeriği %20%-%27 arasında olan biyokütle örnekleri kullanılmıştır.



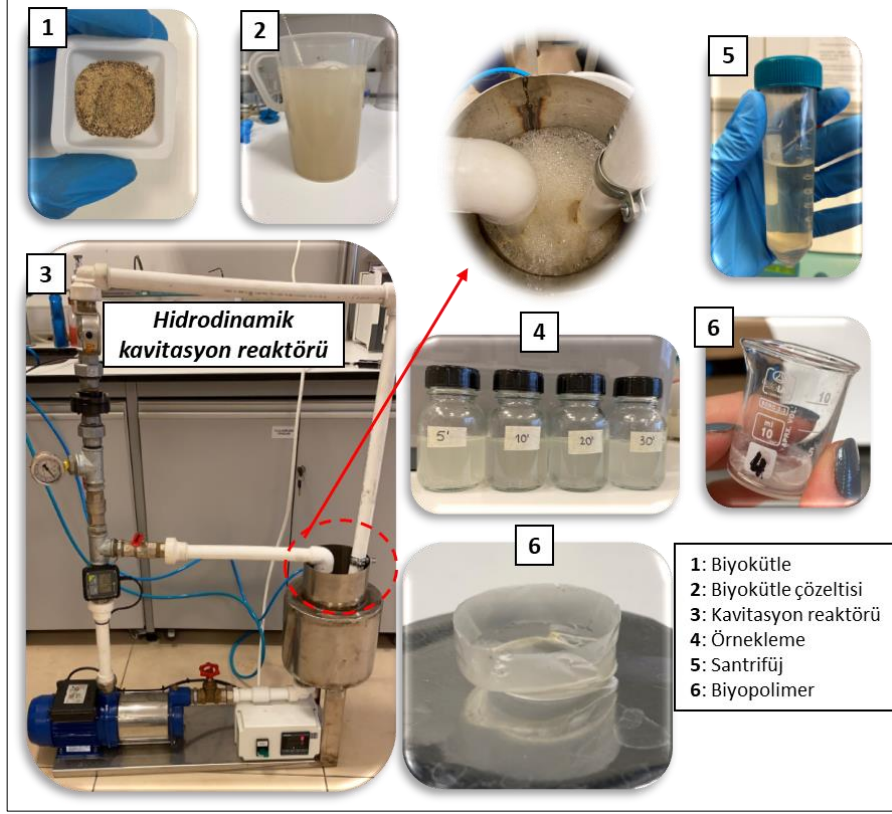
Şekil 3.9: Süperkritik karbondioksit destekli ekstraksiyon deney düzeneği.

### 3.2.3. Hidrodinamik kavitasyon destekli ekstraksiyon deney koşulları

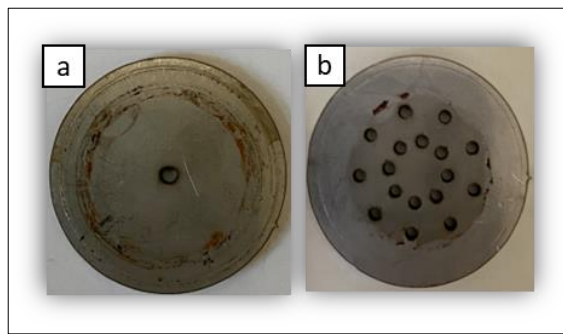
Hidrodinamik kavitasyon destekli ekstraksiyon (HK) çalışmalarında kullanılan deneysel düzenek Şekil 3.10’da, 1-6 arasındaki adımlarla gösterilmiştir. Adım 3, HK reaktörünü göstermektedir. Sıvı akışı için bir santrifüj pompa (SUMAK, SM15), soğutma hazneli 3 L kapasiteli paslanmaz çelik numune rezervuar tankı, kavitasyon cihazından önce ve sonra basınç göstergeleri, bir akış ölçer (FMT 3, Germany), valfler ve bir kavitasyon cihazından oluşmaktadır. Kavitasyon, 1 mm çapındaki deliklerden oluşan, 1 delik (orifis-1) ve 17 delik (orifis-17) içeren radyal desenli orifis plakaları ile sağlanmaktadır (Şekil 3.11).

Adım 1’de görülen liyofilize edilmiş biyokütle örnekleri, farklı katı yüküne (g/L) göre sulu çözeltileri hazırlanarak temiz rezervuara yerleştirilmiştir (Adım 2). Basınç valf ile ayarlanarak, biyokütle süspansiyonunun ana kavitasyon cihazından geçmesine izin verilmiştir. Optimum ekstraksiyon verimliliğini belirlemek için kavitasyon cihazının tipi (orifis-1 ve orifis-17), katı yüklemesi (0,5-2 g/L) ve basınç girişi (2-6 bar) gibi çeşitli çalışma koşulları incelenmiştir. Çalışma sırasında numuneler (20 mL) 5, 10, 20 ve 30 dakikalık çalışma sürelerinde rezervuardan alınmıştır. Hem PHA granülleri hem de PHA olmayan hücre kütlesi içeren numuneler bir cam tüpe yerleştirilmiş ve NPCM’den PHA’yı çözünürleştirilmesi için tüplere 5 mL kloroform eklenmiştir (Adım 4). Tüpler çalkalandıktan sonra 9000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve kloroform fazı parçalanmış biyokütle parçalarından ayrılmıştır (Adım 5). Polimer, kloroformun buharlaştırılmasıyla geri kazanılmış ve ardından çeker ocak altında kurutulmuştur (Adım 6). Belirlenen optimum koşullarda ekstrakte edilen

biyopolimerlerin saflığını belirlemek için GC-FID’de PHB analizi, moleköl ağırlığı tespiti için viskozite ölçümü ve malzeme karakterizasyonu için TGA ve FTIR analizleri yapılmıştır.



Şekil 3.10: Hidrodinamik kavitasyon destekli ekstraksiyon deney düzeneği.



Şekil 3.11 Orifis plakaları.

HK destekli PHA ekstraksiyonu çalışmalarında PHA biriktirme reaktöründen alınan PHB içeriği %35 olan biyokütle örnekleri kullanılmıştır.

### **3.2.4. Analiz yöntemleri**

#### **3.2.4.1 Biyopolimerlerin PHB saflığı**

Elde edilen biyopolimerin PHB saflığının belirlenmesi için Bölüm 2.2.2.1’ de detayları verilen analiz yöntemi, elde edilen biyopolimerden kesilen yaklaşık 5 mg’lık örnekler kullanılarak uygulanmıştır.

#### **3.2.4.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)**

Malzemelerin absorpsiyon ve emisyon kızılötesi spektrumunun elde edildiği spektroskopi tekniğidir. Bu tez çalışmasında elde edilen biyopolimer örneklerinin moleküler yapısı ve fonksiyonel gruplarının standart PHB ile uyumlu olup-olmadığının değerlendirilmesinde Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR marka spektroskopi cihazı kullanılarak 400-4000 nm<sup>-1</sup> aralığında ölçümler yapılmıştır

#### **3.2.4.3 Termogravimetrik analiz (TGA)**

Malzemelerde sıcaklığa bağlı olarak meydana gelen kütle kaybının belirlendiği analizdir. Bu tez çalışmasında elde edilen biyopolimer örneklerinin termokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesi için Mettler Toledo TGA/SDTA 851 marka cihaz kullanılmış olup, analizler 50 mL/dk azot akışında 10°C/dk sıcaklık artışıyla yapılmıştır.

#### **3.2.4.4 Molekül ağırlığı tayini**

Polimerlerin mekanik özelliklerinin değerlendirilmesinde ve uygulama alanı belirlenmesinde kullanılan en önemli özelliklerinden biri molekül ağırlığıdır. Bu tez kapsamında elde edilen biyopolimerlerin molekül ağırlıkları vizkozimetrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Kurutulmuş polimer örnekleri konsantrasyonu %0,1 (%wt) olacak şekilde kloroformda 3 saat karıştırılarak hazırlanmıştır [82]. Vizkozite ölçümleri AND SV-10A Vibro Viscometer cihazı kullanılarak yapılmış ve Eşitlik 3.7 ve Eşitlik 3.8 kullanılarak vizkozimetrik molekül ağırlığı hesaplanmıştır.

### 3.2.5. Kullanılan kimyasal maddeler

Solvent ekstraksiyonu çalışmalarında DMC (Sigma-Aldrich, 99%) ve hem solvent ekstraksiyonunda hem de sCO<sub>2</sub> ve HK proseslerinde yıkama solventi olarak kloroform (Supelco) kullanılmıştır. CO<sub>2</sub> (99.9% saflıkta, Gebze Gaz) sCO<sub>2</sub> reaktöründe kullanılmıştır.

PHB analizleri sırasında parçalama çözeltisinde H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, %95-97), Metanol (Merck, for analysis) internal standart olarak benzoik asit (Sigma Aldrich) kullanılmıştır.

### 3.2.6. Hesaplamalar

Elde edilen biyopolimerlerin saflığı Eşitlik 3.1'e göre hesaplanmıştır. Burada m<sub>PHB</sub> GC'de tayin edilen PHB, m<sub>biyopolimer</sub>: GC'de analiz için parçalama reaksiyonunda kullanılan biyopolimer miktarıdır.

$$\text{Biyopolimer saflığı (\%)} = \frac{m_{PHB}}{m_{biyopolimer}} \times 100 \quad (3.1)$$

Solvent ekstraksiyonunda proses verimi hesabı Eşitlik 3.2'ye göre yapılmıştır. Burada Y ile gösterilen proses verimini, m<sub>biyokütle</sub>; ekstrakte edilen biyokütle miktarını, m<sub>biyopolimer</sub>; elde edilen biyopolimer miktarını göstermektedir.

$$Y = \frac{m_{biyopolimer} \times PHB \text{ saflığı (\%)}}{m_{biyokütle} \times PHB_{biyokütle} (\%)} \quad (3.2)$$

sCO<sub>2</sub> proses verimi (Y<sub>SC</sub>) ile ifade edilmiş olup Eşitlik 3.3'de verilmiştir.

$$Y_{SC} = \frac{sCO_2 \text{ öncesi biyokütlerdeki PHB içeriği} - sCO_2 \text{ sonrası biyokütlerdeki PHB içeriği}}{sCO_2 \text{ öncesi biyokütlerdeki PHB içeriği}} \quad (3.3)$$

Hidrodinamik kavitasyon destekli ekstraksiyon yönteminde proses verimi hesaplanması Eşitlik 3.4'e göre yapılmıştır. Burada Y<sub>HK</sub>: ekstraksiyon verimini, m<sub>biyopolimer</sub>: elde edilen polimer kütlesi, V<sub>numune</sub>: zamana karşı alınan örnek hacmi,

$m_{biyok\ddot{u}tle}$ :kavitasyon reaktörü hazırlanan çözeltideki biyokütle tartımını, :  $V_{\text{çözelti}}$  kavitasyon için hazırlanan çözelti hacmini, PHB içeriği: biyokütlenin PHB içeriğini göstermektedir.

$$Y_{HK} = \frac{m_{biyopolimer}/V_{numune}}{PHB \text{ içeriği} \times m_{biyok\ddot{u}tle}/V_{\text{çözelti}}} \quad (3.4)$$

Kavitasyon sayısı Eşitlik 3.5'e göre hesaplanmıştır. Burada  $P_u$  giriş basıncı,  $P_d$  çıkış basıncı,  $\rho$  akışkanın yoğunluğu ve  $V$  akış hızıdır [69].  $P_u$ ; işletme parametrelerine göre 2-4-6 bar ve  $P_d$  ise atmosfere açık reaktör sistemi nedeniyle 1 bar alınmıştır. Akış hızı  $V$ , Eşitlik 3.6'ya göre debi ve orifis alanları kullanılarak hesaplanmıştır.

$$K = \frac{(p_u - p_d)}{\frac{\rho \cdot V^2}{2}} \quad (3.5)$$

$$V = \frac{Q}{\text{orifis alanı}} \quad (3.6)$$

Polimerlerin mekanik özelliklerinin değerlendirilmesinde ve uygulama alanı belirlenmesinde kullanılan en önemli özelliklerinden biri molekül ağırlığıdır. Bu tez kapsamında elde edilen biyopolimerlerin molekül ağırlıkları vizkozimetrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir.

Molekül ağırlığı Mark Houwink's eşitliğine göre (Eşitlik 3.7) hesaplanmıştır [83].  $\eta$  gerçek viskozite değerini (dL/g),  $M_v$  molekül ağırlığını (g/mol) göstermektedir. Mark Houwink's parametreleri olan  $K$  and  $\alpha$  kloroformda hazırlanan PHA çözeltileri için sabit olup, sırasıyla;  $1.18 \times 10^{-4}$  dL/g ve 0,78'dir.

$$\eta = K M_v^\alpha \quad (3.7)$$

Gerçek viskozite ( $\eta$ ) değeri Solomon-Ciuta [82] eşitliğine göre hesaplanmıştır (Eşitlik 3.8). Bu eşitlikte: polimer konsantrasyonu (g/100 mL),  $\eta_{sp}$  ve  $\eta_{rel}$  sırasıyla, spesifik ve bağıl viskozite değerlerini göstermektedir. Kurutulmuş polimer örnekleri konsantrasyonu %0,1 (%wt) olacak şekilde kloroformda 3 saat karıştırılarak hazırlanmıştır [82].

$$\eta = \frac{\sqrt{2}}{c} \sqrt{\eta_{sp} - \ln \eta_{rel}} \quad (3.8)$$

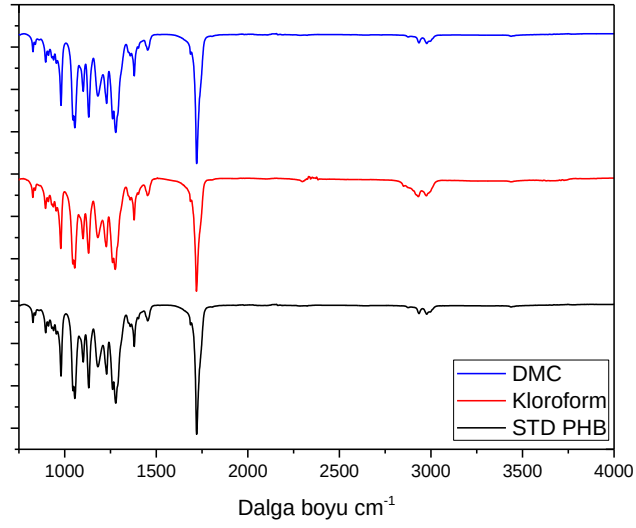
### 3.3. Sonuçlar ve Tartışma

#### 3.3.1. Solvent ekstraksiyonu ile aktif amurdan PHA ekstraksiyonu

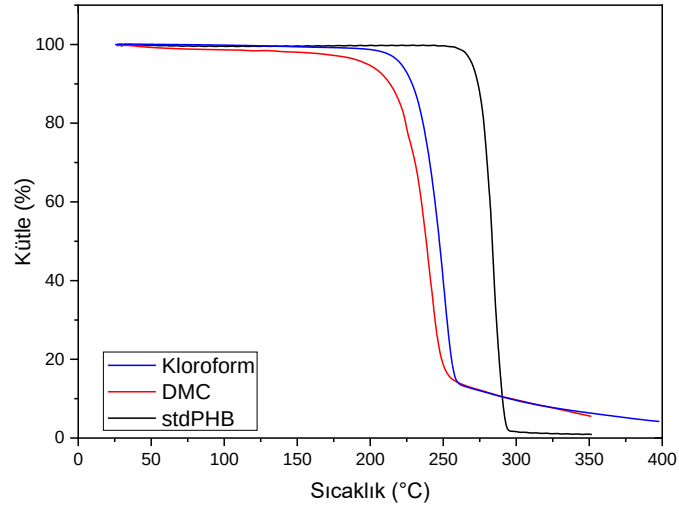
DMC ile %82 verimle %89 PHB saflığında, kloroform ile ise %95 verim ile %84 PHB saflığında biyopolimerler elde edilmiştir. Kloroformun ekstraksiyon performansının DMC'den daha iyi olduğu görülmektedir. Daha fazla hücre parçalayarak daha fazla polimer ekstrakte olmuştur. Fakat daha fazla miktarda hücrenin parçalanması da beraberinde safsızlıklar da getirdiğinden, ekstraksiyon verimi yüksek iken PHB saflığı düşük değerdedir. Safsızlıkların hücrenin yapısındaki diğer bileşenlerden (protein vb.) kaynaklanabileceği bilinmektedir. DMC ve kloroform ile ekstraksiyonda elde edilen polimerlerin molekl ağırlıkları arasında ise belirgin bir fark yoktur (0.25 MDa ve 0.22 MDa).

Elde edilen polimerlerin FTIR ve TGA grafikleri standart PHB ile karşılaştırmalı olarak şekil 3.12 ve şekil 3.13'da verilmiştir. FTIR spektrumları incelendiğinde sCO<sub>2</sub> ile ekstrakte edilen biyopolimerlerin PHB'ye özgü dalga boylarında güçlü pikler sergilediği ve ticari PHB ile karşılaştırılabil-diği görülmektedir. FTIR spektrumlarında, PHB'nin ayırt edici piki 1720 cm<sup>-1</sup> (C=O gerilmesi) civarında yer alırken, ester grubunu temsil eden diğer yoğun pikler 1000-1400 cm<sup>-1</sup> (C-O gerilmesi) arasında yer almaktadır [84]. Ayrıca 1720 cm<sup>-1</sup>'deki keskin pik, biyokütleden elde edilen PHB'nin kristal yapısına işaret etmektedir [85].

TGA grafikleri (şekil 3.13) incelendiğinde DMC ile ekstrakte edilen polimer 218°C'de bozunmaya başlarken, kloroform ile ekstrakte edilen 225°C'de bozunmaya başlamıştır. Maksimum bozunmaları ise sırasıyla 254°C ve 261°C'dir. DMC ile ekstrakte edilen polimerin yaklaşık %4, kloroform ile ekstrakte edilen için ise %8 kalıntı bıraktığı grlmştir.



Şekil 3.12: Solvent ekstraksiyonu prosesi ile elde edilen biyopolimerlerin ticari PHB ile karşılaştırmalı FTIR spektrumları.



Şekil 3.13: Solvent ekstraksiyonu prosesi ile elde edilen biyopolimerlerin ticari PHB ile karşılaştırmalı TGA termogramları.

