

22

INÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALKOL FABRİKASI ATIĞI VİNAS (ŞLEMPE)'İN BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL
FUNGUSLAR TARAFINDAN BİYODEGRADASYONUNDA RENK GİDERİMİ-ENZİM
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Özfer YEŞİLADA

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

INÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

"Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne"

İş bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında
DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan.. Prof. Dr. A. Nihat Bozruk *Udya*

Üye.. Prof. Dr. Nezir... Kalkan *NT*

Üye.. Doç. Dr. Kayahan... Fışkın... *K.F.*

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait
olduğunu onaylarım.

...../...../ 1992

Prof. Dr. Bekir CETINKAYA



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın başından sonuna kadar planlanmasında, yürütülmesinde ve gerçekleşmesinde yardımlarını ve desteğini esirgemeyen danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Kayahan Fışkın'a (İnönü Üniversitesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam sırasında desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Nihat Bozcuk'a (Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi) ve görüşlerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Nazif Kolankaya'ya (Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi) teşekkür ederim.

Araştırma sırasında element analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Grv. Yüksel Özdemir'e (İnönü Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim elemanı) , çalışmalarda kullandığım fungusların sistematüğini yapan Sayın Arş. Grv. Mustafa Işıloğlu'na (İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Elamanı) ve tez yazımı sırasında yardımlarını gördüğüm tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca Doktora çalışmamı desteleyen İnönü Üniversitesi Araştırma Fonu Yönetim Kuruluna teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında bana sabırla katlanan ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Elif Yeşilada'ya teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Melas alkol, maya ve amino asit fermentasyonu gibi çeşitli endüstriler için önemli bir ham madde kaynağıdır. Son 10 yılda Türkiye' nin alkol üretimi artmıştır. Vinas alkol fabrikası atık maddesidir. Alkol üretimi sırasında 1 litre alkole karşılık yaklaşık 9-14 litre vinas oluşmaktadır.

Vinasın yapısında bulunan bir polimer olan melanoidinden ötürü, koyu kahve rengi vardır. Melanoidinin rengi doğal biyolojik metodlarla zor giderilmekte ve kirlilik problemlerine neden olmaktadır.

Bu çalışmada, üç beyaz çürükçül (*Coriolus versicolor*, *Funalia trogii*, ve *Phanerochaete chrysosporium ME446*) vinas ortamında üretilmiş ve vinas renk giderim aktiviteleri, ayrıca renk giderimi ve üreme için optimum koşullar araştırılmıştır.

C. versicolor ve *F. trogii* için optimum koşullar pH 4.5; sıcaklık 30 C° ve 150 rpm olarak saptanmıştır. *P. chrysosporium ME446* için pH 4.5; sıcaklık 40 C° ve 150 rpm kullanılmıştır. Bu koşullarda *C. versicolor* % 75.32 ve *F. trogii* % 62.16 renk giderimi göstermişken, *P. chrysosporium ME446*' nin vinasın rengi üzerine hiçbir etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca ekim miktarının artırılması ile renk gideriminin artacağı da gösterilmiştir.

Statik koşullarda ise *C. versicolor* ve *F. trogii* ile sırasıyla % 53.40 ve % 48.73 renk giderimi saptanmıştır. Bu koşullarda *P. chrysosporium* için izlenebilen bir renk gide-

rimi saptanamamıştır. Bunun yanısıra, tutuklamanın (immobilizasyon) renk giderimine etkisi de çalışılmıştır. *C. versicolor* ve *F. trogii* için sırasıyla % 68.32 ve % 59.58 renk giderimi elde edilmiştir. Tutuklamanın renk giderimini artırıcı bir etkisi bulunamamıştır.

Diğer yandan, bu fungusların hücre dışı enzim üretim aktiviteleri test edilmiş ve izlenebilir ligninaz, glukoz oksidaz, alkol oksidaz ve amino asit oksidaz aktiviteleri saptanamamıştır. Fakat *C. versicolor* ve *F. trogii* yüksek lakkaz ve peroksidaz aktivitesi göstermiş ve her iki fungus ayrıca yüksek NADH oksidasyon aktivitesi de göstermiştir. *P. chrysosporium*' da hücre dışı oksidaz ve peroksidaz aktivitesi saptanamamıştır.

C. versicolor ve *F. trogii* trophofazda renk giderimi ve biyokütle üretimine paralel olarak yüksek lakkaz ve peroksidaz üretebilmekte ve gelişimin bundan sonraki evrelerinde salınımına devam etmektedir.

Bu işlemler sırasında *C. versicolor* ve *F. trogii* ile sırasıyla % 42.71, % 37.18 kimyasal oksijen istemi (KOİ) ve % 68.16, % 63.22 toplam şeker azalımı elde edilebileceği saptanmıştır.

Her üç fungusla da yüksek protein miktarları elde edilmiş ve *C. versicolor* için % 28.18, *F. trogii* için % 27.62 ve *P. chrysosporium* için % 21.13 protein saptanmıştır.

Bununla birlikte, hidrojen peroksitin renk giderimine etkisi araştırılmış ve renk gideriminde hidrojen peroksitin olası rolü tartışılmıştır.

Deneysel sonuçlarımız lignin degradasyon sisteminin bü-

tününün veya bir kısmının renk gideriminde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

ABSTRACT

Molasses is the important raw material for various industries such as alcohol, baker's yeast and amino acid fermentation. In the past ten years alcohol production has increased in Turkey. Vinasse is a waste water of alcohol factory. During the alcohol production approximately 9-14 liter of vinasse is produced for 1 liter of alcohol.

Vinasse has a dark color which comes from the dark brown polymer, melanoidin. Melanoidin is hardly decolorized by usual biological methods and causes pollution problems.

In this work, three white rot fungi (*Coriolus versicolor*, *Funalia trogii* and *Phanerochaete chrysosporium* ME446) were grown on vinasse medium and their vinasse decolorizing abilities and also optimum conditions for decolorization and growth were investigated.

The optimum conditions for *C. versicolor* and *F. trogii* were determined as pH 4.5 ; temperature 30 C° and 150 rpm. It has been used as pH 4.5 ; temperature 40 C° and 150 rpm for *P. chrysosporium* ME446. In these conditions while *C. versicolor* showed a decolorizing yield of 75.32 % and *F. trogii* 62.16 %, *P. chrysosporium* had no effect on the color of vinasse. It is also shown that decolorization was increased by increasing the inoculum concentration.

In the static conditions 53.40 % and 48.73 % decolorization were determined with *C. versicolor* and *F. trogii* respectively. In these conditions no detectable decoloriza-

tion was determined for *P. chrysosporium*. Moreover, the effect of immobilization on decolorization was studied. 68.32 % and 59.58 % decolorization were obtained for *C. versicolor* and *F. troglia* respectively. No positive effect of immobilization on decolorization was found.

On the other hand, extracellular enzyme production activities of these fungi were tested and no detectable ligninase, glucose oxidase, alcohol oxidase and amino acid oxidase activities were determined. But *C. versicolor* and *F. troglia* exhibited high laccase and peroxidase activities, and these two fungi showed high NADH oxidizing activity too. In *P. chrysosporium* the extracellular oxidase and peroxidase activities were not determined.

C. versicolor and *F. troglia* were able to produce high laccase and peroxidase during the trophophase parallel to decolorization and biomass production and continued their excretion in the later phases of development.

During these processes, it was also observed that 42.71 %, 37.18 % chemical oxygen demand (COD) and 68.16 %, 63.22 % total sugar reduction can be obtained with *C. versicolor* and *F. troglia* respectively.

High protein yield were obtained for three fungi. For *C. versicolor* 28.18 %, *F. troglia* 27.62 % and *P. chrysosporium* 21.13 % protein were determined.

Meanwhile, the effect of hydrogen peroxide on decolorization was investigated and the possible role of hydrogen peroxide on decolorization was discussed.

Finally, experimental results suggest that all or a part

of the lignin-degrading system can play a part in decolorization.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|---|----|
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1 Çevre ve Çevre Kirliliği | 1 |
| 1.2 Biyoteknoloji | 2 |
| 1.3 Fungusların Biyoteknolojik Açıdan Kullanımı | 4 |
| 1.4 Immobilize (Tutuklanmış) Enzim ve Hücrelerin Uygulama Alanları | 6 |
| 1.5 Immobilizasyon (Tutuklama) Yöntemleri | 7 |
| 1.6 Tek Hücre Proteini Üretimi | 7 |
| 1.7 Alkol Fabrikası Atığı Vinasın İçeriği | 9 |
| 1.8 Vinasın Çevre Kirliliğine Etkisi | 10 |
| 1.9 Vinası Değerlendirme Yönündeki Çalışmalar | 12 |
| 2. YÖNTEM VE GEREÇLER | 14 |
| 2.1 Kimyasallar | 14 |
| 2.2 Çalışmada Kullanılan Fungusların Elde Edilmesi | 14 |
| 2.3 Fungus Türünün Saptanması ve Miselyum Eldesi | 15 |
| 2.4 Çalışmalarda Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması | 15 |
| 2.5 Kültür Koşulları | 16 |
| 2.6 Çalışmalarda Kullanılan Beyaz Çürükçül Fungusların | 17 |
| 2.6.1 Optimum pH'nın Saptanması | 17 |
| 2.6.2 Optimum sıcaklığın saptanması | 17 |

| | |
|---|----|
| 2.6.3 Optimum çalkalama hızının saptanması | 17 |
| 2.6.4 Fungus üretiminde vinas ortamına eklenecek misel süspansiyonunun saptanması | 18 |
| 2.7 pH'nın Ölçümü | 18 |
| 2.8 Toplam Şeker Miktarı ve Değişiminin Ölçümü | 18 |
| 2.9 Vinasdaki Protein Miktarının Ölçümü | 19 |
| 2.10 Vinasın Mn, Fe, Cu, K ve Al Miktarının Ölçümü | 20 |
| 2.11 Askıda Katı Madde Miktarının Ölçümü | 20 |
| 2.12 Kültür Ortamındaki Kimyasal Oksijen İsteminin (KOf) Ölçümü | 21 |
| 2.13 Kültür Ortamındaki Renk Değişiminin Ölçümü | 21 |
| 2.14 Hücresel Protein Miktarının Ölçümü | 21 |
| 2.15 Kültür Ortamlarında Biyokitle Miktarının Ölçümü | 22 |
| 2.16 Çalışmada Kullanılan Fungusların Tutuklanması | 22 |
| 2.17 Kültür Ortamlarındaki Ekstrasellüler Enzim Aktivitelerinin Saptanması | 23 |
| 2.18 Vinasın pH ve Renk Değişimi Üzerine H ₂ O ₂ 'nin Etkisi | 24 |
| 2.19 Vinas Besiyerine Ekilen Hücre Miktarının Ölçümü | 25 |
| 3. BULGULAR | 26 |

| | |
|--|----|
| 3.1 Alkol Fabrikası Atığı Olan Vinasın | |
| İçeriği | 26 |
| 3.2 Ortama Ekilen Fungus Miktarı | 26 |
| 3.3 Beyaz Çürükçül Funguslardan <i>Coriolus</i> | |
| <i>versicolor</i> 'un Vinas Ortamında Optimum Fizyolojik | |
| Koşullarının ve Ortam Renginin Gideriminin | |
| Saptanması | 27 |
| 3.3.1 pH'nın etkisi | 27 |
| 3.3.2 Sıcaklığın etkisi | 32 |
| 3.3.3 Çalkalama hızının etkisi | 39 |
| 3.3.4 Ekim miktarının etkisi | 44 |
| 3.4 Beyaz Çürükçül Funguslardan <i>Funalia trogii</i> 'nin | |
| Vinas Ortamında Optimum Fizyolojik | |
| Koşullarının ve Ortam Renginin Gideriminin | |
| Saptanması. | 53 |
| 3.4.1 pH'nın etkisi | 53 |
| 3.4.2 Sıcaklığın etkisi | 59 |
| 3.4.3 Çalkalama hızının etkisi | 66 |
| 3.4.4 Ekim miktarının etkisi | 71 |
| 3.5 Immobilize Hücrelerin Vinas Renk ve pH'sına | |
| Etkisi | 80 |
| 3.6 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ' un Vinas | |
| Ortamında İnkübasyonu Sırasında Ortam | |
| Renginin Giderimi ve Biyokitle Değişimi | 82 |
| 3.7 Hücresel Protein Miktarının Saptanması | 83 |
| 3.8 Hidrojen Peroksitin (H_2O_2) Vinas Ortamının | |
| pH'sı ve Renk Giderimi Üzerine Etkisi | 84 |
| 4. TARTIŞMA | 87 |

| | |
|---------------------|------|
| | xiii |
| KAYNAKLAR | 110 |
| UZGECMİŞ | 120 |

| SEKİLLER | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Şekil 2.1 Standart toplam şeker eğrisi. | 19 |
| Şekil 2.2 Standart toplam protein eğrisi. | 20 |
| Şekil 3.1 <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üremesi ve ortam renginin değişimi (%). | 28 |
| Şekil 3.2 <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. | 29 |
| Şekil 3.3 <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üremesi ve ortam renginin değişimi (%) | 29 |
| Şekil 3.4 <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi (%) | 30 |
| Şekil 3.5 <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üremesi ve ortam renginin değişimi (%) | 30 |
| Şekil 3.6 <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi (%). | 31 |
| Şekil 3.7 <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üremesi ve ortam renginin değişimi (%) | 31 |
| Şekil 3.8 <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. | 32 |
| Şekil 3.9 <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. | 34 |
| Şekil 3.10 <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi | 34 |
| Şekil 3.11 <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. | 35 |

| | |
|---|----|
| Şekil 3.12 <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. | 35 |
| Şekil 3.13 <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi | 36 |
| Şekil 3.14 <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. | 36 |
| Şekil 3.15 <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. | 37 |
| Şekil 3.16 <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi | 37 |
| Şekil 3.17 <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. | 38 |
| Şekil 3.18 <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. | 38 |
| Şekil 3.19 <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. | 40 |
| Şekil 3.20 <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. | 40 |
| Şekil 3.21 <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. | 41 |
| Şekil 3.22 <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. | 41 |
| Şekil 3.23 <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. | 42 |
| Şekil 3.24 <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. | 42 |

| | | |
|------------|--|----|
| Sekil 3.25 | <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . | 43 |
| Sekil 3.26 | <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . | 43 |
| Sekil 3.27 | <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . | 46 |
| Sekil 3.28 | <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 46 |
| Sekil 3.29 | <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . | 47 |
| Sekil 3.30 | <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi | 47 |
| Sekil 3.31 | <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . . | 48 |
| Sekil 3.32 | <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerin günlere bağlı değişimi. . . . | 48 |
| Sekil 3.33 | <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . | 49 |
| Sekil 3.34 | <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . | 49 |
| Sekil 3.35 | <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . | 50 |
| Sekil 3.36 | <i>C.versicolor</i> 'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . | 50 |
| Sekil 3.37 | <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk, KOI, toplam şeker ve biyokitle değişimi. | 51 |

| | |
|---|----|
| Şekil 3.38 <i>C.versicolor</i> 'un optimum koşullarda vinas ortamında statik olarak üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. | 52 |
| Şekil 3.39 <i>C.versicolor</i> 'un optimum koşullarda statik olarak üretimi sırasında lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri. | 53 |
| Şekil 3.40 <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üremesi ve ortam renginin değişimi. | 55 |
| Şekil 3.41 <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 56 |
| Şekil 3.42 <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üremesi ve ortam renginin değişimi. | 56 |
| Şekil 3.43 <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 57 |
| Şekil 3.44 <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üremesi ve ortam renginin değişimi. | 57 |
| Şekil 3.45 <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 58 |
| Şekil 3.46 <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üremesi ve ortam renginin giderimi. | 58 |
| Şekil 3.47 <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 59 |
| Şekil 3.48 <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . | 61 |
| Şekil 3.49 <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 61 |
| Şekil 3.50 <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . | 62 |

| | |
|---|----|
| Şekil 3.51 <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz | |
| aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 62 |
| Şekil 3.52 <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi | |
| sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . . | 63 |
| Şekil 3.53 <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz | |
| aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 63 |
| Şekil 3.54 <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi | |
| sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . . | 64 |
| Şekil 3.55 <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz | |
| aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 64 |
| Şekil 3.56 <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi | |
| sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . . | 65 |
| Şekil 3.57 <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz | |
| aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 65 |
| Şekil 3.58 <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi | |
| sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . . | 66 |
| Şekil 3.59 <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz | |
| aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 67 |
| Şekil 3.60 <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi | |
| sırasında pH, renk ve biyokitle | |
| değişimi | 68 |
| Şekil 3.61 <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz | |
| aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 68 |
| Şekil 3.62 <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi | |
| sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . . | 69 |
| Şekil 3.63 <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz | |
| aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 69 |
| Şekil 3.64 <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi | |

| | | |
|------------|---|----|
| | sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . . | 70 |
| Şekil 3.65 | <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 70 |
| Şekil 3.66 | <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . . | 71 |
| Şekil 3.67 | <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 72 |
| Şekil 3.68 | <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . . | 73 |
| Şekil 3.69 | <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 73 |
| Şekil 3.70 | <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . . | 74 |
| Şekil 3.71 | <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 74 |
| Şekil 3.72 | <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . . | 75 |
| Şekil 3.73 | <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 75 |
| Şekil 3.74 | <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. . . | 76 |
| Şekil 3.75 | <i>F.trogii</i> 'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. . . | 76 |
| Şekil 3.76 | <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk, KOİ, toplam şeker ve biyokitle değişimi. | 77 |
| Şekil 3.77 | <i>F.trogii</i> 'nin optimum koşullarda vinas ortamında statik olarak üretimi | |

| | |
|--|----|
| | xx |
| sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. | 79 |
| Şekil 3.78 <i>F.trogii</i> 'nin optimum koşullarda statik olarak üretimi sırasında lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri. | 79 |
| Şekil 3.79 Tutuklanmış <i>C.versicolor</i> 'un vinas ortamında inkübasyonu sırasında renk ve pH değişimi. | 81 |
| Şekil 3.80 Tutuklanmış <i>F.trogii</i> 'nin vinas ortamında inkübasyonu sırasında renk ve pH değişimi. | 81 |
| Şekil 3.81 <i>P.chryso sporium</i> 'un vinas ortamında inkübasyonu sırasında üreme, pH ve renk değişimi. | 82 |
| Şekil 3.82 Farklı H ₂ O ₂ konsantrasyonlarında vinas renginin giderimi. | 86 |
| Şekil 4.1 Statik ve çalkalamalı koşullarda üretilen <i>C.versicolor</i> , <i>F.trogii</i> ve <i>P.chryso sporium</i> 'un maksimum kuru misel değerlerinin karşılaştırılması. | 89 |
| Şekil 4.2 Statik ve çalkalamalı koşullarda üretilen <i>C.versicolor</i> ve <i>F.trogii</i> 'nin, maksimum renk gideriminin karşılaştırılması. | 90 |
| Şekil 4.3 Ekim miktarına bağlı olarak fungusların oluşturduğu maksimum renk gideriminin karşılaştırılması. | 91 |
| Şekil 4.4 Çalkalama hızına bağlı olarak <i>C.versicolor</i> ve <i>F.trogii</i> 'nin maksimum kuru misel değerlerinin karşılaştırılması. | 92 |
| Şekil 4.5 Çalkalama hızına bağlı olarak <i>C.versicolor</i> ve | |

| | | |
|------------|---|-----|
| | <i>F.trogii</i> tarafından oluşturulan maksimum renk gideriminin karşılaştırılması. | 93 |
| Şekil 4.6 | Farklı sıcaklıklarda <i>C.versicolor</i> ve <i>F.trogii</i> ile elde edilen maksimum kuru misel değerlerinin karşılaştırılması. | 94 |
| Şekil 4.7 | Farklı sıcaklıklarda <i>C.versicolor</i> ve <i>F.trogii</i> ile elde edilen maksimum renk gideriminin karşılaştırılması. | 94 |
| Şekil 4.8 | Farklı çalkalama hızlarında yürütülen renk giderim çalışmalarından bir görüntü. | 96 |
| Şekil 4.9 | Farklı ekim miktarlarında yürütülen bir çalışmada renk açılımının makroskobik görünümü. | 97 |
| Şekil 4.10 | Farklı miktarlarda vinas ortamına eklenen tutuklanmış hücrelerin maksimum renk gideriminin karşılaştırılması | 98 |
| Şekil 4.11 | Malat dehidrogenazın NADH ve oksijen ilişkisinde mümkün mekanizmalar | 104 |

| TABLolar | Sayfa |
|--|-------|
| Tablo 1. Vinas'ın içeriği | 10 |
| Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan vinasın içeriği. | 26 |
| Tablo 3.2 <i>C. versicolor</i> 'un optimum koşullarda vinas besiyerinde üretimi sırasında pH, renk, KOf, toplam şeker, biyokitle enzim aktivitesi değişimleri. | 51 |
| Tablo 3.3 <i>F. trogii</i> 'nin optimum koşullarda vinas besiyerinde üretimi sırasında pH, renk, KOf, toplam şeker, biyokitle ve enzim aktivitesi değişimleri. | 78 |
| Tablo 3.4 Fungusların protein yüzdeleri. | 83 |
| Tablo 3.5 Farklı konsantrasyonlarda hidrojen peroksit eklenmiş vinas ortamlarında renk değişimi. | 84 |
| Tablo 3.6 Farklı konsantrasyonlarda hidrojen peroksit eklenmiş vinas ortamlarında pH değişimi. | 85 |

1. GİRİŞ

1.1 Çevre ve Çevre Kirliliği

İnsan ve çevre birbirini tamamlayan ve birbirinden ayrılamayan iki olgudur. Canlılar yaşamak için çevresi ile ilişkide bulunmak zorundadır. Bu ilişki enerji ve madde alışverişi şeklinde açıklanabilir. Canlı populasyonundaki artışa bağlı olarak beslenme, giyim, çeşitli ham maddeler ve enerji gereksinimlerinin teknolojik olarak karşılanmaları, atık ve çevre kirliliği problemini karşımıza çıkarmaktadır. Bu atıkların çevreye yayılması ve ekosistemde birikmesi çevre kirliliğine neden olmaktadır.

Son yıllarda çevre kirliliği olgusu insan-doğa dengesini bozar duruma gelmiştir. 19. yüzyılda başlayan ve hızla gelişen endüstri, çevre kirliliğinin temel nedenidir. Endüstrileşmenin planlı olmaması ve çevre faktörünün göz ardı edilmesi doğal kaynakların kirlenmesi ile sonuçlanmaktadır. Ekolojik sistemlerde atık madde ve enerji belli sınırlara kadar dengelenmektedir. Fakat ekolojik denge bu sınırlar dışında, tamiri imkansız şekilde bozunmaktadır.

Çevre kirliliği genel olarak hava, su, toprak ve gürültü kirliliği olarak ele alınmaktadır. Endüstrileşmenin oluşturduğu kirliliğin nedenleri arasında son ürün olarak sıvı, katı ve gaz formunda atılan atıkların değerlendirilememesi ve bunların atık madde olarak doğada sürekli birikimi sayılabilir.

Endüstriyel atıklar alıcı ortam olarak suya, toprağa ve atmosfere verilmelerine bağlı olarak farklı kirlilik

kriterlerine neden olmaktadır (Türkiye Çevre Sorunları Vakfı 1989). Endüstrinin oluşturduğu kirlilikleri kısaca; fiziksel, kimyasal, fizyolojik ve biyolojik kirlilik olarak sıralayabiliriz. Bunlara ek olarak pestisit, herbisit ve sentetik gübre yüklenmesi sonucunda ortaya çıkan toprak kirlenmesi doğal dengenin bozulmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak endüstriyel atıkların verildiği ortama bağlı olarak farklı kirlilik problemleri ortaya çıkmaktadır (Öztañ 1985). Endüstri kuruluşları üretim yapılarına göre birden fazla ortamı kirletebilir. Örneğin, demir-çelik, şeker, çimento, petrokimya, tekstil ve gıda endüstrileri hava, su ve toprak kirliliğine neden olmaktadır (Türkiye Çevre Sorunları Vakfı 1989).

