

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VİNAS VE ZEYTİN YAĞI FABRİKASI ATIK SUYUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ VE BİYOLOJİK İYİLEŞTİRİLMESİNDE BEYAZ
ÇÜRÜKÇÜL FUNGUS PELETLERİNİN KULLANIMI**

ELİF APOHAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

MALATYA

Temmuz 2007

Tezin Başığı: Vinas ve Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun Değerlendirilmesi ve
Biyolojik İyileştirilmesinde Beyaz ürükül Fungus Peletlerinin Kullanımı

Tezi Hazırlayan: Elif APOHAN

Sınav Tarihi: 12.07.2007

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Doktora
Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN Akdeniz Üniversitesi

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Murat ÖZMEN İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL İnönü Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Sibel KAHRAMAN İnönü Üniversitesi

İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Ali ŞAHİN
Enstitü Müdürü

Ailem'e ve Yeğenim Berke'ye

Onur Sözü

Doktora Tezi olarak sunduğum “Vinas ve Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun Deđerlendirilmesi ve Biyolojik İyileştirilmesinde Beyaz ürükül Fungus Peletlerinin Kullanımı” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı dűşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Elif APOHAN

ÖZET

Doktora Tezi

VİNAS VE ZEYTİN YAĞI FABRİKASI ATIK SUYUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ VE BİYOLOJİK İYİLEŞTİRİLMESİNDE BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUS PELETLERİNİN KULLANIMI

Elif APOHAN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

156+ xiv sayfa

2007

Danışman: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Alkol fabrikası atık suyu (vinas) ve zeytin yağı fabrikası atık suyu (ZYFA) önemli oranda çevre kirliliğine neden olmaktadır. Her iki atık suyun organik madde içeriği yüksektir ve bu nedenle arıtmaları veya değerlendirilmeleri gerekmektedir. Atık suların enzim üretiminde değerlendirilmesi ve bu süreçte biyolojik iyileştirilmenin sağlanması çevre kirliliğinin önlenmesi anlamına gelmektedir.

Bu çalışmada, *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* peletlerinin atık su ortamlarında enzim üretim yetenekleri test edilmiştir ve enzim üretiminde etkili olan faktörler optimize edilmiştir. Lakkaz aktivitesini artırmak için çeşitli kaynaklar (glikoz, maya özütü, bakır, peynir altı suyu) atık su ortamlarına eklenerek tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretim verimi incelenmiştir. Tutuklanmış ve serbest fungusların lakkaz üretim yeteneği ve verimi de tekrarlı kesikli süreçte karşılaştırılmıştır. Fungus peletlerinin biyolojik iyileştirmesini test etmek için işlem görmüş ve görmemiş atık suyun kimyasal oksijen istemi (KOİ) karşılaştırılmıştır. Her iki atık su ortamlarında elde edilen lakkazın sıcaklık kararlılığı da belirlenmiştir.

Glikoz, maya özütü, peynir altı suyu ve bakır, peletlerin kararlılığını ve lakkaz üretim yeteneklerini farklı etkilemiştir. Her iki atık suya bakır eklenmesi enzim aktivitesini arttırmıştır (4-10 kat). *F. trogii* peletleri vinasın ve ZYFA'nın KOİ içeriğini sırasıyla %32 ve %33 oranında gidermiştir. *T. versicolor* peletleri de bu atık suların KOİ içeriğini azaltmıştır. Bu araştırma, fungus peletlerinin bu atık suların biyolojik iyileştirilmesinde kullanılabileceğini ve peletlerin bazı belirli şartlarda lakkaz üretiminde kullanılabileceğini göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Zeytin yağı fabrikası atık suyu, vinas, lakkaz, beyaz çürükçül fungus, biyolojik iyileştirme, pelet, tutuklama

ABSTRACT

PhD. Thesis

USE OF WHITE ROT FUNGAL PELLETS FOR UTILIZATION AND BIOREMEDIATION OF VINASSE AND OLIVE OIL MILL WASTEWATER

Elif APOHAN

Inonu University
Graduate School of Natural Applied Sciences
Department of Biology

156 + xiv pages

2007

Supervisor: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Alcohol factory wastewater (vinasse), and olive oil mill wastewater (OOMW) cause considerable pollution of the environment. The organic material content of both wastewater is high; therefore they should be treated or utilized. Utilization of this wastewater in enzyme production and providing bioremediation during this process mean preventing environmental pollution.

In this study, enzyme production abilities of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor* pellets in wastewater media were tested and factors effective on enzyme production were optimized. In order to increase laccase activity, the effects of various supplementary sources (glucose, malt extract, copper, cheese whey) have been examined in repeated-batch mode. The laccase production ability and yield of immobilized and free fungi were also compared during repeated-batch mode. Chemical oxygen demand (COD) value of treated and untreated wastewater were compared for testing the bioremediation activity of fungal pellets. Thermostability of laccase obtained from wastewater cultures was also determined.

Glucose, malt extract, cheese whey and copper differently affected the laccase production ability and stability of pellets. Addition of copper to both types of the wastewater induced laccase enzyme activity (4 to 10 folds). *F. trogii* pellets reduced the COD content of vinasse and OOMW as 32 % and 33 %, respectively. *T. versicolor* pellets also reduced the COD content of these wastewaters. This research showed that fungal pellets can be used for bioremediation of wastewaters and pellets can also be used for laccase production under certain conditions.

KEYWORDS: Olive oil mill wastewater, vinasse, laccase, white rot fungi,
bioremediation, pellet, immobilization

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın seçimi, planlanması sırasında olduğu gibi deneysel ve yazım aşamasında da değerli fikirleriyle bana yol gösteren, karşılaştığım sorunlara çözüm olan bilgeliği ile araştırmayı kolaylaştıran, hoşgörülü ve sabırlı yaklaşımı ile her anlamda destek olan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA'ya

Tez sürecinde yapılan toplantılarda fikirlerini paylaşan Tez İzleme Komitesindeki Hocalarım Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e ve Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL'e

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi konusunda yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Saim YOLOĞLU'na

Kullandığım atık suların içerik analizi sırasında desteklerini gördüğüm Sayın Doç. Dr. Haluk TÜRKDEMİR'e, zorlu sürecin deneysel aşamasında yardımlarını ve her anlamda desteklerini gördüğüm Öğr. Grv. Nesrin ÖZMEN'e,

Alkol Fabrikası atık suyunu Eskişehir'den gönderen ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan Osmangazi Üniversitesi'nde çalışan arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇABUK'a, zeytin yağı fabrikası atık suyunu Balıkesir Altınoluk'tan gönderen Aydın YALAZI'ya

Grafiklerin çizilmesi konusunda değerli vaktini ayırarak yol gösteren Yrd. Doç. Dr. İbrahim ÜNAL'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında yardıma ihtiyacım olduğu zamanlarda desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Grv. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye ve Seval YILDIRIM'a

Bu çalışmayı, 2004/91 nolu proje olarak destekleyen Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan değerli hocalarım ve dostlarıma, özellikle Arş. Grv. F. Bilge EMRE'ye, ayrıca hayatımın her anında olduğu gibi çalışmalarım süresince de sabır göstererek bana destek olan değerli AİLEM'e, özellikle de kardeşim Esra'ya

çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Çevre Kirliliği.....	1
1.2. Zeytin Yağının Elde Edilmesi.....	2
1.3. Zeytin Yağı Üretim Prosesleri (İşlemleri) ve Üretime Bağlı Olarak Oluşan Karasuyun Kirlilik Özellikleri.....	2
1.3.1. Kesikli üretim prosesi (işlemi).....	3
1.3.2. Sürekli üretim prosesi (işlemi).....	3
1.3.3. Süzme prosesi (işlemi).....	4
1.4. Türkiye’de Zeytin ve Zeytin Yağı Üretimi.....	4
1.5. Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun İçeriği.....	5
1.6. Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun Çevreye Etkileri.....	7
1.7. Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun Arıtımı.....	7
1.7.1. Aerobik biyoremediasyon (biyolojik iyileştirme).....	8
1.7.2. Anaerobik biyoremediasyon (biyolojik iyileştirme).....	9
1.7.3. Anaerobik- aerobik biyoremediasyon (biyolojik iyileştirme).....	9
1.8. Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun Değerlendirilmesi İçin Yapılan Çalışmalar.....	9
1.9. Vinas.....	9
1.10. Vinasın Çevre Kirliliğine Etkisi.....	11
1.11. Vinasın Arıtılabilirliği.....	12
1.12. Biyoteknoloji.....	12
1.12.1. Çevre biyoteknolojisi.....	13
1.12.2. Çevre biyoteknolojisinde fungusların önemi.....	13
1.13. Beyaz Çürükçül Funguslar.....	13
1.14. Lakkaz.....	14
1.14.1. Hücresel lokalizasyon.....	16
1.14.2. Yapısal özellikleri.....	16
1.14.3. Lakkazın önemi.....	18
1.15. Tutuklama (İmmobilizasyon).....	19
1.16. Tutuklama Yöntemleri.....	20
1.16.1. Taşıyıcıya bağlama.....	20
1.16.2. Çapraz bağlama.....	21
1.16.3. İçeride tutuklama.....	21
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	23
2.1. Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun Biyolojik İyileştirilmesine Yönelik Yapılan Çalışmalar.....	23
2.2. Alkol Fabrikası Atık Suyunun Biyolojik İyileştirilmesine Yönelik Yapılan Çalışmalar.....	28

2.3.	Atık Suların Biyolojik İyileştirilmesinde Lakkaz Enziminin Kullanımına Yönelik Yapılan Çalışmalar.....	29
2.4.	Lakkaz Üretimini Artırmaya Yönelik Yapılan Çalışmalar.....	30
3.	MATERYAL VE METOT.....	32
3.1.	Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	32
3.2.	Çalışmada Kullanılacak Beyaz Çürükçül Fungus Peletlerinin Hazırlanması.....	32
3.3.	Çalışmada Kullanılan Atık Sular.....	32
3.4.	Optimizasyon Çalışmaları.....	33
3.4.1.	Atık su konsantrasyonu ve pelet miktarının lakkaz aktivitesi üzerine etkisinin saptanması.....	33
3.4.2.	Sıcaklığın lakkaz aktivitesine etkisinin saptanması.....	33
3.4.3.	pH'nın lakkaz aktivitesine etkisinin saptanması.....	33
3.4.4.	Çalkalama hızının lakkaz aktivitesine etkisinin saptanması.....	34
3.4.5.	İnkübasyon süresinin lakkaz aktivitesine etkisinin saptanması.....	34
3.5.	Peletlerle Yürütülen Çalışmalar.....	34
3.6.	Fungusların Kuru Ağırlıklarının Saptanması.....	34
3.7.	Atık Sulara Eklenen Ek Kaynakların Lakkaz Üretim Verimine Etkisinin Saptanması.....	35
3.7.1.	Glikoz.....	35
3.7.2.	Maya özütü.....	35
3.7.3.	Bakır (CuSO ₄ .5H ₂ O).....	35
3.7.4.	Peynir altı suyu.....	36
3.8.	Atık Suyun Analizi.....	36
3.9.	Fungusların Tutuklanması.....	37
3.9.1.	Fungusların aljinat jel içerisine tutuklanması.....	37
3.9.2.	Aktif karbona tutuklama.....	37
3.9.3.	Lignoselülozlu maddeye tutuklama.....	37
3.10.	Lakkaz Aktivitesinin Tayini.....	38
3.11.	Enzimin Sıcaklık Kararlılığı.....	38
3.12.	Farklı Tampon Sıcaklığı ve pH'sı.....	38
3.12.1.	Farklı sıcaklıklardaki tamponlarla lakkaz aktivite tayini.....	38
3.12.2.	Farklı pH'lardaki tamponlarla lakkaz aktivite tayini.....	39
3.13.	İstatistiksel analiz.....	39
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	40
4.1.	Çalışmada Kullanılan Alkol Fabrikası Atık Suyu (Vinas) ve Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyu (ZYFA) İçerikleri.....	40
4.2.	Fungus Peletlerinin Lakkaz Üretimini Optimizasyonu.....	40
4.2.1.	<i>F. trogii</i> Peletlerinin Vinas Ortamında Lakkaz Üretimini Optimizasyonu.....	40
4.2.1.1.	Pelet miktarının ve vinas konsantrasyonunun lakkaz üretimine etkisi.....	41
4.2.1.2.	Sıcaklığın vinas ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	45
4.2.1.3.	Vinasın başlangıç pH'sının <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi..	45
4.2.1.4.	Çalkalama hızının vinas ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi	47
4.2.1.5.	Vinas ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi.....	47

4.3.	Vinas Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde <i>F. trogii</i> Peletlerinin Lakkaz Üretimine Ek Kaynakaların Etkisi.....	48
4.3.1.	Vinas ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine glikozun etkisi.....	48
4.3.2.	Vinas ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine maya özütünün etkisi.....	49
4.3.3.	Vinas ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine bakırın etkisi.....	50
4.3.4.	Vinas ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine peynir altı suyunun etkisi.....	51
4.4.	Farklı Ajanlara Tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin Vinas Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde Kullanımı.....	52
4.4.1.	Aljinat jele tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin vinas ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı.....	52
4.4.2.	Aktif karbona tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin vinas ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı.....	55
4.4.3.	Çam kozalağına tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin vinas ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı.....	56
4.5.	Fungus Peletlerinin Lakkaz Üretiminin Optimizasyonu.....	57
4.5.1.	Vinas ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretiminin optimizasyonu.....	57
4.5.1.1.	Pelet miktarı ve vinas konsantrasyonun lakkaz üretimine etkisi.....	57
4.5.1.2.	Sıcaklığın vinas ortamında inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	60
4.5.1.3.	Vinasın başlangıç pH'sının <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	60
4.5.1.4.	Çalkalama hızının vinas ortamında inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	62
4.5.1.5.	Vinas ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi.....	62
4.6.	Vinas Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde <i>T. versicolor</i> Peletlerinin Lakkaz Üretimine Ek Kaynakaların Etkisi.....	63
4.6.1.	Vinas ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine glikozun etkisi.....	64
4.6.2.	Vinas ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine maya özütünün etkisi.....	64
4.6.3.	Bakırın vinas ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	65
4.6.4.	Vinas ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine peynir altı suyunun etkisi.....	66
4.7.	Farklı Ajanlara Tutuklanmış <i>T. versicolor</i> 'un Vinas Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde Kullanımı.....	67
4.7.1.	Aljinat jele tutuklanmış <i>T. versicolor</i> 'un vinas ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı.....	68
4.7.2.	Aktif karbona tutuklanmış <i>T. versicolor</i> 'un vinas ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı.....	70
4.7.3.	Çam kozalağına tutuklanmış <i>T. versicolor</i> 'un vinas ortamında tekrarlı	71

	kesikli üretim sürecinde kullanımı.....	71
4.8.	Fungus Peletlerinin Lakkaz Üretimine Optimizasyonu.....	71
4.8.1.	<i>F. trogii</i> peletlerinin ZYFA ortamında lakkaz üretiminin optimizasyonu..	71
4.8.1.1.	Pelet miktarının ve ZYFA konsantrasyonunun lakkaz üretimine etkisi.....	72
4.8.1.2.	Sıcaklığın ZYFA ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	74
4.8.1.3.	ZYFA'nın başlangıç pH'sının <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	75
4.8.1.4.	Çalkalama hızının ZYFA ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> 'nin lakkaz üretimine etkisi.....	77
4.8.1.5.	ZYFA ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> 'nin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi.....	78
4.9.	ZYFA Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde <i>F. trogii</i> Peletlerinin Lakkaz Üretimine Ek Kaynakların Etkisi.....	78
4.9.1.	ZYFA ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine glikozun etkisi.....	79
4.9.2.	ZYFA ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine maya özütü etkisi.....	79
4.9.3.	Bakırın ZYFA ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	80
4.9.4.	ZYFA ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine peynir altı suyunun etkisi.....	81
4.10.	Farklı Ajanlara Tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin ZYFA Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde Kullanımı.....	82
4.10.1.	Aljinat jele tutuklanmış <i>F. trogii</i> hücrelerinin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı.....	83
4.10.2.	Aktif karbona tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı.....	85
4.10.3.	Çam kozalağına tutuklanmış <i>F. trogii</i> 'nin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı.....	86
4.11.	Fungus Peletlerinin Lakkaz Üretimine Optimizasyonu.....	87
4.11.1.	<i>T. versicolor</i> Peletlerinin ZYFA Ortamında Lakkaz Üretimine Optimizasyonu.....	87
4.11.1.1.	Pelet miktarı ve ZYFA konsantrasyonunun lakkaz üretimine etkisi.....	87
4.11.1.2.	Sıcaklığın ZYFA ortamında <i>T. versicolor</i> 'un lakkaz üretimine etkisi.....	90
4.11.1.3.	ZYFA'nın başlangıç pH'sının <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	91
4.11.1.4.	Çalkalama hızının ZYFA ortamında inkübe edilen <i>T. versicolor</i> 'un lakkaz üretimine etkisi.....	93
4.11.1.5.	ZYFA ortamında <i>T. versicolor</i> 'un lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi.....	93
4.12.	ZYFA Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde <i>T. versicolor</i> Peletlerinin Lakkaz Üretimine Ek Kaynakların Etkisi.....	94
4.12.1.	ZYFA ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine glikozun etkisi.....	94
4.12.2.	ZYFA ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine maya özütünün etkisi.....	95

4.12.3.	ZYFA ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine Bakırın etkisi.....	97
4.12.4.	ZYFA ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine peynir altı suyunun etkisi.....	97
4.13.	Farklı Tutuklama Ajanlarına Tutuklanmış <i>T. versicolor</i> 'un ZYFA Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde Kullanılması.....	98
4.13.1.	Aljinat jele tutuklanmış <i>T. versicolor</i> 'un ZYFA ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı.....	99
4.13.2.	Aktif karbona tutuklanmış <i>T. versicolor</i> 'un ZYFA ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı.....	101
4.13.3.	Çam kozalağına tutuklanmış <i>T. versicolor</i> 'un ZYFA ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı.....	102
4.14.	Atık Suların Funguslarla Muamelesi Sonrası Atık Suyun KOİ Değişimi...	103
4.14.1.	Fungus peletlerinin atık su KOİ'si üzerine etkisi.....	104
4.15.	Sıcaklık ve pH'nın Lakkaz Aktivitesine Etkisi.....	104
4.15.1.	Sıcaklığın lakkaz aktivitesine etkisi.....	104
4.15.2.	pH'nın lakkaz aktivitesine etkisi.....	106
4.16.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> Peletlerinin Ürettiği Lakkazın Sıcaklık Kararlılığı.....	107
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	111
6.	KAYNAKLAR.....	124
7	EKLER.....	135
	ÖZGEÇMİŞ.....	156

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	a) Lakkazın yapısı, b) Katalitik döngüsü.....	17
Şekil 4.1.	<i>F. trogii</i> peletlerinin %10'luk vinas ortamında lakkaz aktivitesi	41
Şekil 4.2.	<i>F. trogii</i> peletlerinin %25'lik vinas ortamında lakkaz aktivitesi	42
Şekil 4.3.	<i>F. trogii</i> peletlerinin %50'lik vinas ortamında lakkaz aktivitesi	43
Şekil 4.4.	<i>F. trogii</i> peletlerinin %75'lik vinas ortamında lakkaz aktivitesi	43
Şekil 4.5.	<i>F. trogii</i> peletlerinin %100'lük vinas ortamında lakkaz aktivitesi	44
Şekil 4.6.	Sıcaklığın vinas ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	45
Şekil 4.7.	Başlangıç pH'sının vinas ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	46
Şekil 4.8.	Çalkalama hızının vinas ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	47
Şekil 4.9.	Vinas ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi.....	48
Şekil 4.10.	Glikoz eklenmiş vinas ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	49
Şekil 4.11.	Maya özütü eklenmiş vinas ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	50
Şekil 4.12.	Bakır eklenmiş vinas ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	51
Şekil 4.13.	Peynir altı suyu eklenmiş vinas ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	52
Şekil 4.14.	Aljinat jele tutuklanmış <i>F. trogii</i> hücrelerinin (10 g) vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	53
Şekil 4.15.	Aljinat jele tutuklanmış <i>F. trogii</i> hücrelerinin (20 g) vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	54
Şekil 4.16.	Aljinat jele tutuklanmış <i>F. trogii</i> hücrelerinin (30 g) vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	54
Şekil 4.17.	Aktif karbona tutuklanmış <i>F. trogii</i> peletlerinin vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	55
Şekil 4.18.	Çam kozalağına tutuklanmış <i>F. trogii</i> peletlerinin vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	56
Şekil 4.19.	<i>T. versicolor</i> peletlerinin %10'luk vinas ortamında lakkaz aktivitesi..	57
Şekil 4.20.	<i>T. versicolor</i> peletlerinin %25'lik vinas ortamında lakkaz aktivitesi..	58
Şekil 4.21.	<i>T. versicolor</i> peletlerinin %50'lik vinas ortamında lakkaz aktivitesi..	58
Şekil 4.22.	<i>T. versicolor</i> peletlerinin %75'lik vinas ortamında lakkaz aktivitesi..	59
Şekil 4.23.	<i>T. versicolor</i> peletlerinin %100'lük vinas ortamında lakkaz aktivitesi.....	59
Şekil 4.24.	Sıcaklığın vinas ortamında inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	60
Şekil 4.25.	Başlangıç pH'sının vinas ortamında inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	61
Şekil 4.26.	Çalkalama hızının vinas ortamında inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi	62

Şekil 4.27.	Vinas ortamında inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi.....	63
Şekil 4.28.	Glikoz eklenmiş vinas ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	64
Şekil 4.29.	Maya özütü eklenmiş vinas ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	65
Şekil 4.30.	Bakır eklenmiş vinas ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	66
Şekil 4.31.	Peynir altı suyu eklenmiş vinas ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	67
Şekil 4.32.	Aljinat jele tutuklanmış <i>T. versicolor</i> hücrelerinin (10 g) vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	68
Şekil 4.33.	Aljinat jele tutuklanmış <i>T. versicolor</i> hücrelerinin (20 g) vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	69
Şekil 4.34.	Aljinat jele tutuklanmış <i>T. versicolor</i> hücrelerinin (30 g) vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	69
Şekil 4.35.	Aktif karbona tutuklanmış <i>T. versicolor</i> peletlerinin vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	70
Şekil 4.36.	Çam kozalağına tutuklanmış <i>T. versicolor</i> peletlerinin vinas ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde lakkaz üretimi.....	71
Şekil 4.37.	<i>F. trogii</i> peletleriyle %10'luk ZYFA ortamında lakkaz üretimi.....	72
Şekil 4.38.	<i>F. trogii</i> peletleriyle %25'lik ZYFA ortamında lakkaz üretimi.....	73
Şekil 4.39.	<i>F. trogii</i> peletleriyle %50'lik ZYFA ortamında lakkaz üretimi.....	73
Şekil 4.40.	<i>F. trogii</i> peletleriyle %75'lik ZYFA ortamında lakkaz üretimi.....	74
Şekil 4.41.	<i>F. trogii</i> peletleriyle %100'lük ZYFA ortamında lakkaz üretimi.....	74
Şekil 4.42.	Sıcaklığın ZYFA ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	75
Şekil 4.43.	Başlangıç pH'sının ZYFA ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi	76
Şekil 4.44.	Çalkalama hızının ZYFA ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	77
Şekil 4.45.	ZYFA ortamında inkübe edilen <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi.....	78
Şekil 4.46.	Glikoz eklenmiş ZYFA ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	79
Şekil 4.47.	Maya özütü eklenmiş ZYFA ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	80
Şekil 4.48.	Bakır eklenmiş ZYFA ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	81
Şekil 4.49.	Peynir altı suyu eklenmiş ZYFA ortamında <i>F. trogii</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	82
Şekil 4.50.	Aljinat jele tutuklanmış <i>F. trogii</i> hücrelerinin (10 g) ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	83
Şekil 4.51.	Aljinat jele tutuklanmış <i>F. trogii</i> hücrelerinin (20 g) ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi	84
Şekil 4.52.	Aljinat jele tutuklanmış <i>F. trogii</i> hücrelerinin (30 g) ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi	84

Şekil 4.53.	Aktif karbona tutuklanmış <i>F. trogii</i> peletlerinin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	85
Şekil 4.54.	Çam kozalağına tutuklanmış <i>F. trogii</i> peletlerinin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	86
Şekil 4.55.	<i>T. versicolor</i> peletlerinin %10'luk ZYFA ortamında lakkaz aktivitesi	87
Şekil 4.56.	<i>T. versicolor</i> peletlerinin %25'lik ZYFA ortamında lakkaz aktivitesi	88
Şekil 4.57.	<i>T. versicolor</i> peletlerinin %50'lik ZYFA ortamında lakkaz aktivitesi	89
Şekil 4.58.	<i>T. versicolor</i> peletlerinin %75'lik ZYFA ortamında lakkaz aktivitesi	89
Şekil 4.59.	<i>T. versicolor</i> peletlerinin %100'lük ZYFA ortamında lakkaz aktivitesi.....	90
Şekil 4.60.	Sıcaklığın ZYFA ortamında inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	91
Şekil 4.61.	Başlangıç pH'sının ZYFA ortamında inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	92
Şekil 4.62.	Çalkalama hızının ZYFA ortamında inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	93
Şekil 4.63.	ZYFA ortamında inkübe edilen <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi.....	94
Şekil 4.64.	Glikoz eklenmiş ZYFA ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	95
Şekil 4.65.	Maya özütü eklenmiş ZYFA ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	96
Şekil 4.66.	Bakırın ZYFA ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimine etkisi.....	97
Şekil 4.67.	Peynir altı suyu eklenmiş ZYFA ortamında <i>T. versicolor</i> peletlerinin lakkaz üretimi.....	98
Şekil 4.68.	Aljinat jele tutuklanmış <i>T. versicolor</i> hücrelerinin (10g) ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	99
Şekil 4.69.	Aljinat jele tutuklanmış <i>T. versicolor</i> hücrelerinin (20g) ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	100
Şekil 4.70.	Aljinat jele tutuklanmış <i>T. versicolor</i> hücrelerinin (30g) ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	101
Şekil 4.71.	Aktif karbona tutuklanmış <i>T. versicolor</i> peletlerinin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	102
Şekil 4.72.	Çam kozalağına tutuklanmış <i>T. versicolor</i> peletlerinin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi.....	103
Şekil 4.73.	Vinas ve ZYFA ortamlarından elde edilen <i>F. trogii</i> ham lakkaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	105
Şekil 4.74.	Vinas ve ZYFA ortamlarından elde edilen <i>T. versicolor</i> ham lakkaz enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	106
Şekil 4.75.	Vinas ve ZYFA ortamlarından elde edilen <i>F. trogii</i> ham lakkaz enzim aktivitesine pH'nın etkisi.....	107
Şekil 4.76.	Vinas ve ZYFA ortamlarından elde edilen <i>T. versicolor</i> ham lakkaz enzim aktivitesine pH'nın etkisi.....	107
Şekil 4.77.	Vinas ortamında <i>F. trogii</i> peletleriyle üretilen lakkaz enziminin kararlılığına sıcaklığın etkisi.....	108
Şekil 4.78.	ZYFA ortamında <i>F. trogii</i> peletleriyle üretilen lakkaz enziminin	

	kararlılığına sıcaklığın etkisi.....	109
Şekil 4.79.	Vinas ortamında <i>T. versicolor</i> peletleriyle üretilen lakkaz enziminin kararlılığına sıcaklığın etkisi.....	109
Şekil 4.80.	ZYFA ortamında <i>T. versicolor</i> peletleriyle üretilen lakkaz enziminin sıcaklık kararlılığı.....	110

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1.1.	Sürekli ve kesikli işlem sonucu oluşan zeytin yağı fabrikası atık sularının içeriği.....	5
Çizelge 1.2.	Zeytin yağı fabrikası atık suyu deşarj standartları.....	6
Çizelge 1.3.	Vinas'ın içeriği.....	11
Çizelge 1.4.	Vinasın alıcı ortama deşarj standartları.....	12
Çizelge 4.1.	Vinasın ve zeytin yağı fabrikası atık suyunun içeriği.....	40
Çizelge 4.2.	Farklı başlangıç pH'larındaki vinas ortamlarının <i>F. trogii</i> peletlerinin uygulanması sonrası pH değişimi.....	46
Çizelge 4.3.	Farklı başlangıç pH'larındaki vinas ortamlarının <i>T. versicolor</i> peletlerinin uygulanması sonrası pH değişimleri.....	61
Çizelge 4.4.	Farklı başlangıç pH'larındaki ZYFA ortamlarının <i>F. trogii</i> peletlerinin uygulanması sonrası pH değişimi.....	76
Çizelge 4.5.	Farklı başlangıç pH'larındaki ZYFA ortamlarının <i>T. versicolor</i> peletlerinin uygulanması sonrası ortamın pH değişimi.....	92
Çizelge 4.6.	<i>F. trogii</i> ve <i>T. versicolor</i> peletlerinin işlem görmüş vinas ve ZYFA'nın KOİ'sine etkisi.....	104

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ABTS	2,2'- azino-bis(etilbenzthiazolin-6-sulfonik asit)
BOİ	Biyolojik oksijen ihtiyacı
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat pentahidrat
Cu	Bakır
DDT	Dikloro difenol trikloroethan
DNS	3,5- dinitrosalisilik asit
Fe	Demir
<i>F. trogii</i>	<i>Funalia trogii</i>
g/L	gram/Litre
HCl	Hidroklorik asit
K	Potasyum
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
kDa	Kilodalton
Kcal/kg	Kilokalori/kilogram
Km	Michaelis-Menten sabitesi
KOİ	Kimyasal oksijen ihtiyacı
Mn	Mangan
mM	Milimolar
m ³	Metreküp
mg/L	miligram/Litre
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
rpm	Dakikada dönme hızı
U/ml	Unit/mililitre
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
<i>T. versicolor</i>	<i>Trametes versicolor</i>
ZYFA	Zeytin Yağı Fabrikası Atık suyu

1. GİRİŞ

1.1. Çevre Kirliliği

Sanayi, modern ve kalkınmış toplumlarda ekonominin temelini oluşturmaktadır [1]. Yani, sanayileşme kaçınılmaz bir olgu olarak karşımızdadır. Önemli olan çevre sağlığını koruyarak, sürdürülebilir kalkınma modelini oluşturmaktır.

Günümüzde yaşanan hızlı nüfus artışı, düzensiz şehirleşme, yerleşim alanlarındaki plansızlığın artması, teknolojik gelişmeler, doğal kaynakların bilinçsizce kullanılması, üretimin hızla artması ve sanayileşme, sanayinin belli noktalarda yoğunlaşması ve insanların refah seviyelerini yükseltme isteği doğal dengenin bozulması ve çevre sorunlarını da beraberinde getirmektedir [2]. Endüstrileşmenin planlı olmaması ve çevrenin göz ardı edilmesi sonucunda çevre kirliliği sürekli artmaktadır. Endüstri kuruluşlarının atıklarını ve enerjilerini ekolojik sistemler belirli bir sınıra kadar dengeleyebilmekte ve bu sınır aşılınca, ekolojik denge önemli zarar görmektedir [3].

Çevre kirliliğine bir bütün olarak bakıldığında kirliliğin ortadan kaldırılması yerine kirlenmenin önlenmesi en akıllıca çözüm olarak ortaya çıkmaktadır. Yer küredeki tüm sosyoekonomik ve sosyokültürel yapı dikkate alındığında kirlenmenin tümüyle önüne geçilmesi bugün için olanaksızdır. Bunun yerine özellikle Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde bir yandan kirlenmenin olanaklar ölçüsünde azaltılması, mevcut kirliliğin temizlenmesi ve atıkların yeniden kazanılması gibi işlemler birlikte uygulanmalıdır [4].

Evsel ve endüstriyel atık sular önemli çevre kirleticileridir. Özellikle endüstrilerin farklı karakterde atık sularının olması arıtım işlemlerinde sorunlar oluşturabilmektedir.

Zeytin yağı fabrikası atık suyu (ZYFA) olan ve kara su olarak da ifade edilen atık su ve ayrıca alkol fabrikası atık suyu olan vinas yüksek BOİ ve KOİ değerlerine sahiptir [5]. Bu atık suların içerisinde çeşitli organik ve inorganik maddeler bulunmaktadır. Zengin içeriklerinden dolayı bu atık suların alıcı ortamlara verilmesi durumunda ileride de bahsedilecek çeşitli zararlı etkiler gözlenebilmektedir. İçerikleri göz önüne alındığında, atık suların değerlendirilmelerinin daha uygun olacağı açıktır.

1.2. Zeytin Yağının Elde Edilmesi

Zeytincilik ve zeytin yağı üretimi, yağlı tohum üretim açısından dünya çapında büyük önem taşımaktadır. Toplam zeytin üretiminin tamamına yakın kısmı Akdeniz ülkelerinde gerçekleşmesine rağmen zeytincilik, dünya yağlı tohum üretiminde önemli bir oranı kapsamaktadır. Zeytincilik başta İtalya, İspanya, Yunanistan ve Türkiye olmak üzere Akdeniz ülkelerinin ekonomilerinde ve kültürlerinde önemli bir yer işgal etmektedir. Dünya zeytin yağı üretiminin yaklaşık %95' i Akdeniz, Marmara ve Ege Denizi çevresinde yapılmaktadır [6-8].

Zeytin ağacı zahmetli büyümekle birlikte, uzun ömürlü bir ağaç olup olgun bir zeytin ağacından 15-40 kg zeytin elde edilmektedir [8, 9]. Ortalama 5 kg zeytinden 1 lt zeytin yağı çıkarıldığı düşünülürse, 1 zeytin ağacı yılda ortalama 3 L ya da 4 L zeytin yağı üretebilmektedir [9].

Önemli bir bitkisel yağ olan zeytin yağı, zeytin bitkisinin olgun meyvelerinden elde edilir. Değişik büyüklüğe sahip olan zeytin meyvelerinin yaklaşık %85'i etli kısımdan, %15'i çekirdekten oluşur. Etli kısmın %50-60'ı yağ, % 25'i su, geri kalanı protein, lif ve organik maddedir. Çekirdeğin ise yaklaşık %10'u yağdır [6].

Ekim alanın kuzey ya da güney yarım kürenin hangi bölgesinde olmasına bağlı olarak, zeytin ağacının çiçek verme mevsimi Nisan ile Haziran aylarına rastlamaktadır. Yeşil zeytinler, Ağustos sonundan Kasım başına kadarki süre içinde olgunlaşır; Kasım ile Mart ayları arasındaki dönem ise zeytinin hasat mevsimidir [10].

1.3. Zeytin Yağı Üretim Prosesleri (İşlemleri) ve Üretime Bağlı Olarak Oluşan Karasuyun Kirlilik Özellikleri

Günümüzde zeytin yağı üretiminde çeşitli ülkelerde kullanılan yöntemler; kesikli (geleneksel) üretim işlemi, sürekli üretim işlemi (3-fazlı üretim işlemi ve 2-fazlı üretim işlemi) ve süzme işlemi olarak sıralanabilir [9].

1.3.1. Kesikli üretim prosesi (işlemi)

Geleneksel yöntem olarak da adlandırılan ve küçük işletmelerde uygulanan presleme yönteminde sap ve yapraklardan ayrılarak yıkanan zeytin meyveleri, değirmenlerde bir miktar su ilavesiyle ezilerek yoğrulur [11]. Elde edilen hamur daha sonra preslenerek yağ ve suyu (karasu) ayrılır. Son olarak da düşey santrifüjle yağ ve su kısmı ayrılır. Katı faz ise pirina olarak elde edilir [9].

1.3.2. Sürekli üretim prosesi (işlemi)

Büyük işletmelerde “sürekli” yöntem olarak adlandırılan santrifüjleme yöntemi kullanılır [6]. Üretim; besleme, yıkama, kırma ve hamur hazırlama ünitelerinden oluşmaktadır. Bu sistemde presin yerini santrifüj almıştır ve sürekli çalışmayı sağlamaktadır [9,12-14]. Bu sistemlerde zeytinlerden daha fazla yağ çıkarılır ve aynı zamanda daha az su ve enerji tüketimi olur [14,15]. Üretim sırasında kullanılan dekantöre bağlı olarak iki işlem tanımlanabilir [9, 12-14].

a) 3-fazlı üretim prosesi (işlemi): Bu üretim sisteminde işlem suyu kullanılmaktadır. İşlem sonrasında %20’si yağ, %50’si atık su (karasu) ve %30’u katı kısım (pirina) olmak üzere 3 faz oluşmaktadır. Bu proseste önemli miktarlarda proses suyu eklenmektedir. Bu sebeple, büyük hacimlerde (baskı işleminden üç kat fazla) atık su oluşmaktadır [7,16]. Her 100 kg zeytin için 80-100 L atık su oluşur [17].

b) 2-fazlı üretim prosesi (işlemi): Bu sistemde üretim boyunca proses suyu eklenmez. Proses sonrasında yağ ve pirina olmak üzere iki faz oluşur. Bu sistem ekolojik olarak caziptir, çünkü sıvı faz oluşmamaktadır. Karasuyun büyük bir bölümü pirina ile birlikte açığa çıkmaktadır [16].

Üç fazlı sistemle oluşan yağ, iki fazlı sistemden daha güçlü antioksidant aktiviteye ve daha yüksek total fenolik içeriğine sahiptir [18].

Pirina, zeytin meyvesinin etli kısmı ile çekirdeğinin posasından oluşur. Bu atık maddeden sabun imalinde kullanılmak üzere ekstraksiyon işlemi ile yağ elde edilir [19]. 1000 kg zeytinin işlenmesi sonucu 800 kg katı atık oluşmaktadır. Bu kısımda yaklaşık %60 su, %2.5 yağ bulunmaktadır [20]. Pirina yaklaşık 2500-3500 kcal/kg ısı değerine sahiptir.

Bu özelliğinden dolayı zeytin yağı işletmelerinde gereksinim duyulan sıcak suyun sağlanması amacıyla ve diğer ısıtma amaçlı uygulamalarda yakacak olarak da kullanılabilir [6].

1.3.3. Süzme prosesi (işlemi)

Yağ ve metal arasındaki yapışma, su ve metal arasındakinden daha farklıdır. Bu prensip, yağ üretiminde kullanılan süzme prosesinin (işleminin) temelini oluşturmaktadır. Kullanılan metal tabaka zeytin hamuruna daldırılmakta, bu tabaka yağ ile ıslanmakta ve tabaka üzerinde bulunan boşluklar yağ ile dolmaktadır. Bu metotta çok sayıda metal tabaka kullanılmaktadır. Bu yöntem tek başına kullanılamaz, baskı veya santrifüj yöntemlerinin kombinasyonu olarak kullanılabilir [20].

1.4. Türkiye’de Zeytin ve Zeytin Yağı Üretimi

Ülkemiz zeytinciliği, 0,8 milyon hektarlık zeytin arazisi 95 milyon zeytin ağacı ile önemli bir tarım, sanayi ve istihdam alanlarıdır [21]. Türkiye, bulunduğu coğrafi konum ve Akdeniz iklimi özellikleriyle İspanya, İtalya, Yunanistan ve Tunus gibi diğer Akdeniz ülkeleriyle birlikte dünyanın önde gelen zeytin ve zeytin yağı üreticilerindedir [21, 22]

Türkiye’de Ege, Marmara, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri’nde zeytin ağacı yetiştirilmektedir. Bu ağaçların %75’i Ege, %14’ü Akdeniz, %9.3’ü Marmara, %1.7’si Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde bulunmaktadır. Türkiye, ortalama 99 bin ton zeytin yağı üretimi ile dünya üretiminin %4.6’sını, 36.4 bin ton ihracatla ise dünya ihracatının %10’unu karşılamaktadır. Zeytin yağı üretimi bakımından en büyük üreticiler; İspanya, İtalya ve Yunanistan’dır. Türkiye, dünya zeytin yağı üretiminde 5. sıradadır [21].

Türkiye dünya sofralık zeytin üretiminde ikinci, yağlık zeytin üretiminde 4. büyük üretici konumundadır. Zeytin ve zeytin yağı üretimi daha çok Ege ve Marmara bölgesinde gerçekleşmektedir [9].

Ülkemiz koşullarında zeytin, Ekim-Kasım aylarında olgunlaşmaya başlar. Zeytinin olgunlaşma zamanı ile birlikte zeytin yağı işleme sezonu başlar ve Şubat-Nisan aylarına

kadar işleme sezonu devam eder [2]. Zeytin yağı fabrikası atığı farklı ülkelerde farklı şekilde tanımlanmaktadır. Türkiye’de bu atık su için kara su terimi kullanılmaktadır [6].

1.5. Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun İçeriği

Zeytin yağı üretiminde oluşan atıklar, presleme işleminden oluşan pirina (zeytin katı atıkları ve zeytin çekirdeği) ve ZYFA’dır. Pirina, yağı alınmak üzere pirina yağı çıkaran işletmelere gönderilir ve burada solvent ekstraksiyonu ile yağı alınır. Arta kalan yağsız pirina esas olarak lignin ve selüloz içermekte olup, yüksek ısıl değere sahiptir. Yağsız pirina, kompostlanabilir ve yakılabilir [9].

Üretilen her litre zeytin yağı için yaklaşık 2.5 L atık oluşmaktadır [23, 24]. Atık suyun içeriği işlenen zeytinlerin türüne ve olgunluk derecesine, zeytinlerin depolanma süresine, kültür toprağına, işleme yöntemine, iklim şartlarına, pestisit ve gübre kullanımına, kullanım suyu miktarına göre farklılık göstermektedir [6, 7]. Çizelge 1.1.’de sürekli ve kesikli üretim sistemi ile zeytin yağı üretimi sonucunda oluşan iki atık suyun kirlilik yükü karşılaştırılmıştır [6].

Çizelge 1.1. Sürekli ve kesikli işlem sonucu oluşan zeytin yağı fabrikası atık sularının içeriği [6].

Parametreler	Kesikli işlem (g/L)	Sürekli işlem (g/L)
pH	4.5-5	4.7-5.2
KOİ	120-130	45-60
BOİ	90-100	35-48
Askıda katı	1	9
Toplam katı	120	60
İnorganik katı	15	5
Uçucu katı	105	55

Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliğinde zeytini işleyerek üretim yapan işletmelerin, oluşturdukları atık suları arıttıktan sonra, alıcı ortamlara vermeleri gereken deşarj standartları Çizelge 1.2.’de yer almaktadır [25].

Çizelge 1.2. Zeytin yağı fabrikası atık suyu deşarj standartları [25].

Parametre	Birim	Kompozit numune	
		(2 saat)	(24 saat)
KOİ	mg/L	250	230
Yağ ve gres	mg/L	60	40
pH		6-9	6-9

Akdeniz ülkeleri, zeytinden zeytin yağı eldesi sırasında yılda 30 milyon m³ atık su üretmektedir [6, 26-29]. Türkiye’de de yılda 400.000 tondan fazla zeytin kara suyu oluşmaktadır. Bu değer yıllık oluşan peyniraltı suyu miktarına yakınken, vinas miktarından çok yüksektir. Zeytin yağı fabrikası katı atığı yılda 20 milyon ton oluşmaktadır [30].

Zeytin yağı fabrikası atık suyu %60-70’i su, %13-15 lignin, %18-20 selüloz ve hemiselüloz, %2.5-3 arta kalan zeytin yağı, %2.5 mineral tuzlardan oluşmaktadır. Organik bileşikler arasında %3 şeker, %1 buharlaşan asit, %0.2 polialkol, %1.5 protein, %0.2 polifenol, %0.5 diğer pigmentlerden oluşmaktadır. Selüloz ve pektinin yanısıra rafinoz, mannoz, sakkaroz, glikoz gibi basit şekerleri de içermektedir [6, 30-36]. Yine organik asitlerden de fumarik asit, gliserik asit, laktik asit, malik asit ve melonik asit bulunmaktadır. Tüm amino asitlerin de bu atıkta bulunduğu bildirilmiştir. En bol bulunan amino asitler aspartik asit, glutamik asit, prolin ve glisin gibi amino asitlerdir. İçerisinde bütün minerallere rastlanılmıştır. En bol bulunan mineraller sodyum, potasyum, kalsiyum ve fosfordur. Yine pek çok fenol bu atık içerisinde bulunmaktadır [6, 31, 37]. ZYFA’da bulunan fenolik bileşikler iki grupta sınıflandırılır. İlk grup düşük molekül ağırlığına sahip tanin ve flavanoidler gibi basit fenolik bileşiklerden oluşur. Flavanoidler 15 karbon atomuna sahip polifenolik bileşiklerdir. ZYFA’da belirlenen ana flavanoidler apigenin ve luteolindir. Başlıca fenolik asitler; sirinjik asit, p-hidroksipenilasetik asit, vanilik asit, veratrik asit, kafeik asit ve sinnamik asittir. İkinci grup polifenoller, ilk grup fenolik bileşiklerin otooksidasyonu ve polimerizasyonu ile oluşan koyu renkli polimerlerdir [7, 38, 39]. ZYFA’nın rengi polifenollerin iki grubu arasındaki orana bağlı olarak değişiklik gösterir [7]. Bu dirençli organik bileşiklerin varlığı ZYFA’nın arıtılması ve detoksifikasyonunda en önemli engellerden birini teşkil eder [7, 40].

1.6. Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun Çevreye Etkileri

Zeytin yağı işletmelerindeki atık sular kullanılan işleme yöntemine bağlı olarak farklı yollardan çevreye bırakılır. Baskı yönteminin kullanıldığı işletmelerde, üretim sırasında oluşan atık su doğrudan kanalizasyon, akarsu veya toprağa atılır. Bu yolla deniz ve yer altı sularına kadar kirliliğin ulaşması söz konusu olabilmektedir [41].

Santrifüj yöntemiyle çalışan modern tesislerde atık su ya işletme çevresinde inşa edilen özel havuzlarda toplanmakta ya da doğrudan deşarj yapılmaktadır. Havuza bırakılan atık sular üretim sezonunu takip eden yaz mevsimi süresince doğal olarak buharlaşmakta geriye kalan atık madde ise havuzların yanında toprağa atılmaktadır. Herhangi bir şekilde kullanılmadığı için her yıl üzerine ilave gelmektedir [41, 42].

ZYFA asidik karakterde olan bir atıktır. pH' sı 4.5-5 arasında olan bu atık içerdiği kolloidal maddeler nedeniyle bulanık bir görünüşe sahiptir. Bu atık su yüksek oranda organik ve inorganik madde içermektedir [43]. Genellikle içerdiği renkli maddeler nedeniyle morumsu kahverengi hatta siyaha yakın renktedir. Koyu renkten yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin sorumlu olduğu bilinmektedir [29]. Koyu renginden dolayı nehirlere verildiği dönemler suda renklenme oluşturmaktadır. Renk oluşumu fotosentez ve solunum dengesini bozacağından dolayı istenmeyen bir olaydır [6].

ZYFA'nın BOİ ve KOİ miktarları sırası ile 100 ve 200 g/L' ye ulaşabilmektedir [27, 44, 45]. Fenolik ve polifenolik bileşiklerin konsantrasyonu 10 g/L civarındadır ve bu düzey ayrıca toksik etki nedenidir [46]. Bu atık su aynı zamanda fitotoksik ve antimikrobiyal özelliğe sahiptir [39, 47, 49]. Yağ miktarı 50 g/L'ye ulaşabilmekte ve verildiği ortamlarda yağ kirliliği oluşturabilmektedir.

ZYFA'nın direkt olarak nehirlere verilmesi sonucunda nehrin çözünmüş oksijen içeriği azalmakta bunun yanı sıra organik yükü gösteren potasyum permanganat kapasitesi ve K, Fe, Mn ve toplam inorganik miktarı artmaktadır [6].

1.7. Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun Arıtımı

ZYFA probleminin çözümü için 50 yıldan fazla bir süredir araştırma yapılmaktadır. Pek çok farklı yöntem denenmektedir. Bunlar 3 katagoride sınıflandırılabilir.

- 1- Detoksifikasyon prosesi (işlemi): Fiziksel, termal, fizikokimyasal ve biyolojik işlemlerdir.
- 2- Çeşitli bileşiklerin geri dönüşümü ve kazanımı
- 3- Üretim sistemi modifikasyonu [7].

Lagüde buharlaştırma, sulama amaçlı kullanma ya da buharlaştırarak konsantre hale getirme, ultrafiltrasyon, ters osmoz, anaerobik ve aerobik biyolojik arıtma, kimyasal ve elektrokimyasal arıtma uygulanan yöntemler arasındadır. Atık suyun büyük hacimde olması ve içerdiği maddeler nedeniyle basit fiziksel arıtma yöntemlerinin etkinliği düşüktür [6, 50, 51]. Kimyasal arıtmada kısıtlı ölçüde başarı elde edildiği belirtilmektedir. Ayrıca bu metotlar oldukça pahalıdır [6, 52]. Lignin benzeri polimerlerin geleneksel atık su arıtım sistemlerinde giderilmesinde bazı problemler vardır [53]. Bu problemler; zaman alan işlemler olması, arıtım maliyetinin yüksek olması ve toksik bileşiklerin kalmasıdır [54]. ZYFA, biyolojik ve kimyasal ön arıtma ihtiyaç duymaktadır. Bu açıdan funguslar ZYFA'nın total fenol miktarını azaltmak için denenmektedir [55]. Biyolojik işlemlere bu nedenle ilgi artmıştır [53].

1.7.1. Aerobik biyoremediasyon (biyolojik iyileştirme)

Zeytin yağı fabrikası atıkları yüksek KOİ, fenol ve renk içermektedir. Bu yüzden yapılan çalışmalar daha çok KOİ ve fenol giderimi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Özellikle basit ve yüksek molekül ağırlıklı fenollerin yıkımı ve renk giderimi önemli bir parametredir. Aerobik işlem polifenol ve renk verici maddeler gibi dirençli kirlilikleri gidermede etkili değildir. Yürütülen çalışmalar daha çok funguslar üzerine yoğunlaşmıştır. Bu atığın pH'sının uygun olması ve fungusların bu ortama kolay adapte olması bunu sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar serbest veya tutuklanmış mikroorganizmaların kesikli veya sürekli sistemlerde uygulanması üzerinde yoğunlaşmıştır [6]. Zeytin yağı fabrikası atık suyunun kirlilik probleminin azaltılmasında pek çok metot önerilmektedir. Bunlar arasında aerobik biyolojik işlemler en ekonomik ve etkili olanıdır [56].

1.7.2. Anaerobik biyoremediasyon (biyolojik iyileştirme)

ZYFA'nın arıtım teknolojilerinden en çok önerileni anaerobik arıttır [57]. Genelde anaerobik çalışmalarda atık suyun yüksek oranda sulandırımına ihtiyaç vardır [6]. Anaerobik arıttmada metan üretimi ayrı bir avantajdır.

1.7.3. Anaerobik- aerobik biyoremediasyon (biyolojik iyileştirme)

ZYFA'nın yüksek KOİ, fenol ve yağ içeriğinden dolayı direkt anaerobik işleme sokulduğunda düşük miktarda metan oluşmaktadır. Bu problem atık suyun aerobik olarak ön arıtım ve daha sonra da anaerobik sistemle yüksek metan üretmek şeklinde aşılabilir. Aerobik-anaerobik arıtım, atık suyun metan üretimi açısından değerlendirilebilirlik olasılığını artırmaktadır. Fakat bu çalışmaların dezavantajı koyu renginin kalmasıdır [6].

1.8. Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun Değerlendirilmesi İçin Yapılan Çalışmalar

- 1- Bitkiler için gübre olarak kullanılması
- 2- Hayvanlara besin olarak kullanılması
- 3- Besiyeri olarak kullanılması sürecinde protein üretimi
- 4- Besiyeri olarak kullanılması sürecinde enzim üretimi
- 5- Antioksidant eldesi
- 6- Biosürefektan üretimi
- 7- Ksantan üretimi
- 8- Besiyeri olarak kullanılma sürecinde bitki büyüme maddelerinin üretimidir [6].

1.9. Vinas

Ülkemizde endüstri bitkileri içerisinde toplam üretim alanının %24.4'ünde şeker pancarı ekimi yapılmaktadır [58].

Şeker sanayi, ülkemizdeki en büyük sanayi kuruluşları arasında yer almaktadır. Son yıllarda şeker üretiminde dünya ülkeleri arasında 8. sırayı alan Türkiye'de günde yaklaşık 95 ton/gün kapasitede şeker pancarı işlenmektedir [59]. Şeker fabrikaları atık suları, alıcı

ortamlar için önemli derecede kirlilik meydana getirmektedir. Melas, şeker elde etmek için şeker pancarının işlenmesi sırasında ortaya çıkan koyu kahve renkli koloidal bir maddedir. Şeker fabrikasında işlenen her 100 kg şeker pancarında 4 kg kadar melas oluşmaktadır. İçeriğinde kompleks polisakkaritler, invert şekerler, karbohidrat olmayan bileşikler, koyu ve kahverenkli azot içeren polimerik bileşikler, inorganik iyonlar, malik asit, propiyonik asit, formik asit, asetik asit gibi organik asitler bulunmaktadır. Melas, alkol amino asit ve maya gibi önemli bileşiklerin üretiminde ve aynı zamanda kepek, saman ve kuru küspelere eklenerek hayvan yemlerinde de kullanılmaktadır [60].

Alkol fabrikaları alkol üretiminde melası besiyeri olarak kullanırlar. Mayanın alkol üretimi sürecinde atık su olarak vinas üretilir. Vinas; ana çözültiden alkol destile edildikten sonra geriye kalan atık suya verilen isimdir. Bu atık su, melastan gelen bütün tuzlarla maya üretimi sırasında katılmış olan mineral tuzların ve mayalanmayı yapmış olan maya kütesini kapsar [61].

Vinas, fermentasyon yoluyla etil alkolün üretimi sırasında açığa çıkan, parçalanabilir maddeler açısından zengin, koyu renkli bir atık sudur. [62-65]. Rengi melanoidinden gelmektedir [66-68]. Melanoid, şeker ve amino bileşiklerin ısıtılmasıyla oluşur [68]. Vinas, kısa sürede çok miktarda üretildiği için kirlenici olarak değerlendirilir. Üretilen her 1 L alkole karşı 10-15 L vinas oluşmaktadır [62, 69-72]. Yüksek organik içeriği ve yüksek tuzluluğu nedeniyle 2 ana çevresel probleme neden olur [73-75]. Sucul sisteme verildiğinde suyu renklendireceğinden ışık geçirgenliği azalır ve fotosentez dengesi bozulur. Toprakla karıştığında ise toprağın pH'sını düşürür ve tarımsal ürünleri etkiler. Yüksek organik içeriği nedeniyle ötrofikasyona neden olur [68].

Vinas, havuza ve lagoonlara boşaltıldığında sıcak yaz dönemi süresince konsantre hale gelir. Vinasın içeriği organik madde açısından zengindir [75, 76]. Vinas, metan üretiminde kullanılmakta ve değerlendirilmektedir [77].

Vinas, organik madde ve besin değeri içeriği açısından tarımsal alanlarda gübre olarak da değerlendirilebilir. Fakat tarımsal alan üzerine konsantre edilmiş vinasın direk uygulanması yüksek tuzluluk, düşük fosfor içeriği nedeniyle ekonomik ve çevresel problemlere yol açar [73]. Yapılan bazı çalışmalarda, vinasın besiyeri olarak kullanılmasıyla, çeşitli bitki büyüme hormonlarının üretilebileceği ve bu atığın değerlendirilebileceği bildirilmektedir [78].

Vinasın içeriği, kullanılan melas, maya ve üretim sistemine göre değişiklikler göstermektedir. Bu atık su yüksek oranda azot ve fosfor içermekle birlikte yapısında çeşitli vitaminler ve amino asitler de bulunmaktadır. Çizelge 1.3'de vinasın içeriği verilmiştir [79].

Çizelge 1. 3. Vinasın içeriği [62].