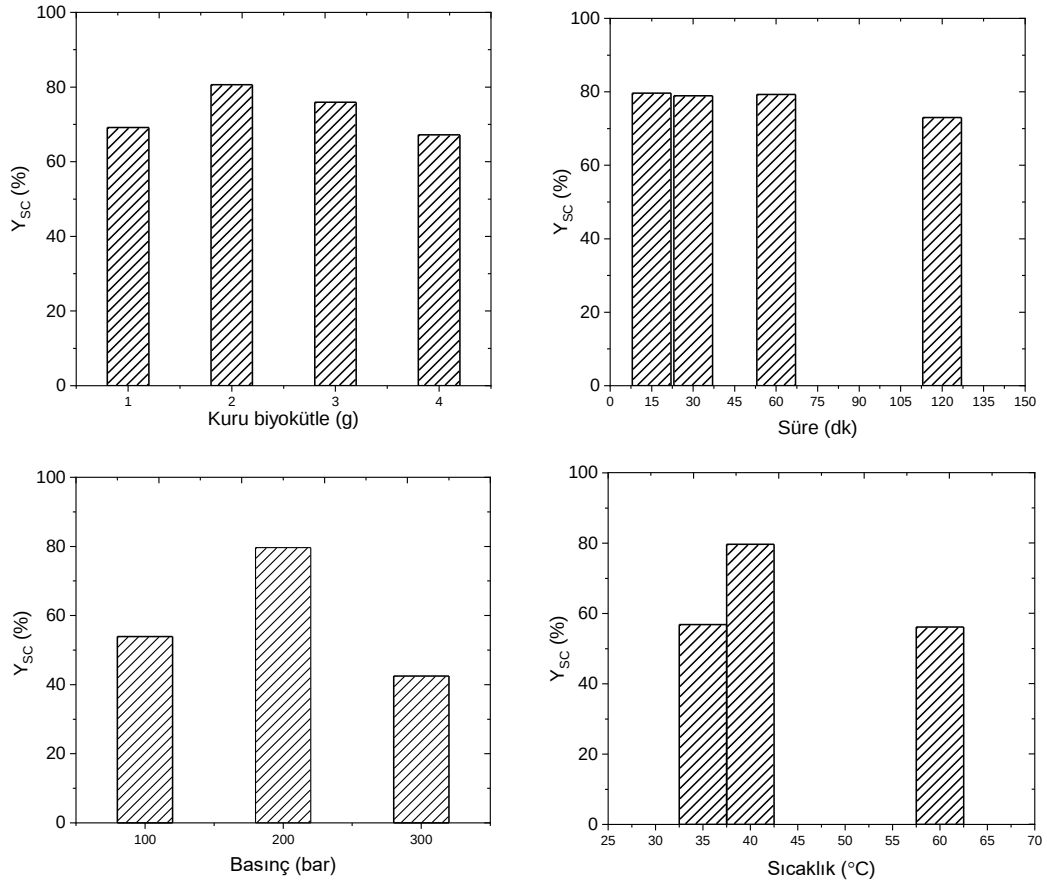
### 3.3.2. sCO<sub>2</sub> prosesi ile aktif çamurdan PHA ekstraksiyonu

sCO<sub>2</sub> destekli ekstraksiyon çalışmalarında, kütle (1-4 gr), basınç (100-300 bar), sıcaklık (35-60°C), süre (15-120 dk) ve metanol ilavesi (2-8 mL)'nin proses verimi (Y<sub>SC</sub>) üzerine etkileri araştırılmıştır. Y<sub>SC</sub>, sCO<sub>2</sub> parçalanmasından sonra biyokütlerde

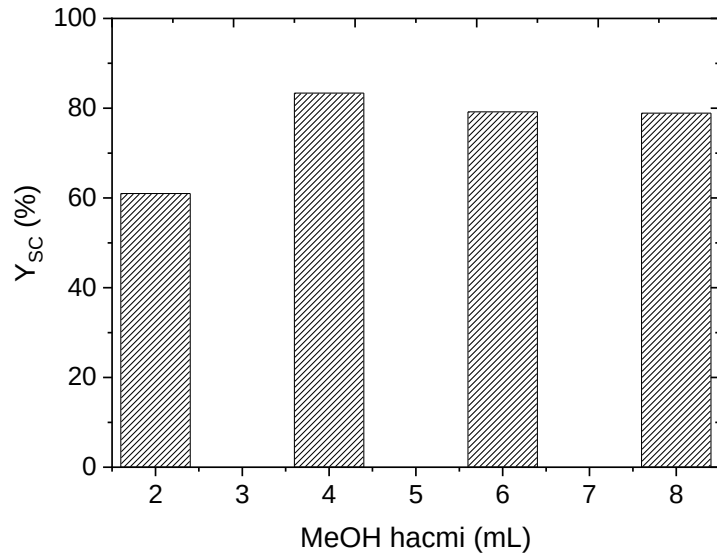
kalan PHB'ye göre hesaplanmıştır (Eşitlik 3.3). Şekil 3.14.a) sCO<sub>2</sub> prosesi ile farklı miktarda biyokütle (1-4 g) ile %70 ile %80 arasında salım veriminin elde edildiğini göstermektedir. Y<sub>SC</sub>, 2 g biyokütle ile %80'e kadar çıkmaktadır. Ekstrakte edilen biyokütle miktarının verimi önemli ölçüde etkilemediği görüldüğünden, diğer deneylerde 2 g biyokütle kullanılmıştır. Şekil 3.14.b'de çalışma süresinin 15 dakikadan 120 dakikaya yükselmesiyle Y<sub>SC</sub>'nin %80'den %72'ye düştüğü görülmüştür. Çalışma süresi, zaman tasarrufu ve enerji maliyeti açısından önemli olduğundan sonraki çalışmalarda 15 dk proses süresi kullanılmıştır. Biyokütle miktarı ve çalışma süresinin Y<sub>SC</sub>'yi etkilemediği görülürken basınç ve sıcaklığın proses verimini en çok etkileyen parametreler olduğu saptanmıştır. Y<sub>SC</sub>, 100 bar'dan 200 bar'a basınç artışıyla %54'ten %80'e yükselmiş ve 300 bar'da %43'e gerilemiştir. Benzer sonuçlar sıcaklık değişimlerinde de elde edilmiştir. Sıcaklık 35°C'den 40°C'ye değiştirildiğinde Y<sub>SC</sub> %56'dan %80'e yükselmiş ve sıcaklığın 60°C'ye yükselmesiyle %56'ya düşmüştür. Yüksek sıcaklık ve basınçta verimin düşmesi literatürde hücre duvarından önce sitoplazmik membranın bozulmasının bir sonucu olarak açıklanmıştır. Bu durumda hücre duvarı bozulmadığı için hücre içi PHA hücre dışına çıkamaz [86]. Bahsedilen proses parametreleri değerlendirildiğinde; 200 bar basınç, 40°C sıcaklıkta 2 gr biyokütle ile 15 dk proses sonucunda biyokütlerdeki PHB'nin %80'inin çıkarılabildiği saptanmıştır.

Proses veriminin iyileştirilmesi için, reaktörde metanol ilavesi çalışmaları yapılmıştır (MeOH-sCO<sub>2</sub>). sCO<sub>2</sub> prosesinde etanol, metanol, toluen, vb. kullanımı daha yüksek verim ve saflık sonuçları göstermiştir [58]. Metanol (MeOH), pigmentleri gidermek ve biyopolimerin saflığını artırmak için ekstraksiyon işlemlerinde kullanılır [87]. Bu çalışmada da MeOH hacminin Y<sub>SC</sub> ve biyopolimer saflığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Şekil 3.15'de görüldüğü gibi, 4 mL MeOH ilavesiyle, Y<sub>SC</sub> %83'e ulaşmıştır, ancak MeOH hacmindeki daha fazla artış düşük Y<sub>SC</sub> ile sonuçlanmıştır (8 mL MeOH ile %79). Metanol CO<sub>2</sub>'in polaritesini ve hücre duvarının geçirgenliğini arttırdığı için, MeOH hacmindeki artış Y<sub>SC</sub>'i arttırmıştır [88]. 4 mL'den daha büyük hacimlerde, Y<sub>SC</sub>'nin azalması ise hücre duvarındaki oluşabilecek MeOH kaplamasının, hücre içine CO<sub>2</sub> difüzyonunu engellemesiyle açıklanabilir [58].

Hücrenin sCO<sub>2</sub> ile parçalanmasından sonra hem PHA granülleri hem de PHA olmayan hücre kütlesi (NPCM) ortaya çıkmaktadır. Hem PHA granülleri hem de NPCM katı fazda olduğu için PHB'nin bu karışımdan ayrılması ve saflaştırılması zordur. Ayırma için iki yöntem vardır: PHA çözünmesi ve NPCM çözünmesi [37].



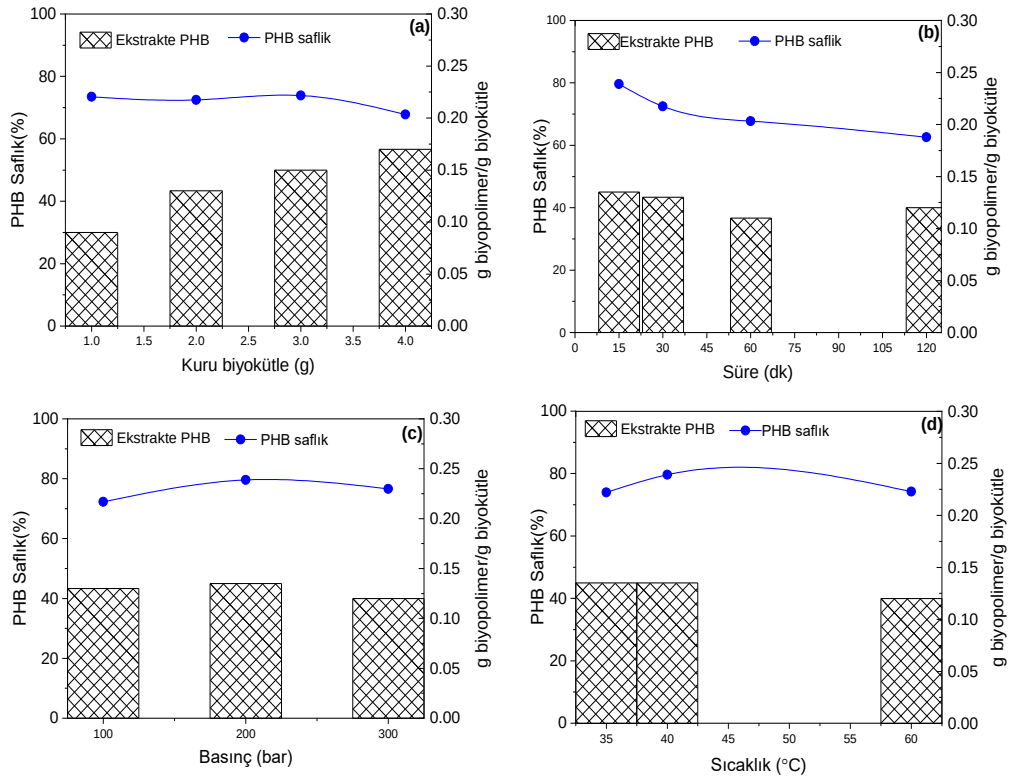
Şekil 3.14: Proses parametrelerinin PHB salım verimine etkisi a) Kuru biyokütle b) Süre c) Basınç d) Sıcaklık.



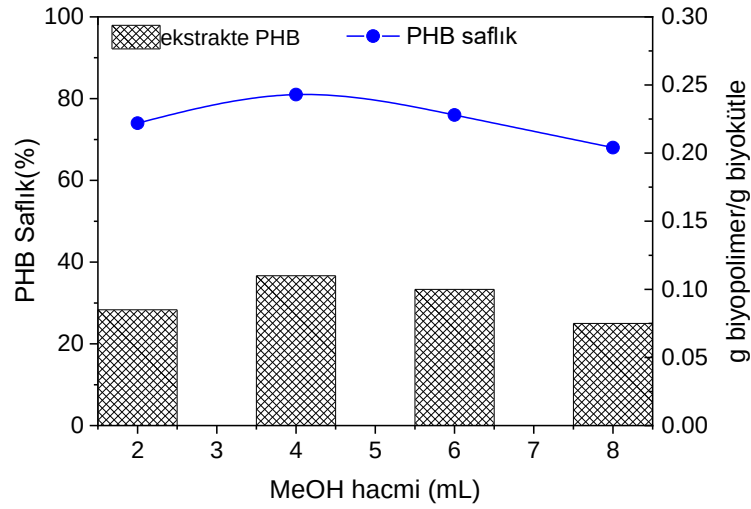
Şekil 3.15: MeOH-sCO<sub>2</sub> prosesinde PHB salım verimi.

Bu çalışmada, PHA'nın çözünmesi yöntemi takip edilmiştir. PHA kloroformda iyi çözünürlüğe sahip olduğundan, parçalanmış hücrelerden PHA'nın geri kazanımı için kloroform kullanılmıştır. sCO<sub>2</sub> sonrası peletler (cam boncuklar, NPCM ve PHA granülleri) Bölüm 3.2.2'de açıklandığı gibi ayrılmıştır. Evaporatör yardımıyla karışımdan ayrılan kloroform diğer deneylerde tekrar kullanılmış ve böylece deneyler sırasında herhangi bir solvent atığı oluşmamıştır.

sCO<sub>2</sub> prosesi ile farklı işletme koşullarında elde edilen polimer miktarları ve saflıkları Şekil 3.16'da verilmiştir. Kuru biyokütle miktarının 1 g'dan 4 g'a artmasıyla, biyokütle başına elde edilen biyopolimer miktarı 0,09'dan 0,17'ye yükselmiştir (Şekil 3.16.a)). 4 g biyokütle 200 barda 30 dakika boyunca sCO<sub>2</sub> ile parçalandığında, %68 PHB saflığında 0,17 g biyopolimer/g biyokütle elde edilmiştir. Ekstrakte edilen kuru biyokütle miktarının artışı PHB saflığını %73'ten %68'e düşürmüştür. Değişen tüm deneysel koşullar altında (kuru biyokütle miktarı, zaman, basınç ve sıcaklık), PHB saflığı %63-%79 arasındadır. 200 bar basınç, 40°C ve 15 dakika çalışma süresinde maksimum değere (%79) ulaşmaktadır. Şekil 3.17'de görüldüğü gibi, 4 mL MeOH ilavesiyle saflık %81'e yükselmiştir.

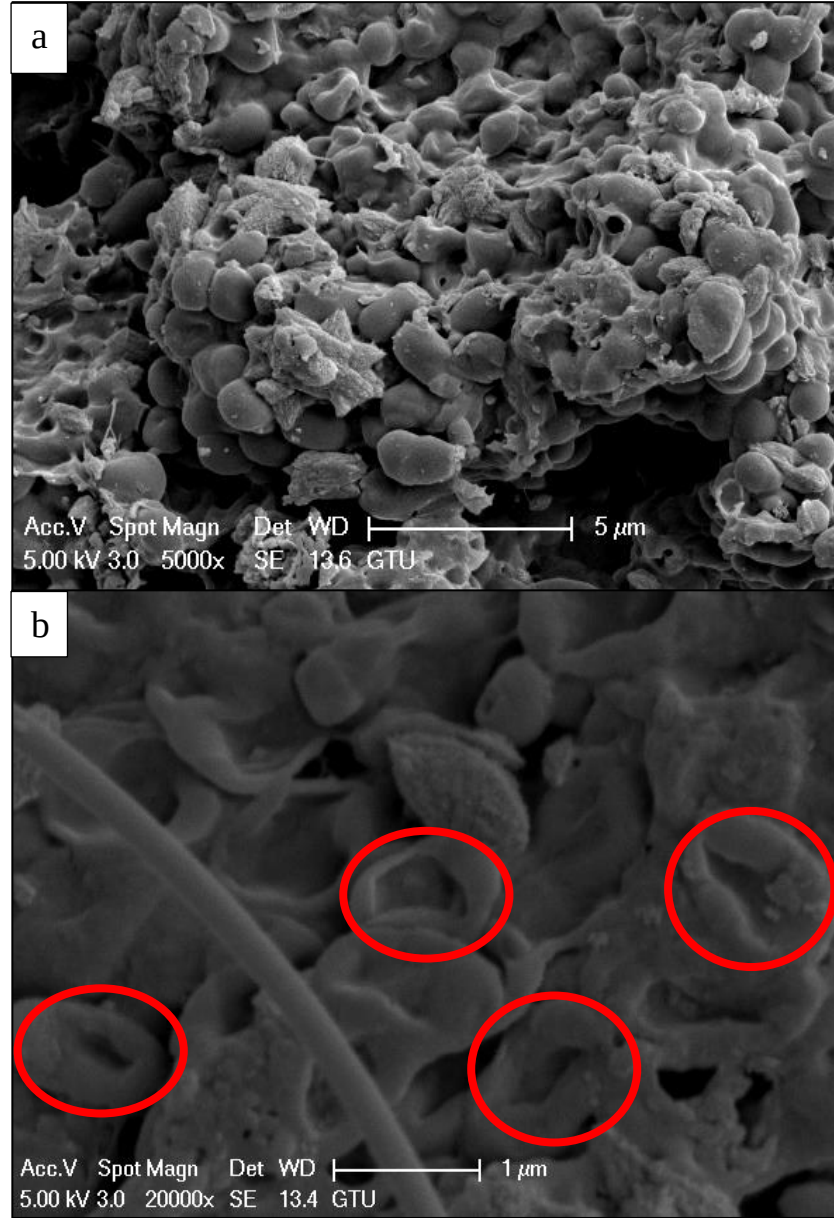


Şekil 3.16: Farklı sCO<sub>2</sub> koşullarında elde edilen biyopolimer miktarları ve PHB saflığı a) Kuru biyokütle b) Süre c) Basınç d) Sıcaklık.



Şekil 3.17: MeOH-sCO<sub>2</sub> prosesinde elde edilen biyopolimer miktarı ve PHB saflığı.

sCO<sub>2</sub> prosesinde PHA ekstraksiyonunda kullanılan biyokütlenin 200 bar basınçta 15 dk parçalanması öncesi ve sonrasındaki SEM görüntüleri Şekil 3.18’de verilmiştir. Biyokütlenin KMK içeriyor olması sebebiyle görüntülerdeki mikroorganizmaları, literatürde tek bir türde (*Ralstonia eutrophia*) [94] elde edilen görüntülere kıyasla ayırt etmesi zordur. Fakat ekstraksiyon öncesindeki görüntülerde (Şekil 3.27.a)) çubuk ve yuvarlak yapıları hücrelerin ekstraksiyon sonrasında bozulmaya başladığı görülmektedir. Hücre duvarının bozulduğu görülen hücreler (kırmızı işaretli hücreler) Şekil 3.18.b)’de işaretlenmiştir.



Şekil 3.18: sCO<sub>2</sub> prosesi ile PHA ekstraksiyonunda kullanılan biyokütlenin a) ekstraksiyon öncesi (x5000) b) ekstraksiyon sonrası SEM görüntüleri (x20000).

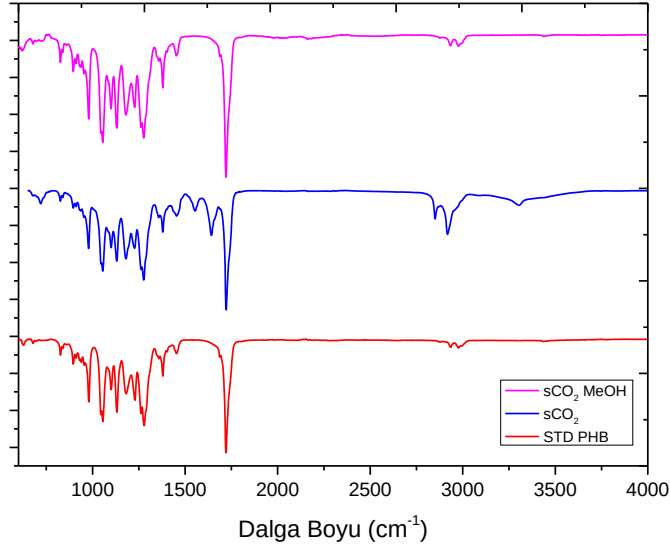
### 3.3.3. sCO<sub>2</sub> prosesi ile aktif çamurdan ekstrakte edilen biyopolimerlerin karakterizasyonu

sCO<sub>2</sub> prosesinde 2 g biyokütlenin, 15 dk'da 200 barda ekstrakte edilmesi ile elde edilen biyopolimerlerin (Şekil 3.19) FTIR spektrumları Şekil 3.20'de ticari PHB ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Buna göre PHB'nin ayırt edici piki 1720 cm<sup>-1</sup> (C=O gerilmesi) civarında yer alırken, ester grubunu temsil eden diğer yoğun pikler 1000-1400 cm<sup>-1</sup> (C-O gerilmesi) arasında yer almaktadır [84]. Ayrıca 1720 cm<sup>-1</sup>'deki keskin

pik, biyokütleden elde edilen PHB'nin kristal yapısına işaret etmektedir [85]. Aslında hücre içi PHB amorf yapıdadır [89] ve tipik olarak, hücre bozulması granülün hızla katılaşmasıyla polimerin kristalleşmesine neden olur [90]. sCO<sub>2</sub> prosesi ile ekstrakte edilen polimerde gözlenen fakat MeOH-sCO<sub>2</sub> prosesi ile giderilen 1540 cm<sup>-1</sup>'deki pik, N-O asimetrik gerilmesine karşılık gelmektedir [91]. Bu pikin sCO<sub>2</sub> prosesi sonrası ortaya çıkan NPCM'de hücre duvarında bulunan protein yapısındaki peptidoglikandan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. FTIR spektrumları incelendiğinde sCO<sub>2</sub> ile ekstrakte edilen biyopolimerlerin PHB'ye özgü dalga boylarında güçlü pikler sergilediği ve ticari PHB ile karşılaştırılabildiği görülmektedir.

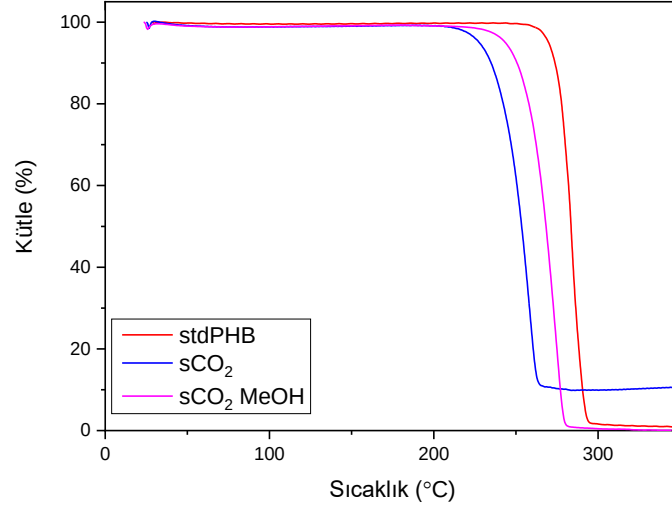


Şekil 3.19: sCO<sub>2</sub> prosesi ile elde edilen biyopolimerler.



Şekil 3.20: sCO<sub>2</sub> prosesi ile elde edilen biyopolimerlerin ticari PHB ile karşılaştırmalı FTIR spektrumları.