Son yıllarda biyoteknoloji alanında çevre ve çevre kirliliğinin oluşturduğu sorunların çözümü yönünde çok yönlü araştırmalar yapılmaktadır (Bumpus vd. 1985; Livingston ve Willacy 1991; Misra 1991). Özellikle biyoteknolojinin ve endüstriyel mikrobiyolojinin attığı dev adımlar bu yöndeki çalışmalara temel teşkil etmektedir.

1. 2 Biyoteknoloji

Biyoteknoloji; maddenin sentez, yıkım ya da dönüşümünde biyolojik sistemlerin kullanılması olarak tanımlanabilir.

Biyoteknolojik çalışmalar, çevre kirliliği problemi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Atıkların yıkım ve çevriminde hücre ve hücre bileşenlerinin kullanılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Atlow vd. 1984; Hammel vd. 1986; Platt

vd. 1985).

Biyoteknoloji biyokimya, genel biyoloji, mikrobiyoloji, kimya mühendisliği ve proses mühendisliği gibi bilim dallarının işbirliğini gerektirmektedir. Polisakkarit, ilaç, hormon, tek hücre proteini eldesi, enzim üretimi, enzimlerin tutuklanması, biyoreaktör yapımı, atıkların çevrimi, değerlendirilmesi ve atıklardan enerji eldesi gibi çalışmalar biyoteknolojinin bünyesi içerisinde yer almaktadır. Ayrıca gen mühendisliği alanındaki çalışmalar da gün geçtikçe artmaktadır (Brown vd.1991 ; Huoponen vd. 1990; Smith 1988; Zhang vd. 1986). Biyoteknolojik çalışmalar hücre veya hücre bileşenlerinin, organik madde üzerinde özgül kimyasal ve fiziksel değişimler oluşturmak üzere kullanılmasını da içermektedir.

Biyolojik yöntemlerle organik maddelerin üretiminin, diğer yöntemlere göre (kimyasal yöntem) bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Yüksek miktarda madde üretimi ve tepkimelerin düşük sıcaklıklarda devamı avantajları, biyolojik sistemlerin kolay kontamine olması ise dezavantajları arasında sayılabilir. Bazı sistemlerde, örneğin; tek hücre protein üretim çalışmalarında koşulların mutlaka steril olması bir zorunluluktur. Çalışma sistemleri amaca yönelik olarak kesikli, yarı sürekli ve sürekli üretim sistemleri olabilir. Kültürler statik ve çalkalamalı olarak üretilebilir. Biyolojik katalizörler serbest veya tutuklanmış (immobilize) olarak kullanılabilir. Enzim veya hücrelerin immobilizasyon teknikleri çalışmaları günden güne artmaktadır (Wiseman 1986). Son yıllarda, enzim tutuklanması yerine doğrudan hücrelerin tutuklanması çalışmaları önem kazanmıştır. Hücrelerin

tutuklanması hem zaman kaybının önlenmesi, hem de enzim saflaştırılması gibi zahmetli ve pahalı bir basamağın aşılmasını sağlamaktadır.

Tutuklanmış biyolojik katalizörlerin avantajları arasında, katalitik prosesin daha kolay kontrolünü sağlaması ve enzimlerin kararlılığının uzun süre devam etmesi sayılabilir (Çağlar 1981; Smith 1988).

1.3 Fungusların Biyoteknolojik Açıdan Kullanımı

Biyoteknoloji alanındaki son gelişmeler endüstriyel fungusların, önemini ve gerekliliğini kanıtlamaktadır. (Berry 1988; Smith 1988). Yaklaşık 120 000 fungus türü bilinmekte ve bunların pek çoğu endüstriyel olarak önemli bulunmaktadır. Endüstriyel funguslar kullanılarak etanol, sitrik asit, glukonik asit, vitamin, amino asit ve polisakkarit gibi primer metabolitler ve ayrıca antibiyotik gibi sekonder metabolitler elde edilmektedir (Smith 1988; Wiseman 1986). Son yıllarda fungusların bu aktivitelerinin daha geniş endüstriyel alanlara adaptasyonu çalışmaları yapılmaktadır. Özellikle; çevre biyoteknolojisi, sıvı atık muamelesi, tek hücre proteini üretimi ve yakıt teknolojisine, uygulama çalışmaları yapılmaktadır (Algur ve Gökalp 1991; Paszczyński vd. 1991). Ayrıca DDT gibi insektisitlerin degradasyonunda fungusların kullanılması çalışmaları sürdürülmektedir (Bumpus ve Aust 1987).

Yukarıda belirttiğimiz gibi pek çok alandaki problemlerin çözümünde odun çürükçülü funguslar, özellikle yüksek enzim kapasitesine sahip olan beyaz çürükçül funguslar kul-

lanılmaktadır (Eriksson 1990; Hammel vd. 1986).

Beyaz çürükçül funguslar, *Basidiomycetes* sınıfına dahil olup, yüksek enzim sentez kapasitesine sahiptirler; Lakkaz, peroksidaz, ligninaz, glikoz oksidaz ve NADH peroksidaz, (NADH oksidaz) gibi enzimleri hücre dışı olarak sentezleyebilmeleri çevre biyoteknolojisindeki önemlerini bir kat daha artırmaktadır. Beyaz çürükçül funguslar ve onların potansiyel enzimleri ile çok fazla oranda araştırma yapılmasına rağmen, enzim mekanizmalarının düzenlenmesi hakkında ayrıntılı bilgi yoktur (Eriksson 1985).

Lignini yıkma yeteneklerinden dolayı lignolitik funguslar olarak da isimlendirilen bu funguslar aromatik hidrokarbonların halkasal yapısını kırabilen tek ökaryot canlıdır. Beyaz çürükçül fungusların bu degradasyon kapasitelerinden lakkaz, peroksidaz, ligninaz, NADH oksidaz, Mn-peroksidaz ve glukoz oksidaz gibi enzimler sorumludur. Çalışmalar, özellikle kağıt fabrikası atığı olan ligninin renginin giderimi, degradasyonu ve lignosellülozlu maddelerden ligninin uzaklaştırılması üzerinde yoğunlaşmıştır (Fışkın vd. 1989; Hammel ve Moen 1991; Kolankaya vd. 1982; Kolankaya vd. 1989). Enzimlerin veya fungusların tutuklanması, bu sistemlerin atık yıkım kapasitelerinin araştırılması, enzimlerin üretim ve aktivitesinin saptanması çalışmaları da yapılmaktadır (Asada vd. 1986; Datta vd. 1991; Kelley ve Reddy 1986; Szklarz vd. 1989).

1.4 Immobilize (Tutuklanmış) Enzim ve Hücrelerin Uygulama Alanları

Enzimlerin uygun taşıyıcılara bağlanması sonucu kararlı, suda çözünmeyen ve daha ekonomik katalizörler, yani tutuklanmış enzimler elde edilir (Telefoncu 1979). Son 25 yıldan beri enzim ve proteinlerin tutuklanmasına ilişkin teknikler geliştirilmiştir (İkizoğlu 1982; Pekin 1982; Telefoncu 1982). Yukarıda belirttiğimiz gibi, enzimlerin veya hücrelerin tutuklanarak kullanılmasının pek çok üstünlükleri bilinmektedir. Amino asit, koenzim, etil alkol ve bira, bazı organik asitler, biyokimyasal maddeler, antibiyotikler ve ilaçların üretimi, karbonhidrat dönüşümleri ve çevre kirliliğine neden olan atıkların parçalanması tutuklanmış mikroorganizmaların uygulanma alanları arasındadır (Arcuri vd. 1985; Ferschl vd. 1991; Sazcı ve Açan 1986; Telefoncu 1982; Tsay ve To 1986).

Mikrobiyal kaynaklı enzimler, endüstriyel amaçlar için çok uygundur ve bazı durumlarda enzimin hücrelerden ekstrakte edilmesine de gerek yoktur. Hücrelerin tutuklanmasının enzimlerin tutuklanmasına göre çeşitli üstünlükleri vardır. Hücre içerisinde enzimlerin kendi doğal çevrelerini koruması, saflaştırma ve ekstraksiyon işlemlerine gerek duyulmaması, enzim aktivite kaybının azalması ve enzimlerin hücre içerisinde daha kararlı kalması bu üstünlükler arasındadır (Smith 1988; Telefoncu 1982; Wiseman 1986).

Son yıllarda fenol, 4-kloro fenol, benzen türevleri ve DDT gibi toksik bileşiklerin degradasyonu için tutuklanmış hücre kullanım çalışmaları bildirilmektedir (Betmman

ve Rehm 1984,1985; Beunink ve Rehm 1988; Kennedy ve Cabral 1983; Sahasrabudhe vd. 1988). Tsay ve To 1986, sitrik asit üretiminde tutuklanmış *Aspergillus niger* kullanılabileceğini rapor etmiştir. Ayrıca lignin yıkımının artırılması ve optimizasyonu çalışmalarında hücre tutuklama teknikleri denenmektedir (Austin vd. 1991; Linko ve Zhong 1991).

1.5 Immobilizasyon (Tutuklama) Yöntemleri

Pratikte tutuklama için fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır:

Fiziksel yöntemler: 1- Polimer matriks (jel) içinde tutuklama

2- Mikrokapsülleme

3- Yarı-geçirgen bir zar içinde tutuklama

Kimyasal yöntemler: 1- Kovalent bağlama

2- Çapraz bağlama

Polimer matriksi içinde tutuklama en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Hücreleri tutuklamanın hızlı, emin ve etkin bir yolu hücreleri aljinat jelleri içine tutuklamaktır (Ikizoğlu 1982; Smith 1988; Wiseman 1986).

1.6 Tek Hücre Proteini Üretimi

Tek hücre proteini terimi ilk kez Massachusetts Teknoloji Enstitüsü araştırmacıları tarafından kullanılmıştır.

Günümüzde tek hücre proteini terimi funguslar için de kullanılmaktadır. 1950'lerin ortalarında başlayan protein yetersizliği mikroorganizmaların insan ve hayvan besini olarak kullanılmalarına olan ilgiyi artırmıştır. Mikroorganizmalar insan ve hayvan besini olarak değerlendirilmektedir. Mikroorganizmaların üretiminde katı ve sıvı substratlar kullanılmaktadır. Özellikle atıkların sürekli olarak artması ve birikmesi sonucunda oluşan çevre kirliliği problemi, atıklarla yapılan tek hücre proteini üretim çalışmaları sırasında bazı atıkların besiyeri olarak kullanılmalarına yol açmıştır (Lovland vd. 1976; Solomons 1983; Totti ve Nicoli 1983). Bu yönde yapılan çalışmaların esas amacı çeşitli endüstri atıklarının değerlendirilmesi, proteince zengin bir yem üretimi ve sonuç olarak çevre kirliliğinin önlenmesidir.

Tek hücre proteini üretiminde lignosellülozlu atıklar, çeşitli gıda, petrol ve kağıt endüstrisi atıklarının kullanılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Aran 1978; Aran ve Ücal 1981; Wood 1985). Tek hücre protein üretim çalışmaları bakteri, maya ve funguslarla yürütülmektedir. Çeşitli atıklarla yapılan çalışmalarda %10-73.2 tek hücre proteini üretildiği bildirilmektedir (Litchfield 1968; Njoku ve Antai 1987; Yazıcıoğlu vd. 1980; Vanetti vd. 1983).

Alkol fabrikası atığı olan vinas (şlempe) tek hücre protein üretim çalışmalarında ve enzim aktivite araştırmalarında besiyeri olarak kullanılmaktadır (Aran 1978; Algur ve Gökalp 1991; Rosalem 1985; Sant'Anna vd. 1986; Silva ve Nicoli 1985 Yeşilada vd.1991). Vinaslı ortamda protein ve üreme miktarlarının optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır (Algur ve Gökalp 1991; Cardoso ve Nicoli

1981; Shannon ve Stevenson 1975; Tauk ve Gambaie 1982).

Funguslardan protein eldesinin çeşitli avantajları vardır. Bunlar arasında: besin değerleri, toksik olmamaları, alerjik reaksiyon göstermemeleri, tadının iyi olması sayılabilir (Edelman vd. 1983). Buna ek olarak bazı araştırmacılar vinas besiyerinde fungusların tek hücre protein kaynağı olarak kullanılmasının, bakterilere göre nükleik asit içeriğinin düşük olması ve tadının daha iyi olması nedeni ile cazip olduğunu savunmaktadır (Cardoso ve Nicoli 1981).

1.7 Alkol Fabrikası Atığı Vinasın İçeriği

Fermantasyon endüstrisi olması nedeni ile alkol fabrikalarının atık suyu parçalanabilir maddeler açısından zengindir. Atık suda bulunan maddelerin büyük bir kısmı alkol üretiminde substrat olarak kullanılan melasdan ileri gelmektedir. Pekçok fermantasyon atığında olduğu gibi organik ve inorganik maddelerce çok zengindir. Alkol üretimi sırasında 1 L alkole karşılık 11-13 L vinas oluşmaktadır. Erzurum-İlica Etil Alkol Fabrikasından günde yaklaşık 700 ton vinas atılmaktadır (Algur ve Kadioğlu 1989). İşletmede kullanılan melas, maya ve üretim sistemlerine göre vinasın içeriği de değişmektedir (Taygun 1984). Vinas yüksek oranda azot ve fosfor içermektedir. Çeşitli vitaminler ve amino asitler de vinasda bulunmaktadır (Koutinas vd. 1991; Yazıcıoğlu vd. 1980). Tablo 1'de vinasın içeriği verilmiştir (Pena vd. 1986).

Tablo 1. Vinasın İçeriği

| | | |
|-----------------|-----------------------|------|
| pH | | 4.89 |
| Renk | | Koyu |
| KOI | (g O ₂ /L) | 70.0 |
| BOİ | (g O ₂ /L) | 60.0 |
| Toplam katı | (g/L) | 98.4 |
| Askıda katı | (g/L) | 6.4 |
| Toplam azot | (g/L) | 3.9 |
| Sülfat | (g/L) | 2.9 |
| Etanol | (g/L) | 5.0 |
| Gliserol | (g/L) | 5.2 |
| Asetik asit | (g/L) | 2.8 |
| Propiyonik asit | (g/L) | 0.0 |
| Butirik asit | (g/L) | 0.0 |
| Laktik asit | (g/L) | 10.0 |
| Süksinik asit | (g/L) | 0.5 |

1.8 Vinasın Çevre Kirliliğine Etkisi

Zengin organik ve inorganik yapısı nedeni ile, vinasın fabrikadan çıktığı formda araziye atılması hem ekonomik kayıplar oluşturmakta ve hem de çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu çeşit atıklar toprağın özelliğini ve bitki büyümesini kötü yönde etkilemektedir (Algur ve Kadioğlu 1989; Oruç ve Gök 1990; Srivastave ve Sahai 1987).

Araştırmacılar vinasın çok koyu bir rengi olduğunu ve vinasın renginin normal mikrobiyolojik arıtım prosesleri

ile giderilemediğini bildirmektedir. Bu rengin büyük bir kirlilik problemi oluşturduğu ve mutlak suretle giderilmesi gerektiği rapor edilmiştir (Ohmomo vd. 1988; Sirianuntapi-boon vd. 1988).

Bu atığın K01 ve B01 değerleri yaklaşık 85000 mg/L ve 70000 mg/L'ye ulaşmaktadır (Algur ve Kadioğlu 1989; Pena vd. 1986). Bu değerler göz önüne alınacak olursa çok yüksek kirlilik değerlerine sahip olduğu söylenebilir.

Alkol ve maya üreten pek çok ülkede, bu atık madde kirlilik problemi yaratmaktadır. Atık suyun kirlilik derecesi öncelikle fermantasyona uğramamış maddelerin miktarına bağlıdır. Melas kuru maddesinin 3'te biri mayalar tarafından asimile edilemeyen organik ve inorganik maddelerden oluşmaktadır. Vinasın çok düşük pH'ya sahip olması alıcı ortam açısından dezavantajlar yaratabilir. Alıcı ortam olarak sulara verildiğinde, oksijen dengesini bozmaktadır. Kanalizasyona verildiği durumlarda, çok yüksek oranlarda seyreltilip verilse ve kanalizasyon arıtılsa bile suyun rengini etkilemektedir. (Algur ve Kadioğlu 1989; Kıda vd. 1991; Pena vd. 1986; Taygun 1984; Totti ve Nicoli 1983).

Vinasda bulunan en önemli maddelerden biri sülfattır. Sülfat, melasın asitlendirme işleminden ileri gelmektedir. Sülfat konsantrasyonu çok yüksek olduğu zaman atık su, betonu aşındırmaktadır. Ayrıca anaerop arıtım sırasında kükürtlü hidrojenin oluşması sakıncalı bir durum yaratmaktadır (Taygun 1984).

Almanya'da bazı maya fabrikası atıkları kanalizasyona bağlıdır. Fakat, bu işlemde aşağıdaki problemlere neden olmaktadır;

- 1- Kanalizasyon sisteminde düşük pH ve yüksek sülfat,

korezyona neden olabilir.

2- Atık su çok yüksek olmayan oranlarda evsel sularla karıştırıldığı zaman, arıtmadan çıkmış bile olsa suyun rengini etkiler.

3- Atık su, evsel atık sularla karıştığı zaman oksijen dengesi bozulur, oksijen derhal harcanır ve anaerob koşullar oluşur. Anaerobik koşullarda ise H_2S meydana gelir ki, bu çok kötü kokan bir gazdır (Taygun 1984).

1.9 Vinası Değerlendirme Yönündeki Çalışmalar

Özellikle Malatya, Eskişehir ve Erzurum fabrikalarında büyük bir potansiyel atık olan vinas değerlendirilememektedir. Dünyadaki bazı işletmelerde ise vinas, metan üretiminde kullanılmakta ve değerlendirilmesi yönüne gidilmektedir.

Vinasın biyogaz üretiminde substrat olarak kullanıldığı ve biyogaz verimini artırdığı rapor edilmiştir (Kida vd. 1991; Koutinas vd. 1991). Vinasın değerlendirilmesi açısından kurulan diğer bir çalışmada, hayvan besini olarak kullanılabilirliği denenmiş ve bu çalışma sonucunda vinasın düşük protein ve enerji içeriğinden ötürü hayvan yemi olarak kullanılamayacağı bildirilmiştir (Weigand ve Kirchgessner 1980).

Vinasın aerobik koşullarda arıtılması, asidifikasyon ile değerlendirilmesi ve tek hücre protein üretim sistemlerinde kullanılması çalışmaları yapılmaktadır (Algur ve Gökalkalp 1991; Aran ve Ücal 1981; Cardoso ve Nicoli 1981; Pena vd. 1986; Totti ve Nicoli 1983).

Ayrıca vinasın besiyeri olarak kullanılmasıyla, çeşitli bitki büyüme hormonlarının üretileceği ve bu atığın değerlendirilebileceği bildirilmektedir (Aksöz vd. 1991; Yeşilada vd. 1990).

Vinasın zengin organik ve inorganik içeriğinin olması, bu atığın besiyeri olarak yüksek enzim kapasiteli funguslarca kullanılabilmesi fikrini vermektedir. Günümüzde, vinasın değerlendirilmesi ve arıtılması çalışmaları sürdürülmektedir.

1, 1 - 1, 9'da anlatılan bilgilerin ışığı altında aşağıda maddeler halinde özetlenen çalışmalar planlanmıştır.

Araştırma kapsamında;

- 1- Alkol fabrikası atığı olan ve çevre kirliliği yaratan vinasın renginin giderilmesi, arıtılması ve değerlendirilmesi,
- 2- Hücre dışı enzim sentez kapasitesine sahip olan beyaz çürükçül fungusların (özellikle ülkemizde yetişen funguslar) bu atığın muamelesinde ve özellikle renginin gideriminde kullanılabilirliğinin araştırılması,
- 3- Ülkemizde yetişen ve laboratuvarımızda kültüre aldığımız beyaz çürükçül fungusların vinas ortamında fizyolojik (pH, ısı v.b.) koşullarının saptanması,
- 4- Çalışmada kullanılan fungusların vinas besiyerinde inkübasyonu sırasında bazı hücre dışı enzimlerin sentezlenip sentezlenmediğinin araştırılması ve sentezlenen enzimlerin günlere bağlı değişiminin saptanması,
- 5- Bu enzimlerin vinasın renginin gideriminde rolü olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. YONTEM VE GEREÇLER

2.1 Kimyasallar

Guaiakol, H₂O₂, veratril alkol, veratril aldehit, antron, gümüş sülfat, civa klorür, L-leucine, borik asit, sodyum tiyosülfat, potasyum dikromat, mangan sülfat, süksinik asit, sodyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, H₂SO₄, civa oksit, tartarik asit, sodyum hidroksit, metil red, metilen blue, hidroklorik asit, demir amonyum sulfat, metanol, bakır sülfat, sodyum potasyum tartarat, kalsiyum klorür Merck firmasından; o-dianosidine, NADH, peroksidaz, glukoz, sodyum aljinat Sigma firmasından; BSA Serva firmasından; sabouroud dextrose agar Oxoid firmasından temin edilmiştir.

2.2 Çalışmada Kullanılan Fungusların Elde Edilmesi

Araştırmamızda beyaz çürükçül funguslardan *Coriolus versicolor*, *Funalia trogii*, *Phanerochaete chrysosporium* ME 446 kullanılmıştır. Bu funguslardan *C.versicolor* Adana, *F.trogii* Malatya bölgesinden toplanmış, Mustafa Işıloğlu tarafından teşhis edilmiş ve laboratuvarımızda kültüre alınmıştır. *P.chrysosporium* ise Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Bilim Dalından temin edilmiştir. Bu fungusların tümü 15 günlük aralarla taze besiyerlerine aktarılarak korunmuştur.

2.3 Fungus Türünün Saptanması ve Miselyum Eldesi

Çalışmamızda kullanılan iki beyaz çürükçül fungus ülkemizde doğada yetişen funguslar arasından toplanmıştır. Bu iki beyaz çürükçül fungus doğadan toplandıktan sonra tür tanımları literatürden ve bölümümüz mantar herbaryumundan yararlanılarak Mustafa Işıloğlu tarafından yapılmıştır.

Her üç fungus da sabouroud dextrose agar ortamlarında kültüre alınmış ve 30°C'da 4 veya 6 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreçte miselyum formları elde edilmiştir. Inkübasyon sonrasında funguslar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'da saklanmıştır.

2.4 Çalışmalarda Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

Çalışmalarda besiyeri olarak alkol fabrikası atığı olan vinas kullanılmıştır. Vinas karbon, enerji ve azot kaynaklarını içeren zengin bir besiyeri olduğundan çalışma süresince bu besiyerine başka bir kaynak eklenmemiştir. Çalışmada kullanılan besiyeri % 10 vinas içerecek şekilde distile su ile sulandırılarak hazırlanmış ve 250 mL'lik erlenlere koyulmuştur. Ayrıca, bazı çalışmalarda besiyeri pH ları çalışma planına göre ayarlanmış ve hazırlanan besiyerleri 120 °C'da 15 dakika ve 1 atm. basınç altında otoklavda steril edilmiştir.