Parametreler	Miktar	Birim
pH	4.89	----
Renk	Koyu	----
KOİ	80.0	g/L
BOİ	70.0	g/L
Toplam Katı	98.4	g/L
Askıda Katı	6.4	g/L
Toplam Azot	3.9	g/L
Sülfat	2.9	g/L
Etanol	5.0	g/L
Gliserol	5.2	g/L
Asetik Asit	2.8	g/L
Laktik Asit	10.0	g/L
Süksinik Asit	0.5	g/L

1.10. Vinasın Çevre Kirliliğine Etkisi

Vinasta bulunan maddelerden biri de sülfattır. Sülfat melasın asitlendirme işleminden ileri gelmektedir. Konsantrasyonunun çok yüksek seviyede olması durumunda beton üzerinde korozif bir etkiye sahiptir. Ayrıca anaerob arıtım sırasında kükürtlü hidrojenin oluşması olumsuz durumlar yaratmaktadır [79].

Bu atık su içerisinde fenolik maddeler olduğu ve bu maddelerin atık suyun anaerobik arıtımında (metan üretimi) olumsuz etki yaptığı bildirilmektedir [80].

1.11. Vinasın Arıtlabilirliği

Kapsadığı organik maddelerden dolayı vinas evre kirliliği yaratmakta ve bu nedenle arıtılması veya değerlendirilmesi gerekmektedir (izelge 1.4) Koyulaştırılarak elde edilen konsantre vinas hayvan yemi veya gübre olarak kullanılabilir. Ancak vinastaki organik maddelerden yeterince istifade edilemediği gibi buharlaştırma maliyeti de yüksek olmaktadır [79].

Çizelge 1.4. Vinasın alıcı ortama deşarj standartları [25].

Parametre	Birim	Kompozit numune (2 saatlik)
BOİ	mg/L	80
KOİ	mg/L	150

1.12. Biyoteknoloji

Biyoteknoloji biyolojik sistemlerin mal ve hizmet üretiminde kullanılması olarak tanımlanabilir. Biyoteknoloji; sağlık, gıda, tarım, kimya ve evre gibi alanlarda uygulama bulmaktadır.

Biyoteknolojiyi çeşitli alt kısımlara ayırabiliriz:

- Fermentasyon Biyoteknolojisi
- Enzim Biyoteknolojisi
- Atık Biyoteknolojisi
- evre Biyoteknolojisi
- Yenilenebilir Kaynak Teknolojisi
- Anaerobik Biyoteknoloji
- Protein Biyoteknolojisi
- Tarımsal Biyoteknoloji gibi [81].

1.12.1. Çevre biyoteknolojisi

Yeni bir çok sanayi dalının gelişmesi, varolanların etkinliğini artırması ve sürekli artan şehir nüfusu, bu yüzyılın başından itibaren doğal kaynakların kirlenmesine neden olmuş ve beraberinde çevre sorunlarının çözümüne yönelik teknolojilerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Çevre Biyoteknolojisi, canlı organizmaların ve onlardan elde edilen ürünlerin, çevre kirliliği ve riski yaratan madde ve atıkların biyolojik iyileştirilmesinde kullanılmasıdır. Bununla birlikte çevrenin izlenmesi ve çevreye yönelik transgenik bitki üretimleri de bu çerçevede içerisindedir [82].

1.12.2. Çevre biyoteknolojisinde fungusların önemi

Çevre kirliliği olgusu ve kirliliğin giderimine yönelik araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bugüne kadar rapor edilen çalışmaların çoğunda bakterilerin ve onların ürünlerinin yıkım yetenekleriyle ilgiliyken bu amaç için mayaların ve filamentli fungusların değerlendirilmesi üzerine de ilgi artmaktadır [83, 84].

Fungusların çevresel kirleticilerin yıkımında kullanılabilmesinde 2 ana yol vardır. İlk yaklaşım, sıvı atık suyun özgül fungusla maruz kalması için fermentasyon ve evsel atık su arıtım sistemlerini modifiye etmektir. Bu yolda kullanılan funguslar, tek kirleticiyi ya da karışık kirliliği aktif olarak yıkabilmektedir. İkinci yaklaşım canlı fungusun ya da enzim gibi ürünlerinin kirlenmiş çevrede direkt olarak kullanılmasıdır [83].

1.13. Beyaz Çürükçül Funguslar

Beyaz çürükçül funguslar çevre kirliliğine karşı kullanabileceğimiz muhteşem çevre dostu organizmalardır [81]. *Basidiomycetes* sınıfına dahildir. Bu funguslar, lignin ve yıkıma dirençli diğer aromatik bileşiklerin yıkımı için spesifik olmayan oksidatif sistemi geliştirmektedir [85-87]. Beyaz çürükçül funguslar, lignin dahil fenolik orjinli polimerleri tamamen yıkabilen bir kaç mikroorganizma grubundan biridir [88]. Beyaz çürükçül funguslar lakkaz, mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz gibi lignin yıkımından sorumlu enzimleri sentezler [89]. Lignin yıkım yetenekleri yüksek olan bu funguslar odunda beyaz

çürümeye neden olduklarından dolayı “beyaz çürükçül fungus” olarak adlandırılırlar. Aynı zamanda “ligninolitik funguslar” olarak da bilinirler. Çalışmalar bu fungusların, polisiklik aromatik hidrokarbonları, polisiklik bifenil dioksin, DDT ve endüstriyel boyalar gibi ksenobiyotikleri içeren kirlilikleticilerin yıkımında yetenekli olduğunu göstermektedir. Beyaz çürükçül funguslarla yürütülen çalışmaları aşağıdaki şekilde gruplayabiliriz.

- 1- Boyar maddelerin yıkımı/giderimi [90-93]
 - 2- Alkol fabrikası atık sularının arıtımı [94]
 - 3- Zeytin yağı fabrikası atık sularının arıtımı ve değerlendirilmesi [44, 49].
 - 4- Peynir altı suyunun değerlendirilmesi [95]
 - 5- Tekstil fabrikası atık sularının arıtımı [96]
 - 6- Tarımsal atıkların değerlendirilmesi [64, 71]
 - 7- Lakkaz gibi enzimlerin üretimi [97, 98]
 - 8- Ksenobiyotiklerin yıkımı [99]
 - 9- Metal adsorbsiyonu [100]
 - 10- Kömürün sıvılaştırılması [101]
 - 11- Hormon üretimi [78]
- Lakkaz, lignin yıkan basidiomyceteslerin çoğu tarafından salgılanmaktadır [102].

1.14. Lakkaz

Lakkaz, 19. yüzyılın sonlarından beri üzerinde çalışmalar yapılan bir enzimdir. [103, 104]. Lakkaz, ilk kez Yoshida tarafından 1883’de Japon vernik ağacı (*Rhus vernicifera*) özsuğunda keşfedilmiştir [105-107]. Fungusta bu enzimin varlığı 1896’da rapor edilmiştir [105, 107]. Lakkazlar, uzun süredir bilinmesine rağmen beyaz çürükçül funguslar tarafından odunun enzimatik yıkımı çalışmalarına başlandıktan sonra dikkati çekmiştir [103].

Lakkaz (EC 1.10.3.2), katalitik merkezinde bakır atomu içeren polifenol oksidaz grubuna aittir ve çoklubakır oksidaz olarak da adlandırılır. [103, 105, 108]. Lakkaz, difenol oksidaz olarak adlandırılmasına rağmen 2,6 dimetoksifenol ve guaikol gibi monofenoller, difenollerden daha iyi substrattır [103].

Lakkazlar, pekçok filamentli fungus (*Basidiomycetes*, *Ascomycetes*, *Deuteromycetes*), bitkiler (örn: *Rhus vernicifera*), birkaç böcek (örn: *Bombyx* sp.) tarafından üretilen enzimlerdir. [103, 106, 109, 110]. *Azospirillum lipoferium* ve *Alteromonas* sp. gibi bazı bakterilerin de bu enzimi ürettiği rapor edilmiştir [112-114]. Bakteri lakkazları intraselüler ya da periplazmik proteinlerdir. En iyi karakterize edilen bakteri lakkazı *Sinorhizobium meliloti*'den izole edilendir. [103, 115]. Fungus lakkazları in vivo'da pigment sentezinde, meyve şekillenmesinde, lignin yıkımı sürecince fenollerin detoksifikasyonunda, fungus/konuk (patojenik türlerde virulans içeren) etkileşiminde işe karışır [103, 109, 116, 117].

Beyaz çürükçül fungusların hemen hemen her türünün çeşitli oranlarda lakkazı ürettiği rapor edilmektedir [103].

Beyaz çürükçül funguslar, odun ya da katı substrat ortamında çeşitli lakkazları düşük konsantrasyonda üretir. Ekstraselüler lakkaz *Basidiomycetes*'lerde az miktarda üretilmektedir. Lakkazın üretimi ferulik asit, 2,5-ksilidin, p-anisidin ya da veratril alkol gibi yapısal olarak lignin benzeri ya da lignin türevi gibi maddelerle zenginleştirilebilmektedir [106, 119]. Pek çok araştırmacı, lakkaz üretimini arttırmak amacıyla kültür ortamına indükleyicilerin eklenmesi durumunu değerlendirmiş ve ksilidin, veratril alkol gibi bileşiklerin eklenmesiyle lakkaz üretiminin arttığı saptanmıştır [120]. Bazı fungusların üreme ortamına çeşitli aminoasit ve vitaminlerin eklenmesi lakkaz üretimini artırmaktadır [121]. Bakır; oksidaz grubunun süperoksidaz, askorbik asit oksidaz, tirozinaz, sitokrom oksidaz ve lakkaz gibi pek çok fungal enzimde metal aktivatör olarak anahtar role sahiptir. Çalışmalar lakkaz sentezi üzerine önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bakır pek çok lakkaz izoformlarının gen transkripsiyon düzeyinde düzenlenmesini sağlamaktadır [119].

Beyaz çürükçül fungusların ligninolitik sistemleri esas olarak fungusun sekonder metabolik fazı süresince aktive edilir ve sık sık azot sınırlamasıyla başlatılır. Fakat bazı soylarda azot konsantrasyonunun ligninolitik aktivite üzerine etkisinin olmadığı bulunmuştur [106].

1.14.1. Hücresel lokalizasyon

Substratlarının özellikleri nedeniyle lignini yıkabilen enzimler ekstraselülerdir. Şaflaştırılan çoğu lakkaz şimdiye kadar ekstraselüler enzim olmasına rağmen odun çürükçülü fungusların lakkazları intraselüler olarak da bulunabilir. *Trametes versicolor*, glikoz, buğday samanı ve kayın ağacı yaprakları üzerinde üretildiğinde hem ekstraselüler hem de intraselüler lakkazı üretmektedir. *Agaricus bisporus*'da lakkaz aktivitesinin az bir kısmı intraselüler olarak bulunmuştur. Fakat total aktivitenin %88'inden daha fazlası hücre dışıdır. Lakkaz aktivitesinin intra ve ekstraselüler varlığı *Phanerochaete chrysosporium* ve *Suillus granulatus*'da da belirlenmiştir. *Basidiomycetes Irpex lacteus*'da, *C. neoformans* mayası ve *Trichoderma* spp.'nin sporlarında hücre duvarıyla ilişkilidir. Lakkazın lokalizasyonu muhtemelen fizyolojik fonksiyonuyla birleştirilir. Periplazmik bakteriyal lakkaz kadar funguslardaki intraselüler lakkazların da hücrede düşük moleküler ağırlıklı fenolik bileşiklerin transformasyonuna katılması olasıdır [103].

1.14.2. Yapısal özellikleri

Lakkazlar genellikle molekül ağırlıkları 60 ve 80 kDa olan, hücre dışı ve glikoprotein yapıda enzimlerdir. Pek çok monomerik lakkaz molekülleri yapılarında 4 bakır atomu içerir [106, 122].

Fungal lakkazların bir kısmı monomerik proteindir. Pekçok lakkaz homodimerik yapı sergiler [103].

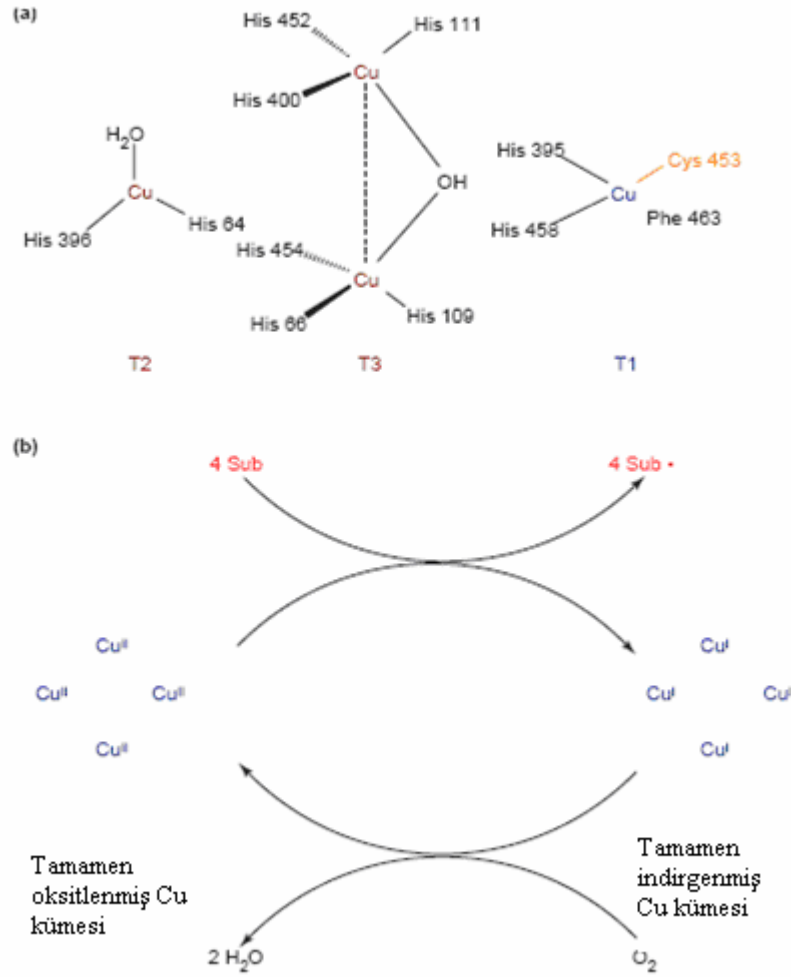
Lakkazlar ard arda dört kez, 1 elektron oksidasyonunu katalizler sonra bu elektronları moleküler oksijene transfer ederek suya indirger. Bu ailenin tüm üyeleri tarafından yerine getirilen bu kataliz, enzim molekülünde 4 bakır merkezin varlığıyla meydana gelir [103]. Lakkazlar yapısında bulunan bakır atomlarından dolayı çok bakırlı enzimler (metaloenzimler) olarak ifade edilirler [122]. Şekil 1.1'de lakkazın yapısı ve katalitik döngüsü gösterilmiştir [104].

Genellikle 4 bakır atomu içeren lakkaz enzimi diğer organizmalara göre funguslarda daha yaygın olarak bulunmaktadır [123, 124].

Lakkazlar çeşitli substratları kullanabilmektedir. Fenolik maddeler (krezol gibi monofenoller; orto, meta, para difenoller ve polifenoller) ve aromatik aminler bu substratların başında gelir [122].

Lakkazlar elektronları moleküler oksijene transfer ederek suya indirgerler ve bu yolla lignindeki fenolik üniteleri fenoksi radikallerine oksitlerken belli yardımcı substratların ve aracılarn varlığında fenolik olmayan lignin alt birimlerini de oksitleyebilir [122].

Beyaz çürükçül fungusların bu enzimi üretimi düzenlenebilir. Ksilidin, veratril alkol, ferrulik asit gibi indükleyicilerin *T. versicolor* üreme ortamına eklenmesi ve *T. trogii*, *P. ostreatus* ve *T. versicolor* üreme ortamına bakırın eklenmesi durumunda lakkaz üretiminin arttığı bildirilmiştir [108].



Şekil 1.1. a) Lakkazın yapısı, b) Lakkazın katalitik döngüsü [104].

Lakkazların substratları için Km değeri aralığı geniştir (1-10 mM) [125].

1.14.3. Lakkazın önemi

Lakkaz enziminin biyoteknolojide kullanım alanları:

- Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde ağartma ajanı olarak kullanımı: Lakkazın odun ve kağıt hamurundan lignin gideriminde kullanımına yönelik çalışmalar yapılmaktadır [126, 127].
- İçeceklerde fenol analizinde kullanımı: Tutuklanmış lakkazın, şarap ve elma suyundaki fenol analizinde ve fenollerin gideriminde kullanımı çalışılmaktadır [106].
- Biyosensör olarak kullanımı: Fenolik bileşiklerin belirlenmesinde biyosensör olarak kullanılmasına yönelik çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir [128].
- Biyolojik iyileştirmede kullanımı: Atık sularındaki fenolik bileşiklerin giderilmesinde kullanımına yönelik çalışmalar rapor edilmiştir. Ayrıca lakkaz enzimi ksenobiyotik olan herbisitleri yapısal değişikliğe uğratarak inaktif analoglarına dönüştürebilmekte, böylece herbisitlerin hem toksikliği giderilmekte hem de bu toksisiteden pek çok canlının etkilenmesi önlenmektedir [122].
- Kot kumaşının beyazlatılmasında kullanımı: Tekstil endüstrisinde lakkazın kullanımı çok hızlı bir şekilde gelişmektedir. Çünkü lakkaz, tekstil boyalarının ve tekstil atık sularının rengini giderebilmektedir.
- Nanobiyoteknolojide kullanımı: Lakkaz, kofaktör eklenmeksizin elektron transfer reaksiyonlarını katalize etmede yetenekli olduğu için çeşitli fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılmalarına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Nanoteknoloji, mikro ve nanometre ölçekli farklı tipteki yüzeyler üzerine biyomoleküllerin spesifik adsorpsiyonunu ve yüklemesini kontrol etmek yoluyla daha küçük ve daha etkili biyosensör geliştirmeye katkı sağlamaktadır.
- Toprak biyoremediasyonunda kullanımı: Polisiklik aromatik hidrokarbonlarla birlikte diğer ksenobiyotikler topraktaki kirliliğin ana kaynağıdır. Böylece onların yıkılması çevre için oldukça önemlidir. Lakkazın katalitik özellikleri bu tip bileşikleri yıkmak için kullanılabilir.

- Sentetik kimyada kullanımı: Lakkazlar, sentetik kimyada da büyük ilgi görmektedir. Kopmleks polimer ve medikal ajanların korunmasında ve oksidadif hasarı önlemede uygulanabilirliği önerilmektedir.
- Kozmetikte kullanımı: Lakkaz kozmetik alanında da kullanılmaktadır. Lakkaz temelli saç boyalarının daha az tahriş edici olduğu bilinmektedir. Çünkü boya formasyonunda lakkaz, okside edici ajan olarak H_2O_2 'in yerini alır [126].
- Besin endüstrisinde kullanımı: Besin endüstrisinde lakkazlar, besin ya da içeceklerden fenol gideriminde kullanılmaktadır [105, 126]. Lante v.d. (1992) şarap prosesi süresince lakkazın stabilizer olarak kullanımını rapor etmiştir [129].
- İmmunosensör olarak ve enzim analizlerinde kullanımı
- Organik sentezde uygulama alanı olması

Beyaz çürükçül funguslar lignini yıkabilen bir kaç organizmadan biri olduğu için biyolojik kağıt hamurunun ağartılması uygulamalarında çalışılmaktadır. Bu funguslar odunun yıkımını gerçekleştiren lignonolitik enzimlerin üreticileri olarak bilinir. Lakkaz, endüstriyel uygulamalar için önemlidir. Çünkü lakkaz, fenolik ve fenolik olmayan lignin yapısını yıkabilir. Lakkazların ekstraselüler glikoprotein doğası fungal biyokütleden hızlıca ayrılmasını sağlar. Fungal lakkazların büyük ölçekli uygulamalarında kullanımının en önemli sınırlayıcısı, düşük oranda üretimidir [106].

Organik kirliliklerinin arıtımı için lakkaz ve peroksidaz enzimleri kullanılabilir. Enzimatik metotlar genellikle düşük enerji gerektirir ve kontrolü kolaydır. Lakkaz ve peroksidazlar toksik organik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyebilir ve geniş substrat özgülüğü vardır [125].

1.15. Tutuklama (İmmobilizasyon)

Mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen biyokimyasal dönüşümlerden; besin, kimya, tıp ve fermentasyon olaylarına dayalı endüstri kollarında geniş ölçüde yararlanılmaktadır. Bu dönüşümlerde ilk aşamada serbest mikroorganizmalar kullanılmış daha sonra mikroorganizmaların tutuklanarak kullanılabilceği düşüncesi ortaya çıkmıştır.

Son yıllarda tutuklanmış hücrelerden yararlanılmakta ve böyle katalizörlerin yeni özellikleri kullanılmaktadır [130]. Bu çalışmaların bir nedeni, böyle organizmaların

endüstriyel açıdan kullanımında önemli bir parametre olan sekonder metabolit üretim fazını mümkün olduğu kadar uzatmaktır [131]. Tutuklanmış hücrelerin serbest hücrelere göre bazı avantajlarının olduğu bildirilmektedir. Bunlar;

- Jel ve hücreler arasındaki fizikokimyasal ilişkilerin korunmasına bağlı üstün bir denge oluşturur.
- Uygun olmayan çevre koşullarına karşı hücreleri korur.
- Yüksek oranda substrat alınmasına doğru hücrelerin geçirgenliğini değiştirir.
- Fermentasyon bölgesinden son ürünleri hızla uzaklaştırır.
- Biyokatalist sisteminin kendini kolaylıkla yenilenmesini sağlar.
- Tekrar tekrar kullanılabilir.

Birçok endüstri kolunda, ekonomik olan maddelerin (enzimler, antibiyotikler, bitki büyüme hormonları, steroidler ve organik asitler v.d.) üretiminde alışlagelmiş yöntemler kullanılmakla birlikte, son yıllarda gerek laboratuvar koşullarında gerek pilot düzeyde yapılan çalışmalarda çeşitli tutuklama işlemleri gerçekleştirilmeye başlanmıştır [132, 133].

1.16. Tutuklama Yöntemleri

Çeşitli taşıyıcılara, hayvan ve bitki hücrelerinin, enzimlerin ve mikroorganizmaların tutuklanarak kullanılmasının biyoteknolojik uygulamalarda pek çok avantajı vardır [134]. Tutuklama ajanı olarak sodyum aljinat, kitin, kitosan ve selüloz türevleri gibi doğal polimerler kullanılmaktadır [135, 136].

1.16.1. Taşıyıcıya bağlama

Mikroorganizmaların veya enzimlerin bir taşıyıcıya bağlanması üç ana şekilde olmaktadır.

a) Fiziksel adsorpsiyon: Hücre tutuklamada kullanılan ilk uygulamadır. Hücreler plastik materyal, seramik yüzey ve odun gibi farklı destekler üzerine adsorpsiyonla tutuklanır [137]. Burada etkili olan, yükler arası ve hidrofobik ilişkidir. Fiziksel adsorpsiyonun dezavantajı sıcaklık, pH gibi çevresel koşullardan etkilenmesidir [138].

b) Kovalent bağlama: Bu uygulama, destek matriksi ve biyolojik materyalin fonksiyonel grubu arasında bağ oluşumuna dayanır. Reaksiyon düşük sıcaklık, düşük iyonik kuvvet ve nötral pH şartlarında gerçekleşir [139].

c) İyonik bağlama: İyonik bağlama metodu suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. İyon değiştirici özelliğe sahip polisakkarit ve sentetik polimerler taşıyıcı olarak kullanılır. Bu taşıyıcılara enzimin bağlanması kolaylıkla olur ve şartlar kovalent bağlanma için gerekenden daha uygundur. İyonik bağlanma metodunda enzimin aktif bölgesinde ve konformasyonunda küçük değişiklikler meydana gelebilir [140].

1.16.2. Çapraz bağlama

Bu yöntem, daha çok içeride tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde uygulanır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak gluteraldehit, hegzametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen sık kullanılır. Bifonksiyonel reaktifler hem enzim hem de hücre tutuklamasında kullanılır [141]. Bu metodu oluşturan mekanizma aktive edilmiş inorganik destek ve hücre arasında kovalent bağ formasyonuna dayanır. Çapraz bağ için yüzeyin kimyasal modifikasyonu gereklidir. Bu reaksiyon aktive edilmiş destek materyali ve hücre arasındaki reaksiyon için inorganik silis yüzey üzerine reaktif organik grubun girişini gerektirir. Çapraz bağlama için kullanılan kimyasalların toksisitesi bu uygulamanın kullanımını sınırlar [137].

1.16.3. İçeride tutuklama

Hücre tutuklamada en yaygın çalışılan metot, polimer matriks içine hücrelerin alınmasıdır. Bu amaçla kullanılan matriksler arasında agar, aljinat jel, selüloz ve türevleri, kollajen, jelatin, poliakrilamid, poliester, poliüretan sayılabilir [137].

a) Jel içerisinde tutuklama: Burada aljinat boncukları içerisine tutuklanır [142].

b) Mikrokapsül içerisine tutuklama: İki şekilde yapılmaktadır. İlk olarak jel içerisinde tutuklama yapıldıktan sonra boncuk içerisine 'sitrat' verilerek jel halindeki aljinat

sıvılaştırılır ve kapsül elde edilmiş olur. Bu metod ile hücreler tutuklandığında besin ve oksijen gibi küçük moleküller rahatlıkla kapsül içine nüfuz ederler, hem hücre gibi büyük moleküller kapsül dışına çıkamazlar. İkinci olarak hücre veya enzim CaCl_2 çözeltisi ile karıştırılır. Bir enjektör yardımıyla karıştırılmakta olan Na-aljinat çözeltisine enzim – CaCl_2 karışımı damlatılarak kapsüller oluşturulur. Oluşan kapsüller distile su veya uygun tampon çözelti ile yıkandıktan sonra CaCl_2 çözeltisinde bekletilerek sertleşmesi sağlanır. Kapsüllerin sağlamlığı açısından şekillerinin düzgün küreler halinde olması gerekir. Kapsüllerin içi sıvıdır ve etrafı aljinat membran ile kaplıdır. İç ortam sıvı olduğu için enzimin hareket kabiliyeti boncuklarda olduğu gibi sınırlanmamıştır [142].

Ülkemizde zeytin yağı ve alkol fabrikalarının pek çoğunun arıtım sistemi mevcut değildir ve bu nedenle oluşturulan atık sular direkt olarak doğaya verilmektedir. Her iki atık su yüksek organik içeriğe sahiptir. Aynı zamanda KOİ, pH gibi parametreleri de Türk Çevre Mevzuatında belirtilen atık su deşarj standartlarına uymamaktadır. Zengin içerikleri nedeniyle atık suların değerlendirilmesi ve bu süreçte biyolojik iyileştirilmesinin gerçekleştirilmesi çok önemlidir.

Bu çalışmanın amacı vinas ve ZYFA'nın besiyeri olarak kullanılması sürecinde pek çok alanda uygulama alanı bulabilen lakkaz enziminin beyaz çürükçül fungus peletleriyle üretilmesidir. Çalışmada ayrıca biyolojik iyileştirmenin olup olmadığı da araştırılacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun Biyolojik İyileştirilmesine Yönelik Yapılan Çalışmalar

Scioli ve Vollaro (1997) tarafından yapılan bir araştırmada ZYFA'nın arıtımı için *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 mayası kullanılmıştır. Bu mayanın 3.5 litrelik fermantöre ekimi sonucunda 24 saat içinde atık suyun KOİ'si %80 oranında azaltılmıştır. Çalışmada 22.45g/L biyomas ve lipaz enzimi elde edilmiştir. Yağ, gres, fenoller ve karbohidratların aerobik fermentasyon sırasında büyük oranda giderildiği rapor edilmiştir [143].

Poliüretana tutuklanmış *Lentinula edodes* ile yapılan çalışmada sakaroz, maya özütü ve Tween 80 eklenmiş ZYFA tutuklanmış fungusla muamele edilmiştir. Total organik karbon, total fenol ve orto-difenol içeriğinin azaldığı aynı zamanda atık suyun renginin 1. günde %75 ve 2. günde ise %72 oranında giderildiği bildirilmiştir [144].

Yeşilada vd. (1998) *Coriolus versicolor* ve *Funalia trogii*'nin ZYFA ortamında üretilmesi sürecinde biyolojik iyileştirilme verimini araştırmış ve başlangıç KOİ konsantrasyonu, ekim miktarı ve çalkalama hızının biyolojik giderimi etkilediği rapor edilmiştir. Optimum koşullarda *F. trogii*'nin üreme sürecinde atık suyun KOİ'sinin %70, fenolünün %93 ve renginin %81 oranında giderildiği saptanmış ve *C.versicolor*'un 6 günlük üreme sürecinde ise %63 KOİ, %90 fenol ve %65 renk giderimi gerçekleştirdiği rapor edilmiştir [145].

Yeşilada vd. (1999) ZYFA'nın akut letal ve genotoksik etkisinin olduğunu rapor etmiştir. LC50 değerleri *Rana ridibunda* için %2.59, *Bufo viridis* için %2.12 olarak saptanmıştır. Atık suyun *Drosophila melanogaster* üzerine genotoksik etkisinin olduğu saptanmıştır. *Funalia trogii* ile 6 gün muamele edilen atık suyun fenol (%88), KOİ (%40), renk (%64) gideriminin gerçekleştiği ve toksikliğin azaldığı rapor edilmiştir [46].

Kahraman ve Yeşilada (1999) yapmış oldukları çalışmada farklı oranlarda seyreltilmiş ZYFA'yı dört beyaz çürükçül fungus (*Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Funalia trogii*, *Phanerochaete sajor-caju*) ile muamele etmişler ve üreme ortamına tarımsal atık olan pamuk sapı ekleyerek fungusların renk giderim ve KOİ giderim yeteneklerini araştırmışlardır. *Phanerochaete chrysosporium* % 20'lik atık su ortamda

KOİ'yi %48 ve rengi %58 oranında giderirken, *F. trogii* %30'luk atık su ortamında %51 KOİ ve %55 oranında rengi gidermiştir [71].

Portekiz'in farklı bölgelerinden sağlanan ZYFA'nın (geleneksel ve sürekli üretim sisteminden çıkmış) akut toksisitesi *Vibrio fisheri*, *Photobacterium phosphoreum* ve *Daphnia magna* kullanılarak ve ayrıca pek çok fiziksel ve kimyasal parametrelerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bütün test türleri üzerine ZYFA'nın yüksek derecede toksik etki gösterdiği saptanmıştır [146].

ZYFA'nın biyolojik yıkılabilirliği üzerine yapılan diğer bir çalışmada atık sudan izole edilen *Penicillium*' un 7 soyu kullanılmış ve bütün soyların 22 gün içinde KOİ'yi (%60-%74) ve fenolik içeriği (%52-%67) düşürdüğü saptanmıştır. Ayrıca P4 soyunun ZYFA ortamında fermentasyonu sonucu atık suyun *Bacillus megaterium*'e antibakteriyel aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir [29].

ZYFA'nın çevresel problemlere yol açmasına neden olan yüksek, orta ve düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin etkilerini araştırmak için yapılan çalışmada ultrafiltrasyonla atık su üç kısma ayrılmıştır. Ayrılan kısımlar jel filtrasyonla analiz edilmiş ve düşük molekül ağırlıklı bileşiklerden oluşan kısım *Phaerochaete chrysosporium* ile muamele edilmiştir. Renk gideriminin ve depolimerizasyonun yüksek olduğu saptanmıştır. Bu kısımda lignin peroksidaz enzimi eser miktarda bulunmuştur. Yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin olduğu kısım fungus ile muamele edildiğinde ise KOİ gideriminde ve depolimerizasyon düzeyinde azalma saptanmıştır [44].

Oktav ve Şengül (2000) karasuyun biyolojik iyileştirilmesi amacıyla Türkiye'de henüz uygulama alanı olmayan yeni bir bakteri türü denemiş ve ham atık su örneğine farklı miktarlarda bakteri ekilerek bakteri miktarının KOİ giderimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bakteri miktarının artırılmasıyla KOİ giderme veriminin arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca atık suyun pH'sı da yükselmektedir. Havalandırma süresinin KOİ giderme verimi üzerine etkisine yönelik yapılan çalışma sonucunda KOİ'nin %52 oranında giderildiği bulunmuştur [147].

Kissi vd. (2001) *Phaerochaete chrysosporium* ve *Pleuratus ostreatus*'u dekstroz, maya özütü ve maltoz eklenmiş %20'lik ZYFA ortamında üretmişlerdir. Detoksifikasyonda ve renk gideriminde *P. chrysosporium*'un *P. ostreatus*'dan daha iyi olduğu bulunmuştur. *P. chrysosporium* 6 gün içinde %50'den daha fazla renk giderimi ve fenol giderimi

gerçekleştirirken, *P. ostreatus*'un 12 günde giderebildiği rapor edilmiştir. Aynı zamanda *P. chrysosporium*'la muamele edilen ZYFA'nın *Bacillus cereus* üzerine olan toksik etkisinin azaldığı da saptanmıştır [27].

ZYFA'da bulunan fenolik bileşiklerin ve atık suyun renginin giderimi için yapılan diğer bir çalışmada, *Geotrichum candidum* kullanılmış ve mikroorganizmanın 3 gün üretimi sürecinde %50 KOİ giderimine ulaşılmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerin *G. candidum* tarafından hidrolize edilmesi ve *G. candidum*'un üremesiyle bazı basit fenolik bileşiklerin giderimi gerçekleştiğinden %75 oranında da renk gideriminin meydana geldiği gözlenmiştir. [38].

Fountoulakis vd. (2002) ZYFA'dan fenol giderimi için *P. ostreatus* kullanmış ve bu fungusun fenol giderim yeteneği sulandırılmamış ve %50 oranında seyreltilmiş ZYFA ortamında test etmiştir. %50 oranında seyreltilmiş atık suda 22 gün içinde %78 fenol azalımı elde edilmiştir [23].

Ruiz vd. (2002) ZYFA ortamında *Phaerochaete florida-alba*'yı üretmiş ve fungus tarafından sentezlenen ligninolitik enzimler aracılığıyla fenol giderimi ve renk gideriminin gerçekleştirildiği bildirilmiştir [148].

Beyaz çürükçül funguslardan *Pleurotus* spp.'in ZYFA ortamında üretimi sonucunda 12-15 günde fenolik bileşiklerin %69-76 oranında giderildiği, ZYFA'nın siyah renginin sarı-kahverengiye dönüştüğü, daha parlak hale geldiği ve üreme ortamında yüksek lakkaz aktivitesinin olduğu rapor edilmiştir [42].

Phanerochaete flavido-alba'nın üretildiği ZYFA ortamında mangan peroksidaz ve lakkaz enzimi belirlenirken lignin peroksidaz belirlenememiş ve 10 gün içerisinde %70 oranında renk, %51 oranında aromatik bileşik giderimi ve %70 oranında toksikliğin azaldığı rapor edilmiştir [149].

Fenole dirençli iki alg (*Ankistrodesmus braunii* ve *Scenedesmus quadricauda*) ile ZYFA'nın arıtımına yönelik yapılan çalışmada 5. günden sonra fenol içeriğindeki azalmanın sınırlandığı saptanmıştır. Her iki alg kültürünün ZYFA ortamındaki düşük molekül ağırlıklı fenollerin %50'sinden fazlasını yıktığı fakat tamamen gideremediği tespit edilmiştir [150].

Farklı KOİ değerlerindeki ZYFA ortamlarında *Pynoporus coccineus*, *Pleurotus sajor caju*, *Coriolopsis polyzona*, *Lentinus tigrinus*'un renk ve KOİ giderim yetenekleri test

edilmiştir. *P. sajor-caju* ve *C. polyzona* 50 g/L KOİ içeren ZYFA'nın rengini %75 oranında gidermiş ve hem mono hem de poliaromatiklerin *C. polyzona* ile muameleden sonra azaldığı tespit edilmiştir [28].

ZYFA ortamında üretilen *Geotrichum* sp., *Aspergillus* sp. ve *Candida tropicalis*'in polifenol yıkım yeteneği farklı konsantrasyonlardaki atık sularda araştırılmıştır. Ortalama KOİ giderimi *Geotrichum* sp., *Aspergillus* sp. ve *C. tropicalis* için sırası ile %55, %53 ve %63 olarak tespit edilmiştir. Maksimum polifenol giderimi ise sırasıyla %47, %44 ve %52 olarak bulunmuştur [151].

Bir başka çalışmada, ZYFA'nın detoksifikasyonu için *Lentinula edodes* kullanılmıştır. İnkübasyondan 48 saat sonra lakkaz üretimi başlamış ve 9 günlük inkübasyon sonrası maksimum değere (2.8 IU/ml) ulaşmıştır. Maksimum KOİ giderimi 240 saat sonra %67 oranında olmuştur. Yine, 240 saat sonra %88 toplam fenol giderimi elde edilmiştir. *L. edodes* ile muamele edilen ZYFA'nın *Triticum durum*'un çimlenmesine etkisi araştırılmış ve ZYFA'nın fitotoksik etkisinin azalmış olduğu saptanmıştır [152].

Sulandırılmış ve steril edilmiş ZYFA ortamında biyoreaktörde üretilen *Pleurotus ostreatus*'un primer metabolizması sırasında üreme ortamında belirlenen tek enzimin lakkaz olduğu ve fungus biyokütlesinin artışına paralel olarak şeker tüketiminin arttığı fakat fenolik kısmın oksidasyona güçlü dirençlilik gösterdiği bildirilmiştir. *P. ostreatus*'un ZYFA'nın toksikliğini ve fenolik içeriğini azaltabildiği rapor edilmiştir [153].

Phanerochaete chrysosporium ve yeni bir *Basidiomycetes* soyu Euc-1 kullanılan çalışmada kullanılan yeni soyun ZYFA'nın rengini giderme konusunda daha iyi olduğu bildirilmiştir ve başlangıç fenol konsantrasyonu 800 mg/L olan atık su ortamında 24 günlük inkübasyon süresince %90 fenol, %73 renk ve %45 KOİ giderimi elde edilmiştir [53].

Coriolopsis polyzona'nın lignolitik enzim üretim yeteneğine çeşitli indükleyicilerin etkisinin test edildiği çalışmada veratril alkolün lignin peroksidaz, Mn peroksidaz ve lakkazı sırası ile 18.5, 20.8 ve 55 kat arttırdığı saptanmıştır. Ligninolitik enzimler, oksijen varlığında düşük azot düzeyinde ve glikoz bulunan ortamda daha iyi üretilmiştir [154].

Pleurotus cinsine ait 4 fungus (*P. floridae*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*), iki maya türünün (*Saccharomyces cerevisiae* ve *Kluyveromyces lactis*) ve filamentli fungusların (*Oidodendron* spp ve *Penicillium* spp) ZYFA'nın biyolojik iyileştirilmesinde

kullanıldığı çalışmada atık su öncelikle kimyasal arıtıma tabi tutulmuştur. Fermantasyondan önce fenolik maddelerin içeriği kimyasal arıtımla azaltılmıştır. Fermentasyon süresince redükte şekerin tamamı mikrobiyal karışım tarafından 9-12 günde metabolize edilmiştir. Santrifüj edilmiş ZYFA'nın protein içeriği fermentasyondan sonra yaklaşık %40 oranında azaltılmıştır. ZYFA'nın fenol içeriğinin kimyasal arıtım sonrası %65 (3.2 g/L'den 1.2'ye) oranında fermentasyondan sonra ise 0.2 g/L azaldığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde BOİ de kimyasal arıtmadan sonra 102 g/L'den 27 g/L'ye düşerken, fermentasyondan sonra ise 11 g/L'ye düşmüş olduğu bulunmuştur [155].

Olivieri vd.'nin (2006) ZYFA'nın biyolojik yıkımı üzerine yaptıkları çalışmada *Pleurotus ostreatus* kullanılmış ve toplam organik karbon, polifenol konsantrasyonu, fenol oksidaz aktivitesi, renk giderimi ve pH değişimi gibi biyolojik dönüşümler test edilmiştir. *P. ostreatus*'un üremesi sırasında steril olmayan ve aerobik koşullarda %70 polifenol giderimi bildirilmiştir. Bu çalışmada yüksek oranda lakkaz elde edilmiş ve renk giderimi tespit edilememiştir [156].

ZYFA'nın renk ve KOİ giderimi çalışmasında *Phanerochaete chrysosporium* poliüretana tutuklanarak kullanılmıştır. Renk giderimi, adsorbsiyonla polifenollerin %39 oranında odun talaşına tutuklanmasından sonra gerçekleşmiştir. Yüksek lignin peroksidaz üretilen ortamın kullanımında etkili KOİ ve yüksek renk giderimi elde edilmiştir. Poliüretana tutuklanmış fungus kullanılması durumunda ZYFA'nın kirlilik parametrelerinin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir [157].

ZYFA'nın *Phaerochaete chrysosporium* ile 3-5 gün muamelesinden sonra anaerobik arıtım uygulanmış ve uygulama sonrası atık suyun toksisitesi *Vibrio fischeri* kullanılarak saptanmıştır. *P. chrysosporium* ile muameleden sonra atığın toksisitesinin %100'den %74'e düştüğü ve anaerobik arıtmadan sonra ise %38'e gerilediği bildirilmiştir [24].

Aspergillus cinsinin *Nigri* soyu, *Aspergillus aculeatus* Ege-K, *A. foeditus* var. *pallidus* Ege-K156, *A. niger* Ege-K4 ve *A. tubingensis* Ege-K 265'in ZYFA'nın renk ve fenol giderim yetenekleri araştırılmıştır. *A. tubingensis* Ege-K 265'in bütün soyları sulandırılmamış ZYFA'nın rengini %30 ve 2 kez sulandırılmış ZYFA'nın rengini ise %80 oranında gidermiştir. Ayrıca sulandırılmamış ve 2 kez sulandırılmış ZYFA'nında fenolik bileşiklerin %30 oranında giderildiği rapor edilmiştir [158].

2.2. Alkol Fabrikası Atık Suyunun Biyolojik İyileştirilmesine Yönelik Yapılan Çalışmalar

Yeşilada ve Fışkın (1995) 3 farklı beyaz çürükçül fungusu (*Funalia trogii*, *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*) vinas ortamında üretmişler ve fungusların optimum üreme koşulları ve vinasın renginin giderimini araştırmışlardır. *C. versicolor* ve *F. trogii* için optimum üreme ve renk gideriminin pH 4.5, 30°C ve 150 rpm'de olduğu, *P. chrysosporium* için ise optimum sıcaklığın 40°C'de olduğu belirtilmiştir. Optimum koşullarda *C. versicolor*'un %75 ve *F. trogii*'nin %62 oranında renk giderimine neden olduğunu ve *P. chrysosporium*'un renk giderimi gerçekleştirmediği bildirilmiştir. Ayrıca ekim miktarına paralel olarak renk gideriminin arttığı da saptanmıştır [66].

Benito vd. (1997) *Coriolus versicolor* ile anaerobik-aerobik arıtmadan geçmiş ve 3 g/L sukroz ve 1g/L KH₂PO₄ eklenmiş vinas ortamında %82'lik renk giderimi ve %77'lik KOİ giderimi rapor etmişlerdir [159].

Beyaz çürükçül funguslar dışında diğer bazı funguslar ve bakterilerle de renk giderim çalışmaları yürütülmüştür. Bu açıdan yapılan bir çalışmada Kumar vd. (1997) anaerobik arıtmadan geçmiş atık suyu %2.5 oranında seyreltmışler ve buna 10 g/L olacak şekilde glikoz ekledikten sonra fakültatif anaerobik saf bakteri kültürü ile 7 gün sonunda %31 renk giderimi ve %57 KOİ giderimi elde etmişlerdir [67].

Aspergillus terreus ve *Geotrichum candidum* kullanılan diğer bir çalışmada *A. terreus* ile 120 saatte %66 toplam fenol giderimi elde edilirken *G. candidum* ile %70 giderim elde edilmiştir [80].

Coriolus versicolor, *Funalia trogii*, *Phanerochaete chrysosporium* ve *Pleurotus sajor caju* kullanılan diğer bir çalışmada statik koşullarda vinasın renk ve KOİ giderim aktiviteleri araştırılmıştır. Fungusların KOİ ve renk giderim yeteneklerine pamuk sapının etkisi de ayrıca test edilmiştir. *F. trogii* ve *C. versicolor*'un %10'luk ve %30'luk atık suların rengini etkili bir şekilde giderdiği tespit edilmiş ve pamuk sapının eklenmesinin renk giderim aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir [160].

Alkol fabrikası atık suyunun renginin ve toksisitesinin giderimi üzerine yürütülen bir araştırmada *Flavodon flavus* (beyaz çürükçül fungus) poliüretan köpük üzerine tutuklanmış ve tutuklanmış fungusun %10'luk atık suyun rengini 5-7 gün arasında %60-73

oranında giderdiği ve 3 kere etkili bir şekilde kullanılabilirdiği tespit edilmiştir. Fungusla muamele edilmiş atık suyun toksikliğindeki değişim *Oreochromis mossambicus* kullanılarak araştırılmış ve muamele görmüş atık su, balıkta karaciğer hasarı yapmazken fungusla muamele görmemiş atık suyun karaciğer hasarına neden olduğu bildirilmiştir [68].

2.3. Atık Suların Biyolojik İyileştirilmesinde Lakkaz Enziminin Kullanımına Yönelik Yapılan Çalışmalar

Cerrena unicolor'dan saflaştırılarak izole edilen lakkazın kararlılığı ve kinetiğinin araştırıldığı bir çalışmada ZYFA gibi atık sularda yaygın olarak bulunan fenollerin lakkaz enzimi tarafından giderilebilirliği de araştırılmış ve fenollerin yüksek oranda giderildiği rapor edilmiştir [54].

Lentinula edodes'den elde edilen lakkaz enziminin ZYFA'nın biyolojik iyileştirilmesinde kullanımının araştırıldığı çalışmada, lakkaz enzimi adsorbsiyon ve sonrasında glutaraldehit ile çarpaz bağlanarak kitosana tutuklanmıştır. Tutuklanmış enzimin 24 saatlik sürede %67 polifenol, %72 ortodifenol, toksisiteyi azalttığı ve ayrıca renk giderimini gerçekleştirdiği rapor edilmiştir [161].

Yürütülen diğer bir çalışmada *Trametes* sp. I-62 (CECT 20197) vinasın detoksifikasyonunda kullanılmıştır. Bu çalışmada kültür ortamına %20'lik vinasın eklenmesinden 7 gün sonra maksimum renk ve KOİ giderimi elde edilmiştir. %73 oranında renk ve %62 oranında KOİ giderimi saptanmıştır [162].

Fenice vd. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada havalandırılmalı tank tipi reaktör ve havalandırılmalı reaktörde ZYFA ortamında *Panus tigrinus* kullanılarak lakkaz ve mangan peroksidaz üretimi incelenmiştir. Tank tipi reaktörde en yüksek lakkaz aktivitesi 13 gün sonra 4600±98 U/L, havalandırılmalı reaktörde ise 7 günde 4300±23 U/L olarak bulunmuştur [163].

2.4. Atık Su Ortamlarında Lakkaz Üretimini Artırmaya Yönelik Yapılan Çalışmalar

Yeşilada ve Fıskın (1995) vinas içeren ortamlarda *Funalia trogii* ve *Coriolus versicolor*'un lakkaz üretim yeteneğini araştırmış ve KOİ değişimini de saptamışlardır.

Vinas ortamında yüksek lakkaz aktivitesi rapor edilmiş ve ayrıca *C. versicolor*'un %43, *F. trogii*'nin %37 oranında KOİ giderimini gerçekleştirdiği bildirilmiştir [164].

ZYFA ortamından izole edilen *Chalara paradoxa* CH32 maya-malt agarda üretildikten sonra lakkaz üretimi için maya-malt sıvı besiyerine alınmış ve lakkaz üretimini indüklemek için üretimin 1. gününde ortama ayrı ayrı %0.1 lignin hamuru, %5 ZYFA, 20 µM gayakol, 2,5-ksilidin eklenmiş ve lakkaz aktivitesi belirlenmiştir. Gayakol ve 2,5-ksilidin lakkaz aktivitesini indüklememiş, lignin hamuru ve ZYFA'nın eklenmesi durumunda enzim aktivitesi belirlenememiştir. Metanol, *iso*-propil alkol ve etanol gibi organik asitlerin eklenmesi sonucu lakkaz aktivitesi değişimi incelenmiş ve son konsantrasyonu %25 olacak şekilde karışımın eklenmesi durumunda enzim aktivitesinin arttığı (%63.6-%73 oranında) tespit edilmiştir [165].

Kahraman vd. (2002)'de yapmış oldukları çalışmada *Funalia trogii* ve *Coriolus versicolor* kullanarak vinas ortamında lakkaz üretimini araştırmışlardır. Pamuk sapı eklenmiş vinas kültür ortamında *F. trogii* ile 4.880 U/ml ve *C. versicolor* ile 4.406 U/ml aktivite elde edilmiştir. [166].

Trametes pubescens'in lakkaz üretimini artırmak amacıyla yapılan bir çalışmada kültür ortamı olarak basal ortam kullanılmış ve kültür ortamına lakkaz indükleyicisi olarak bakır, p-metoksianilin, galik asit, ferulik asit, vanilik asit ve 2,5-ksilidin eklenmiştir. Aynı zamanda üreme ortamına farklı konsantrasyonlarda glikoz eklenmiş ve glikozun etkisi test edilmiştir. Glikoz konsantrasyonunun artışıyla lakkaz üretimin baskılandığı saptanırken lakkaz indükleyicisi olarak test edilen bileşiklerden gallik asit ve kateşolun lakkaz aktivitesini 1.1 kat arttırdığı tespit edilmiştir [167].

Lakkaz üretimini artırmaya yönelik yapılan diğer bir çalışmada, bir beyaz çürükçül fungus olan *Trametes versicolor* kullanılmış ve üreme ortamına farklı konsantrasyonlarda glikoz, bakır, 2,5-ksilidin ve fenolik karışım eklenerek lakkaz üretimine etkisi incelenmiştir. Karbon sınırlı ortamda lakkazın üretiminin indüklendiği ve maksimum lakkaz aktivitesinin indükleyicilerin karışım halinde kullanıldığı durumda 5500 U/dm³ olarak elde edildiği rapor edilmiştir. Kullanılan indükleyicilerin sinerjistik etkisinin olduğu da rapor edilmiştir [168].

Herhangi bir karbon kaynağı eklenmeksizin ZYFA'da üreyebilen ve bu endüstriyel atık suyun KOİ ve rengini giderebilen bir beyaz çürükçül fungus olan *Pycnoporus*

coccineus ile yapılan çalışmada farklı indükleyicilerin lakkaz üretimi üzerine etkisi çalışılmıştır. Lakkaz aktivitesi belirlenmiş ve izoenzimi izole edilerek karakterize edilmiştir. En yüksek lakkaz aktivitesi Cu^{+2} etanol ortamında 45 gün inkübasyon süresi sonrası 100,000 U/L olarak bulunmuştur [169].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu tez çalışmasında, *Basidiomycetes* sınıfına dahil olan beyaz çürükçül funguslardan *Funalia trogii* ATCC 200800 ve *Trametes versicolor* ATCC 200801 kullanıldı. Bu funguslar İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji-Biyoteknoloji laboratuvarında saf kültür olarak muhafaza edilmektedir.

Bu funguslar, sabouraud dekstroz agar (SDA) plaklarında, 30°C'ye ayarlanmış inkübatörde (Sanyo) 6 gün inkübe edildi ve her 4-5 haftada bir taze besiyerine pasajlamaları yapılarak devamlılığı sağlandı. Fungus kültürleri +4°C' de buzdolabında saklandı.

3.2. Çalışmada Kullanılacak Beyaz Çürükçül Fungus Peletlerinin Hazırlanması

Yatık agarda üretilen beyaz çürükçül fungus kültürlerine 10 ml steril distile su eklenerek misel süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan misel süspansiyonun 5 ml'si 100 ml sabouraud dekstroz sıvı besiyeri (SDB) içeren 250 ml'lik erlene aktarıldı ve 30°C, 150 rpm'de çalkalamalı etüvde (G24 Environmental incubator shaker) 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kültür, homojenizatör kullanılarak (Kinematica Gmdh) düşük devirde homojenize edildi ve 600 ml SDB içeren 1000 ml'lik erlenlere kültürlerden ekildi. Ekim sonrası kültürler 30°C ve 150 rpm'de üretilmiş ve üretim sonrası, hazırlanan peletler steril koşullarda süzülerek alındı ve atık su içeren test ortamlarına çalışma planına bağlı olarak eklendi.

3.3. Çalışmada Kullanılan Atık Sular

Çalışmada kullanılan zeytin yağı fabrikası atık suyu (ZYFA) Balıkesir, TARIŞ Zeytin Yağı Fabrikası'ndan temin edildi. Atık su, cam şişeler içerisinde, 120°C'de 20 dakika otoklavda steril edildikten sonra muhafaza edildi.

Alkol fabrikası atık suyu (vinas) ise Eskişehir Şeker Fabrikası'na bağlı Alkol Fabrikası'ndan sağlandı. Bu atık su da cam şişelere konularak otoklavda 120°C 'de 20 dakika steril edilerek saklandı ve çalışmalarda kullanıldı.

3.4. Optimizasyon Çalışmaları

3.4.1. Atık su konsantrasyonu ve pelet miktarının lakkaz aktivitesi üzerine etkisinin saptanması

Bölüm 3.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan *F. trogii* ve *T. versicolor* peletleri sırası ile 0.275, 0.360, 0.820 g ve 0.213, 0.366, 0.588 g olacak şekilde 250 ml'lik erlenlere tartılarak kondu. Üzerlerine 50 ml %10, %25, %50, %75 ve %100'lük konsantrasyonlarda vinas eklendi ve 30°C ve 150 rpm'de 24 saat inkübe edildi.

ZYFA da 250 ml'lik erlenlere %10, %25, %50, %75 ve %100 olacak şekilde hazırlandı ve 50 ml besiyerlerine belirtilen miktarlarda fungus peletleri eklenerek 30°C ve 150 rpm'de 24 saat inkübe edildi.

3.4.2. Sıcaklığın lakkaz aktivitesine etkisinin saptanması

Her iki atık su için optimum atık konsantrasyonu ve uygun pelet miktarı belirlendikten sonra çalışmada kullanılan peletler için en uygun sıcaklık derecesinin saptanması amacı ile 10, 20, 30, 35 ve 40°C'lerde optimum pelet miktarı ve uygun atık konsantrasyonunda 24 saat inkübe edildi. Lakkaz aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık dereceleri hem vinas hem de ZYFA ortamında her iki fungus için saptanmış ve bundan sonraki çalışmalarda peletler test ortamlarında optimum sıcaklık derecelerinde inkübe edildi.

3.4.3. pH'nın lakkaz aktivitesine etkisinin saptanması

Kullanılan atık suların optimum konsantrasyonu tespit edildikten sonra %25'lik ZYFA ve vinasın pH'ları, 1N HCl ve 1N NaOH kullanılarak 3, 4, 5, 6, 7 ve 8'e ayarlandı

ve başlangıç pH'larının çalışmada kullanılan peletlerin lakkaz enzimi sentezleme yetenekleri üzerine etkisi araştırıldı.

3.4.4. Çalkalama hızının lakkaz aktivitesine etkisinin saptanması

En uygun çalkalama hızı koşulunun tespit edilmesine yönelik çalışmalarda 0, 50, 100, 150, 200 ve 250 rpm çalkalama hızlarına ayarlanmış inkübatörler (Unitron Infors ve Nüve ES110) kullanıldı ve bu hızlarda peletlerin lakkaz üretimi izlendi.