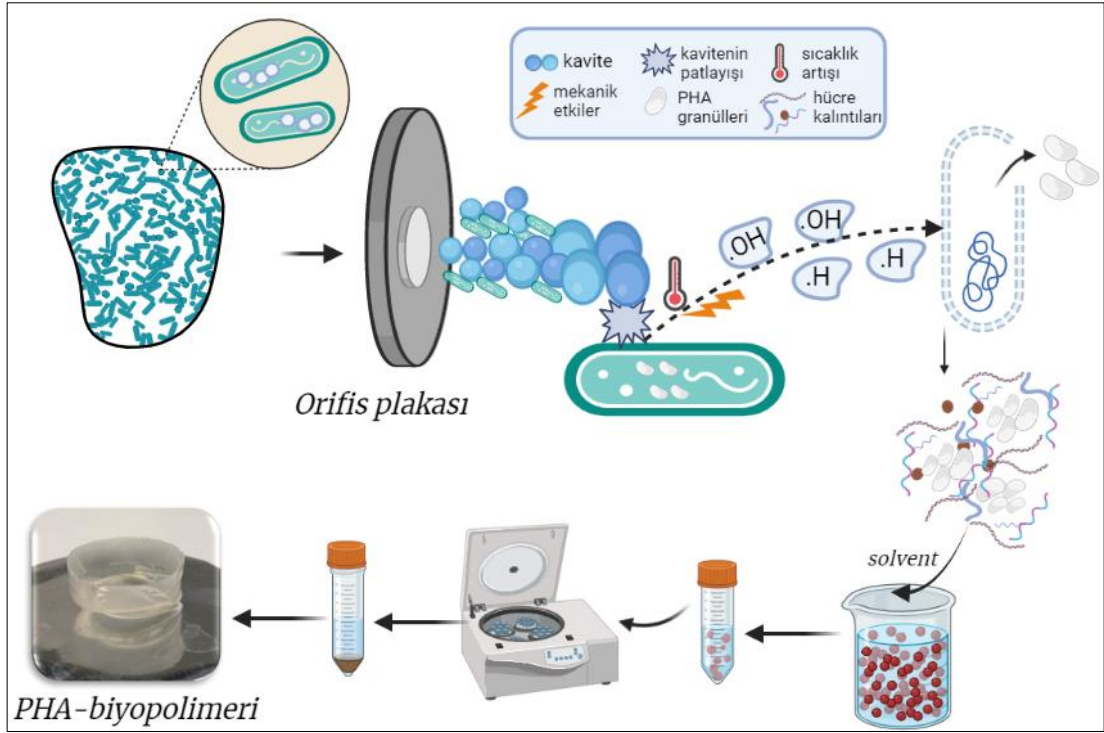
Ticari PHB ve sCO<sub>2</sub> prosesi ile ekstrakte edilmiş biyopolimerler için termal bozunma profilleri Şekil 3.21’de gösterilmektedir. İlk bozunma ticari PHB için 269,75°C’de başlarken, sCO<sub>2</sub> destekli ekstraksiyon ve MeOH-sCO<sub>2</sub> destekli ekstraksiyon için sırasıyla 237,89°C ve 249,81°C’de başlamaktadır. sCO<sub>2</sub> ile ekstrakte edilen biyopolimerlerin maksimum termal bozunmasının (267,56°C), ticari PHB’ye (296,62°C) yakın olduğu görülmektedir. En yüksek termal bozunma sıcaklığı olan 282,54°C’de, sCO<sub>2</sub>-MeOH prosesi ile ekstrakte edilen biyopolimerin kalıntı bırakmadan tamamen bozunduğu gözlenirken sCO<sub>2</sub> prosesi ile elde edilen biyopolimerin 267,56°C’de %10 kalıntı bıraktığı gözlenmiştir. Bunun nedeni ise hücre kütlelerinde proteinler ve lipoproteinler gibi uzaklaştırılmamış kirletici maddelerin varlığı olabilir [92].



Şekil 3.21: sCO<sub>2</sub> prosesi ile elde edilen biyopolimerlerin ticari PHB ile karşılaştırmalı TGA termogramları.

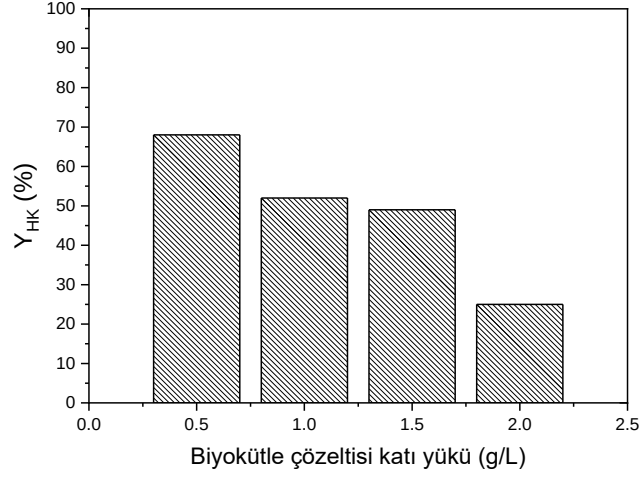
### 3.3.4. HK prosesi ile aktif çamurdan PHA ekstraksiyonu

HK prosesi ile PHA ekstraksiyonu prosesinde gerçekleşmesi mümkün olan hücre parçalanma mekanizması akış şeması Şekil 3.22’de verilmiştir. PHA depolamış KMK’yı içeren sulu çözelti HK reaktöründe orifisten geçerek sıvı akışının hızlanması yerel basınç düşüşüne neden olur, bu düşüş sıvının doymuluk buhar basıncının altındaysa kavitasyon oluşumunu tetikleyebilir (kavite oluşumu). Oluşan kavitelerin çökmesi; şok dalgaları, sıvı mikrojetleri ve yüksek kesme kuvvetleri (türbülans ve girdaplar) gibi bildirilen mekanik etkileri yönlendiren aşırı koşullar meydana gelebilir. Ayrıca, kavitelerin çöküşü aşırı yüksek sıcaklıklara sahip sıcak küçük alanlara ve bu alanlarda H<sub>2</sub>O moleküllerinin homolitik bölünmesine ve serbest radikallerin ( $\cdot\text{OH}$  ve  $\cdot\text{H}$ ) oluşumuna sebep olabilir. Güçlü oksidanlardan olan  $\cdot\text{OH}$  radikalleri, karşılaştıkları herhangi bir türü kolayca okside eder. Tüm bu mekanik etkiler mikroorganizmanın dış katmanına fiziksel olarak zarar vererek membranda açılmaya ve hücre materyallerinin dışarı salınmasına sebebiyet verir [36]. PHA ve diğer hücre kalıntılarının olduğu bu sulu karışımdan PHA’yı çözerek ayırmak için de kloroform kullanılmıştır. Kloroform-su-PHA ve hücre kalıntılarının olduğu bu karışım santrifüj edilerek hücre kalıntılarının çökmesi ve PHA içeren kloroform fazının ayrılması sağlanır. Kloroformun evaporasyonu ile PHA-biyopolimeri elde edilmiş olur.



Şekil 3.22: HK prosesi ile PHA ekstraksiyonun proses mekanizması.

HK prosesinde kullanılacak biyokütle çözeltisinin katı yükünün ekstraksiyon verimi üzerine etkisini gözlemlemek ve sonraki çalışmalarda kullanılacak katı yükünü belirleyebilmek için orifis-17 kullanılarak, farklı katı yüklemeleri (0,5-1,0-1,5 ve 2,0 g/L) ile çalışılmıştır. Bu çalışmalarda, çalışma süresi 5 dk ve basınç 4 bar olarak sabit tutulmuştur. Şekil 3.23’de gösterildiği gibi, ekstraksiyon verimi artan katı oranı ile azalmıştır. 0,5 g/L katı yükünde %68 ekstraksiyon verimi elde edilirken, 2,0 g/L katı yükünde %25’e kadar önemli bir düşüş gözlenmiştir. Hücre parçalanması ile ilgili literatüre de uygun olarak HK destekli ekstraksiyon için düşük katı yükü optimize edilmiştir [70], [72]. Ayrıca, daha yüksek katı oranlarında çalışmak biyokütle çözeltisini pompalama zorluklarını beraberinde getirirken, düşük katı oranlarında bu risk engellenmektedir.

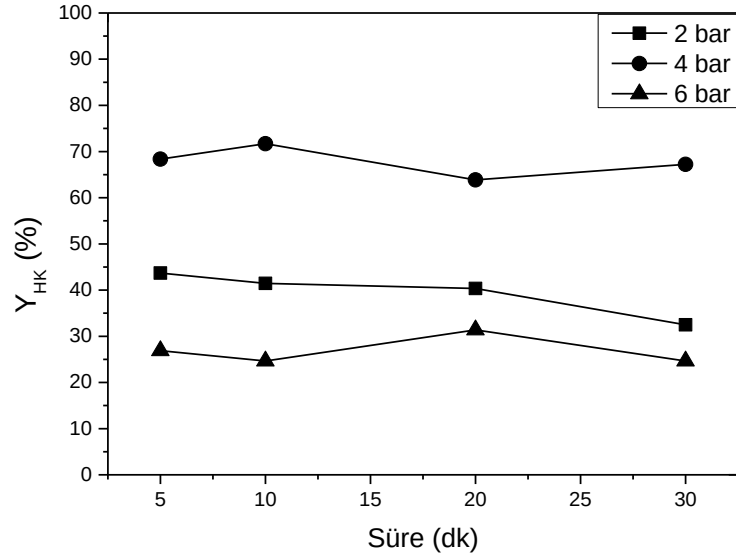


Şekil 3.23: Biyokütle çözeltisi katı yükünün HK destekli ekstraksiyon verimine etkisi.

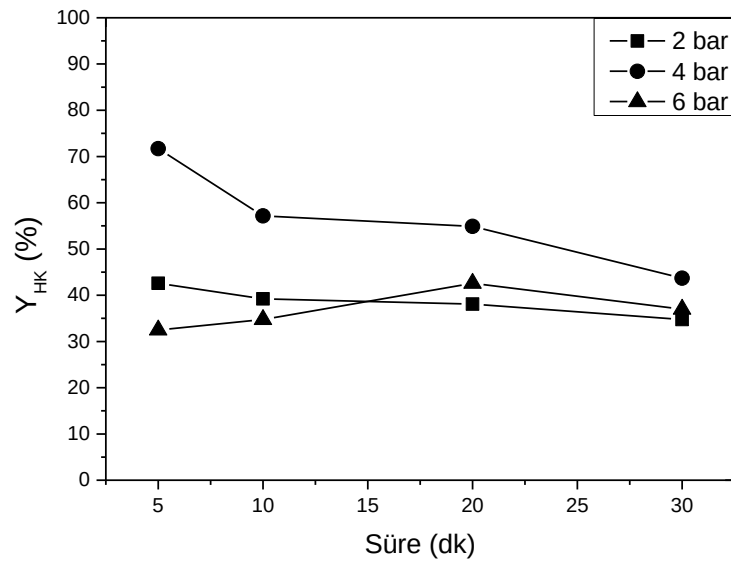
Basıncın (2, 4, 6 bar) HK destekli ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisi orifis-1 ve orifis-17 kullanılarak, katı yükü 0,5 g/L’de sabit tutularak incelenmiştir. Sonuçlar zamana bağlı olarak Şekil 3.24 ve Şekil 3.25’de verilmiştir. Örnekler 5 dakikalık aralıklarla toplanmıştır. Bu numuneler biyopolimer ekstraksiyon verimi açısından değerlendirilmiştir.

Tüm basınç girişlerinde hem orifis-1 hem de orifis-17 kullanıldığında, ekstraksiyon veriminde çalışma süresine bağlı olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Hem orifis-1 hem de orifis-17’de 4 bar basıncın maksimum ekstraksiyon verimi gösterdiği görülmüştür. Şekil 3.24’de gösterildiği gibi, maksimum ekstraksiyon verimi (%72), orifis-17 ile 10 dakikalık çalışma süresinden sonra elde edilmiştir. Basıncın 2 bar’dan 4 bar’a yükselmesi ekstraksiyon verimini arttırırken, basıncın 6 bar’a yükselmesi ekstraksiyon verimini %30’a düşürmüştür.

Orifis-1 kullanıldığında ise 4 bar basınçta 5 dakikalık çalışma süresi sonunda maksimum ekstraksiyon verimine (%72) ulaşılmıştır. Ekstraksiyon verimi 2 ve 4 bar basınçlarda çalışma süresiyle azalırken, 6 barda 20 dakikaya kadar artmış ve 30 dakikada düşmüştür.

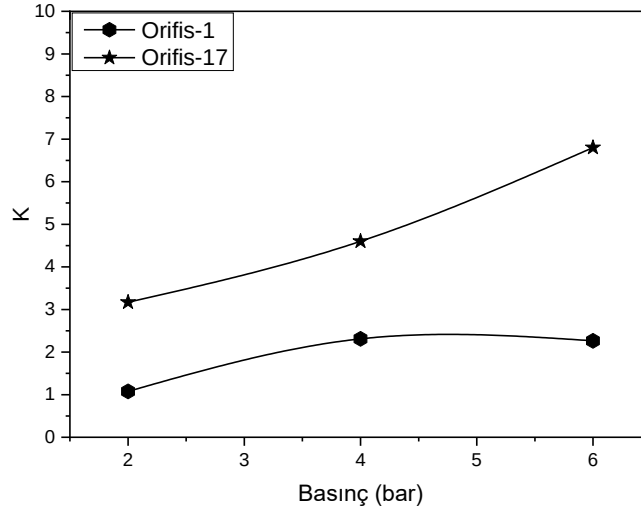


Şekil 3.24: Orifis-17 ile HK prosesinde basıncın ekstraksiyon verimine etkisi.



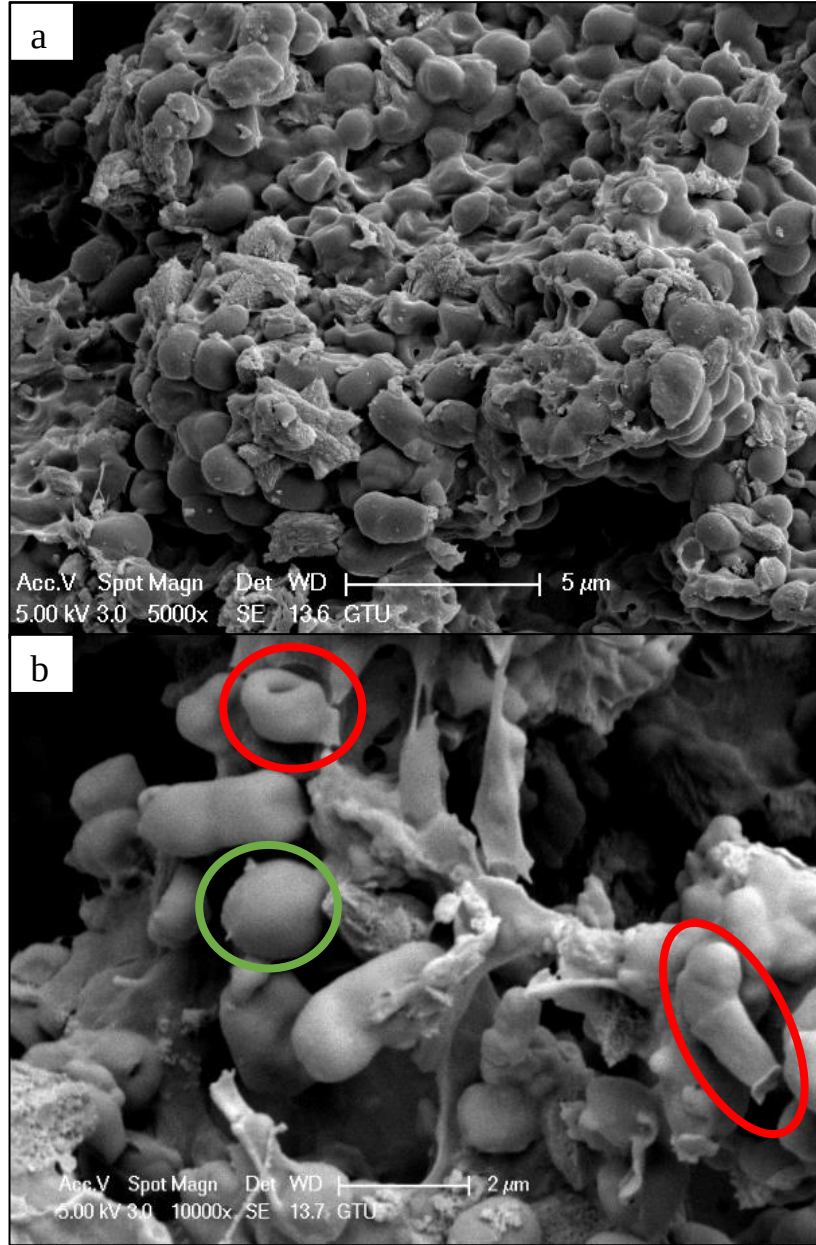
Şekil 3.25: Orifis-1 ile HK prosesinde basıncın ekstraksiyon verimine etkisi.

Kavitasyon sayısı (K), HK süreci için önemli bir parametredir. Ancak, hücre bozulma derecesi ile doğrusal olarak ilişkili değildir [93]. Şekil 3.26 farklı orifislerde basınç değişimine bağlı olarak K'nın değişimini göstermektedir. K, orifis-1 ile 1-2 arasında iken, orifis-17 ile 3'ten 7'ye yükselmektedir. K'nın 1'den küçük olduğu durumlarda önemli kavitasyonel etkilerin olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, kavitasyonun daha yüksek K'da da (2 ile 4 arasında) meydana gelebileceği ve bunun da sıvı ortamda çözünmüş gazların veya belirli kirleticilerin varlığıyla ilgili olabileceği keşfedilmiştir [62].



Şekil 3.26: HK destekli ekstraksiyon prosesinde kavitasyon sayısı.

HK destekli PHA ekstraksiyonunda kullanılan biyokütlenin orifis-1 ile 4 bar basınçta 5 dk parçalanması öncesi ve sonrasındaki SEM görüntüleri Şekil 3.27’de verilmiştir. Biyokütlenin KMK içeriyor olması sebebiyle görüntülerdeki mikroorganizmaları, literatürde tek bir türde (*Ralstonia eutrophia*) [94] elde edilen görüntülere kıyasla ayırt etmesi zordur. Fakat ekstraksiyon öncesindeki görüntülerde (Şekil 3.27.a)) çubuk ve yuvarlak yapılı hücrelerin ekstraksiyon sonrasında bozulmaya başladığı görülmektedir. Hücre duvarının bozulduğu görülen hücreler (kırmızı işaretli hücreler) ve parçalanmayan hücreler (yeşil işaretli hücreler) Şekil 3.27.b)’de işaretlenmiştir.



Şekil 3.27: HK destekli PHA ekstraksiyonunda kullanılan biyokütlenin a) ekstraksiyon öncesi (x5000) b) ekstraksiyon sonrası SEM görüntüleri (x10000).

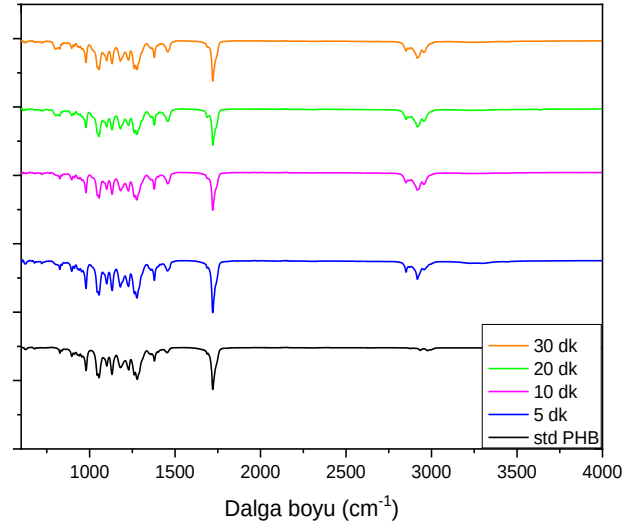
### 3.3.5. HK prosesi ile aktif çamurdan ekstrakte edilen biyopolimerlerin karakterizasyonu

Orifis-1 ile 4 barda zamana bağlı olarak ekstrakte edilen biyopolimerlerin (Şekil 3.28) FTIR spektrumları ticari PHB ile karşılaştırmalı olarak Şekil 3.29’da verilmiştir. HK’ya maruz kalma süresinin biyopolimerin kimyasal yapısı üzerindeki etkisini keşfetmek için FTIR spektrumları zamana bağlı olarak takip edilmiştir. 30 dakikaya kadar takip edilen işlem süresinin biyopolimer yapısı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. PHB'nin ayırt edici piki  $1720\text{ cm}^{-1}$  (C=O) civarında yer alırken, diğer yoğun pikler ester grubunu temsil eden  $1000\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$  (C-O) arasında yer almıştır[84].