2.5 Kültür Koşulları

C.versicolor, *F.trogii* ve *P.chryso sporium*'un çalışma ortamlarına ekilmesi ve bu ortamlara adaptasyonlarının sağlanması amacıyla sabouroud dextrose agar eğik besiyeri tüplerinde üretilmiş olan fungus ortamlarına 10 mL steril serum fizyolojik eklenmiş ve misel süspansiyonları hazırlanmıştır. Misel süspansiyonları steril şekilde vinas besiyeri içeren 250 mL'lik erlenlere aktarılmıştır. *C.versicolor* ve *F.trogii* kültürleri 30°C'de 150 rpm' de çalkalamalı inkübatörde (Dedeoğlu) 6 gün üretilmiş ve bu kültürler çalışmada kullanılacak besiyelerine ekim için temel fungus kültürleri olarak hazırlanmıştır. *P.chryso sporium* kültürü ise 40°C'de 150 rpm de 6 gün üretilmiştir.

Hazırlanan kültürler steril koşullar altında homojenizatör (Kinematic Polytron Homogeniser) vasıtası ile çok düşük devirde homojenize edilmiştir. Erlenlerdeki vinas besiyelerine çalışma amacına göre değişik miktarlarda ekim yapılmış ve çalışmanın amacına bağlı olarak değişik sıcaklıklarda statik veya çalkalamalı koşullarda inkübe edilmiştir. Bazı çalışmalarda çalkalama hızı amaca bağlı olarak değiştirilmiştir.

2.6 Çalışmalarda Kullanılan Beyaz Çürükçül Fungusların Vinas Ortamında Optimum Fizyolojik Kosullarının Saptanması

2.6.1 Optimum pH'nın Saptanması

Kullanılan beyaz çürükçül fungusların optimum fizyolojik koşullarının saptanması amacı ile besiyeri pH ları 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 olarak 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH ile ayarlanmış ve üretime geçilmiştir.

2.6.2 Optimum sıcaklığın saptanması

Funguslar için en uygun sıcaklığın saptanması amacı ile ekim yapıldıktan sonra kültürler 20, 25, 30, 35 ve 40°C'de inkübe edilmiştir.

2.6.3 Optimum çalkalama hızının saptanması

Optimum çalkalama hızının saptanması amacı ile kültürler hem statik olarak ve hem de 50, 100, 150 ve 200 rpm'de inkübe edilmiştir.

2.6.4 Fungus üretiminde vinas ortamına eklenecek misel süspansiyonunun saptanması

Ekim miktarının etkisinin araştırılması amacı ile daha önce Kinematic Polytron Homojenizatör ile homojenize edilmiş stok fungus kültürlerinden vinas besiyerlerine steril koşullarda 0.1, 0.5, 1, 2 ve 5'er mL eklenmiştir.

2.7 pH'nın Ölçümü

Vinas besiyerinin pH'sı ve kültürlerdeki pH değişimleri 2 gün aralıklarla pH metre (Nel mod 821) kullanılarak ölçülmüştür.

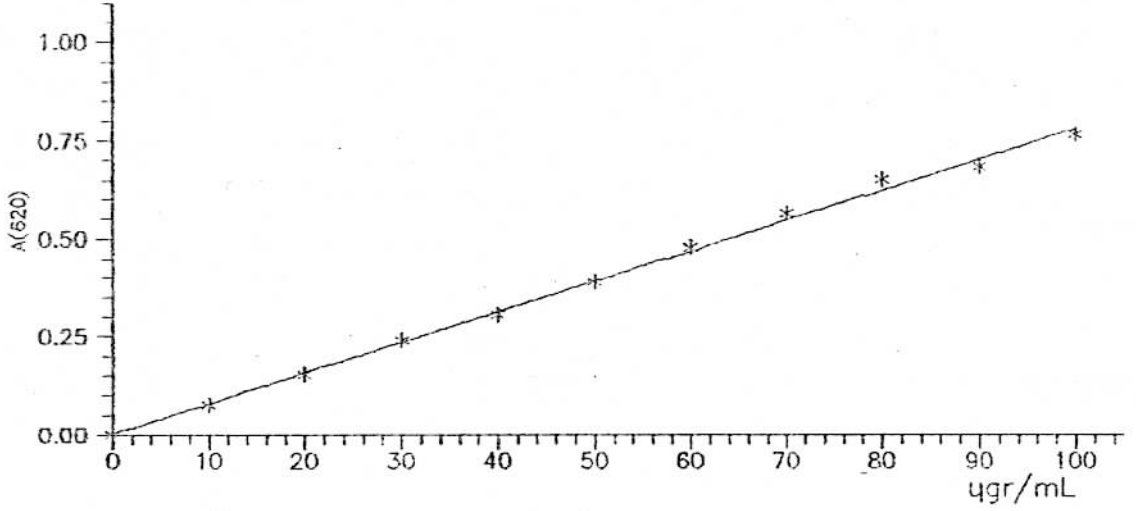
2.8 Toplam Şeker Miktarı ve Değişiminin Ölçümü

Vinas besiyeri ve kültürlerdeki toplam şeker değişimleri 2 gün aralıklarla Antron yöntemi kullanılarak ölçülmüştür (Atalay 1978; Rosenberg 1980).

Örnekler uygun bir şekilde seyreltildikten sonra 1 mL örneğe 4 mL antron reaktifi eklenmiş ve karıştırılmıştır. Karışım kaynar su banyosunda 10 dakika bırakılmış ve oluşan renk 620 nm'de Bousch & Lomb kolorimetre kullanılarak köre karşı okunmuştur. 620 nm'de saptanan absorbans değerleri aynı koşullarda çizilmiş olan standart toplam şeker grafiği ile karşılaştırılarak (Şekil 2.1), toplam şeker değeri hesaplanmıştır.

Antron ayracının hazırlanması için 200 mg antron 100

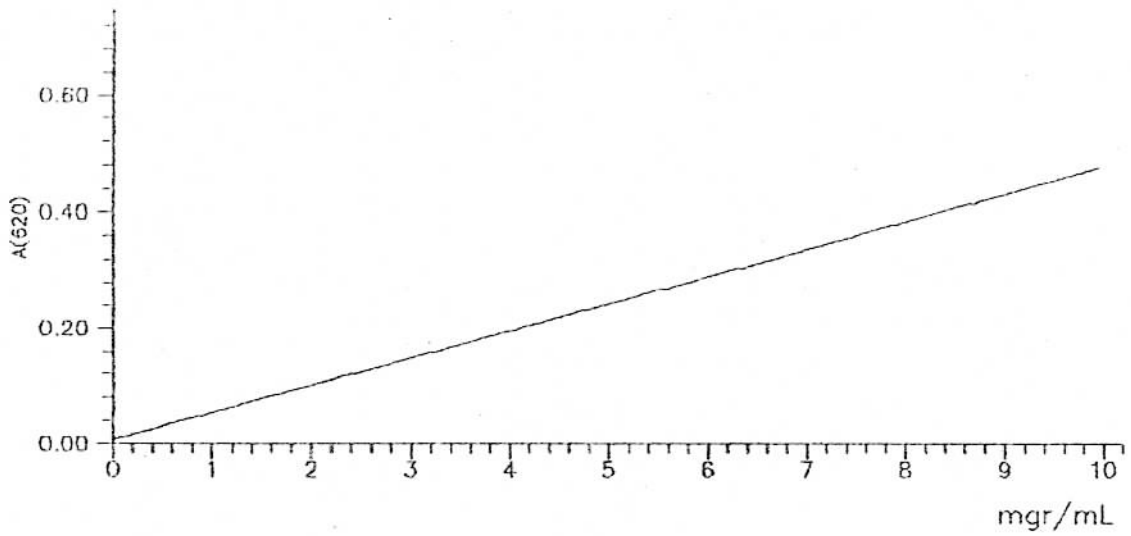
mL %96'lık H_2SO_4 içinde çözülmüş ve kullanılmadan önce 1 saat $+4^\circ C$ 'da bırakılmıştır. Çalışmada kullanılan antron çözeltisi hergün taze olarak hazırlanmıştır.



Şekil 2.1 Standart toplam şeker eğrisi.

2.9 Vinadaki Protein Miktarının Ölçümü

Vinanın protein miktarı Biüret yöntemi kullanılarak saptanmıştır (Clark ve Switzer 1977). Atık madde uygun bir ölçüm aralığına kadar sulandırılmış (1/10), 1 mL'si 4 mL biüret ayracı ile tepkimeye sokulmuştur. Reaksiyon karışımı 30 dakika oda sıcaklığında bırakılmış ve 550 nm dalgaboyunda elde edilen absorbans değerleri B.S.A. (Bovin Serum Albumin) ile çizilmiş standart grafiklerle karşılaştırılarak (Şekil 2. 2) protein miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 2.2 Standart toplam protein eğrisi.

2.10 Vinasın Mn, Fe, Cu, K ve Al Miktarının Ölçümü

Vinasın toplam Mn, Fe, Cu, K ve Al miktarı ölçümünde PU 9100 model Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi kullanılmıştır. Ölçümler hava/asetilen alevinde ve sırasıyla 279.5, 248.3, 324.8 ve 766.5 nm 'de alınmıştır. Al miktarı ise 396.2 nm ve N_2O/C_2H_4 'alevinde ölçülmüştür.

2.11 Askıda Katı Madde Miktarının Ölçümü

Vinasın içerdiği askıda katı madde miktarının saptanması için mezür içerisinde 2 saat bekletilmiş vinas üst kısmından bir pipetle çekilip, darası alınmış milipor filtre kağıdından süzümüştür. Filtre kağıdı+örnek kurutulduktan sonra 2 saat desikatörde bırakılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış filtre kağıdı+örnek desikatörden çıkarılır

çıkarılmaz hassas terazide (Sartorius A 120 S) ağırlık ölçümü yapılmış ve askıda katı madde miktarı saptanmıştır (Ülkü 1989).

2.12 Kültür Ortamındaki Kimyasal Oksijen İsteminin (KOİ) Ölçümü

Kültür ortamlarındaki KOİ değişimleri bikromat yöntemi ile ölçülmüştür. Örnek içerisindeki organik maddeler potasyum bikromat ve sülfürik asit karışımı ile reaksiyona sokulmuş, ortamda kalan bikromat, demir amonyum sülfat ile titre edilerek hesaplanmıştır. Kullanılan potasyum bikromat miktarı oksitlenebilecek organik madde miktarı ile orantılıdır (Standart Methods 1979).

2.13 Kültür Ortamındaki Renk Değişiminin Ölçümü

Kültür ortamındaki renk miktarı ve değişimi absorbans değişimi olarak ölçülmüştür. Fungusun aktivitesi sonucu gözlenen renk değişimi günlere bağlı olarak saptanmıştır. Renk değişimi kontrola karşı %renk değişimi olarak ifade edilmiştir (Sarianuntapiboon vd. 1988).

2.14 Hücresel Protein Miktarının Ölçümü

Besiyerlerinde üreyen fungusların protein miktarlarının ölçülmesinde Kjeldahl yöntemi kullanılmıştır (AOAC

1984). Organik maddelerin amino azotu sülfirik asit, potasyum sülfat ve civa oksit varlığında amonyum sülfata çevrilmiştir. Oluşan civa-amonyum kompleksi sodyum tiyo-sülfatla yıkılmış ve amonyak borik asit içerisine distilasyon vasıtası ile absorblanmıştır. Titrimetrik yöntem ile toplam azot miktarı saptanmış ve bulunan değerlerin 6.25 faktörü ile çarpılması sonucunda protein miktarı hesaplanmıştır.

2.15 Kültür Ortamlarında Biyokitle Miktarının Ölçümü

Kültür ortamlarındaki biyokitle miktarlarını saptamak için kültürler, daha önce 70°C'de 24 saat kurutulup 2 saat desikatörde bekletildikten sonra hassas terazide darası alınmış Whatman No: 1 filtre kağıtlarından süzölmüş ve filtre kağıdı+örnek 24 saat 70°C'de kurutulmuştur. Kurutma işlemi sonrası örnek 2 saat desikatörde bırakılmış ve hassas terazide tartılmıştır. Biyokitle miktarı g/L olarak ifade edilmiştir.

2.16 Çalışmada Kullanılan Fungusların Tutuklanması

Fungusların tutuklanması işleminde tutuklama ajanı olarak Na aljinat kullanılmıştır. Na aljinat ve CaCl_2 çözeltileri hazırlanmış ve Na aljinat çözeltisine fungus eklenmiştir. Daha sonra Na aljinat-hücre karışımı uygun bir şekilde %2 lik CaCl_2 çözeltisi içine damlatılarak hücrelerin tutuklanması sağlanmıştır (Ferschl vd. 1991).

2.17 Kültür Ortamlarındaki Ekstrasellüler Enzim Aktivitelerinin Saptanması

Kültür ortamlarında çeşitli hücre dışı enzimlerin aktivite değişimleri araştırılmış ve ortamlarda saptanabilen enzimlerin günlere bağlı olarak aktiviteleri ölçülmüştür.

Lakkaz (O_2 : p-difenol oksido-redüktaz E.C.1.10.3.2) aktivitesi ölçümünde guaiakol (Merck) substrat olarak kullanılmıştır. 5 mL'de 0.01 mmol guaiakol içerecek şekilde fosfat tamponu (pH 6) içerisinde hazırlanmış 4.9 mL guaiakol çözeltisine 0.1 mL enzim kaynağı eklenmiş ve 30°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Guaiakol'un oksidasyonu sonucu oluşan renk 465 nm dalgaboyunda Bousch & Lomb kolorimetrede okunmuştur.

Peroksidaz, lakkaz aktivitesine benzer bir yolla ölçülmüştür. Fakat, reaksiyon karışımı %0.03 H_2O_2 içerecek şekilde hazırlanmıştır. Lakkaz ve peroksidaz aktivitesi kolorimetrik birimler olarak bağlı terimlerle (cu/mL) ifade edilmiştir. Kolorimetrik birim, 0.1 mL enzim kaynağına karşılık gelen absorbanans değeri X 10 (AX10) olarak hesaplanmıştır (Ander ve Eriksson 1976; Gök 1985; Yeşilada vd. 1991).

NADH peroksidaz aktivitesi (NADH oksidasyon aktivitesi) ölçümünde NADH substrat olarak kullanılmıştır (Asada vd. 1986). Reaksiyon karışımı 0.3 mM NADH, 0.2 mM $MnSO_4$, 50 mM süksinat tamponu (pH 4.5) ve enzim kaynağı içerecek şekilde hazırlanmıştır. NADH oksidasyon aktivitesi 340 nm'de absorbanans değişiminin spektrofotometrik (PU 8620 uv/visible spectrophotometer) ölçümü ile saptanmış ve

nkatal/mL ve ünite/mL olarak iki şekilde ifade edilmiştir. Mililitredeki enzim ünite sayısının saptanmasında şu formülden yararlanılmıştır:

$$\text{Ünite enzim/mL} = \frac{A_{340} \times \text{reaksiyon karışımı miktarı}}{6.22 \times \text{örnek miktarı}}$$

1 ünite enzim, 1 μmol NADH'in oksidasyonunu, optimum şartlarda, 1 dakikada katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Ligninaz aktivitesi ölçümünde, veratril alkol substrat olarak kullanılmış ve ligninaz aktivitesi üç farklı yöntemden yararlanılarak araştırılmıştır (Asada vd. 1986; Boominathan vd. 1990; Faison ve Kirk 1985).

Glukoz oksidaz, alkol oksidaz ve amino asit oksidaz aktivite tayininde 500 nm dalgaboyunda o-dianosidinin oksidasyonu sonucu oluşan absorbands değişiminin ölçülmesi tekniği kullanılmıştır (Kelly ve Reddy 1986 ; Worthington Biochemical 1978; Methods in Enzymology 1975).

Ligninaz, glukoz oksidaz, alkol oksidaz ve amino asit oksidaz ölçümlerinde PU 8620 Philips uv/visible spektrofotometre kullanılmıştır.

2.18 Vinasın pH ve Renk Değişimi Üzerine H_2O_2 'nin Etkisi

Vinasın renginin gideriminde H_2O_2 'in rolünün bulunup bulunmadığının saptanması için kurulan deneylerde 50 mL vinas ortamına farklı miktarlarda (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 ve 5 mL) % 37'lik H_2O_2 eklenmiş ve vinas ortamındaki renk ve pH değişimleri günlere bağlı olarak ölçülmüştür.

2.19 Vinas Besiyerine Ekilen Hücre Miktarının Olm

Vinas besiyerine ekilen fungus miktarının saptanması için milipor filtre kullanılmıştır. Darası alınmış bir milipor filtre kağıdından fungus süspansiyonu szlmş, filtre kağıdı+rnek 20°C'de 24 saat kurutulmuş ve desikatörde 2 saat bekletildikten sonra hassas terazide olm yapılarak, 0.1 mL'deki hücre miktarı mg olarak saptanmıştır.

3. BULGULAR

3.1 Alkol Fabrikası Atığı Olan Vinasın İçeriği

Yürütülen çalışmada kullanılan vinasın içeriği saptanmış ve bu değerler tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan vinasın içeriği

| Renk | | Koyu |
|-------------------|-------|-----------|
| pH | | 4.40-4.55 |
| KOİ | (ppm) | 73000 |
| Toplam şeker | (ppm) | 21000 |
| Protein | (ppm) | 16000 |
| K | (ppm) | 9500 |
| Mn | (ppm) | 5.0 |
| Fe | (ppm) | 20 |
| Cu | (ppm) | 2.0 |
| Al | (ppm) | 29.12 |
| Askıda katı madde | (ppm) | 2100 |

3.2 Ortama Ekilen Fungus Miktarı

Yürütülen tüm çalışmalarda kültürler homojenize edildiikten sonra, steril koşullarda = 20 mg/2mL homojenat 50 mL besiyerlerine eklenmiştir.

3.3 Beyaz Cürükçül Funguslardan *Coriolus versicolor*'un Vinas Ortamında Optimum Fizyolojik Koşullarının ve Ortam Renginin Gideriminin Saptanması

3.3.1 pH'nın etkisi

Çalışmamız vinas ortamının başlangıç pH'sının üreme ve bir kirlilik parametresi olan renk üzerine etkisinin araştırılması amacı ile değişik pH değerlerinde bu çalışma sürdürülmüştür. Ayrıca, farklı pH değerlerinde, hücre dışı oksidasyon enzimleri olan lakkaz, peroksidaz ve kültür ortamında, H_2O_2 üretiminden sorumlu olan NADH peroksidaz'ın günlere bağlı enzim aktiviteleri saptanmıştır. Stok *C.versicolor* kültüründen vinas ortamına 2mL / 50mL olacak şekilde ekim yapılmış $30^{\circ}C$ 'de 150 rpm'de 12 gün inkübasyona bırakılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonunda üreme ve renk giderimi için en uygun pH 4.5 olarak bulunmuştur. pH 4.5'da en yüksek renk giderimi %75.32 ve biyokitle miktarı da 2.326 g/L olarak saptanmıştır. Üretimin 6.gününde elde edilen bu değerlere karşılık, aynı günde lakkaz aktivitesi 3.46 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 1.85 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0868 ünite/mL olarak elde edilmiştir.

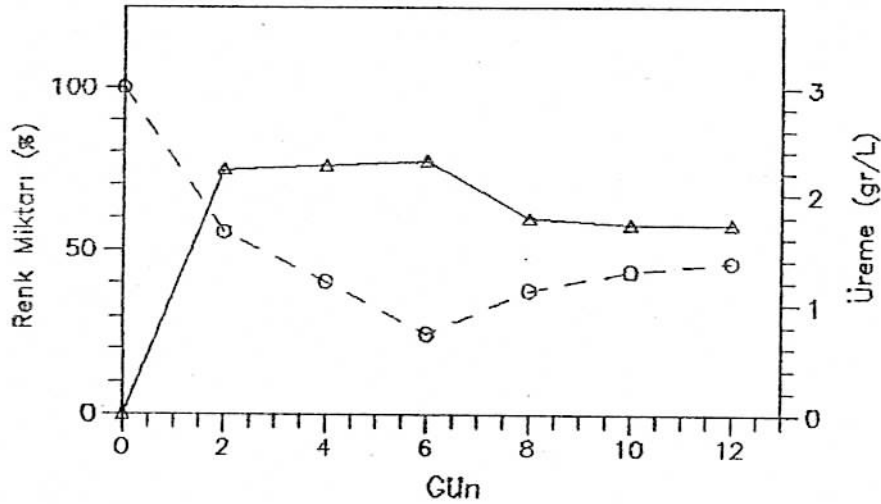
pH 5.5 aralığında kurulan çalışmada ise en yüksek renk giderimi 6.günde %68.61 ve biyokitle miktarı da 4.günde 2.268 g/L olarak saptanmıştır. 4. günde lakkaz 1.89 cu/mL, peroksidaz 1.09 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.1161 ünite/mL olarak saptanmıştır.

pH 6.5'da en yüksek renk giderimi ve biyokitle miktarı

4.günde elde edilmiştir. Bu pH aralığında renk giderimi %62.10 ve biyokitle miktarı da 2.242 g/L olarak bulunurken, lakkaz 1.94 cu/mL, peroksidaz 1.31 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi 0.1296 ünite/mL olarak gözlenmiştir.

7.5 pH aralığında ise en yüksek renk giderimi 4. günde %64.27 olarak gözlenirken, biyokitle miktarı 2.306 g/L olarak elde edilmiştir. Bu günde lakkaz aktivitesi 2.17 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 1.24 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.1151 ünite/mL olarak saptanmıştır.

Elde edilen verilere göre *C.versicolor*'un üremesi ve en yüksek renk gideriminin elde edilebilmesi için uygun pH 4.5 olarak elde edilmiştir. Bu pH elimizdeki vinasın pH'sına uygun bir pH aralığıdır (Şekil 3.1 - 3.8).

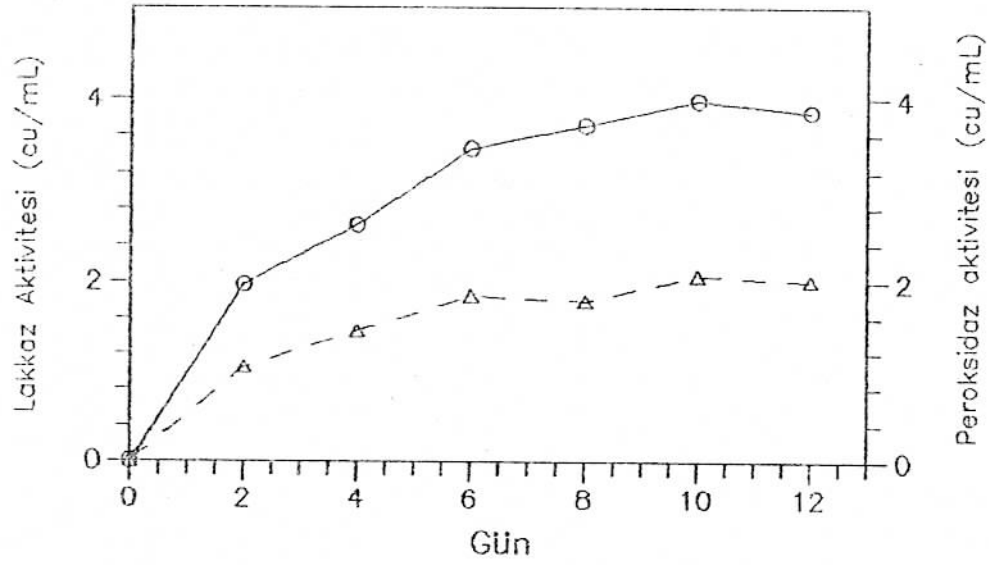


Şekil 3.1 *C.versicolor*'un vinas ortamında üremesi ve ortam renginin değişimi (%).