3.4.5. İnkübasyon süresinin lakkaz aktivitesine etkisinin saptanması

F. trogii ve *T. versicolor* peletleri 250 ml'lik erlenlere aktarıldı ve üzerlerine %25'lik ZYFA ve vinas 50 ml olacak şekilde eklendi. Daha sonra 30°C'de ve 150 rpm'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresince 0., 2., 4., 6., 8., 10. ve 24. saatlerde steril koşullarda örnekler alınarak lakkaz aktivitesi ölçüldü.

3.5. Peletlerle Yürütülen Çalışmalar

Bölüm 3.2.'de belirtildiği gibi hazırlanan fungus peletleri % 25'lik vinas ve ZYFA ortamlarına optimum miktarda pelet (%25'lik vinas *F. trogii* 0.360 g %25'lik ZYFA'ya 0.820 g, her iki atık suya 0.588 g *T. versicolor*) 250 ml'lik erlenlere tartılarak konuldu ve üzerine 50 ml %25'lik atık sular ilave edilerek 30°C ve 150 rpm'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında peletler steril koşullarda süzüldü ve üzerlerine 50 ml %25'lik atık sular eklenerek peletler tekrarlı kesikli olarak kullanıldı.

3.6. Fungusların Kuru Ağırlıklarının Saptanması

Bölüm 3.2.'de belirtildiği gibi hazırlanan fungus peletleri, Bölüm 3.4.1'de belirtildiği şekilde tartıldı ve daha önce 50°C 'de 24 saat kurutulup, 1 saat desikatörde bekletildikten sonra darası alınmış Whatman No: 1 filtre kağıtlarından süzüldü. Daha sonra

filtre kağıdı + örnek 24 saat 50°C'de kurutuldu. Kurutma işlemi sonrası desikatörde bırakıldı ve sonra hassas terazide tartıldı. Biyokütle miktarı g/L olarak ifade edildi.

3.7. Atık Sulara Eklenen Ek Kaynakların Lakkaz Üretim Verimine Etkisinin Saptanması

Tekrarlı kesikli çalışmada peletlerin lakkaz aktivitesinin artırılması amacıyla karbon ve enerji kaynağı olarak glikoz, maya özütü ve peyniraltı suyu eklendi. Yine lakkaz aktivitesi üzerine bakırın etkisini saptamak amacıyla atık su ortamlarına bakır ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) eklendi ve çalışmalar tekrarlı kesikli olarak sürdürüldü.

3.7.1. Glikoz

Peletlerin lakkaz üretim yeteneğini artırmak amacıyla %25'lik vinas ve ZYFA ortamlarına son konsantrasyonda 1, 2, 5 ve 10 g/L olacak şekilde glikoz eklendi. Bu ortamlarda *F. trogii* ve *T. versicolor* peletleri ile tekrarlı kesikli çalışmalar yürütüldü.

3.7.2. Maya özütü

Vinas ve ZYFA (%25) ortamlarına 1, 2 ve 5 g/L olacak şekilde maya özütü eklendi ve her iki fungus peletleri ile tekrarlı kesikli çalışmalar yapıldı.

3.7.3. Bakır ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Vinas ve ZYFA ortamlarına son konsantrasyonu 0.5, 1.0 ve 2.0 mM olacak şekilde $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ eklenerek her iki fungusun lakkaz aktivite değişimi tekrarlı kesikli süreçte saptandı.

3.7.4. Peynir altı suyu

Peynir altı suyu otoklavda 120°C’de 20 dakika steril edildikten sonra kullanıldı. Vinas ve ZYFA ortamlarına (%25) %5, %10 ve %20’lik olacak şekilde peyniraltı suyu eklendi ve fungus peletleriyle tekrarlı kesikli çalışmalar yapıldı.

3.8. Atık Suyun Analizi

Toplam katı ve uçucu katı madde miktarları standart metodlardan yararlanılarak saptandı [170].

Her iki atık suyun toplam şeker miktarı Antron [171], redükte şeker miktarı ise DNS yöntemi kullanılarak saptandı [172] ve g/L cinsinden ifade edildi.

Kimyasal oksijen isteminin saptanmasında Spectroquant TR 320 ve Spectroquant NOVA 60 cihazları kullanıldı. Uygun oranda seyreltilmiş atık suların KOİ’si, standart KOİ kitleri (Merck KgaA 64271) kullanılarak belirlendi ve g/L cinsinden ifade edildi.

Toplam karbon miktarını belirlemek için Spectroquant TR 320 ve Spectroquant NOVA 60 cihazları kullanıldı. Uygun oranda seyreltilen atık suların toplam karbon miktarları, standart toplam karbon kitleri (Merck KgaA 62271) kitleri kullanılarak saptandı ve g/L cinsinden ifade edildi.

Atık suların renk miktarı ZYFA için 395 nm, vinas için 475 nm dalga boyunda spektrofotometrede (UV-1601 Shimadzu) absorbans değeri olarak ölçüldü [171, 66].

Atık suların pH değeri pH metre (SevenMulti Mettler Toledo mV/ORP) kullanılarak saptandı.

ZYFA’nın askıda katı madde miktarı, uygun sulandırım yapıldıktan sonra 810 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometrede (Hach 2800) ölçüldü ve g/L cinsinden ifade edildi. Vinasın askıda katı miktarı ise standart metodtan yararlanılarak saptandı [170].

3.9. Fungusların Tutuklanması

Çalışmada ayrıca tutuklanmış funguslar da tekrarlı kesikli çalışmalarda kullanıldı. Bu amaçla hücreler aljinat jele, aktif karbona ve lignoselülozlu hammadde olarak çam kozalağına tutuklandı. Tutuklama işlemleri aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

3.9.1. Fungusların aljinat jel içerisine tutuklanması

Funguslar Bölüm 3.2.'de belirtildiği gibi üretilip %1 w/v aljinat çözeltisiyle karıştırıldıktan sonra düşük devirde homejenize edildi. Bu çözelti, 0.1 mol/L CaCl₂ çözeltisine pastör pipeti ile damlatılarak tutuklama gerçekleştirildi. Tutuklama işlemi sonrası tutuklanmış olan funguslar serum fizyolojik çözeltisi içerisinde bekletildi. Çalışma için tutuklanmış hücreler steril distile su ile yıkandıktan sonra SDB besiyerinde 24 saat inkübe edildi [171]. İnkübasyon sonrası tutuklanan hücreler steril koşullarda süzülüp tartılarak atık su ortamlarına eklendi. Tutuklanmış fungus peletleri tartıldıktan sonra 10 g, 20 g ve 30 g'da tutuklanan hücre sayısı sayılarak belirlendi.

3.9.2. Aktif karbona tutuklama

Aktif karbon 0.71-1.18 mm olacak şekilde hazırlandıktan sonra 250 ml'lik erlenlere 0.5 g olacak şekilde eklendi ve üzerine 100 ml SDB besiyeri eklenerek steril edildi. Bölüm 3.2.'de belirtildiği gibi üretilen funguslar, düşük devirde homojenize edildikten sonra tutuklama ajanı (aktif karbon) içeren sıvı besiyerine 2 ml olacak şekilde ekim yapıldı ve 150 rpm çalkalama hızında ve 30°C sıcaklık derecesinde 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrası merkezinde aktif karbon bulunan fungus peletleri steril koşullarda süzülüp tartılarak atık sulara eklendi.

3.9.3. Lignoselülozlu maddeye tutuklama

Lignoselülozlu hammadde olarak çam kozalağı kullanıldı. Çam kozalakları öğütüldükten sonra boyutları 0.71-1.18 mm olacak şekilde hazırlandı. 250 ml'lik erlenlere

çam kozalakları 0.2 g olacak şekilde eklendi ve 40 ml SDB sıvı besiyeri eklenerek steril edildi. Bölüm 3.2’de belirtildiği şekilde üretilen fungus düşük devirde homojenize edildikten sonra hazırlanan besiyerine 2 ml ekildi. Etüvde 30°C’de statik olarak 5 saat inkübe edildikten sonra etüvün çalkalama hızı 110 rpm’e ayarlandı. 24 saat sonra inkübatörün çalkalama hızı 150 rpm’e çıkarılarak 2 gün inkübe edildi. Daha sonra steril koşulda 60 ml SDB besiyeri eklenerek 3 gün daha inkübe edildi. Bu şekilde çam kozalağına tutuklanan peletler steril koşullarda süzülerek alındı ve tartılarak test ortamlarına ilave edildi.

3.10. Lakkaz Aktivitesinin Tayini

Lakkaz aktivitesinin saptanması için ABTS [2,2’- azino-bis(etilbenzthiazolin-6-sulfonik asit)] substrat olarak kullanıldı. Enzim aktivitesinin ölçümünde 833µl sodyum asetat tamponu, 100 µl ABTS ve uygun miktarda enzim içeren kültür sıvısı içerecek şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı. Enzim aktivitesi 420 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede 1 dakikada oluşan absorbans değişimi olarak belirlendi ve U/ml cinsinden ifade edildi.

3.11. Enzimin Sıcaklık Kararlılığı

F. trogii ve *T. versicolor* peletlerinin uygun miktarlarıyla %25’lik vinas ve ZYFA ortamlarında yapılan tekrarlı kesikli çalışmalardan alınan ekstraselüler sıvılar 20, 30, 40, 50 ve 60°C’ye ayarlı su banyosunda 1 saat bekletildi ve enzim aktivitesi Bölüm 3.10’da belirtildiği şekilde tayin edildi. Daha sonra 5 saat bekletilmiş ekstraselüler sıvının enzim aktivitesi tespit edilerek sıcaklık kararlılığı belirlendi.

3.12. Farklı Tampon Sıcaklığı ve pH’sı

3.12.1. Farklı sıcaklıklardaki tamponlarla lakkaz aktivite tayini

F. trogii ve *T. versicolor* peletlerinin uygun miktarlarıyla %25’lik vinas ve ZYFA ortamında yapılan tekrarlı kesikli çalışmalardan elde edilen ekstraselüler sıvıların lakkaz

aktivitesi 20, 30, 40 ve 50°C sıcaklıklarda bekletilen sodyum asetat tamponlarıyla tayin edildi.

3.12.2. Farklı pH'lardaki tamponlarla lakkaz aktivite tayini

F. trogii ve *T. versicolor* peletlerinin uygun miktarlarıyla %25'lik vinas ve ZYFA ortamlarında yapılan tekrarlı kesikli çalışmalardan elde edilen ekstraselüler sıvı örneklerinin lakkaz aktivitesi pH'sı 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8 olan tamponlarla belirlendi.

3.13. İstatistiksel analiz

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında ve ortalama alınarak standart sapmanın belirlenmesinde SPSS programı (SPSS Inc. USA) kullanıldı. Tekrarlı kesikli çalışmalarda günlere bağlı enzim aktivitelerinin gruplar arası değerlendirilmesinde karşılaştırma yapıldı. Bunun için Mann Whitney-U testi kullanılarak kontrol grubuyla karşılaştırma yapıldı. Gruplar arası farklılığın önemli olup olmadığı $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlilik derecesine göre belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Çalışmada Kullanılan Alkol Fabrikası Atık Suyu (Vinas) ve Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun (ZYFA) İçerikleri

Çalışmada kullanılan vinas ve ZYFA'nın içerikleri Çizelge 4.1'de verildi. Çizelgeden de görüldüğü gibi atık sular doğaya direkt olarak verildiği durumda çevre kirliliği oluşturabilecek değerleri içermektedir.

Çizelge 4.1. Vinas ve zeytin yağı fabrikası atık sularının içeriği

	Vinas	ZYFA	
Parametre	Değer	Değer	Birim
Renk (A₄₇₅, A₃₉₅)	5	33	
pH	5.25	4.74	
KOİ	60.23	59.54	g/L
Toplam Şeker	6.44	19.11	g/L
Redükte Şeker	4.59	4.21	g/L
Toplam Karbon	36.80	53.13	g/L
Toplam Katı	91.12	94.38	g/L
Askıda Katı	4.25	16.57	g/L
Uçucu katı	65.46	67.18	g/L

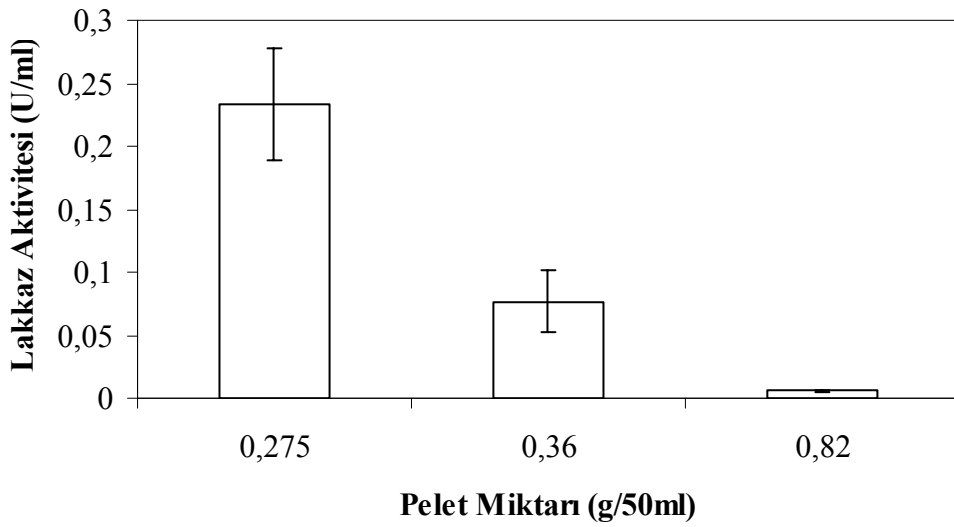
4.2. Fungus Peletlerinin Lakkaz Üretiminin Optimizasyonu

4.2.1. *F. trogii* Peletlerinin Vinas Ortamında Lakkaz Üretiminin Optimizasyonu

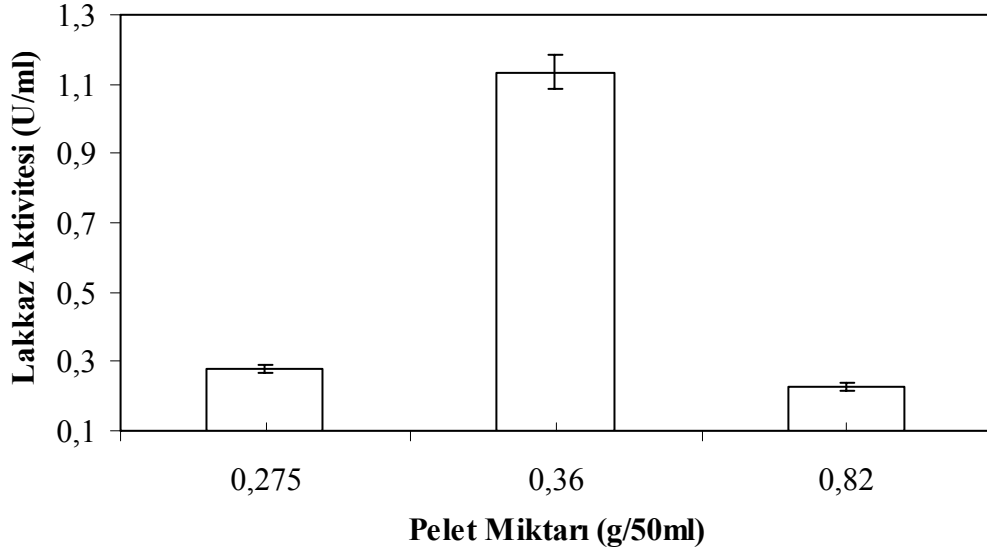
Bölüm 3.2'de belirtildiği gibi hazırlanan *F. trogii* peletlerinin vinas ortamında kullanımı sırasında lakkaz aktivitesinin en yüksek olduğu koşulun saptanması amacıyla çeşitli koşullar test edildi.

4.2.1.1. Pelet miktarının ve vinas konsantrasyonunun lakkaz üretimine etkisi

Atık su konsantrasyonu ve pelet miktarının etkisinin test edildiği çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda 50 ml vinas içeren erlenlere kuru ağırlığı 0.275, 0.36 ve 0.82 g olacak şekilde *F. trogii* peletleri eklendi ve 30° C, 150 rpm'de 24 saat inkübe edildi. Çalışma sonucu elde edilen değerler Şekil 4.1-4.4'de verildi.

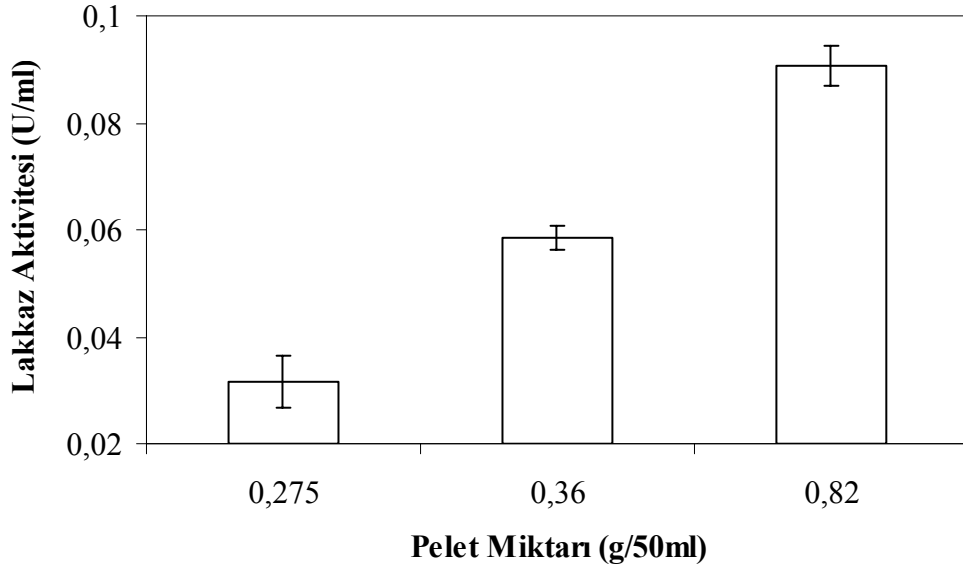


Şekil 4.1. *F. trogii* peletlerinin %10'luk vinas ortamında lakkaz aktivitesi

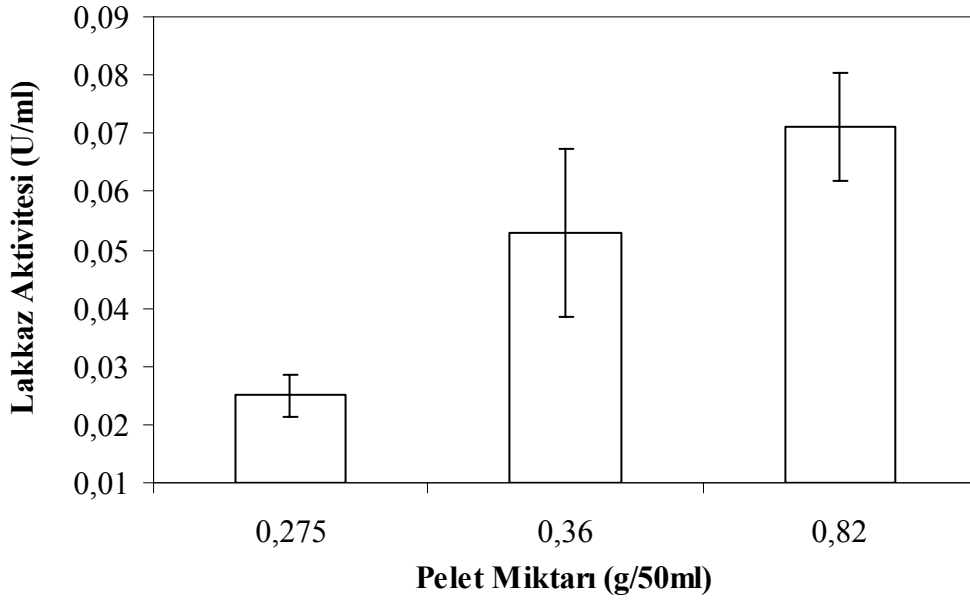


Şekil 4.2. *F. trogii* peletlerinin %25'lik vinas ortamında lakkaz aktivitesi

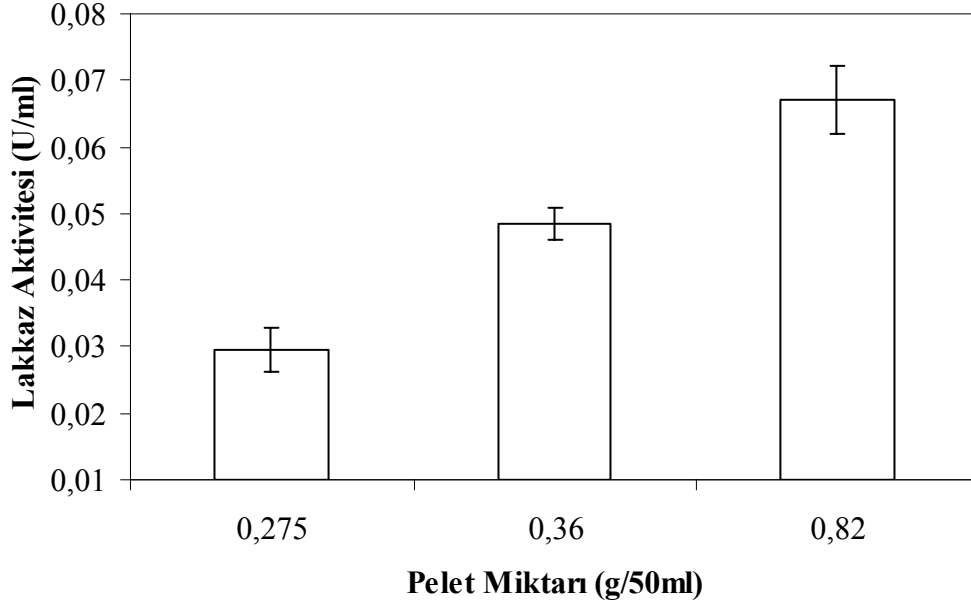
En yüksek lakkaz aktivitesi %25'lik vinas ortamında, 0.36 g pelet kullanılan çalışmalarda elde edildi. Diğer konsantrasyonlar için ise 0.82 g kuru pelet kullanılması durumunda yüksek lakkaz aktivitesi saptandı.



Şekil 4.3. *F. trogii* peletlerinin %50'lik vinas ortamında lakkaz aktivitesi



Şekil 4.4. *F. trogii* peletlerinin %75'lik vinas ortamında lakkaz aktivitesi



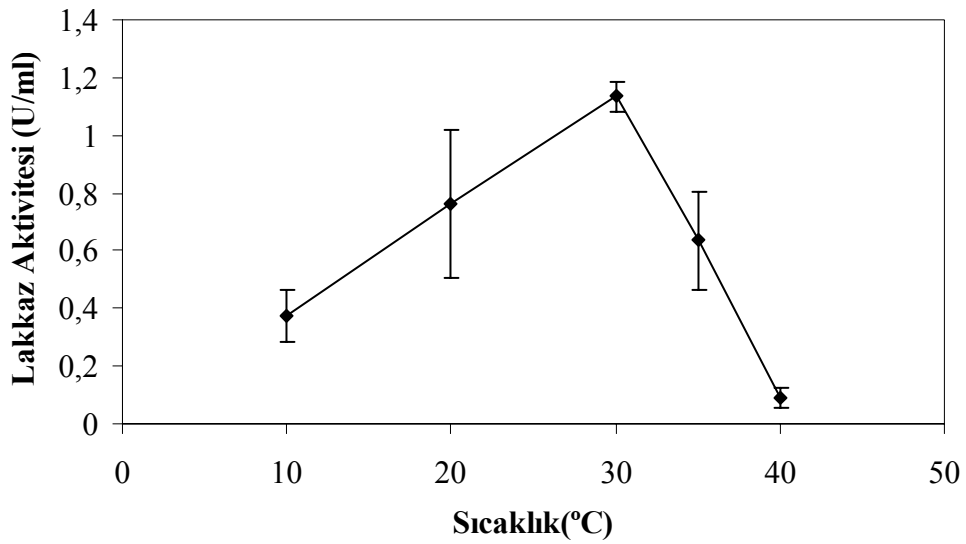
Şekil 4.5. *F. troglia* peletlerinin %100'lük vinas ortamında lakkaz aktivitesi

Sulandırım yapılmamış vinasın peletler üzerine yaptığı toksik etkiden dolayı enzim aktiviteleri diğer konsantrasyonlara göre çok daha düşük çıktı (Şekil 4.5).

Bu çalışma sonucunda en yüksek lakkaz aktivitesi %25'lik atık su ve 0.36 g pelet kullanıldığı durumda elde edildi. Bundan sonraki çalışmalarda, %25'lik atık su konsantrasyonu ve 0.36 g pelet kullanıldı.

4.2.1.2. Sıcaklığın vinas ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

Pelet miktarı ve atık su konsantrasyonu belirlendikten sonra 0.36 g pelet, %25'lik vinas ortamına eklendi ve farklı sıcaklıklarda 150 rpm'de inkübe edildi. Yirmidört saat inkübasyon süresi sonrasında lakkaz aktivitesi belirlendi.

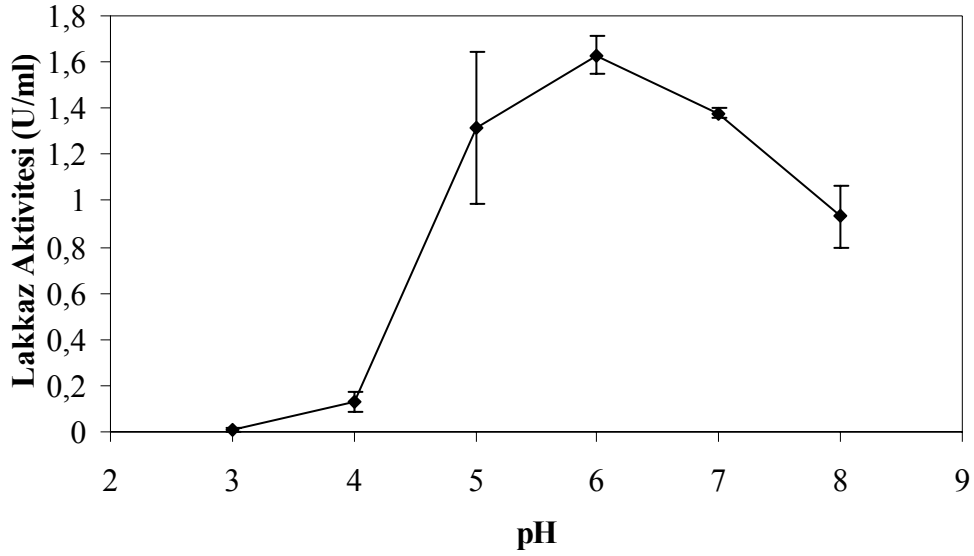


Şekil 4.6. Sıcaklığın vinas ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

Çalışma sonucunda en yüksek lakkaz aktivitesi 30°C'de elde edildi ve sonraki çalışmalarda inkübasyon sıcaklığı olarak 30°C kullanıldı (Şekil 4.6).

4.2.1.3. Vinasın başlangıç pH'sının *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

Başlangıç pH'sının lakkaz üretimine etkisini tespit etmek amacıyla %25'lik vinas besiyerinin pH'sı 3-8'e ayarlanmış ve pelet eklendikten sonra, 30°C ve 150 rpm'de inkübe edildi. Şekil 4.7'de de görüldüğü gibi pH 5-7 arasında yüksek lakkaz aktivitesi saptandı.



Şekil 4.7. Başlangıç pH'sının vinas ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

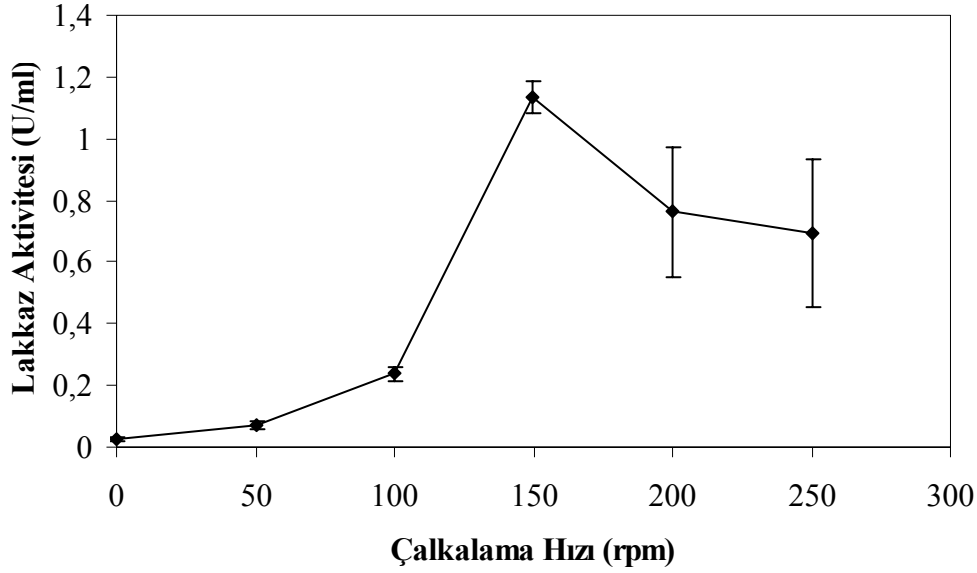
Çalışma sırasında 24 saatlik inkübasyon sonrası pH değişimi de izlendi ve sonuçlar Çizelge 4.3'de verildi. pH 3-6 aralığında fungusla muamele sonucu pH değerlerinde artış meydana gelirken, pH değeri 7 ve 8'e ayarlanmış vinasın pH'sı hafif bir şekilde düştü.

Çizelge 4.2. Farklı başlangıç pH'larındaki vinas ortamlarının *F. trogii* peletlerinin uygulanması sonrası pH değişimi

Başlangıç pH'sı	Uygulama sonrası pH
3.00	3.49
4.00	4.79
5.00	5.75
6.00	6.42
7.00	6.70
8.00	6.80

4.2.1.4. alkalama hızının vinas ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

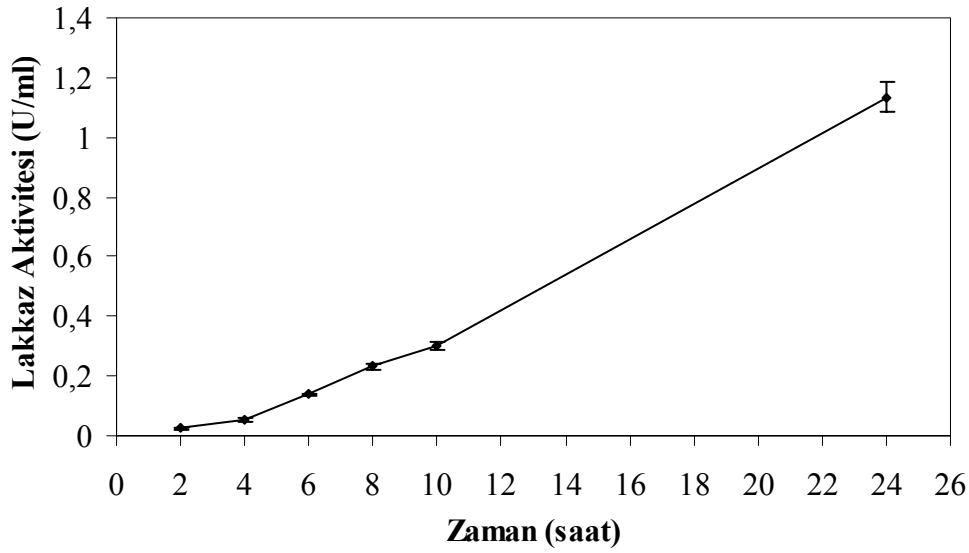
Farklı alkalama hızlarına ayarlanmış etüvlerde *F. trogii* peletlerinin %25'lik vinas ortamında elde edilen lakkaz aktiviteleri test edildi ve en yüksek aktivite 150 rpm'de saptandı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. alkalama hızının vinas ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

4.2.1.5. Vinas ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi

Uygun atık su konsantrasyonu, pelet miktarı, çalkalama hızı ve inkübasyon sıcaklığı belirlendikten sonra lakkazın 24 saatlik inkübasyon süresi içerisinde maksimum üretildiği zaman aralığını saptamak amacıyla Bölüm 3.4.5'de belirtildiği şekilde çalışma kuruldu.



Şekil 4.9. Vinas ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi

Kültürlerden, 2'şer saatlik zaman aralıklarında steril şekilde örnek alındı. İlk 10 saat içerisinde enzim aktivitesi artışı yavaş olurken 10. saatle 24. saat arasındaki 12 saatlik zaman diliminde hızlı bir artış oldu ve 24. saatte maksimuma ulaştı (Şekil 4.9).

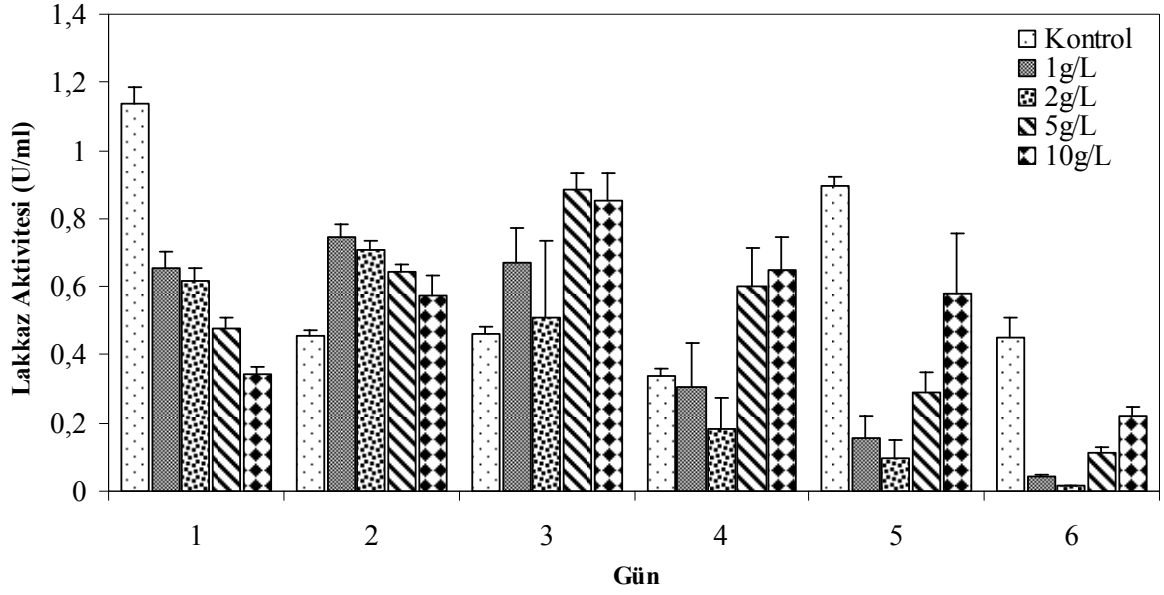
4.3. Vinas Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde *F. trogii* Peletlerinin Lakkaz Üretimine Ek Kaynakların Etkisi

Optimum koşullar tespit edildikten sonra %25'lik vinase ortamına ayrı ayrı glikoz, maya özütü, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve peynir altı suyu eklenerek Bölüm 3.5'de belirtildiği gibi tekrarlı kesikli çalışmalar yapıldı.

4.3.1. Vinas ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine glikozun etkisi

Karbon ve enerji kaynağı olarak 1, 2, 5 ve 10 g/L olacak şekilde glikoz vinase ortamına eklenerek optimum koşullarda tekrarlı kesikli çalışma yapıldı. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular Şekil 4.10'da verildi. 1. günde kontrolün aktivitesi glikoz eklenen kültürlerden daha yüksek iken, 5 ve 10 g/L olacak şekilde glikoz eklenmiş çalışmalarda 2.,

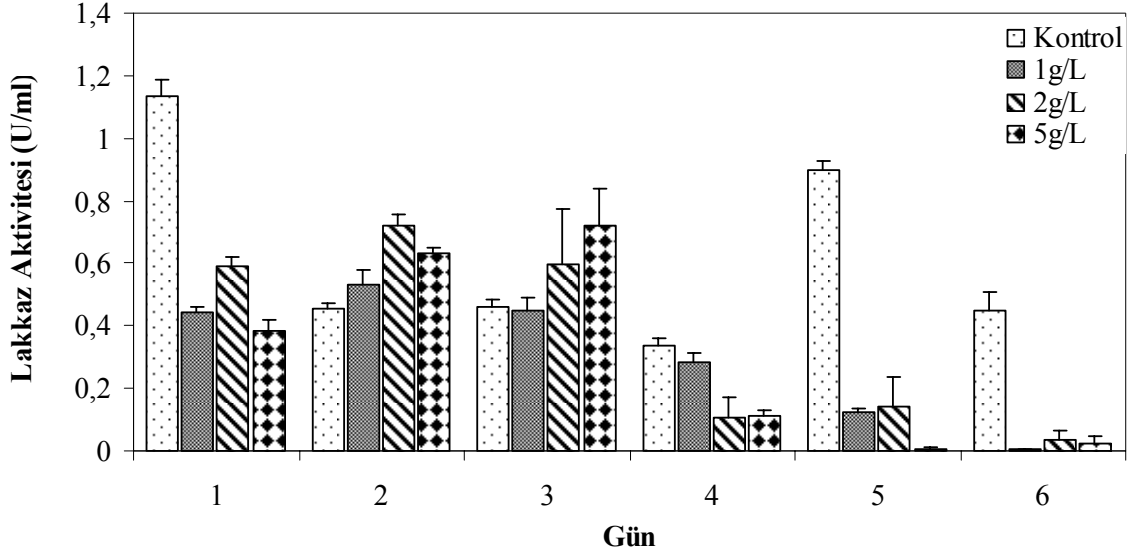
3. ve 4. günde kontrole kıyasla enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.10. Glikoz eklenmiş vinas ortamında *F. troglit* peletlerinin lakkaz üretimi

4.3.2. Vinas ortamında *F. troglit* peletlerinin lakkaz üretimine maya özütünün etkisi

Karbon, enerji ve azot kaynağı olarak maya özütünün kullanıldığı çalışmalarda %25'lik vinas ortamında son konsantrasyon 1, 2 ve 5 g/L olacak şekilde maya özütü eklendi. Yapılan tekrarlı kesikli çalışmalar sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.11'de gösterildi.

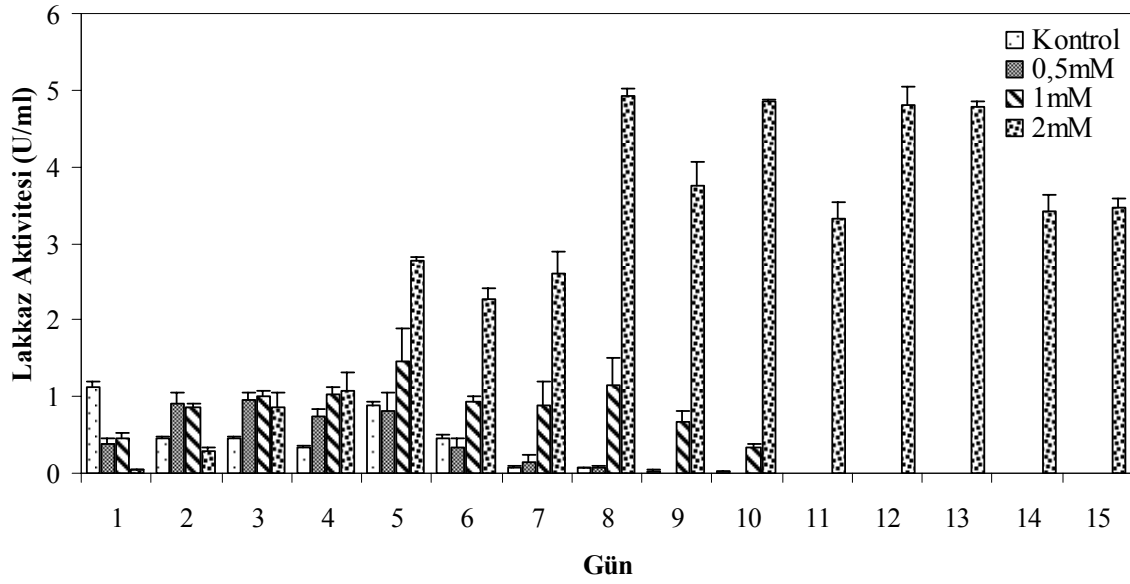


Şekil 4.11. Maya özütü eklenmiş vinas ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi

Maya özütünün eklenmesi 1. günde lakkaz üretimi üzerinde pozitif bir etki yapmazken, 2. ve 3. günlerde 2 g/L ve 5 g/L olacak şekilde maya özütü eklenmiş ortamlarda lakkaz aktivitesi kontrole göre daha yüksek bulundu.

4.3.3. Vinas ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine bakırın etkisi

F. trogii'nin lakkaz üretim yeteneğine bakırın etkisini test etmek amacıyla %25'lik vinas ortamına 0.5, 1.0 ve 2.0 mM bakır eklenerek tekrarlı kesikli çalışmalar yapıldı. Çalışmalardan elde edilen bulgular Şekil 4.12'de gösterildi.

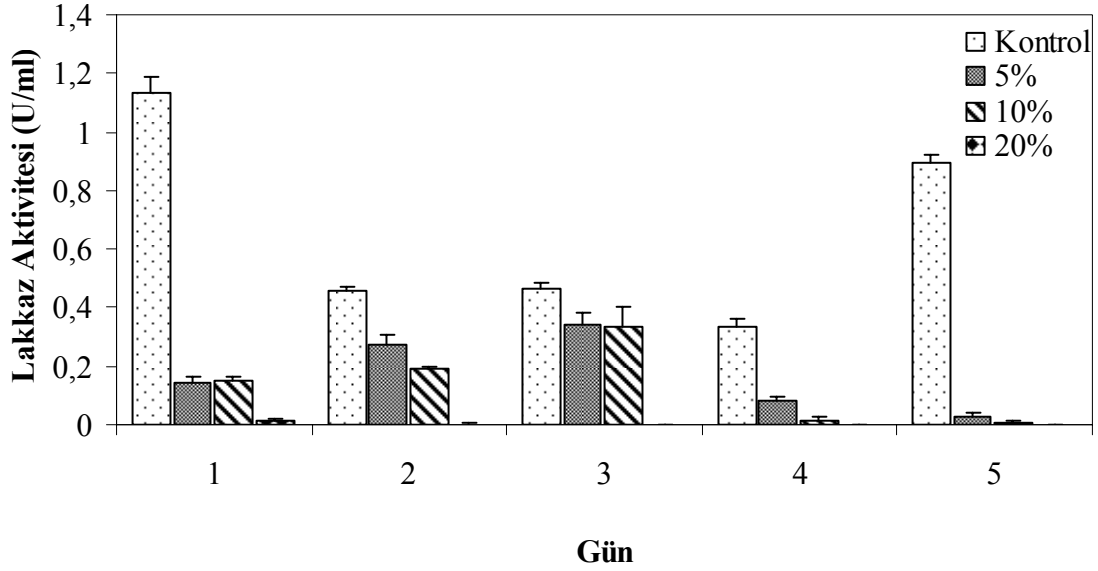


Şekil 4.12. Bakır eklenmiş vinas ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi

Şekil 4.12'den de görüldüğü gibi bakır ilavesi fungusun lakkaz üretim yeteneğini pozitif etkilemiştir. Özellikle 2 mM bakır eklenmesi hem lakkaz üretimini hem de üretim süresi ve verimini olumlu etkilemiş ve uzun süreli 5 U/ml civarında enzim aktivitesi elde edildi.

4.3.4. Vinas ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine peynir altı suyunun etkisi

Benzer şekilde %25 vinas ortamına %5, %10 ve %20 olacak şekilde peynir altı suyu eklendi ve tekrarlı kesikli çalışmalar yürütüldü. Elde edilen bulgular Şekil 4.13'de verildi.



Şekil 4.13. Peynir altı suyu eklenmiş vinas ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

Peynir altı suyunun, *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine pozitif bir etki yapmadığı hatta enzim üretimini baskıladığı gözlemlendi.

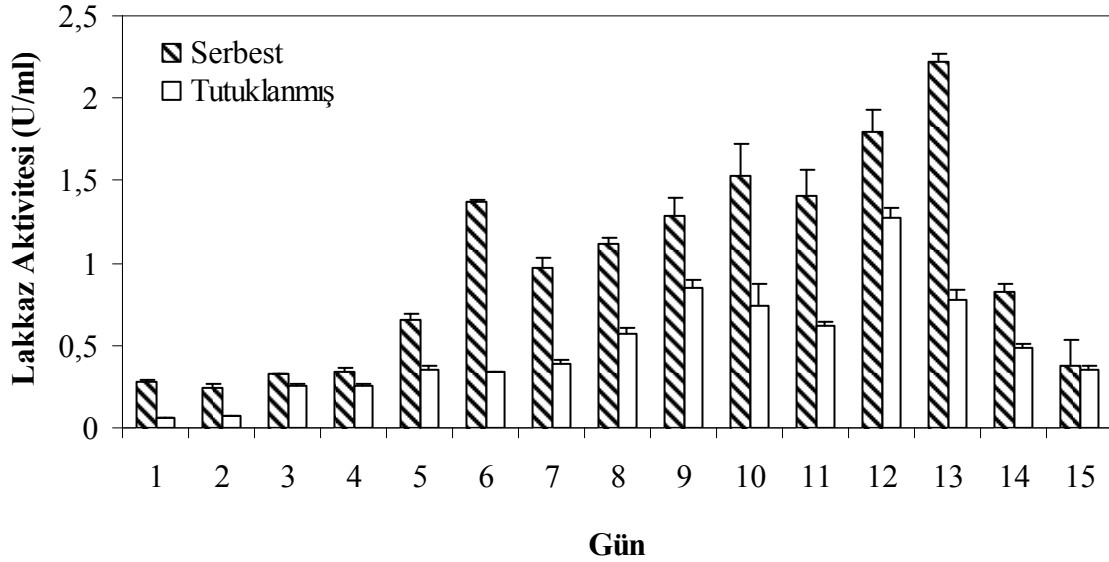
4.4. Farklı Ajanlara Tutuklanmış *F. trogii*'nin Vinas Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde Kullanımı

Fungus peletlerinin tekrarlı kesikli çalışmalarda kullanım sayısını artırmaya yönelik planlanan çalışmalar, fungusların çeşitli ajanlara tutuklanarak kullanılmasını kapsamaktadır. Bu amaçla fungus peletleri aljinat jele, aktif karbona ve lignoselülozlu madde olarak da çam kozalağına tutuklanarak atık su ortamlarına alındı ve tekrarlı kesikli süreçte lakkaz aktivitesi saptandı.

4.4.1. Aljinat jele tutuklanmış *F. trogii*'nin vinas ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı

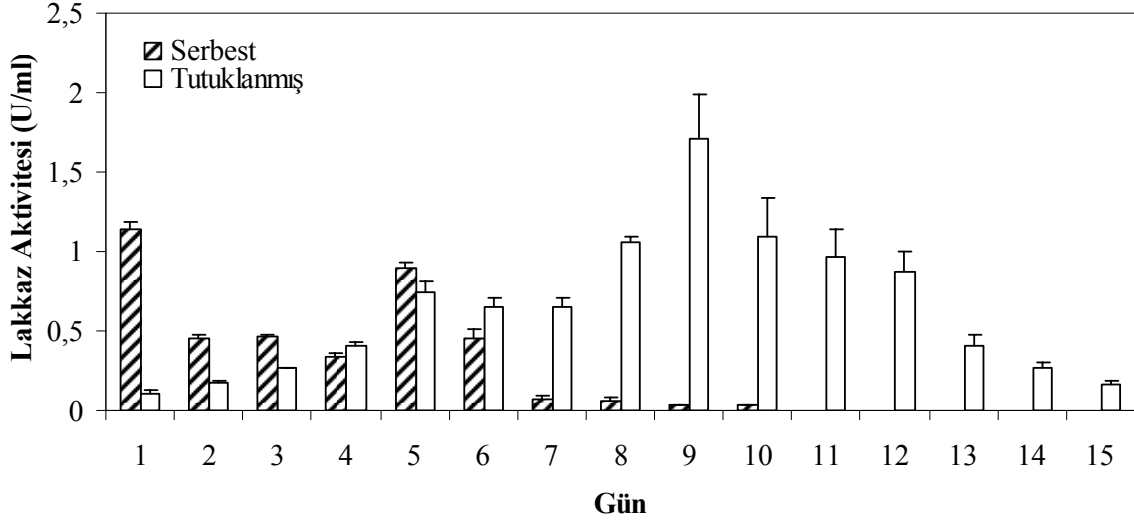
Bölüm 3.9.1'de belirtildiği gibi hazırlanan aljinat jele tutuklanan fungus hücreleri 10 g (123 adet tutuklanmış hücre), 20 g (235 adet tutuklanmış hücre) ve 30 g (346 adet

tutuklanmış hücre) olacak şekilde test ortamlarına eklendi ve lakkaz aktivitesi değişimi incelendi. 10 g tutuklanmış hücre kullanılan çalışmalarda tutuklamanın enzim aktivitesini pozitif etkilemediği serbest hücrelerin aktivitesinin daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 4.14).

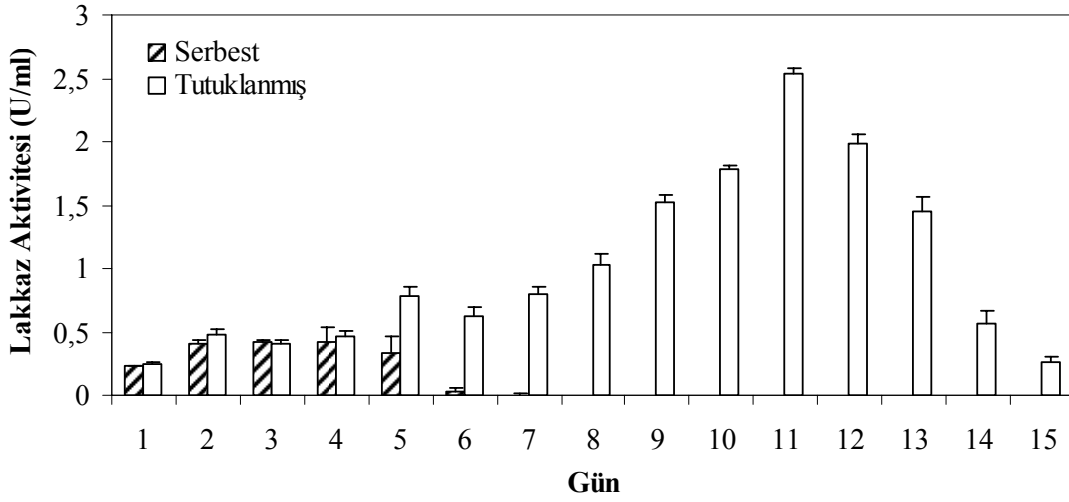


Şekil 4.14. Aljinat jele tutuklanmış *F. trogii* hücrelerinin (10 g) vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Tutuklanmış 20 g hücre kullanılan çalışmalarda enzim aktivitesi ilk 4 gün düşük çıkarken, 12. günde enzim aktivitesi maksimum olmuş ve daha sonra günlere bağlı olarak enzim aktivitesinde azalış kaydedildi. Tutuklanmış hücreler, serbest hücrelere göre daha uzun süre kullanılabilir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Aljinat jele tutuklanmış *F. trogii* hücrelerinin (20 g) vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi



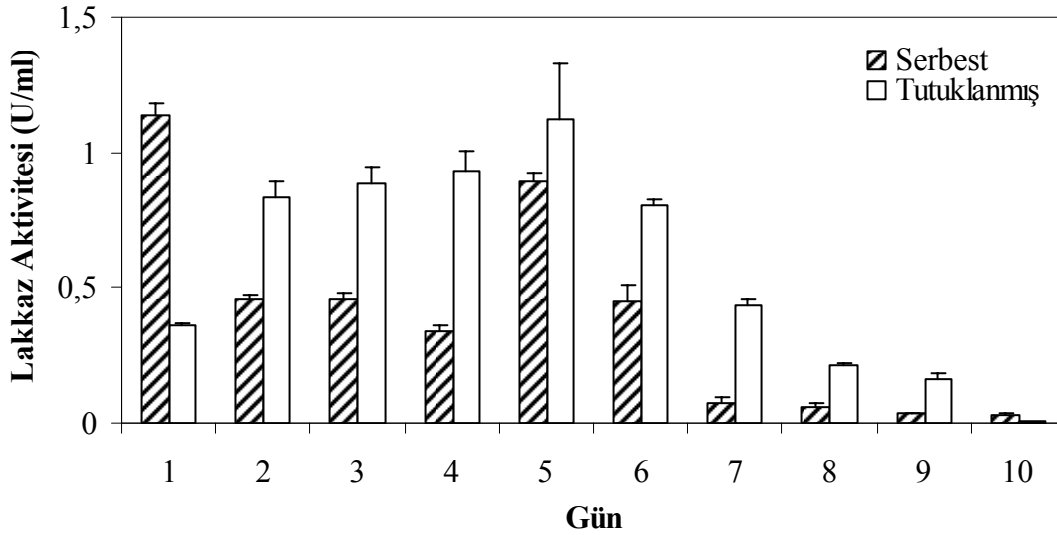
Şekil 4.16. Aljinat jele tutuklanmış *F. trogii* hücrelerinin (30 g) vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Daha yüksek miktarda (30 g) tutuklanmış hücre kullanılan çalışmalarda ilk 4 gün süresince tutuklanmış hücre kültürlerinin lakkaz aktivitesi kontrol gruplarıyla benzer saptandı. Özellikle 5. günden sonra tutuklamanın pozitif etkisi gözlemlendi ve serbest hücreler 7 gün süresince kullanılırken tutuklanmış hücreler 15 gün süresince kullanıldı. En yüksek

enzim aktivitesi 11. günde 2.53 U/ml olarak elde edildi. 11. günden sonra enzim aktivitesinde azalış meydana geldi (Şekil 4.16).

4.4.2. Aktif karbona tutuklanmış *F. trogii*'nin vinas ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı

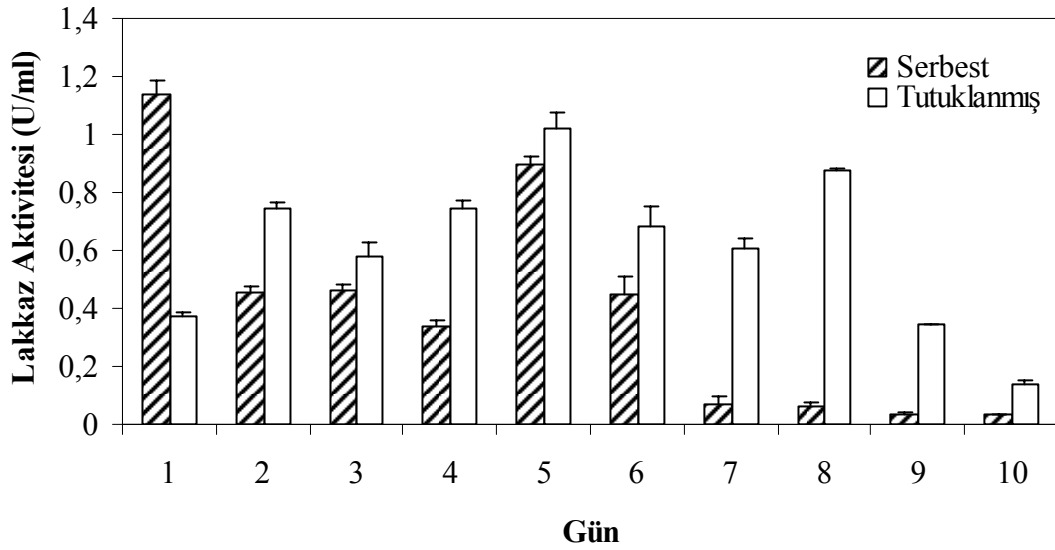
Hücrelerin tekrarlı kullanım sayılarını artırmak için yapılan tutuklama çalışmalarında diğer bir tutuklama ajanı olarak aktif karbon kullanıldı. *F. trogii*, Bölüm 3.9.2'de belirtildiği gibi tutuklanmış ve tutuklanmamış funguslar atık sularla muamele edildi. Çalışma, 10 gün süresince sürdürüldü ve elde edilen veriler Şekil 4.17'de gösterildi. Tutuklanmış *F. trogii* hücrelerinin lakkaz aktivitesi ilk gün kontrolden düşük çıkarken takip eden günlerde enzim aktivitesi pozitif etkilenmiştir.