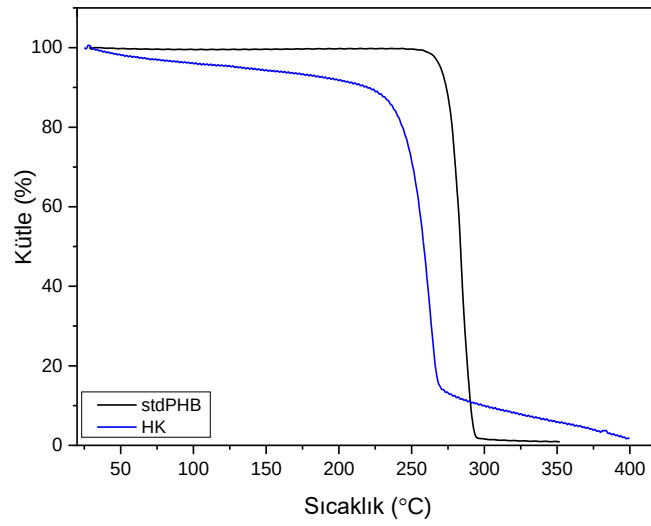


Şekil 3.28: HK destekli ekstraksiyon çalışmalarında elde edilen biyopolimerler.

Ticari PHB ve orifis-1 ile 4 barda 5 dakikada ekstrakte edilmiş biyopolimerin termal bozunma profilleri Şekil 3.30’da gösterilmektedir. İlk bozunma, ticari PHB için  $269,75^{\circ}\text{C}$ 'de başlarken, HK destekli ekstraksiyon ile elde edilen biyopolimer için  $243,21^{\circ}\text{C}$ 'de başlamaktadır. HK destekli ekstrakte edilen biyopolimerlerin maksimum termal bozunmasının ( $262,12^{\circ}\text{C}$ ) ticari PHB'den ( $296,62^{\circ}\text{C}$ ) daha düşük olduğu görülmüştür.



Şekil 3.29: HK prosesi ile elde edilen biyopolimerlerin ticari PHB ile karşılaştırmalı FTIR spektrumları.



Şekil 3.30: HK prosesi ile elde edilen biyopolimerlerin ticari PHB ile karşılaştırmalı TGA termogramları.

### **3.3.6. Aktif çamurdan biyopolimer ekstraksiyonu yöntemlerinin karşılaştırılması**

Bu tez çalışması kapsamında uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinin en iyi proses verimi alınan koşulları ve elde edilen polimerlere ait saflık, moleköl ağırlığı ve TGA sonuçları Tablo 3.2’de verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi kullanılan ekstraksiyon yöntemi, proses verimini, biyopolimerlerin fiziksel ve termokimyasal özelliklerini etkilemektedir. Buna göre sCO<sub>2</sub> ve sCO<sub>2</sub>-MeOH çalışmalarında verim ve PHB saflığı açısından önemli bir farkın olmadığı fakat moleköl ağırlığının metanol kullanımıyla yükseldiği görülmektedir. Kavitasyon çalışmalarında ise hem proses veriminin hem de elde edilen polimerin saflık ve M<sub>v</sub> bakımından diğer ekstraksiyon proseslerinin gerisinde kaldığında görülmektedir. Solvent ekstraksiyonunda kullanılan DMC ve kloroform ile ise daha yüksek proses verimi alınmasına rağmen polimer saflığı, sCO<sub>2</sub> prosesinde elde edilen polimerden daha düşüktür. Uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinde elde edilen bütün polimerler termal özellikleri bakımından da değerlendirildiğinde en yüksek bozunma sıcaklığının MeOH-sCO<sub>2</sub> prosesi ile elde edildiği görülmüştür. Bu nedenle nanofiber üretim çalışmalarında kullanılmak üzere gerekli olan biyopolimerler sCO<sub>2</sub>-MeOH prosesiyle ekstrakte edilmiştir.

Tablo 3.2: Ekstraksiyon çalışmalarında elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

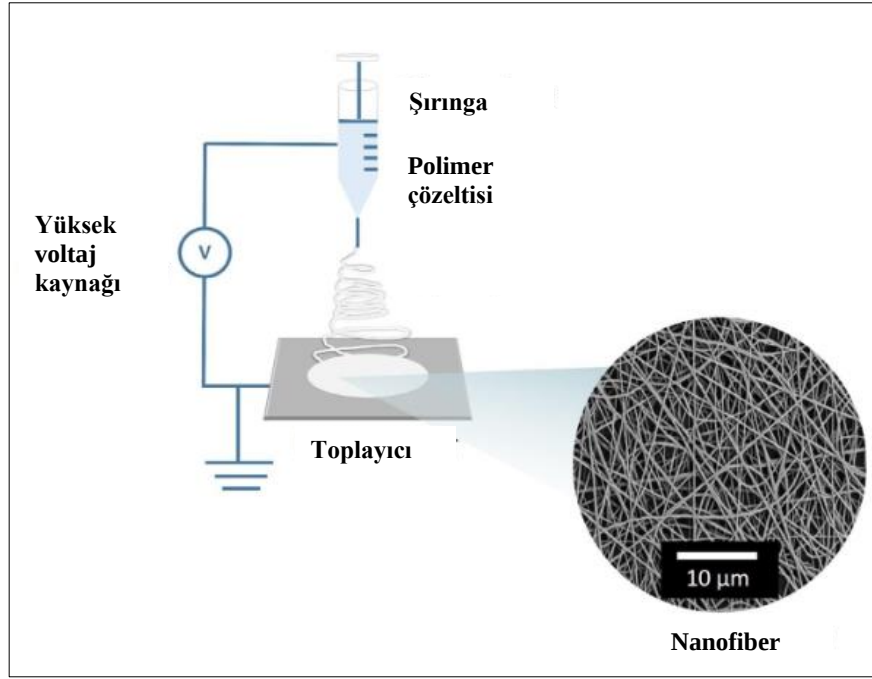
| Ekstraksiyon yöntemi   | Ekstraksiyon koşulu                       | Verim (%) | Safılık (PHB) (%) | M <sub>v</sub> (*10 <sup>6</sup> ) | TGA               |                  |                    | Kalan kütle (%) |
|------------------------|-------------------------------------------|-----------|-------------------|------------------------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|
|                        |                                           |           |                   |                                    | T <sub>baş.</sub> | T <sub>pik</sub> | T <sub>bitiş</sub> |                 |
| DMC                    | 90°C’de 1 saat                            | 82.28     | 89.56             | 0.25                               | 218,34            | 240,39           | 254,64             | 3,92            |
| Kloroform              | 60°C’de 1 saat                            | 95.48     | 83.69             | 0.22                               | 225,83            | 251,06           | 261,44             | 8,48            |
| sCO <sub>2</sub>       | 200 bar, 40°C’de 15 dk                    | 80.00     | 80.00             | 0.27                               | 237,89            | 259,31           | 267,56             | 9,98            |
| sCO <sub>2</sub> -MeOH | 200 bar, 40°C’de 15 dk, 4 mL MeOH ilavesi | 83.00     | 81.00             | 0.37                               | 249,81            | 274,22           | 282,51             | 0,3             |
| Kavitasyon             | Orifis-1, 4 bar, 5 dk                     | 72.00     | 71.35             | 0.15                               | 243,21            | 262,12           | 270,77             | 5,51            |

## 4. BİYOPOLİMERDEN NANOFİBER ÜRETİMİ

### 4.1. Giriş

Nanoteknoloji, son zamanların en çok çalışma yapılan alanlarından biridir ve yeni bir endüstriyel devrimin öncüsü olacağı tahmin edilmektedir. Bu kapsamda nanofiberler de yüksek porozite ve hacmine göre geniş yüzey alanı olması gibi özellikleri sebebiyle, enerji üretimi ve depolanması (yakıt pilleri, güneş pilleri), insan sağlığı (doku mühendisliği, ilaç salınımı) ve çevre mühendisliği (su arıtımı, gaz filtrasyonu) çalışmalarında geniş uygulama alanı bulmaktadır [95]. Nanofiberlerin çapları ise birkaç nanometre ile 100-150 nm arasında olabilmektedir. Nanofiberlerin çaplarının bu kadar düşük olması yüzey alanlarının hacimlerine oranla konvansiyonel fiberlerinkine göre neredeyse 1000 kat fazla olmasını sağlamaktadır. Bu nedenle, nanofiberler sıradan polimer fiberlerine göre üstün fiziksel (sertlik, gerilme mukavemeti vb.) ve kimyasal (birim yüzeyde bulunan fonksiyonel grup sayısı) özelliklere sahip olurlar [96].

Nanofiber üretiminde en yaygın kullanılan yöntem elektroğirme yöntemidir. Bu yöntem, yüksek elektrik alanındaki elektrostatik itme kuvvetlerinin, fiber sentezinde kullanılması prensibine dayanmaktadır [95]. Tipik elektroğirme düzeneği Şekil 4.1’de görülmektedir [97]. Elektroğirme düzeneği; pompa, içerisinde polimer çözeltisi bulunan şırınga, yüksek voltaj kaynağı ve metal toplayıcı olarak 4 temel bileşenden oluşmaktadır. Elektroğirme işlemi metal iğnenin içerisindeki polimer çözeltisinin elektrik ile yüklenmesi ile başlar. Elektrik ile yüklenen polimer damlasında bir düzensizlik meydana gelir. Aynı zamanda yüklerin karşılıklı birbirlerini itmeleri bir kuvvet oluşturur bu da yüzey gerilimine neden olur. Sonuç olarak polimer çözeltisi elektrik alanı yönünde bir akış meydana getirir. Elektrik akımının biraz daha yükselmesi küre şeklinde damlacık oluşturur ve ilerleyen safhada koni oluşumuna (Taylor konisi) sebebiyet verir. Bu koniden oluşan ince jetler metal toplayıcıda birikir.



Şekil 4.1: Elektroğirme deneyi için tipik bir düzenek.

Elektroğirme yönteminde üretilen nanofiberlerin yapısını etkileyen proses parametreleri: voltaj, akış hızı, şırınga ve toplayıcı tabla arasındaki mesafe ve polimer çözeltisinin konsantrasyonudur [98]. Yüksek voltaj yüzey yükü yoğunluğunu artırarak fiber çapını azalttığı için lif gerilimi için faydalıdır. Şırıngadaki polimerin akış hızının yavaş olması proses süresini uzatırken hızlı olması da fiber çaplarının büyümesine sebep olacaktır. Toplayıcı tablaya olan mesafenin çok kısa olması solventin buharlaşmasına elverişli değildir, bu da elyaflar arasında yapışmaya, elyaf çapının azalmasına ve elyaf performansının düşmesine neden olur. Mesafenin artmasıyla, eğirme jeti daha fazla ayrılma fırsatı elde edecek ve çap önemli ölçüde azalacaktır. Polimer konsantrasyonu, elektroğirme işlemindeki en önemli parametrelerden biridir. Düşük konsantrasyonlarda, zincir dolanması jeti kararsız hale getirir ve jetin çapı yüzey geriliminin etkisi altında küçülerek çözeltinin boncuklar veya boncuklu lifler oluşturmaya neden olur. Bununla birlikte, çözelti konsantrasyonu sıvı jet oluşturmak için çok yüksekse proses gerçekleştirilemez. Bu nedenle, tüm polimerler yalnızca uygun konsantrasyon aralığında elektroğirme yönteminde kullanılabilir.

Birçok doğal ve sentetik polimerler elektroğirme yöntemiyle nanofiber üretiminde kullanılmıştır. Sentetik polimerlere poliakrilonitril (PAN), polivinil alkol (PVA), polivinilflorit (PVDF), poliüretan (PU) örnek verilebilir [98]. Tipik doğal

polimerler arasında ise kolajen, kitosan, jelatin, selüloz asetat, kitin, polilaktik asit (PLA) ve PHB bulunur [99], [100]. Literatürde PHB kullanılarak elektroğirme yöntemi ile nanofiber üretim çalışmalarına bakıldığında; Acevedo vd. (2018)'nin [101] 25 kV voltaj, 0,5 mL/sa akış hızı ile 25 cm tabla uzaklığında 2,6 µm/2,2 µm çapında, Kuntzler vd. (2018)'nin [102] 15-25 kV voltaj aralığında, 1,15 mL/sa akış hızı ile 15 cm tabla uzaklığında 810 nm çapında, Cherpinski vd. (2018)'nin [103] 16 kV voltajda, 6 mL/sa akış hızında ve 15 cm tabla uzaklığında 100 µm çapında, Morais vd. (2015)'nin [104] 15,4-31,3 kV aralığında 2 µL akış hızında 826 µm çapında fiberler elde ettiği görülmektedir. PHB'lerden elde edilen bu nanofiberlerin biyomedikal uygulamalarda ve gıda paketlenmede kullanılması önerilmiştir. Atıklardan elde edilen PHA'nın ise çeşitli safsızlıklar içermesi (endotoksinler, protein, yağ, DNA vb.) ve viral, bakteriyel veya genetik kirleticiler sebebiyle medikal alanlarda kullanım alanı bulması güçtür [105].

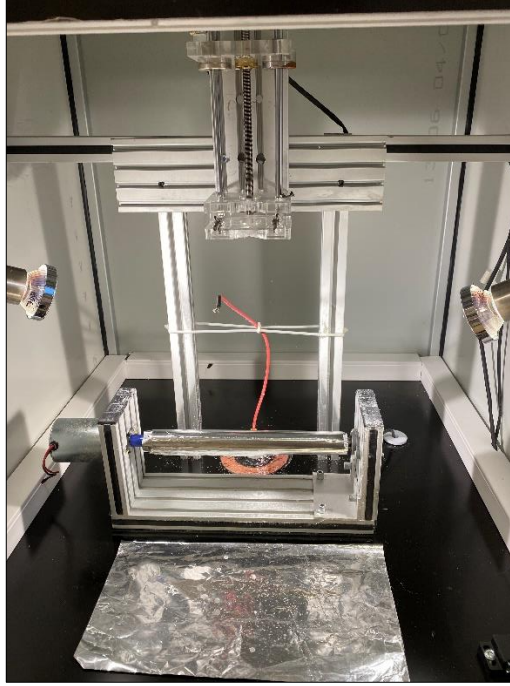
Nanofiberler çevre mühendisliği uygulamalarında, hava filtrasyon sistemlerinde, toz tutma sistemlerinde, iç ortam hava filtrasyonunda, araç kabin filtrelerinde, sıvıların filtrasyonunda, ağır metallerin ve organik bileşiklerin adsorpsiyonunda ve sıvı/gaz alanlarında sensör üretiminde uygulama alanı bulmaktadır [106]. Nanofiberler geniş yüzey-hacim oranı ile membran filtrasyonu uygulamaları için uygun malzemelerdir. Atık sulardan 1-3 µm boyutlarındaki partiküllerin gideriminde %95 verim elde edilmiştir [107]. Nanofiber membran ile havadan partiküler madde gideriminde (1-5 µm arasındaki partiküller) %100 verim sağlanmıştır [108].

## **4.2. Metodoloji**

### **4.2.1. Elektroğirme yöntemi deney koşulları**

Elde edilen PHB polimerinden nanofiber üretimi için Şekil 4.2'deki elektroğirme cihazı kullanılmıştır. Cihaz temel olarak pompa, yüksek voltaj kaynağı, şırınga ve toplayıcı döner diskten oluşmaktadır. Belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan polimer çözeltileri 50°C'de bir gece boyunca karıştırılarak hazırlanmıştır. Homojen olarak çözünmüş halde olan polimer çözeltisinin sıcaklığı kapatılarak oda sıcaklığına soğuması beklenmiştir. Uygun sıcaklık ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan polimer çözeltileri şırınga ile cihaza yerleştirilerek akış hızı, voltaj ve

zaman parametreleri değiştirilerek toplayıcı ünite üzerine sarılan folyo ile nanofiberler toplanmıştır.



Şekil 4.2: Nanofiber üretiminde kullanılan elektroğirme cihazı.

#### 4.2.2. Analiz yöntemleri

Nanofiberlerin karakterizasyon çalışmalarında kullanılan FTIR ve TGA analizleri Bölüm 3.2.4.2 ve Bölüm 3.2.4.3’de detayları verilen metotlara göre yapılmıştır.

##### 4.2.2.1 Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)

Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), bir numunenin ve referansın sıcaklığını artırmak için birim zamandaki enerji girdisi farkının (mW) sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçüldüğü tekniktir. Bu çalışma kapsamında üretilen nanofiberlerin termal özelliklerinin belirlenmesinde TG-DSC (Ohio, USA) Mettler 126 1/1600 cihazı 50 mL/dk argon atmosferinde kullanılmıştır.

#### **4.2.2.2 Temas açısı**

Temas açısı, bir sıvı-buhar arayüzünün katı bir yüzeyle buluştuğu yerde, ölçülen açıdır. Katı bir yüzeyin bir sıvı tarafından ıslatılabilirliğini ölçer. Bu çalışma kapsamında üretilen nanofiberlerin temas açısı, temas açısı açölçeri (CAM 101, KSV Instruments) kullanılarak karakterize edilmiştir. Yüzeye bırakılan su damlasının görüntüsü bilgisayara kaydedilmiştir. Görüntü yazılımda analiz edilerek nanofiber yüzeyi ile olan açısı belirlenmiştir. Temas açısı $<90^{\circ}$  olan malzemeler hidrofilik;  $>90^{\circ}$  olan örnekler ise hidrofobik olarak tanımlanmaktadır.

#### **4.2.2.3 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)**

Elde edilen nanofiberlerin morfolojisi SEM (Philips XL30 SFEG, Amsterdam, Hollanda) ile görüntülenmiştir. Görüntüler kullanarak ImageJ programında fiber çapları dağılımı grafiği oluşturulmuştur.

#### **4.2.2.4 Çekme testleri**

Nanofiberlerin çekme testleri Zwick Roell marka malzeme test cihazı ve TESTXPERT II programı kullanılarak yapılmıştır. Cihaz parametrelerinde ön yük 0,01N, hız ise 50 mm/min olarak ayarlanmıştır.

### **4.3. Sonuçlar ve Tartışma**

#### **4.3.1. Ticari PHB kullanılarak nanofiber üretimi**

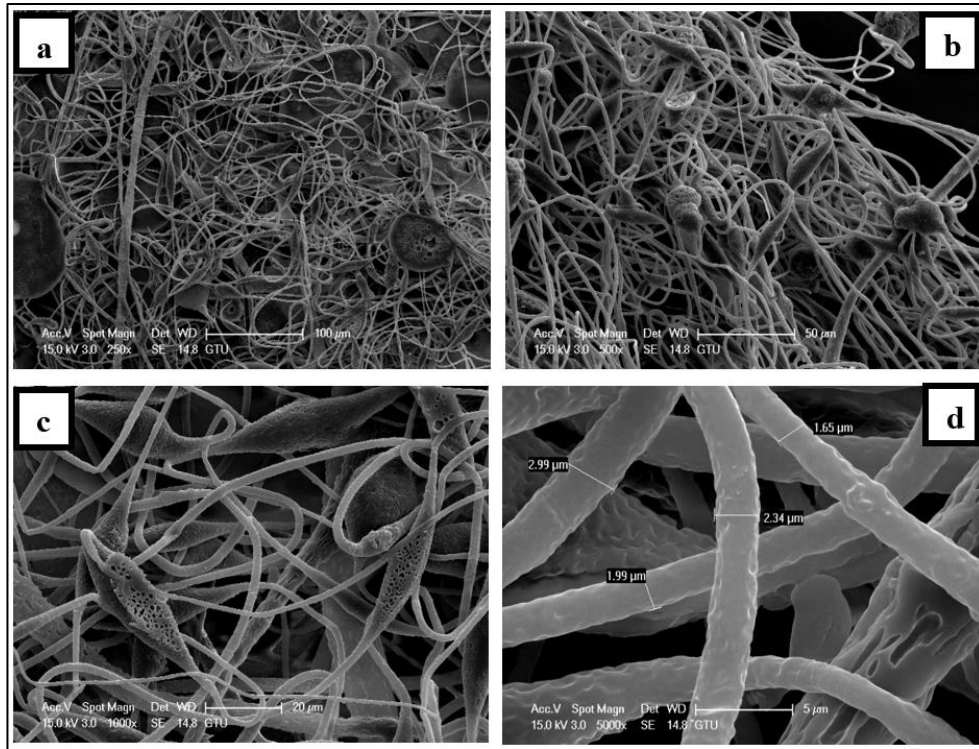
Bu çalışma kapsamında üretilen PHB polimerlerinden nanofiber üretimi yapılmadan önce ticari PHB ile nanofiber üretimi çalışmaları yapılmıştır. Böylece nanofiber üretiminde önemli olan proses parametreleri belirlenmiştir.

PHB nanofiberinin sentezi için konsantrasyon, solvent ve akış hızı parametreleri değiştirilerek farklı deney setleri hazırlanmıştır. Deney setlerinde değişen parametreler Tablo 4.1’de verilmiştir. Çekilen nanofiberler SEM ile görüntülenmiş ve FTIR analizleri yapılmıştır.