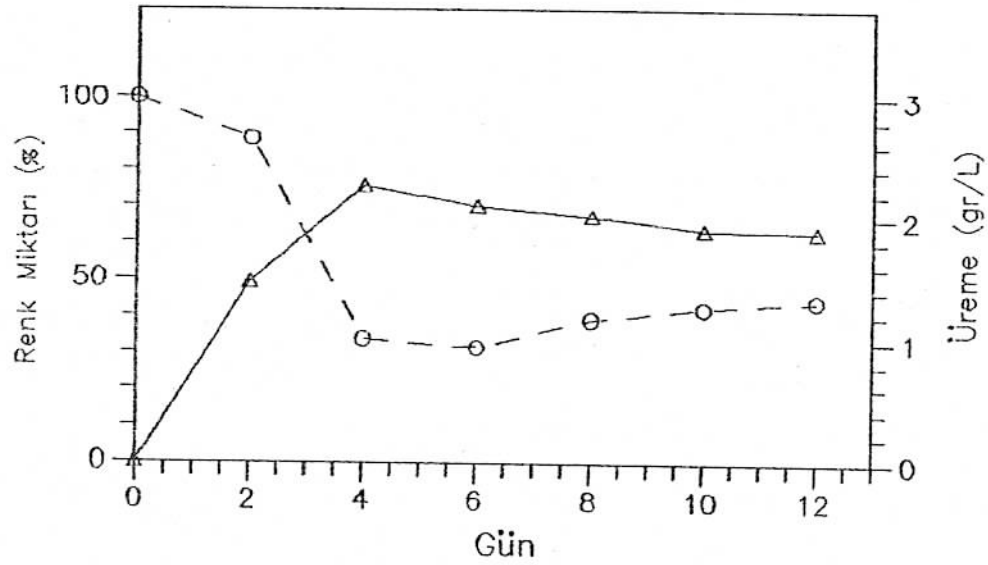
Deney koşulları; pH:4.5; sıcaklık:30°C; çalkalama hızı:150 rpm ; ekim miktarı:2 mL/50 mL vinas.

○ --- ○ Renk miktarı

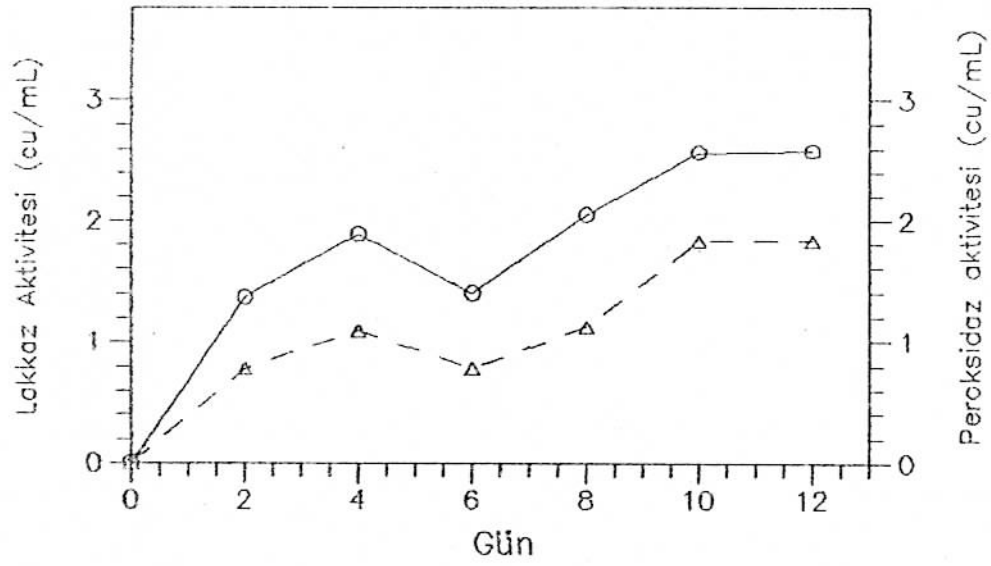
△ ——— △ Üreme



Şekil 3.2 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.
Deney koşulları; pH:4.5; sıcaklık:30°C; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2 mL/50 mL vi-nas.
○—○ Lakkaz △—△ Peroksidaz



Şekil 3.3 *C.versicolor*'un vinas ortamında üremesi ve ortam renginin değişimi (%).
Deney koşulları; pH:5.5; sıcaklık:30°C; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2 mL/50 mL vi-nas.
○—○ Renk Miktarı △—△ Üreme

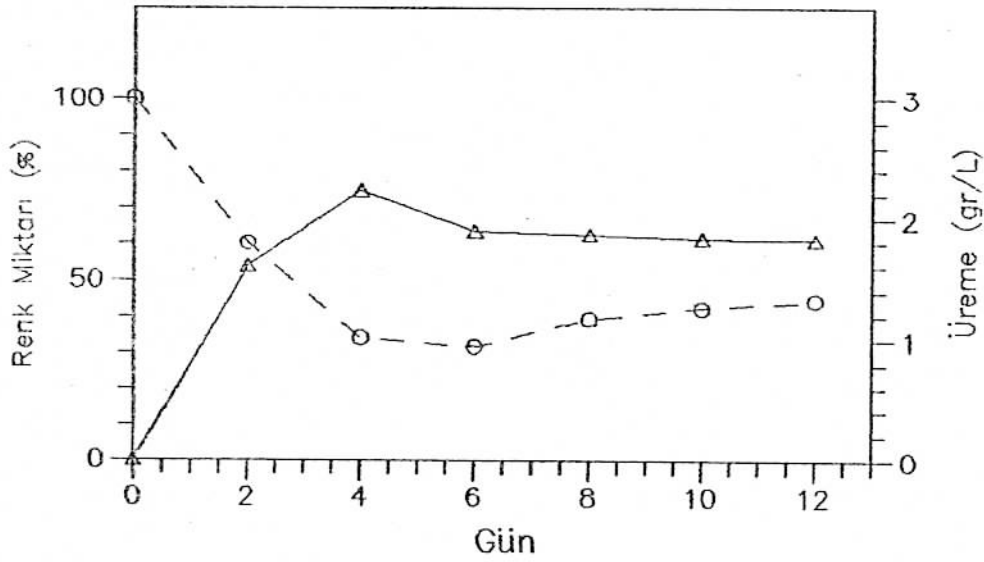


Şekil 3.4 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi (%).

Deney koşulları; pH:5.5; sıcaklık:30°C; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2 mL/50 mL vinas.

○—○ Lakkaz

△---△ Peroksidaz

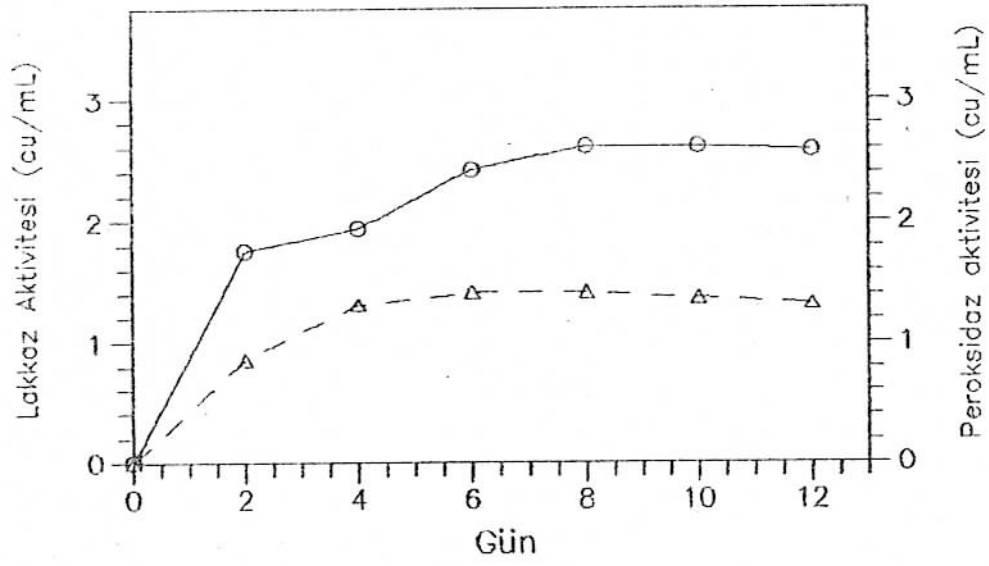


Şekil 3.5 *C.versicolor*'un vinas ortamında üremesi ve ortam renginin değişimi (%).

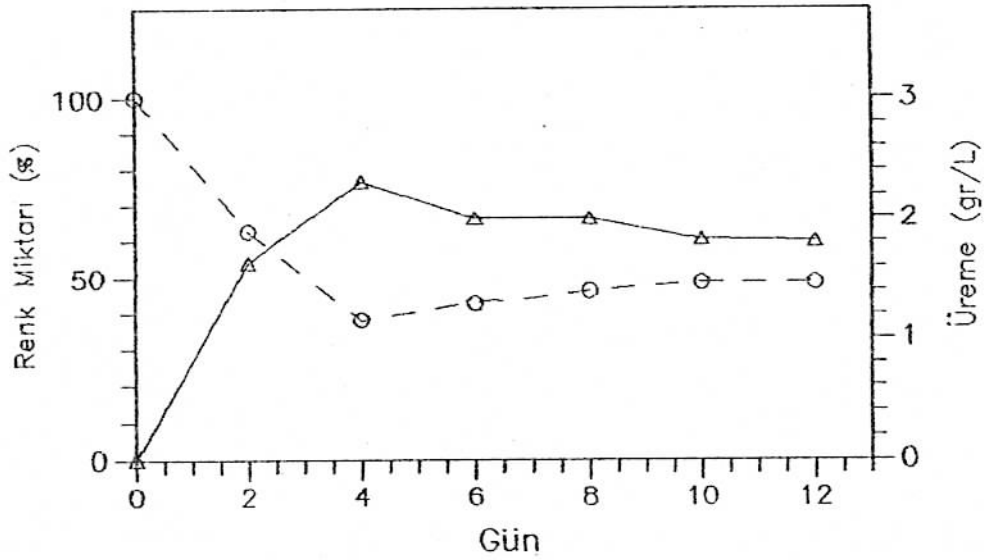
Deney koşulları; pH:6.5; sıcaklık:30°C; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2 mL/50 mL vinas.

○---○ Renk Miktarı

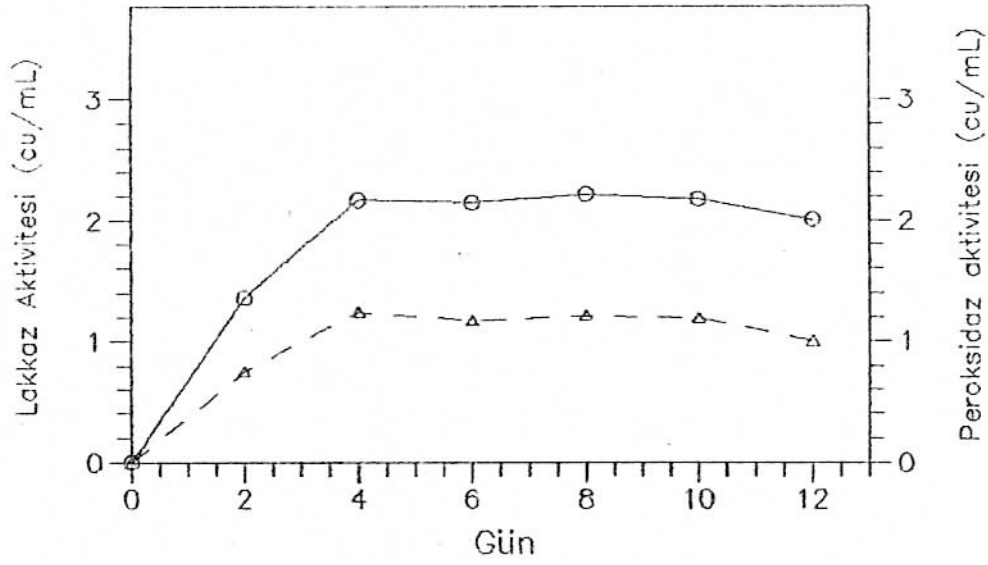
△—△ Üreme



Şekil 3.6 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi (%).
Deney koşulları; pH:6.5; sıcaklık:30°C; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2 mL/50 mL vinas.
○—○ Lakkaz Δ---Δ Peroksidaz



Şekil 3.7 *C.versicolor*'un vinas ortamında üremesi ve ortam renginin değişimi (%).
Deney koşulları; pH:7.5; sıcaklık:30°C; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2 mL/50 mL vinas.
○---○ Renk Miktarı Δ—Δ Üreme



Şekil 3.8 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.

Deney koşulları; pH:7.5; sıcaklık:30°C; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2 mL/50 mL vi-nas.

○—○ Lakkaz

△---△ Peroksidaz

3.3.2 Sıcaklığın etkisi

En uygun pH 4.5 olarak saptandıktan sonra optimum sıcaklığın saptanması için deneyler 20°C, 25°C, 30°C, 35°C ve 40°C'de sürdürülmüştür.

20°C'de kurulan çalışmalarda en yüksek renk giderimi ve biyokitle miktarı 6.günde saptanmış, renk giderimi %49.11 ve biyokitle miktarıda 2.117 g/L olarak elde edilmiştir. 6.gündeki lakkaz aktivitesi 0.93 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 0.26 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0483 ünite/mL olarak saptanmıştır. Bu koşullarda pH'nın da sürekli olarak yükseldiği gözlenmiş ve 6.gündeki pH, 5.83 civarında ölçülmüştür (Şekil 3.9 ve 3.10).

25°C'de kurulan çalışmada en yüksek renk giderimi ve üreme yine 6.günde saptanmıştır. Bu koşullar altında renk giderimi %68.27, biyokitle miktarı 2.220 g/L ve pH değeri de 5.61 olarak elde edilirken lakkaz aktivitesi 2.97 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 1.53 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0643 ünite/mL değerinde bulunmuştur (Şekil 3.11 ve 3.12).

30°C'de en yüksek renk giderimi ve biyokitle miktarı yine 6.günde saptanmıştır. Bu günde renk giderimi %75.32, biyokitle miktarı 2.376 g/L ve pH değeri de 5.87 dir. Aynı günde lakkaz aktivitesi 3.46 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 1.85 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0875 ünite/mL olarak elde edilmiştir (Şekil 3.13 ve 3.14).

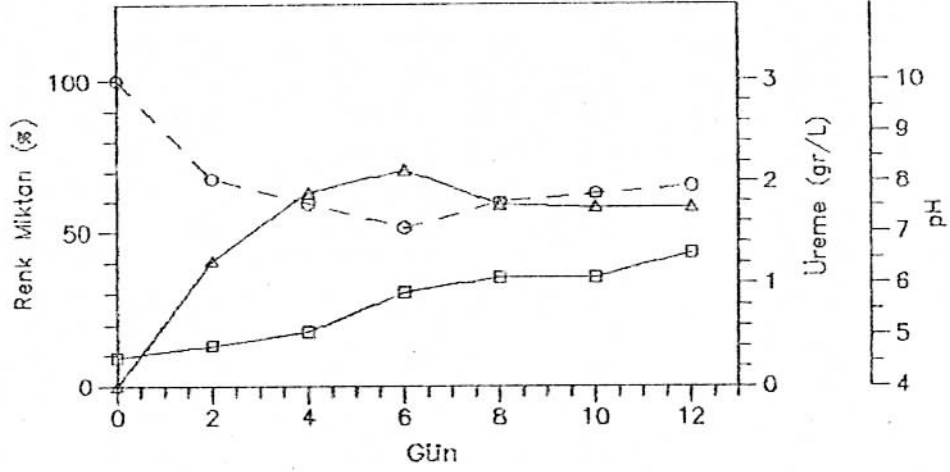
35°C'de ise en yüksek değerlerin elde edildiği 6.günde renk giderimi %64.23 ve biyokitle miktarı 2.176 g/L olarak bulunmuştur. Bu günde pH değeri de 5.55'e yükselmiştir. Lakkaz aktivitesi 2.66 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 1.37 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0585 ünite/mL olarak saptanmıştır (Şekil 3.15 ve 3.16).

40°C'de en yüksek renk giderimi 4.günde %38.73 olarak elde edilirken en yüksek biyokitle miktarı da 6.günde 2.002 g/L olarak elde edilmiştir. Bu günde pH değeri 5.91, lakkaz aktivitesi 0.35 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 0.11 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0135 ünite/mL olarak saptanmıştır (Şekil 3.17 ve 3.18).

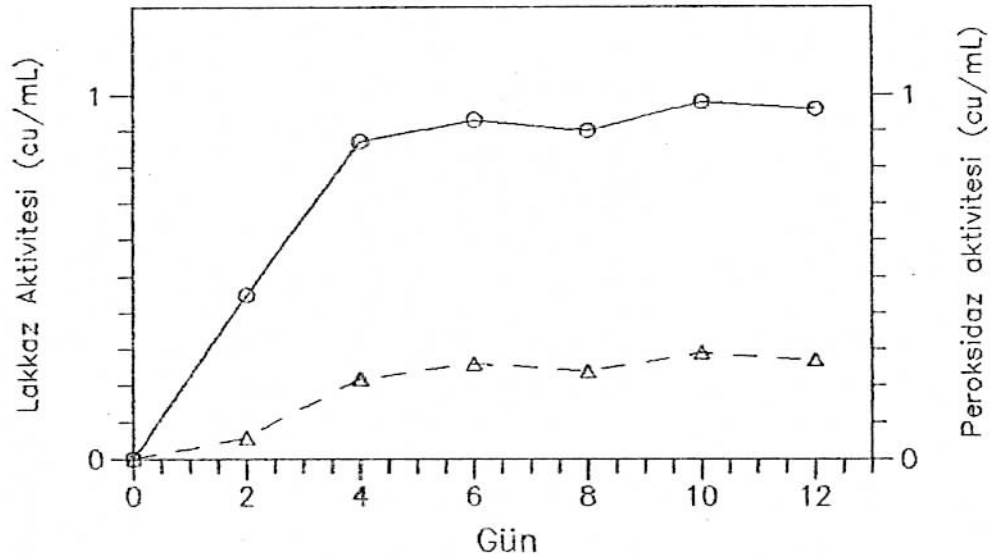
Sonuç olarak *C.versicolor* için optimum sıcaklık 30°C olarak belirlenmiş ve çalışmalarda bu sıcaklık derecesi kullanılmıştır.

Optimum sıcaklığın saptanması amacıyla kurulan bu çalışmada Bölüm 2.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanmış 50

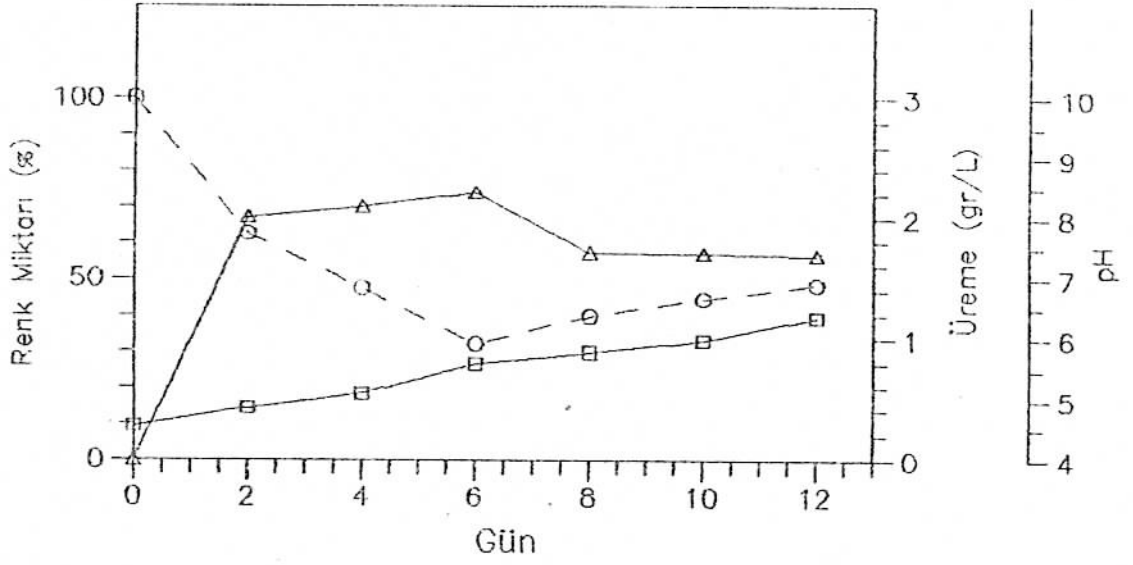
mL'lik besiyelerine Bölüm 2.5'de anlatıldığı gibi *C.versicolor* kültürlerinden homojenizasyon sonrası 2 mL süspansiyon ekilmiş ve kültürler 20°C, 25°C, 30°C, 35°C ve 40°C da 150 rpm de 12 inkübe edilmiştir.