Şekil 4.17. Aktif karbona tutuklanmış *F. trogii* peletlerinin vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

4.4.3. Çam kozalağına tutuklanmış *F. trogii*'nin vinas ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı

Fungusu tutuklamada kullanılan bir diğer tutuklama ajanı lignoselülozlu madde olarak tercih edilen çam kozalağıdır. Bölüm 3.9.3'de belirtildiği gibi hazırlanan hücreler çam kozalaklarına tutuklandı ve %25'lik vinas ortamlarına eklenerek tekrarlı kesikli çalışma yapıldı. Çalışma 10 gün süresince devam ettirilmiş ve bu süreçte lakkaz aktivitesi belirlendi. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular Şekil 4.18'de ifade edildi.



Şekil 4.18. Çam kozalağına tutuklanmış *F. trogii* peletlerinin vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Serbest hücrelerin lakkaz aktivitesi 1. günde tutuklanmış hücrelerden yüksek saptanırken, 2. günden sonra serbest hücrelerin lakkaz aktivitesi azaldı ve tutuklanmış hücrelerde daha yüksek miktarda ve uzun süre lakkaz elde edildi.

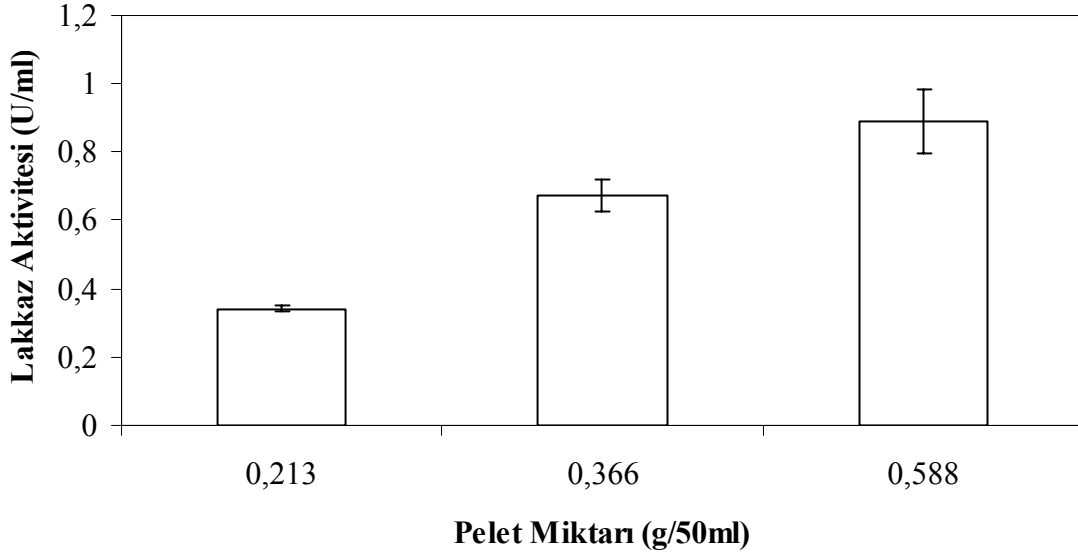
4.5. Fungus Peletlerinin Lakkaz Üretimini Optimizasyonu

4.5.1. Vinas ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimini optimizasyonu

Bölüm 3.2’de belirtildiği gibi hazırlanan *T. versicolor* peletlerinin vinas ortamında kullanılarak lakkaz aktivitesinin en yüksek olduğu koşulun saptanması amaçlandı ve bu amaçla çeşitli koşullar test edildi.

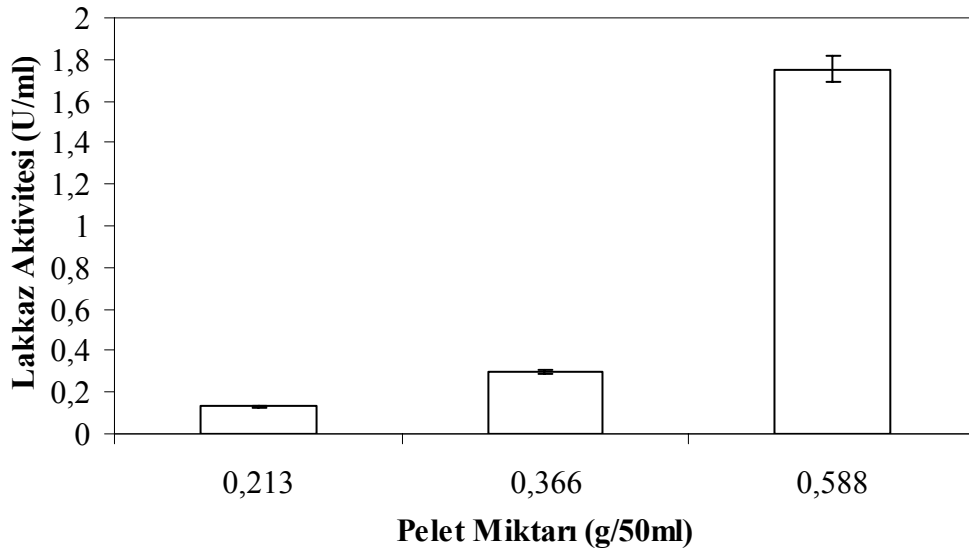
4.5.1.1. Pelet miktarı ve vinas konsantrasyonunun lakkaz üretimine etkisi

Atık su konsantrasyonunun optimizasyonu çalışmasında vinas %10, %25, %50, %75 ve %100’lük olacak şekilde hazırlandı ve Bölüm 3.2’de belirtildiği gibi hazırlanan fungus peletleri kuru ağırlıkları 0.213, 0.366 ve 0.588 g/ 50 ml vinas olacak şekilde ortamlara eklendi. Fungus peletleri 30°C ve 150 rpm’de 24 saat inkübe edildi.

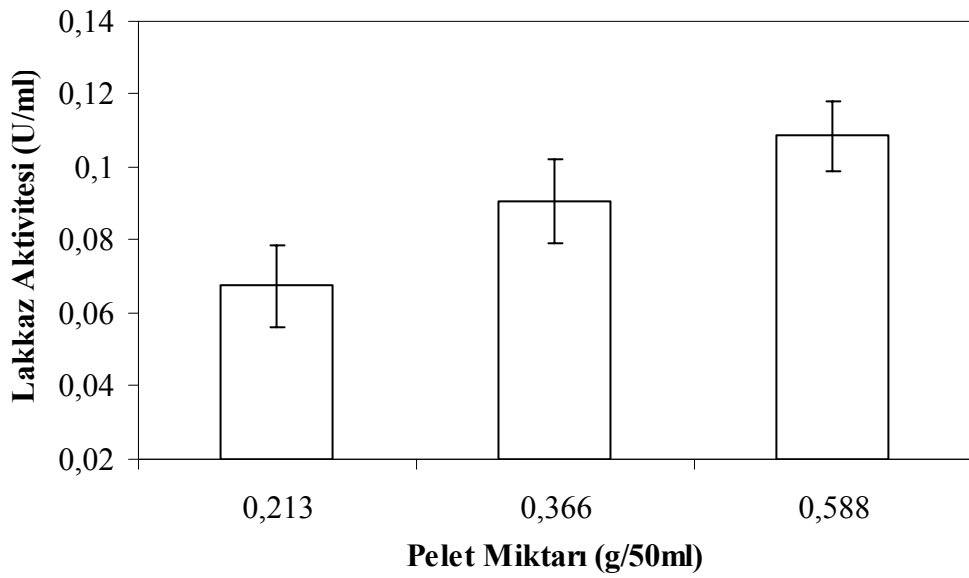


Şekil 4.19. *T. versicolor* peletlerinin %10’luk vinas ortamında lakkaz aktivitesi

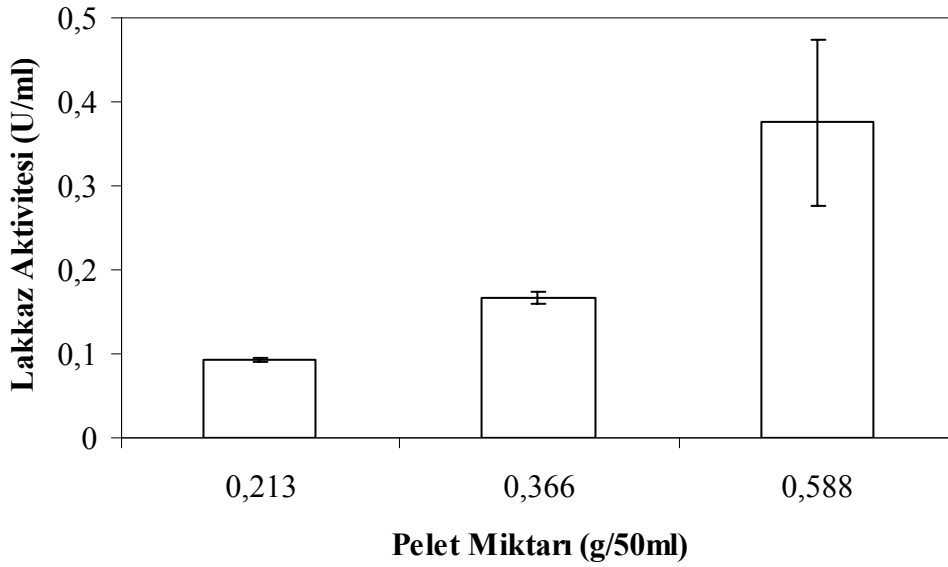
En yüksek enzim aktivitesi %10’luk vinas konsantrasyonunda 0.588 g pelet kullanıldığında saptandı (Şekil 4.19).



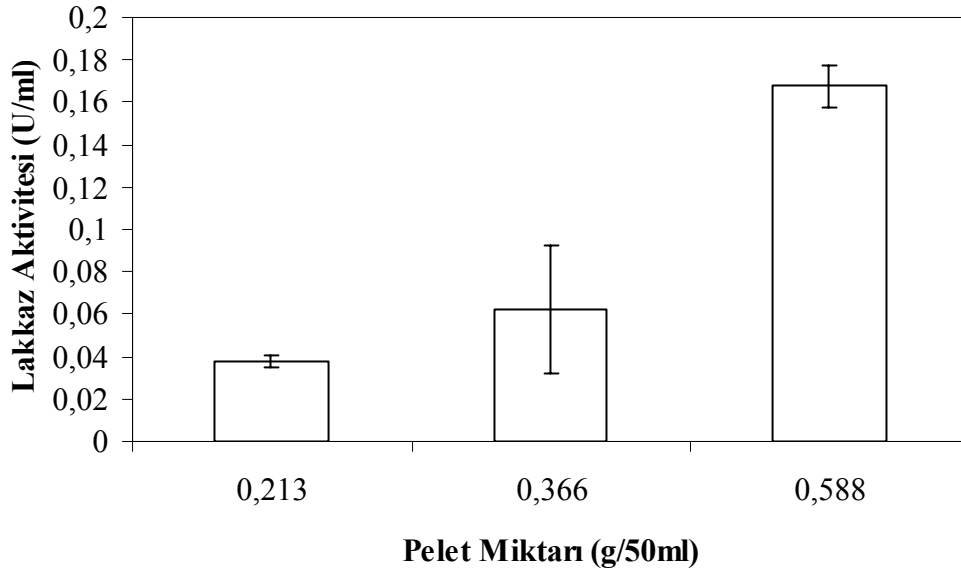
Şekil 4.20. *T. versicolor* peletlerinin %25'lik vinas ortamında lakkaz aktivitesi



Şekil 4.21. *T. versicolor* peletlerinin %50'lik vinas ortamında lakkaz aktivitesi



Şekil 4.22. *T. versicolor* peletlerinin %75'lik vinas ortamında lakkaz aktivitesi

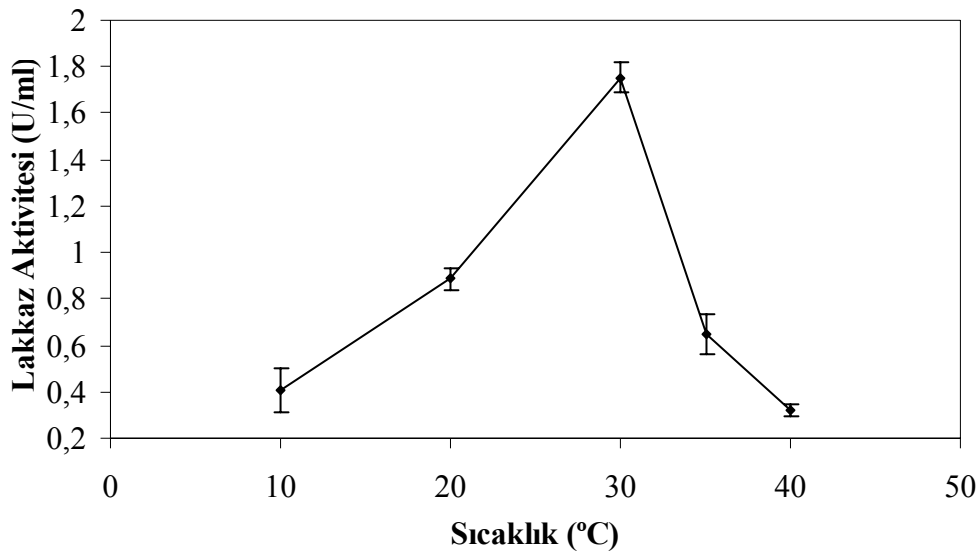


Şekil 4.23. *T. versicolor* peletlerinin %100'lük vinas ortamında lakkaz aktivitesi

Çalışılan tüm konsantrasyonlar dikkate alındığında, en uygun atık su konsantrasyonu %25 ve en uygun pelet miktarı ise 0.588 g olarak saptandı (Şekil 4.20-4.23). Bu nedenle bundan sonraki optimizasyon çalışmalarında %25'lik vinas ve 0.588 g pelet kullanıldı.

4.5.1.2. Sıcaklığın vinas ortamında inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

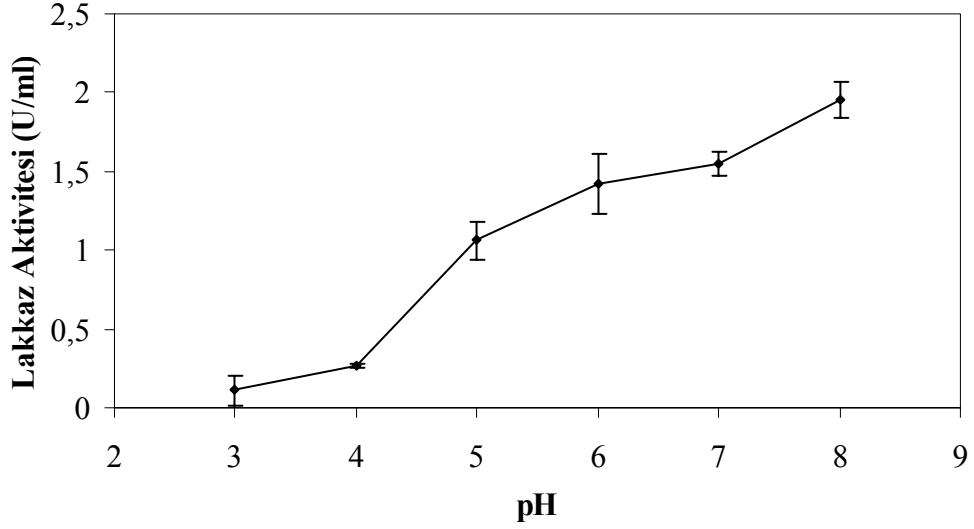
Sıcaklığın, *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine etkisini test etmek amacıyla peletler %25'lik vinas ortamında 10, 20, 30, 35 ve 40°C'de ve 24 saat inkübe edildi. Sonuçlar Şekil 4.24'de verildi. Şekil 4.24'den de görülebileceği gibi en yüksek enzim aktivitesi 30 °C'de 1.75 U/ml olarak bulundu.



Şekil 4.24. Sıcaklığın vinas ortamında inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

4.5.1.3. Vinasın başlangıç pH'sının *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

Farklı pH değerlerinde hazırlanmış % 25'lik vinas ortamlarına *T. versicolor* peletleri 0.588 g olacak şekilde eklenerek 30°C ve 150 rpm'de 24 saat inkübe edildi. pH 5-8 aralığında yüksek lakkaz değerleri elde edilirken en yüksek lakkaz değeri pH 8'de elde edildi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Başlangıç pH'sının vinas ortamında inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

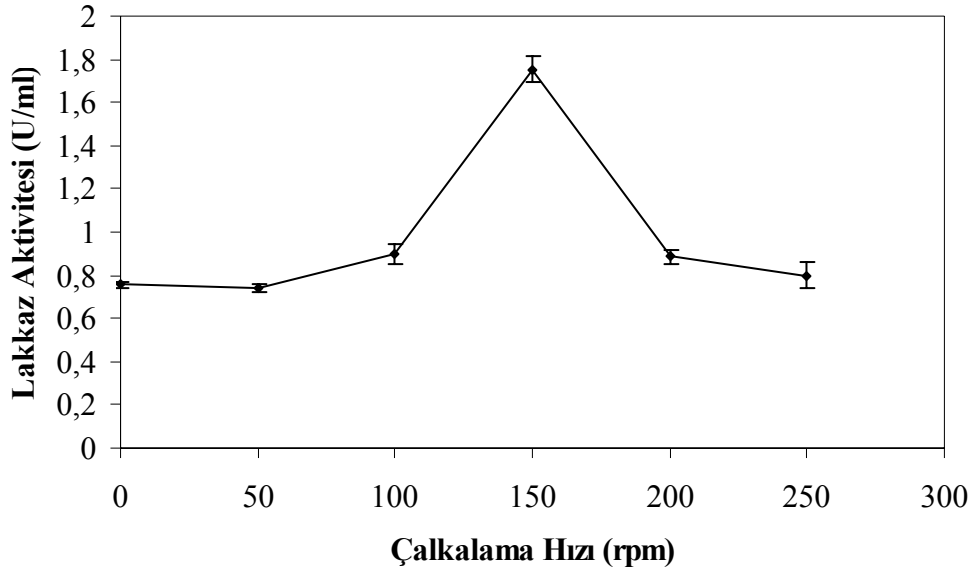
Çizelge 4.3. Farklı başlangıç pH'larındaki vinas ortamlarının *T. versicolor* peletlerinin uygulanması sonrası pH değişimleri

Başlangıç pH	Uygulama sonrası pH
3.00	3.55
4.00	4.23
5.00	5.28
6.00	6.17
7.00	5.92
8.00	6.69

Çalışmada ayrıca inkübasyon sonrası ortamın pH değişimi izlendi (Çizelge 4.4). pH 3-6 aralığında fungusla muamele sonucu pH değerlerinde artış meydana gelirken, pH değeri 7 ve 8'e ayarlanmış vinasın pH'sı düşmüştür. Sonuçlar, pH değişimine bağlı olarak lakkaz üretiminin pH 5-8 arasında arttığını göstermektedir.

4.5.1.4. alkalama hızının vinas ortamında inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

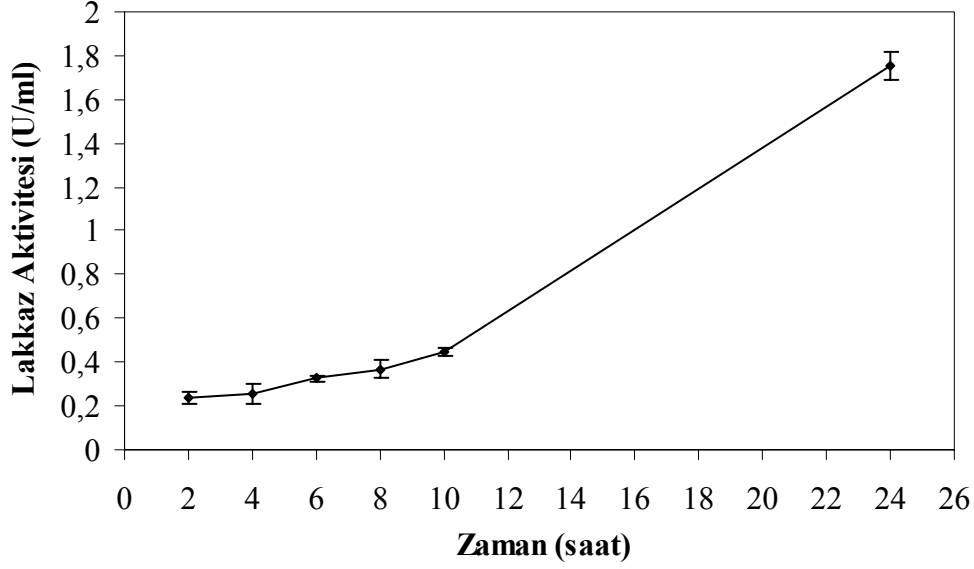
alkalama hızının % 25'lik vinas ortamında *T. versicolor*'un lakkaz üretimine etkisini belirlemek amacıyla 0-250 rpm'de çalışmalar yürütüldü. Lakkaz aktivitesi 150 rpm çalkalama hızında 1.75 U/ml olarak saptandı (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. alkalama hızının vinas ortamında inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

4.5.1.5. Vinas ortamında inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi

Vinas ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi için en uygun atık su konsantrasyonu, pelet miktarı, çalkalama hızı ve inkübasyon sıcaklığı belirlendikten sonra zamana bağlı lakkaz üretimi test edildi. Çalışma Bölüm 3.4.5'de belirtildiği şekilde yapıldı.



Şekil 4.27. Vinas ortamında inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi

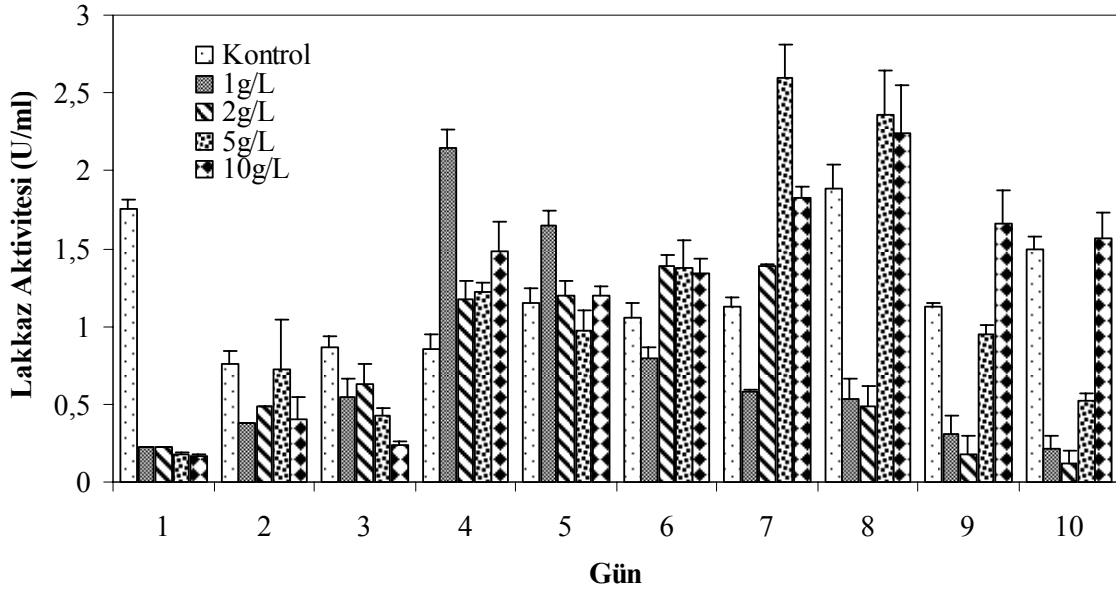
Kültürün lakkaz aktivitesi 2'şer saatlik zaman aralıklarında belirlendi. Enzim aktivitesindeki artış ilk 10 saatte yavaş olurken 24. saatte yüksek enzim değeri elde edildi (Şekil 4.27).

4.6. Vinas Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde *T. versicolor* Peletlerinin Lakkaz Üretimine Ek Kaynakların Etkisi

Vinas ortamları çeşitli karbon, enerji ve diğer ek kaynaklarla zenginleştirilerek bu kaynakların lakkaz üretimine etkisi araştırıldı. Çalışmada glikoz, maya özütü ve peynir altı suyunun peletlerin lakkaz üretim verimine etkisi araştırıldı ve ayrıca bakırın etkisinin incelenmesi amacıyla besiyerlerine bakır kaynağı olarak $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ eklendi.

4.6.1. Vinas ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine glikozun etkisi

Farklı konsantrasyonlarda glikoz (1, 2, 5 ve 10 g/L son konsantrasyon) eklenmiş besiyerlerinde *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretim verimi test edildi. Çalışmalar bu fungusun optimum koşullarında yürütüldü.



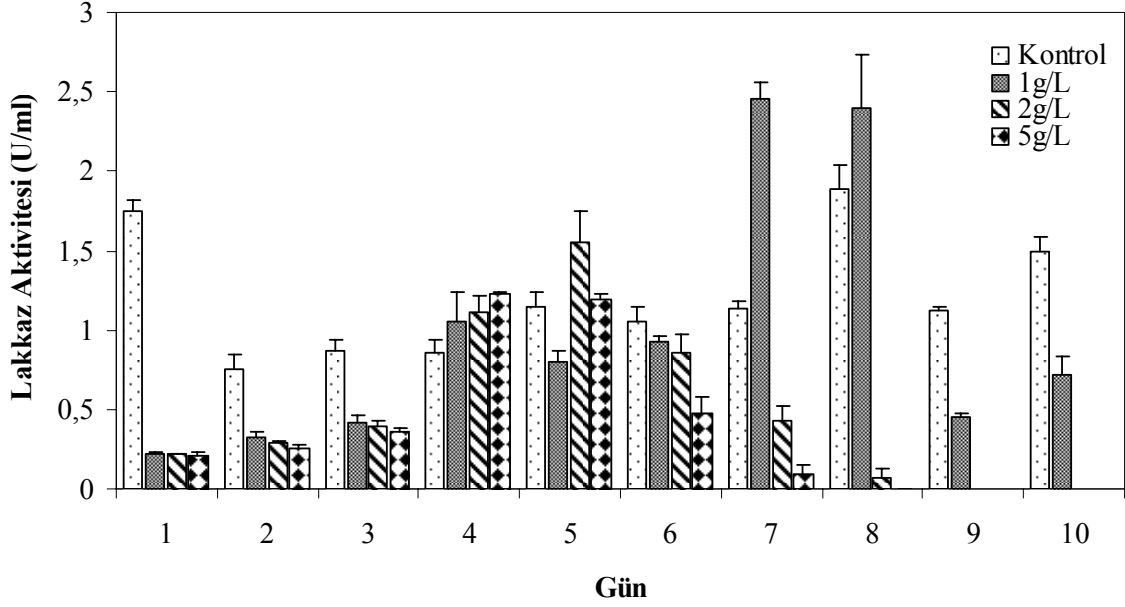
Şekil 4.28. Glikoz eklenmiş vinas ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi

Kontrol gruplarının lakkaz aktivitesi 0.75-1.88 U/ml arasında elde edilirken, 1g/L olacak şekilde glikoz eklenen ortamlarda 0.20- 2.14 U/ml arasında elde edildi. 5 g/L glikoz bulunan ortamda 7-8. günlere kadar enzim aktivitesinde artış gözlemlendi ve 8. günden sonra enzim aktivitesinde azalma kaydedildi. 10 g/L glikoz eklenmiş kültürlerde ise ilk günlerde düşük aktivite izlenirken, 4. günden 10. güne kadar kontrole göre daha yüksek aktivite gözlemlendi (Şekil 4.28).

4.6.2. Vinas ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine maya özütünün etkisi

Maya özütü iyi bir karbon, enerji ve azot kaynağıdır. Bu açıdan, *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretim yeteneği üzerine maya özütünün etkisi test edildi. Bu amaçla

maya özütü son konsantrasyonda 1, 2 ve 5 g/L olacak şekilde besiyerine eklenmiş ve *T. versicolor* peletleri ile %25'lik vinas ortamında çalışma yürütüldü.

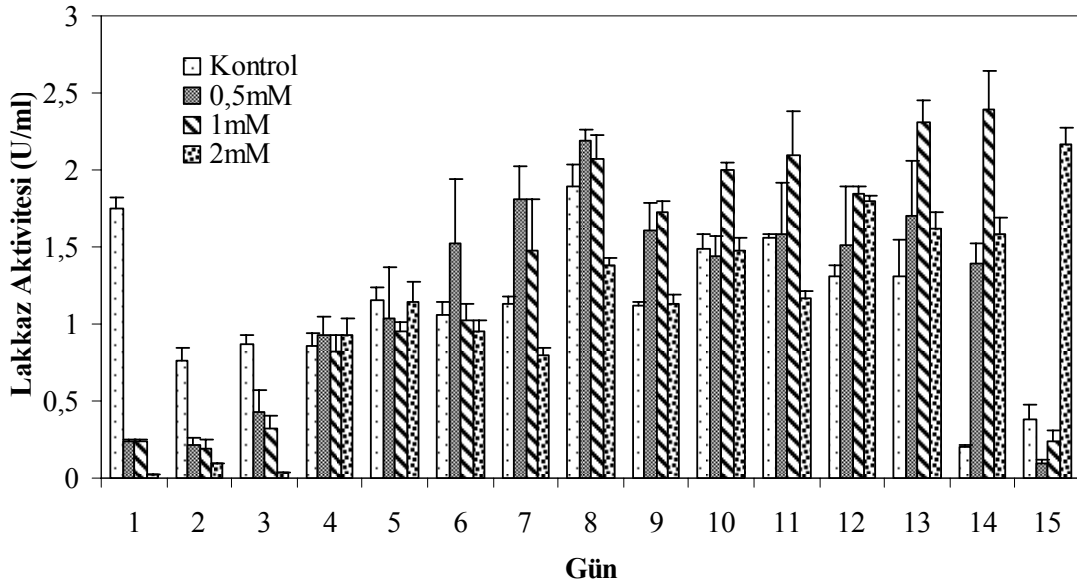


Şekil 4.29. Maya özütü eklenmiş vinas ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi

Şekil 4.29'dan da izlenebileceği gibi 1 g/L maya özütü içeren kültürlerin enzim aktivitesi 7. ve 8. günlerde kontrole göre çok daha yüksek çıkmıştır (7. gün de 2.46 U/ml ve 8. günde 2.39 U/ml). 2 ve 5 g/L maya özütü içeren kültürlerde 4. ve 5. günlerde kontrole göre daha yüksek aktivite saptanmış fakat ilerleyen günlerde pozitif etki devam etmemiştir.

4.6.3. Vinas ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine bakırın etkisi

T. versicolor peletlerinin lakkaz üretim yeteneğini indüklemek ve üretim süresini artırmak için bakırın etkisinin araştırıldığı çalışmalarda %25'lik vinas ortamı son konsantrasyonda 0.5, 1.0 ve 2.0 mM bakır içerecek şekilde hazırlandı ve peletlerin üretim yeteneği ve verimi araştırıldı.

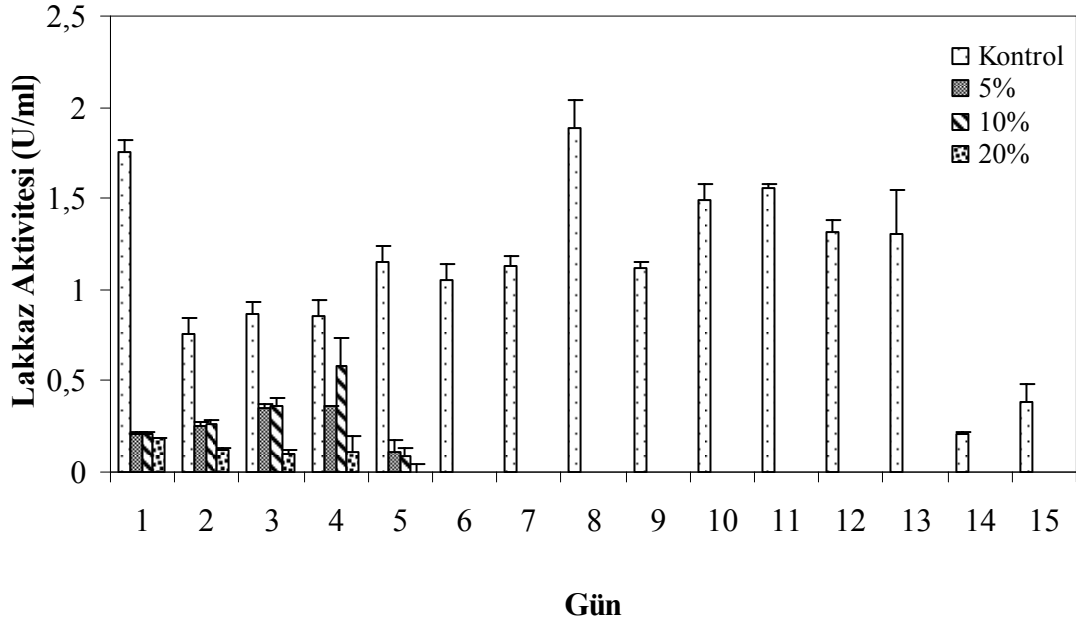


Şekil 4.30. Bakır eklenmiş vinas ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi

Bu çalışmada özellikle pelet kullanımının ilerleyen günlerinde, 5. günden sonra, peletlerin lakkaz üretim yeteneği bakırın etkisiyle yüksek oranda indüklenmiştir. Yine 13. günden sonra bakır içermeyen kültürlerin lakkaz üretimi hızla düşerken bakır içeren kültürlerin (2.0 mM bakır) enzim üretim yeteneği devam etmiştir (Şekil 4.30).

4.6.4. Vinas ortamında *T.versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine peynir altı suyunun etkisi

Peyniraltı suyunun lakkaz üretimine etkisinin test edildiği çalışmalar Bölüm 3.7.4'de belirtildiği şekilde hazırlandı.



Şekil 4.31. Peynir altı suyu eklenmiş vinas ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi

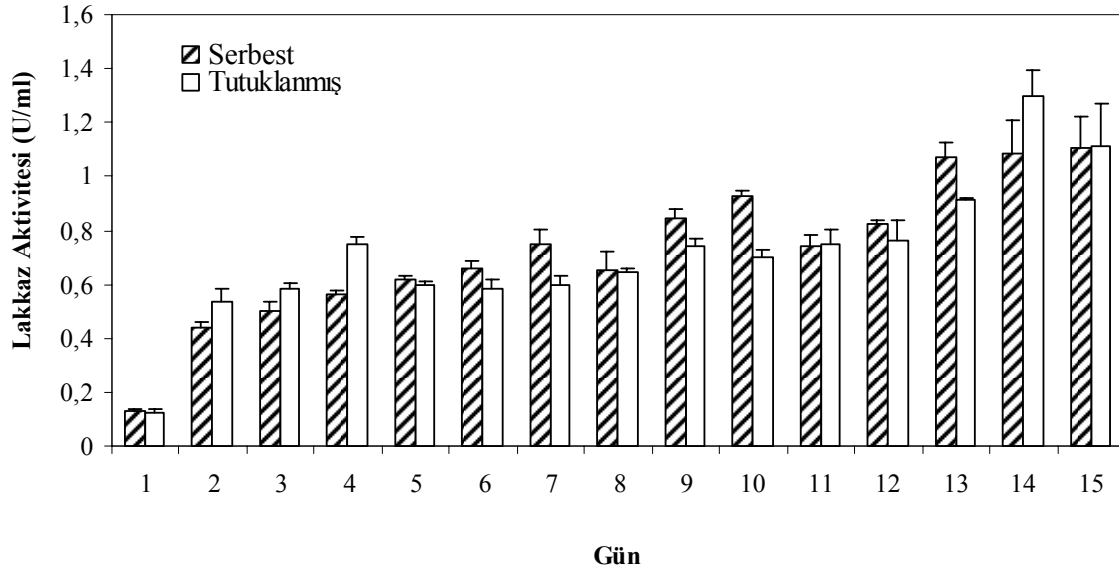
Sonuçlar, %5, %10 ve %20 olacak şekilde peynir altı suyu içeren %25'lik vinas ortamlarında lakkaz üretim yeteneğinin indüklenmediğini tam tersi baskılandığını ve üretim veriminin düştüğünü göstermiştir (Şekil 4.31).

4.7. Farklı Ajanlara Tutuklanmış *T. versicolor*'un Vinas Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde Kullanımı

T. versicolor'un %25'lik vinas ortamında tekrarlı kullanım sayısını arttırmak amacıyla funguslar çeşitli ajanlara tutuklanarak kullanıldı. Tutuklama ajanı olarak kullanılan aljinat jel, aktif karbon ve çam kozalağına tutuklama işlemleri Bölüm 3.9'da belirtildiği gibi yapıldı.

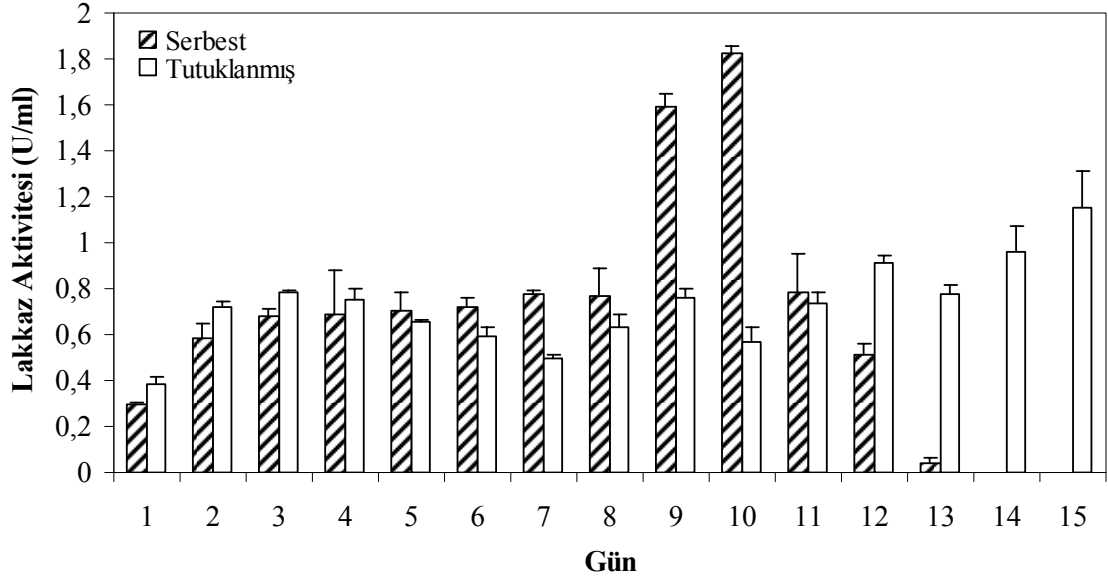
4.7.1. Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor*'un vinas ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı

T. versicolor hücreleri Bölüm 3.9.1'de belirtildiği şekilde aljinat jele tutuklandıktan sonra 10 g'a karşılık gelen 111 adet tutuklanmış hücre %25'lik vinas ortamına eklendi ve tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretim verimi araştırıldı. Tutuklanmış ve serbest hücrelerin üretim verimi benzer bulundu (Şekil 4.32).

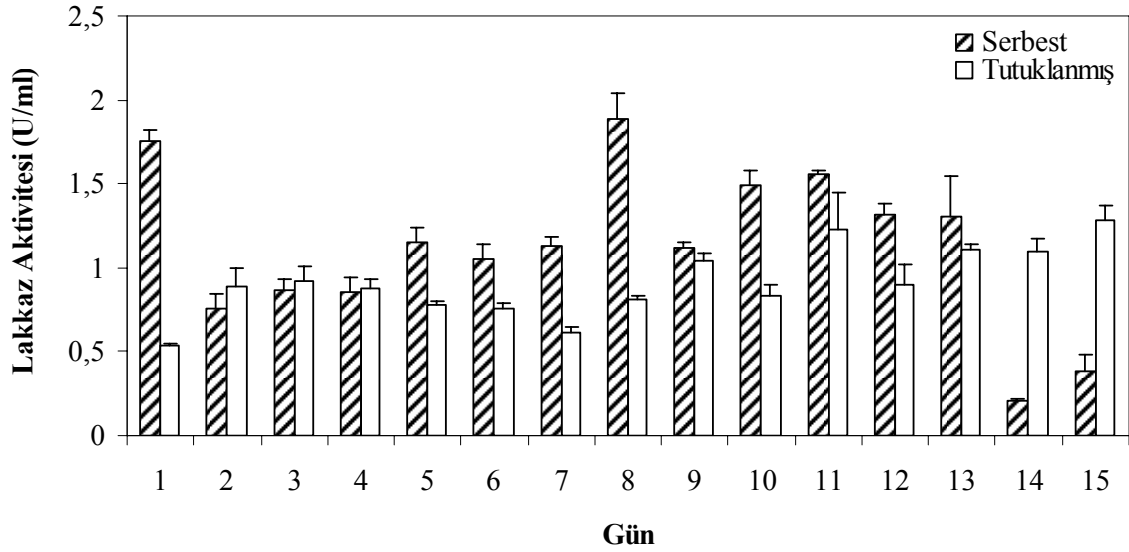


Şekil 4.32. Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor* hücrelerinin (10 g) vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Daha yüksek miktarda tutuklanmış hücre kullanılan çalışmalarda gözlenen en önemli etki, tutuklanmış hücrelerin lakkaz üretim yeteneğinin tutuklanmamış hücrelerden daha uzun süre devam etmesidir (Şekil 4.33 ve 4.34).



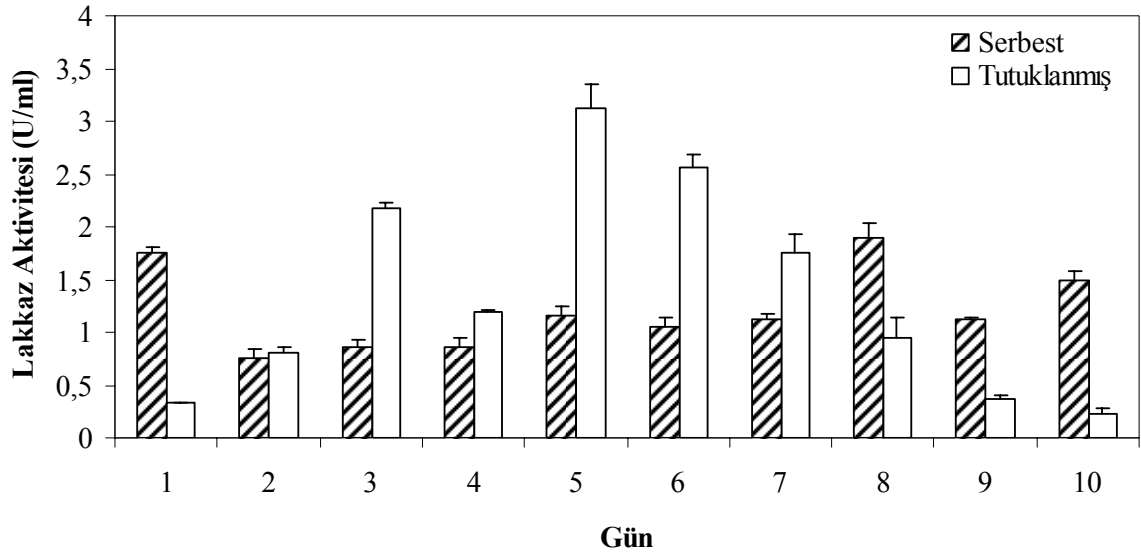
Şekil 4.33. Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor* hücrelerinin (20 g) vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi



Şekil 4.34. Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor* hücrelerinin (30 g) vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

4.7.2. Aktif karbona tutuklanmış *T. versicolor*'un vinas ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı

Aktif karbona tutuklanmış *T. versicolor* hücrelerinin %25'lik vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretim yeteneği araştırıldı.

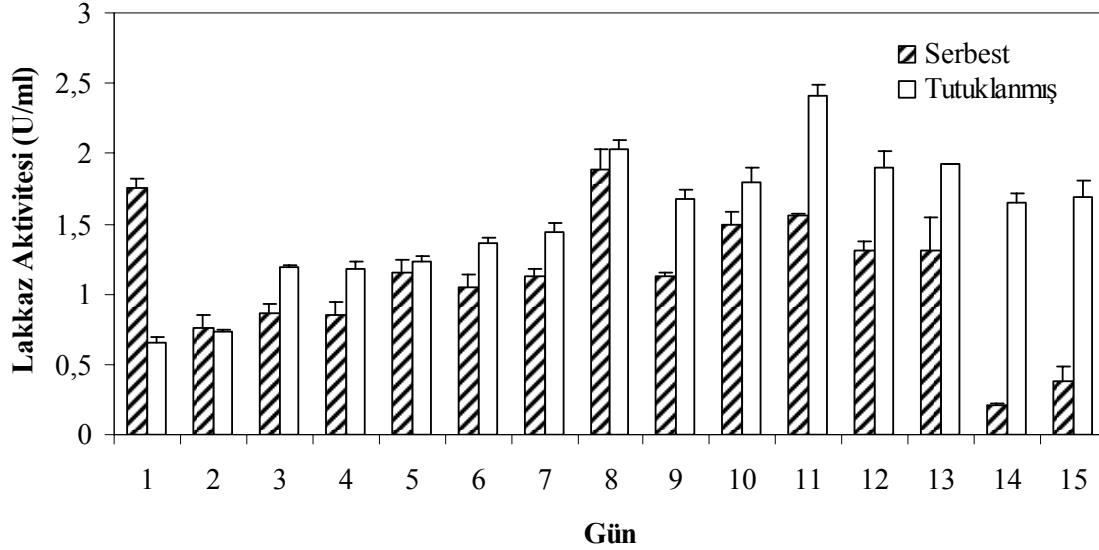


Şekil 4.35. Aktif karbona tutuklanmış *T. versicolor* peletlerinin vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Tutuklanmış fungusların enzim aktivite değerleri serbest hücre (kontrol) değerleriyle karşılaştırıldığında 1. gün kontrolden düşük ve 3. günden itibaren kontrolden daha yüksek değerler bulundu. 5. günde enzim aktivitesi kontrole göre 3 kat daha fazla olurken ve daha sonra enzim aktivitesinde düşüş gözlemlendi ve 8. günden itibaren ise kontrolde enzim aktivitesinin daha yüksek çıktığı bulundu (Şekil 4.35).

4.7.3. Çam kozalağına tutuklanmış *T. versicolor*'un vinas ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı

T. versicolor peletleri Bölüm 3.9.3'de belirtildiği şekilde çam kozalaklarına tutuklandıktan sonra %25'lik vinas ortamlarına alındı ve tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretim yetenekleri test edildi.



Şekil 4.36. Çam kozalağına tutuklanmış *T. versicolor* peletlerinin vinas ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Çam kozalağına tutuklanmış fungusların enzim aktivitesi ilk 2 kullanımdan sonra kontrolden daha yüksek bulundu. 3. kullanımdan itibaren tutuklanmış hücrelerin enzim aktiviteleri tutuklanmamış hücrelerden daha yüksek bulundu (Şekil 4.36).

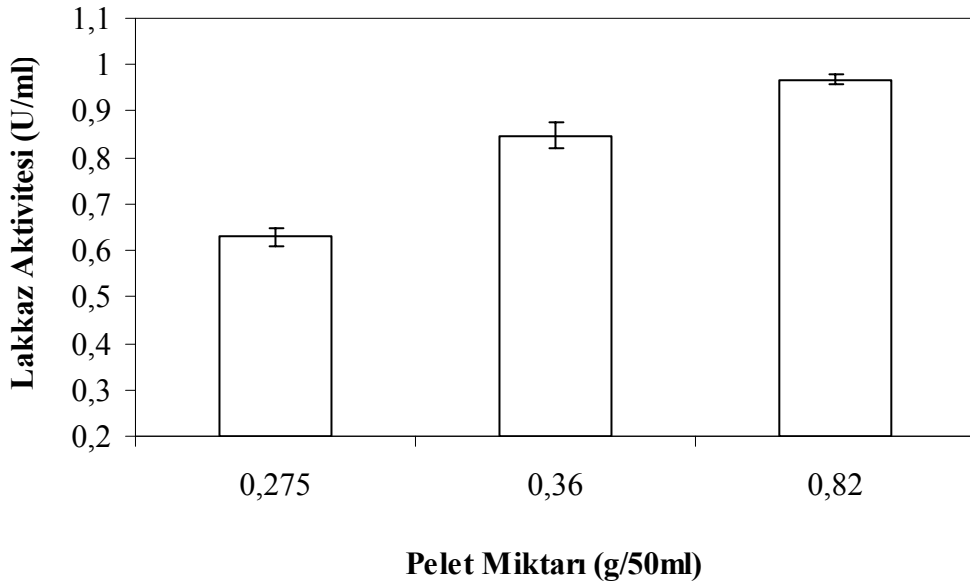
4.8. Fungus Peletlerinin Lakkaz Üretiminin Optimizasyonu

4.8.1. *F. trogii* peletlerinin ZYFA ortamında lakkaz üretiminin optimizasyonu

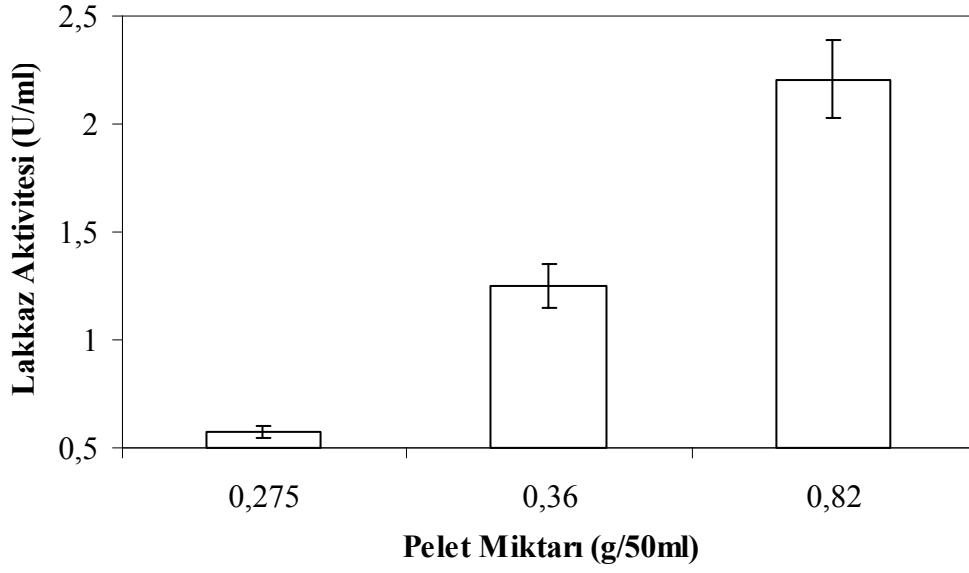
ZYFA ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etki eden çeşitli faktörlerin etkisi test edildi.

4.8.1.1. Pelet miktarının ve ZYFA konsantrasyonunun lakkaz üretimine etkisi

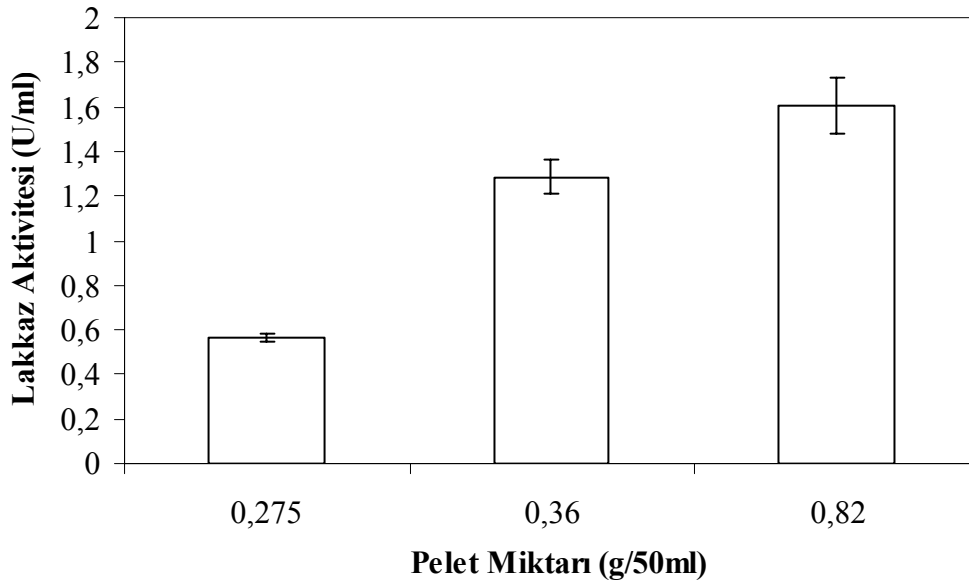
ZYFA'nın %10, %25, %50, %75 ve %100'lük konsantrasyonları 0.275, 0.360 ve 0.820 g olan *F. trogii* peletleriyle muamele edildi ve çalışma sonucunda elde edilen bulgular Şekil 4.37–4.41'de verildi. %25'lik vinas ortamında yüksek enzim aktivitesi elde edildi. Bu çalışmalarda en iyi lakkaz üretimi 0.820 g pelet kullanıldığında elde edildi. Bundan sonraki çalışmalar %25'lik ortamda ve 0.820 g peletle yürütüldü.