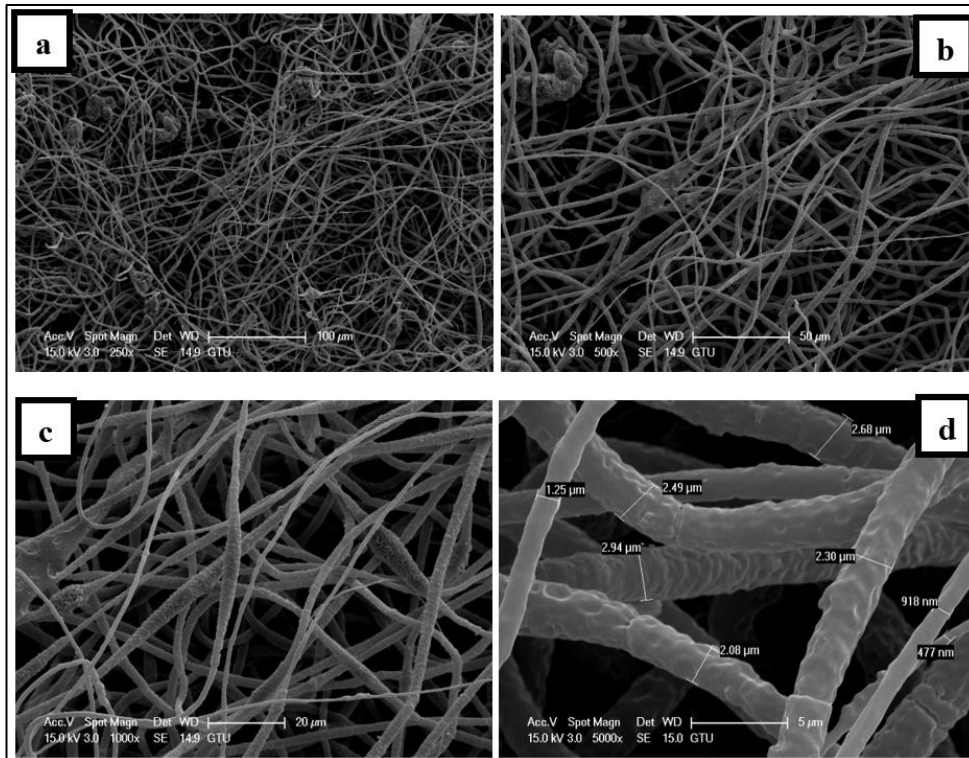
Tablo 4.1: Standart PHB ile nanofiber üretimi deney seti parametreleri.

| Kod   | Polimer<br>çözeltisi<br>yoğunluk<br>(%wt) | Çözücü    | Voltaj<br>(kV) | Akış hızı<br>(mL/sa) | Süre<br>(sa) |
|-------|-------------------------------------------|-----------|----------------|----------------------|--------------|
| PHB-1 | 2,5                                       | Kloroform | 15             | 1                    | 1            |
| PHB-2 | 5                                         | Kloroform | 15             | 1                    | 1            |
| PHB-3 | 5                                         | Kloroform | 15             | 2                    | 1            |

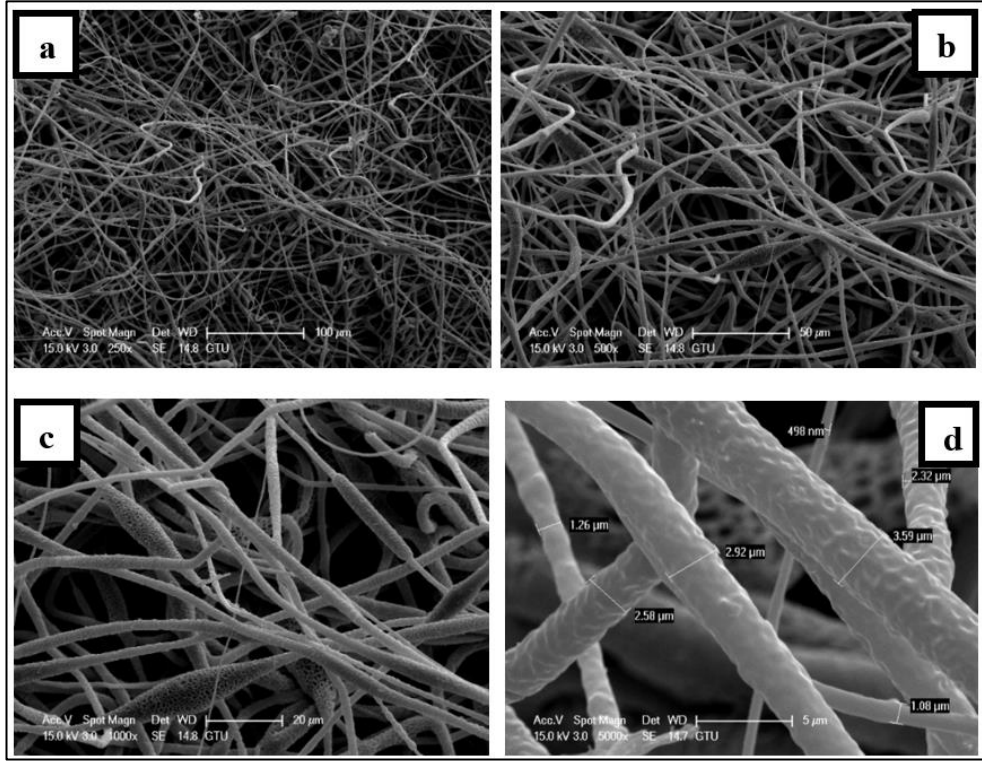
PHB-1 ve PHB-2 olarak sırasıyla %2,5 ve %5 lik konsantrasyonlarda aynı voltaj ve akış hızı ile hazırlanan nanofiberlerin SEM morfolojileri incelendiğinde %2,5 konsantrasyonunda istenmeyen boncuksu yapıların daha fazla olduğu (Şekil 4.3) ve %5'lik konsantrasyonda daha homojen yapılar (Şekil 4.4) elde edildiği gözlemlenmiştir. Akış hızı saatte 2 mL ve saatte 1 mL olarak çalışılmıştır. 2 mL/sa akış hızı ile elde edilen fiberlerde daha az saçaklanma olduğu ve daha homojen fiber yüzeyleri elde edildiği SEM analizlerinde nanofiberlerin nm mertebesinde ince uzun ipliksi şeklinde yapıları gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). En iyi görüntünün alındığı PHB-3 nanofiberi Şekil 4.6'da verilmiştir. Farklı parametreler ile elde edilen PHB nanofiberlerin FTIR spektrumları Şekil 4.7'de verilmiştir. FTIR spektrumlarında PHB'nin ayırt edici piki  $1720\text{ cm}^{-1}$  (C=O) civarında görülmüştür.



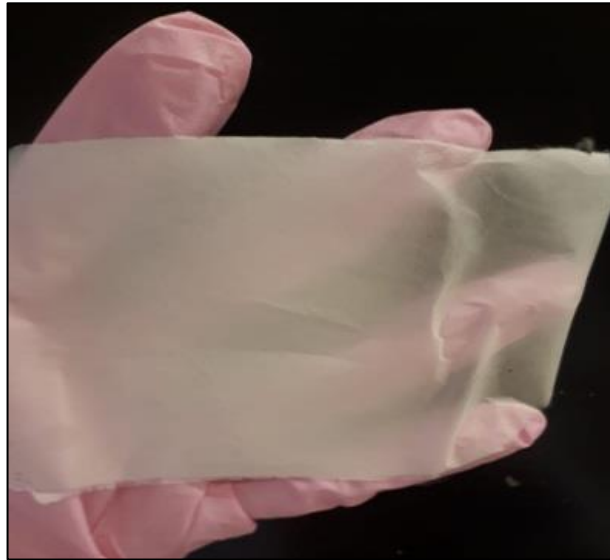
Şekil 4.3: PHB-1 kodlu numunenin SEM görüntüleri a) x250, b) x500 c) x1000 d) x5000.



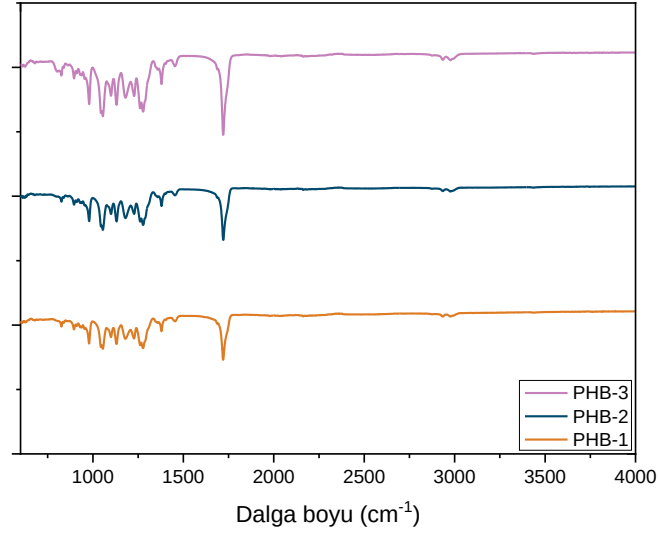
Şekil 4.4: PHB-2 kodlu numunenin SEM görüntüleri a) x250, b) x500 c)x1000 d) x5000.



Şekil 4.5: PHB-3 kodlu numunenin SEM görüntüleri a) x250, b) x500 c) x1000 d) x5000.



Şekil 4.6 PHB-3 kodlu nanofiberin görüntüsü.



Şekil 4.7: PHB-1,2,3 nanofiberlerinin FTIR spektrumları.

#### 4.3.2. sCO<sub>2</sub> destekli ekstraksiyon ile elde edilen PHB kullanılarak nanofiber üretimi

sCO<sub>2</sub> prosesi ile aktif çamurdan ekstrakte edilen %78 PHB içeren biyopolimerler ile nanofiber üretimi için Tablo 4.2’de verilen deney koşulları kullanılmıştır. Çalışmalar, ticari PHB ile yapılan nanofiber çalışmalarında elde edilen optimum koşullar olan %5 polimer yoğunluğu, 2 mL/sa akış hızı ve çözücü olarak kloroform kullanılması ile başlamıştır. Fakat 15 kV voltaj uygulandığında çok fazla saçılma olduğundan nanofiber elde edilememiştir. Bu sebeple voltaj 12 kV’a düşürülerek çalışmalara devam edilmiştir. Bütün deneyler 60 dk boyunca yürütüldükten sonra, nanofiberlerin çekme mukavemetinde zamanın etkisini değerlendirmek amacıyla optimum elektroegirme proses şartları kullanarak 30 dk, 120 dk ve 150 dk sürelerinde de nanofiber üretimi yapılmıştır.

Tablo 4.2: sCO<sub>2</sub> ile ekstrakte edilen PHB polimeri ile nanofiber üretimi deney koşulları.

| Kod        | Polimer çözelti yoğunluk (%wt) | Çözücü    | Voltaj (kV) | Akış hızı (mL/sa) | Süre (dk) |
|------------|--------------------------------|-----------|-------------|-------------------|-----------|
| PHB-R1     | 5                              | Kloroform | 12          | 2                 | 60        |
| PHB-R2     | 5                              | Kloroform | 12          | 1                 | 60        |
| PHB-R5     | 4                              | Kloroform | 12          | 1                 | 60        |
| PHB-R7     | 4                              | Kloroform | 12          | 0,6               | 60        |
| PHB-R2-30  | 5                              | Kloroform | 12          | 1                 | 30        |
| PHB-R2-120 | 5                              | Kloroform | 12          | 1                 | 120       |
| PHB-R2-150 | 5                              | Kloroform | 12          | 1                 | 150       |

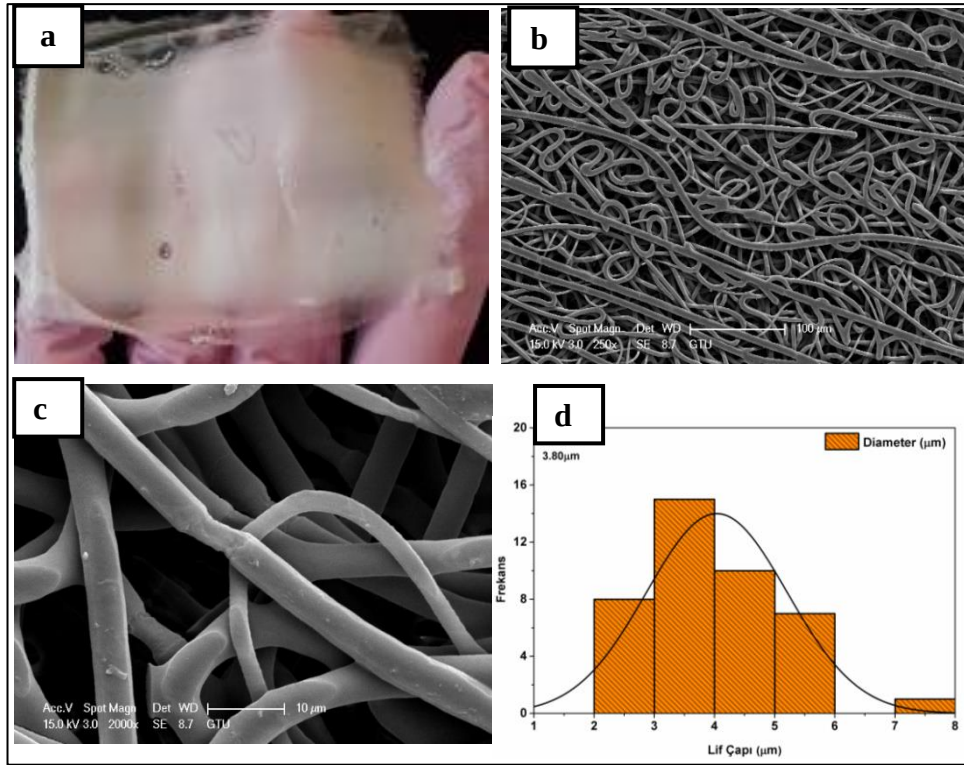
Fiberlerin ortalama çapları PHB-R1 için 3,80  $\mu\text{m}$ , PHB-R2 için 3,37  $\mu\text{m}$ , PHB-R5 için 1,98  $\mu\text{m}$  ve PHB-R7 için 2,20  $\mu\text{m}$  olarak SEM görüntüleri kullanılarak ImageJ programı ile hesaplanmıştır. Buna göre konsantrasyonun %5'ten %4'e (PHB-R2 ve PHB-R5) düşmesi ile fiber çapının azaldığı görülmüştür. Literatürde sadece PHB kullanılarak üretilen nanofiber çalışmaları, kompozit nanofiber çalışmalarına oranla daha azdır ve %5-%35 (w/v) arasındaki PHB oranlarında çalışmalar yapılmıştır (Tablo 4.3). Yüksek polimer yoğunluğunda yapılan çalışmada elektriksel iletkenliği artırarak daha küçük çaplı fiber elde edilebilmesi için NaCl ilavesi yapılmıştır [102].

Akış hızının saate 2 mL'den 1 mL'ye (PHB-R1 ve PHB-R2) azalması ile fiber çaplarının azaldığı görülmüştür (Tablo 4.3). Düşük akış hızında nanolifler toplayıcıya ulaşmadan önce çözücünün buharlaşmasından dolayı yüksek akış hızlarındakine göre daha düşük çaplı fiberler elde edilmektedir [98], [102], [104], [109]. Nanofiber çaplarının küçük olması, fiberlerin birbirine daha yakın olması ve/veya üstüste gelmelerine olanak sağlayarak nanofiber malzemenin geçirgenliğini azaltmaktadır [104]. Bu özellik de nanofiberlerin uygun uygulama alanı bulmasında önemlidir.

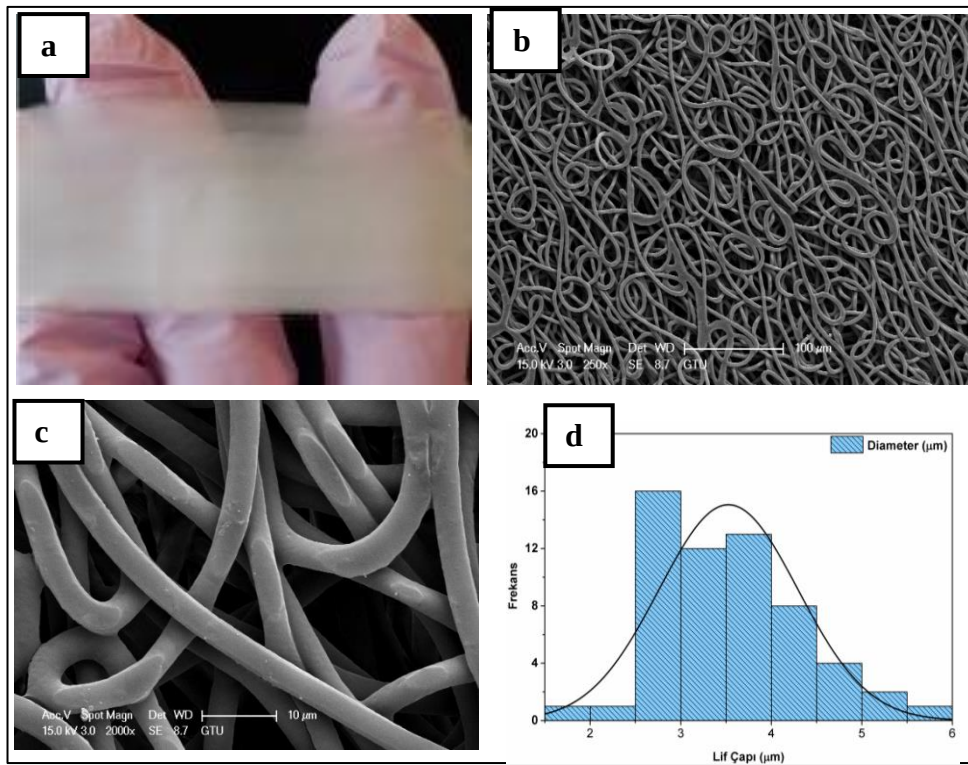
Tablo 4.3: PHB kullanılarak üretilen nanofiberlerin üretim ve ürün özelliklerinin karşılaştırılması.

| Polimer | Polimer üretim koşulu                                 | Fiber<br>çapı<br>( $\mu\text{m}$ ) | Yoğunluk<br>(w/v) | Akış hızı<br>( $\mu\text{L/sa}$ ) | Volt.<br>(kV) | Ref.          |
|---------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|---------------|---------------|
| PHB     | <i>Burkholderia xenovorans</i><br>(xylos ve mannitol) | 2-4                                | 5                 | 500                               | 25            | [101]         |
| PHB     | <i>Spirulina sp.</i><br>(Sentetik besi yeri)          | 0,81                               | 35                | 1150                              | 15            | [102]         |
| PHB     | Biomer marka                                          | 100                                | 10                | 6000                              | 16            | [103]         |
| PHB     | <i>Spirulina sp.</i><br>(Sentetik besi yeri)          | 0,82                               | 30                | 120                               | 15,4-31,3     | [104]         |
| PHB     | Goodfellow marka                                      | 3-4                                | 10                | 0,5                               | 10            | [110]         |
| PHB     | Aktif çamur<br>(Endüstriyel atık su)                  | 3,80                               | 5                 | 2000                              | 12            | Bu<br>çalışma |
|         |                                                       | 3,34                               | 5                 | 1000                              | 12            |               |
|         |                                                       | 1,98                               | 4                 | 1000                              | 12            |               |
|         |                                                       | 2,20                               | 4                 | 600                               | 12            |               |

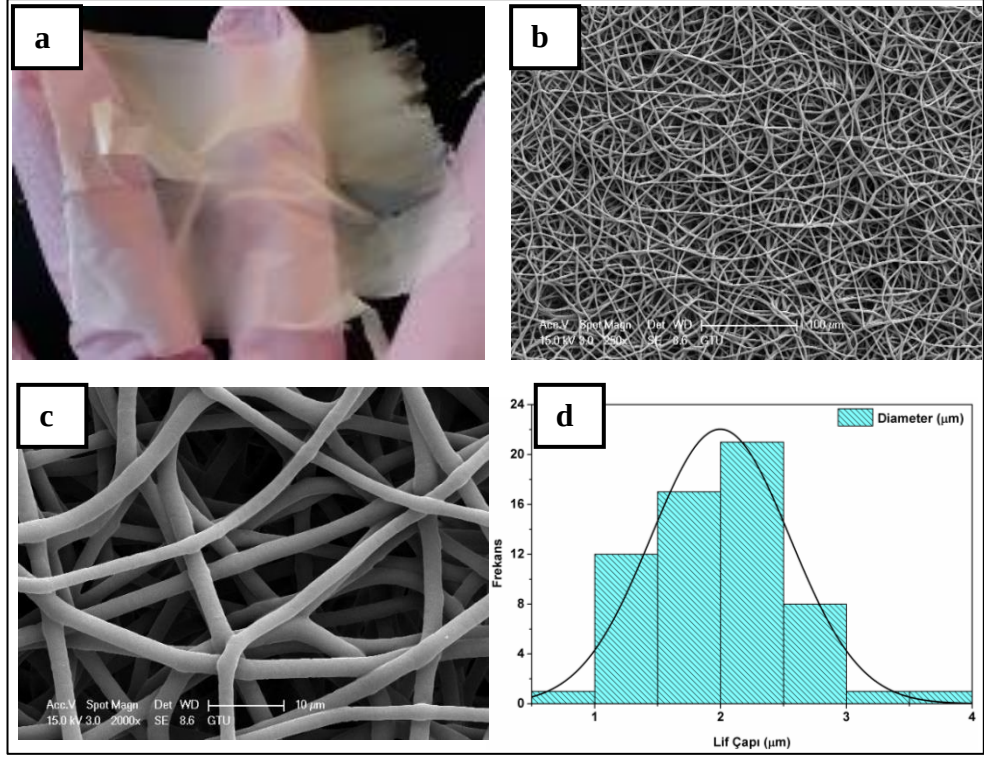
Elde edilen PHB-R1, PHB-R2, PHB-R5 ve PHB-R-7 kodlu nanofiberlerin fotoğrafları, SEM görüntüleri ve ortalama çap grafikleri Şekil 4.8-Şekil 4.11 arasında verilmiştir. SEM görüntülerine göre elde edilen nanofiberlerin; homojen, ince ve uzun filamentli yapıları olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca nanofiber morfolojisinde istenmeyen bir durum olan boncuk benzeri yapılar gözlemlenmemiştir.