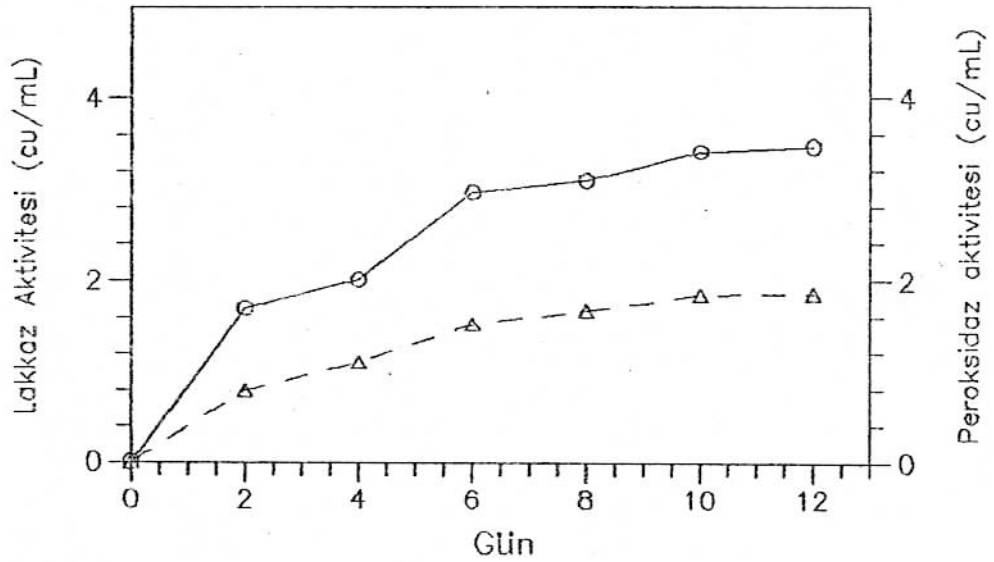
Şekil 3.9 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları; sıcaklık:20°C; pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2 mL/50 mL vinas. O---O Renk Miktarı □—□ pH Δ—Δ Üreme



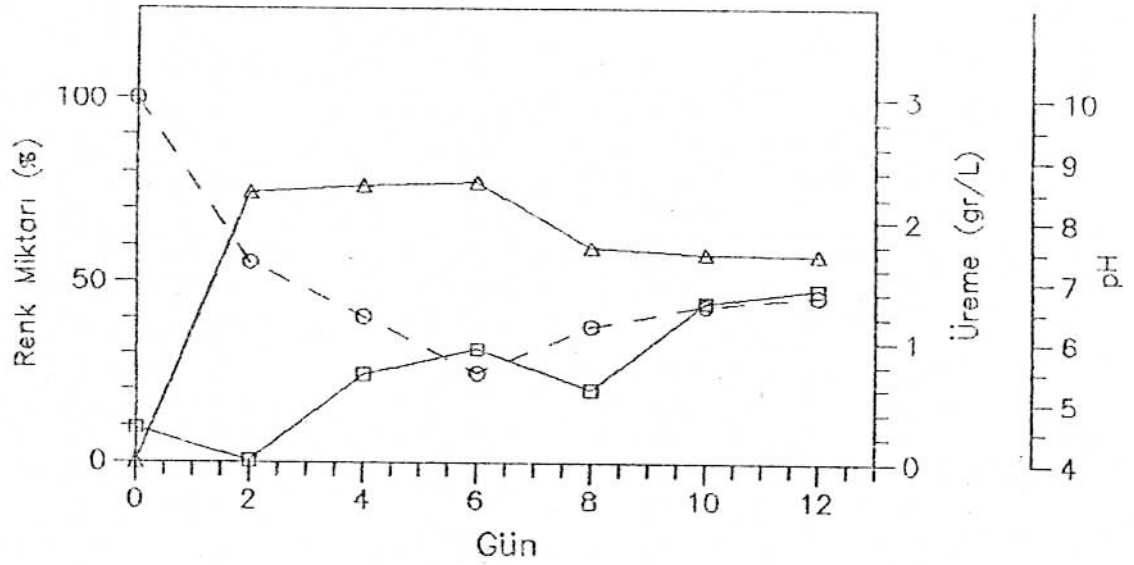
Şekil 3.10 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları;sıcaklık:20°C; pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2 mL/50mL vinas. O—O Lakkaz Δ---Δ Peroksidaz



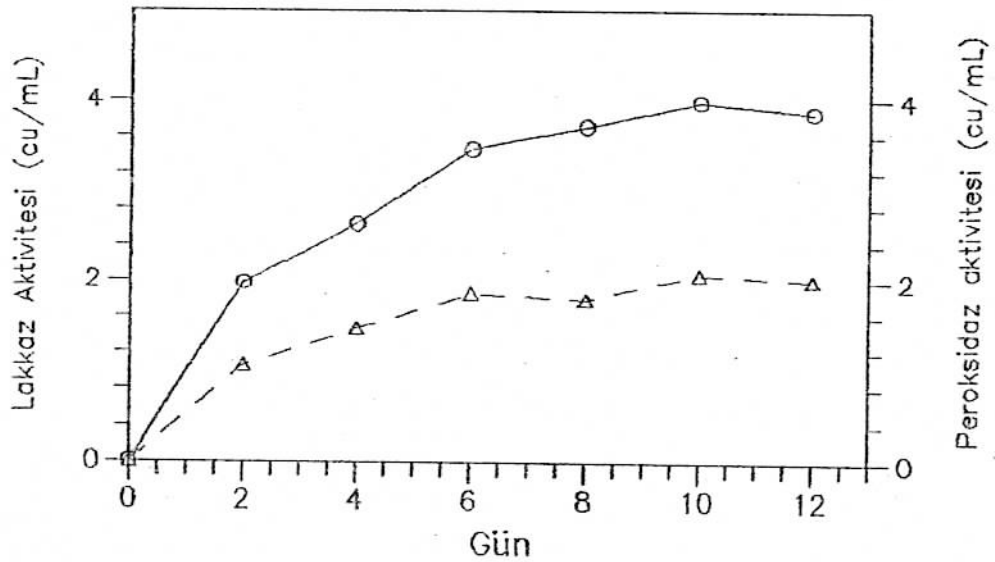
Şekil 3.11 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları; sıcaklık: 25°C; pH: 4.5; çalkalama hızı: 150 rpm; ekim miktarı: 2 mL/50mL vinas.
 O---O Renk Miktarı □---□ pH Δ---Δ Üreme



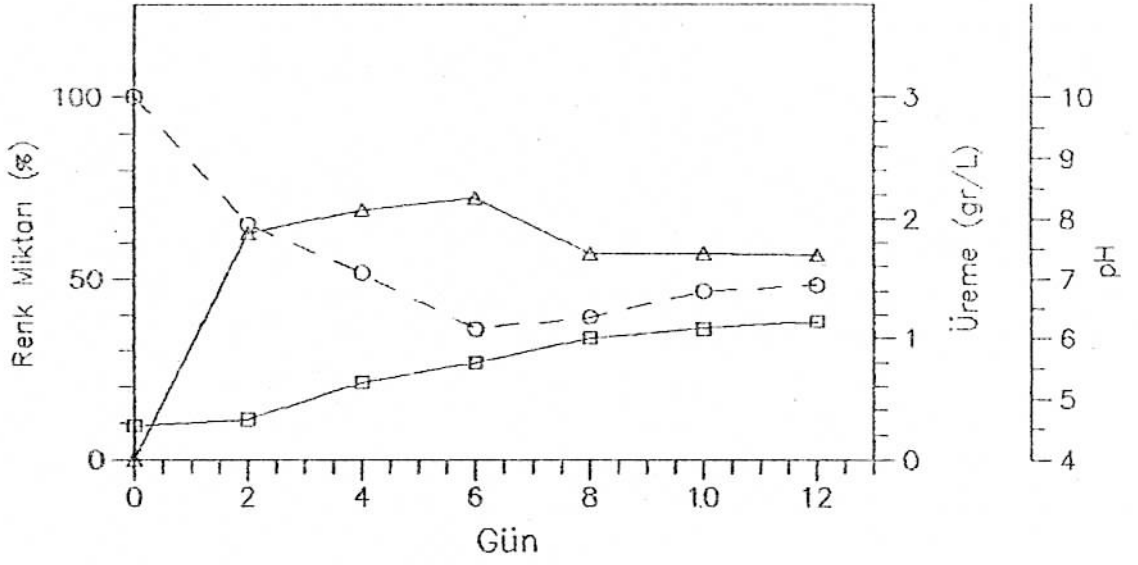
Şekil 3.12 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları; sıcaklık: 25°C; pH: 4.5; çalkalama hızı: 150 rpm; ekim miktarı: 2 mL/50mL vinas.
 O---O Lakkaz Δ---Δ Peroksidaz



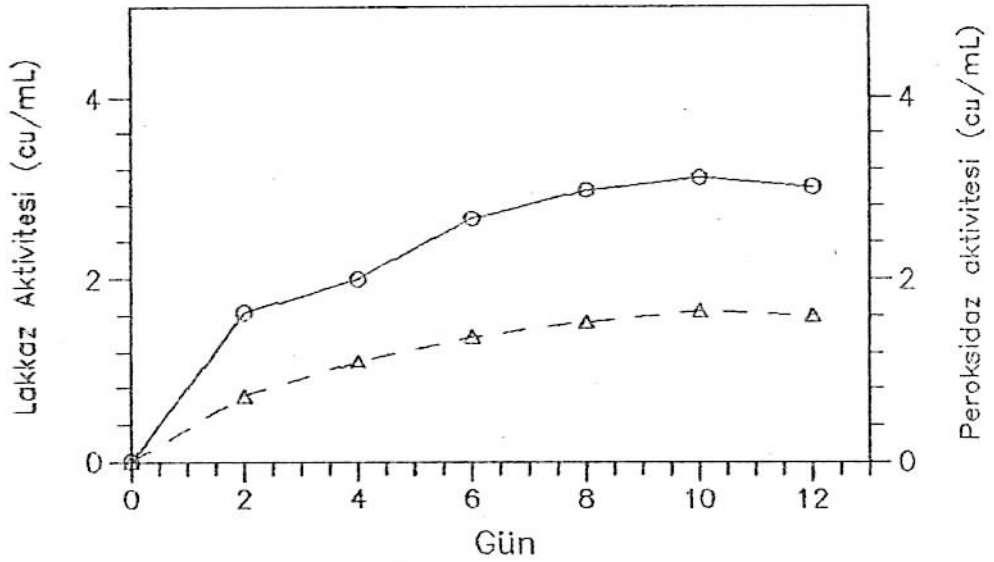
Şekil 3.13 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları; sıcaklık:30°C; pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2 mL/50mL vinas.
 O---O Renk Miktarı □—□ pH ▲—▲ Üreme



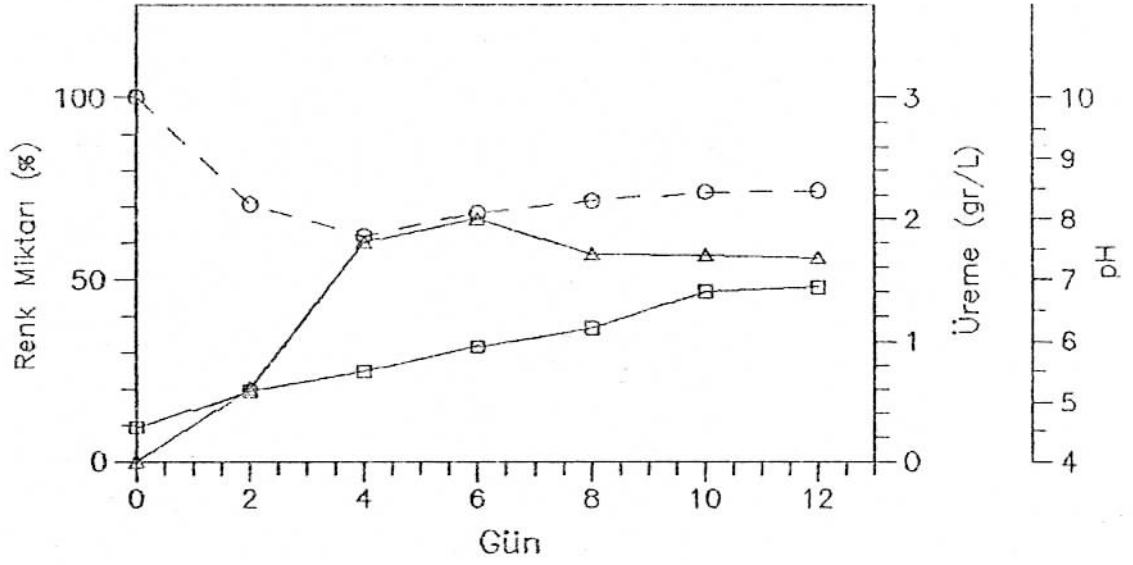
Şekil 3.14 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları; sıcaklık:30°C; pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2 mL/50mL vinas.
 O—O Lakkaz ▲----▲ Peroksidaz



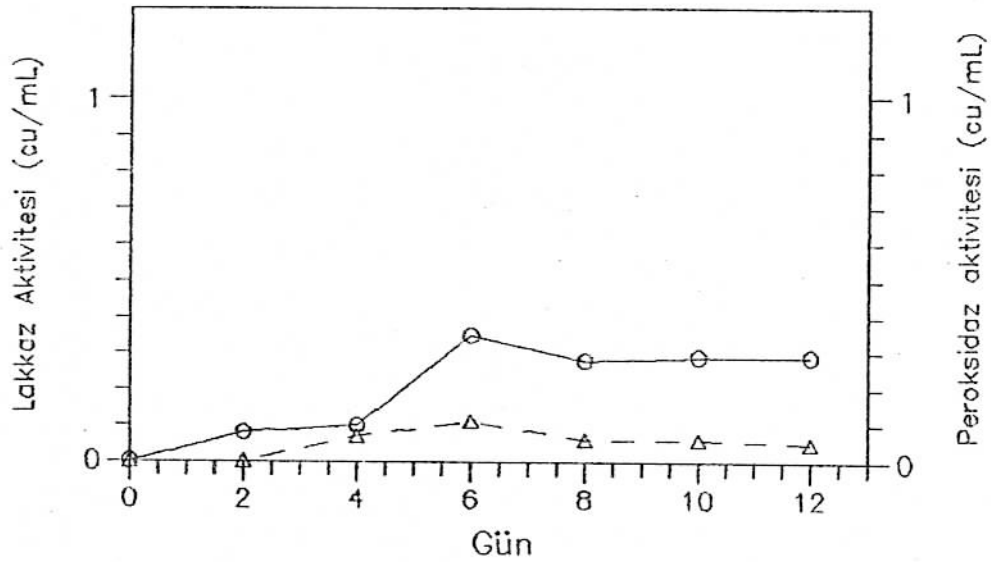
Şekil 3.15 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları; sıcaklık:35°C; pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2 mL/50mL vinas.
 O---O Renk Miktarı □—□ pH Δ—Δ Üreme



Şekil 3.16 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları; sıcaklık:35°C; pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı: 2mL/50mL vinas.
 O—O Lakkaz Δ---Δ Peroksidaz



Şekil 3.17 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları; sıcaklık: 40°C; pH: 4.5; çalkalama hızı: 150 rpm; ekim miktarı: 2mL/50mL vinas.
 O---O Renk Miktarı □—□ pH ▲—▲ Üreme



Şekil 3.18 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları; sıcaklık: 40°C; pH: 4.5; çalkalama hızı: 150 rpm; ekim miktarı: 2mL/50mL vinas.
 O—O Lakkaz ▲---▲ Peroksidaz

3.3.3 Çalkalama hızının etkisi

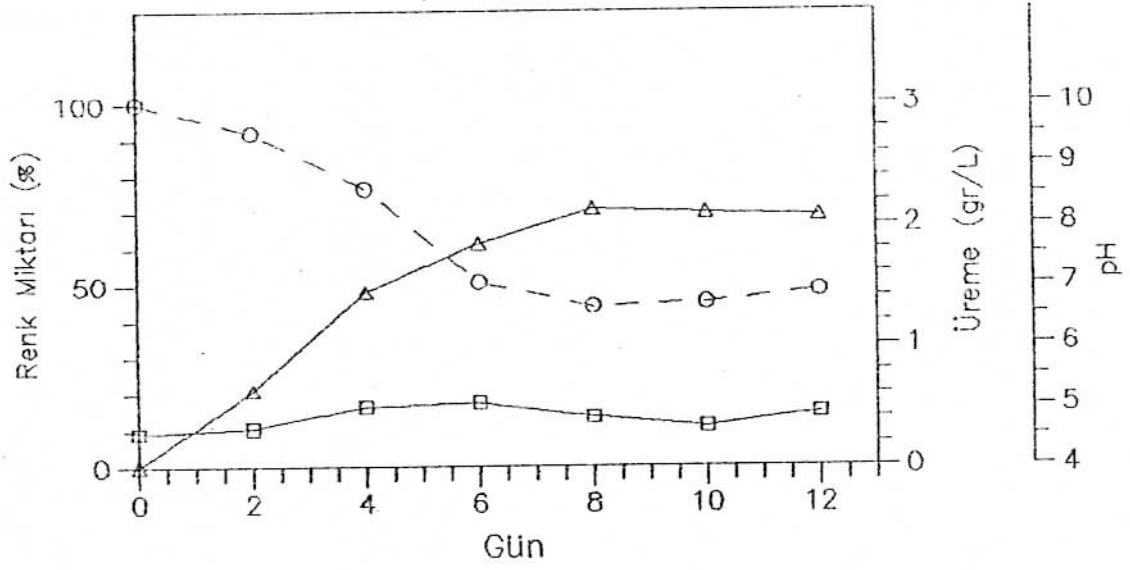
Çalkalama hızının saptanması amacıyla kurulan bu çalışmada, kültürler 50, 100, 150 ve 200 rpm çalkalama hızında üretilmişler ve bu koşullarda ortam pH, renk, biyokitle ve enzim değişimleri saptanmıştır.

50 rpm çalkalama hızında kurulan çalışmada en yüksek renk giderimi ve biyokitle miktarı 8.günde saptanmıştır. Bu günde renk giderimi %55.43, biyokitle miktarı 2.120 g/L ve pH değeri de 4.82 bulunmuştur. Aynı günde lakkaz aktivitesi 1.26 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 0.72 cu/mL NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0493 ünite/mL olarak elde edilmiştir (Şekil 3.19 ve 3.20).

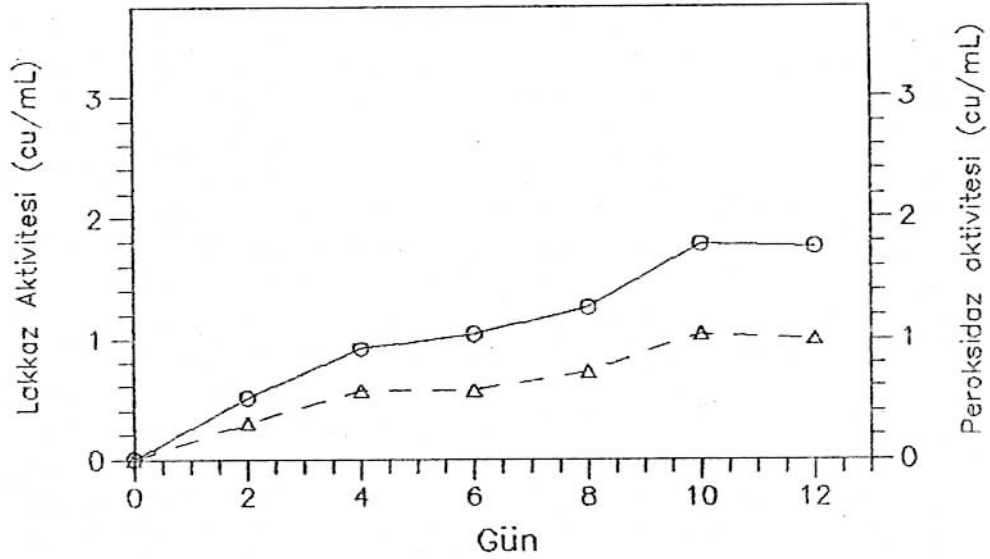
100 rpm'de kurulan çalışmada ise en yüksek renk giderimi ve biyokitle miktarı 6.günde %73.96 ve 2.272 g/L değerlerinde bulunmuştur. Bu günde pH 4.71, lakkaz aktivitesi 0.84 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 0.50 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.1282 ünite/mL olarak saptanmıştır (Şekil 3.21 ve 3.22).

150 rpm'de ise 6.günde renk giderimi %75.32, biyokitle miktarı 2.326 g/L ve pH 5.87 olarak saptanırken 3.46 cu/mL lakkaz aktivitesi, 1.85 cu/mL peroksidaz aktivitesi ve 0.0875 ünite/mL NADH peroksidaz aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 3.23 ve 3.24).

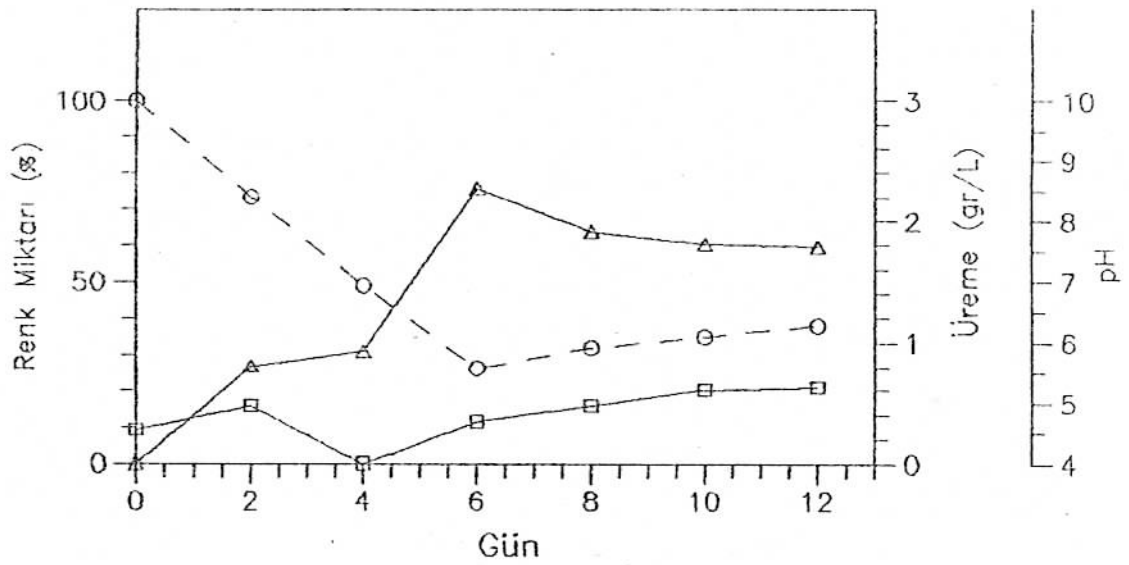
200 rpm'de kurulan çalışmada ise 6. günde %68.17 renk giderimi ve 2.201 g/L biyokitle elde edilmiştir. Bu günde pH 5.63'e yükselmiştir. Aynı gün için lakkaz aktivitesi 2.98 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 1.55 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi ise 0.0749 ünite/mL olarak saptanmıştır (Şekil 3.25 ve 3.26).