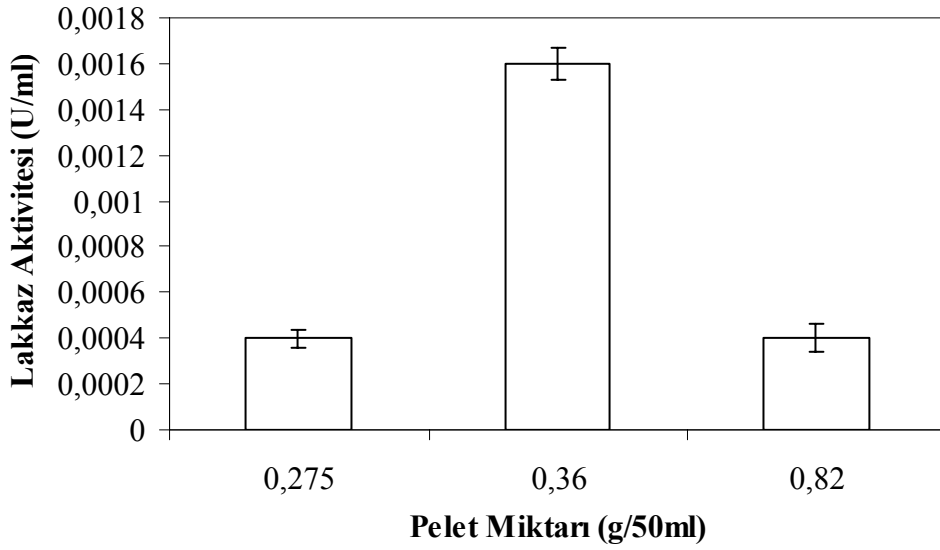
Şekil 4.37. *F. trogii* peletleriyle %10'lük ZYFA ortamında lakkaz üretimi



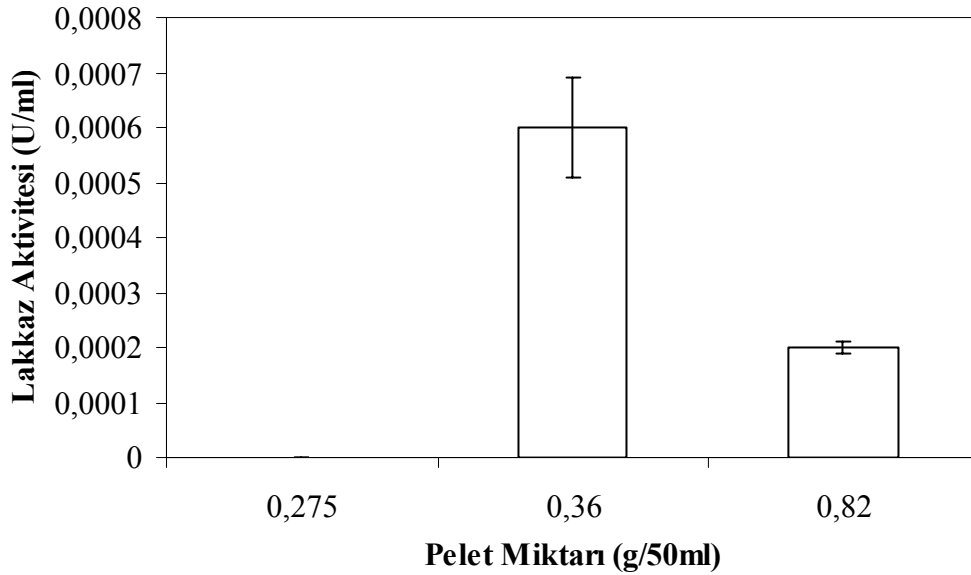
Şekil 4.38. *F. trogii* peletleriyle %25'lik ZYFA ortamında lakkaz üretimi



Şekil 4.39. *F. trogii* peletleriyle %50'lik ZYFA ortamında lakkaz üretimi



Şekil 4.40. *F. trogii* peletleriyle %75'lik ZYFA ortamında lakkaz üretimi

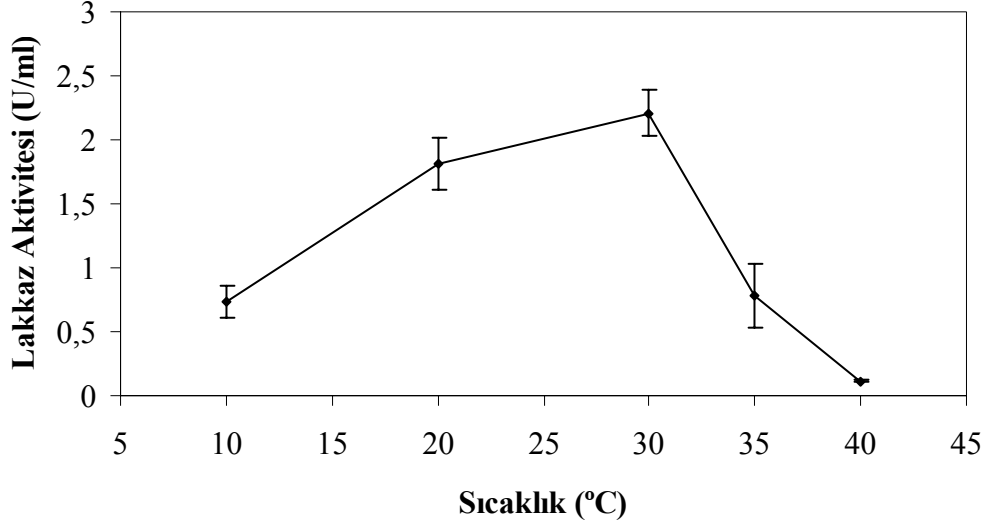


Şekil 4.41. *F. trogii* peletleriyle %100'lük ZYFA ortamında lakkaz üretimi

4.8.1.2. Sıcaklığın ZYFA ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

F. trogii peletlerinin %25'lik ZYFA ortamında inkübasyonu sürecinde sıcaklığın lakkaz üretimine etkisi test edildi. Şekil 4.42'den de görüldüğü gibi sıcaklık derecesi

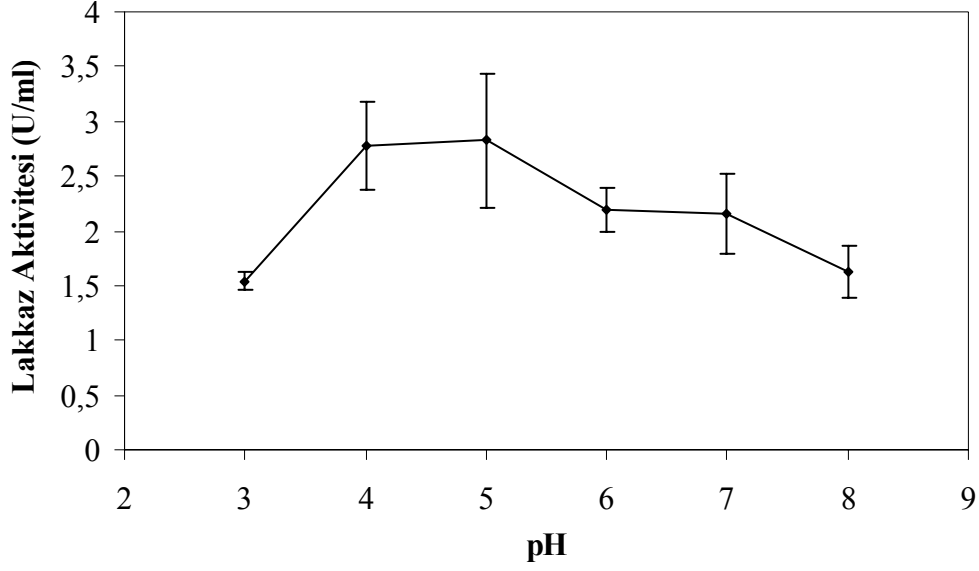
30°C'ye kadar enzim aktivitesinde artış görüldü. Sıcaklık 35°C ve 40°C'de ise enzim aktivitesi azaldı. Bu çalışmada en yüksek enzim aktivitesi 30°C'de saptanırken artan sıcaklıklarda enzim üretimi hızla düşmüştür.



Şekil 4.42. Sıcaklığın ZYFA ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

4.8.1.3. ZYFA'nın başlangıç pH'sının *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

Farklı pH'lardaki %25'lik ZYFA'da yürütülen çalışmalarda pH 4-6 aralığında enzim aktivitesi yüksek olarak saptanırken diğer pH'larda aktivite düşük bulundu (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. Başlangıç pH'sının ZYFA ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

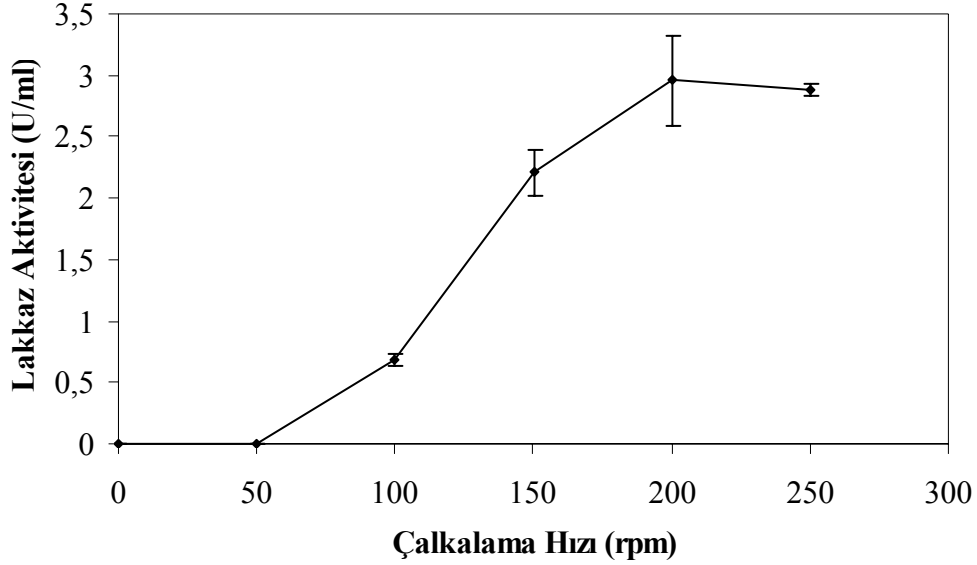
Başlangıç pH'sı Bölüm 3.4.3'de belirtildiği şekilde ayarlanmış %25'lik ZYFA, *F. trogii* peletleriyle 24 saat muamele edildikten sonra, besiyerlerinin pH değişimleri saptandı ve sonuçlar Çizelge 4.5'de verildi. Başlangıç pH'sı 3-6 aralığında olan ZYFA'nın fungusla muamelesi sonucu pH değerlerinde artış meydana gelirken pH değeri 7 ve 8'e ayarlanmış ZYFA kültürlerinin pH değeri düşmüştür.

Çizelge 4.4. Farklı başlangıç pH'larındaki ZYFA ortamlarının *F. trogii* peletlerinin uygulanması sonrası pH değişimi

Başlangıç pH'sı	Uygulama sonrası pH
3.00	3.93
4.00	4.63
5.00	5.45
6.00	6.12
7.00	6.60
8.00	6.79

4.8.1.4. alkalama hızının ZYFA ortamında inkübe edilen *F. trogii*'nin lakkaz üretimine etkisi

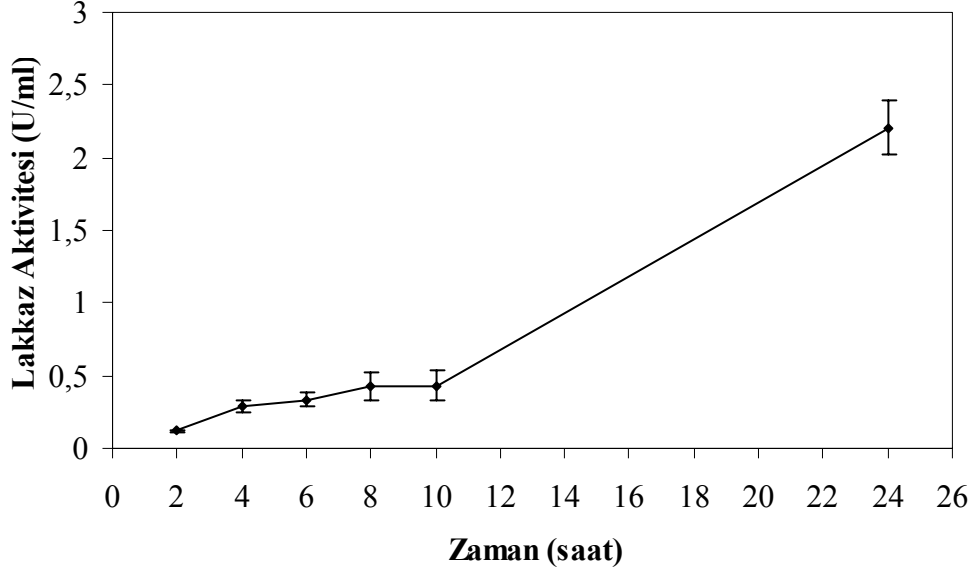
En uygun sıcaklık, pelet miktarı ve ZYFA konsantrasyonu saptandıktan sonra 0-250 rpm çalkalama hızlarında peletlerin lakkaz üretimi araştırıldı.



Şekil 4.44. alkalama hızının ZYFA ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

Statik koşul ve 50 rpm'de %25'lik ZYFA ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletleriyle yeterli lakkaz aktivitesi elde edilemezken, 100 rpm'de lakkaz aktivitesi 0.68 U/ml olarak ve 150, 200, 250 rpm çalkalama hızlarında ise sırasıyla 2.20, 2.95 ve 2.87 U/ml olarak bulundu.

4.8.1.5. ZYFA ortamında inkübe edilen *F. trogii*'nin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi



Şekil 4.45. ZYFA ortamında inkübe edilen *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi

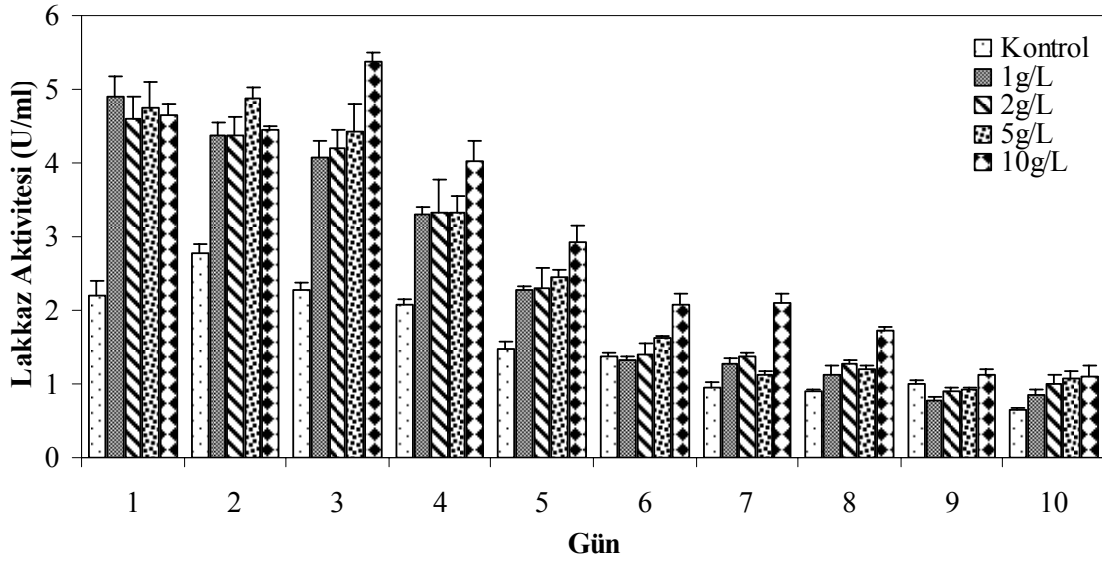
Peletlerin lakkaz üretimi için en uygun zaman aralığının saptanması amacıyla kültürlerden 2'şer saatlik zaman aralıklarında alınan örneklerin lakkaz aktiviteleri ölçüldü ve sonuçlar Şekil 4.45'de grafiklendi. Enzim aktivitesi artışı ilk 10 saatte yavaş olurken 24. saatte yüksek bir değere ulaşmıştır (2.20 U/ml).

4.9. ZYFA Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde *F. trogii* Peletlerinin Lakkaz Üretimine Ek Kaynakların Etkisi

F. trogii'nin lakkaz üretimini indüklemek amacıyla %25'lik ZYFA ortamlarına glikoz, maya özütü ve peynir altı suyu gibi ek kaynaklar eklendi ve ayrıca farklı miktarlarda bakırın tekrarlı kesikli süreçte enzim üretimi üzerine etkisi test edildi.

4.9.1. ZYFA ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine glikozun etkisi

Son konsantrasyonda 1, 2, 5 ve 10 g/L olacak şekilde glikoz eklendi %25'lik ZYFA ortamlarında *F. trogii* peletleri inkübe edildi ve Bölüm 3.5'de belirtildiği şekilde tekrarlı kesikli çalışmalar yapıldı. Çalışma sonucunda elde edilen değerler Şekil 4.46'da verildi.

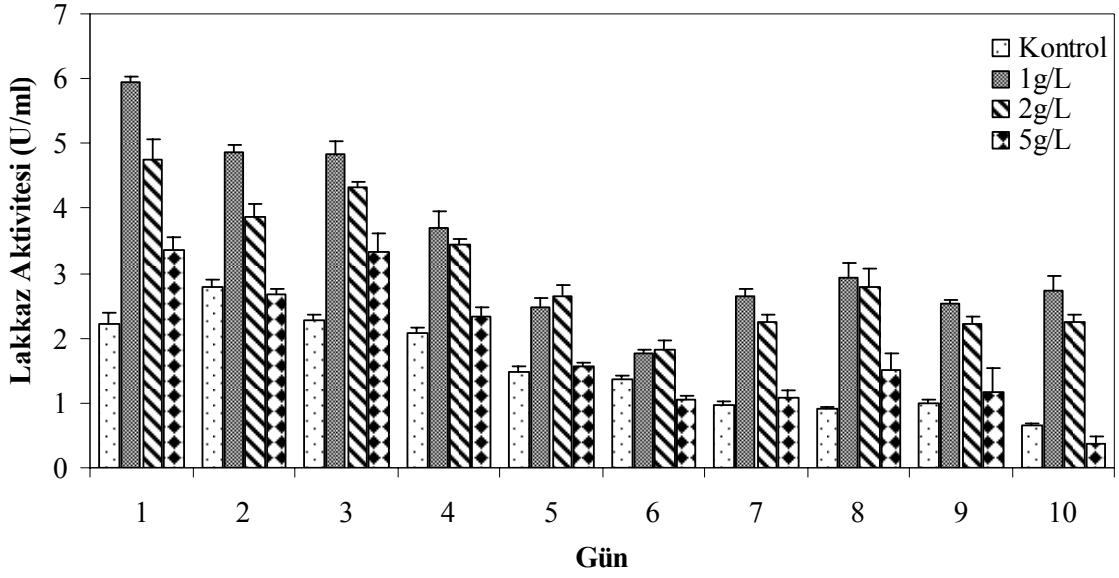


Şekil 4.46. Glikoz eklenmiş ZYFA ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi

Glikoz, hücrelerin enzim üretimine pozitif etki yapmış ve 1 g/L glikoz içeren kültürlerin ilk 4 gün içerisinde enzim aktiviteleri 3-5 U/ml olarak saptandı. Üretim üzerindeki bu pozitif etki çalışmanın yürütüldüğü 10. güne kadar devam etmiştir.

4.9.2. ZYFA ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine maya özütünün etkisi

Karbon, enerji ve azot kaynağı olan maya özütü son konsantrasyonda 1, 2 ve 5g/L olacak şekilde ZYFA ortamına eklenmiş ve tekrarlı kesikli çalışmalar yürütüldü.

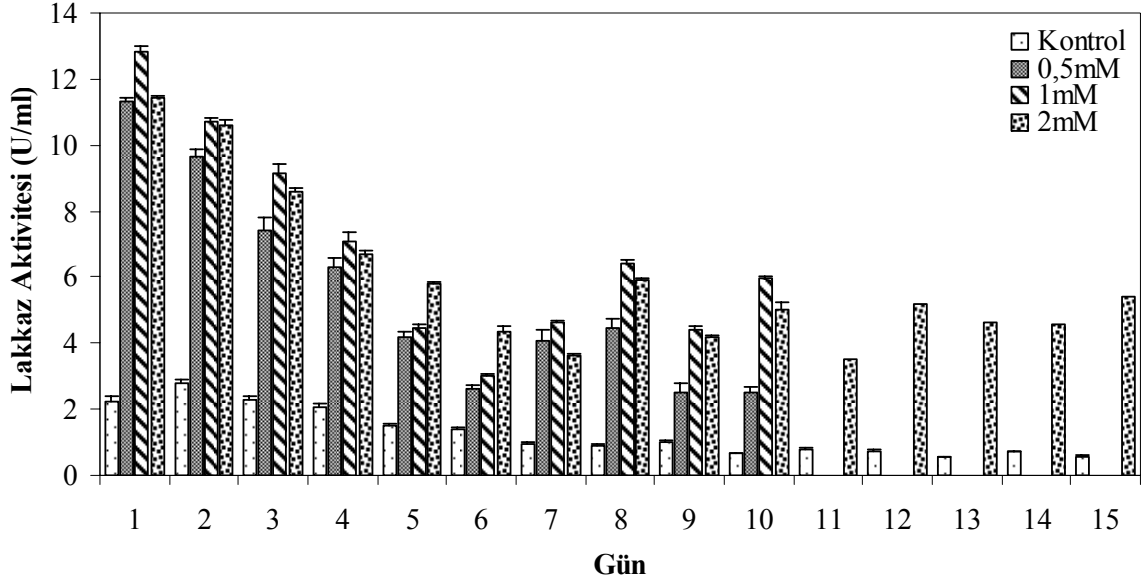


Şekil 4.47. Maya özütü eklenmiş ZYFA ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi

Şekil 4.47’den de görülebileceği gibi 1 g/L maya özütü eklenmiş ZYFA ortamında *F. trogii* peletleriyle yapılan tekrarlı kesikli çalışmada enzim aktivitesi ilk gün, kontrole göre yaklaşık 3 kat yüksek bulundu ve 10 gün süresince enzim aktivitesi kontrolden daha yüksek devam etmiştir. Diğer maya konsantrasyonları için de benzer etki gözlemlendi ve genelde 10 gün süresince lakkaz aktivitesi kontrolden daha yüksek elde edildi.

4.9.3. ZYFA ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine bakırın etkisi

Lakkaz enziminin sentezini indüklemek amacıyla yapılan bir diğer çalışmada ise %25’lik ZYFA ortamına son konsantrasyon 0.5, 1.0 ve 2.0 mM olacak şekilde bakır eklendi ve *F. trogii* peletleriyle tekrarlı kesikli çalışmalar yapıldı.

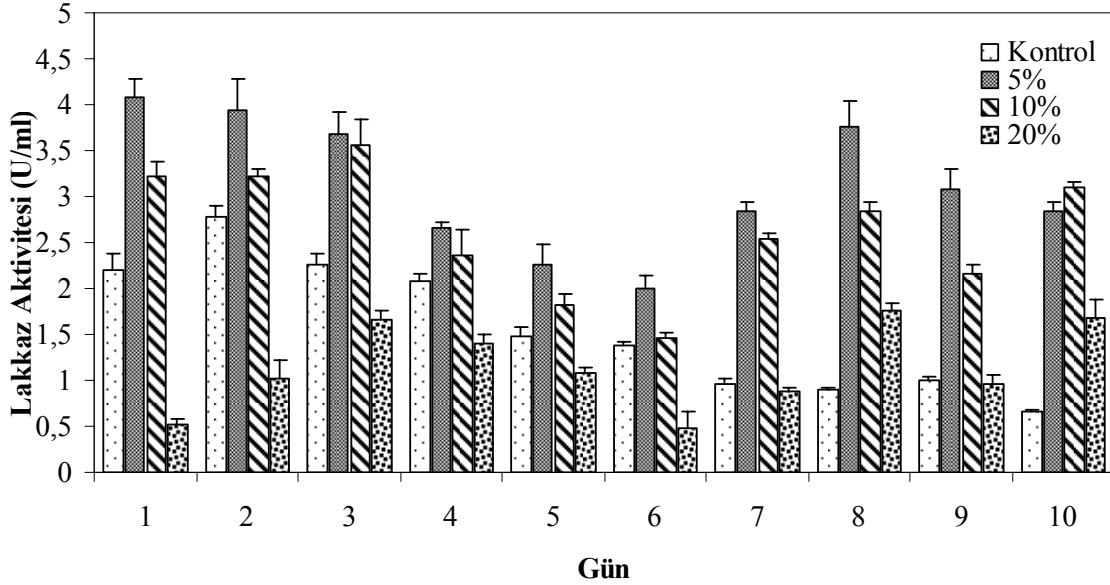


Şekil 4.48. Bakır eklenmiş ZYFA ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi

Şekil 4.48’de de görüldüğü gibi tüm bakır konsantrasyonları enzim aktivitesini çok yüksek oranda indüklemiştir. Enzim aktiviteleri ilk günde 11-13 U/ml olarak yani kontrolden 5-6 kat daha yüksek bulundu. Bakır eklenmesi özellikle peletlerin lakkaz üretim verimini arttırmıştır. 2.0 mM bakır eklenmiş ZYFA kültürleri 15 günde (15. kullanım) halen yaklaşık 6 U/ml enzim üretebilmiştir.

4.9.4. ZYFA ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimine peynir altı suyunun etkisi

ZYFA (%25’lik) ortamına peynir altı suyu son konsantrasyonu %5, %10 ve %20’lik olacak şekilde eklendi ve *F. trogii* peletleriyle tekrarlı kesikli çalışma yapıldı. Bu süreçte lakkaz aktivitesindeki değişim saptandı ve çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular Şekil 4.49’da verildi.



Şekil 4.49. Peynir altı suyu eklenmiş ZYFA ortamında *F. trogii* peletlerinin lakkaz üretimi

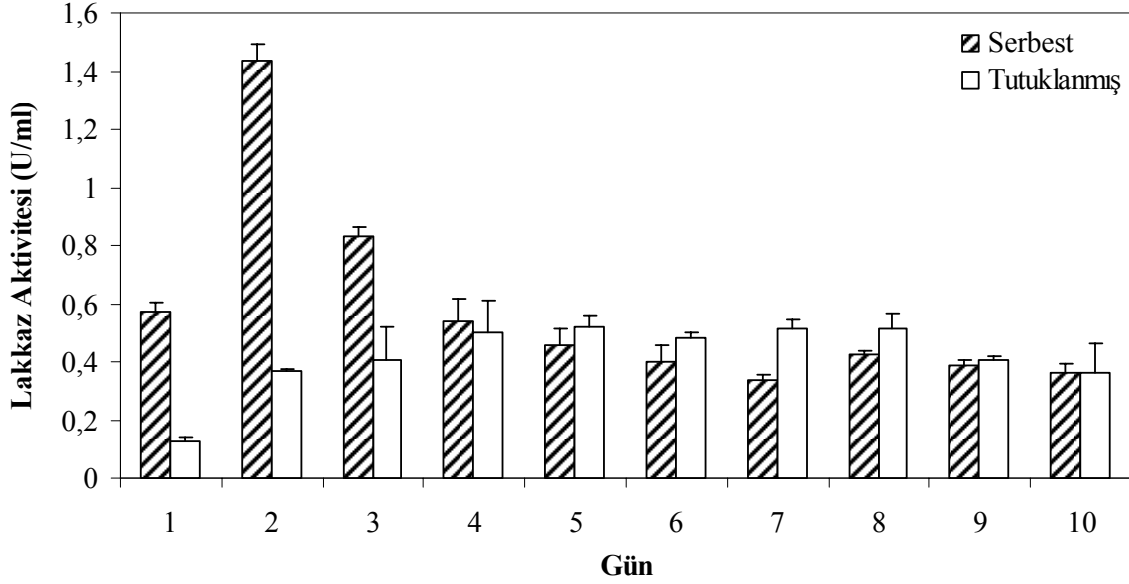
Şekil 4.49'dan da görüldüğü gibi son konsantrasyonda %5 ve %10 peynir altı suyu içeren kültürlerin lakkaz üretimi indüklendi ve 10 gün süresince yüksek enzim değerleri elde edildi. Bu çalışmada, ZYFA içerisinde peynir altı suyu bulunması peletlerin yüksek lakkaz üretimini ve üretimin sürekliliğini sağlamıştır.

4.10. Farklı Ajanlara Tutuklanmış *F. trogii*'nin ZYFA Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde Kullanımı

Tutuklamanın lakkaz üretim yeteneği ve sürekliliğine etkisinin test edildiği çalışmalarda hücreler çeşitli tutuklama ajanlarına tutuklanarak kullanıldı. Funguslar Bölüm 3.9.1'de belirtildiği gibi aljinat jele, Bölüm 3.9.2'de belirtildiği gibi aktif karbona ve Bölüm 3.9.3'de belirtildiği gibi çam kozalağına tutuklandı ve çalışmalar yürütüldü.

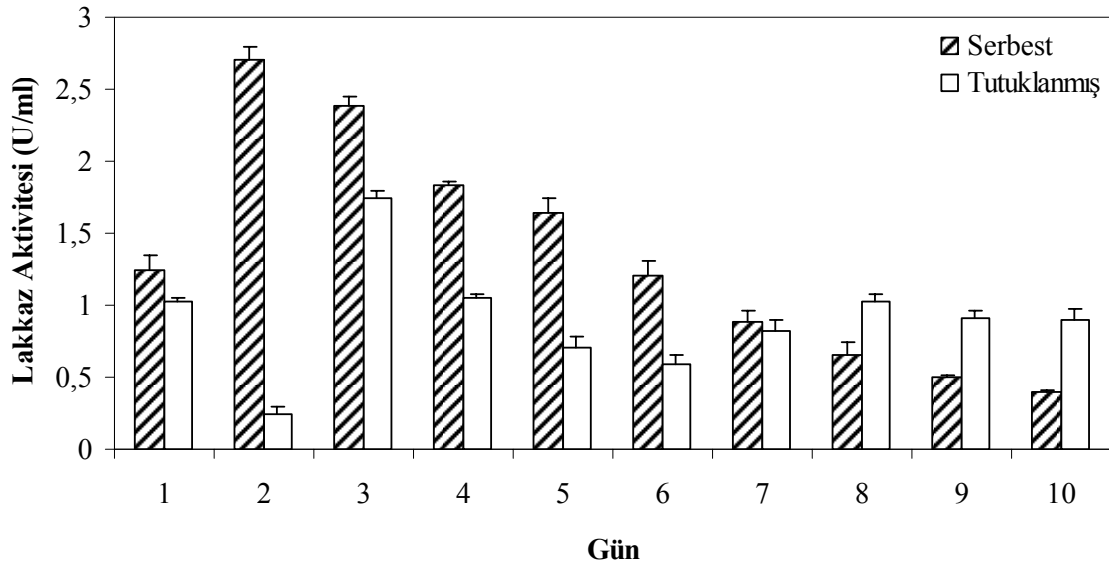
4.10.1. Aljinat jele tutuklanmış *F. trogii* hücrelerinin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı

Bölüm 3.9.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan aljinat jele tutuklanmış *F. trogii* hücreleri 10 g (123 adet), 20 g (225 adet) ve 30 g (346 adet) olacak şekilde %25’lik ZYFA ortamına eklendi ve tekrarlı kesikli çalışmalar yürütüldü.



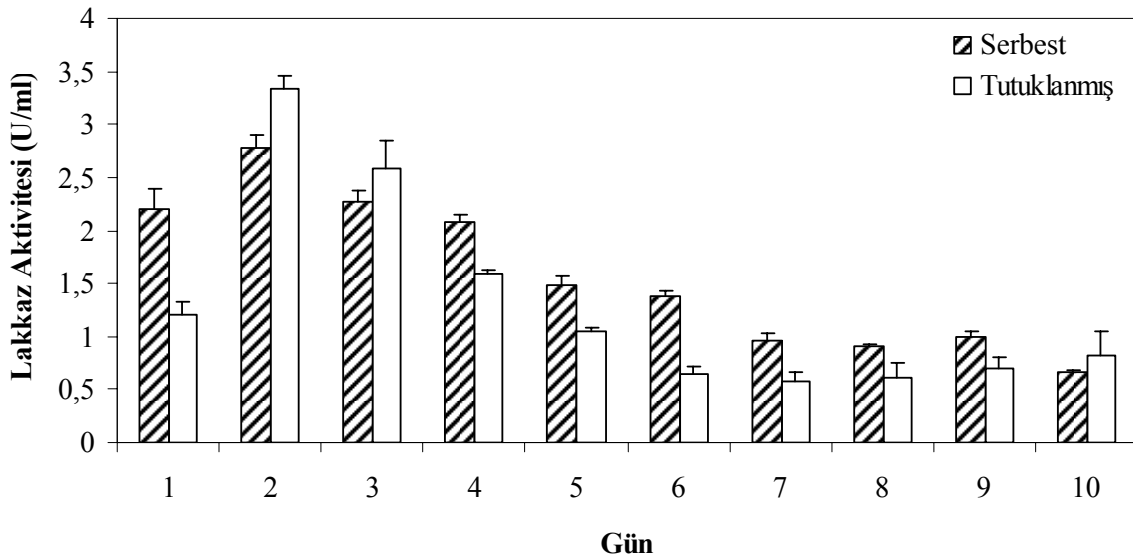
Şekil 4.50. Aljinat jele tutuklanmış *F. trogii* hücrelerinin (10 g) ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Şekil 4.50’de de görüldüğü gibi tutuklanmış ve tutuklanmamış *F. trogii* hücreleri tekrarlı kesikli çalışmada 10 gün süresince kullanıldı. Serbest hücrelerin lakkaz aktivitesi ilk üç gün tutuklanmış hücrelerden daha yüksek çıkarken, diğer günlerde serbest ve tutuklanmış hücrelerin enzim aktiviteleri yakın çıkmıştır.



Şekil 4.51. Aljinat jele tutuklanmış *F. trogii* hücrelerinin (20 g) ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

20 g tutuklanmış hücre kullanılan çalışmalarda serbest hücrelerin lakkaz aktivitesi ilk 6 kullanımda tutuklanmış peletlere göre daha yüksek iken, 7. günden itibaren tutuklanmış peletlerin lakkaz aktivitesi daha yüksek çıkmıştır (Şekil 4.51).

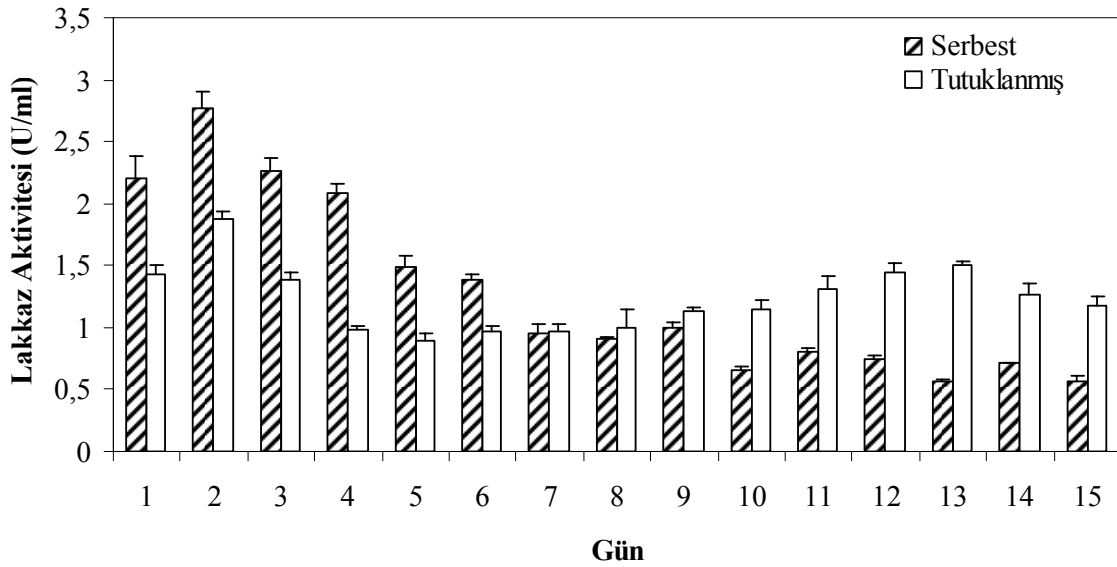


Şekil 4.52. Aljinat jele tutuklanmış *F. trogii* hücrelerinin (30 g) ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Daha fazla tutuklanmış hücre kullanılan çalışmalarda enzim üretimi açısından pozitif bir etki saptanmadı (Şekil 4.52).

4.10.2. Aktif karbona tutuklanmış *F. trogii*'nin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı

Tutuklama ajanı olarak aktif karbon kullanılan çalışmalarda *F. trogii* hücreleri Bölüm 3.9.2'de belirtildiği şekilde aktif karbona tutuklanmış ve tutuklanmış funguslar uygun miktarda tartıldıktan sonra %25'lik ZYFA'ya eklenerek tekrarlı kesikli üretim sürecinde lakkaz aktivitesi belirlendi.

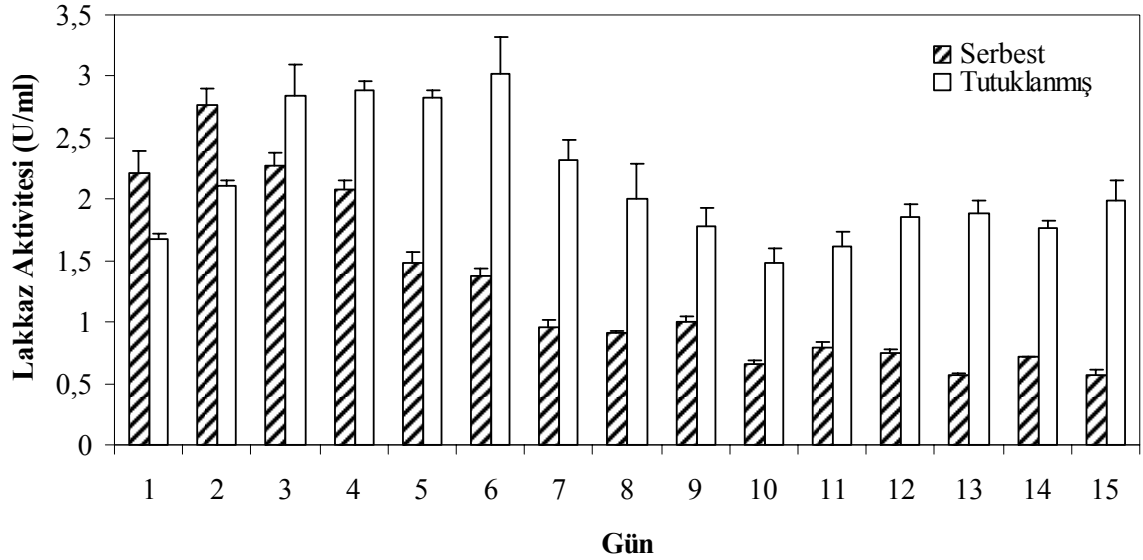


Şekil 4.53. Aktif karbona tutuklanmış *F. trogii* peletlerinin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Şekil 4.53 incelendiğinde ilk 6 günde serbest hücrelerin lakkaz aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Sonraki günlerde ise aktif karbona tutuklanmış fungusların enzim aktivitesi daha yüksek çıkmıştır. Aktif karbona tutuklama kullanılabilirlik sayısını (kararlılığını) arttırmıştır.

4.10.3. Çam kozalağına tutuklanmış *F. trogii*'nin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı

Lignoselülozlu materyal olan çam kozalağına Bölüm 3.9.3'de belirtildiği şekilde tutuklanmış fungusun, lakkaz üretim verimi araştırıldı. Serbest hücrelerin enzim aktivitesi ilk 2 gün, tutuklanmış hücrelerden daha yüksek çıkarken, sonraki günlerde çam kozalağına tutuklanmış hücrelerin aktivitesi daha yüksek bulundu (Şekil 4.54). Çam kozalağına tutuklanmış funguslar 15 gün süresince kullanılabilir. Yani tutuklama pelet kararlılığını artırmıştır. Serbest fungusların enzim aktivitesi 15 gün süresince 0.50-2.20 U/ml arasında değişirken, çam kozalağına tutuklanmış fungusların 15 gün süresince 1.60-3.02 U/ml aralığında değişmektedir. Çam kozalağına tutuklamayla hem enzim aktivitesinde hem de fungusun kullanma sayısında artış elde edildi.



Şekil 4.54. Çam kozalağına tutuklanmış *F. trogii* peletlerinin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

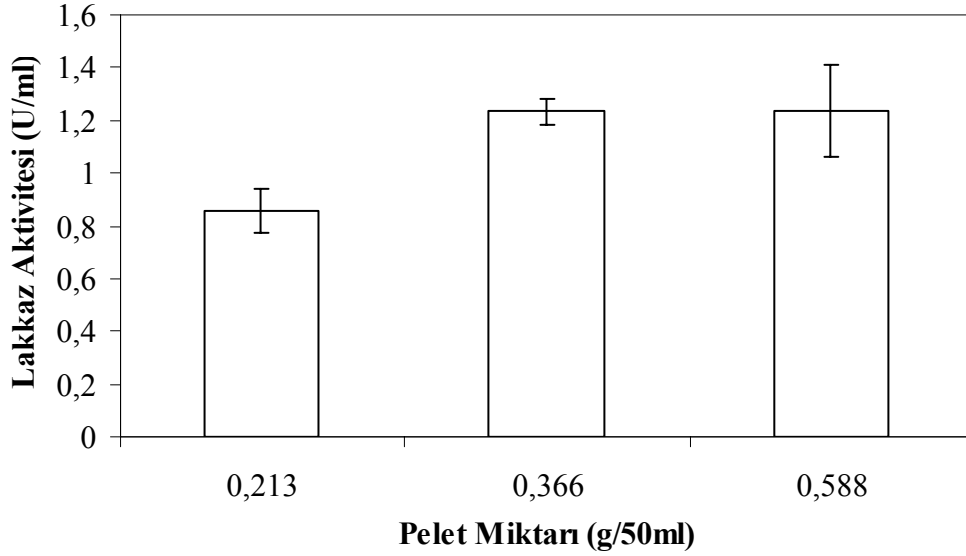
4.11. Fungus Peletlerinin Lakkaz Üretimine Optimizasyonu

4.11.1. *T. versicolor* Peletlerinin ZYFA Ortamında Lakkaz Üretimine Optimizasyonu

ZYFA ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi üzerine etkili olan pelet miktarı, atık su konsantrasyonu, sıcaklık, pH, çalkalama hızı gibi koşullara bağlı olarak optimize edildi.

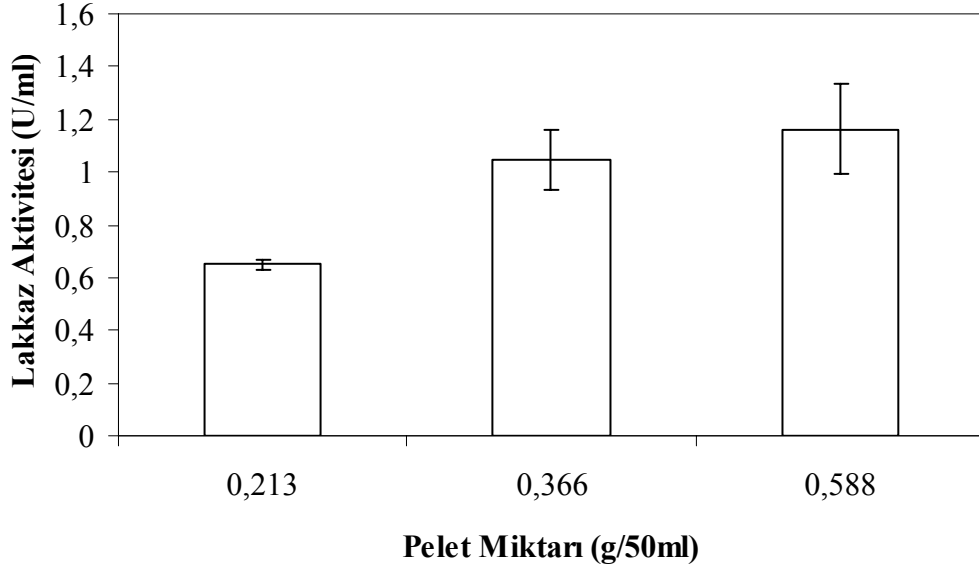
4.11.1.1. Pelet miktarı ve ZYFA konsantrasyonunun lakkaz üretimine etkisi

Uygun atık su konsantrasyonu ve uygun pelet miktarını saptamak amacı ile %10, %25, %50, %75 ve %100'lük ZYFA'lar kuru ağırlığı 0.213, 0.366 ve 0.588 g olan *T. versicolor* peletleriyle muamele edildi.



Şekil 4.55. *T. versicolor* peletlerinin %10'lük ZYFA ortamında lakkaz aktivitesi

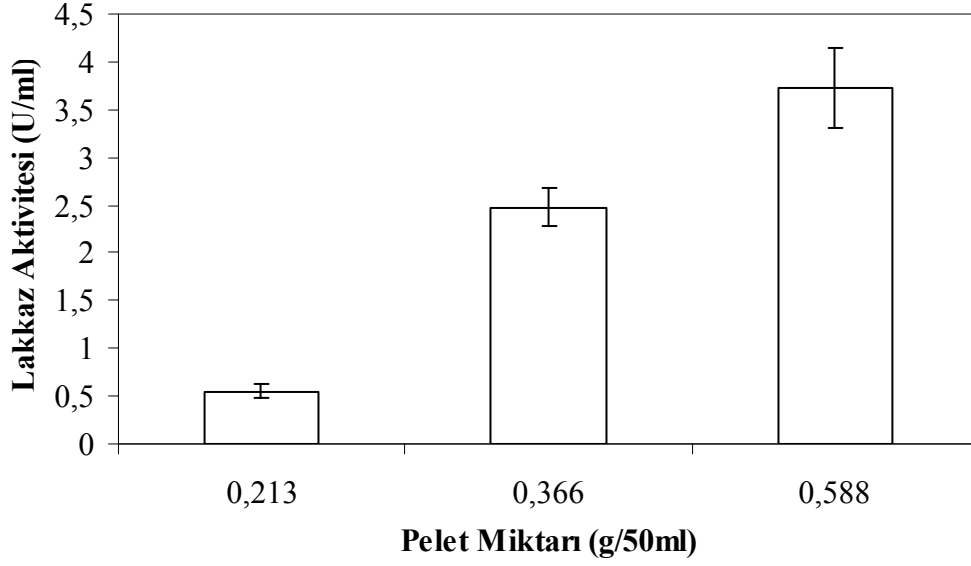
T. versicolor peletleri ile muamele edilmiş %10'lük ZYFA ortamında saptanan lakkaz aktivite sonuçları Şekil 4.55'de verildi. Kuru ağırlığı 0.366 ve 0.588 g pelet kullanıldığında lakkaz aktivitesi 1.23 U/ml olarak bulundu.



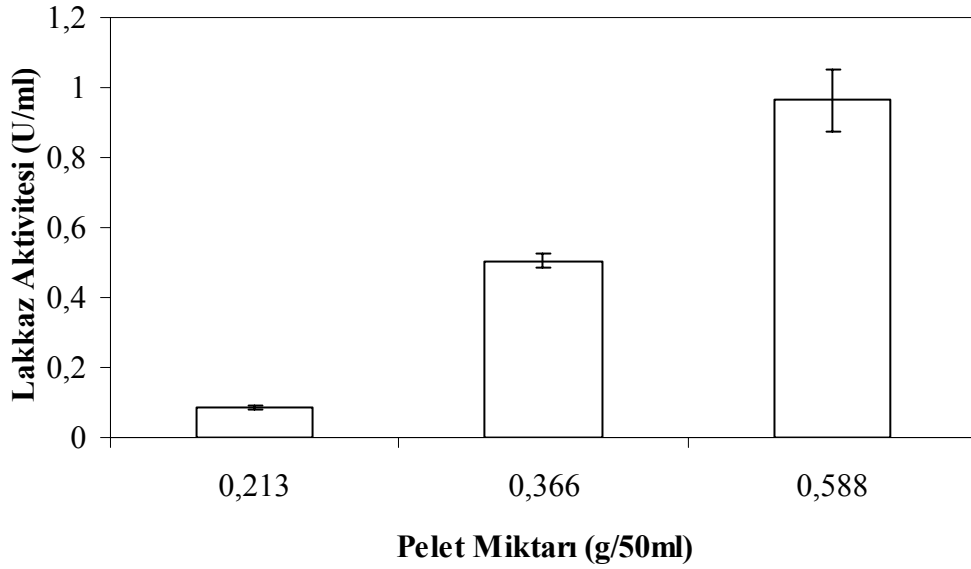
Şekil 4.56. *T. versicolor* peletlerinin %25'lik ZYFA ortamında lakkaz aktivitesi

T. versicolor peletleri ile %25 ZYFA ortamında yürütülen çalışmalarından elde edilen lakkaz aktivite sonuçları Şekil 4.56'da gösterildi. Şekilden de görüleceği gibi 0.366 ve 0.588 g hücre kullanımı sonucu yakın lakkaz aktivite değerleri elde edildi.

T. versicolor'un peletleriyle %50'lik ZYFA ortamında en yüksek enzim aktivitesi 0.588 g pelet kullanılan çalışmalarda 3.72 U/ml olarak saptandı (Şekil 4.57).

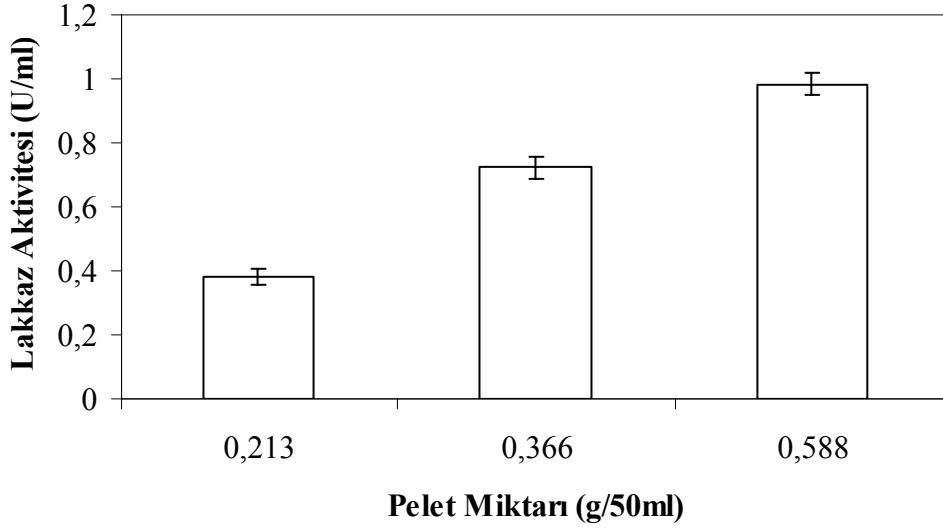


Şekil 4.57. *T. versicolor* peletlerinin %50'lik ZYFA ortamında lakkaz aktivitesi



Şekil 4.58. *T. versicolor* peletlerinin %75'lik ZYFA ortamında lakkaz aktivitesi

%75 ZYFA (Şekil 4.58) ve %100 ZYFA (Şekil 4.59) ortamlarında da en yüksek lakkaz aktivitesi 0.588 g pelet kullanıldığı durumda saptandı.



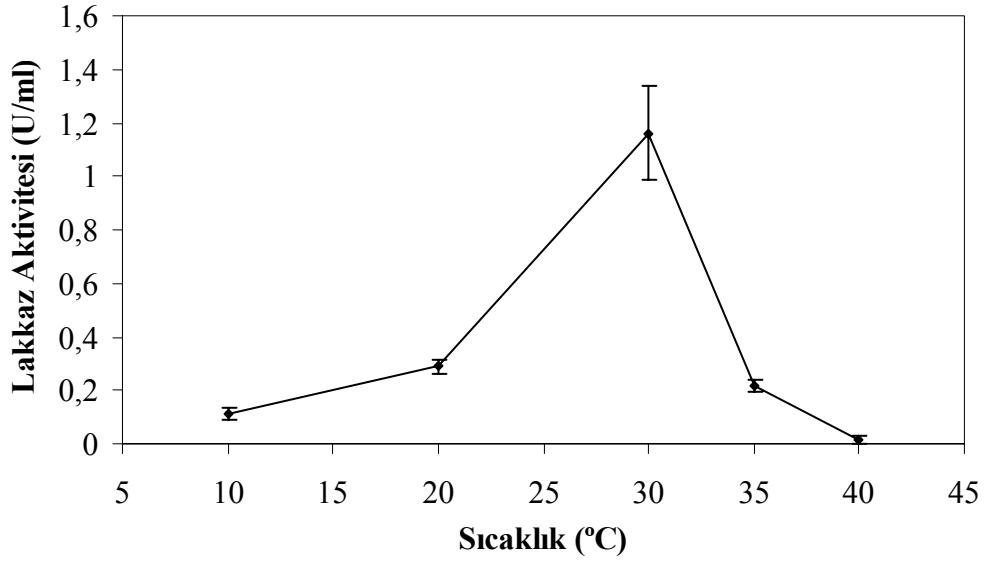
Şekil 4.59. *T. versicolor* peletlerinin %100'lük ZYFA ortamında lakkaz aktivitesi

Çalışma sonucunda en yüksek enzim aktivitesi %50'lik konsantrasyon ve 0.588 g pelet kullanıldığı durumda saptanırken, atık suyun olası toksisitesi göz önüne alınarak tekrarlı kesikli çalışmalarda verimi (kullanım sayısını) artırmak amacıyla %25'lik ZYFA optimum olarak tercih edildi.

4.11.1.2. Sıcaklığın ZYFA ortamında inkübe edilen *T. versicolor*'un lakkaz üretimine etkisi

Optimum pelet miktarı ve uygun ZYFA konsantrasyonu belirlendikten sonra 0.588 g *T. versicolor* %25'lik ZYFA ortamında 150 rpm'de farklı sıcaklıklarda inkübe edildi ve 24 saat süren inkübasyon sonrası lakkaz aktivitesi belirlendi.

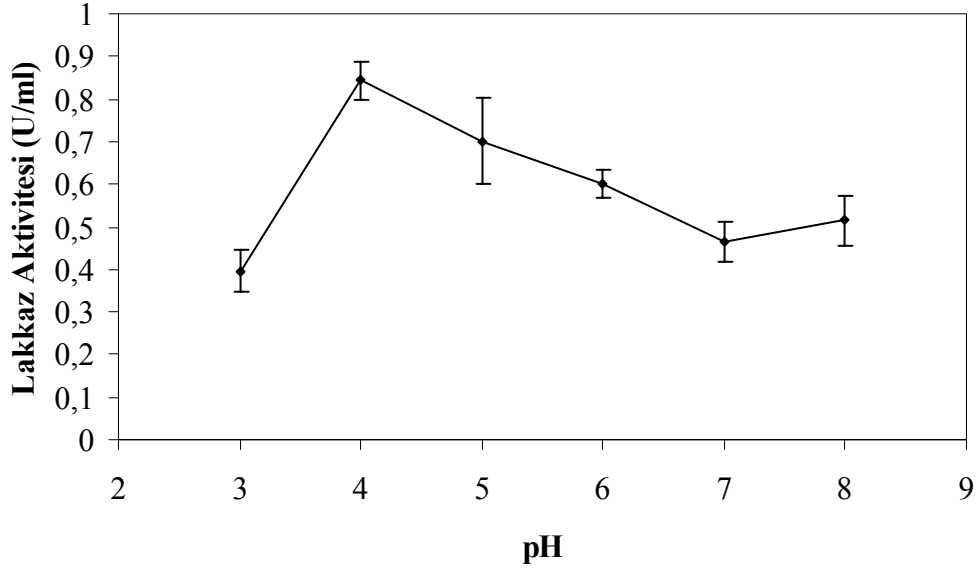
Lakkaz aktivitesinin 30°C'de en yüksek olduğu bulundu (Şekil 4.60). Bu nedenle takip eden çalışmalarda bu sıcaklık değeri inkübasyon sıcaklığı olarak kullanıldı.



Şekil 4.60. Sıcaklığın ZYFA ortamında inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

4.11.1.3. ZYFA'nın başlangıç pH'sının *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

Farklı başlangıç pH'larına ayarlanmış % 25'lik ZYFA ortamlarına *T. versicolor* peletleri eklenerek 30°C ve 150 rpm'de 24 saat inkübe edildi.