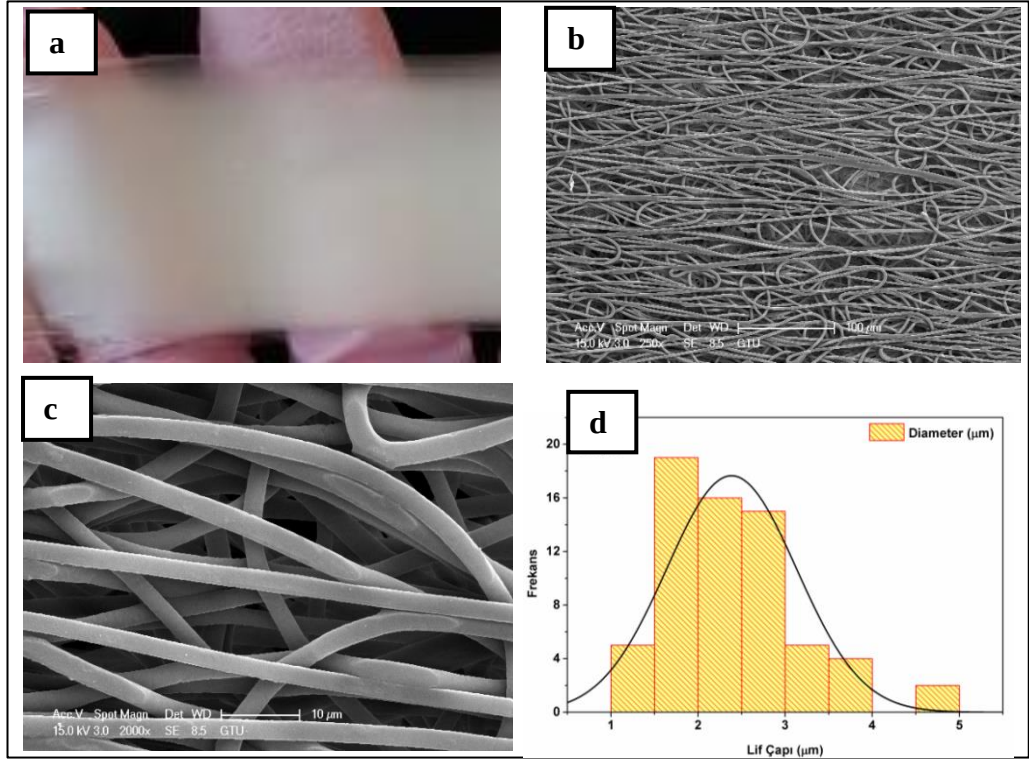
Şekil 4.8: PHB-R1 Nanofiberinin a) Fotoğrafi b) SEM görüntüsü x250 c) SEM görüntüsü x2000 d) nanofiberin ortalama çap grafiği.



Şekil 4.9 : PHB-R2 Nanofiberinin a) Fotoğrafi b) SEM görüntüsü x250 c) SEM görüntüsü x2000 d) nanofiberin ortalama çap grafiği.



Şekil 4.10: PHB-R5 Nanofiberinin a) Fotoğrafi b) SEM görüntüsü x250 c) SEM görüntüsü x2000 d) nanofiberin ortalama çap grafiği.



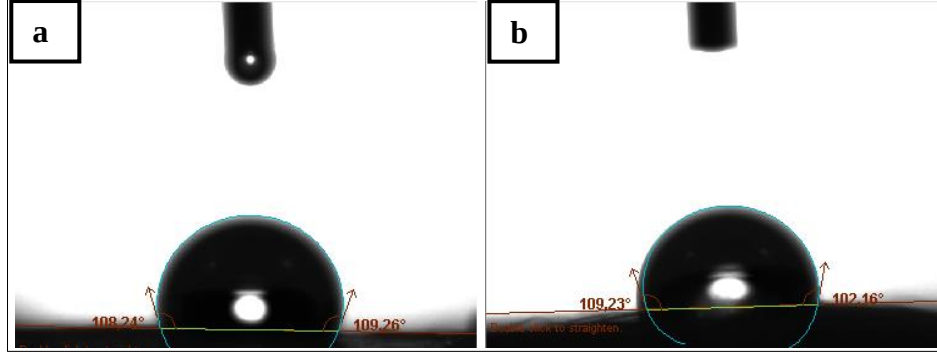
Şekil 4.11: PHB-R7 Nanofiberinin a) Fotoğrafi b) SEM görüntüsü x250 c) SEM görüntüsü x2000 d) nanofiberin ortalama çap grafiği.

### 4.3.3. Elde edilen nanofiberlerin karakterizasyonu

KMK'ya endüstriyel atık su beslenerek üretilen PHB kullanılarak elde edilen nanofiberlerin karakterizasyonu, standart PHB nanofiberleri ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Standart PHB ile üretilen nanofiberlerden PHB-3 kodlu ve mikroorganizmadan ekstrakte edilen PHB biyopolimeri üretilen nanofiberlerden PHB-R2 kodlu olan örneklerin; hidrofilik/hidrofobik özelliklerini belirlemek için temas açısı ölçümü, yapısal karakterizasyonu için FTIR analizi, termal özelliklerinin belirlenmesi için DSC ve TGA analizleri, mekanik özelliklerinin karşılaştırılması için ise çekme testleri yapılmıştır.

#### 4.3.3.1 Temas açısı

PHB nanofiberlerinin suda çözünmeme özelliği sebebiyle hidrofobik özellik göstermesi beklenmektedir [102]. PHB-3 kodlu standart PHB nanofiberi ve PHB-R2 hidrofobik özellik göstermiş ve temas açıları sırasıyla 108,75° ve 105,70° olarak ölçülmüştür (Şekil 4.12).

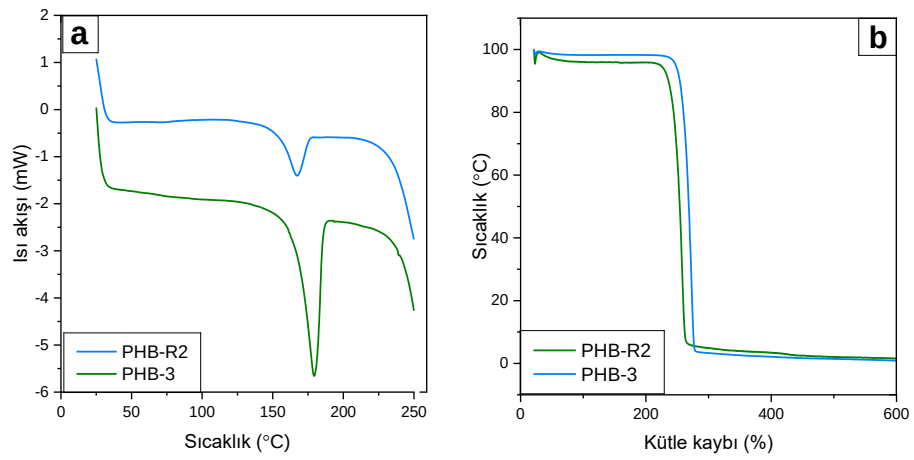


Şekil 4.12: Temas açısı a) PHB-3 b) PHB-R2.

#### 4.3.3.2 Nanofiberlerin termal özellikleri

Numune ve referans arasındaki ısı akışı farkı sıcaklığın bir fonksiyonu olarak incelenerek elde edilen nanofiberlerin DSC termogramları Şekil 4.13.a)'da verilmiştir. Sonuçlara göre, elde edilen sCO<sub>2</sub>-PHB polimer nanofiberinin, ticari PHB polimer nanofiberi ile benzer termal özellikler gösterdiği gözlenmiştir. Ticari PHB polimeri ile hazırlanan PHB-3 kodlu nanofiber için erime sıcaklığı 179,05°C iken sCO<sub>2</sub> prosesi ile ekstrakte edilen biyopolimer için 167,09°C bulunmuştur.

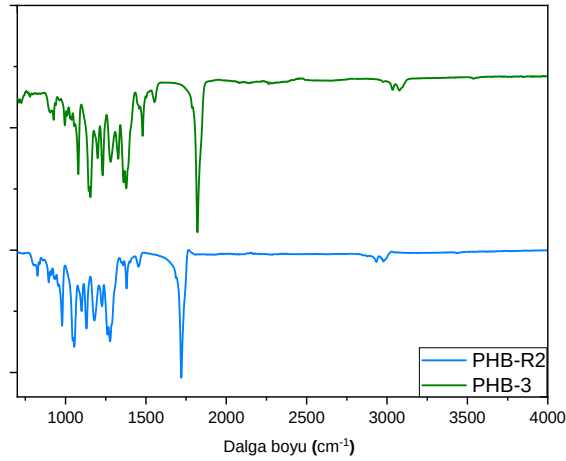
Numune kütlesindeki değişiklik, sıcaklığın ve zamanın bir fonksiyonu olarak incelenerek elde edilen nanofiberlerin termal bozunma eğrileri Şekil 4.13.b)'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, ticari PHB polimeri ile hazırlanan PHB-3 kodlu nanofiber için termal bozunma piki 271,34°C olarak kaydedilmiştir. %78 saflıkta geri kazanılan PHB polimeri ile hazırlanan PHB-R2 kodlu nanofiber numunesindeki termal bozunma piki ise 257,62°C olarak bulunmuştur. Bulunan değerler karşılaştırıldığında ticari ve ekstraksiyon ile geri kazanılan PHB polimer nanofiberlerinin termal olarak benzer özellikler gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.13: PHB-R2 ve PHB-3 'ün termal özellikleri: a) DSC b) TGA termogramı.

#### 4.3.3.3 Nanofiberlerdeki fonksiyonel gruplar

PHB-3 nanofiberinin gösterdiği PHB karakteristik pikleri, 3000  $\text{cm}^{-1}$ 'e yakın olan C-H bağları ve 1700  $\text{cm}^{-1}$  etrafındaki C=O bağları, PHB-R2 nanofiberinde de tespit edilmiştir. Bu tez kapsamında ekstrakte edilen PHB ile üretilen nanofiberlerin standart PHB nanofiberi ile uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 4.14).

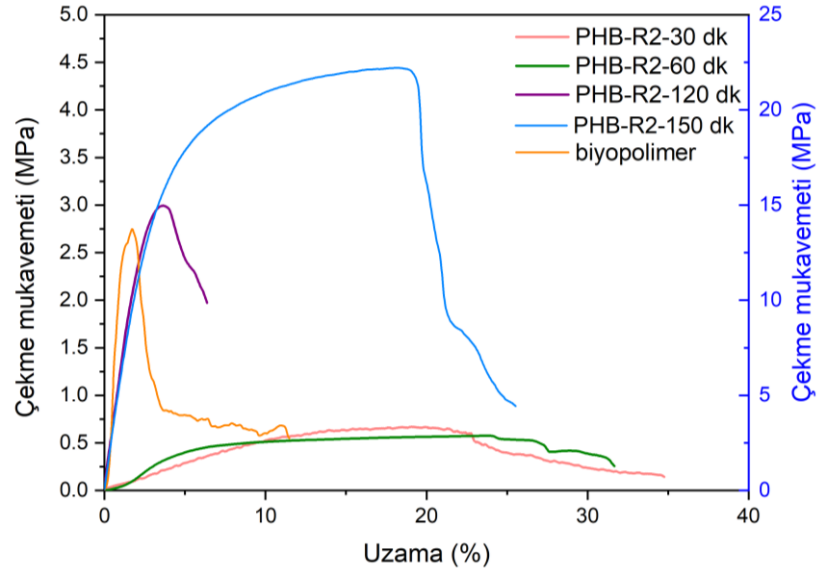


Şekil 4.14: PHB-R2 ve PHB-3'ün FTIR spektrumu.

#### 4.3.3.4 Nanofiberlerin mekanik özellikleri

Nanofiberlerin çekme mukavemeti-uzama grafiği Şekil 4.15'de verilmiştir. Test sonuçları ise Tablo 4.4'de verilmiştir. En iyi mekanik performansı; 22,21 MPa çekme mukavemeti ve %25,54 kırılmadaki uzama değeri ile PHB-R2 koşullarında (%5 (w/v); 12 kV; 1 mL/sa) 150 dk süresinde çekilen nanofiber göstermiştir. Malzemenin dayanımını ifade eden çekme modülü ise 599,59 MPa olarak, PHB filmlerinin 1,5 GPa olan çekme modülü değerinden çok düşük olarak ölçülmüştür [111]. Ayrıca nanofiber üretiminde kullanılan biyopolimerin de çekme testi yapılmış ve nanofiber üretimi ile çekme modülünün 77,58 MPa'dan 599,59 MPa'a yükseldiği görülmüştür.

Bu çalışma kapsamında üretilen nanofiberlerin karakterize edilen özellikleri değerlendirildiğinde nanofiberlerin yüksek bozunma sıcaklığı (257,62°C), hidrofobikliği (105,7°) ve düşük çekme modülü (599,59 MPa) özellikleri dikkat çekmektedir. Literatürde saf kültürlerden elde edilen PHB ya da doğrudan ticari PHB kullanılarak üretilen nanofiberler özellikleri sebebiyle gıda paketlenme uygulamaları ve biyomedikal uygulamalar için önerilmiştir [102], [104], [110], [112]. Fakat KMK ve atık su kullanılarak elde edilen PHB'ler kullanılarak nanofiber üretimi çalışmaları bulunmamaktadır. Bu çalışma kapsamında elde edilen çekme dayanımının artırılması (kompozit nanofiberler) ile atık suların arıtılması (boya giderimi vb)[100], [113], hava filtreleme uygulamalarında [113], [114] ve gaz sensörlerinde [115] kullanılabilmesi önerilmektedir.



Şekil 4.15: Nanofiberlerin çekme mukavemeti-uzama grafiği.

Tablo 4.4: PHB-R2 Nanofiberinin çekme testi sonuçları.

| Örnek         | Çekme modülü (Mpa) (E) | Çekme mukavemeti (MPa) ( $\sigma$ ) | Kopma gerilmesi (MPa) ( $\sigma_b$ ) | Kırılmadaki uzama (%) ( $\epsilon_b$ ) | Ortalama tabaka kalınlığı ( $\mu m$ ) |
|---------------|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|
| PHB-R2-30 dk  | 5,19                   | 0,67                                | 0,14                                 | 34,76                                  | 30                                    |
| PHB-R2-60 dk  | 1,88                   | 0,57                                | 0,26                                 | 31,66                                  | 70                                    |
| PHB-R2-120 dk | 133,80                 | 2,99                                | 1,97                                 | 6,37                                   | 160                                   |
| PHB-R2-150 dk | 599,59                 | 22,21                               | 4,43                                 | 25,54                                  | 150                                   |
| Biyopolimer   | 77,58                  | 2,75                                | 0,55                                 | 11,50                                  | 20                                    |

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması, atık su ve atık çamur kullanılarak, KMK'da PHA depolanmasını, depolanan PHA'nın yenilikçi ekstraksiyon yöntemleri ile hücre dışına çıkarılmasını ve çıkarılan PHA'nın nanofiber üretiminde kullanılması sürecindeki proseslerin işletme parametrelerinin belirlenmesini kapsamaktadır.

Maya endüstrisi atık su arıtma tesisi aktif çamur prosesinden alınan aktif çamurun laboratuvar ortamında, aynı endüstrinin atık suyu ile beslenmesi sonucu mikroorganizmaların depoladıkları PHA'nın hücre dışına çıkarılması için 3 farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. PHA depolayan bakteriler hasat edilerek liyofilizasyon yöntemi ile kurutulmuştur. Biyokütlede mikrobiyal tanımlama yapılarak biyokütle içinde 15 farklı tür tespit edilmiştir. Baskın türlerden biri olan *Bacillus cereus* literatürde, PHA depolamasında da kullanılan türlerden biridir.

Çalışma kapsamında uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinden birincisi, solvent ekstraksiyonudur ve tez kapsamında geliştirilen diğer ekstraksiyon yöntemleri için referans olarak kullanılmak üzere uygulanmıştır. Bu yöntem için kloroform ve DMC olmak üzere iki farklı solvent kullanılmıştır. Kloroform PHA ekstraksiyonu için en çok kullanılan solventtir; fakat kloroformun toksik özellikleri sebebiyle, alternatif olabilecek solventler araştırılmaktadır. Bunlar arasında DMC, çözücü olarak çok yönlülüğü ve insan sağlığı için düşük toksisitesi nedeniyle PHA ekstraksiyonu için kloroforma alternatif bir çözücü olarak seçilmiştir. KMK'da depolanan PHA; DMC ile %82 verimle, kloroform ile %95 verimle ekstrakte edilmiştir. Sırasıyla %89 PHB saflığında, 0,25 MDa molekül ağırlığında ve %84 PHB saflığında 0,22 MDa molekül ağırlığında biyopolimerler elde edilmiştir. Polimerlerin FTIR spektrumları ve termal özellikleri ticari PHB ile uyumludur.

İkinci ekstraksiyon yöntemi ise sCO<sub>2</sub> destekli ekstraksiyon yöntemidir. Bu yöntem literatürde genellikle aromatik yağların çıkarılması proseslerinde kullanılmakla birlikte, biyokütleden biyopolimer ekstrakte edilmesi için de az sayıda çalışmada kullanılmıştır. Bu tez kapsamında sCO<sub>2</sub> destekli ekstraksiyon çalışmalarında, proses verimine, basınç (100-300 bar), sıcaklık (35-60°C), biyokütle miktarı (1-4 gr), ekstraksiyon süresi (15-120 dk) ve yardımcı çözücü olarak metanol kullanımı parametrelerinin etkisi değerlendirilmiştir. Proses verimini; basınç ve sıcaklığın, ekstrakte edilen biyokütle ve ekstraksiyon süresi parametrelerinden daha

çok etkilediği görülmüştür. Buna göre sCO<sub>2</sub> destekli ekstraksiyon prosesinde 2 gr biyokütlenin 200 barda 4 mL metanol ilavesi ile 15 dk ekstrakte edilmesinde %83 proses verimi ve %81 PHB saflığında 0,37 MDa molekül ağırlığında polimerler elde edilmiştir. Elde edilen polimerlerin FTIR ve TGA sonuçları ise ticari PHB ile uyumludur.

Uygulanan üçüncü ekstraksiyon yöntemi ise hidrodinamik kavitasyon destekli ekstraksiyon yöntemidir. Bu yöntemde liyofilize çamurun su ile hazırlanan çözeltileri kavitasyon reaktörüne beslenmiştir. İki farklı orifis plakası ile farklı basınç (2-6 bar), süre (5-30 dk) ve yoğunluk (0,5-2 g/L) parametreleri ile yapılan çalışmalarda, orifis-1 ile 5 dk'da orifis-17 ile de 10 dk'da maksimum proses verimine ulaşıldığı görülmüştür (4 barda %72). Konsantrasyonun 0,5 g/L'den 2 g/L'ye artmasıyla ise verim %30 seviyelerine düşmektedir. HK prosesi için önemli parametrelerden olan kavitasyon sayısı orifis-1 ile 1-2 arasında iken, orifis-17 ile basıncın artmasıyla 3'ten 7'ye yükselmektedir. Sonuç olarak kavitasyon destekli ekstraksiyon çalışmalarında, tek delikli orifis kullanılarak 0,5 g/L çözelti yoğunluğunda 5 dk proses süresince, %72 verimle, %71 PHB saflığında, 0,17 MDa molekül ağırlığında polimerler elde edilmiştir. Elde edilen polimerlerin FTIR ve TGA sonuçları ise ticari PHB ile uyumludur.