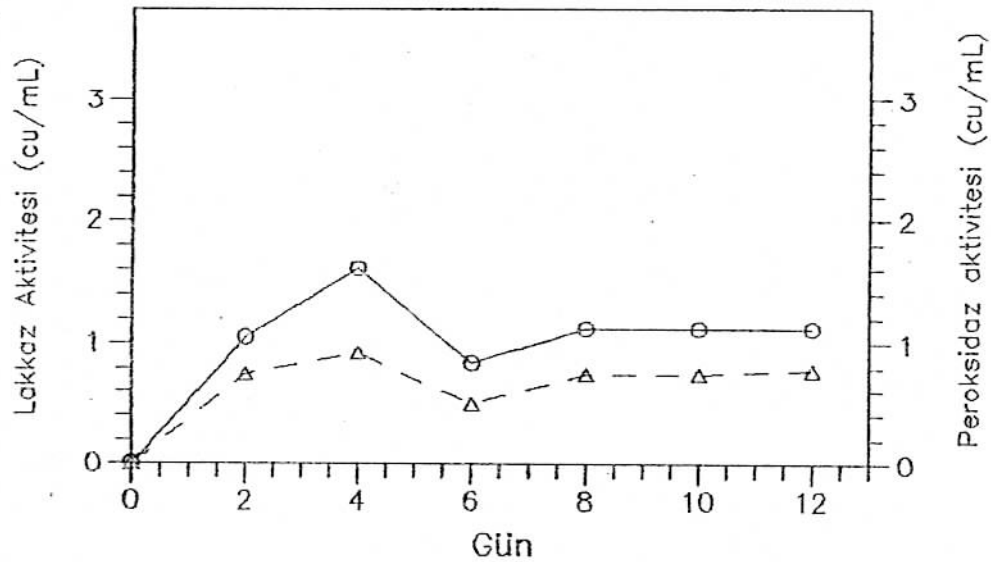
Şekil 3.19 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları;çalkalama hızı:50 rpm; sıcaklık:30°C; pH:4.5; ekim miktarı: 2 mL/50mL vinas. O-----O Renk Miktarı □——□ pH Δ——Δ Üreme



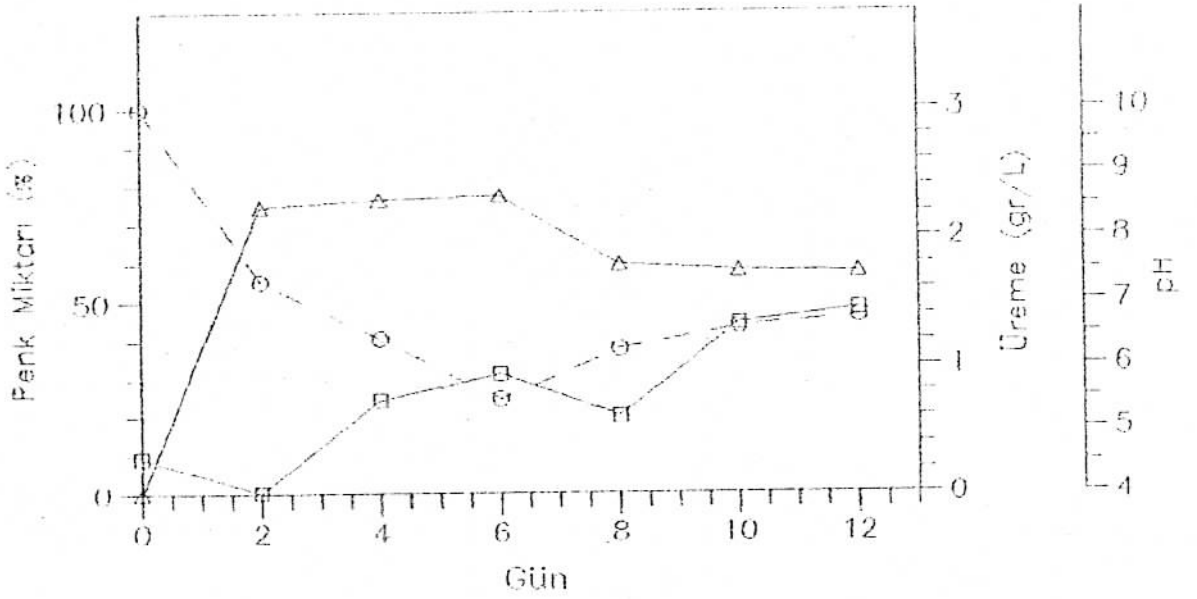
Şekil 3.20 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları;çalkalama hızı:50 rpm; sıcaklık:30°C; pH:4.5; ekim miktarı: 2mL/50mL vinas. O——O Lakkaz Δ----Δ Peroksidaz



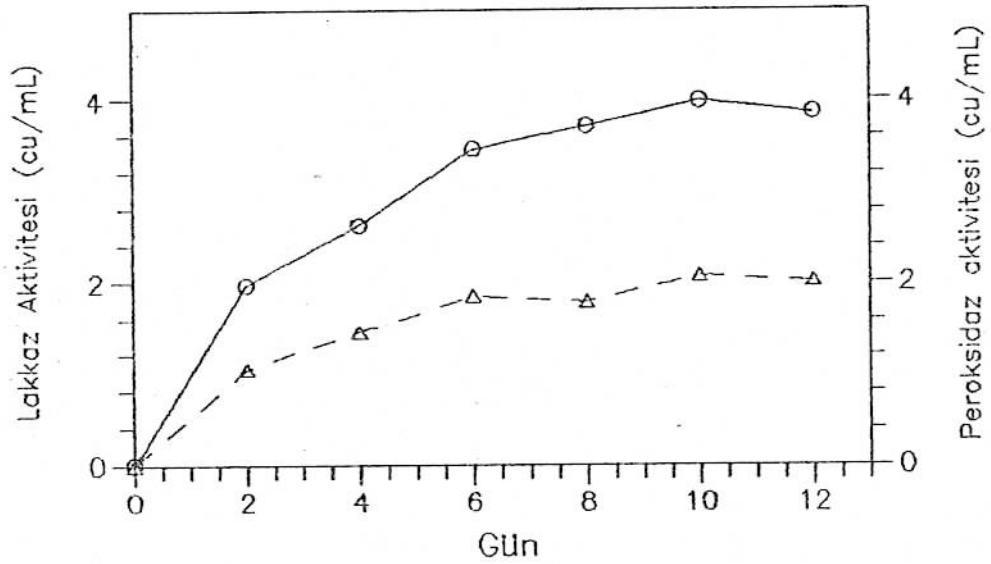
Sekil 3.21 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları; çalkalama hızı: 100 rpm; sıcaklık:30°C; pH:4.5; ekim miktarı:2 mL/50 mL vinas.
 O-----O Renk miktarı □——□ pH Δ——Δ Üreme



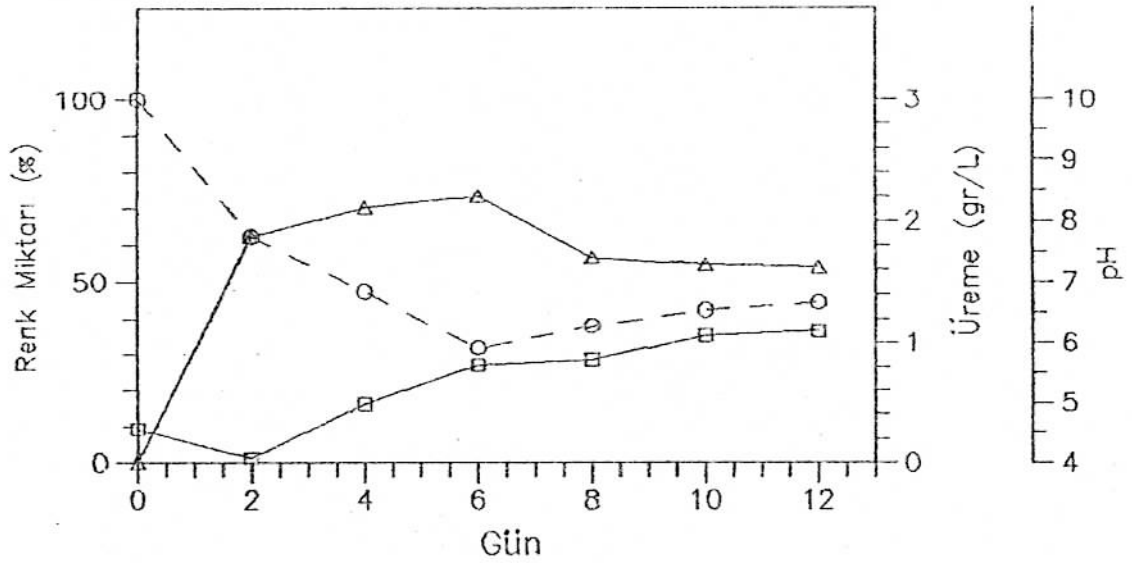
Sekil 3.22 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları; çalkalama hızı:100 rpm; sıcaklık:30°C; pH:4.5; ekim miktarı: 2mL/50mL vinas.
 O——O Lakkaz Δ---Δ.Peroksidaz



Sekil 3.23 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.
Deney koşulları; çalkalama hızı:150 rpm; sıcaklık:30°C; pH:4.5; ekim miktarı:2 mL/50 mL vinas.
O---O Renk miktarı □—□ pH Δ—Δ Üreme



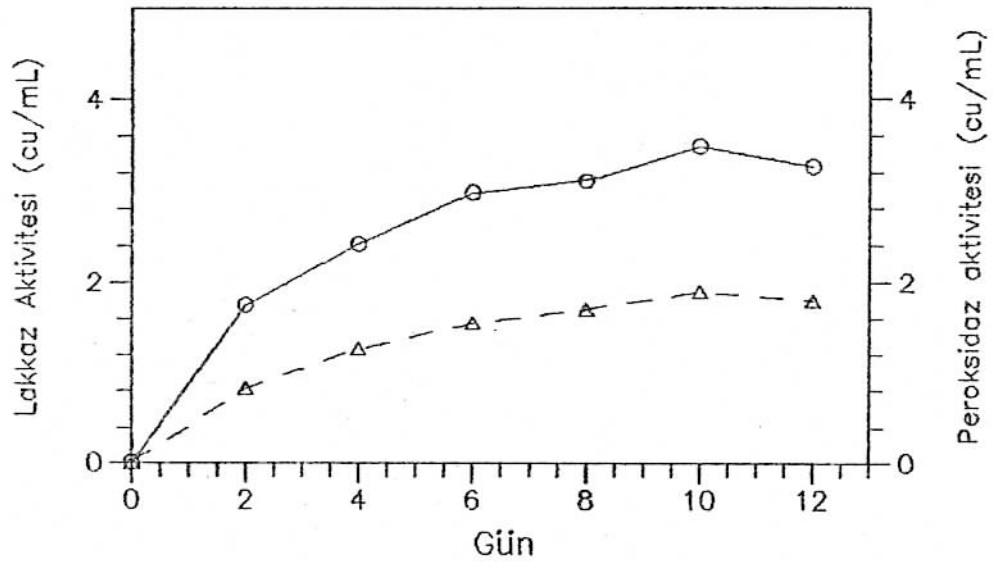
Sekil 3.24 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.
Deney koşulları; çalkalama hızı:150 rpm; sıcaklık: 30°C; pH:4.5; ekim miktarı:2 mL/50mL vinas.
O—O Lakkaz Δ---Δ Peroksidaz



Şekil 3.25 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.

Deney koşulları; çalkalama hızı:200 rpm; sıcaklık:30°C; pH:4.5; ekim miktarı: 2mL/50mL vinas.

○-----○ Renk Miktarı □——□ pH △——△ Üreme



Şekil 3.26 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.

Deney koşulları; çalkalama hızı:200 rpm; sıcaklık: 30°C; pH:4.5; ekim miktarı: 2 mL/50mL vinas.

○——○ Lakkaz △-----△ Peroksidaz

3.3.4 Ekim miktarının etkisi

Optimum pH, sıcaklık ve çalkalama hızı saptandıktan sonra ekim miktarının üreme, enzim aktivitesi, ortam pH'sı ve rengi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla bu çalışma kurulmuştur. Yapılan çalışmada, Bölüm 2.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanmış besiyerlerine Bölüm 2.5'deki gibi üretilmiş stok *C.versicolor* kültürlerinden, homojenizasyon sonrası steril koşullarda 0.1, 0.5, 1, 2 ve 5 mL eklenmiştir. Kültürler 30°C'de 150 rpm'de 12 gün inkübe edilmiştir.

Ekim miktarının 0.1 mL olarak uygulandığı çalışmada en yüksek renk giderimi 8.günde %57.39 olarak gözlenirken biyokitle miktarı 4.günde 1.700 g/L olarak saptanmıştır. 4.gündeki pH değeri 4.36'dan 8.günde 5.19'a yükselmiştir. Bu günde lakkaz 4.62 cu/mL, peroksidaz 2.52 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0256 ünite/mL olarak ölçülmüştür (Şekil 3.27 ve 3.28).

0.5 mL fungus ekilen kültürlerde en yüksek renk giderimi 10.günde, %61.13 olarak gözlenirken, biyokitle miktarı 4.günde 1.900 g/L olarak tesbit edilmiştir. 4.günde pH değeri 5.35 iken 10.günde 5.30'a düşmüştür. Yine 4.günde 2.75 cu/mL lakkaz, 1.20 peroksidaz ve 0.0106 NADH peroksidaz aktivitesi gözlenirken, 10.günde bu değerler 2.07 cu/mL lakkaz, 1.00 cu/mL peroksidaz ve 0.0754 ünite/mL NADH peroksidaz olarak tesbit edilmiştir (Şekil 3.29 ve 3.30).

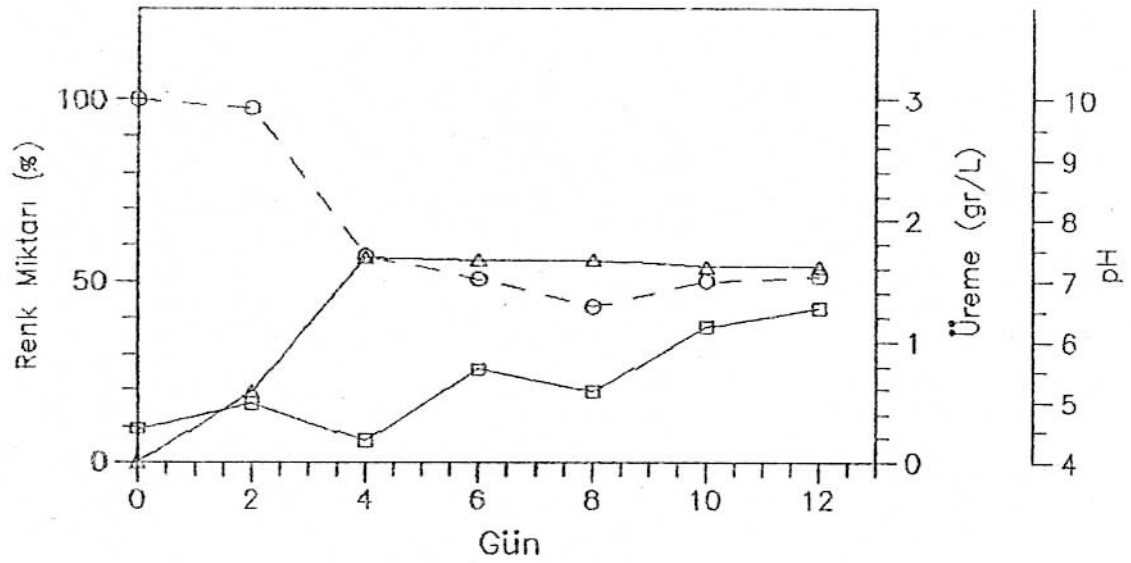
1 mL ekim yapılan kültürlerde en yüksek renk giderimi 8.günde %62.28 olarak bulunmuştur. Bu koşullarda elde edilen en yüksek biyokitle 1.942 g/L'dir. Bu günde lakkaz aktivitesi 4.12 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 2.08 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0740 ünite/mL olarak sap-

tanmıştır. Bu gündeki pH değeri 5.56' dır (Şekil 3.31 ve 3.32).

2 mL ekim yapılan kültürlerde 6.günde renk giderimi %75.32 ve biyokitle miktarı da 2.326 g/L iken lakkaz aktivitesi 3.46 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 1.85 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0875 ünite/mL olarak gözlenmiştir. Bu gündeki pH değeri 5.87'dir (Şekil 3.33 ve 3.34).

En yüksek renk giderimi ve üreme ise 5 mL ekim yapılan kültürlerde gözlenmiştir. Bu kültürlerde en yüksek renk giderimi %78.10 ve üreme 3.312 g/L olarak ölçülmüştür (Şekil 3.35 ve 3.36).

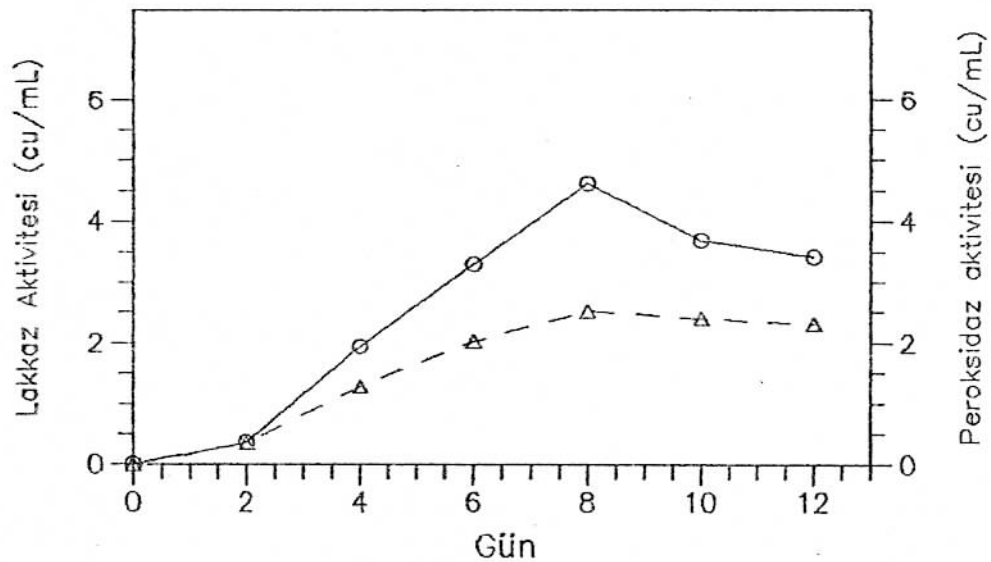
Optimum şartlar ortaya konduktan sonra *C.versicolor* ile kurulan çalışmada pH, renk, kimyasal oksijen istemi (KOİ), toplam şeker, biyokitle ve enzim değişimleri 30°C, pH 4.5, 150 rpm ve 2 mL ekim miktarı koşullarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda %42.71 KOİ, %68.16 toplam şeker ve %75.32 renk giderimi saptanırken, 2.326 g/L biyokitle elde edilmiştir (Şekil 3.37 ve Tablo 3.2).



Şekil 3.27 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.

Deney koşulları; ekim miktarı: 0.1mL/50mL vinas; sıcaklık:30°C; pH:4.5; çalkalama hızı : 150 rpm.

○-----○ Renk Miktarı □-----□ pH △-----△Üreme

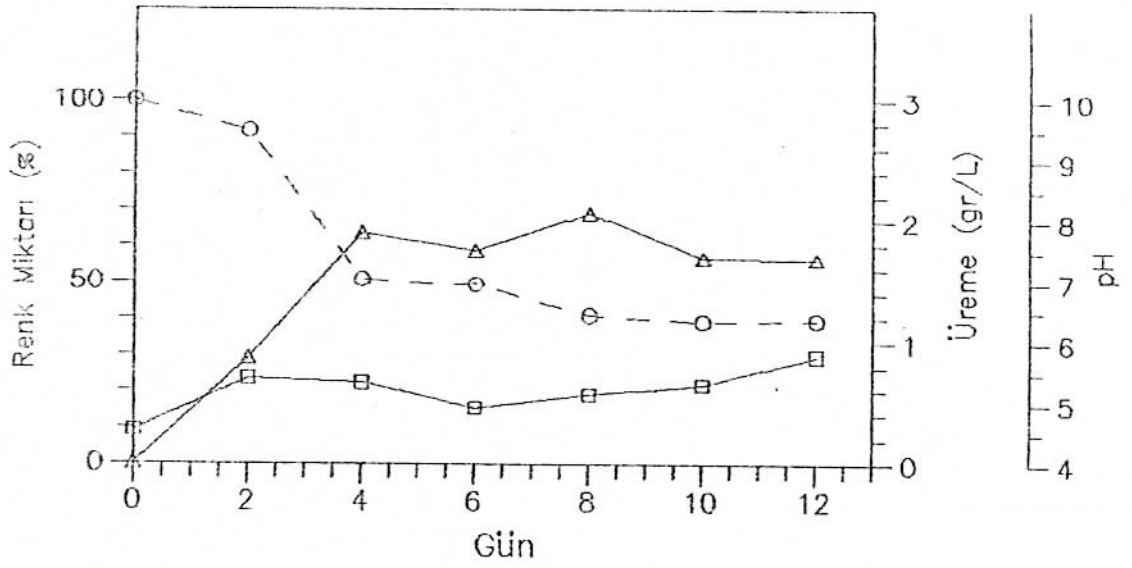


Şekil 3.28 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.

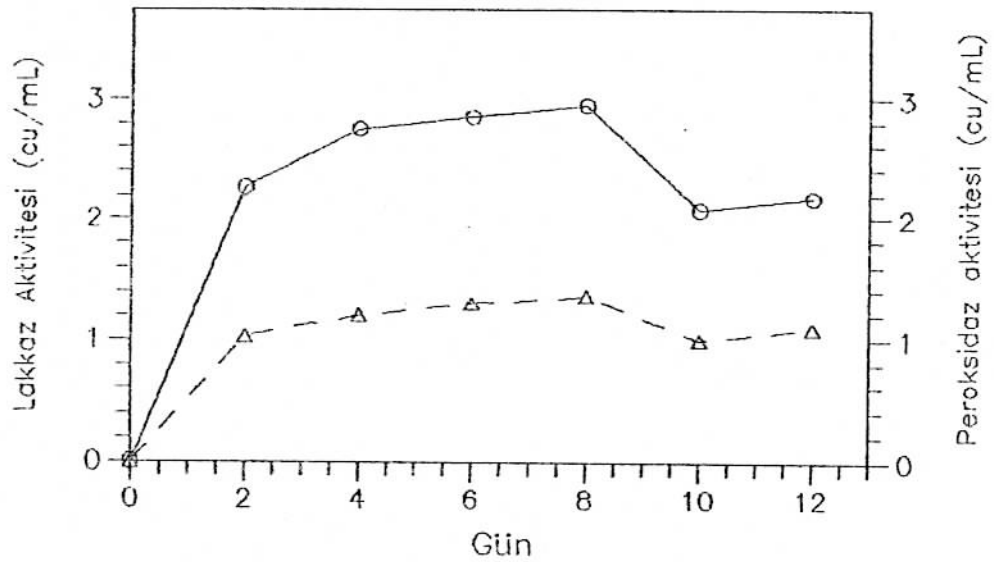
Deney koşulları; ekim miktarı:0.1mL/50mL vinas; sıcaklık:30°C; pH:4.5; çalkalama hızı : 150 rpm.