Şekil 4.61. Başlangıç pH'sının ZYFA ortamında inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

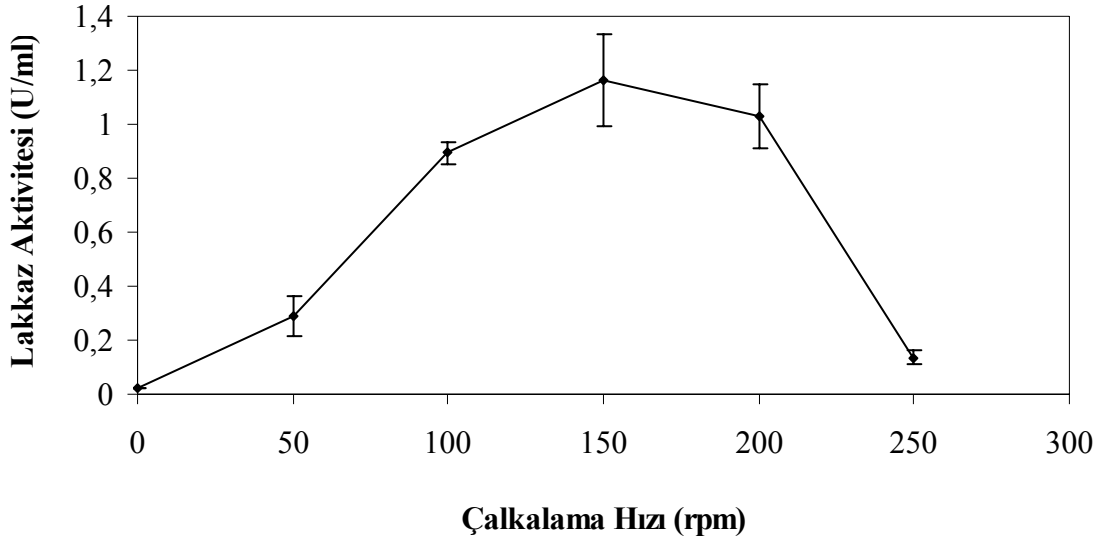
Şekil 4.61'den de görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi pH 4-6 aralığında elde edildi. Çalışma sırasında inkübasyon sonrası besiyerinin pH'sı da tespit edilmiş ve pH değerlerindeki değişim Çizelge 4.6'da verildi. pH 3-6 aralığında fungusla muamele sonucu pH değerlerinde artış olurken pH değeri 7 ve 8'e ayarlanmış ZYFA'nın pH'sı düşmüştür.

Çizelge 4.5. Farklı başlangıç pH'larındaki ZYFA ortamlarının *T. versicolor* peletlerinin uygulanması sonrası pH değişimi

Başlangıç pH'sı	Uygulama sonrası pH
3.00	4.15
4.00	5.01
5.00	5.80
6.00	6.06
7.00	6.07
8.00	6.29

4.11.1.4. Çalkalama hızının ZYFA ortamında inkübe edilen *T. versicolor*'un lakkaz üretimine etkisi

Daha önceki çalışmalarda saptanan optimum pelet miktarı kullanılarak *T. versicolor* peletiyle %25'lik ZYFA ortamında 30°C'de lakkaz üretimi araştırıldı (Şekil 4.62).

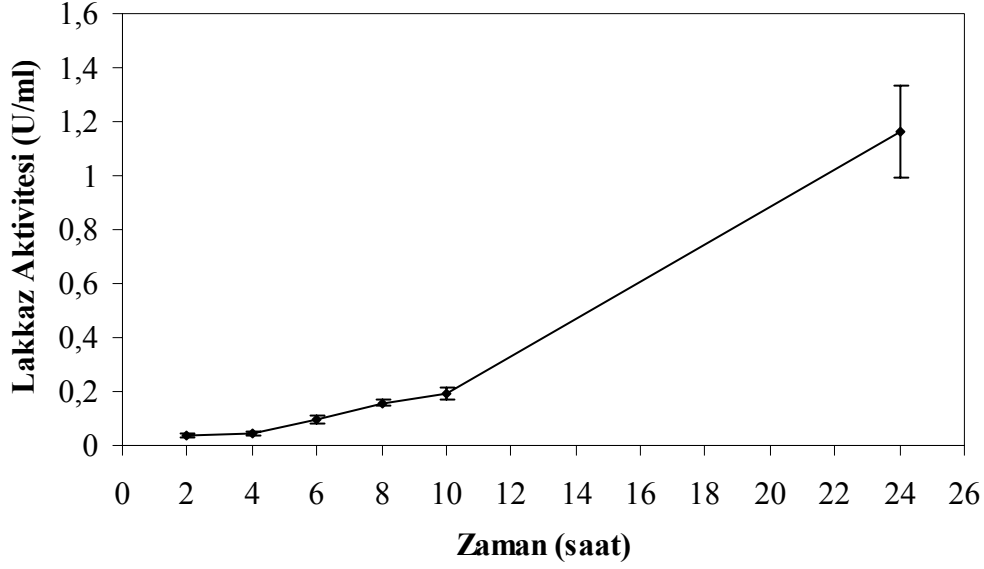


Şekil 4.62. Çalkalama hızının ZYFA ortamında inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine etkisi

Statik koşulda enzim aktivitesi tespit edilemezken, 50 rpm'de çalkalama hızında enzim aktivitesinin arttığı ve 150 rpm'de maksimuma ulaştığı görülmektedir. Bunun üzerindeki çalkalama hızlarında aktivitede azalış gözlemlendi (Şekil 4.62).

4.11.1.5. ZYFA ortamında inkübe edilen *T. versicolor*'un lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi

T. versicolor peletlerinin zamana bağlı lakkaz üretimini test etmek amacıyla %25'lik ZYFA ortamında optimum pelet miktarıyla 30°C ve 150 rpm'de çalışma yapıldı (Şekil 4.63).



Şekil 4.63. ZYFA ortamında inkübe edilen *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretiminin zamana bağlı değişimi

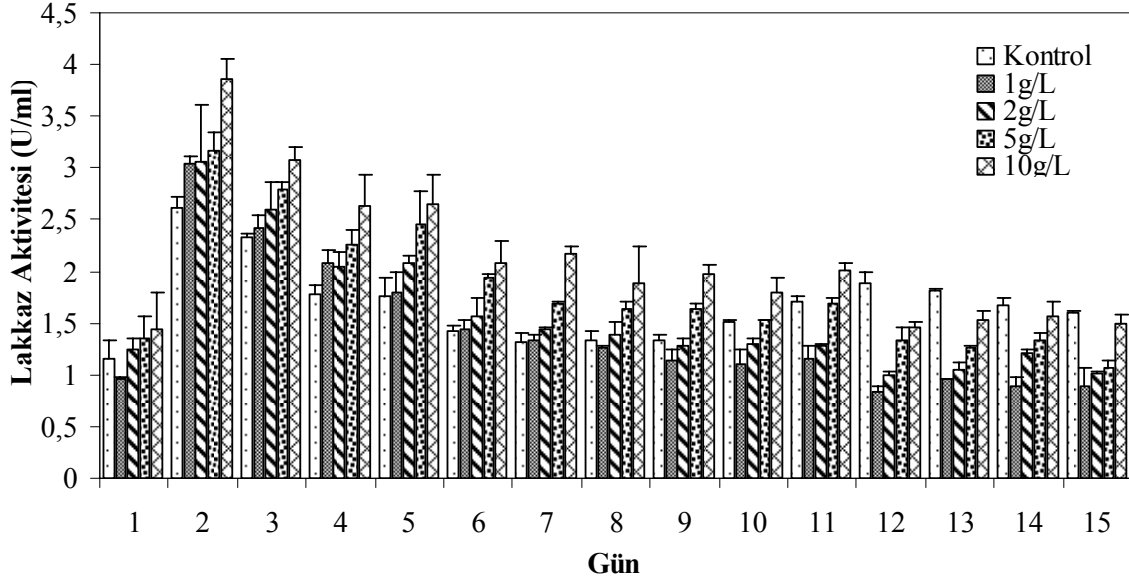
Şekilden de görüldüğü gibi 10. saate kadar 0.2 U/ml civarında lakkaz değerine ulaşılabilirken 24. saatte yüksek enzim aktivitesi elde edildi.

4.12. ZYFA Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde *T. versicolor* Peletlerinin Lakkaz Üretimine Ek Kaynakların Etkisi

ZYFA ortamlarına ek kaynak olarak glikoz, maya özütü ve peynir altı suyu eklenerek çalışmalar yapıldı. Ayrıca enzim üretim verimini artırmak amacıyla besiyerine bakır eklenerek de çalışmalar sürdürüldü.

4.12.1. ZYFA ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine glikozun etkisi

ZYFA ortamına (%25) karbon ve enerji kaynağı olarak glikoz 1, 2, 5 ve 10g/L olacak şekilde eklendi ve *T. versicolor* peletleriyle (0.588 g), optimum sıcaklık ve çalkalama hızında tekrarlı kesikli çalışmalar yapıldı.

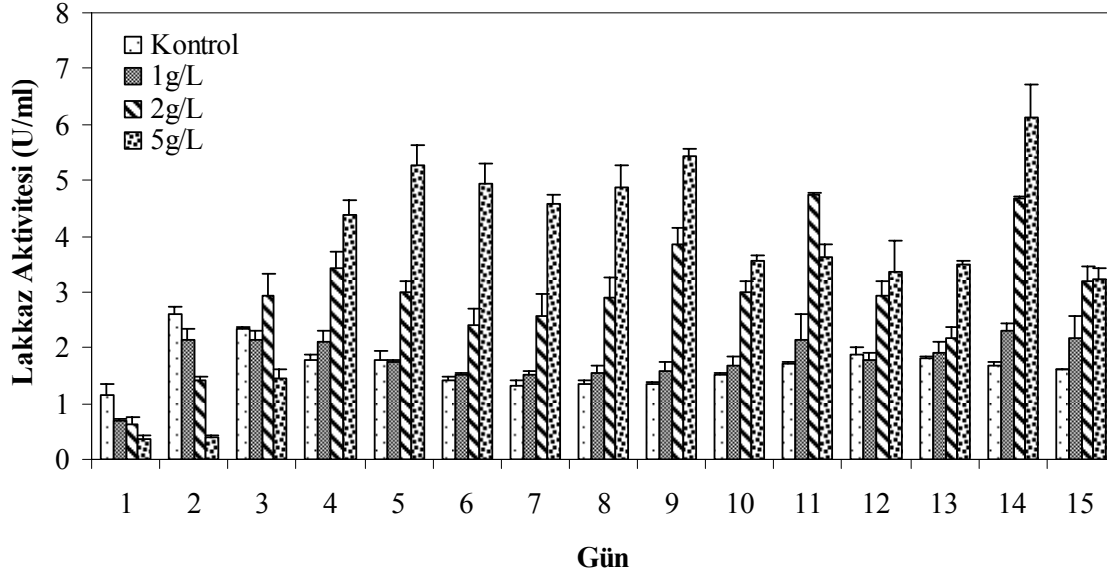


Şekil 4.64. Glikoz eklenmiş ZYFA ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi

Çalışma 15 gün devam ettirilmiş ve lakkaz aktivitesi belirlendi. 1. gün glikoz konsantrasyonunun artışına paralel olarak enzim aktivitesinin de arttığı, 2. günde ise artışın daha fazla olduğu görüldü. Bu durum 7 gün süresince devam etmiştir. 12. günden sonra kontrolde lakkaz aktivitesi daha yüksek bulundu (Şekil 4.64).

4.12.2. ZYFA ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine maya özütünün etkisi

Lakkaz üretim verimini artırmak amacıyla son konsantrasyonu 1, 2 ve 5g/L olacak şekilde maya özütü %25'lik ZYFA ortamına eklendi ve tekrarlı kesikli çalışmalar optimum koşullarda devam ettirildi.

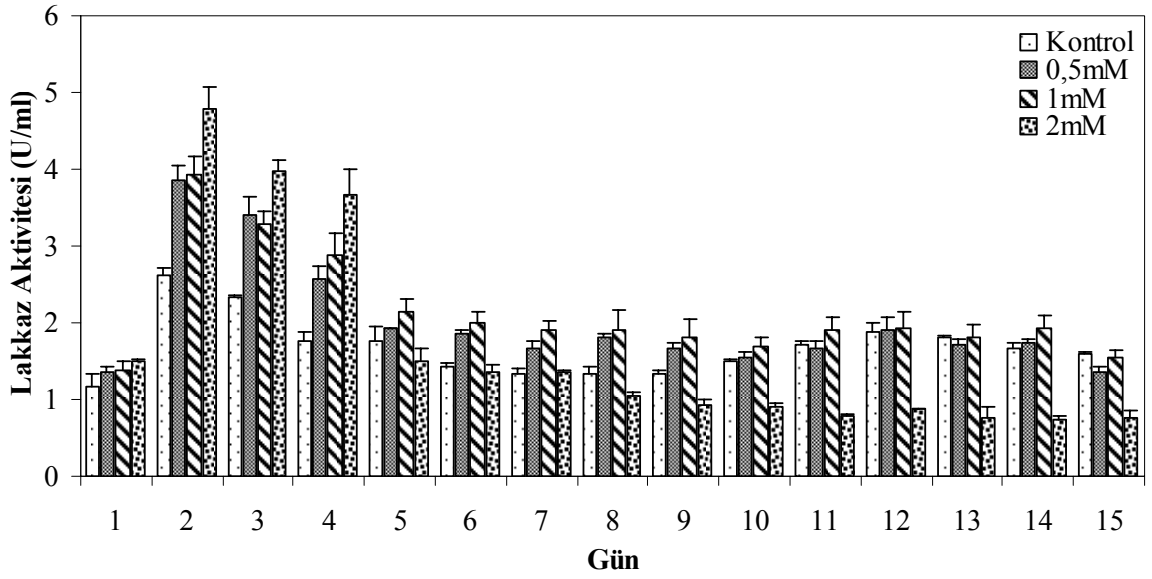


Şekil 4.65. Maya özütü eklenniş ZYFA ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi

Maya özütü, ilk 3 günde lakkaz üretimini olumsuz etkilerken, 4. günden itibaren 15. güne kadar enzim üretimini arttırdı. Özellikle 2 ve 5 g/L maya özütü eklenen kültürlerde enzim aktivitesi belirgin bir şekilde artmıştır. Kontrol gruplarında lakkaz aktivitesi 15 gün süresince 1.16- 2.61 U/ml arasında değişirken, 1 g/L maya özütü içeren ortamlarda 2. günden itibaren 1.50-2.32 U/ml arasında değişmektedir. 2 g/L konsantrasyonun kullanıldığı çalışmada 2. günden itibaren 15 gün süresince lakkaz aktivitesi 1.41-4.75 U/ml arasında değişmiştir. 5g/L konsantrasyonda ise 4. günden itibaren 15. güne kadar lakkaz aktivitesi 3.22 – 6.13 U/ml arasında saptandı (Şekil 4.65).

4.12.3. ZYFA ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine bakırın etkisi

Farklı konsantrasyonlarda bakır eklenen %25'lik ZYFA ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretiminin günlere bağlı değişimi Şekil 4.66'da verildi.

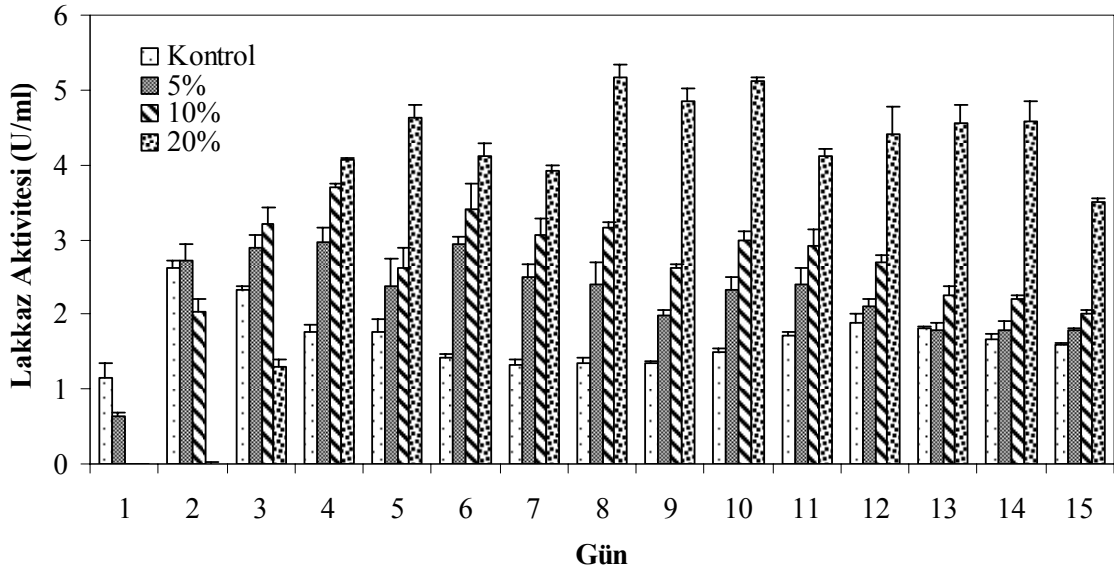


Şekil 4.66. Bakır eklenmiş ZYFA ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi

Bakır, enzim aktivitesini 2. ve 4. günler arasında belirgin bir şekilde indüklerken 5. günden sonra 2 mM bakır içeren kültürlerde enzim aktivitesi kontrole göre daha düşük saptandı.

4.12.4. ZYFA ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimine peynir altı suyunun etkisi

%5, %10 ve %20 peynir altı suyu içeren %25'lik ZYFA ortamlarında *T. versicolor* peletleriyle tekrarlı kesikli çalışmalar yürütüldü ve kültürün lakkaz aktivite değişimi saptandı (Şekil 4.67).



Şekil 4.67. Peynir altı suyu eklenmiş ZYFA ortamında *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretimi

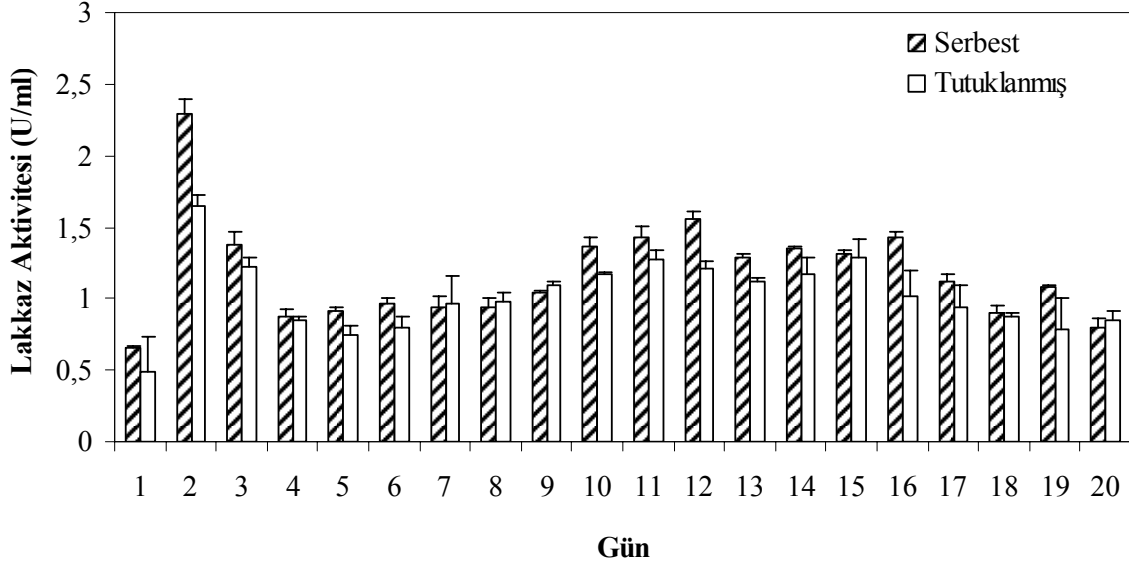
Şekil 4.67 incelendiğinde peynir altı suyu konsantrasyonuna bağlı olarak *T. versicolor* peletlerinin adapte olma sürelerinin uzadığı görülmektedir. Kontrol gruplarında enzim aktivitesi 15 gün süresince 1.16- 2.61 U/ml arasında değişirken, %5 peynir altı suyu içeren kültürlerin 15 günlük süreçte enzim aktivitesi 0.64-2.96 U/ml arasında saptandı. %10 peynir altı suyu içeren kültürlerin ise 14 günlük sürede enzim aktivitesi 0.64-2.96 U/ml arasındadır. %20 peynir altı suyu içeren kültürlerin enzim aktiviteleri ise 13 günlük sürede kontrole göre 3 kat indüklenmiş ve enzim aktivitesi 3.51-4.85 U/ml arasında değişmiştir.

4.13. Farklı Ajanlara Tutuklanmış *T. versicolor*'un ZYFA Ortamında Tekrarlı Kesikli Üretim Sürecinde Kullanılması

Fungus peletlerinin tekrarlı kesikli çalışmalarda kullanım sayısını artırmaya yönelik planlanan çalışmalarda *T. versicolor* peletleri aljinat jel, aktif karbon ve lignoselülozlu madde olarak da çam kozalağına tutuklanmış ve tekrarlı kesikli süreçte lakkaz enzim üretim yetenekleri ve verimleri saptandı.

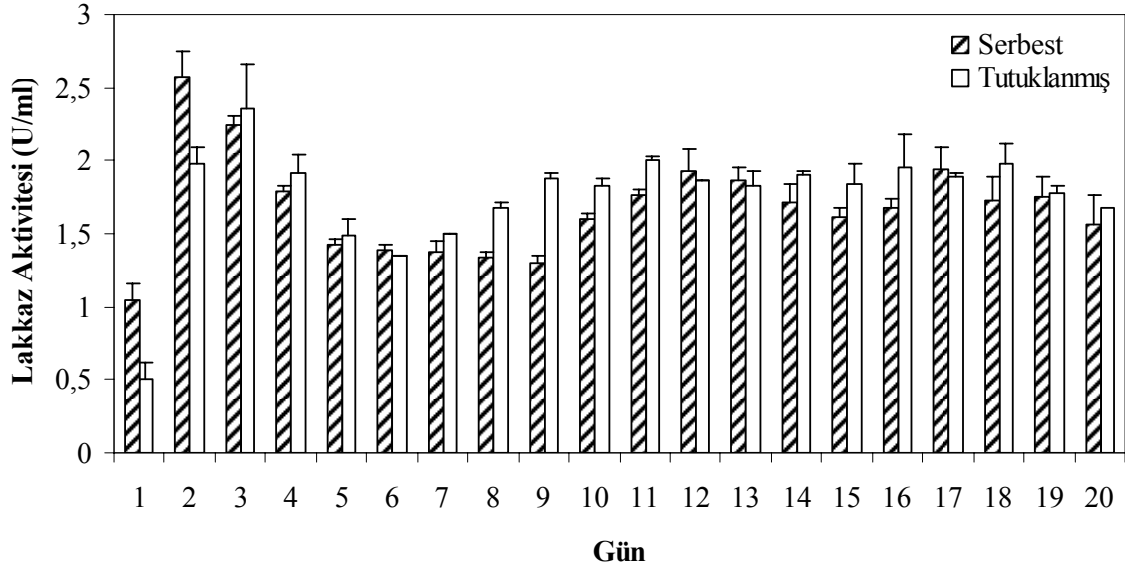
4.13.1. Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor*'un ZYFA ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı

Bölüm 3.9.1'de belirtildiği şekilde aljinat jele tutuklanan *T. versicolor* hücreleri daha sonra %25'lik ZYFA ortamına 10 g (111 adet) olacak şekilde eklendi ve tekrarlı kesikli çalışma yürütüldü.



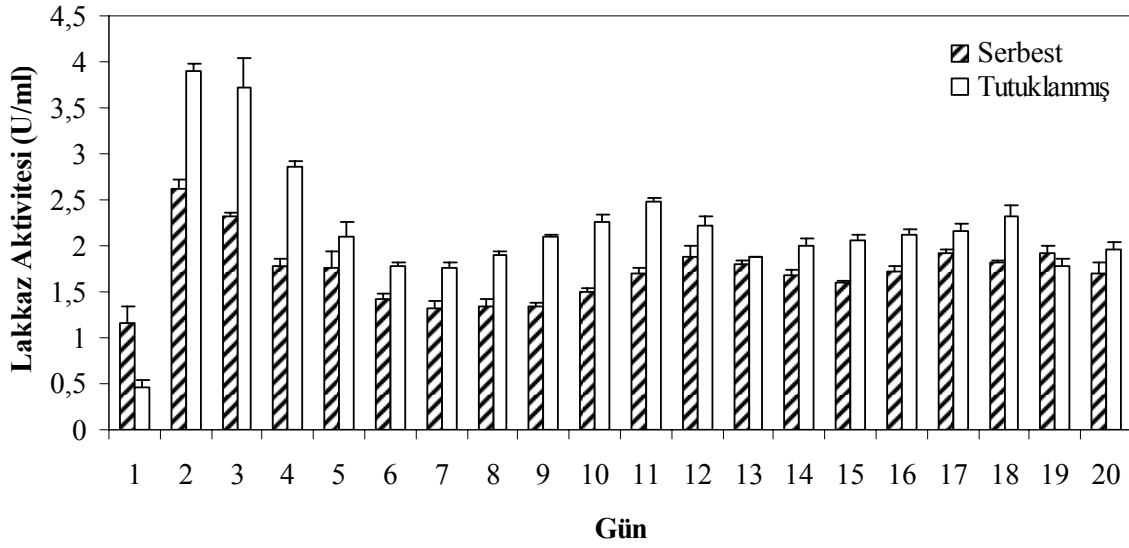
Şekil 4.68. Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor* hücrelerinin (10g) ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

20 gün süresince devam ettirilen çalışmalarda serbest hücrelerin enzim üretim yeteneğinin tutuklanmış hücrelerin yeteneğinden daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.68).



Şekil 4.69. Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor* hücrelerinin (20g) ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor* peletleri 20 g (223 adet) kullanılmış ve çalışma 20 gün süresince devam ettirildi. İlk 2 günde serbest hücrelerin enzim aktivitesi tutuklanmışlardan daha yüksek çıkarken, sonraki günlerde tutuklanmış funguslarla yakın veya yüksek enzim değerleri elde edildi (Şekil 4.69).

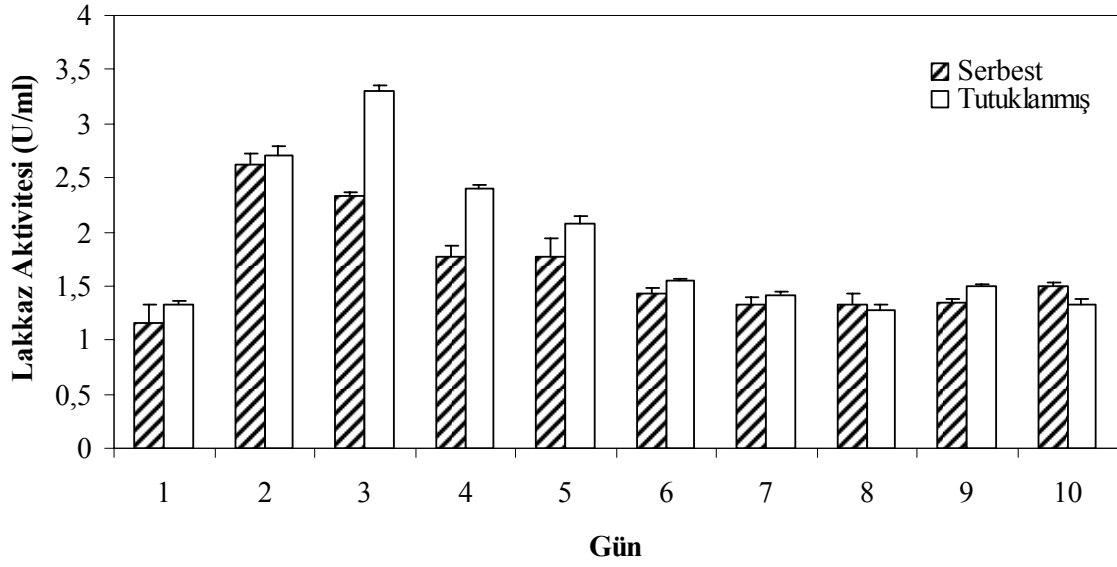


Şekil 4.70. Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor* hücrelerinin (30g) ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

30 g (335 adet) aljinat jele tutuklanmış fungus kullanılan çalışmalarda ilk gün serbest hücrelerin lakkaz aktivitesi daha yüksek iken, sonraki günlerde tutuklanmış hücreler tarafından üretilen enzim miktarı 19. kullanım hariç daha yüksek çıkmıştır (Şekil 4.70).

4.13.2. Aktif karbona tutuklanmış *T. versicolor*'un ZYFA ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı

T. versicolor peletleri Bölüm 3.9.2'de belirtildiği şekilde aktif karbona tutuklanarak kullanıldı. Tutuklanmış funguslar %25'lik ZYFA ortamına eklenmiş ve tekrarlı kesikli çalışmalar yürütüldü.

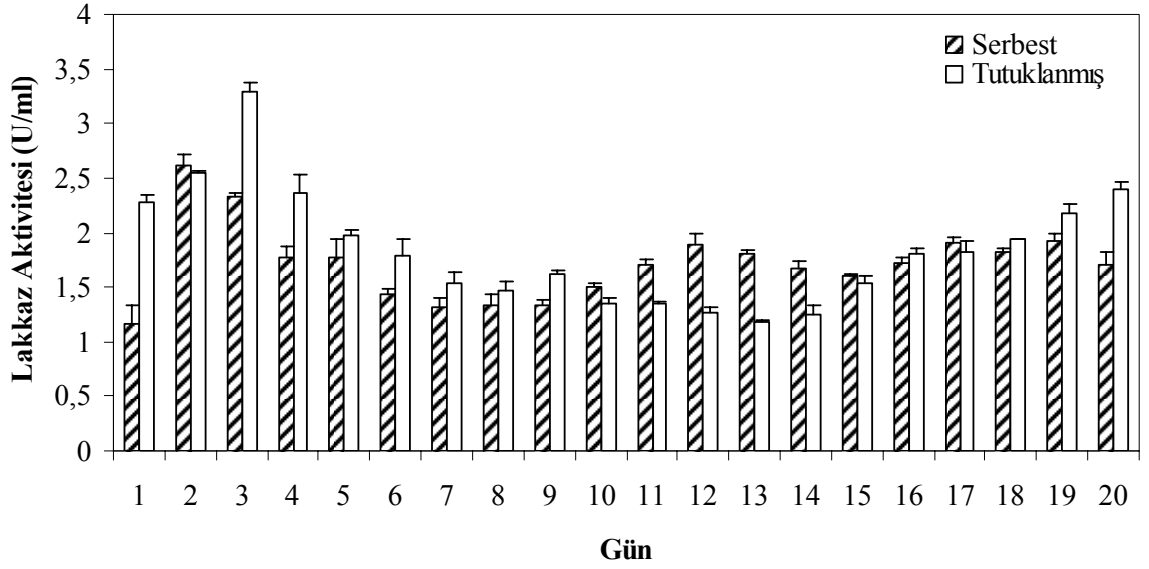


Şekil 4.71. Aktif karbona tutuklanmış *T. versicolor* peletlerinin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Çalışma sonucunda elde edilen bulgular Şekil 4.71’de gösterildi. Aktif karbona tutuklama 10 gün verimli olmuştur.

4.13.3. Çam kozalağına tutuklanmış *T. versicolor*’un ZYFA ortamında tekrarlı kesikli üretim sürecinde kullanımı

Fungusu tutuklamada kullanılan bir diğer tutuklama ajanı lignoselülozlu madde olarak kullanılan çam kozalağıdır. Bölüm 3.9.3’de belirtildiği gibi *T. versicolor* hücreleri çam kozalaklarına tutuklanmış ve optimum pelet miktarı %25’lik ZYFA ortamlarına eklenerek tekrarlı kesikli çalışmalar sürdürüldü.



Şekil 4.72. Çam kozalağına tutuklanmış *T. versicolor* peletlerinin ZYFA ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Tutuklanmış hücrelerle %25'lik ZYFA ortamında yürütülen tekrarlı kesikli çalışma 20 gün süresince devam ettirildi. İlk 9 gün çam kozalağına tutuklanmış funguslar daha fazla lakkaz üretirken 10-14. gün arasında serbest hücrelerin üretim verimi artmıştır. 15. günden 19. güne kadar üretim verimi benzerken 19 ve 20. günlerde tutuklanmış fungusların enzim aktivitesi serbest hücrelerden daha yüksek değerlere ulaşmıştır (Şekil 4.72).

4.14. Atık Suların Funguslarla Muamelesi Sonrası Atık Suyun KOİ Değişimi

Atık suların funguslarla muamelesi sürecinde biyolojik iyileştirmenin olup olmadığını anlamak amacıyla biyolojik iyileşmenin göstergesi olarak KOİ değişimine bakıldı. Çalışmalar serbest ve tutuklanmış hücrelerle sürdürüldü.

4.14.1. Fungus peletlerinin atık su KOİ'si üzerine etkisi

Çizelge 4.7'den de görülebileceği gibi serbest veya tutuklanmış formda kullanılan tüm kültür ortamlarında önemli oranda KOİ giderimi 24 saat içinde elde edildi.

Çizelge 4.6. *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin vinas ve ZYFA'nın KOİ'sine etkisi

Fungus	KOİ Giderimi (%)	
	Vinas	ZYFA
Serbest <i>F. trogii</i>	32	33
Tutuklanmış <i>F. trogii</i>	17	27
Serbest <i>T. versicolor</i>	26	28
Tutuklanmış <i>T. versicolor</i>	23	33

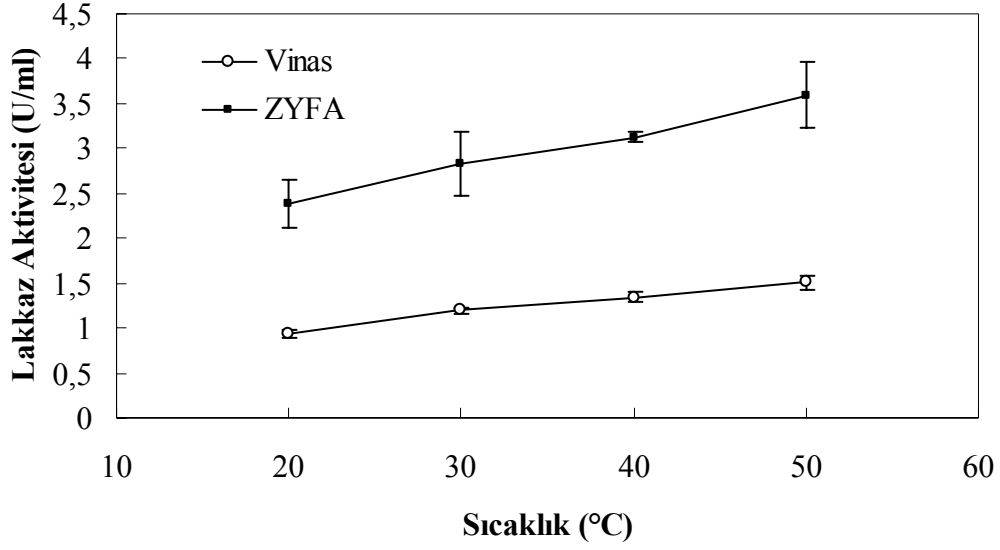
Çalışmalar %25'lik atık su konsantrasyonlarında yürütüldü. Sonuçlar, lakkaz üretim sürecinde biyolojik iyileştirmenin de olduğunu göstermektedir.

4.15. Sıcaklık ve pH'nın Lakkaz Aktivitesine Etkisi

Çalışmanın bu kısmında elde edilen ham enzim kaynağının farklı sıcaklık ve pH'larda aktivite değişimi araştırıldı. Bu amaçla *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin kültür ortamları kullanıldı.

4.15.1. Sıcaklığın lakkaz aktivitesine etkisi

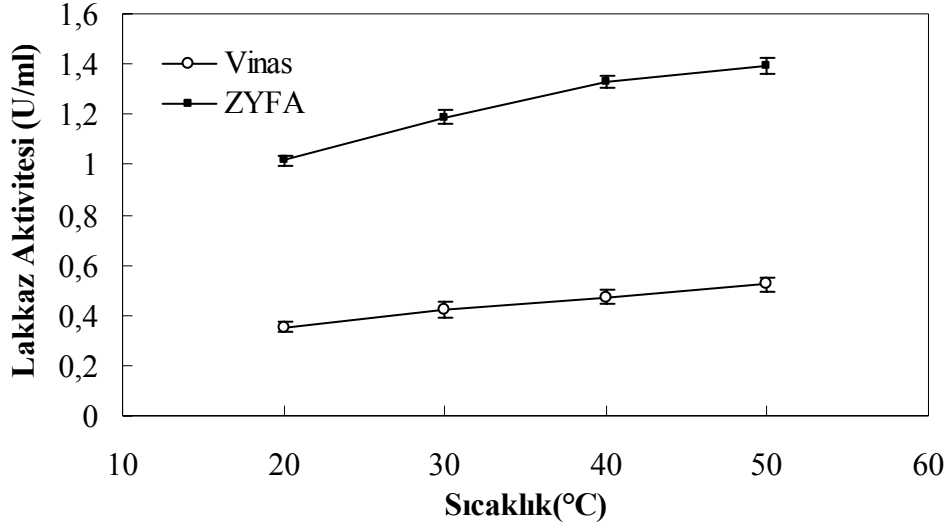
F. trogii peletleriyle %25'lik vinas ortamında yürütülen tekrarlı kesikli çalışma sırasında ekstraselüler sıvı alındı ve enzim aktivitesi farklı sıcaklıklarda araştırıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.73'de verildi. Çalışma sırasında enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak arttığı gözlemlendi.



Şekil 4.73. Vinas ve ZYFA ortamlarından elde edilen *F. trogii* ham lakkaz enziminin aktivitesine sıcaklığın etkisi

Benzer olarak, %25'lik *F. trogii* ile muamele edilmiş ZYFA ortamından da kültür sıvısı alındı ve sıcaklığın aktiviteye etkisi test edildi. Burada da ölçüm sıcaklığına bağlı olarak daha yüksek lakkaz aktivite değeri elde edildi (Şekil 4.73).

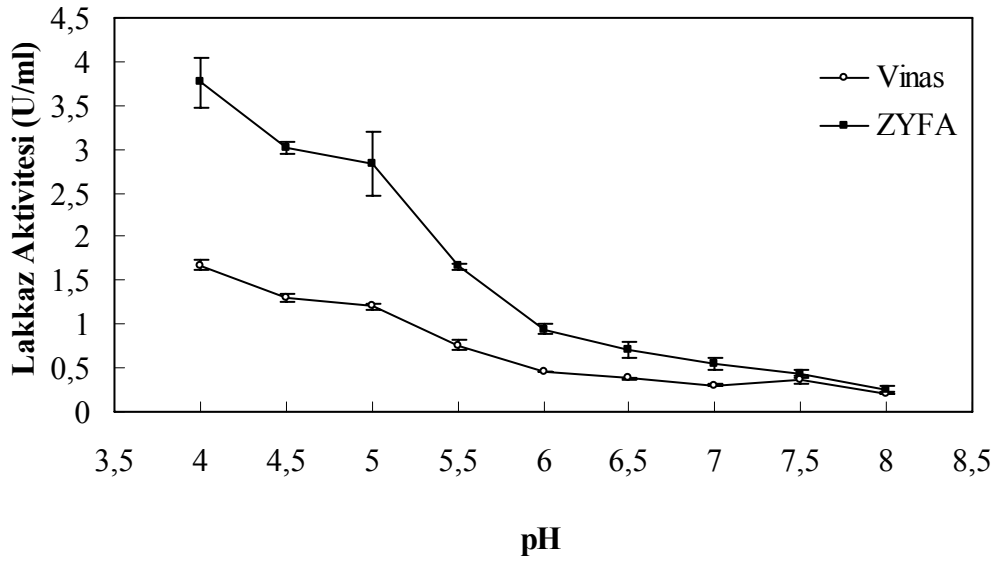
T. versicolor peletleriyle %25'lik vinas ve ZYFA ortamlarında yürütülen tekrarlı kesikli çalışma sırasında kültür sıvısı alındı ve enzim aktivitesi farklı sıcaklıklarda araştırıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.74'de verildi. Çalışma sırasında enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı arttığı görülmektedir.



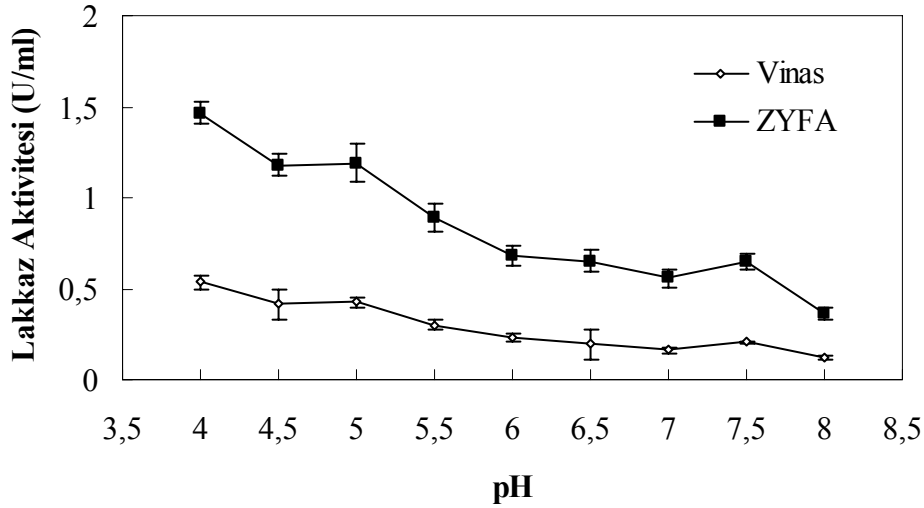
Şekil 4.74. Vinas ve ZYFA ortamlarından elde edilen *T. versicolor* ham lakkaz aktivitesine sıcaklığın etkisi

4.16.2. pH'nın lakkaz aktivitesine etkisi

Optimum koşullarda her iki fungus peletleriyle yapılan tekrarlı kesikli çalışmalardan elde edilen kültür sıvısının lakkaz aktivitesi, farklı pH'larda belirlendi. *F. trogii* ve *T. versicolor* peletlerinin %25 vinas ve ZYFA ortamlarında inkübasyonu sırasında alınan kültür sıvısının pH'ya bağlı enzim aktivite değişimi Şekil 4.75 ve 4.76'da verildi. pH 4-5 aralığında enzim aktivitesi yüksek iken pH değişimine bağlı olarak enzim aktivitesinde de düşüş saptandı.



Şekil 4.75. Vinas ve ZYFA ortamlarından elde edilen *F. trogii* ham lakkaz enzim aktivitesine pH'nın etkisi

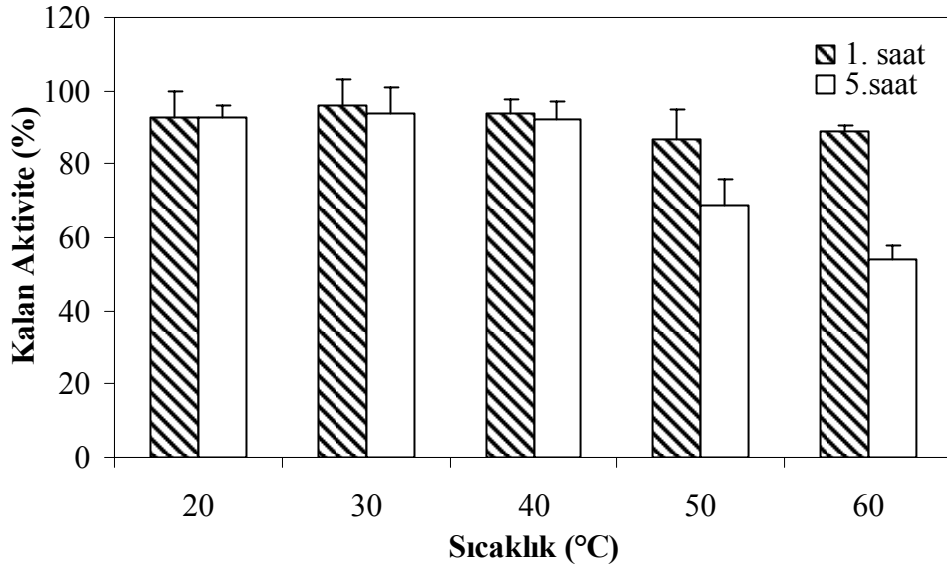


Şekil 4.76. Vinas ve ZYFA ortamlarından elde edilen *T. versicolor* ham lakkaz enzim aktivitesine pH'nın etkisi

4.16. *F. trogii* ve *T. versicolor* Peletlerinin Ürettiği Lakkazın Sıcaklık Kararlılığı

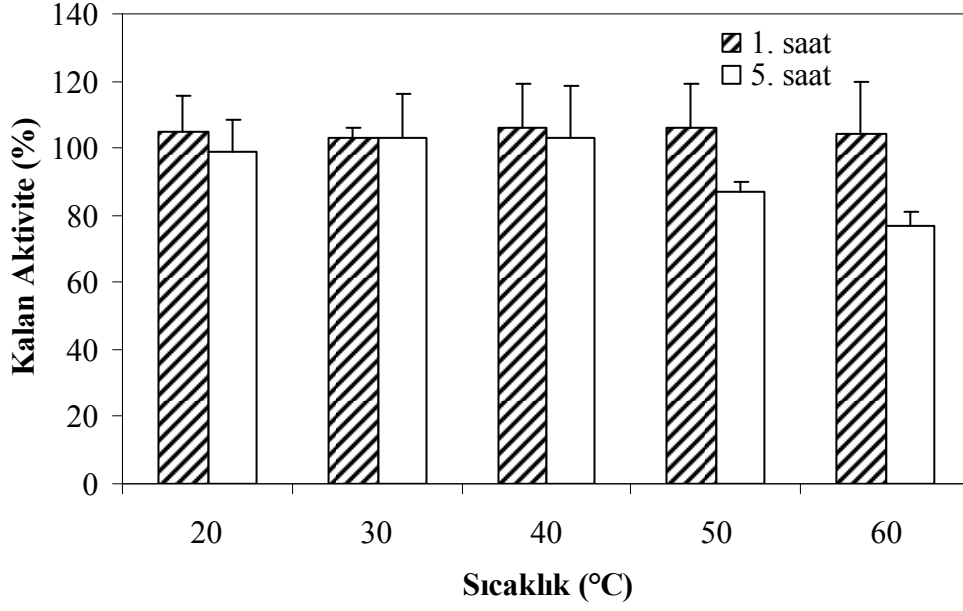
Optimum koşullar belirlendikten sonra %25'lik vinas ve %25'lik ZYFA ortamında *F. trogii*'nin ve *T. versicolor*'un uygun pelet miktarlarıyla tekrarlı kesikli çalışmalar yapıldı.

F. trogii ile vinas ortamında yürütülen kültür ortamından alınmış ekstraselüler sıvı farklı sıcaklıklarda 1 ve 5 saat bekletildikten sonra enzim aktivitesi ölçüldü (Şekil 4.77). Enzim 20, 30 ve 40°C’de kararlı kalırken, 50 ve 60°C’de 5 saat inkübasyon sonrası enzim aktivitesinin düştüğü tespit edildi. Yine de bu sıcaklıklarda bekletilme sonrasında bile yüksek enzim değerleri (0.83 ve 0.65 U/ml) elde edildi. Örneğin 50 °C’de 5 saat inkübasyon sonrası aktivitede sadece %31 azalış olmuştur.

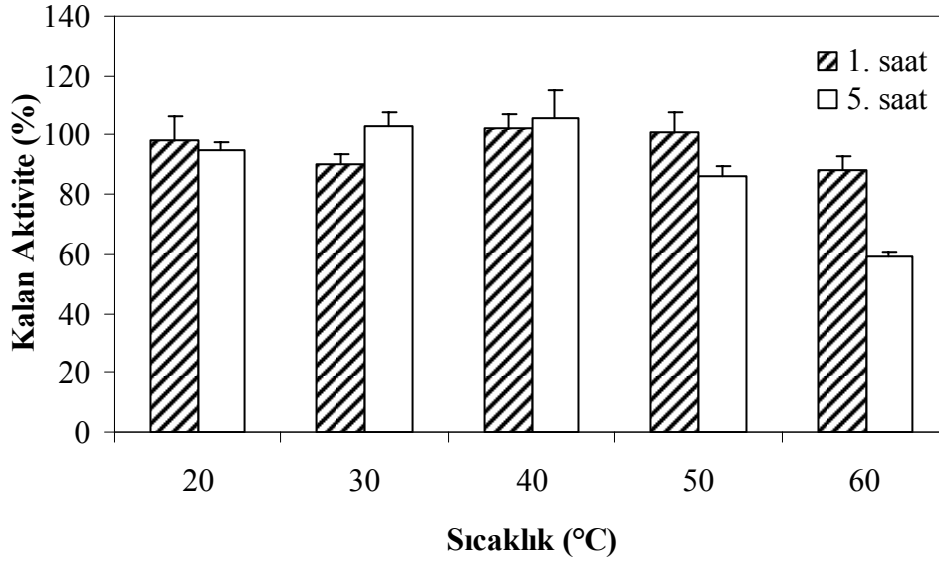


Şekil 4.77. Vinas ortamında *F. trogii* peletleriyle üretilen lakkaz enziminin kararlılığına sıcaklığın etkisi

Benzer olarak, %25’lik ZYFA ortamından elde edilen kültür sıvısında sıcaklık kararlılığının yüksek olduğu saptandı (Şekil 4.78).

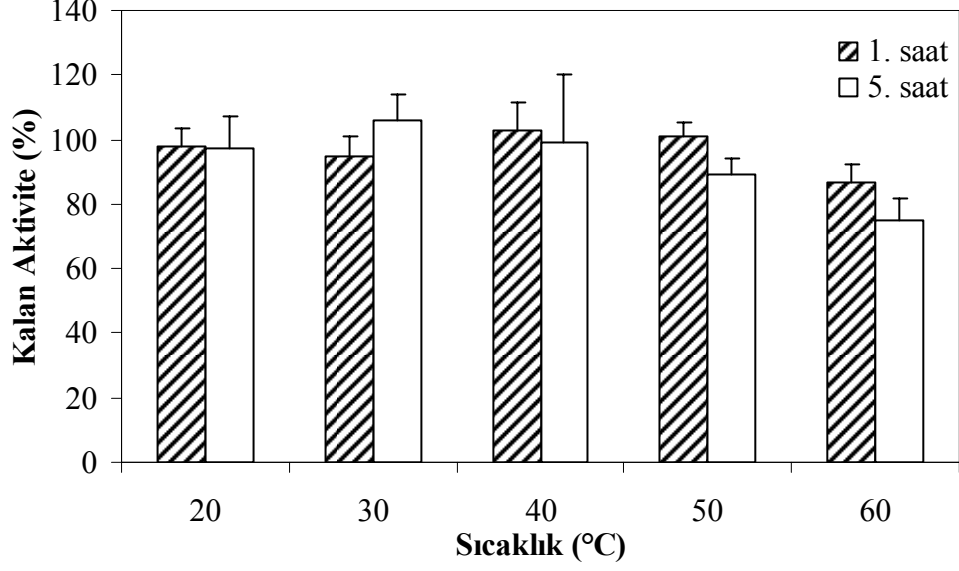


Şekil 4.78. ZYFA ortamında *F. troglia* peletleriyle üretilen lakkaz enziminin kararlılığına sıcaklığın etkisi



Şekil 4.79. Vinas ortamında *T. versicolor* peletleriyle üretilen lakkaz enziminin kararlılığına sıcaklığın etkisi

T. versicolor'un vinas ve ZYFA kültür ortamlarından elde edilen enzim kaynağının da sıcaklık kararlılığı *F. trogii* ile benzer bulundu (Şekil 4.79 ve Şekil 4.80).



Şekil 4.80. ZYFA ortamında *T. versicolor* peletleriyle üretilen lakkaz enziminin sıcaklık kararlılığı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, zeytin yağı fabrikası atık suyu ve alkol fabrikası atık suyu olan vinasın fungus peletleri için besiyeri olarak kullanılması sürecinde, endüstriyel ve biyoteknolojik açıdan önemi olan lakkazın üretimi ve üretiminin indüklenmesi hedeflenmiştir. Atık suların enzim üretiminde değerlendirilmesi sürecinde aynı zamanda çevresel kirliliğe yol açan atık suların biyolojik yöntemle iyileştirilmesinin gerçekleştirilmesi de amaçlanmıştır.

Zeytin yağı fabrikası atık suyu mevsimsel üretilen bir atıktır ve üretilen her litre zeytin yağı için yaklaşık 2.5 L atık su oluşmaktadır [6, 23, 24]. Atık suyun pH' sı 4.5-5 arasındadır ve içerdiği kolloidal maddeler nedeniyle bulanık bir görünüşe sahiptir. Aynı zamanda yüksek oranda organik ve inorganik madde içeren atık suyun BOİ ve KOİ değerleri sırası ile 100 ve 200 g/L' ye ulaşabilmektedir [27, 43-45].

Literatürde ZYFA'nın organizmalar üzerine toksik ve genotoksik etkilerini rapor eden çalışmaların var olduğu görülmektedir [46].

Ülkemizde zeytin yağı üretimi daha çok Ege ve Marmara bölgesinde gerçekleştirilmektedir. Aydın, İzmir, Muğla, Balıkesir, Manisa, Çanakkale [9] ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden de Gaziantep üretimin gerçekleştirildiği başlıca illerimizdir. Zeytin yağı üretimini gerçekleştiren pek çok küçük işletme, atıklarını herhangi bir arıtım işleminden geçirmeksizin, dolayısıyla Türk Çevre Mevzuatı'nda belirtilen parametrelerini atık su deşarj standart değerlerine getirmeden, doğrudan alıcı ortama vermektedir.

Zeytin yağı fabrikası atık suyu doğrudan sucul ortama verilirse organik yükün fazla olması nedeniyle çevresel kirliliğe neden olur. Buharlaştırma, seçici membran kullanımı, H₂SO₄ eklenerek nötralizasyon, O₃ ile oksidasyon, O₃/ H₂O₂ ve fenton ayırıcı gibi çeşitli fiziko-kimyasal arıtma metotları zeytin yağı fabrikası atık suyunun arıtımı amacıyla önerilmektedir. Bu metotlar oldukça pahalıdır ve bu nedenle biyolojik metotlar (aerobik ve anaerobik prosesler) araştırılmaktadır [23, 173].

Zeytin yağı üretimi sonrasında oluşan atık sular karasu olarak da adlandırılmaktadır. Askıda katı madde (AKM), pektinler, şeker, fenolik bileşikler ve bitkisel yağları büyük miktarlarda içermektedir. Diğer taraftan, içerdiği aromatik bileşikler, basit ve kompleks şekerlerden dolayı yüksek enerji kaynağı potansiyeline sahiptir [9].

Vinas, fermentasyon yoluyla etil alkolün üretimi sırasında açığa çıkan, parçalanabilir maddeler açısından zengin, koyu renkli bir atık sudur [62-64]. Rengi melanoidinden gelmektedir [66, 68] ve mikroorganizmalar tarafından yıkımı zor bir polimerdir [62]. Vinas, kısa sürede çok miktarda üretildiği için çevre kirleticisi bir etmendir. Üretilen her 1 L alkole karşılık 10-15 L vinas açığa çıkmaktadır [62, 69-71] ve vinasın da toksik etkisi rapor edilmiştir [68]. Vinas organik madde içeriği nedeniyle zengin bir kaynak olduğundan besiyeri olarak kullanılabilir [71, 75, 171].

Ülkemizde 22 yerde şeker fabrikası bulunmaktadır ve sadece Malatya, Eskişehir, Erzurum ve Turhal'daki şeker fabrikaları alkol ünitesine sahiptir [174]. Eskişehir alkol fabrikası hariç diğerlerinde arıtım sistemi olmadığından, bu tesislerin çevreye verdikleri zararlar nedeniyle 2002 yılından itibaren faaliyetleri durdurulmuştur.

Her iki atık suyun negatif etkileri, koyu renkli olması ve organik madde yükünün yüksek olması nedenlerinden dolayı arıtımı yapılmadan çevreye verilmesi durumunda çok ciddi çevresel problemlere neden olacağından, arıtılmaları ve/veya değerlendirilmeleri şarttır.

Atık suların arıtılmadan çevreye verilmesi konusunun önemli olması kadar, atık suların arıtımı sırasında kullanılacak yöntemin etkin, ucuz ve çevre dostu olması da önemlidir.