Ekstraksiyon çalışmalarının verim, saflık ve molekül ağırlığı parametreleri bakımından karşılaştırıldığı Tablo 3.2'de kullanılan ekstraksiyon yönteminin, proses verimi ile biyopolimerlerin fiziksel ve termokimyasal özelliklerini etkilediği görülmektedir. Buna göre sCO<sub>2</sub> ve sCO<sub>2</sub>-MeOH çalışmalarında verim ve PHB saflığı açısından önemli bir farkın olmadığı fakat molekül ağırlığının metanol kullanımıyla yükseldiği görülmektedir. Kavitasyon çalışmalarında ise hem proses veriminin hem de elde edilen polimerin saflık ve M<sub>v</sub> bakımından diğer ekstraksiyon proseslerinin gerisinde kaldığında görülmektedir. Solvent ekstraksiyonunda kullanılan DMC ve kloroform ile ise daha yüksek proses verimi alınmasına rağmen polimer saflığı, sCO<sub>2</sub> prosesinde elde edilen polimerden daha düşüktür. Uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinde elde edilen bütün polimerler termal özellikleri bakımından da değerlendirildiğinde en yüksek bozunma sıcaklığının MeOH-sCO<sub>2</sub> prosesi ile elde edildiği görülmüştür. Bu durumda, sCO<sub>2</sub>-MeOH prosesinde elde edilen biyopolimerler kullanılarak nanofiber üretim çalışmaları yapılmıştır.

Nanofiberler yüksek porozite ve geniş yüzey alanı özellikleri ile enerji, sağlık ve çevre konularında uygulama alanı bulmaktadır. Nanofiber üretiminde en yaygın

kullanılan yöntem elektroğirme yöntemidir. sCO<sub>2</sub> destekli ekstraksiyon prosesi ile ekstrakte edilen ortalama %78 PHB saflığındaki biyopolimerin elektroğirme prosesinde nanofiber üretiminde kullanılmasıyla elde edilen nanofiberlerin morfolojik, kimyasal, termal ve mekanik özellikleri araştırılmıştır. Elde edilen nanofiberlerin karakterizasyonları incelendiğinde, atık su arıtma çamurlarından ekstrakte edilen polimer ile üretilen nanofiberlerin ticari PHB polimerinden elde edilen nanofiberler ile benzer özellikler gösterdiği gözlemlenmiştir. SEM analizlerinde nanofiberlerin mikrometre mertebesinde ince uzun ipliksi şeklinde yapıları gözlemlenmiştir. Üretilen nanofiberlerin karakterize edilen özellikleri değerlendirildiğinde nanofiberlerin yüksek bozunma sıcaklığı (257,62°C), hidrofobikliği (105,7°) ve düşük çekme modülü (599,59 MPa) özellikleri dikkat çekmektedir.

Nanofiberlerin üretim kaynaklarından biri olan polimerlerin atık su arıtma çamurlarından geri kazanılarak kullanılması hem maliyet azaltılması hem de atıkların değerlendirilmesi açısından önemlidir. Atıklardan elde edilen nanofiberlerin çeşitli safsızlıklar içermesi (endotoksinler, protein, yağ DNA) ve henüz araştırması yapılmamış toksik etkilerinin olabilmesi durumu PHB nanofiberlerinin uygulama alanlarını kısıtlamaktadır. Atıktan üretilen polimerler ile elde edilen nanofiberlerin kullanım alanı çevre mühendisliği uygulamalarına yönelmektedir. Nanofiberler çevre mühendisliği uygulamalarında hava filtrasyon sistemleri, toz tutma sistemleri, iç ortam hava filtrasyonu, araç kabin filtreleri, sıvıların filtrasyonu, ağır metallerin ve organik bileşiklerin adsorpsiyonu ve sıvı/gaz alanlarında sensör üretimi gibi birden fazla uygulama alanı bulmaktadır.

Çalışma kapsamında elde edilen nanofiberlerin mekanik özelliklerinin geliştirilmesi için kompozit malzeme üretimi çalışmaları devam etmektedir. Üretilen kompozit PHB-nanofiberinin çevre mühendisliği çalışmalarında kullanımı değerlendirilecektir.

Sonuç olarak, atıkların değerlendirilerek PHA bazlı biyopolimer üretilmesi ve bu polimerler kullanılarak nanofiber elde edilmesi çalışmaları sürdürülebilir biyoekonomi çerçevesinde, sürdürülebilir bir gelecek için önemli sonuçlar ortaya çıkarmıştır.

## KAYNAKLAR

- [1] Geyer R., Jambeck J. R., Law K. L., (2017), "Production, use, and fate of all plastics ever made", *Science Advances*, 2017;3: e1700782.
- [2] Web 1, (2022), <http://www.european-bioplastics.org/news/publications/> (Erişim tarihi: 09.02.2023).
- [3] Yadav B., Chavan S., Atmakuri A., Tyagi R. D., Drogui P., (2020), "A review on recovery of proteins from industrial wastewaters with special emphasis on PHA production process: Sustainable circular bioeconomy process development", *Bioresource Technology*, 317, 124006.
- [4] Saavedra del Oso M., Mauricio-Iglesias M., Hospido A., (2021), "Evaluation and optimization of the environmental performance of PHA downstream processing", *Chemical Engineering Journal*, 412, 127687.
- [5] Kourmentza C., Plácido J., Venetsaneas N., Burniol-Figols A., Varrone C., Gavala H. N., Reis M. A. M., (2017), "Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production", *Bioengineering*, 4, 55.
- [6] Mannina G., Presti D., Montiel-Jarillo G., Suárez-Ojeda M. E., (2019), "Bioplastic recovery from wastewater: A new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures", *Bioresource Technology*, 282 (January), 361–369.
- [7] Arumugam A., (2019), "Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production", *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 1–17.
- [8] Wang X., Li C., Lam C. H., Subramanian K., Qin Z. H., Mou J. H., Jin M., Chopra S. S., Singh V., Ok Y. S., Yan J., Li H. Y., Lin C. S. K., (2022), "Emerging waste valorisation techniques to moderate the hazardous impacts, and their path towards sustainability", *Journal of Hazardous Materials*, 423, 127023.
- [9] Yadav B., Talan A., Tyagi R. D., Drogui P., (2021), "Concomitant production of value-added products with polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis: A review", *Bioresource Technology*, 337, 125419.
- [10] Naser A. Z., Deiab I., Darras B. M., (2021), "Poly(lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: a review", *RSC Advances*, 11 (28), 17151–17196.
- [11] Kurian N. S., Das B., (2021), "Comparative analysis of various extraction processes based on economy, eco-friendly, purity and recovery of polyhydroxyalkanoate: A review", *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1881–1890.

- [12] Raza Z. A., Abid S., Banat I. M., (2018), "Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications", *International Biodeterioration and Biodegradation*, 126, 45–56.
- [13] Możejko-Ciesielska J., Kiewisz R., (2016), "Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?", *Microbiological Research*, 192, 271–282.
- [14] Koller M., Mukherjee A., (2022), "A New Wave of Industrialization of PHA Biopolyesters", *Bioengineering*, 9,74.
- [15] Valentino F., Morgan-Sagastume F., Campanari S., Villano M., Werker A., Majone M., (2017), "Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers", *New Biotechnology*, 37, 9–23.
- [16] 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.
- [17] Majone M., Massanisso P., Carucci A., Lindrea K., Tandoi V., (1996), "Influence of storage on kinetic selection to control aerobic filamentous bulking", In: "Water Science and Technology", Pergamon Press Inc., 34, 223–232.
- [18] Serafim 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.
- [19] Carta F., Beun J. J., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J., (2001), "Simultaneous storage and degradation of PHB and glycogen in activated sludge cultures", *Water Research*, 35 (11), 2693–2701.
- [20] 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.
- [21] Bengtsson S., Werker A., Christensson M., Welander T., (2008), "Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater", *Bioresource Technology*, 99 (3), 509–516.
- [22] Dionisi D., Carucci G., Petrangeli Papini M., Riccardi C., Majone M., Carrasco F., (2005), "Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers", *Water Research*, 39 (10), 2076–2084.
- [23] Basak B., (2010), Comparative Evaluation of Microbial Diversity and PHA Storage Ability Of Activated Sludge Under Different Operating Conditions, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi.

- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Anjum A., Zuber M., Zia K. M., Noreen A., Anjum M. N., Tabasum S., (2016), "Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements", *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161–174.
- [27] 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.
- [28] Nguyenhuynh T., Yoon L. W., Chow Y. H., Chua A. S. M., (2021), "An insight into enrichment strategies for mixed culture in polyhydroxyalkanoate production: feedstocks, operating conditions and inherent challenges", *Chemical Engineering Journal*, 420, 130488.
- [29] Corsino S. F., di Trapani D., Traina F., Cruciata I., Scirè Calabrisotto L., Lopresti F., la Carrubba V., Quatrini P., Torregrossa M., Viviani G., (2022), "Integrated production of biopolymers with industrial wastewater treatment: Effects of OLR on process yields, biopolymers characteristics and mixed microbial community enrichment", *Journal of Water Process Engineering*, 47, 102772.
- [30] Fang F., Xu R. Z., Huang Y. Q., Wang S. N., Zhang L. L., Dong J. Y., Xie W. M., Chen X., Cao J. S., (2019), "Production of polyhydroxyalkanoates and enrichment of associated microbes in bioreactors fed with rice winery wastewater at various organic loading rates", *Bioresource Technology*, 292, 121978.
- [31] Dai J., Gliniewicz K., Settles M. L., Coats E. R., McDonald A. G., (2015), "Influence of organic loading rate and solid retention time on polyhydroxybutyrate production from hybrid poplar hydrolysates using mixed microbial cultures", *Bioresource Technology*, 175, 23–33.
- [32] Ospina-Betancourth C., Echeverri S., Rodriguez-Gonzalez C., Wist J., Combariza M. Y., Sanabria J., (2022), "Enhancement of PHA Production by a Mixed Microbial Culture Using VFA Obtained from the Fermentation of Wastewater from Yeast Industry", *Fermentation*, 8, 180.
- [33] Çiftci H. N., (2021), *Biyopolimer Üretiminde Maya Endüstrisi Atık sularının Kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.*

- [34] Eaton D. Andrew, Clesceri S. Lenore, Rice W. Eugene, Greenberg E. Arnold, Eds. (2005), "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 21st ed.
- [35] Torri C., Cordiani H., Samorì C., Favaro L., Fabbri D., (2014), "Fast procedure for the analysis of poly(hydroxyalkanoates) in bacterial cells by off-line pyrolysis/gas-chromatography with flame ionization detector", *Journal of Chromatography A*, 1359 230–236.
- [36] Zupanc M., Pandur Ž., Stepišnik Perdih T., Stopar D., Petkovšek M., Dular M., (2019), "Effects of cavitation on different microorganisms: The current understanding of the mechanisms taking place behind the phenomenon. A review and proposals for further research", *Ultrasonics Sonochemistry*, 57 147–165.
- [37] Yu J., Chen L. X. L., (2006), "Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass", *Biotechnology Progress*, 22 (2), 547–553.
- [38] Samorì C., Abbondanzi F., Galletti P., Giorgini L., Mazzocchetti L., Torri C., Tagliavini E., (2015), "Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: Impact on polymer quality and recovery", *Bioresource Technology*, 189 195–202.
- [39] Mongili B., Abdel Azim A., Fraterrigo Garofalo S., Batuecas E., Re A., Bocchini S., Fino D., (2021), "Novel insights in dimethyl carbonate-based extraction of polyhydroxybutyrate (PHB)", *Biotechnology for Biofuels*, 14:13.
- [40] Rodrigues A. M., Franca R. D. G., Dionísio M., Sevrin C., Grandfils C., Reis M. A. M., Lourenço N. D., (2022), "Polyhydroxyalkanoates from A Mixed Microbial Culture: Extraction Optimization and Polymer Characterization", *Polymers*, 14, 2155.
- [41] Aramvash A., Moazzeni Zavareh F., Gholami Banadkuki N., (2018), "Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*", *Engineering in Life Sciences*, 18 (1), 20–28.
- [42] Aramvash A., Gholami-Banadkuki N., Moazzeni-Zavareh F., Hajizadeh-Turchi S., (2015), "An environmentally friendly and efficient method for extraction of PHB biopolymer with non-halogenated solvents", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25 (11), 1936–1943.
- [43] Fiorese M. L., Freitas F., Pais J., Ramos A. M., de Aragão G. M. F., Reis M. A. M., (2009), "Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate", *Engineering in Life Sciences*, 9 (6), 454–461.
- [44] Jiang G., Johnston B., Townrow D. E., Radecka I., Koller M., Chaber P., Adamus G., Kowalczyk M., (2018), "Biomass extraction using non-chlorinated solvents for biocompatibility improvement of polyhydroxyalkanoates", *Polymers*, 10, 731.

- [45] Pacheco M. A., Marshall C. L., (1997), "Reviews Review of Dimethyl Carbonate (DMC) Manufacture and Its Characteristics as a Fuel Additive", *Energy & Fuels*, 11,2-29.
- [46] Koller M., Niebelschütz H., Braunegg G., (2013), "Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass", *Engineering in Life Sciences*, 13 (6), 549–562.
- [47] Kemmere M. F., Thierry Meyer, (2006), "Supercritical carbon dioxide: in polymer reaction engineering.", John Wiley & Sons.
- [48] Badgujar K. C., Dange R., Bhanage B. M., (2021), "Recent advances of use of the supercritical carbon dioxide for the biomass pre-treatment and extraction: A mini-review", *Journal of the Indian Chemical Society*, 98, 100018.
- [49] Tyskiewicz K., Konkol M., Rój E., (2018), "The application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials", *Molecules*, 23, 2625.
- [50] Hurren David, Berger Thomas, Greisheim Messer, (1999), "Supercritical fluid extraction with CO<sub>2</sub>", *Filtration and Separation*, 25–27.
- [51] Couto R. M., Fernandes J., da Silva M. D. R. G., Simões P. C., (2009), "Supercritical fluid extraction of lipids from spent coffee grounds", *Journal of Supercritical Fluids*, 51 (2), 159–166.
- [52] Kayathi A., Chakrabarti P. P., Bonfim-Rocha L., Cardozo-Filho L., Jegatheesan V., (2020), "Selective extraction of polar lipids of mango kernel using Supercritical Carbon dioxide (SC–CO<sub>2</sub>) extraction: Process optimization of extract yield/phosphorous content and economic evaluation", *Chemosphere*, 260, 127639.
- [53] Baysal T., Ersus S., Starmans D. A. J., (2000), "Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of  $\beta$ -carotene and lycopene from tomato paste waste", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (11), 5507–5511.
- [54] Reverchon E., della Porta G., (1995), "Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Fractionation of Lavender Essential Oil and Waxes", *J.Agric.Food Chem.*, 43,1654-1658.
- [55] Mouahid A., Crampon C., Toudji S. A. A., Badens E., (2013), "Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of neutral lipids from microalgae: Experiments and modelling", *Journal of Supercritical Fluids*, 77, 7–16.
- [56] Patil P. D., Dandamudi K. P. R., Wang J., Deng Q., Deng S., (2018), "Extraction of bio-oils from algae with supercritical carbon dioxide and co-solvents", *Journal of Supercritical Fluids*, 135, 60–68.
- [57] He J. Z., Shao P., Liu J. H., Ru Q. M., (2012), "Supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peel and their antioxidant activity", *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (10), 13065–13078.

- [58] Hejazi P., Vasheghani-Farahani E., Yamini Y., (2003), "Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) Recovery", *Biotechnology Progress*, 19 (5), 1519–1523.
- [59] Daly S. R., Fathi A., Bahramian B., Manavitehrani I., McClure D. D., Valtchev P., Schindeler A., Dehghani F., Kavanagh J. M., (2018), "A green process for the purification of biodegradable poly(B-hydroxybutyrate)", *Journal of Supercritical Fluids*, 135, 84–90.
- [60] Gogate P. R., Kabadi A. M., (2009), "A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology", *Biochemical Engineering Journal*, 44 (1), 60–72.
- [61] Ozonok J., (2012), "Application of Hydrodynamic Cavitation in Environmental Engineering", CRC Press.
- [62] Gogate P. R., (2011), "Hydrodynamic Cavitation for Food and Water Processing", *Food and Bioprocess Technology*, 4 (6), 996–1011.
- [63] Yao Y., Sun Y., Wang X., Song Y., Wang Z., (2022), "Insight into the sludge reduction performances by hydrodynamic cavitation", *Journal of Water Process Engineering*, 49, 102950.
- [64] Lee I., Han J. I., (2013), "The effects of waste-activated sludge pretreatment using hydrodynamic cavitation for methane production", *Ultrasonics Sonochemistry*, 20 (6), 1450–1455.
- [65] Kim H., Koo B., Sun X., Yoon J. Y., (2020), "Investigation of sludge disintegration using rotor-stator type hydrodynamic cavitation reactor", *Separation and Purification Technology*, 240, 116636.
- [66] Jyoti K. K., Pandit A. B., (2001), "Water disinfection by acoustic and hydrodynamic cavitation", *Biochemical Engineering Journal*, 7, 201–212
- [67] Chakinala A. G., Gogate P. R., Burgess A. E., Bremner D. H., (2009), "Industrial wastewater treatment using hydrodynamic cavitation and heterogeneous advanced Fenton processing", *Chemical Engineering Journal*, 152 (2–3), 498–502.
- [68] Lee A. K., Lewis D. M., Ashman P. J., (2015), "Microalgal cell disruption by hydrodynamic cavitation for the production of biofuels", *Journal of Applied Phycology*, 27 (5), 1881–1889.
- [69] Lee I., Han J. I., (2015), "Simultaneous treatment (cell disruption and lipid extraction) of wet microalgae using hydrodynamic cavitation for enhancing the lipid yield", *Bioresource Technology*, 186, 246–251.
- [70] Setyawan M., Budiman A., Mulyono P., (2018), "Optimum Extraction of Algae-oil from Microalgae using Hydrodynamic Cavitation", *International Journal Of Renewable Energy Research*, 8, 452–458.

- [71] Lee I., Oh Y. K., Han J. I., (2019), "Design optimization of hydrodynamic cavitation for effectual lipid extraction from wet microalgae", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7 (2), 246-251.
- [72] Waghmare A., Nagula K., Pandit A., Arya S., (2019), "Hydrodynamic cavitation for energy efficient and scalable process of microalgae cell disruption", *Algal Research*, 40,101496.
- [73] Cerecedo L. M., Dopazo C., Gomez-Lus R., (2018), "Water disinfection by hydrodynamic cavitation in a rotor-stator device", *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 71–78.
- [74] Mezule L., Tsyfansky S., Yakushevich V., Juhna T., (2009), "A simple technique for water disinfection with hydrodynamic cavitation: Effect on survival of *Escherichia coli*", *Desalination*, 248 (1–3), 152–159.
- [75] Balasundaram B., Harrison S. T. L., (2006), "Study of physical and biological factors involved in the disruption of *E. coli* by hydrodynamic cavitation", *Biotechnology Progress*, 22 (3), 907–913.
- [76] Balasundaram B., Harrison S. T. L., (2006), "Disruption of Brewers' yeast by hydrodynamic cavitation: Process variables and their influence on selective release", *Biotechnology and Bioengineering*, 94 (2), 303–311.
- [77] Batista M. D., Anhê A. C. B. M., de Souza Inácio Gonçalves J. C., (2017), "Use of Hydrodynamic Cavitation for Algae Removal: Effect on the Inactivation of Microalgae Belonging to Genus *Scenedesmus*", *Water, Air, and Soil Pollution*, 228:443.
- [78] Geciova J., Bury D., Jelen P., (2002), "Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry: A review", *International Dairy Journal* 12, 541–553.
- [79] Palmieri S., Tittarelli F., Sabbatini S., Cespi M., Bonacucina G., Eusebi A. L., Fatone F., Stipa P., (2021), "Effects of different pre-treatments on the properties of polyhydroxyalkanoates extracted from sidestreams of a municipal wastewater treatment plant", *Science of the Total Environment*, 801,149633.
- [80] Ghatnekar M. S., Pai J. S., Ganesh M., (2002), "Production and recovery of poly-3-hydroxy-butyrate from *Methylobacterium* sp V49", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77 (4), 444–448.
- [81] Koller M., (2020), "Established and advanced approaches for recovery of microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymers from surrounding microbial biomass", *The EuroBiotech Journal*, 4 (3), 113–126.
- [82] Corsino S. F., di Trapani D., Traina F., Cruciata I., Scirè Calabrisotto L., Lopresti F., la Carrubba V., Quatrini P., Torregrossa M., Viviani G., (2022), "Integrated production of biopolymers with industrial wastewater treatment: Effects of OLR on process yields, biopolymers characteristics and mixed microbial community enrichment", *Journal of Water Process Engineering*, 47, 102772.