○-----○ Lakkaz

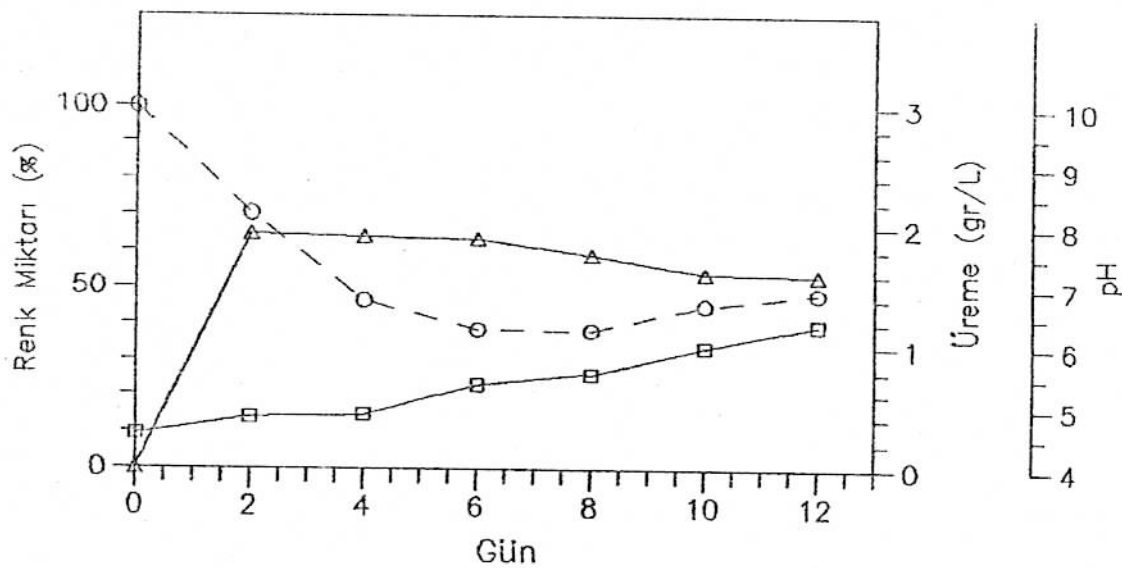
△-----△ Peroksidaz



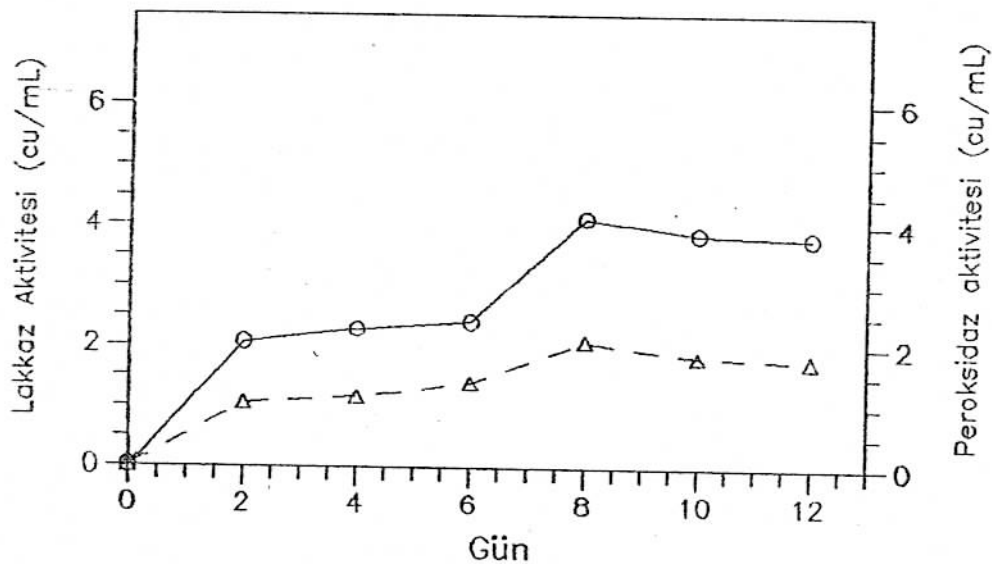
Şekil 3.29 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları: ekim miktarı:0.5mL/50mL vinas; sıcaklık:30°C; pH:4.5; çalkalama hızı: 150 rpm.
 O-----O Renk Miktarı □-----□ pH Δ-----Δ Üreme



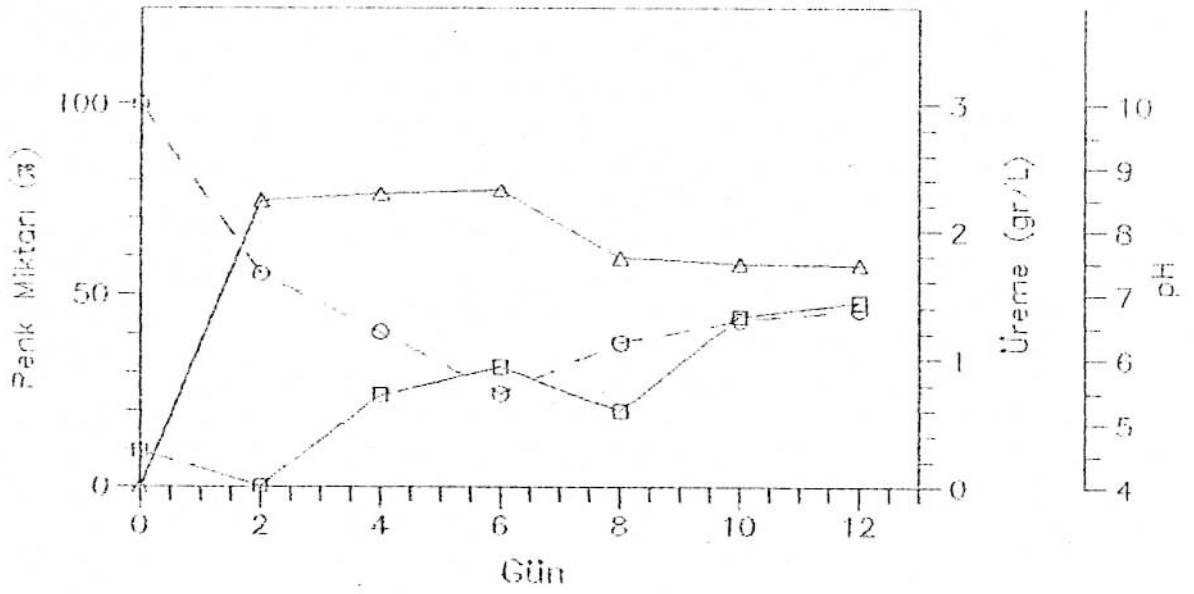
Şekil 3.30 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları; ekim miktarı:0.5 mL/50mL vinas;sıcaklık 30°C; pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm.
 O-----O Lakkaz Δ-----Δ Peroksidaz



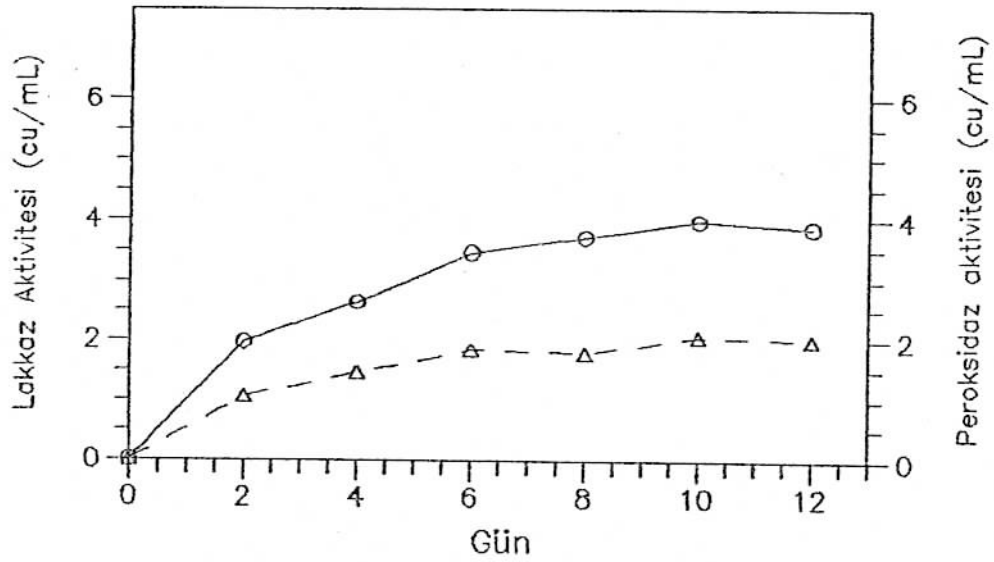
Şekil 3.31 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları; ekim miktarı:1mL/50mL vinas; sıcaklık:30°C;pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm. O---O Renk Miktarı □---□ pH Δ---Δ Üreme



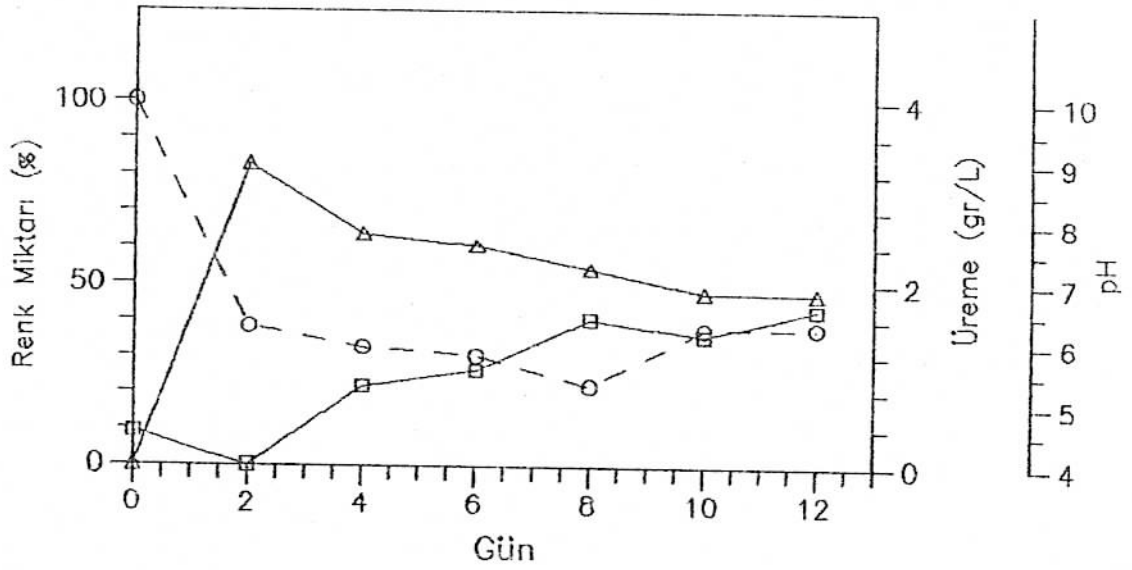
Şekil 3.32 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları; ekim miktarı:1mL/50mL vinas; sıcaklık:30°C;pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm. O---O Lakkaz Δ---Δ Peroksidaz



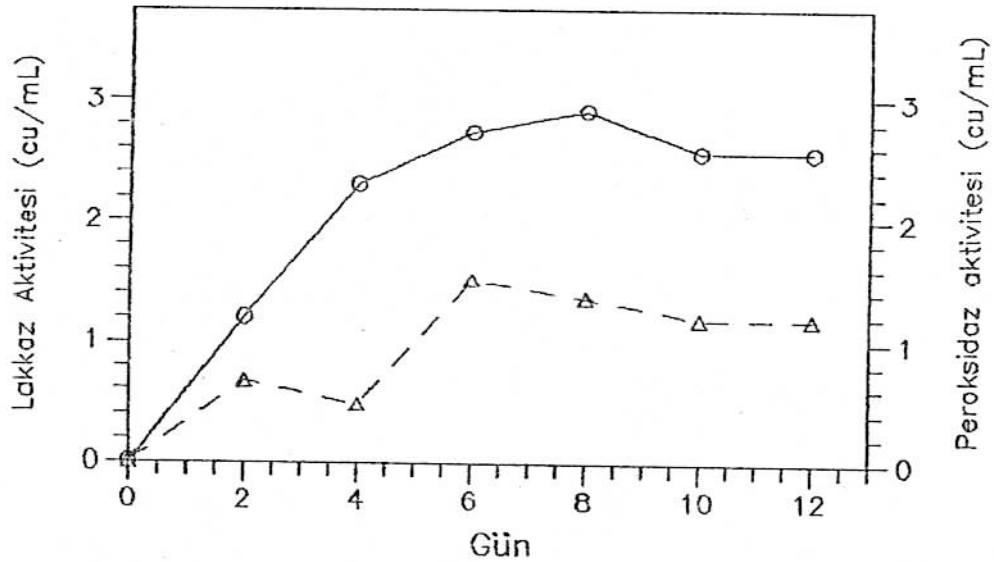
Şekil 3.33 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları; ekim miktarı:2mL/50mL vinas; sıcaklık:30°C;pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm. O---O Renk Miktarı □---□ pH Δ---Δ Üreme



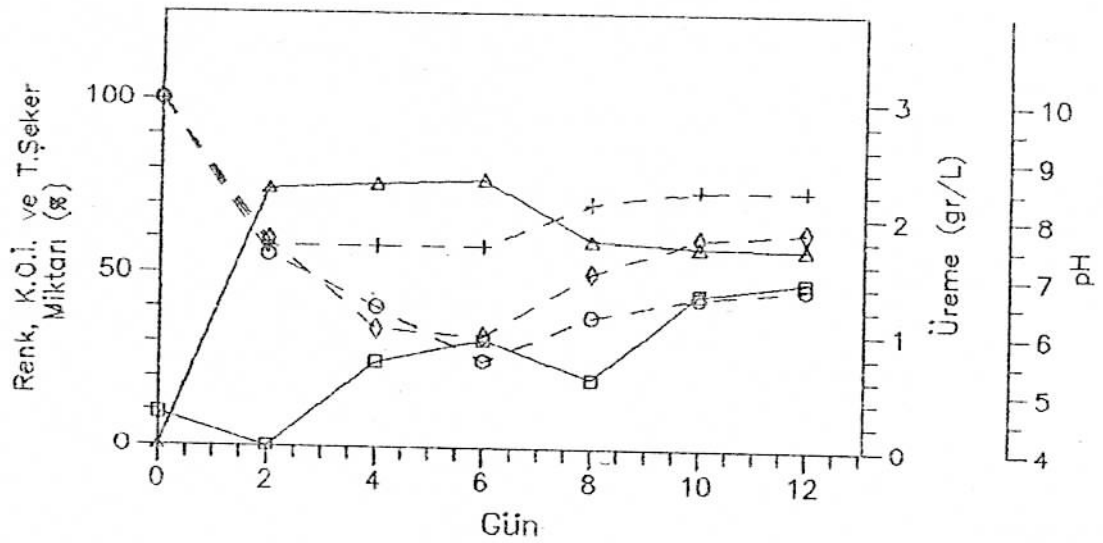
Şekil 3.34 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları; ekim miktarı:2mL/50mL vinas; sıcaklık:30°C;pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm. O---O Lakkaz Δ---Δ Peroksidaz



Sekil 3.35 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.
Deney koşulları; ekim miktarı:5mL/50mL vinas;
sıcaklık:30°C;pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm.
○-----○ Renk Miktarı □-----□ pH △-----△ Üreme



Sekil 3.36 *C.versicolor*'un lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.
Deney koşulları; ekim miktarı:5mL/50mL vinas;
sıcaklık:30°C;pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm.
○-----○ Lakkaz △-----△ Peroksidaz



Sekil 3.37 *C.versicolor*'un vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk, KOf, toplam şeker ve biyokitle değişimi.

Deney koşulları; sıcaklık: 30°C; pH: 4.5; çalkalama hızı: 150 rpm; ekim miktarı: 2mL/50mL vinas.

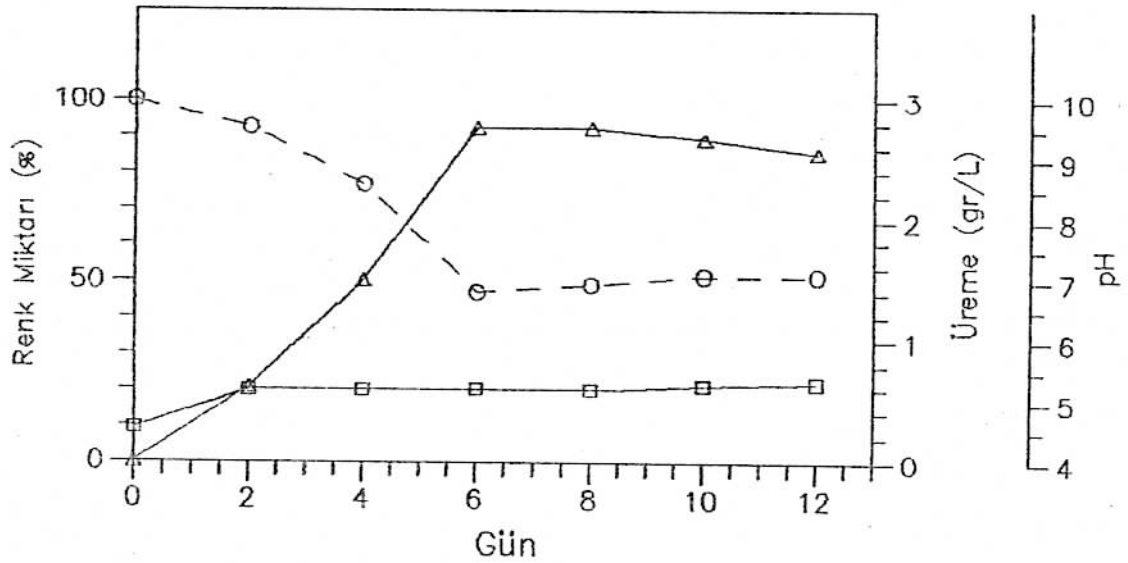
O----O Renk Miktarı □----□ pH △----△ Üreme
+----+ KOf ◇----◇ Toplam Şeker

Tablo 3.2 *C.versicolor*'un optimum koşullarda vinas besiyerinde üretimi sırasında pH, renk, KOf, toplam şeker, biyokitle ve enzim aktivitesi değişimleri.

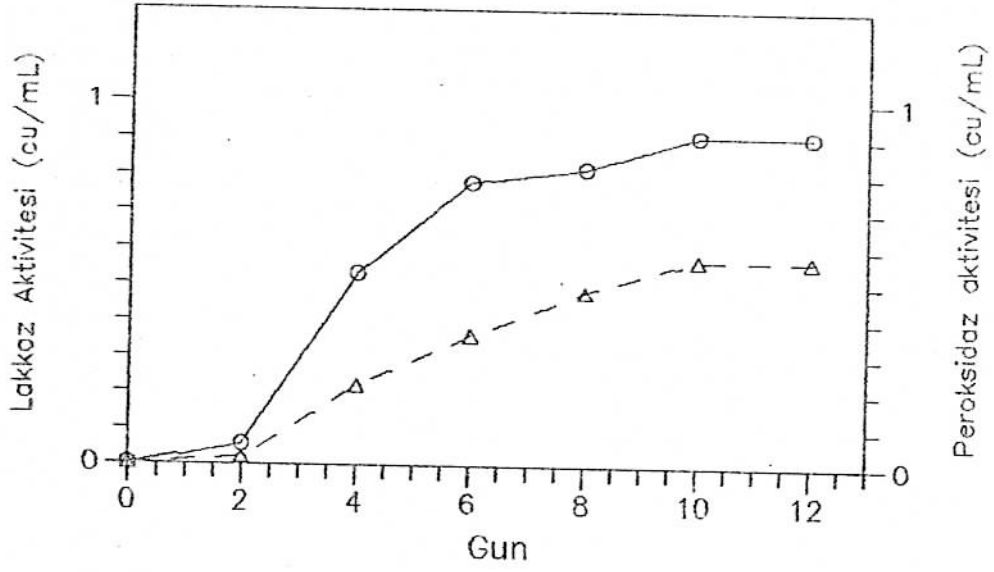
| Gün | 1* | 2* | 3* | 4* | 5* | 6* | 7* | 8* | 9* |
|-----|------|-------|------|------|------|------|------|--------|-------|
| 0 | 4.56 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 4.02 | 45.21 | 42.7 | 41.0 | 1.97 | 1.05 | 0.52 | 0.0251 | 2.242 |
| 4 | 5.47 | 60.00 | 42.7 | 66.3 | 2.63 | 1.46 | 1.03 | 0.0498 | 2.286 |
| 6 | 5.87 | 75.32 | 42.7 | 68.2 | 3.46 | 1.85 | 1.81 | 0.0875 | 2.326 |
| 8 | 5.19 | 62.56 | 30.1 | 50.2 | 3.71 | 1.79 | 1.13 | 0.0546 | 1.792 |
| 10 | 6.66 | 56.95 | 26.2 | 40.1 | 3.98 | 2.07 | 0.75 | 0.0362 | 1.738 |
| 12 | 6.88 | 54.23 | 20.2 | 38.1 | 3.86 | 2.01 | 0.72 | 0.0348 | 1.732 |

1* pH, 2* Renk giderimi (%), 3* KOf giderimi (%)
4* T. şeker giderimi (%), 5* Lakkaz 6* Peroksidaz (cu/mL)
7* (A/dak/mL) 8* ünite/mL (NADH perok.), 9* Biyokitle (g/L)

C.versicolor optimum şartlarda statik olarak da üretilmiş ve bu koşullar altında pH, renk, biyokitle ve enzim aktivite değişimleri saptanmıştır. Statik inkübasyon sırasında en yüksek renk giderimi 6.günde %53.40 olarak saptanırken, biyokitle miktarı 2.770 g/L olarak bulunmuştur; lakkaz 0.78 cu/mL, peroksidaz 0.36 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0154 ünite/mL olarak gözlenmiştir. Aynı günde pH 4.56'dan 5.22'ye yükselmiştir (Şekil 3.38 ve 3.39).



Şekil 3.38 *C.versicolor*'un optimum koşullarda vinas ortamında statik olarak üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.
Deney koşulları; sıcaklık:30°C; pH:4.5; ekim miktarı:2mL/50mL vinas.
O----O Renk Miktarı □——□ pH Δ——Δ Üreme



Şekil 3.39 *C.versicolor*'un optimum koşullarda statik olarak üretimi sırasında lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri.

Deney koşulları; sıcaklık:30°C; pH:4.5; ekim miktarı:2mL/50mL vinas.

○—○ Lakkaz

△---△ Peroksidaz

3.4 Beyaz Çürükçül Funguslardan *Funalia trogii*'nin Vinas Ortamında Optimum Fizyolojik Koşullarının ve Ortam Renginin Gideriminin Saptanması.

3.4.1 pH'nın etkisi

Vinas ortamının başlangıç pH'sının üreme ve bir kirlilik parametresi olan renk üzerine etkisinin araştırılması amacı ile değişik pH değerlerinde bu çalışma sürdürülmüştür. Ayrıca, deney koşullarının hücre dışı oksidasyon enzimleri olan lakkaz, peroksidaz ve kültür ortamında, H_2O_2

üretiminden sorumlu olan NADH peroksidaz'ın günlere bağlı enzim aktiviteleri saptanmıştır. Yapılan çalışma sırasında üreme ve renk giderimi için en uygun pH 4.5 olarak bulunmuştur. Bu pH aralığında en yüksek renk giderimi %62.16 ve biyokitle miktarı da 2.544 g/L olarak bulunmuştur. Üretimin 4. günde elde edilen değerlere karşılık, aynı günde lakkaz aktivitesi 3.08 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 2.13 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0836 ünite/mL olarak saptanmıştır (Şekil 3.40 ve 3.41).

pH 5.5'da kurulan çalışmada ise en yüksek renk giderimi 4.günde %61.87 ve biyokitle miktarı da 2.244 g/L olarak ölçülmüştür. 4.günde lakkaz 2.24 cu/mL, peroksidaz 1.24 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0183 ünite/mL olarak saptanmıştır (Şekil 3.42 ve 3.43).

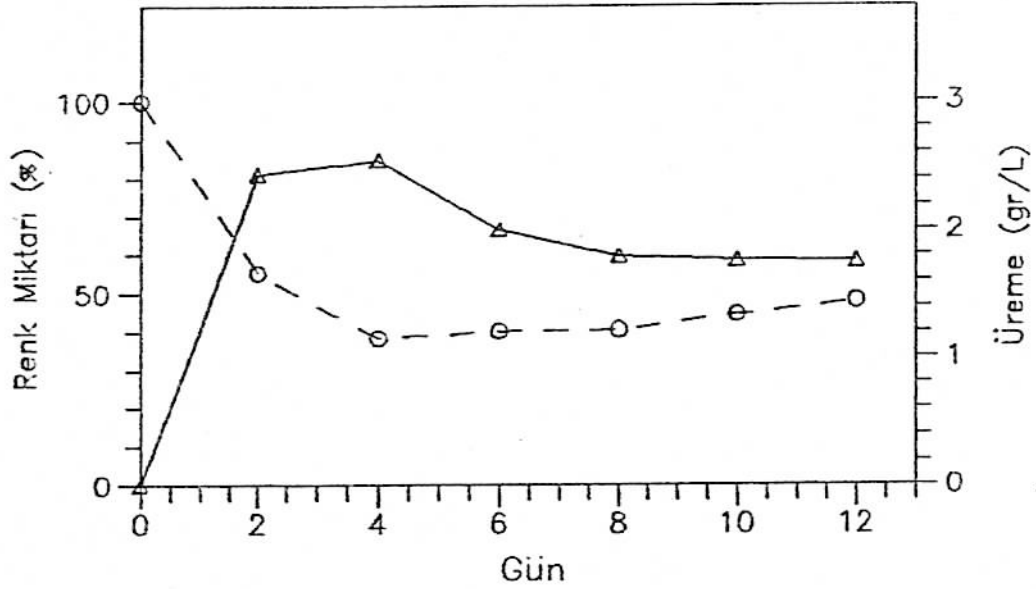
pH 6.5'da en yüksek renk giderimi ve biyokitle miktarı 4.günde elde edilmiştir. pH 6.5'da renk giderimi %60.19 ve biyokitle miktarı da 2.448 g/L olarak bulunurken, lakkaz 2.30 cu/mL, peroksidaz 1.25 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi 0.0324 ünite/mL olarak gözlenmiştir (Şekil 3.44 ve 3.45).

pH 7.5'da ise en yüksek renk giderimi 4.günde %60.00 olarak gözlenirken, bu günde biyokitle miktarı 2.480 g/L olarak elde edilmiş, lakkaz aktivitesi 2.00 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 1.11 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0295 ünite/mL olarak ölçülmüştür (Şekil 3.46 ve 3.47).