Beyaz çürükçül fungusların lakkaz, ligninaz ve Mn peroksidaz gibi enzimleri sentezleyebilme yetenekleri çevre ve atık biyoteknolojisi açısından önemlidir. Endüstriyel ve çevresel kirleticilerin giderimi ya da arıtımı için enzimlerin kullanımında enzimlerin etkinliği ve seçiciliği nedeniyle son yıllarda bu konulara ilgi artmaktadır. Ksenobiyotiklerin yıkımı ve endüstriyel atık suyun toksik ve fenolik bileşiklerin giderimi için lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkazların değerlendirilebileceği bildirilmektedir [121].

Lakkaz, pek çok bileşiği okside etme özelliğine sahiptir. Bu nedenle endüstriyel atık suların biyoteknolojik arıtımında ve ksenobiyotiklerin okside edilmesi/biyolojik yıkımında kullanılmaktadır [175, 176]. Daha önce de belirttiğimiz gibi lakkazın pek çok uygulama alanı vardır. Literatürde, atık su ortamında enzim üretimi konusunda fungus peletlerinin kullanılması çalışmaları sınırlıdır. Bu çalışmada fungus peletleriyle atık su ortamında lakkaz üretimi test edilmiştir.

Çalışmanın ilk kısmında, kullanılan atık suların içeriği analiz edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Organik yükü gösteren KOİ değeri vinas için 60.23 g/L ve ZYFA için de 59.54 g/L olarak saptanmıştır. Elde edilen değerler literatür verileriyle uyumludur [29, 53]. Atık suların kirlilik özelliği; işlenen hammaddenin olgunluk derecesi ve türüne, hammaddenin depolanma süresine, kültür toprağına, işleme yöntemine, iklim şartlarına, kullanım suyu miktarına göre farklılık göstermektedir [6, 7]. Atık su içeriğinde var olan bazı farklılıkların bu nedenlerden dolayı olduğu düşünülmektedir.

Peletlerle yürütülen çalışmalarda öncelikle *F. trogii* peletleriyle vinas ve ZYFA ortamlarında optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. *F. trogii* peletleriyle vinas ortamında en yüksek lakkazın üretildiği pelet miktarı ve uygun atık konsantrasyonu tespit edilmiştir. Şekil 4.1-4.5’den de görülebileceği gibi, uygun atık su konsantrasyonu olarak %25’lik konsantrasyon ve pelet miktarı olarak da 0.36 g pelet optimum olarak tespit edilmiştir. Besiyerindeki karbon ve azot kaynağı olarak kullanılacak maddelerin %10’luk atık suya göre daha fazla olması ve daha yüksek konsantrasyonlarda (%50 ve üstü) ise atığın tekrarlı kesikli süreçte pelet üzerine olası toksik etkisinden dolayı %25’lik atık su kullanılmıştır. ZYFA ortamında ise Şekil 4.37-4.41’den de görülebileceği gibi uygun atık su konsantrasyonu ve pelet miktarı olarak sırasıyla %25’lik atık su ve 0.82 g pelet saptanmıştır.

F. trogii ZYFA ortamında 150-250 rpm çalkalama hızlarında yüksek düzeyde lakkaz üretmiştir. Her iki atık su ortamında, lakkaz üretimi için 150 rpm çalkalama hızı ve 30°C sıcaklık derecesi optimum olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulguların literatür verileriyle uyum içerisinde olduğu görülmektedir [66, 93, 171, 177]. Van Der Merwe sıcaklığın lakkaz üretimine etkisi üzerine yaptığı çalışmada, lakkaz üretimi için en uygun sıcaklığın ışık varlığında 25°C olduğunu ve karanlıkta ise 30°C olduğunu saptamıştır. 30°C’den daha yüksek sıcaklıklarda kültüre edildiğinde ise ligninolitik enzim aktivitesinin azaldığını rapor etmiştir [106].

Başlangıç pH’sı 3-8’e ayarlanmış %25’lik vinas ve ZYFA ortamlarında lakkaz aktivitesinin maksimum olduğu pH aralığının belirlendiği çalışmalarda maksimum lakkaz aktivitesi, vinas ortamında pH 5-7, ZYFA ortamında ise pH 4-5 aralığında bulunmuştur. Asidik olan vinas ve ZYFA’nın pH’sı fungusla muamele sonrası artarken pH 7 ve 8’e ayarlanmış atık suların pH’sı da muamele sonrası düşmüştür. Kullandığımız vinasın pH

değeri 5.25 ve ZYFA'nın ise 4.75'tir. Bu değerler fungusların üreyebileceği pH aralığında olduğundan fungusla muamele öncesi pH değerini ayarlamaya gerek kalmamıştır.

Beyaz çürükçül funguslar kemoorganotrofik organizmalardır ve çok çeşitli organik kaynağı kullanabilirler. ZYFA ortamında lakkaz üretmeleri ve bu ortamda lakkazın indüklenebilmesi funguslar tarafından ZYFA içerisindeki karbon ve enerji kaynaklarını kullanabildiğini göstermektedir. ZYFA ortamında gözlenen lakkaz aktivitesindeki artış, atık su içerisindeki bazı toksik maddelere karşı fungusun fizyolojik bir yanıtıdır. ZYFA kateşol, kaffeik asit, 3,4-dihidroksifenoletanol ve diğer aromatik bileşikler içerir. Fenolik ve fenolik olmayan pekçok aromatik maddelerin lakkaz üretimini arttırdığı bilinmektedir. Bazı alifatik alkoller ve lignoselülozlu atıklar da benzer etki yapmaktadır [53]. *P. flavido-alba*'nın ZYFA ortamında inkübe edilmesi sonucu atık suyun fenol içeriğinin ve toksikliğinin azalmasıyla kültür ortamındaki enzimler arasında ilişki kurulabileceği ifade edilmiştir. Lakkazların ZYFA'daki toksik bileşiklerin etkisine karşı daha kararlı olduğu rapor edilmiştir [148].

Tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretiminde enzimi indüklemek için farklı konsantrasyonlarda glikoz, maya özütü, peynir altı suyu gibi ek kaynaklar ve bakır atık su ortamlarına eklenmiş ve lakkaz üretimine ve üretim verimine etkisi araştırılmıştır. Buna göre %25'lik vinas son konsantrasyonda 5 ve 10 g/L olacak şekilde glikoz eklenmesi uygulamanın 2-4. günler arasında kontrole göre farkın önemli ($p \leq 0.05$) olmasını sağlamıştır. 6 gün süresince elde edilen toplam lakkaz aktivitesine bakıldığında kontrolde toplam aktivitenin daha yüksek olduğu görülmektedir (Ek 7.1). Glikoz eklenmesinin %25'lik vinas ortamında *F. trogii* tarafından üretilen lakkaz aktivitesini artırıcı etkisi olmamıştır. Organizma tarafından hızlı ve etkili kullanılan substratlar lakkaz aktivitesinin yüksek olmasına neden olur. C. Galhaup ve arkadaşları [167] tarafından yapılan bir çalışmada *Trametes pubescens*'in lakkaz aktivitesini indüklemek amacıyla fungusun üreme ortamına çeşitli ek kaynaklar eklenmiş ve lakkaz aktivite değişimi incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda glikoz üreme ortamına eklenerek, lakkaz üretimine etkisi test edilmiştir. Glikoz konsantrasyonu 10 g/L'den 40 g/L'ye çıkarıldığında, lakkaz aktivitesinde 5 kat artış görülürken 60 g/L'ye çıkarıldığında lakkaz aktivitesinde bir artış elde edilmemiştir. Glikoz konsantrasyonunun artması lakkaz sentezinde lag fazının uzamasına yol açtığından yüksek glikoz konsantrasyonunun lakkaz üretimini baskıladığı ifade edilmiştir. Glikozun, *F. trogii*

peletlerinin ZYFA ortamında lakkaz üretimine pozitif etki yaptığı görülmektedir (Ek 7.2). Son konsantrasyonda 1g/L ve 2 g/L glikoz içeren ortamlarda 6. ve 9. günler hariç diğer günlerdeki sonuçların kontrol grupları ile arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Yine 5 ve 10 g/L konsantrasyonlarda da 10 gün süresince elde edilen günlere bağlı enzim aktivitesi kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında aralarındaki fark önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Toplam enzim aktivitesi açısından değerlendirildiğinde 10 g/L olacak şekilde glikoz içeren ortamlarda enzim aktivitesi kontrolden yaklaşık 2 kat daha yüksek bulunmuştur. Benzer verim artışı diğer glikoz konsantrasyonları için de geçerlidir.

Farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde maya özütünün vinas ortamına eklenmesi durumunda elde edilen enzim aktivitesi değişikliği Ek 7.3'de gösterilmektedir. %25'lik vinası 1 g/L olacak şekilde maya özütü eklenerek *F. trogii* peletleriyle yapılan tekrarlı kesikli çalışmada, lakkaz aktivitesi kontroller ile karşılaştırıldığında bazı günlerdeki aktivite değeri arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Vinas ortamına maya özütünün eklenmesi *F. trogii*'nin lakkaz üretim yeteneğinde artış oluşturmazken, %25'lik ZYFA ortamında maya özütü lakkaz üretimini indüklemiştir. Ek 7.4'den de görüldüğü gibi 1 g/L ve 2 g/L olacak şekilde maya özütü içeren ortamlarda günlere bağlı elde edilen lakkaz aktivitesi kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında fark anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). 1 g/L maya özütü içeren ortamda enzim aktivitesi kontrole göre yaklaşık 2 kat artmıştır. Maya özütünün lakkaz üretimine pozitif etkisi zengin içeriği ile ilgili olabilir. Beyaz çürükçül funguslarda ligninolitik enzimlerin sentezinin düzenlenmesinde azotun önemli bir faktördür [178].

Farklı konsantrasyonlarda bakır eklenmiş vinas ortamında *F. trogii* peletleriyle yapılan tekrarlı kesikli çalışmada kontrol gruplarına kıyasla 0.5 mM bakır için 2., 3. ve 4. günlerde fark önemli ($p \leq 0.05$), 1.0 mM için 1. gün hariç diğer günlerdeki fark önemli ($p \leq 0.05$), 2.0 mM için ise ilk iki gün hariç diğer günler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$) ve 2.0 mM bakırın eklenmesi toplam enzim aktivitesini yaklaşık 10 kat artırmıştır. Bu süreçte hem fungusun kullanım süresi uzamış hem de yüksek düzeyde aktivite artışı ve devamlılığı elde edilmiştir (Ek 7.5). ZYFA ortamında da benzer pozitif etki gözlenmiştir. Bakır eklenmesiyle özellikle ilk 2 gün, kontrole göre enzim aktivitesi yaklaşık 5 kat artmıştır. Bakır toplam enzim aktivitesini de önemli oranda artırmıştır (Ek 7.6). Birhanlı ve Yeşilada'nın [177] yaptığı bir çalışmada stok temel besiyerine son

konsantrasyonu 0.5 mM olacak şekilde bakır eklenmiş ve bu ortamlarda hem *F. trogii* hem de *T. versicolor*'un lakkaz üretim yeteneği araştırılmıştır. Bakır uygulanmasına bağlı olarak *F. trogii*'nin enzim aktivitesi 40 kat artarken, *T. versicolor*'un aktivitesi 15 kat artmıştır. Galhaup vd. [167] tarafından yapılan çalışmada, *T. pubescens*'in üreme ortamına lakkaz indükleyicisi olarak bakır eklenmiş ve lakkaz sentezinin üremenin 48. saatinde 2.0 mM bakırın eklenmesiyle indüklendiği tespit edilmiştir. Mechichi vd. [102] *T. versicolor*'un üreme ortamına bakır eklenmesinin lakkaz üretimini belirgin bir şekilde indüklediğini rapor etmiştir. Couto vd. [93] lakkazın üretimini artırmak için arpa kepeği ortamına bakır ve 2,5 ksilidin eklemişler ve 1.0 mM bakır ve 2.0 mM ksilidin eklenmesi durumunda lakkazın 5 kat arttığı tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada da %25'lik vinas ortamına 2.0 mM bakır eklendiğinde ve *F. trogii* peletlerinin ürettiği lakkaz aktivitesi 10 kat arttırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar literatür verileriyle uyumludur.

Bakırın, lakkaz üretimine etkisi tam olarak açık değildir. Bunun için olası 2 mekanizma düşünülmektedir. Birincisi, oksidatif strese karşı lakkazın savunma rolü nedeniyle sentezinde artış olduğudur. İkinci açıklama ise, lakkazın melanin sentezinde bir etkiye sahip olmasıdır [177]. *Trametes versicolor* bakır içeren ortamlarda üretildiğinde, lakkaz aktivitesi ve *lcc* mRNA üzerine bakırın transkripsiyon düzeyinde etkili olduğu tespit edilmiştir [178, 179]. Bakır konsantrasyonunun artışına bağlı olarak hem enzim aktivitesinin hem de *lcc* transkripsiyonunun arttığı bulunmuştur. Bu korelasyon, *lcc* ifadesinin düzenlenmesinde bakırın rolünün olduğunu göstermektedir. Ökaryotik organizmalarda metalloprotein ifadesi ağır metallerin oranıyla indüklenir. Burada bir intraselüler metal düzenleyici protein hem metal reseptör hem de trans-etkili transkripsiyon faktörü olarak çalışır [178].

F. trogii peletlerinin son konsantrasyon %5, %10 ve %20'lik olacak şekilde peynir altı suyu içeren vinas ortamında inkübasyonu lakkaz üretimini artırmamış aksine baskılamıştır. (Ek 7.7) ZYFA ortamında ise, lakkaz üretimi %20 oranında peynir altı suyu içeren ZYFA kültürü hariç önemli oranda indüklenmiştir (Ek 7.8).

Tutuklamanın etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, aljinat jele tutuklanmış funguslarla (10 g, 20 g ve 30 g) %25'lik vinas ortamında yapılan tekrarlı kesikli çalışmalarda günlere bağlı olarak kontrollerle karşılaştırılma yapıldığında 10 g tutuklanmış fungus kullanıldığında, lakkaz aktivitesi serbest hücrelerin aktivitesinden daha düşük

bulunmuştur. 20 g kullanılan çalışmalarda ilk 3 gün ve 5. günde kontrolden düşük, diğer günlerde ise kontrole arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). 30 g tutuklanmış peletin kullanıldığı çalışmada ise 3. ve 4. gün hariç diğer günlerde kontrole arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). 20 ve 30 g tutuklanmış ve serbest hücre kullanılan çalışmalarda, tutuklanmış hücrelerin kullanım sayısının arttığı görülmüştür (Ek 7.9). Buna bağlı olarak, toplam enzim aktivitesi de kontrole göre daha yüksek çıkmıştır. Bishnoi ve Kumar [180]'ın yaptığı çalışmada aljinat jele tutuklanmış *Trichoderma viride*'nin 25 seferden daha fazla kullanıldığı ve rejenerasyon etkinliğinin %75-78 olduğu tespit edilmiştir. Aljinat jele tutukladığımız funguslarla yaptığımız çalışmada, tutuklanmış funguslarla elde edilen lakkaz miktarı kontrole göre daha yüksektir. Elde ettiğimiz sonuçlar hücre kullanım sayısının artışı bakımından literatür verileriyle benzerlik göstermektedir. Aljinat jele tutuklanmış *F. trogii* ile %25'lik ZYFA ortamında yapılan çalışmada ise tutuklamanın 10 günlük süreçte lakkaz üretimine pozitif bir etkisi gözlenmemiştir. Toplam verim (10 günlük) açısından da aljinat jele tutuklama pozitif etki yapmamıştır (Ek 7.10).

Aktif karbon ve çam kozalağına tutuklanmış *F. trogii* peletleri ile %25'lik vinas ortamında yapılan tekrarlı kesikli çalışmalar günlere bağlı olarak kontrolleriyle karşılaştırıldığında, aktif karbona tutuklanmış fungusla yapılan çalışmada 5. gün hariç diğer günlerdeki enzim aktivite değerlerinin kontrole göre önemli düzeyde farklılık gösterdiği bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Çam kozalağına tutuklanmış hücrelerle yapılan çalışmada ise son gün hariç bütün günlerde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Aktif karbon ve çam kozalağına tutuklamanın da toplam enzim aktivitesinde kontrole göre artış meydana getirdiği görülmektedir (Ek 7.11). Tutuklama enzim üretim verimini arttırmıştır. Aktif karbona tutuklama *F. trogii*'nin %25'lik ZYFA ortamında lakkaz üretim yeteneğini özellikle 8. günden itibaren indüklemiş ve 8. günden sonraki günlerde elde edilen aktiviteler kontrolleri ile karşılaştırıldığında fark önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Bununla birlikte aktif karbona tutuklanmış fungusla elde edilen 15 günlük enzim aktivitesi kontrolden daha düşüktür. Çam kozalağına tutuklama ise 2. günden itibaren kontrole göre enzim aktivitesini önemli oranda indüklemiştir ($p \leq 0.05$). Toplam enzim aktivitesi de belirgin şekilde yüksektir (Ek 7.12). Couto vd. [93] yaptıkları bir çalışmada *T. hirsuta*'yı aljinat jel, poliüretan köpük ve paslanmaz çelik gibi taşıyıcılara

tutuklamışlar ve lakkaz üretim yeteneğini araştırmışlardır. 8 günlük inkübasyon sonucunda en yüksek lakkaz aktivitesi 800 U/L ile paslanmaz çelik süngere tutuklama sonucunda elde edilmiş ve kültür ortamına 1.0 mM bakır eklendiğinde aktivitenin 2200 U/L'ye ulaştığı rapor edilmiştir. Prasad vd. [181] poliüretan köpük üzerine tutuklanmış *Pleurotus ostreatus*'un lakkaz üretim verimini araştırmışlar ve tutuklanmış hücrelerin lakkaz aktivitesinin serbest hücrelere göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

T. versicolor peletleriyle de vinas ve ZYFA ortamlarında optimizasyon çalışmaları yapılmış ve Şekil 4.18-4.22 ve Şekil 4.55-4.59'den de görülebileceği gibi vinas ve ZYFA için uygun konsantrasyon %25 olarak saptanırken en uygun pelet miktarı 0.588 g pelet olarak saptanmıştır.

T. versicolor için optimum lakkaz üretim sıcaklığı 30°C ve optimum çalkalama hızı da 150 rpm olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgular literatür verileriyle uyum içerisindedir [66, 106, 171, 182]. *T. versicolor* için vinas ortamında optimum pH aralığı 5-8 olarak saptanırken, ZYFA için pH 4 olarak saptanmıştır. Atık suların başlangıç pH'ları fungus için uygun pH aralığında olduğundan değiştirilmemiştir.

Farklı miktarlarda glikoz eklenmiş vinas ortamında *T. versicolor* peletleriyle yapılan tekrarlı kesikli çalışmada elde edilen lakkaz aktivite değerleri günlere bağlı olarak kontrolleriyle karşılaştırıldığında, son konsantrasyonda 1 g/L glikoz eklenmesi enzim aktivitesini 4. ve 5. günler hariç olumsuz etkilemiştir. Benzer olarak 2 g/L konsantrasyonda aktivite 4., 6. ve 7. gün hariç kontrolden daha düşük bulunmuştur. Son konsantrasyonu 5 g/L olacak şekilde ortama glikoz eklenmesi ise 4., 6., 7. ve 8. günlerde enzim aktivitesini pozitif etkilemiş, bu artış kontrole göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). 10g/L'de de 4., 6., 7., 8. ve 9. günlerdeki enzim aktivite değerleriyle kontrol arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Toplam enzim aktivitesi glikoz konsantrasyonu artışına bağlı olarak artmış fakat kontrolde elde edilen aktivite toplamını geçmemiştir (Ek 7.13). Modifiye edilmiş *Trametes* üretim ortamına farklı konsantrasyonlarda bakır ve glikoz eklenerek yapılan çalışmada glikoz artışına bağlı olarak enzim aktivitesinin düştüğü ve karbon sınırlı ortamda enzim aktivitesinin maksimuma ulaştığı rapor edilmiştir [168]. *T. versicolor* peletlerinin glikoz içeren %25'lik ZYFA ortamında inkübasyonu sonucunda elde edilen 15 günlük toplam verim 5 ve 10 g/L glikoz içeren kültürlerde kontrolden daha yüksek bulunmuştur (Ek 7.14). 5 g/L konsantrasyonda

ilk 9 gündeki lakkaz aktivitesi kontrol gruplarından daha yüksek çıkmış ve fark anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). 10 g/L konsantrasyon için ise ilk 13 gün içinde 12. gün dışında diğer günlerde lakkaz aktivitesinin kontrol grubuyla arasındaki fark istatistiksel bakımdan önemlidir ($p \leq 0.05$).

Farklı konsantrasyonlarda maya özütü eklenen vinas ortamlarında bazı günlerdeki enzim aktivite değerlerinde kontrolüyle arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuş olsa da, toplam enzim aktivitesine bakıldığında maya özütünün enzim aktivitesini indüklediği görülmektedir (Ek 7.15). %25'lik ZYFA ortamında maya özütü eklenmesi ise *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretim yeteneğini indüklemiştir. Özellikle son konsantrasyonda 2 g/L ve 5 g/L olacak şekilde maya özütü eklenmesi peletlerin 15 günlük toplam lakkaz üretim verimini önemli ölçüde artırmıştır (Ek 7.16). Bu miktarlarda maya özütü eklenmesi ilk bir kaç kullanım sonrasında lakkaz üretim verimini önemli oranda etkilemiştir ($p \leq 0.05$).

Bakırın 0.5 mM son konsantrasyon olacak şekilde %25'lik vinas ortamına eklenmesi *T. versicolor* peletlerinin çok az arttırmıştır. Son konsantrasyonda 1.0 mM bakır 9. günden 14. güne kadar enzim aktivitesi üzerinde istatistiki olarak önemli etki yaparken ($p \leq 0.05$) 2.0 mM bakır içeren kültürünün 12-15. günlerdeki aktivite değerleri ile kontroller arasında fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Toplam enzim aktivitesi değerlendirildiğinde 0.5 mM ve 1.0 mM bakırın eklenmesi durumunda enzim aktivitesi hafif bir oranda indüklenmiştir. 2.0 mM bakır kültürleriyle ilk günler de düşük enzim aktivitesi elde edilirken 3. günden sonra artmaya başlamıştır (Ek 7.17). *T. versicolor* ile ZYFA ortamında yürütülen çalışmalarda ise 0.5 ve 1 mM bakır eklenmesi lakkaz üretimini önemli oranda etkilemiş fakat 2 mM bakır *T. versicolor*'un lakkaz üretim verimini etkilememiştir. 1.0 mM konsantrasyonda 5. gün hariç, ilk 10 gün içerisindeki fark önemli bulunmuş ($p \leq 0.05$) ve 2.0 mM konsantrasyonda ilk 4 gündeki fark anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$) (Ek 7.18). Modifiye *Trametes* üretim ortamına farklı konsantrasyonlarda bakır ve glikoz eklenerek yapılan çalışmada optimal bakır konsantrasyonu 75 μ M olarak bulunmuş ve bu konsantrasyonda bakır eklenmesi durumunda kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında lakkaz aktivitesinin 4 kat arttığı saptanmıştır. Daha yüksek bakır konsantrasyonunda lakkaz aktivitesinin azaldığı rapor edilmiş ve fungal metabolizma üzerine yüksek konsantrasyondaki bakırın toksik etkisi bildirilmiştir [168].

Vinas ortamına peynir altı suyu eklenmesi *T. versicolor* peletlerinin lakkaz üretim yeteneğini hiç bir durumda etkilememiştir (Ek 7.19). ZYFA ortamlarında ise %5'lik olacak şekilde peynir altı suyu eklenmesi durumunda *T. versicolor*'un lakkaz enzim aktivitesi kontrole göre 5. gün hariç, diğer 3-11. günler arasında fark önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). %10'luk peynir altı suyu eklenmesi durumunda ilk iki gün enzim aktivitesi kontrole göre düşük çıkmış fakat diğer günlerin kontrolleriyle arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). %20'lik konsantrasyonda ise ilk 3 günkü enzim aktivite sonuçları kontrole göre daha düşük çıkmıştır. 15 günlük süreçte ilerleyen günlerdeki fark önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Toplam enzim aktivitesi ise eklenen peynir altı suyu miktarına bağlı olarak artmıştır (Ek 7.20).

Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor* farklı oranlarda olacak şekilde %25'lik vinas ortamına konulmuş ve tekrarlı kesikli çalışmalar yapılmıştır. 20 g kullanılan çalışmada ilk 2 ve son 2 gündeki enzim aktivitesi kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında arasındaki fark anlamlı ($p \leq 0.05$), 30 g kullanılan çalışmada ise sadece son 2 günkü enzim aktivitesi değerleri ile kontrol grubuyla fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Toplam enzim aktiviteleri dikkate alındığında kontrol grubunda enzim aktivitelerinin daha yüksek olduğu Ek 7.21'de görülmektedir. *T. versicolor*'un tutuklanarak kullanılması, enzim üretiminde bir artışa neden olmamıştır. *T. versicolor*'un aljinat jele tutuklanması özellikle 20 ve 30 g tutuklanmış hücre kullanılması durumunda ZYFA ortamında lakkaz üretim yeteneği ve verimini artırmıştır. 10 g pelet kullanılan çalışmalarda serbest peletlerin tutuklanmış hücrelere göre lakkaz aktivitesi daha yüksekken, 20 g pelet kullanılan çalışmalarda elde edilen lakkaz aktivite değerleri kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında 7-18. günler arasında 12., 13. ve 17. günler hariç kontrol grubuyla arasındaki fark istatistiki olarak önemli ($p \leq 0.05$) ve 30 g kullanılan çalışmalarda da 1., 5. ve 12. günler hariç diğer günlerdeki fark önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$) (Ek 7.22).

Aktif karbon ve çam kozalağına tutuklanmış *T. versicolor* ile %25'lik vinas ortamında yapılan çalışmada aktif karbona tutuklamada 3-9. günler arasında 8. gün hariç diğer günlerde enzim aktivitesi sonuçları kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında fark önemli bulunmuş ($p \leq 0.05$) ve benzer olarak çam kozalağına tutuklamada 3-15. günler arasında 8. gün hariç diğer günlerde elde edilen lakkaz aktivitesi değerlerinin kontrol gruplarıyla arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Aktif karbona tutuklanmış funguslarla 10

günde elde edilen toplam lakkaz aktivitesinin kontrole göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Çam kozalağına tutuklanmış funguslar ise 15 gün süresince kullanılmış ve toplam enzim aktivitesi serbest hücrelerin toplam aktivitesinden daha yüksek saptanmıştır (Ek 7.23). M. Lorenzo vd. [182] yarı katı kültürde *T. versicolor* ile lakkaz üretimi konusunda çalışma yapmış ve bu çalışmada lakkaz üretimini arttırmak amacıyla kültür ortamına çözünmeyen lignoselülozik maddeler eklemiştir. Tarım endüstrisi atığı olması nedeniyle lignoselülozik materyal olarak üzüm tohumu, üzüm sapı ve arpa kepeği kullanmış ve özellikle arpa kepeği kullandıkları çalışmada kontrole göre 10 kat daha yüksek bir enzim aktivitesi (639 U/L) elde etmişlerdir. Aktif karbona tutuklanmış peletlerin, ZYFA ortamlarında kullanıldığı çalışmalarda bazı günlerde elde edilen lakkaz aktivite değerlerinin kontrol grupları ile arasındaki farkı anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Yine çam kozalağına tutuklanmış fungusların bazı günlerde elde edilen lakkaz aktivite değerlerinin kontrol grupları ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Ek 7.24). Zhang vd. [183] aktif karbona tutuklanmış *T. versicolor*'u, Asit viyole 7 boyasının renginin gideriminde kullanmış ve tutuklanmış hücreler ile daha yüksek oranda renk giderimi elde etmiş ve özellikle tutuklanmış peletlerin daha kararlı olduğunu vurgulamıştır. Cing ve Yeşilada [184] yaptıkları benzer çalışmada *F. trogii*'yi aktif karbona tutuklayarak boyanın rengini gidermedeki verimini saptamışlardır. Aktif karbona tutuklanmış peletlerin on günlük süreçte toplam renk giderim verimi (%88) serbest peletlerinkinden (% 69) daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da çam kozalağına tutuklanmış peletlerin 19. ve 20. kullanımlarında lakkaz aktivitesi kontrole göre daha yüksek bulunmuştur. Sonuçlar, tutuklamanın peletlerin kullanım sayısını arttırması açısından literatür verileriyle uyumludur.

Jaouani vd. [169] *P. sajor caju*, *C. polyzona*, *L. tigrinus* ve *P. coccineus*'un ZYFA'nın rengi ve KOİ'sini etkili bir şekilde giderdiğini rapor etmiştir.

Bu çalışmada biyolojik iyileştirme açısından serbest ve tutuklanmış *F. trogii* ve *T. versicolor*'un KOİ giderim yetenekleri araştırılmış ve %17-33 arasında KOİ giderimine ulaşılmıştır. Lanciotti vd. [35] ZYFA'nın arıtımı için *Yarrowia lipolytica*'nın 20 suşunu kullandıkları çalışmada mikroorganizmalar seyreltilmemiş ZYFA ortamında 25°C'de 72 saat inkübe edilmiş ve %1.47-%41.22 arasında KOİ giderimi saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada 24 saat içinde %17-33 oranlarında KOİ giderimi tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Robles vd. [117] zeytin yağı fabrikası atık suyu ortamından izole ettikleri *Chalara paradoxa*'nın 9 suşunun lakkaz üretim yeteneğini çalışmışlardır. ZYFA ortamından lakkaz enzimi üreten farklı soyların izole edilmesi, lakkaz üretiminin fenolik bileşiklerin detoksifikasyonunda rolünün olduğunu göstermektedir. Fenolik bileşiklerin toksisitesi nedeniyle atık suyun anaerobik arıtımı sürecinde inhibisyonun ana nedeni olduğu rapor edilmiştir. *A. terreus* ve *G. candidum* gibi bazı fungus türlerinin, arıtımın ilk safhasında hem atığın KOİ'sini azaltmak hem de fenolik inhibitörleri yok etmek amacıyla kullanılmakta olduğu bildirilmiştir. *A. niger*, *A. terreus* ya da *G.candidum*'larla atık suyun ön arıtımı ile, metajonik bakteriler üzerine bu fenollerin inhibitör etkisini azaltan aromatik ve taninlerin konsantrasyonu azalmaktadır [44].

Çalışmada ayrıca enzimin sıcaklık kararlılığı da araştırılmış ve enzimin 60°C'de bile yüksek oranda ve uzun süre kararlı kaldığı saptanmıştır. *F. trogii* peletleriyle %25'lik vinas ortamında yürütülen tekrarlı kesikli kültürden elde edilen ekstraselüler sıvı 5 saat 50°C'de bekletildiğinde, lakkaz aktivitesinde %31 ve 60°C'de bekletildiğinde %46 oranında azalma olmuştur. *T. versicolor* kültürlerden elde edilen ekstraselüler sıvı ile yapılan kararlılık çalışmasında ise 50°C'de %14 ve 60°C'de %41 aktivite kaybı olmuştur. *F. trogii* peletlerinin %25'lik ZYFA kültürlerinden elde edilen ekstraselüler sıvının sıcaklık kararlılığı çalışmasında 50°C'de %13 ve 60°C'de %23 oranında aktivite kaybı olduğu saptanmıştır. *T. versicolor*'un ZYFA ortamındaki kültür sıvısı için ise 50°C'de %11 ve 60°C'de %25 aktivite azalışı saptanmıştır. *Pycnoporus sanguineus*'un lakkaz aktivitesinin 35°C'de hızlı bir şekilde düştüğü rapor edilmiştir [185]. *Pleurotus sajor-caju*'nun enziminin 55°C ve 65°C'de 5 dakika bekletilmesinden sonra lakkaz aktivitesinin sırasıyla %40 ve %75 oranında azaldığı bildirilmiştir [186]. Ullrich vd. [187] tarafından yapılan çalışmada enzimin 40°C'de 25 dakikada bekletilmesi sonucunda lakkaz aktivitesininin %50'sinin kaldığı, 120 dakikadan sonra ise sadece %10'u kaldığı sonucu rapor edilmiştir. Vinas ve ZYFA ortamlarında üretilen ham lakkaz enziminin biyoteknolojik uygulamalarda avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak;

1) Atık suların, KOİ ve pH değerleri dikkate alındığında her iki atık suyun mutlaka değerlendirilmesi ve/veya arıtılması gerektiği görülmektedir.

- 2) Beyaz çürükçül fungus peletlerinin atık suların biyolojik iyileştirilmesinde kullanımına yönelik model çalışmalar artırılmalıdır.
- 3) Beyaz çürükçül fungusların pelet formunda kullanılması uygulama açısından avantaj sağlayacaktır.
- 4) Bu atık sular peletler için besiyeri olarak kullanılabilir ve uygun indükleyicilerle yüksek miktarda enzim üretilebilir.
- 5) Atık su ortamlarında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi, hem atık suyun değerlendirilmesi hem de çevre kirliliği riskinin azaltılması anlamında yararlı olabileceği ifade edilebilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] www.cedgm.gov.tr/cevreatlasi/sanayicevre.pdf
- [2] E. Apohan, “Zeytin Yağı Fabrikası Atık Su Probleminin Çözümünde Biyoteknolojik Yaklaşımlar”, Doktora Semineri, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2003.
- [3] B. Otlu, “Peynir Altı Suyu ve Alkol Fabrikası Atık Sularının Arıtımı ve Değerlendirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2002.
- [4] A. K. Halkman, M. Atamer, A. H. Ertaş, “Endüstri ve Çevre İlişkileri II” Türkiye 5. Teknik Bildiriler Kongresi
- [5] Ö. Yeşilada, K. Fışkın, E. Yeşilada, *The use of white rot fungus *Funalia trogii* (Malatya) for the decolorization and phenol removal from olive mill wastewater*, **Environ. Technol.** Vol. 16 (1995) 95-100.
- [6] Ö. Yeşilada, *Zeytin Yağı Fabrikası Atık Suyunun Değerlendirilmesi ve Arıtımı*, **Biyoteknoloji Dergisi**, 2000, 24/2, 69-81 .
- [7] R. Borja, B. Rincon, F. Raposo, *Review Anaerobic biodegradation of two-phase olive oil mill solid wastes and liquid effluents: kinetic studies and process performance*, **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 81 (2006), 1450-1462.
- [8] P. Paraskeva, E. Diamadopoulos, *Technologies for olive oil mill wastewater (OMW) treatment: a review*, **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 81 (2006), 1475-1485.
- [9] Zeytin Karasuyu Arıtımı Projesi: EBSO Projesi Kapsamındaki Zeytin yağı İşletmeleri İçin Durum Tespiti, Karasu Karakteizasyonu, Karasu Arıtılabilirlik Çalışmaları ve Sonuçları, Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü Kasım, (2003), İzmir
- [10] İTO Raporu: Zeytin-Zeytin Yağı Sektör Araştırması, (2001), İzmir
- [11] T. Işıklı, “Türkiye’de Zeytin Alt Ürünlerinin Üretimi ve Değerlendirme Durumu, Sorunları ve Çözüm Yolları”, Uluslararası Zeytin Yağı Teknolojisi ve Yan Ürünleri Değerlendirme Semineri, 20-24 Ekim, 1986, İzmir.
- [12] A. G. Gomez, A. Roig, M.P. Bernal, *Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity*, **Bioresource Technol.** 86 (2003) 59-64.
- [13] A. Linares, J. M. Caba, F. Ligeró, T. Rubia, J. Martínez, *Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip using *Phanerochaete flavido-alba**, **Chemosphere** 51 (2003) 887-891.
- [14] A. G. Vlyssides, M. Loizides, P. K. Karlis, *Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products*, **J. Clean.Prod.** 12 (2004) 603-611.
- [15] J. Martín, I. Sampedro, I. G. Romera, J. M. G. Garrido, J. A. Ocampo, *Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Glycine max*) and lettuce (*Lactuca sativa*) and phytotoxic effects of olive mill residues*, **Soil Biol. Biochem.** , 34 (11) (2002) 1769-1775.
- [16] M. Masghouni, M. Hassairi, *Energy applications of olive-oil industry by-products: I The exhaust foot cake*, **Biomass Bioenerg.** 18 (2000) 257-262.
- [17] M. Ahmadi, F. Vahabzadeh, B. Bonakdarpour, M. Mehranian, *Empirical modeling of olive oil mill wastewater treatment using loofa-immobilized *Phanerochaete chrysosporium**, **Process Biochem.**, 41 (5) (2006) 1148-1154.

- [18] D. Atanossova, P. Kefalas, E. Psillakis, *Measuring the antioxidant activity of olive oil mill wastewater using chemiluminescence*, **Environ. Int.**, 31 (2) (2005) 275-280.
- [19] A. F. Jose, Volarization of olive by-products, F.A.O. 500 C, 130-131 Madrid.
- [20] www.fiw.rwthachen.de/improlive/englisch/rsanfall/abwasser/anaerob.html.
- [21] www.maviegemuhendislik.com
- [22] www.sba-int.ch/pdf/files/ANAEROBICTREATMENT.pdf
- [23] M. S. Fountoulakis, S. N. Dokianakis, M. E. Kornaros, G. G. Aggelis, G. Lyberatos, *Removal of phenolics in olive mill wastewater using the white rot fungus *Pleurotus ostreatus**, **Water Res.**, 36 (2002) 4735-4744.
- [24] A. Dhouib, F. Aloui, N. Hamad, S. Sayadi, *Pilot-plant treatment of olive mill wastewaters by *Phanerochaete chrysosporium* coupled to anaerobic digestion and ultrafiltration*, **Process Biochem.**, 41 (2006) 159-167.
- [25] Anonim, *Türk Çevre Mevzuatı*, Türk Çevre Vakfı Yayınları, 1988.
- [26] D. Quaratino, A. D'Annibale, F. Federici, C. F. Cereti, F. Rossini and M. Fenice, *Enzyme and fungal treatments and a combination thereof reduce olive mill wastewater phytotoxicity on *Zea mays* L. seeds*, **Chemosphere**, 66 (9) (2006) 1627-1633.
- [27] M. Kissi, M. Mountadar, O. Assobhei, E. Gargiulo, G. Palmieri, P. Giardina, G. Sannia, *Roles of two white rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill wastewater*, **Appl. Microbiol Biotechnol.**, (2001) 57: 221-226.
- [28] A. Jaouni, S. Sayadi, M. Vanthourhout, M. J. Pennickx, *Potent fungi for decolorisation of olive oil mill wastewaters*, **Enzyme Microb. Tech.**, 33 (2003) 802-809.
- [29] A. Robles, R. Lucas, G. A. Cienfuegos, A. Galvez, *Biomass production and detoxification of wastewater from the olive oil Industry by strain of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds*", **Bioresource Technol.**, 74 (2000) 217-221.
- [30] F. Baubaker, B. C. Ridha, *Anaerobic co-digestion of olive mill wastewater with olive mill solid waste in a tubular digester at mesophilic temperature*, **Bioresource Technol.**, 98 (2007) 769-774.
- [31] A. Mekki, A. Dhouib, S. Sayadi, *Changes in microbiol and soil properties following amendment with threated and untreated olive mill wastewater*, **Microbiol. Res.**, 161 (2006) 93-101.
- [32] R. Borja, B. Rincon, F. Raposo, J. Alba, A. Martin, *A study of anaerobic digestibility of two-phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature*, **Process Biochem.**, 38 (5) (2002) 733-742.
- [33] P. L. Buldini, A. Mevoli, A. Quirini, *Online microdialysis-ion chromatographic determination of inorganic anions in olive-oil mill wastewater*, **Journal of Chromatography A**, 882 (2000) 321-328.
- [34] C. J. Israilides, A. G. Vlyssides, V. N. Mourafeti, G. Karvouni, *Olive oil wastewater treatment with the use of an electrolysis system*, **Bioresource Technol.**, 61 (1997) 163-170.
- [35] R. Lanciotti, A. Gianotti, D. Baldi, R. Angrisani, G. Suzzi, D. Mastrocola, M. E. Guerzoni, *Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive oil mill wastewater*, **Bioresource Technol.**, 96 (3) (2004) 317-322.

- [36] A. B. Sassi, A. Boularbah, A. Jaouad, G. Walker, A. Boussaid, *A comparison of olive oil mill wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco*, **Process Biochem.**, 41 (2006) 74-78.
- [37] L. C. Davies, J. M. Novais, S. Martins-Dias, *Influence of salts and phenolic compounds on olive mill wastewater detoxification using superabsorbent polymers*, **Bioresource Technol.**, 95 (2004) 259-268.
- [38] N. Assas, L. Ayed, L. Marouani, M. Hamdi, *“Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewaters by Geotrichum candidum”* **Process Biochem.**, 38 (2002) 361-365.
- [39] F. Kachouri, M. Hamdi, *Enhancement of polyphenols in olive oil by contact with fermented olive mill wastewater by Lactobacillus plantarum*, **Process Biochem.**, 39 (2004) 841-845.
- [40] D. Di Gioia, F. Fava, L. Bertin, *Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 55 (2001) 619-626.
- [41] M. B. Coşkun, T. Akbaş, *Zeytin Yağı İşletmelerindeki Atık Suların İşletme İçerisinde Değerlendirilmesine Yönelik Bir Uygulama Örneği*, Ulusal Sanayi-Çevre Sempozyumu ve Sergisi 25-27 Nisan (2001) Mersin.
- [42] A. Tsioulpas, D. Dimou, D. Iconomou, G. Aggelis, *Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of Pleurotus spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity*, **Bioresource Technol.**, 84 (2002) 251-257.
- [43] M. Kotsou, A. Kyriacou, K. Lasaridi, G. Pilidis, *Integrated aerobic biological treatment and chemical oxidation with Fenton’s reagent for the processing of green table olive wastewater*, **Process Biochem.**, 39 (2004) 1653-1660.
- [44] S. Sayadi, N. Allouche, M. Jaoua, F. Aloui, *Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment*, **Process Biochem.**, 35 (2000) 725-735.
- [45] P. L. D’Acqui, E. Sparvoli, A. Agnelli, A. C. Santi, *Olive oil mills waste waters and clay minerals interactions: organics transformation and clay particles aggregation*, 17. WCSS Symposium, 14-21 August, 2002, Thailand.
- [46] E. Yeşilada, M. Özmen, Ö. Yeşilada, *Studies on the toxic and genotoxic effect of olive oil mill wastewater*, **Fresenius. Envir. Bull.** 8: (1999) 732-739.
- [47] A. Kyriacou, K. E. Lasaridi, M. Kotsou, C. Balis, G. Pilidis, *Combined bioremediation and advanced oxidation of green table olive processing wastewater*, **Process Biochem.**, 40 (2005) 1401-1408.
- [48] P. K. Thassitou, I.S. Arvanitoyannis, *“Bioremediation: a novel approach to food waste management”* **Trends Food Sci. Tech.**, 12 (2001) 185-196.
- [49] Ö. Yeşilada, S. Şık, M. Şam, *Treatment of olive oil mill wastewater with fungi*, **Tr. J. of Biology**, 23 (1999) 231-240.
- [50] H. Inan, A. Dimoglo, H. Şimşek, M. Karpuzcu, *Olive oil mill wastewater treatment by means of electro-coagulation*, **Sep. Purif. Technol.**, 36 (2004) 23-31.
- [51] F. J. Benitez, J. L. Acero, T. Gonzales, J. Garcia, *Organic matter removal from wastewater of the black olive industry by chemical and biological procedures*, **Process Biochemistry**, 37 (2001) 257-265.
- [52] G. Toscano, M. L. Colarieti, G. Greco, *Oxidative polymerisation of phenol by a phenol oxidase from green olives*, **Enzyme and Microb. Tech.**, 33 (2003) 47-54.

- [53] A. A. Dias, *Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater*, **Bioresource Technol.**, 92 (2004) 7-13.
- [54] L. Gianfreda, F. Sannino, M. T. Filazzola, A. Leonowicz, ‘*Catalytic behavior detoxifying ability of a laccase from the fungal strain Cerrena unicolor*’ **Journal of Mol. Catal. B: Enzymatic**, 4 (1998) 13-23.
- [55] S. Crognale, A. D’Annibale, F. Federici, M. Fenice, D. Quaratino and M. Petruccioli, *Olive oil mill wastewater valorisation by fungi*, **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 81 (2006), 1547- 1555.
- [56] M. Kotsou, I. Mari, K. Lasaridi, I. Chatzipavlidis, C. Balis, A. Kyriacou, *The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against Rhizotonia solani*, **Applied. Soil Ecology**, 26 (2004) 113-121.
- [57] T. Mechichi, S. Sayadi, *Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewaters*, **Process Biochem.**, 40 (2005) 139-145.
- [58] S. Engindeniz, Türkiye’de Şeker Pancarı Üretiminde ve Şeker İşlenmesinde İzlenen Politikalar İle Bu Konuda Bazı Öneriler, *Çiftçi ve Köy Dergisi* 99 (1993) 21-26.
- [59] www.yildiz.edu.tr/kanat/sekersan.htm-20k
- [60] M. Kahyaoglu, V. Konar, “*Şeker Fabrikası Atık Maddeleri Kullanılarak Pseudomonas aeruginosa’dan Ramnolipit Biyosümfektanı Elde Edilmesi*” **Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi** 18 (4), (2006) 493-498 .
- [61] Türkiye Çevre Atlası, ÇED ve Planlama Genel Müdürlüğü Çevre Envanteri
- [62] S. Kahraman, “*Endüstriyel ve Tarımsal Atıkların Biyoteknolojik Olarak Değerlendirilmesinde Yeni Bir Yaklaşım*” Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1998.
- [63] M. A. Martin, F. Raposo, R. Borja, A. martin, *Kinetic study of the anaerobic digestion of vinasse pretreated with ozone, ozone plus ultraviolet light, and ozone plus ultraviolet light in the presence of titanium dioxide*, **Process Biochemistry**, 37 (2002) 699-706.
- [64] S. Kahraman, Ö. Yeşilada, *Industrial and agricultural wastes as substrates for laccase production by white rot fungi*, **Folia Microbiol.**, 46 (2) (2001) 133-136.
- [65] E. Yeşilada, *Genotoxic activity of vinasse and its effect on fecundity and longevity of Drosophila melanogaster*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 63 (1999) 560-566.
- [66] Ö. Yeşilada, K. Fıfşkın, *Decolorization of alcoholic waste water by white rot fungi Coriolus versicolor, Funalia trogii and Phanerochaete chrysosporium ME446*, **Tr. J. Of Biology** 19 (1995) 191-200.
- [67] V. Kumar, L. Wati, F. FitzGibbon, P. Nigam, I.M. Banat, D. Singh, R. Marchant, *Bioremediation and decolorization of anaerobically digested distillery spent wash*, **Biotechnol. Let.**, 19:4 (1997) 311-313.
- [68] C. Raghukumar, C. Mohandass, S. Kamat, M.S. Shailaja, *Simultaneous detoxification and decolorization of molasses wash by the immobilized white rot fungus Flavodon flavus isolated from a marine habitat*, **Enzyme Microb. Tech.**, 35 (2004) 197-202.
- [69] M. Decloux, A. Bories, R. Lewandowski, C. Fargues, A. Mersad, M. L. Lameloise, F. Bonnet, B. Dherbecourt, L. N. Osuna, *Interest of electro dialysis to reduce potassium level in vinasses, preliminary experiments*, **Desalination**, 146 (2002) 393-398.

- [70] T. C. S. Lima, B. M. Grisi, M. C. M. Bonato, *Bacteria Isolated From Sugarcane Agroecosystem: Their Potential Production of Polyhydroxyalcanoates and Resistance to Antibiotics*, **Rev. Microbiol.**, 30 (1999) 214-224.
- [71] S. Kahraman, Ö. Yeşilada, *Effect of spent cotton stalks on color removal and chemical oxygen demand lowering in olive oil mill wastewater by white rot fungi*, **Folia Microbiol.**, 44 (6) (1999) 673-676.
- [72] J. G. O. Rodriguez, *Effects of vinasse on sugarcane (*Saccharum officinarum*) productivity*, **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**, 17 (2000) 318-326.
- [73] E. Madejan, M. J. Diaz, R. Lopez, F. Cabrera, *Co-composting of sugarbeet vinasse: influence of the organic matter nature of the bulking agents used*, **Bioresource Technol.**, 76 (2001) 275-278.
- [74] M. J. Diaz, E. Madejon, F. Lopez, R. Lopez, F. Cabrera, *Optimization of the rate vinasse/grape marc for co-composting process*, **Process Biochem.**, 37 (2002) 1143-1150.
- [75] M. J. Diaz, E. Madejon, F. Lopez, R. Lopez, F. Cabrera, *Compostin of vinasse and cotton gin waste by using two different systems*, **Resour. Conserv. Recy.**, 34 (2002) 235-248.
- [76] M. B. Benke, A. R. Mermut, H. Shariatmatmadari, *Retention of dissolved organic carbon from vinasse by a tropical soil, kaolinite and Fe-oxides* **Geoderma Geoderma**, 91 (1999) 47-63.
- [77] I. G. Lalov, M. A. Krysteva, J. L. Phelouzat, *Improvement of biogas production from vinasse via covalently immobilized methanogens*, **Bioresource Technol.**, 79 (2001) 83-85.
- [78] Ö. Yeşilada, Ş. F. Topçuoğlu, A. Ünyayar, S. Ünyayar, K. Fışkın, S. Bozcuk, *Şlempe (vinnase) içeren inkübsyon ortamında bazı beyaz çürükçül funguslarda absisik asid (ABA) üretimi*, X. Ulusal Biyoloji Kongresi 18-20 Temmuz, Erzurum, (1990).
- [79] Ö. Yeşilada, “Alkol Fabrikası Atığı Olan Şlempe (vinasse)’nin Biyolojik Olarak Değerlendirilmesi ve Beyaz Çürükçül Funguslarda Şlempe-Enzim İlişkisinin Araştırılması”, Doktora tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1992.
- [80] I. G. Garcia, J.L. Bonilla, P.R. Pena and E.R. Gomez, “*Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum**”, **Wat. Res.**, 31:8 (1997) 2005-2011.
- [81] E. Apohan, “*Biyoteknolojik işlemde geçmiş ve geçmemiş tekstil fabrikası boyalarının çeşitli organizmalar üzerine toksik etkisinin araştırılması*”, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1999.
- [82] www.tusiad.org/turkish/rapor/biotech/bolum2.pdf
- [83] M. Wainwright, “*An Introduction to Fungal Biotechnology*” Department of Molecular Biology and Biotechnology University of Sheffield UK, (1992), 81-1001. Lorenzo.
- [84] J. Wu, Y. Z. Xiao, H. Q. Yu, *Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white rot fungi on biofilm*, **Bioresource Technol.**, 96 (12) (2005) 1357-1363.
- [85] A. Jaouani, F. Guillen, M. J. Penninckx, A. T. Martinez, M. J. Martinez, *Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater*, **Enzyme Microb. Tech.**, 36 (2005) 478-486.
- [86] L. Levin, F. Forchiassin, A. Viale, *Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes versicolor*: application the Plackett-Burman*

- experimental design to evaluate nutritional requirements*, **Process Biochem.**, 40 (2005) 1381-1387.
- [87] C. Haglund, “*Biodegradation of xenobiotic compounds by the white rot fungus Trametes trogii*” **Master’s degree project**, Molecular Biotechnology Programme Uppsala University School of Engineering, (1999).
- [88] D. Ryan, W. Leukes, S. Burton, *Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by Trametes versicolor*, **Bioresource Technol.**, 98 (2007) 579-587.
- [89] M. Ohkuma, Y. Maeda, T. Johjima, T. Kudo, *Lignin degradation and roles of white rot fungi: study on an effluent symbiotic system in fungus-growing termites and its application to bioremediation*, **RIKEN Review**, (2001) 42.
- [90] S. Cing, D. Asma, E. Apohan, O. Yesilada, *Decolorization of textile dyeing wastewater by Phanerochaete chrysosporium*, **Folia Microbiol.** 48-5 (2003) 639-642.
- [91] Ö. Yeşilada, *Decolorization of crystal violet by fungi and commercial horseradish peroxidase*, **Tr. J. Biology**, 20 (1996) 129-138.
- [92] Ö. Yeşilada, *Decolorization of crystal violet by fungi*, **World J. Microbiol. Biot.**, 11 (1995) 601-602.
- [93] S. R. Couto, M. A. Sanroman, D. Hofer, G. M. Gübitz, *Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of white-rot fungus Trametes hirsuta for decolourization of textile dyes*, **Bioresource Technol.**, 95 (2004) 67-72.
- [94] Ö. Yeşilada, K. Fışkın, *Decolorization of alcoholic waste water by white rot fungi Coriolus versicolor, Funalia trogii and Phanerochaete chrysosporium ME446*, **Tr. J. of Biology**, 19 (1995) 191-200.
- [95] G. Feijoo, M. T. Moreira, E. Roca, J. M. Lema, *Use of cheese whey as a substrate to produce manganese peroxidase by Bjerkandera sp. BOS55*, **J. Ind. Microbiol. Biot.**, 23 (1999) 86-90.
- [96] P. C. Vandevivere, R. Bianchi, W. Verstrate, *Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technology*, **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 72 (1998) 289-302.
- [97] Ö. Yeşilada, B. Özcan, S. Şık, K. Fışkın, *Enzim üretiminde çeşitli endüstriyel atıkların kullanımı*, XII. Ulusal Biyoloji Kongresi Kitapçığı, (1996) 443-453.
- [98] E. Apohan, Ö. Yeşilada, *Endüstriyel atık su ortamında beyaz çürükçül fungusların lakkaz üretiminin araştırılması*, 31 Ağustos-2 Eylül, Eskişehir, 2005, 575.
- [99] D. Asma, “Bazı Fungus ve Bakterilerde Detoksifikasyon Sistemi Üzerine Pestisitlerin Etkisinin Araştırılması”, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Malatya, 1998.
- [100] J. Gabriel, O. Kofronova, P. Rychlovsky, M. Krenzelok, *Accumulation and effect cadmium in the wood-rotting Basidiomycete Daedalea quercina*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 57 (1996) 383-390.
- [101] M. S. Cohen, P. D. Gabriele, *Degradation of coal by fungi Polyporus versicolor and Poria monticolor*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 44 (1982) 23-27.
- [102] H. Z. Mechichi, T. Mechichi, A. Dhoub, S. Sayadi, A. T. Martinez, M. J. Martinez, *Laccase purification and characterization from Trametes trogii isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes the purified enzyme*, **Enzyme Microb. Tech.**, 39 (2006) 141-148.
- [103] P. Baldrian, *Fungal laccases- occurrence and properties*, **FEMS Microbiol. Rev.**, 30, (2006) 215-242.