- [83] Masuelli M. A., (2014), "Mark-Houwink Parameters for Aqueous-Soluble Polymers and Biopolymers at Various Temperatures", *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry*, 2 (2), 37–43.
- [84] Narayanan M., Kandasamy G., Murali P., Kandasamy S., Ashokkumar V., Nasif O., Pugazhendhi A., (2021), "Optimization and production of polyhydroxybutyrate from sludge by *Bacillus cereus* categorized through FT-IR and NMR analyses", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9 (1), 104908.
- [85] Kansiz M., Domínguez-Vidal A., McNaughton D., Lendl B., (2007), "Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallisation of polyhydroxyalkanoates (PHAs)", In: "*Anal Bioanal Chem*", 388:1207–1213.
- [86] Castor et al., (1995), *Supercritical Fluid Disruption of and Extraction from microbial cells*, U.S Patent 5,380,826.
- [87] Costa S. S., Miranda A. L., Assis D. de J., Souza C. O., de Moraes M. G., Costa J. A. V., Druzian J. I., (2018), "Efficacy of *Spirulina* sp. polyhydroxyalkanoates extraction methods and influence on polymer properties and composition", *Algal Research*, 33 (December 2017), 231–238.
- [88] Kunasundari B., Sudesh K., (2011), "Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates", *Express Polymer Letters*, 5 (7), 620–634.
- [89] Kawaguchi Y., Doi Y., (1990), "Structure of native poly(3-hydroxybutyrate) granules characterized by X-ray diffraction", *FEMS Microbiology Letters*, 70, 151-156
- [90] Martino L., Cruz M. v., Scoma A., Freitas F., Bertin L., Scandola M., Reis M. A. M., (2014), "Recovery of amorphous polyhydroxybutyrate granules from *Cupriavidus necator* cells grown on used cooking oil", *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 117–123.
- [91] Mohapatra S., Samantaray D. P., Samantaray S., (2015), "Impact of Process Recovery on PHA Production by *Bacillus Thuringiensis* RKD-12", *Poll Res.*, 34 (2), 395-400.
- [92] Choi J.-I., Lee S. Y., (1997), "Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation", *Bioprocess Engineering*, 17, 335-342.
- [93] Panda D., Saharan V. K., Manickam S., (2020), "Controlled hydrodynamic cavitation: A review of recent advances and perspectives for greener processing", *Processes*, 8, 220.
- [94] Kenry, Lim C. T., (2017), "Nanofiber technology: current status and emerging developments", *Progress in Polymer Science*, 70 1–17.

- [95] Huang Z. M., Zhang Y. Z., Kotaki M., Ramakrishna S., (2003), "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites", *Composites Science and Technology*, 63 (15), 2223–2253.
- [96] Ang S. L., Sivashankari R., Shaharuddin B., Chuah J. A., Tsuge T., Abe H., Sudesh K., (2020), "Potential Applications of Polyhydroxyalkanoates as a Biomaterial for the Aging Population", *Polymer Degradation and Stability*, 181, 109371.
- [97] Cui J., Li F., Wang Y., Zhang Q., Ma W., Huang C., (2020), "Electrospun nanofiber membranes for wastewater treatment applications", *Separation and Purification Technology*, 250, 117116.
- [98] Bhardwaj N., Kundu S. C., (2010), "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique", *Biotechnology Advances*, 28 (3), 325–347.
- [99] Abutaleb A., ArunPrasanna V., (2022), "Fabrication of biopolymer nanofibers from natural sources", *Textile Research Journal*, 92 (9–10), 1694–1725.
- [100] Acevedo F., Villegas P., Urtuvia V., Hermosilla J., Navia R., Seeger M., (2018), "Bacterial polyhydroxybutyrate for electrospun fiber production", *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 692–697.
- [101] Kuntzler S. G., Almeida A. C. A. de, Costa J. A. V., Morais M. G. de, (2018), "Polyhydroxybutyrate and phenolic compounds microalgae electrospun nanofibers: A novel nanomaterial with antibacterial activity", *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1008–1014.
- [102] Cherpinski A., Torres-Giner S., Vartiainen J., Peresin M. S., Lahtinen P., Lagaron J. M., (2018), "Improving the water resistance of nanocellulose-based films with polyhydroxyalkanoates processed by the electrospinning coating technique", *Cellulose*, 25 (2), 1291–1307.
- [103] de Morais M. G., Stillings C., Dersch R., Rudisile M., Pranke P., Costa J. A. V., Wendorff J., (2015), "Extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Spirulina* LEB 18 for developing nanofibers", *Polimeros*, 25 (2), 161–167.
- [104] Raza Z. A., Abid S., Banat I. M., (2018), "International Biodeterioration & Biodegradation Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126 (October 2017), 45–56.
- [105] Thavasi V., Singh G., Ramakrishna S., (2008), "Electrospun nanofibers in energy and environmental applications", *Energy and Environmental Science*, 1 (2), 205–221.
- [106] Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W., Yong T., Ma Z., Ramaseshan R., (2006), "Electrospun nanofibers: solving global issues", *Materials today*, 9 (3), 40–50.
- [107] Gibson P., Schreuder-Gibson H., Rivin D., (2001), "Transport properties of porous membranes based on electrospun nanofibers", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 187 – 188 , 469 – 481

- [108] Megelski S., Stephens J. S., Bruce Chase D., Rabolt J. F., (2002), "Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers", *Macromolecules*, 35 (22), 8456–8466.
- [109] Jang S. A., Park J. H., Lim H. J., Oh J. Y., Ki H. B., Lee K. J., Song J. K., Kim D. M., (2021), "Bio-specific immobilization of enzymes on electrospun PHB nanofibers", *Enzyme and Microbial Technology*, 145, 109749.
- [110] Mottin A. C., Ayres E., Oréface R. L., Câmara J. J. D., (2016), "What Changes in Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) When Processed as Electrospun Nanofibers or Thermo-Compression Molded Film?", *Materials Research*, 19 (1), 57–66.
- [111] Wu C. S., Wang S. S., (2018), "Bio-Based Electrospun Nanofiber of Polyhydroxyalkanoate Modified with Black Soldier Fly's Pupa Shell with Antibacterial and Cytocompatibility Properties", *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10 (49), 42127–42135.
- [112] Zhijiang C., Cong Z., Ping X., Jie G., Kongyin Z., (2018), "Calcium alginate-coated electrospun polyhydroxybutyrate/carbon nanotubes composite nanofibers as nanofiltration membrane for dye removal", *Journal of Materials Science*, 53 (20), 14801–14820.
- [113] Zhu M., Han J., Wang F., Shao W., Xiong R., Zhang Q., Pan H., Yang Y., Samal S. K., Zhang F., Huang C., (2017), "Electrospun Nanofibers Membranes for Effective Air Filtration", *Macromolecular Materials and Engineering*, 302, 1600353.
- [114] Avossa J., Paolesse R., di Natale C., Zampetti E., Bertoni G., de Cesare F., Scarascia-Mugnozza G., Macagnano A., (2019), "Electrospinning of polystyrene/polyhydroxybutyrate nanofibers doped with porphyrin and graphene for chemiresistor gas sensors", *Nanomaterials*, 9, 280.

## ÖZGEÇMİŞ

Tülin Yılmaz NAYIR, 2006 yılında başladığı Yıldız Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nden 2010 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldu. 2007 yılında başladığı çift anadal programı Kimya Mühendisliği Bölümü'nden 2011 yılında mezun oldu. Aynı yıl özel sektörde Ar-Ge laboratuvarında mühendis olarak çalışmaya başladı. 2012 yılında YTÜ Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamış ve tez dönemini erasmus kapsamında Hollanda Twente Üniversitesi'nde tamamlayarak 2014 yılında mezun olmuştur. 2015 yılında Gebze Teknik Üniversitesi'nde (GTÜ) Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlayarak 2016 yılında mezun olmuştur. 2016 yılında aynı bölümde doktora eğitimine başlamıştır. 2015 yılından bu yana GTÜ Çevre Mühendisliği Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir.

## EKLER

### Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Yılmaz Nayır T., Konuk S., Kara S., (2023), “Extraction of polyhydroxyalkanoate from activated sludge using supercritical carbon dioxide process and biopolymer characterization”, Journal of Biotechnology, 364, 50-57.

Yılmaz Nayır T., Çiftci, H., Konuk S., Küçük, B., Küçükağa, Y., Kara, S. “Single stage biopolymer production with yeast industry wastewater: Effect of SRT and OLR on biopolymer production yield” Biomass Conversion and Biorefinery, *under review*.

### Konferans Bildirileri

**Yılmaz Nayır T.**, Konuk S., Çiftci H., Küçük B., Kara S., (2022), " Polyhydroxyalkanoate production from yeast industry wastewater using mixed microbial culture", Conference on Sustainable Solid Waste Management (CORFU 2022), Corfu-Greece, Haziran 2022.

**Yılmaz Nayır T.**, Çiftci H.,Konuk S., Kara S., (2022), "Polyhydroxyalkanoate production through yeast industry wastewater using mixed microbial culture", Renewable Resources and Biorefineries (RRB 2022), Brugge-Belgium, Poster Sunumu.

Konuk S., **Yılmaz Nayır T.**, Çiftci H., Kara S.,(2021), “Endüstriyel Atık Su İle Beslenen Bakteri Hücrelerinden Süperkritik CO<sub>2</sub> ile PHA Ekstraksiyonu”, 14. National 2. International Environmental Engineering Congress, Kocaeli-Turkey, December 2021.

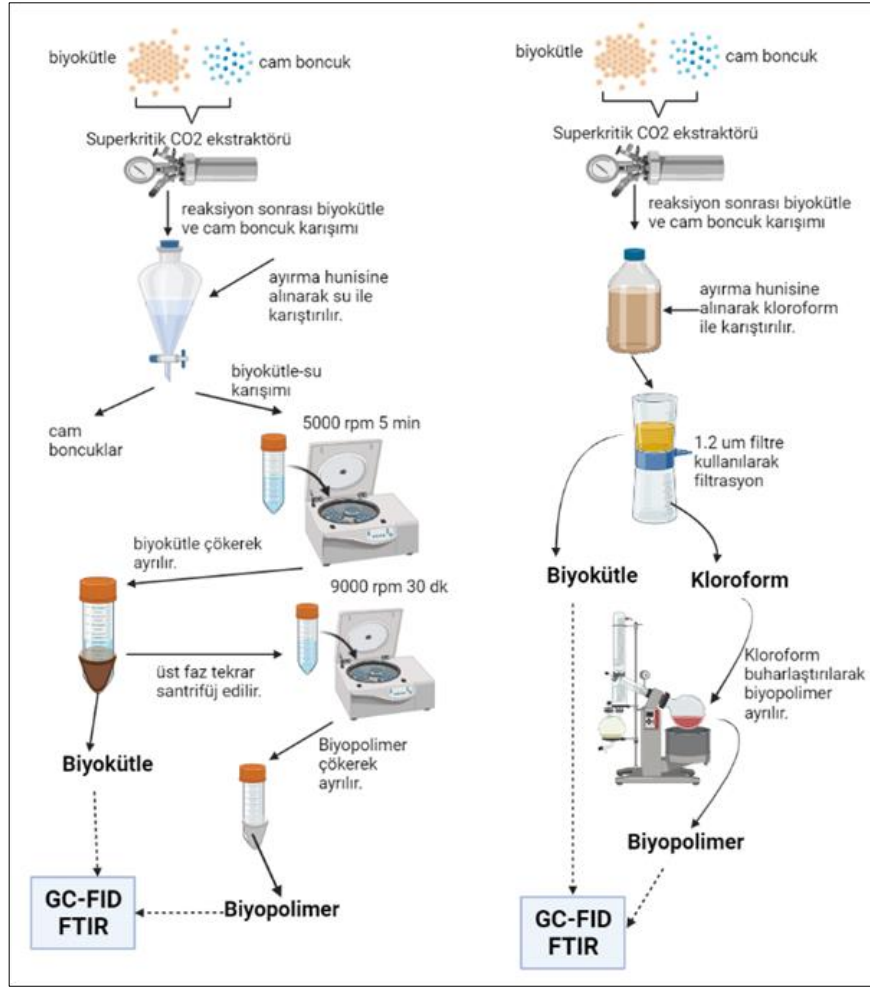
## **Ek B: sCO<sub>2</sub> ile PHB Ekstraksiyonu için Metot Geliştirilmesinde Yapılan Ön Çalışmalar**

### **Metodoloji**

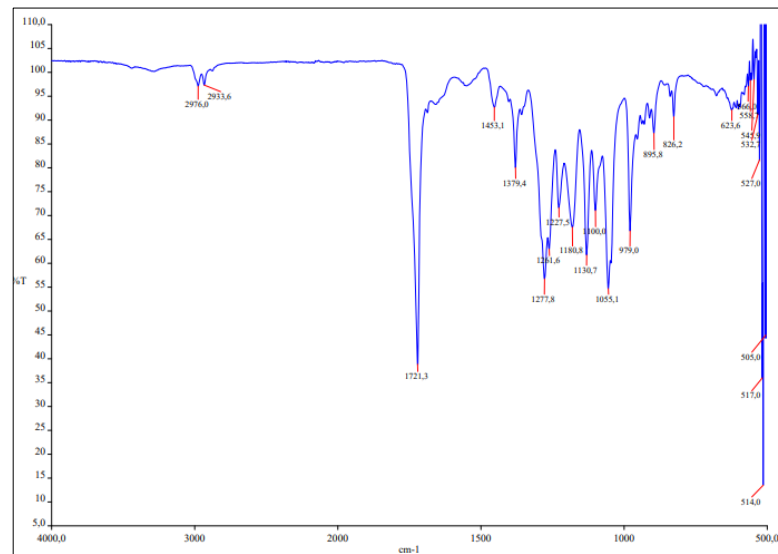
sCO<sub>2</sub> ekstraksiyonu sonucunda elde edilen biyopolimerin karakterizasyon çalışmalarının yapılması gereklidir. Bu sebeple, reaksiyon sonucunda, biyokütleden çıkarılan biyopolimerin NPCM'i de içeren ortamdan alınması için iki yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerden ilki, ekstraksiyon sonrasında reaktörün kloroform ile yıkanması ve ortaya çıkan polimerin kloroformda tutulmasıdır. Diğer yöntemde ise reaktör saf su ile yıkanmış ve kademeli santrifüj ile biyopolimer ortamdan ayrılmıştır. Yöntemlerin şematik gösterimi Şekil E.1'de verilmiştir. Kloroform ile tutulma yöntemi detayları 3.2.2'de verilmiştir. Çözücü olarak suyun kullanılması durumunda ise, reaktörden alınan cam, biyokütle kalıntıları ve polimeri içeren karışım bir şişe içerisinde 100 mL su ile çalkalanır ve ayırma hunisinde alınır. Cam boncuklar ayrıldıktan sonra biyokütle-su karışımı 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Böylece polimere göre daha ağır ve büyük partiküller ilk santrifüjde çökmesi beklenir. Biyokütle ayrıldıktan sonra, kalan sıvı faz 9000 rpm'de 30 dk santrifüj edilir. Bu santrifüj sonrası da biyopolimerin çökmesi beklenmektedir. Kalan tüm fazlar: çöken katı faz (biyokütle ve biyopolimer) ile sıvı fazda FTIR analizi yapılmıştır. Katı fazlar ile GC-FID'de PHB analizi yapılmıştır.

### **Sonuç ve Tartışma**

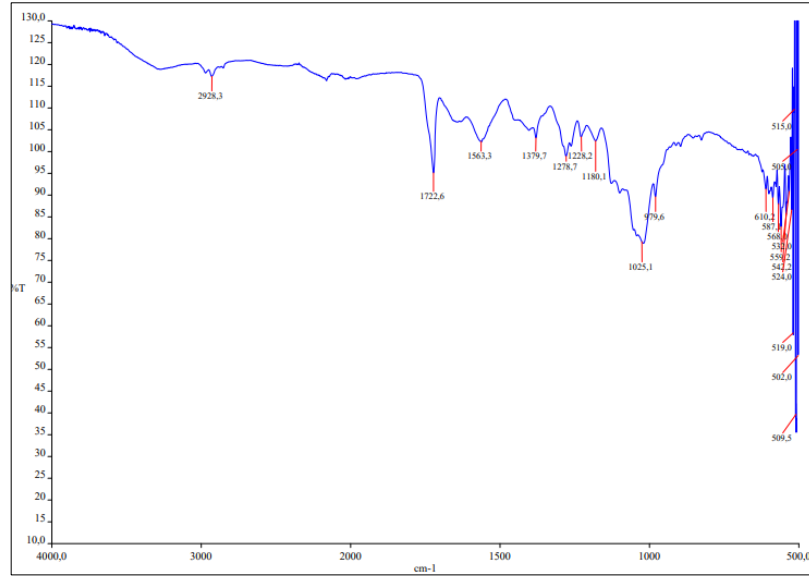
Kademeli santrifüj işlemleri sonrası elde edilen biyokütle kalıntıları, beyaz polimer çökeltisi ve kalan su fazlarının PHB içerip içermediğini bağ yapısına göre yorumlamak için FTIR analizi yapılmıştır. Buna göre Şekil E2-Şekil E4 arasında verilen grafiklerde 1700 cm<sup>-1</sup> civarında elde edilen karakteristik PHB piki (C=O) tüm fazlarda PHB olduğunu göstermektedir. Ayrıca elde edilen biyopolimer ile GC-FID'de PHB analizi yapılarak %37 PHB içerdiği saptanmıştır. Buradaki en önemli bulgu, suda çözünmeyen polimerin santrifüj yöntemiyle sudan çöktürülerek ayrılabilmesidir. Fakat elde edilen polimerin düşük saflıkta olması ve proseste kademeli santrifüjler sırasında kayıplar olması sebebiyle bu metot uygulanmaya devam edilmemiştir.



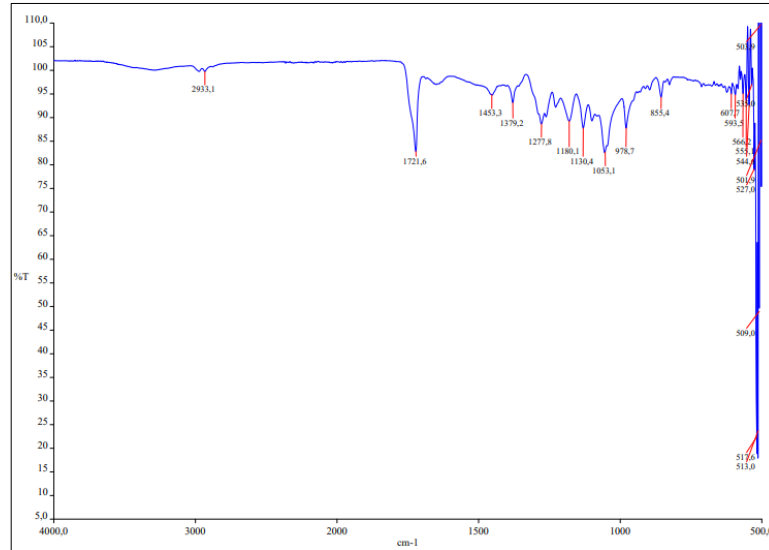
Şekil E.1: sCO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile biyokütleden biyopolimer geri kazanımı akım şeması.



Şekil E.2: Santrifüjle elde edilen biyopolimerin FTIR spektrumu.



Şekil E.3: Santrifüj sonrası kalan su fazı FTIR spektrumu.



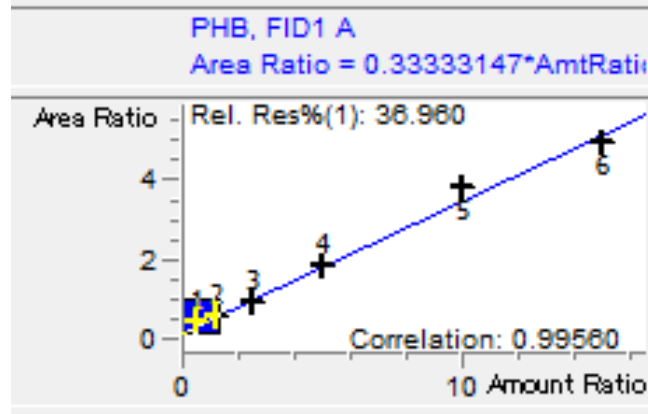
Şekil E.4: Santrifüj sonrası çöken biyokütle kalıntılarının FTIR spektrumu.

## Ek C: GC-FID’de PHB Kalibrasyonu

Biyokütlerdeki ve biyopolimerlerde % PHB oranını tayin edebilmek asidik metanol ortamında parçalama metoduyla elde edilen 2-hidroksi asidin metil esteri PHB markajı olarak GC-FID’de PHB tayininde kullanılmıştır. Internal standard (IS) olarak kullanılan benzoik asit 9.093. dakikada ve PHB 7.577. dakikada görülmüştür. Kalibrasyon eğrisi ve kalibrasyon değerleri Şekil E.5 ve Tablo E.1’de verilmiştir.

Tablo E.1: PHB tayininde kullanılan kalibrasyon eğrisi verileri.

| PHB STD<br>konsantrasyon<br>(mg) | IS<br>konsantrasyon<br>(mg) | PHB STD<br>Alanı | IS<br>Alanı |
|----------------------------------|-----------------------------|------------------|-------------|
| 0.2                              | 0.4                         | 150.3938         | 320.5555    |
| 0.5                              | 0.4                         | 192.3172         | 333.2566    |
| 1.0                              | 0.4                         | 611.9143         | 326.7334    |
| 2.0                              | 0.4                         | 314.1323         | 330.3047    |
| 4.0                              | 0.4                         | 1160.667         | 304.141     |
| 6.0                              | 0.4                         | 1733.956         | 348.2041    |



Şekil E.5: PHB tayininde kullanılan kalibrasyon eğrisi.