- [104] S. Riva, *Laccases: blue enzymes for green chemistry*, **TRENDS Biotechnol.**, 24 :5 (2006) 219-226.
- [105] W. H. Flurkey, “*Whitaker, Jhon R. Handbook of Food Enzymology*” 2002 p 525.
- [106] J. J. V. D. Merwe, *Production of laccase by the white rot fungus Pycnoporus sanguineus*, Magister Scientiae, University of the State, Bloemfontein, South Africa, 2002.
- [107] A. Zille, *Laccase reactions for textile applications*, PhD. Thesis Universidade do Minho (2005).
- [108] C. M. Rosana, M. Rossi, L. Bologna, D. Rotilio, G. M. Pastore, N. Duran, *Phenols removal in musts: strategy for wine stabilization by laccase*, **J. Mol. Catal. B:Enzym.**, 45 (2007) 102-107.
- [109] C. Mazdak, L. Otterbein, M. Chamkha, S. Moukha, M. Asther, C. Gaillardin, J. M. Beckerich, *Heterologous production of a laccase from the basidiomycete Pycnoporus cinnabarinus in the dimorphic yeast Yarrowia lipolytica*, **FEMS Yeast Res.**, 5 (2005) 635-646.
- [110] M. Bar, *Kinetics and physico-chemical properties of white rot fungal laccases*, Magister Scientiae, University of the Free State Bloemfontein, December 2001.
- [111] N. Duran, M. A. Rosa, A. D’Annibale, L. Gianfreda, *Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: review*, **Enzyme Microbiol Technol.**, 31 (2002) 907-931.
- [112] L. Gianfreda, F. Sannino, M. T. Filazzola, A. Leonowicz, *Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal starin Cerrena unicolor*, **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 4 (1998) 13-23.
- [113] A. Givaudan, A. Effosse, D. Faure, P. Poiter, M. Bovillant, R. Bally, *Polyphenoloxidase from Azospirillum lipoferium isolated from the rhizosphere: evidence for a laccase in non-motile strains of Azospirillum lipoferium*, **FEMS Microbiol Lett.**, 10, (1993) 108-205.
- [114] A. Sanchez-Amat, F. Solano, *A. Pluripotent Polyphenoloxidase from the melanogenic Alteromonas sp. Shares catalytic capabilities of tyrosinase and laccase*, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 92, (1997) 240-787.
- [115] F. Rosconi, L. F. Fraguas, G. M. Drets, S. C. Sowinski, *Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by Sinorhizobium meliloti*, **Enzyme Microb. Tech.**, 36 (2005) 800-807.
- [116] S. Dhavan, R. Lal, M. Hanspal, R. C. Kuhad, *Effect of antibiotics on growth and laccase production from Cyathus bulleri and Pycnoporus cinnabarinus*, **Bioresource Technol.**, 96 (2005) 1415-1418.
- [117] A. Robles, R. Lucas, G. A. Cienfuegos, A. Galvez, *Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete Chalara paradoxa isolated from olive mill wastewater disposal ponds*, **Enzyme Microb. Tech.**, 26 (2000) 484-490.
- [118] R. Necochea, B. Valderrama, S. D. Sandoval, J. L. F. Mallol, R. V. Duhalt, G. Iturriaga, *Phylogenetic and biochemical characterization of a recombinant laccase from Trametes versicolor*, **FEMS Microb. Let.**, 244 (2) (2005) 235-241.
- [119] M. S. Revakar, S. S. Lele, *Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1*, **Process Biochem.**, 41 (2006) 581-588.
- [120] G. Rancano, M. Lorenzo, N. Molaes, S. R. Couto, M. A. Sanroman, *Production of laccase by Trametes versicolor in an airlift fermentor*, **Process Biochem.**, 39 (2003) 467-473.

- [121] K. Ikehata , I. D. Buchanan, D. W. Smith, *Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment*, **J. Environ. Eng. Sci.**, 3 (1), (2004) 1-19.
- [122] E. Birhanlı, Lakkaz enziminin üretiminin artırılması, Doktora Semineri, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005.
- [123] K. L. Min, Y. H. Kim, Y. W. Kim, H. S. Jung, Y. C. Hah, *Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus Phellinus ribis*, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 392 (2) (2001) 279-286.
- [124] D. T. D'Souza, R. Tiwari, A. K. Sah, C. Raghakumar, *Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes*, **Enzyme Microb. Tech.**, 38 (2006) 504-511.
- [125] E. Torres, I. B. Jaimes, S. L. Borgne, *Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants*, **Appl. Catal. B: Environ.**, 46 (2003) 1-15.
- [126] S. R. Couto, J. L. T. Herrera, *Industrial and Biotechnological application of laccases: a review*, **Biotechnol. Adv.**, 24 (2006) 500-513.
- [127] R. C. Minussi, G. M. Pastore, N. Duran, *Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent*, **Bioresource Technol.**, 98 (2006) 158-164.
- [128] D. Odacı, S. Timur, N. Pazarlıoğlu, M. R. Montereali, W. Vastarella, R. Pilloton, A. Telefoncu, *Determination of phenolic acids using Trametes versicolor laccase*, **Talanta**, 71 (2007) 312-317.
- [129] A. Lante, A. Crapisi, G. Pasini, A. Zamorani, P. Spettoli, *Immobilized laccase for must and wine processing*, **Ann. Ny. Acad. Sci.**, 672 (1992) 558-562.
- [130] A. Jones, R. P. Lonsane, *Production of gibberellins and bikaverin by cells of Gibberella fujikuroi immobilized in carrageenan*, **J. Ferment. Technol.**, 65, (1987) 717-722.
- [131] S. Ünyayar, *Poliüretan köpük üzerine tutuklanmış Phanerochaete chrysosporium ME446'da gibberellik asit ve sitokinin üretimi*, **Turk J. Biol.**, 24 (2000) 513-519.
- [132] P. K. R. Kumar, B. K. Lonsane, *Immobilized growing cells of Gibberella fujikuroi P-3 for production of giberellic acid and pigment in batch and semi-continuous cultures*, **Appl. Microbiol. Biotech.**, 28, (1988), 537-542.
- [133] B. K. McCabe, C. Kuek, G. L. R. Gordon, M. W. Philips, *Immobilization of monocentric and polycentric types of anaerobic chytrid fungi in Ca-alginat* **Enzyme Microb. Tech.**, 29 (2001) 144-149.
- [134] N. Vassilev, M. Vassileva, M. Fenice, F. Federici, *Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition*, **Bioresource Technol.**, 79 (2001), 263-271.
- [135] J. Wu, H-Q Yu, *Biosorption of 2,4-diclorophenol by immobilized white rot fungus Phanerochaete chrysosporium from aqueous solutions*, **Bioresource Technol.**, 98 (2007) 253-259.
- [136] G. Bitton, *Wastewater Microbiology*, Willey-Liss, New-York, 1994, 296-297.
- [137] www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles17.htm
- [138] M. Şam, "Beyaz çürükçül fungusların boyar maddelerinin gideriminde kullanımının araştırılması" Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1999.
- [139] B. R. Eggins *Chemical sensors and biosensors* University of Ulster at Jordanstown Northern Ireland, UK 2002.

- [140] www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/ionic.htm-3k.
- [141] A. Telefoncu, *Biyosensörlerin İmmobilizasyonu*, Biyokimya Yaz Okulu 1999, 42-65.
- [142] www.yildizdünyasi.net/biyokimya/tez.htm-38k
- [143] C. Scioli, L. Vollaro, *The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewater*, **Water Res.**, 31, (1997) 2520-2524.
- [144] A. D'Annibale, C. Crestini, V. Vinciguerra, G. G. Sermanni, *The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white rot fungus*, **J. Biotechnol.**, 61 (1998) 209-218.
- [145] O. Yesilada, S. Sik, M. Sam, *Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization*, **World J. Microb. Biot.**, 14 (1998) 37-42.
- [146] S. M. Paixao, E. Mendonça, A. Picado, A. M. Anselmo, *Acute toxicity evaluation of olive oil mill wastewaters: A comparative study of three aquatic organisms*, **Environ. Toxicol.** 14 (1999) 263-269.
- [147] E. Oktav, F. Şengül, A. Özer, *Zeytin yağı Endüstrisi Atıksularının Fizikokimyasal ve Kimyasal Yöntemlerle Arıtımı*, Ulusal Sanayi- Çevre Sempozyumu ve Sergisi Bildiriler Kitabı, 25-27 Nisan, 2001, Mersin.
- [148] J. C. Ruiz, T. Rubia, J. Perez, J. M. Lopez, *Effect of olive oil mill wastewater on extracellular ligninolytic enzymes produced by *Phanerochaete flavido-alba**, **FEMS Microbiol. Let.**, 212 (2002) 41-45.
- [149] P. Blaquez, G. Caminal, M. Sarra, M. T. Vicent, X. Gabarrall, *Olive oil mill wastewater and detoxification in a bioreactor by the white rot fungus *Phanerochaete flavido-alba**, **Biotechnol. Progr.**, 18 (3) (2002) 660-662.
- [150] G. Pinto, A. Pollio, L. Previtara, M. Stanzione, F. Temussi, *Removal of low molecular weight phenols from olive oil mill wastewater using microalgae*, **Biotechnol. Let.**, 25: 19, (2003) 1657-1659.
- [151] K. Fadil, A. Chahlaoui, A. Ouahbi, A. Zaid, R. Borja, *Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry*, **Int. Biodeter. Biodegr.**, 51 (1) (2003) 37-41.
- [152] A. D'Annibale, R. Casa, F. Pieruccetti, M. Ricci, R. Marabottini, **Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability*, **Chemosphere**, 54 (2004) 887-894.
- [153] G. Aggelis, D. Iconomou, M. Christou, D. Bokas, S. Kotzaillias, G. Christou, V. Tsagou, S. Papanikolaou, *Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process*, **Wat. Res.**, 37: 16 (2003) 3897-3904.
- [154] A. Jaouani, M. G. Tabka, M. J. Penninckx, *Lignin modifying enzymes of *Coriolopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewater decolorization*, **Chemosphere**, 62 (2006) 1421-1430.
- [155] S. Laconi, G. Molle, A. Cabiddu, R. Pompei, *Bioremediation of olive oil mill wastewater and production of microbial biomass*, **Biodegradation DOI** (2006) 10.1007/s10532-006-9087-1.
- [156] G. Olivieri, A. Marzocchella, P. Salatino, P. Giardina, G. Cennamo, G. Sannia, *Olive mill wastewater remediation by means of *Pleurotus ostreatus**, **Biochem. Eng. J.**, 31 (2006) 180-187.

- [157] M. Mebirouk, L. Sbai, M. Lopez, J. Gonzales, *Olive oil mill wastewaters pollution abatement by physical treatments and biodegradation with Phanerochaete chrysosporium*, **Environ. Technol.**, 27:12 (2006) 1351-1356.
- [158] G. Öngen, G. Güngör, B. Kanberoğlu, *Decolorisation and dephenolisation potential of selected Aspergillus section Nigri starins- Aspergillus tubingensis in olive oil mill wastewater*, **World J. Microb. Biot.**, 23: 4 (2007) 519-524.
- [159] G. G. Benito, M. P. Miranda and D. R. Santos, *Decolorization of wastewater from fermentation process with Trametes versicolor*, **Bioresource Technol.**, 61 (1997) 33-37.
- [160] S. Kahraman, O. Yeşilada, *Decolorization and bioremediation of molasses wastewater by white rot fungi in a semi-solid-state condition*, **Folia Microbiol.** 48:4 (2003) 525-528.
- [161] A. D'Annibale, S. R. Stazi, V. Vinciguerra E. Di Mattia, G. G. Sermanni, *Characterization of immobilized laccase from Lentinula edodes and its use in olive-mill wastewater treatment*, **Process Biochem.**, 34 (1999) 697-706.
- [162] T. Gonzalez, M. C. Terron, S. Yagüe, E. Zapico, G. C. Galletti, A. E. Gonzalez, *Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry monitoring of fungal-biotreated distillery wastewater using Trametes sp. I-62 (CECT 20197)*, **Rapid Commun. Mass Sp.**, 14:15 (2000) 1417-1424.
- [163] M. Fenice, G. G. Sermanni, F. Fedorici, A. D'Annibale, *Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by Panus tigrinus on olive mill wastewater-based media*, **J. Biotechnol.**, 100 (2003) 77-85.
- [164] Ö. Yeşilada, K. Fışkın, *The use of white rot fungi for evaluation and degradation of vinasse*, **Tr. J. Of Biology**, 19 (1995) 181-189.
- [165] A. Robles, R. Lucas, M. M. Canamero, N. B. Omar, R. Perez, A. Galvez, *Characterisation of laccase activity produced by the hyphomycete Chalara (syn. Thielaviopsis) paradoxa CH32*, **Enzyme Microb. Tech.**, 31 (2002) 516-522.
- [166] S. S. Kahraman, I. H. Gurdal, *Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi*, **Bioresource Technol.**, 82 (2002) 215-217.
- [167] C. Galhaup, H. Wagner, B. Hinterstoisser, D. Haltrich, *Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete Trametes pubecens* **Enzyme Microb. Tech.**, 30 (2002) 529-536.
- [168] A. Travares, M. Coelho, J. Coutinho, A. Xavier, *Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modelling*, **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 80 (2005) 669-676.
- [169] A. Jaouani, F. Guillen, M. J. Penninckx, A. T. Martinez, M. J. Martinez, *Role of Pycnoporus coccineus laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater*, **Enzyme Microb. Tech.**, 36 (2005) 478-486.
- [170] Standard Methods, Standart methods for the examination of water and wastewater, Fourteenth Edition American Public Health Association, 1979.
- [171] O. Yesilada, S. Sik, M. Sam, *Biodegradation of olive oil mill wastewater by Coriolus versicolor and Funalia trogii: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization*, **World J. Microb. Biot.**, 14 (1998) 37-42.
- [172] G. L. Miller, Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31 (1959) 426-428.

- [173] E. Aranda, I. G. Romera, J. A. Ocampo, V. Carbone, A. Malorni, F. Sannino, A. D. Martino, R. Capasso, *Reusing ethyl acetate and aqueous exhausted fractions of dry olive mill residue by saprobe fungi*, **Chemosphere** 66 (2007) 67-74.
- [174] www.sanayi.gov.tr/webedit/gozlem.aspx?sayfano=1215-91k.
- [175] A. J. Wilkolazka, T. Ruzgas, L. Gorton, *Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids*, **Enzyme and Microbial Technology** 35 (2004) 238-241.
- [176] T. Saito, P. Hong, K. Kato, M. Okazaki, H. Inagaki, S. Maeda, Y. Yokogawa, *Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil*, **Enzyme Microb. Tech.**, 33 (2003) 520-526.
- [177] E. Birhanlı, Ö. Yeşilada, *Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated-batch mode*, **Enzyme Microb. Technol.**, 39 (2006) 1286-1293.
- [178] P. J. Collins, A. D. W. Dobson, *Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor**, **Appl. Environ. Microb.** 63 (9) (1997) 3444-3450.
- [179] L. Levin, F. Forchiassin, A. M. Ramos, *Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white rot fungus *Trametes trogii**, **Mycologia**, 94 (3) (2002) 377-383.
- [180] N. R. Bishnoi, R. Kumar, *Removal of Cr (VI) with *Trichoderma viride* immobilized fungal biomass and cell free Ca-alginate beads* The IASTED Conference on Advanced Technology in the Environmental Field, Lanzarote, Canary Islands, Spain, February 6-8, 2006.
- [181] K. K. Prasad, S. V. Mohan, Y. V. Bhaskar, S.V. Ramanaiah, V. L. Babu, B. R. Pati, P. N. Sarma, *Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilization on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions*, **J. Appl. Microbiol.** 43 (3) (2005) 301-307.
- [182] M. Lorenzo, D. Moldes, S. R. Couto, A. Sanroman, *Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor**, **Bioresource Technol.**, 82 (2002) 109-113.
- [183] F. Zhang, J. Yu, *Decolourisation of acid violet 7 with complex pellets of white rot fungus and activated carbon*, **Bioprocess Eng.**, 23 (2000) 295-301.
- [184] S. Cing, Ö. Yeşilada, *Astrazon red dye decolorization by growing cells pellets of *Funalia trogii**, **J. Basic Microbiol.** 44:4 (2004) 263-269.
- [185] S. B. Pointing, E. B. G. Jones, L. L. P. Vrijmoed, *Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid cultures*, **Mycologia**, 92 (2000), 139-144.
- [186] S. C. Lo, Y. S. Ho, J. A. Buswell, *Effect of phenolic monomers on the production of laccases by edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* and partial characterization of a major laccase component*, **Mycologia**, 93 (2001), 413-421.
- [187] R. Ullrich, L. M. Huong, N. L. Dung, *Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 67, (2005), 357-363.

7. EKLER

Ek 7.1. Farklı konsantrasyonlarda glikoz eklenmiş vinas (%25'lik) ortamlarında *F. trogii* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)				
	Kontrol	Glikoz (g/L)			
		1	2	5	10
1	1.13±0.05	0.65±0,04 ^c	0.61±0.03 ^c	0.47±0.03 ^c	0.34±0.02 ^c
2	0.45±0.02	0.74±0.03 ^a	0.70±0.02 ^a	0.64±0.01 ^a	0.57±0.05 ^a
3	0.46±0,02	0.67±0.10 ^a	0.51±0.22 ^b	0.88±0.04 ^a	0.85±0.07 ^a
4	0.33±0.02	0.30±0.12 ^b	0.18±0.09 ^c	0.59±0.11 ^a	0.64±0.09 ^a
5	0.89±0.05	0.15±0.06 ^c	0.09±0.05 ^c	0.28±0.06 ^c	0.57±0.17 ^c
6	0,45±0,02	0.04±0,00 ^c	0.01±0.00 ^c	0.11±0.01 ^c	0.22±0.02 ^c
Toplam	3.71	2.55	2.1	2.97	3.19

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.2. Farklı konsantrasyonlarda glikoz eklenmiş ZYFA (%25'lik) ortamlarında *F. trogii* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)				
	Kontrol	Glikoz (g/L)			
		1	2	5	10
1	2.20±0.18	4.88±0.29 ^a	4.60±0.28 ^a	4.74±0.36 ^a	4.64±0.16 ^a
2	2.77±0.12	4.38±0.15 ^a	4.38±0.22 ^a	4.87±0.14 ^a	4.44±0.06 ^a
3	2.26±0.10	4.08±0.22 ^a	4.21±0.23 ^a	4.43±0.35 ^a	5.38±0.10 ^a
4	2.07±0.07	3.31±0.07 ^a	3.32±0.43 ^a	3.31±0.24 ^a	4.03±0.25 ^a
5	1.48±0.09	2.26±0.05 ^a	2.28±0.28 ^a	2.44±0.10 ^a	2.92±0.22 ^a
6	1.37±0.04	1.33±0.03 ^b	1.38±0.16 ^b	1.62±0.01 ^a	2.06±0.15 ^a
7	0.95±0.06	1.26±0.08 ^a	1.36±0.06 ^a	1.13±0.03 ^a	2.10±0.10 ^a
8	0.90±0.02	1.12±0.12 ^a	1.26±0.05 ^a	1.19±0.06 ^a	1.71±0.06 ^a
9	0.99±0.04	0.76±0.05 ^b	0.89±0.05 ^c	0.93±0.02 ^a	1.12±0.06 ^a
10	0.65±0.03	0.84±0.07 ^a	0.99±0.11 ^a	1.07±0.08 ^a	1.10±0.14 ^a
Toplam	15.64	24.22	24.67	25.73	29.5

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.3. Farklı konsantrasyonlarda maya özütü eklenmiş vinas (%25'lik) ortamlarında *F. trogii* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)			
	Kontrol	Maya Özütü (g/L)		
		1	2	5
1	1.13±0.05	0.44±0.02 ^c	0.59±0.02 ^c	0.38±0.03 ^c
2	0.45±0.02	0.53±0.04 ^a	0.71±0.02 ^a	0.63±0.01 ^a
3	0.46±0,02	0.44±0.04 ^b	0.59±0.17 ^b	0.71±0.12 ^a
4	0.33±0.02	0.28±0.03 ^b	0.10±0.06 ^a	0.11±0.01 ^c
5	0.89±0.05	0.12±0.00 ^c	0.13±0.09 ^c	0.00±0.00 ^c
6	0,45±0,02	0.00±0.00 ^c	0.03±0.02 ^c	0.02±0.02 ^c
Toplam	3.71	1.81	2.15	1.85

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.4. Farklı konsantrasyonlarda maya özütü eklenmiş ZYFA (%25'lik) ortamlarında *F. trogii* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)			
	Kontrol	Maya Özütü (g/L)		
		1	2	5
1	2.20±0.18	5.96±0.08 ^a	4.74±0.32 ^a	3.34±0.20 ^b
2	2.77±0.12	4.87±0.09 ^a	3.85±0.20 ^a	2.68±0.07 ^b
3	2.26±0.10	4.84±0.18 ^a	4.33±0.08 ^a	3.32±0.28 ^a
4	2.07±0.07	3.71±0.25 ^a	3.44±0.08 ^a	2.32±0.15 ^a
5	1.48±0.09	2.46±0.16 ^a	2.65±0.17 ^a	1.56±0.04 ^b
6	1.37±0.04	1.75±0.06 ^a	1.82±0.13 ^a	1.06±0.04 ^a
7	0.95±0.06	2.64±0.12 ^a	2.24±0.12 ^a	1.07±0.12 ^b
8	0.90±0.02	2.91±0.23 ^a	2.77±0.28 ^a	1.51±0.24 ^a
9	0.99±0.04	2.53±0.05 ^a	2.22±0.10 ^a	1.15±0.36 ^a
10	0.65±0.03	2.72±0.24 ^a	2.25±0.09 ^a	0.37±0.10 ^c
Toplam	15.64	34.39	30.31	18.38

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.5. Farklı konsantrasyonlarda bakır eklenmiş vinas (%25'lik) ortamlarında *F. trogii* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)			
	Kontrol	CuSO ₄ .5H ₂ O (mM)		
		0.5	1	2
1	1.13±0.05	0.37±0.08 ^c	0.46±0.04 ^c	0.03±0.00 ^c
2	0.45±0.02	0.90±0.14 ^a	0.85±0.02 ^a	0.28±0.04 ^c
3	0.46±0.02	0.95±0.09 ^a	1.00±0.07 ^a	0.86±0.19 ^a
4	0.33±0.02	0.74±0.07 ^a	1.03±0.09 ^a	1.08±0.21 ^a
5	0.89±0.05	0.82±0.23 ^b	1.46±0.43 ^a	2.77±0.05 ^a
6	0.45±0.02	0.32±0.12 ^c	0.93±0.07 ^a	2.27±0.12 ^a
7	0.07±0.01	0.14±0.08 ^b	0.89±0.29 ^a	2.60±0.28 ^a
8	0.06±0.00	0.05±0.03 ^b	1.15±0.34 ^a	4.91±0.10 ^a
9	0.03±0.00		0.65±0.15 ^a	3.74±0.32 ^a
10	0.03±0.01		0.34±0.03 ^a	4.84±0.03 ^a
11				3.33±0.21
12				4.79±0.26
13				4.77±0.08
14				3.42±0.22
15				3.46±0.13
Toplam(8gün)		4.29		
Toplam(10gün)	3.9		8.76	
Toplam(15gün)				43.15

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.6. Farklı konsantrasyonlarda bakır eklenmiş ZYFA (%25'lik) ortamlarında *F. trogii* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)			
	Kontrol	CuSO ₄ .5H ₂ O (mM)		
		0.5	1	2
1	2.20±0.18	11.31±0.13 ^a	12.84±0.09 ^a	11.45±0.23 ^a
2	2.77±0.12	9.66±0.29 ^a	10.71±0.20 ^a	10.59±0.29 ^a
3	2.26±0.10	7.39±0.31 ^a	9.15±0.40 ^a	8.60±0.01 ^a
4	2.07±0.07	6.30±0.30 ^a	7.05±0.28 ^a	6.68±0.29 ^a
5	1.48±0.09	4.19±0.18 ^a	4.44±0.14 ^a	5.78±0.23 ^a
6	1.37±0.04	2.64±0.15 ^a	3.00±0.07 ^a	4.32±0.44 ^a
7	0.95±0.06	4.04±0.15 ^a	4.62±0.34 ^a	3.64±0.22 ^a
8	0.90±0.02	4.36±0.23 ^a	6.40±0.28 ^a	5.88±0.43 ^a
9	0.99±0.04	2.53±0.39 ^a	4.42±0.24 ^a	4.16±0.24 ^a
10	0.65±0.03	2.51±0.32 ^a	5.95±0.15 ^a	5.03±0.07 ^a
11	0.80±0.03			3.51±0.16 ^a
12	0.74±0.02			5.20±0.23 ^a
13	0.56±0.01			4.63±0.11 ^a
14	0.71±0.00			4.55±0.06 ^a
15	0.57±0.04			5.42±0.11 ^a
Toplam (10)	15.64	54.93	68.58	
Toplam (15)	19.02			89.44

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.7. Farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu eklenmiş vinas (%25'lik) ortamlarında *F. trogii* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)			
	Kontrol	Peynir Altı Suyu (%)		
		5	10	20
1	1.13±0.05	0.14±0.02 ^c	0.14±0.02 ^c	0.01±0.00 ^c
2	0.45±0.02	0.27±0.02 ^c	0.19±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
3	0.46±0.02	0.34±0.02 ^c	0.33±0.06 ^c	0.00±0.00 ^c
4	0.33±0.02	0.08±0.01 ^c	0.01±0.01 ^c	0.00±0.00 ^c
5	0.89±0.05	0.02±0.01 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
Toplam	3.26	0.85	0.67	0.01

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.8. Farklı konsantrasyonlarda peynir altı suyu eklenmiş ZYFA (%25'lik) ortamlarında *F. trogii* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)			
	Kontrol	Peynir Altı Suyu (%)		
		5	10	20
1	2.20±0.18	4.08±0.19 ^a	3.22±0.16 ^b	0.52±0.05 ^c
2	2.77±0.12	3.93±0.34 ^a	3.21±0.08 ^a	1.02±0.19 ^c
3	2.26±0.10	3.68±0.24 ^a	3.56±0.28 ^a	1.66±0.09 ^c
4	2.07±0.07	2.66±0.05 ^a	2.35±0.28 ^b	1.40±0.10 ^c
5	1.48±0.09	2.25±0.23 ^a	1.82±0.10 ^a	1.08±0.05 ^c
6	1.37±0.04	2.00±0.13 ^a	1.46±0.04 ^a	0.48±0.16 ^c
7	0.95±0.06	2.84±0.08 ^a	2.54±0.04 ^a	0.88±0.03 ^b
8	0.90±0.02	3.75±0.28 ^a	2.84±0.10 ^a	1.75±0.07 ^a
9	0.99±0.04	3.08±0.21 ^a	2.15±0.11 ^a	0.96±0.09 ^c
10	0.65±0.03	2.83±0.09 ^a	3.09±0.07 ^a	1.67±0.20 ^a
Toplam	15.64	31.1	26.24	11.42

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.9. Aljinat jele tutuklanmış *F. trogii* hücreleriyle vinas (%25'lik) ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

G ü n	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)					
	Serbest hücre (10g)	Tutuklanmış hücre	Serbest hücre (20g)	Tutuklanmış hücre	Serbest hücre (30g)	Tutuklanmış hücre
1	0.27±0.01	0.06±0.00 ^c	1.13±0.05	0.10±0.01 ^c	0.22±0.01	0.24±0.00 ^a
2	0.24±0.01	0.06±0.00 ^c	0.45±0.02	0.17±0.01 ^c	0.40±0.02	0.48±0.03 ^a
3	0.32±0.00	0.25±0.01 ^c	0.46±0.02	0.26±0.00 ^c	0.41±0.01	0.41±0.02 ^b
4	0.33±0.02	0.24±0.01 ^c	0.33±0.02	0.40±0.02 ^a	0.41±0.11	0.46±0.03 ^b
5	0.65±0.03	0.34±0.02 ^c	0.89±0.02	0.74±0.06 ^c	0.32±0.14	0.78±0.07 ^a
6	1.37±0.01	0.33±0.00 ^c	0.45±0.02	0.65±0.05 ^a	0.03±0.01	0.62±0.06 ^a
7	0.96±0.02	0.38±0.01 ^c	0.07±0.01	0.65±0.04 ^a	0.06±0.00	0.79±0.05 ^a
8	1.11±0.04	0.56±0.04 ^c	0.06±0.00	1.05±0.03 ^a		1.03±0.08
9	1.28±0.11	0.84±0.05 ^c	0.03±0.00	1.70±0.27 ^a		1.15±0.06
10	1.53±0.19	0.74±0.13 ^c	0.03±0.01	1.08±0.24 ^a		1.77±0.03
11	1.40±0.15	0.62±0.02 ^c		0.96±0.17		2.53±0.04
12	1.79±0.13	1.27±0.05 ^c		0.87±0.12		1.98±0.07
13	2.22±0.04	0.77±0.06 ^c		0.40±0.07		1.44±0.11
14	0.82±0.52	0.48±0.02 ^c		0.26±0.03		0.57±0.09
15	0.38±0.15	0.34±0.02 ^c		0.15±0.02		0.26±0.04
T	14.67	7.28	3.71	9.44	1.85	14.87

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.10. Aljinat jele tutuklanmış *F. trogii* ZYFA (%25'lik) ortamlarında hücreleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

G ü n	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)					
	Serbest hücre (10g)	Tutuklanmış hücre	Serbest hücre (20g)	Tutuklanmış hücre	Serbest hücre (30g)	Tutuklanmış hücre
1	0.57±0.03	0.12±0.00 ^c	1.24±0.10	1.02±0.01 ^c	2.20±0.18	1.21±0.10 ^c
2	1.43±0.05	0.36±0.00 ^c	2.70±0.08	2.38±0.06 ^c	2.77±0.12	3.33±0.13 ^a
3	0.83±0.02	0.40±0.11 ^c	2.38±0.06	1.73±0.05 ^c	2.26±0.10	2.57±0.27 ^b
4	0.53±0.07	0.50±0.10 ^b	1.83±0.03	1.05±0.01 ^c	2.07±0.07	1.59±0.02 ^c
5	0.45±0.06	0.52±0.03 ^b	1.64±0.09	0.70±0.07 ^c	1.48±0.09	1.04±0.04 ^c
6	0.40±0.05	0.48±0.01 ^a	1.20±0.10	0.59±0.05 ^c	1.37±0.04	0.64±0.06 ^c
7	0.33±0.02	0.51±0.03 ^a	0.88±0.07	0.82±0.06 ^b	0.95±0.06	0.57±0.08 ^c
8	0.42±0.01	0.51±0.04 ^a	0.65±0.08	1.02±0.05 ^a	0.90±0.02	0.61±0.13 ^a
9	0.38±0.02	0.40±0.00 ^b	0.49±0.02	0.91±0.04 ^a	0.99±0.04	0.69±0.11 ^c
10	0.35±0.03	0.36±0.09 ^b	0.39±0.01	0.90±0.07 ^a	0.65±0.03	0.72±0.11 ^b
T	5.69	4.16	13.4	11.12	15.64	12.97

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.11. Aktif karbon ve çam kozalağına tutuklanmış *F. trogii* peletleriyle vinas (%25'lik) ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)		
	Kontrol	Aktif karbon	Çam kozalağı
1	0.30±0.02	0.36±0.00 ^a	0.37±0.01 ^a
2	0.47±0.01	0.83±0.05 ^a	0.74±0.02 ^a
3	0.46±0.02	0.88±0.05 ^a	0.58±0.05 ^a
4	0.74±0.11	0.93±0.07 ^a	0.74±0.02 ^a
5	0.88±0.06	1.12±0.21 ^b	1.02±0.05 ^a
6	0.43±0.01	0.80±0.02 ^a	0.68±0.06 ^a
7	0.07±0.06	0.43±0.02 ^a	0.60±0.02 ^a
8	0.06±0.01	0.21±0.02 ^a	0.87±0.00 ^a
9	0.03±0.00	0.16±0.01 ^a	0.34±0.00 ^a
10	0.03±0.00	0.00±0.00 ^b	0.14±0.00 ^c
Toplam	3.47	5.72	6.08

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.12. Aktif karbona ve çam kozalağına tutuklanmış *F. trogii* peletleriyle ZYFA (%25'lik) ortamlarında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)		
	Serbest hücre	Aktif karbona tutuklanmış hücre	Çam kozalağına tutuklanmış hücre
1	2.20±0.18	1.42±0.08 ^c	1.68±0.04 ^c
2	2.77±0.12	1.88±0.04 ^c	2.10±0.02 ^c
3	2.26±0.10	1.38±0.06 ^c	2.84±0.25 ^a
4	2.07±0.07	0.97±0.04 ^c	2.88±0.07 ^a
5	1.48±0.09	0.89±0.05 ^c	2.82±0.05 ^a
6	1.37±0.04	0.97±0.03 ^c	3.02±0.29 ^a
7	0.95±0.06	0.96±0.07 ^b	2.31±0.16 ^a
8	0.90±0.02	1.00±0.14 ^b	1.99±0.29 ^a
9	0.99±0.04	1.13±0.03 ^a	1.78±0.13 ^a
10	0.65±0.03	1.15±0.06 ^a	1.48±0.11 ^a
11	0.80±0.03	1.31±0.10 ^a	1.60±0.13 ^a
12	0.74±0.02	1.14±0.06 ^a	1.85±0.10 ^a
13	0.56±0.01	1.50±0.03 ^a	1.87±0.10 ^a
14	0.71±0.00	1.26±0.09 ^a	1.77±0.05 ^a
15	0.57±0.04	1.18±0.07 ^a	1.98±0.05 ^a
Toplam	19.02	18.14	31.97

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.13. Farklı konsantrasyonlarda glikoz eklenmiş vinas (%25'lik) ortamlarında *T. versicolor* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)				
	Kontrol	Glikoz (g/L)			
		1	2	5	10
1	1.75±0.06	0.22±0.00 ^c	0.22±0.00 ^c	0.18±0.00 ^c	0.16±0.01 ^c
2	0.75±0.08	0.37±0.05 ^c	0.48±0.00 ^c	0.72±0.31 ^b	0.40±0.14 ^c
3	0.86±0.06	0.54±0.05 ^c	0.63±0.12 ^c	0.42±0.04 ^c	0.23±0.02 ^c
4	0.85±0.08	2.14±0.34 ^a	1.17±0.11 ^a	1.22±0.05 ^a	1.43±0.18 ^a
5	1.15±0.09	1.64±0.14 ^a	1.20±0.09 ^b	0.97±0.12 ^c	1.20±0.05 ^b
6	1.05±0.05	0.79±0.06 ^c	1.38±0.07 ^a	1.37±0.17 ^a	1.33±0.09 ^a
7	1.12±0.14	0.57±0.14 ^c	1.38±0.01 ^a	2.59±0.20 ^a	1.82±0.07 ^a
8	1.88±0.02	0.53±0.23 ^c	0.48±0.12 ^c	2.35±0.29 ^a	2.24±0.30 ^a
9	1.12±0.08	0.31±0.13 ^c	0.17±0.11 ^c	0.95±0.05 ^c	1.66±0.21 ^a
10	1.49±0.01	0.20±0.01 ^c	0.12±0.08 ^c	0.51±0.05 ^c	1.56±0.17 ^b
Toplam	12.02	7.31	7.23	11.28	12.03

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.14. Farklı konsantrasyonlarda glikoz eklenmiş ZYFA (%25'lik) ortamlarında *T. versicolor* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)				
	Kontrol	Glikoz (g/L)			
		1	2	5	10
1	1.16±0.17	0.95±0.02 ^b	1.25±0.09 ^a	1.34±0.21 ^a	1.43±0.36 ^a
2	2.61±0.11	3.04±0.07 ^a	3.06±0.53 ^a	3.16±0.18 ^a	3.86±0.19 ^a
3	2.32±0.03	2.42±0.11 ^b	2.59±0.26 ^b	2.80±0.06 ^a	3.06±0.13 ^a
4	1.77±0.09	2.07±0.12 ^a	2.04±0.13 ^a	2.25±0.15 ^a	2.63±0.29 ^a
5	1.76±0.18	1.79±0.20 ^b	2.08±0.06 ^a	2.46±0.31 ^a	2.65±0.28 ^a
6	1.42±0.04	1.43±0.08 ^b	1.56±0.17 ^b	1.93±0.04 ^a	2.08±0.20 ^a
7	1.32±0.07	1.33±0.04 ^b	1.44±0.01 ^a	1.68±0.01 ^a	2.16±0.08 ^a
8	1.33±0.09	1.26±0.02 ^b	1.38±0.11 ^b	1.63±0.07 ^a	1.89±0.34 ^a
9	1.33±0.04	1.14±0.10 ^b	1.28±0.07 ^b	1.64±0.03 ^a	1.97±0.00 ^a
10	1.50±0.02	1.09±0.14 ^c	1.29±0.05 ^c	1.52±0.01 ^b	1.79±0.14 ^a
11	1.70±0.05	1.16±0.12 ^c	1.27±0.01 ^c	1.69±0.05 ^b	2.01±0.07 ^a
12	1.88±0.11	0.83±0.05 ^c	1.00±0.03 ^c	1.32±0.12 ^c	1.45±0.05 ^c
13	1.80±0.02	0.95±0.01 ^c	1.04±0.07 ^c	1.25±0.02 ^c	1.53±0.08 ^a
14	1.67±0.02	0.88±0.09 ^c	1.20±0.03 ^c	1.34±0.05 ^c	1.56±0.14 ^b
15	1.59±0.06	0.89±0.18 ^c	1.01±0.02 ^c	1.06±0.07 ^c	1.49±0.07 ^c
Toplam	25.16	21.23	23.49	27.07	31.56

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.15. Farklı konsantrasyonlarda maya özütü eklenmiş vinas (%25'lik) ortamlarında *T. versicolor* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)			
	Kontrol	Maya Özütü (g/L)		
		1	2	5
1	1.75±0.06	0.21±0.01 ^c	0.21±0.00 ^c	0.21±0.01 ^c
2	0.75±0.08	0.32±0.03 ^c	0.29±0.00 ^c	0.25±0.01 ^c
3	0.86±0.06	0.41±0.04 ^c	0.39±0.03 ^c	0.35±0.02 ^c
4	0.85±0.08	1.05±0.19 ^a	1.11±0.10 ^a	1.22±0.01 ^a
5	1.15±0.09	0.80±0.06 ^c	1.55±0.20 ^a	1.18±0.03 ^b
6	1.05±0.05	0.92±0.03 ^b	0.86±0.11 ^c	0.47±0.10 ^c
7	1.12±0.14	2.46±0.10 ^a	0.42±0.10 ^c	0.09±0.05 ^c
8	1.88±0.02	2.39±0.33 ^a	0.07±0.05 ^c	0.00±0.00 ^c
9	1.12±0.08	0.44±0.02 ^c		
10	1.49±0.01	0.71±0.12 ^c		
Toplam(8gün)			4.9	3.77
Toplam(10gün)	12.02	9.71		

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.16. Farklı konsantrasyonlarda maya özütü eklenmiş ZYFA (%25'lik) ortamlarında *T. versicolor* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)			
	Kontrol	Maya Özütü (g/L)		
		1	2	5
1	1.16±0.17	0.68±0.03 ^c	0.62±0.12 ^c	0.35±0.06 ^c
2	2.61±0.11	2.13±0.20 ^c	1.41±0.07 ^c	0.41±0.02 ^c
3	2.32±0.03	2.15±0.15 ^b	2.92±0.39 ^a	1.44±0.17 ^c
4	1.77±0.09	2.12±0.17 ^a	3.43±0.27 ^a	4.36±0.26 ^a
5	1.76±0.18	1.75±0.03 ^b	2.98±0.21 ^a	5.28±0.35 ^a
6	1.42±0.04	1.51±0.02 ^a	2.39±0.29 ^a	4.93±0.36 ^a
7	1.32±0.07	1.50±0.08 ^a	2.57±0.37 ^a	4.57±0.15 ^a
8	1.33±0.09	1.55±0.12 ^a	2.88±0.38 ^a	4.88±0.38 ^a
9	1.33±0.04	1.59±0.16 ^a	3.85±0.29 ^a	5.44±0.11 ^a
10	1.50±0.02	1.66±0.15 ^b	3.00±0.18 ^a	3.57±0.09 ^a
11	1.70±0.05	2.14±0.46 ^a	4.75±0.01 ^a	3.60±0.23 ^a
12	1.88±0.11	1.77±0.14 ^c	2.93±0.26 ^a	3.34±0.55 ^a
13	1.80±0.02	1.90±0.20 ^b	2.18±0.18 ^a	3.48±0.07 ^a
14	1.67±0.02	2.32±0.11 ^a	4.66±0.04 ^a	6.13±0.57 ^a
15	1.59±0.06	2.18±0.37 ^a	3.20±0.26 ^a	3.22±0.21 ^a
Toplam	25.16	26.95	43.77	55

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.17. Farklı konsantrasyonlarda bakır eklenmiş vinas (%25'lik) ortamlarında *T. versicolor* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)			
	Kontrol	CuSO ₄ .5H ₂ O (mM)		
		0.5	1	2
1	1.75±0.06	0.23±0.01 ^c	0.23±0.01 ^c	0.01±0.00 ^c
2	0.75±0.08	0.21±0.04 ^c	0.18±0.06 ^c	0.08±0.00 ^c
3	0.86±0.06	0.43±0.14 ^c	0.32±0.07 ^c	0.03±0.00 ^c
4	0.85±0.08	0.92±0.12 ^b	0.81±0.11 ^b	0.92±0.11 ^b
5	1.15±0.09	1.03±0.33 ^b	0.95±0.06 ^c	1.14±0.12 ^b
6	1.05±0.09	1.52±0.41 ^b	1.02±0.10 ^b	0.95±0.06 ^b
7	1.12±0.05	1.81±0.20 ^a	1.47±0.33 ^b	0.80±0.04 ^c
8	1.88±0.14	2.18±0.07 ^a	2.07±0.15 ^b	1.38±0.03 ^c
9	1.12±0.02	1.60±0.18 ^a	1.72±0.08 ^a	1.13±0.05 ^b
10	1.49±0.08	1.44±0.12 ^b	1.99±0.05 ^a	1.47±0.08 ^b
11	1.56±0.01	1.58±0.34 ^b	2.09±0.28 ^a	1.16±0.04 ^c
12	1.31±0.06	1.50±0.38 ^b	1.84±0.04 ^a	1.79±0.04 ^a
13	1.30±0.24	1.70±0.35 ^b	2.31±0.14 ^a	1.61±0.10 ^a
14	0.20±0.01	1.39±0.13 ^a	2.39±0.24 ^a	1.57±0.10 ^a
15	0.38±0.09	0.10±0.01 ^c	0.23±0.06 ^c	2.61±0.11 ^a
Toplam	16.77	17.64	19.62	16.65

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.18. Farklı konsantrasyonlarda bakır eklenmiş ZYFA (%25'lik) ortamlarında *T. versicolor* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)			
	Kontrol	CuSO ₄ .5H ₂ O (mM)		
		0.5	1	2
1	1.16±0.17	1.35±0.08 ^a	1.37±0.13 ^a	1.49±0.02 ^a
2	2.61±0.11	3.84±0.18 ^a	3.91±0.24 ^a	4.79±0.26 ^a
3	2.32±0.03	3.40±0.24 ^a	3.28±0.17 ^a	3.96±0.14 ^a
4	1.77±0.09	2.57±0.17 ^a	2.89±0.26 ^a	3.66±0.33 ^a
5	1.76±0.18	1.91±0.01 ^b	2.13±0.17 ^b	1.50±0.15 ^b
6	1.42±0.04	1.86±0.02 ^a	1.98±0.14 ^a	1.34±0.09 ^b
7	1.32±0.07	1.65±0.11 ^a	1.90±0.12 ^a	1.35±0.03 ^b
8	1.33±0.09	1.79±0.06 ^a	1.91±0.24 ^a	1.05±0.03 ^a
9	1.33±0.04	1.66±0.06 ^a	1.80±0.24 ^a	0.92±0.08 ^c
10	1.50±0.02	1.55±0.05 ^b	1.68±0.12 ^a	0.89±0.04 ^c
11	1.70±0.05	1.66±0.10 ^b	1.90±0.15 ^b	0.79±0.01 ^c
12	1.88±0.11	1.90±0.17 ^b	1.93±0.20 ^b	0.88±0.03 ^c
13	1.80±0.02	1.70±0.08 ^b	1.81±0.16 ^b	0.76±0.12 ^c
14	1.67±0.02	1.73±0.05 ^b	1.91±0.17 ^b	0.72±0.05 ^c
15	1.59±0.06	1.36±0.06 ^c	1.54±0.10 ^b	0.77±0.09 ^c
Toplam	25.16	29.93	31.94	24.87

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.19. Farklı konsantrasyonlarda peyniraltı suyu eklenmiş vinas (%25'lik) ortamlarında *T. versicolor* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)			
	Kontrol	Peynir Altı Suyu (%)		
		5	10	20
1	1.75±0.06	0.21±0.03 ^c	0.21±0.00 ^c	0.18±0.00 ^c
2	0.75±0.08	0.25±0.01 ^c	0.26±0.02 ^c	0.11±0.01 ^c
3	0.86±0.06	0.34±0.02 ^c	0.36±0.04 ^c	0.10±0.01 ^c
4	0.85±0.08	0.36±0.00 ^c	0.57±0.15 ^c	0.11±0.08 ^c
5	1.15±0.09	0.11±0.05 ^c	0.08±0.04 ^c	0.00±0.00 ^c
6	1.05±0.09			
7	1.12±0.05			
8	1.88±0.14			
9	1.12±0.02			
10	1.49±0.08			
11	1.56±0.01			
12	1.31±0.06			
13	1.30±0.24			
14	0.20±0.01			
15	0.38±0.09			
Toplam	16.77	1.27	1.48	0.5

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.20. Farklı konsantrasyonlarda peyniraltı suyu eklenmiş ZYFA (%25'lik) ortamlarında *T. versicolor* peletleriyle tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)			
	Kontrol	Peynir Altı Suyu (%)		
		5	10	20
1	1.16±0.17	0.64±0.04 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
2	2.61±0.11	2.72±0.20 ^b	2.03±0.16 ^c	0.01±0.00 ^c
3	2.32±0.03	2.88±0.17 ^a	3.21±0.20 ^a	1.29±0.11 ^c
4	1.77±0.09	2.96±0.17 ^a	3.69±0.05 ^a	4.07±0.00 ^a
5	1.76±0.18	2.36±0.39 ^b	2.61±0.27 ^a	4.64±0.15 ^a
6	1.42±0.04	2.94±0.08 ^a	3.40±0.34 ^a	4.10±0.18 ^a
7	1.32±0.07	2.50±0.15 ^a	3.06±0.20 ^a	3.91±0.08 ^a
8	1.33±0.09	2.40±0.29 ^a	3.14±0.09 ^a	5.16±0.16 ^a
9	1.33±0.04	1.97±0.08 ^a	2.61±0.05 ^a	4.85±0.15 ^a
10	1.50±0.02	2.33±0.17 ^a	2.99±0.10 ^a	5.11±0.05 ^a
11	1.70±0.05	2.40±0.20 ^a	2.92±0.20 ^a	4.11±0.08 ^a
12	1.88±0.11	2.10±0.09 ^b	2.69±0.08 ^a	4.40±0.36 ^a
13	1.80±0.02	1.79±0.09 ^b	2.25±0.11 ^a	4.56±0.24 ^a
14	1.67±0.02	1.77±0.13 ^b	2.20±0.04 ^a	4.58±0.27 ^a
15	1.59±0.06	1.77±0.04 ^a	2.00±0.04 ^a	3.51±0.04 ^a
Toplam	25.16	33.55	38.8	54.29

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Çizelge 7.21. Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor* hücreleriyle vinas (%25'lik) ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

G ü n	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)					
	Serbest hücre (10g)	Tutuklanmış hücre	Serbest hücre (20g)	Tutuklanmış hücre	Serbest hücre (30g)	Tutuklanmış hücre
1	0.13±0.00	0.12±0.01 ^b	0.29±0.00	0.38±0.02 ^a	1.75±0.06	0.53±0.01 ^c
2	0.44±0.01	0.53±0.04 ^a	0.58±0.06	0.72±0.01 ^a	0.75±0.08	0.89±0.10 ^b
3	0.49±0.03	0.58±0.02 ^a	0.68±0.25	0.78±0.00 ^b	0.86±0.06	0.91±0.08 ^b
4	0.56±0.01	0.75±0.02 ^a	0.68±0.19	0.75±0.05 ^b	0.85±0.08	0.87±0.05 ^b
5	0.62±0.01	0.59±0.01 ^b	0.70±0.07	0.65±0.00 ^b	1.15±0.09	0.78±0.01 ^c
6	0.66±0.02	0.58±0.03 ^c	0.71±0.04	0.59±0.03 ^c	1.05±0.09	0.75±0.03 ^c
7	0.74±0.05	0.59±0.03 ^c	0.77±0.02	0.49±0.01 ^c	1.12±0.05	0.61±0.02 ^c
8	0.65±0.06	0.64±0.02 ^b	0.76±0.12	0.62±0.05 ^b	1.88±0.14	0.80±0.02 ^c
9	0.84±0.03	0.74±0.02 ^c	1.58±0.05	0.75±0.04 ^c	1.12±0.02	1.03±0.04 ^c
10	0.92±0.02	0.69±0.02 ^c	1.82±0.32	0.56±0.06 ^c	1.49±0.08	0.83±0.06 ^c
11	0.73±0.04	0.75±0.04 ^b	0.78±0.16	0.73±0.04 ^b	1.56±0.01	1.23±0.21 ^c
12	0.82±0.01	0.76±0.00 ^b	0.51±0.04	0.91±0.02 ^a	1.31±0.06	0.89±0.12 ^c
13	1.07±0.05	0.91±0.00 ^c	0.03±0.02	0.77±0.04 ^a	1.30±0.24	1.10±0.03 ^b
14	1.08±0.12	1.29±0.09 ^a		0.95±0.11	0.20±0.01	1.09±0.07 ^a
15	1.10±0.11	1.11±0.15 ^b		1.15±0.16	0.38±0.09	1.28±0.08 ^a
T	10.85	10.63	9.89	10.8	16.77	13.59

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.22. Aljinat jele tutuklanmış *T. versicolor* hücreleriyle ZYFA (%25'lik) ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

G ü n	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)					
	Serbest hücre (10g)	Tutuklanmış hücre	Serbest hücre (20g)	Tutuklanmış hücre	Serbest hücre (30g)	Tutuklanmış hücre
1	0.65±0.01	0.49±0.24 ^b	1.04±0.11	0.59±0.10 ^c	1.16±0.17	0.46±0.06 ^c
2	2.28±0.10	1.64±0.08 ^c	2.57±0.17	3.92±0.22 ^a	2.67±0.01	3.89±0.09 ^a
3	1.38±0.08	1.22±0.07 ^c	2.24±0.05	2.35±0.30 ^b	2.32±0.03	3.71±0.32 ^a
4	0.88±0.04	0.84±0.03 ^b	1.78±0.04	1.91±0.12 ^b	1.77±0.09	2.86±0.05 ^a
5	0.91±0.02	0.74±0.06 ^c	1.41±0.03	1.48±0.11 ^b	1.76±0.18	2.10±0.14 ^b
6	0.96±0.03	0.79±0.07 ^c	1.39±0.03	1.32±0.05 ^c	1.42±0.04	1.77±0.05 ^a
7	0.93±0.07	0.96±0.19 ^b	1.36±0.08	1.49±0.00 ^a	1.32±0.07	1.75±0.07 ^a
8	0.93±0.07	0.98±0.05 ^b	1.33±0.03	1.67±0.04 ^a	1.33±0.09	1.89±0.05 ^a
9	1.03±0.01	1.09±0.01 ^a	1.29±0.05	1.87±0.04 ^a	1.33±0.04	2.10±0.00 ^a
10	1.35±0.06	1.17±0.01 ^c	1.59±0.04	1.82±0.05 ^a	1.50±0.02	2.26±0.08 ^a
11	1.42±0.07	1.27±0.05 ^c	1.76±0.04	2.00±0.01 ^a	1.70±0.02	2.48±0.04 ^a
12	1.55±0.05	1.21±0.05 ^c	1.93±0.14	1.85±0.01 ^b	1.88±0.11	2.22±0.08 ^b
13	1.29±0.02	1.11±0.03 ^c	1.86±0.09	1.82±0.09 ^b	1.80±0.02	1.87±0.00 ^a
14	1.29±0.10	1.17±0.10 ^b	1.70±0.12	1.89±0.03 ^a	1.67±0.07	2.00±0.07 ^a
15	1.31±0.01	1.29±0.12 ^b	1.61±0.06	1.84±0.13 ^a	1.59±0.02	2.05±0.05 ^a
16	1.42±0.03	1.01±0.18 ^c	1.67±0.06	1.94±0.08 ^a	1.71±0.00	2.11±0.05 ^a
17	1.12±0.03	0.94±0.14 ^c	1.94±0.14	1.88±0.22 ^b	1.91±0.04	2.16±0.06 ^a
18	0.90±0.03	0.87±0.03 ^b	1.72±0.16	1.97±0.03 ^a	1.82±0.02	2.32±0.11 ^a
19	1.07±0.01	0.78±0.22 ^c	1.67±0.01	1.97±0.13 ^b	1.92±0.06	1.78±0.07 ^a
20	0.79±0.04	0.85±0.06 ^b	1.67±0.00	1.67±0.04 ^b	1.70±0.11	1.96±0.08 ^a
T	22.53	20.42	33.53	37.25	34.28	41.69

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.23. Aktif karbona ve çam kozalağına tutuklanmış *T. versicolor* peletleriyle vinas (%25'lik) ortamında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)		
	Serbest	Aktif karbona tutuklanmış	Çam kozalağına tutuklanmış
1	1.75±0.06	1.33±0.01 ^c	0.64±0.05 ^c
2	0.75±0.08	2.71±0.08 ^b	0.73±0.01 ^c
3	0.86±0.06	3.29±0.06 ^a	1.18±0.02 ^a
4	0.85±0.08	2.39±0.03 ^a	1.18±0.04 ^a
5	1.15±0.09	2.07±0.06 ^a	1.23±0.04 ^a
6	1.05±0.09	1.54±0.02 ^a	1.36±0.02 ^a
7	1.12±0.05	1.41±0.03 ^a	1.44±0.06 ^a
8	1.88±0.14	1.26±0.00 ^c	2.03±0.05 ^b
9	1.12±0.02	1.50±0.00 ^a	1.67±0.06 ^a
10	1.49±0.08	1.32±0.05 ^c	1.79±0.10 ^a
11	1.56±0.01		2.41±0.07 ^a
12	1.31±0.06		1.89±0.12 ^a
13	1.30±0.24		1.92±0.00 ^a
14	0.20±0.01		1.65±0.05 ^a
15	0.38±0.09		1.68±0.12 ^a
Toplam(10)	12.02	18.82	
Toplam(15)	16.77		22.8

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

Ek 7.24. Aktif karbona ve çam kozalağına tutuklanmış *T. versicolor* peletleriyle ZYFA (%25'lik) ortamlarında tekrarlı kesikli süreçte lakkaz üretimi

Gün	Lakkaz Aktivitesi (U/ml)		
	Kontrol	Aktif karbon	Çam kozalağı
1	1.16±0.17	1.33±0.01 ^a	2.28±0.05 ^a
2	2.67±0.01	2.71±0.08 ^b	2.54±0.01 ^b
3	2.32±0.03	3.29±0.06 ^a	3.29±0.07 ^a
4	1.77±0.09	2.39±0.03 ^a	2.36±0.16 ^a
5	1.76±0.18	2.07±0.06 ^a	1.97±0.05 ^b
6	1.42±0.04	1.54±0.02 ^a	1.79±0.13 ^a
7	1.32±0.07	1.41±0.03 ^b	1.53±0.09 ^a
8	1.33±0.09	1.26±0.00 ^b	1.46±0.08 ^b
9	1.33±0.04	1.50±0.00 ^a	1.61±0.03 ^a
10	1.50±0.02	1.32±0.05 ^c	1.34±0.05 ^c
11	1.70±0.02		1.34±0.02 ^c
12	1.88±0.11		1.27±0.03 ^c
13	1.80±0.02		1.18±0.01 ^c
14	1.67±0.07		1.24±0.09 ^c
15	1.59±0.02		1.53±0.06 ^b
16	1.71±0.00		1.80±0.05 ^a
17	1.91±0.04		1.82±0.10 ^b
18	1.82±0.02		1.93±0.01 ^a
19	1.92±0.06		2.17±0.08 ^a
20	1.70±0.11		2.40±0.06 ^a
Toplam(10)	15.25	18.82	
Toplam(20)	34.28		36.85

^a Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p \leq 0.05$

^b Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında $p > 0.05$

^c Lakkaz aktivitesi kontrol ile karşılaştırıldığında kontrolden daha düşük

ÖZGEÇMİŞ

25.07.1977 tarihinde Konya'da doğdu. İlk öğrenimini Ankara'da, Orta öğrenimini Malatya'da tamamladı. 1994 yılında Malatya Lisesi'nden, 1999 yılında da İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nden mezun oldu. 2001 yılında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansını tamamladı. 2001 yılında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında doktora programına kayıt yaptırdı. 1999 yılından bu yana İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.