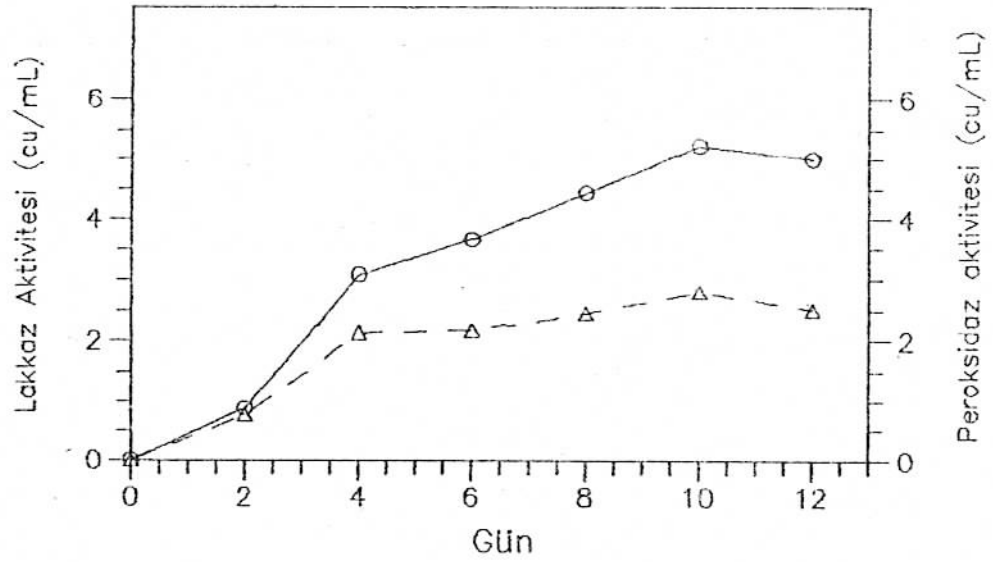
Bu çalışma sonucunda *F.trogii*' nin üremesi ve en yüksek renk gideriminin elde edilebilmesi için en uygun pH 4.5 olarak elde edilmiştir. pH 4.5 elimizdeki vinasın pH değerine uygun bir pH değeridir.

En uygun pH değerinin saptanması amacı ile kurulan

çalışmalarda Bölüm 2.4'de anlatıldığı Şekilde hazırlanmış besiyerlerinin pH'ları Bölüm 2.6.1'de belirtildiği Şekilde ayarlanmıştır. Bu ortamlara Bölüm 2.5'de anlatıldığı Şekilde üretilmiş Őek *F.trogii* kùltürlerinden 2 mL ekilmiş ve kùltürler 30°C'de 150 rpm'de inkùbatörde 12 gün inkùbe edilmiştir.



Sekil 3.40 *F.trogii*'nin vinas ortamında üremesi ve ortam renginin değişimi.
Deney koşulları; pH:4.5; sıcaklık:30°C; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı: 2mL/50 mL vinas.
O----O Renk Miktarı Δ—Δ Üreme

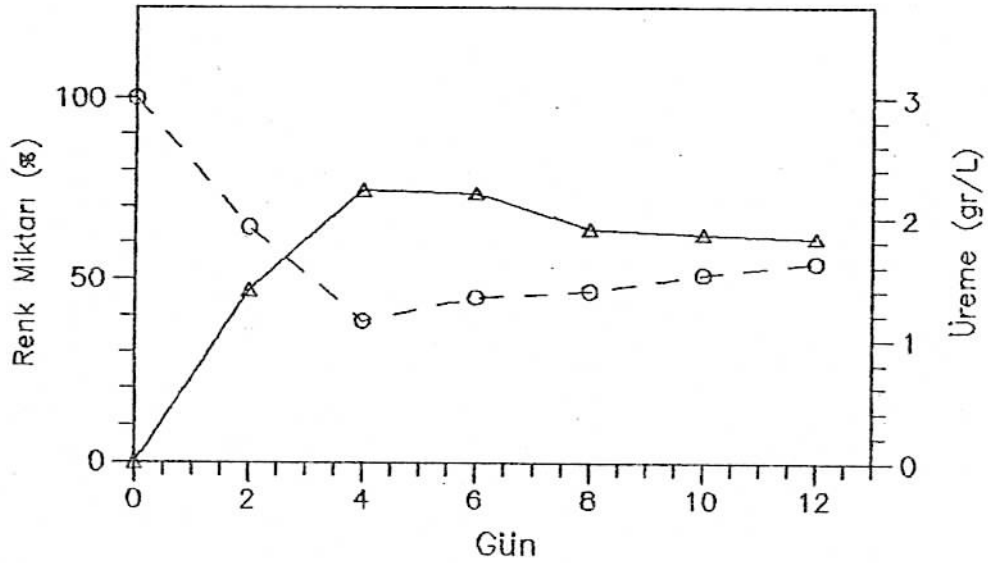


Şekil 3.41 *F.trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivite-lerinin günlere bağlı değişimi.

Deney koşulları; pH:4.5; sıcaklık:30°C; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2mL/50mL vinas.

○—○ Lakkaz

△----△ Peroksidaz

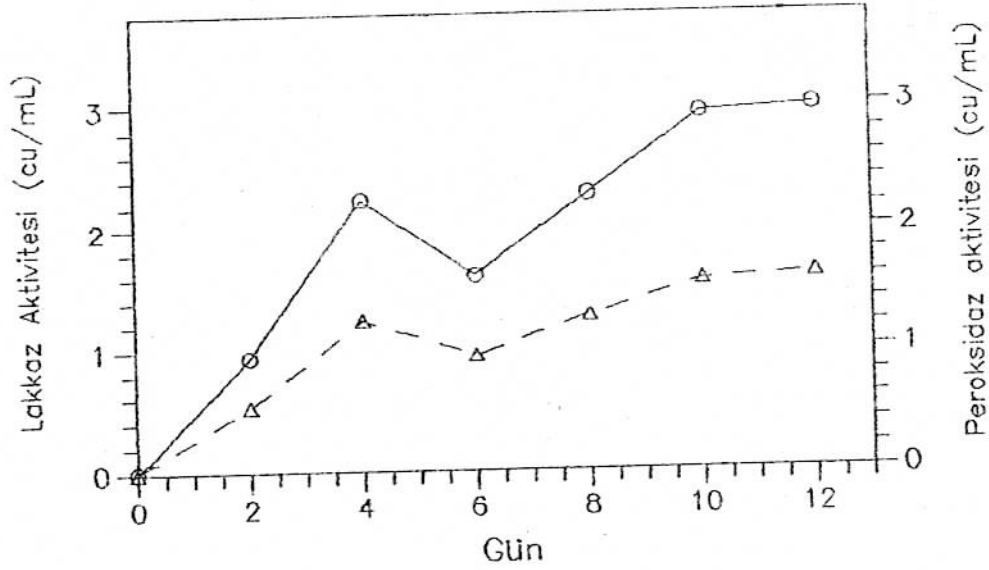


Şekil 3.42 *F.trogii*' nin vinas ortamında üremesi ve ortam renginin değişimi.

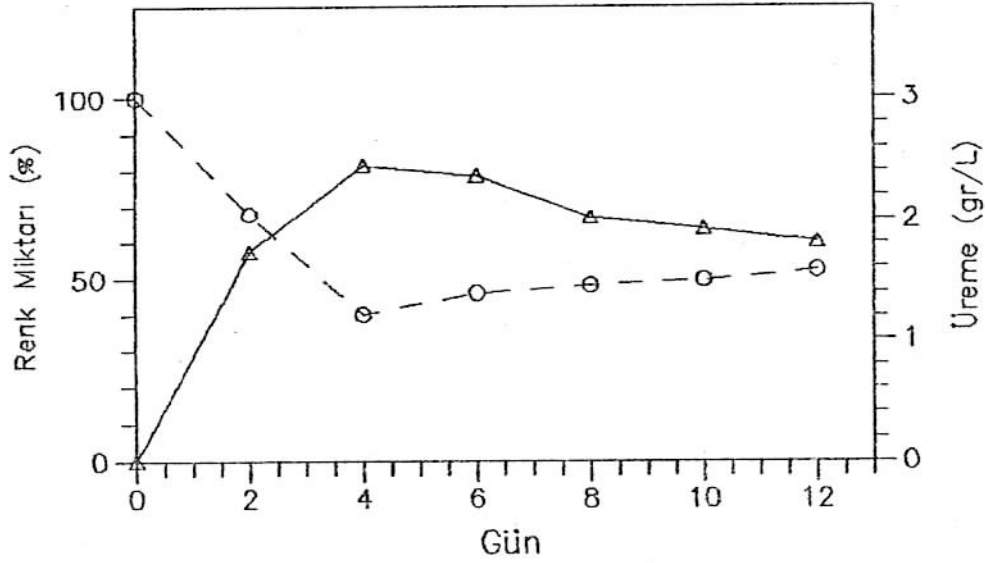
Deney koşulları; pH:5.5; sıcaklık:30°; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2mL/50mL vinas.

○----○ Renk Miktarı

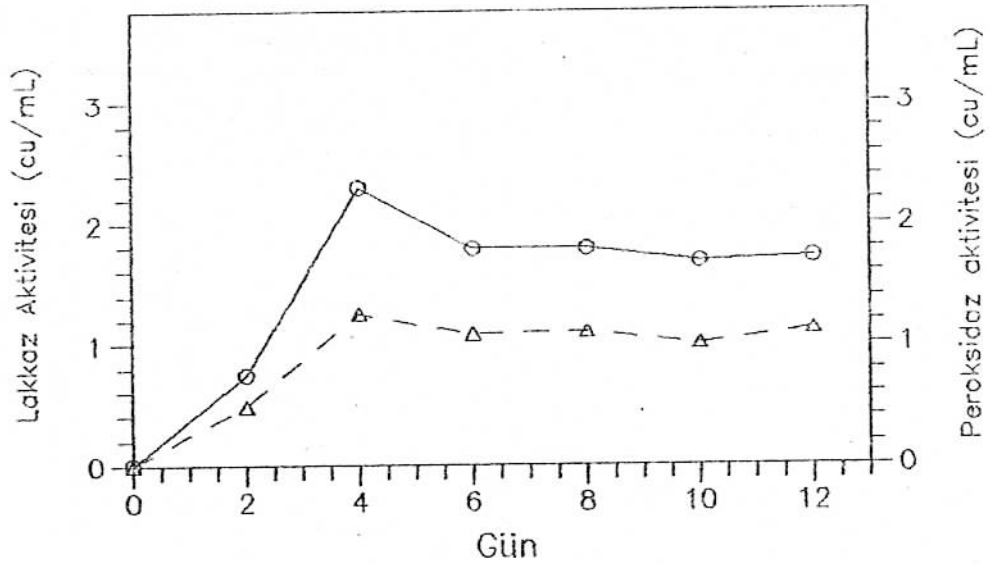
△—△ Üreme



Şekil 3.43 *F. trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivite-
lerinin günlere bağlı değişimi.
Deney koşulları:pH:5.5; sıcaklık:30°C; çalka-
lama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2mL/50mL vi-
nas.
○—○ Lakkaz △---△ Peroksidaz



Şekil 3.44 *F. trogii*'nin vinas ortamında üremesi ve
ortam renginin değişimi.
Deney koşulları:pH:6.5; sıcaklık:30°C; çalka-
lama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2mL/50mL vi-
nas.
○---○ Renk Miktarı △—△ Üreme

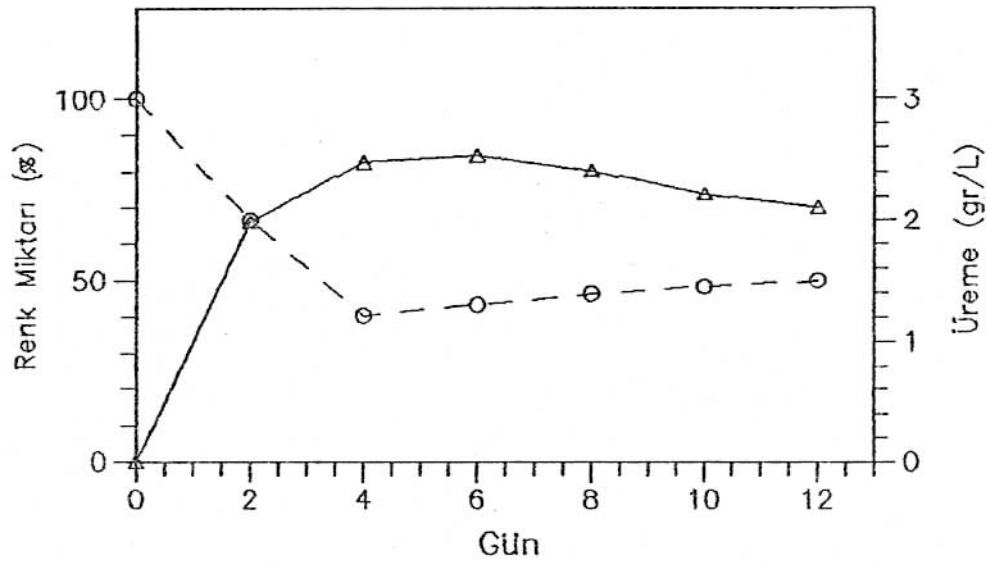


Şekil 3.45 *F.trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivite-lerinin günlere bağlı değişimi.

Deney koşulları; pH:6.5; sıcaklık:30°C; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2mL/50mL vi-nas.

○—○ Lakkaz

△---△ Peroksidaz

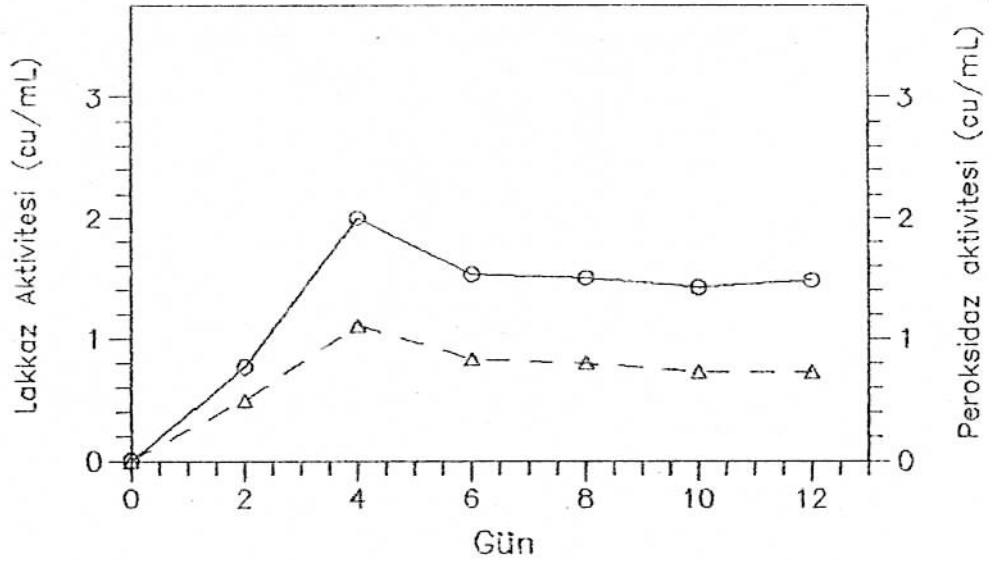


Şekil 3.46 *F.trogii*' nin vinas ortamında üremesi ve ortam renginin giderimi.

Deney koşulları: pH:7.5; sıcaklık:30°C; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2mL/50mL vi-nas.

○-----○ Renk Miktarı

△——△ Üreme



Şekil 3.47 *F. troglia*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitele-
rinin günlere bağlı değişimi.

Deney koşulları; pH:7.5; sıcaklık:30°C; çal-
kalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2mL/50mL vi-
nas.

○—○ Lakkaz

△---△ Peroksidaz

3.4.2 Sıcaklığın etkisi

En uygun pH aralığı 4.5 olarak saptandıktan sonra op-
timum sıcaklığın saptanması için 20°C, 25°C, 30°C, 35°C ve
40°C'lerde deneyler kurulmuştur. 20°C'de kurulan çalışmada
en yüksek renk giderimi ve biyokitle miktarı 4.günde sap-
tanmıştır. Bu günde renk giderimi %42.27 ve biyokitle
miktarı da 2.001 g/L olarak elde edilmiştir. Bu gündeki
lakkaz aktivitesi 0.75 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 0.10
cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0149 ünite/mL ola-
rak saptanmıştır. Bu koşullarda pH'nın da sürekli olarak
yükseldiği saptanmış ve 4.günde pH 5.29 olarak ölçülmüştür
(Şekil 3.48 ve 3.49).

25°C'de kurulan çalışmada en yüksek renk giderimi ve üreme yine 4.günde saptanmıştır. Bu koşullar altında renk giderimi %61.39, biyokitle miktarı 2.376 g/L ve pH değeri de 6.4 olarak elde edilirken lakkaz aktivitesi 1.31 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 0.36 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0483 ünite/mL değerinde bulunmuştur (Şekil 3.50 ve 3.51).

30°C'de en yüksek renk giderimi ve biyokitle miktarı yine 4.günde ölçülmüştür. Bu günde renk giderimi %62.16, biyokitle miktarı 2.544 g/L ve pH değeri de 6.07 dir. Aynı günde lakkaz aktivitesi 3.08 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 2.13 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0836 ünite/mL olarak elde edilmiştir (Şekil 3.52 ve 3.53).

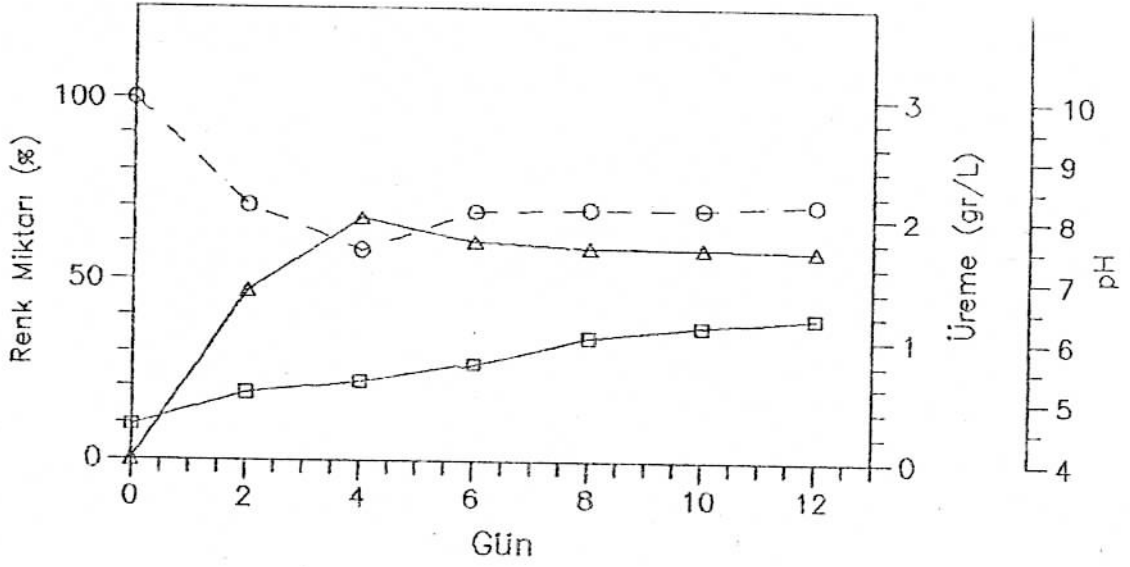
35°C'de ise en yüksek değerlerin elde edildiği 4.günde renk giderimi %61.33 ve biyokitle miktarı 2.082 g/L olarak bulunmuştur. Bu günde pH değeri de 4.46'e yükselmiştir. Lakkaz aktivitesi 0.70 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 0.06 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0435 ünite/mL olarak saptanmıştır (Şekil 3.54 ve 3.55).

40°C'de en yüksek renk giderimi 4. günde % 36.23 olarak elde edilirken en yüksek biyokitle miktarı da 6. günde 2.000 g/L olarak elde edilmiştir. Bu günde pH değeri 7.75 lakkaz aktivitesi 0.04 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0096 ünite/mL olarak bulunmuştur (Şekil 3.56 ve 3.57).

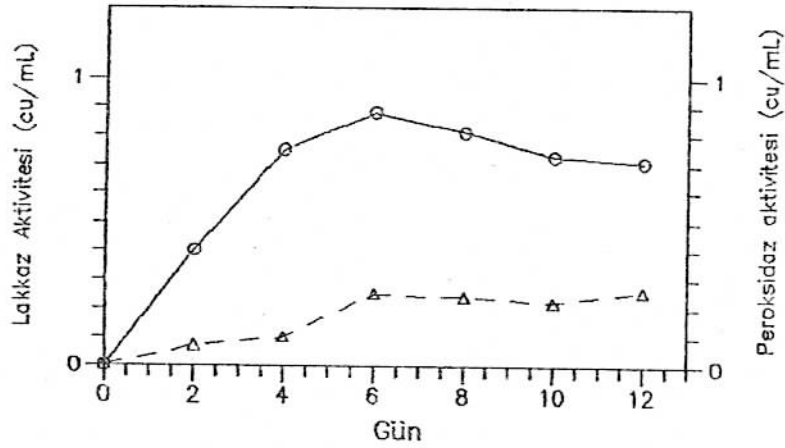
Sonuç olarak *F.trogii* için çalkalamalı üreme sürecinde optimum sıcaklık 30°C olarak belirlenmiş ve çalışmalarda bu sıcaklık derecesi kullanılmıştır.

Optimum sıcaklığın saptanması amacıyla kurulan bu çalışmada Bölüm 2.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanmış besiyerlerine Bölüm 2.5'de anlatıldığı gibi *F.trogii* kültürler-

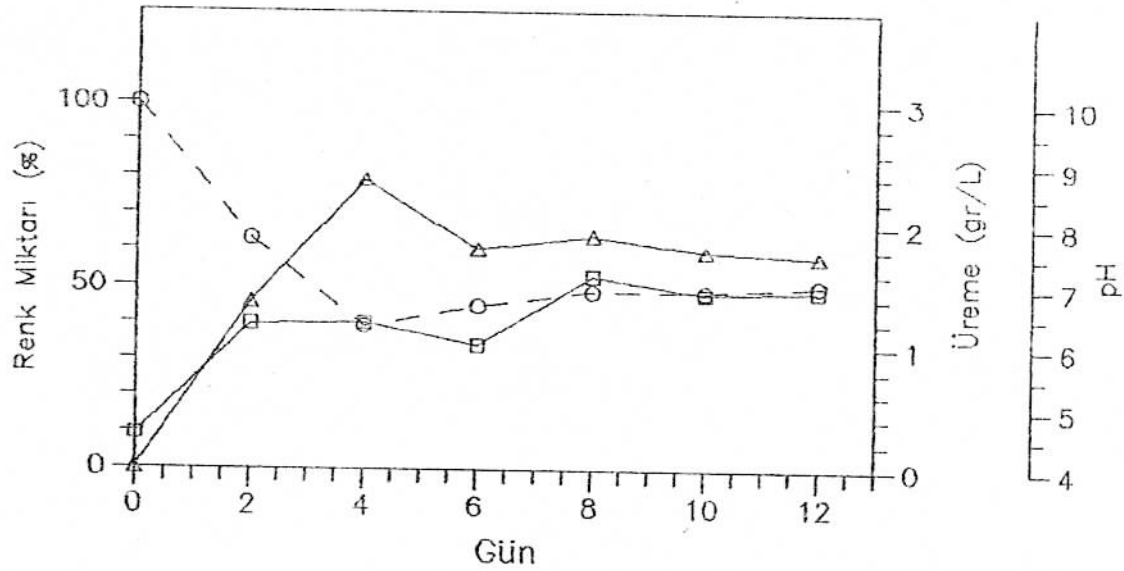
inden homojenizasyon sonrası 2 mL ekilmiş ve kültürler 20°C, 25°C, 30°C, 35°C ve 40°C'de 150 rpm de 12 inkübe edilmiştir.



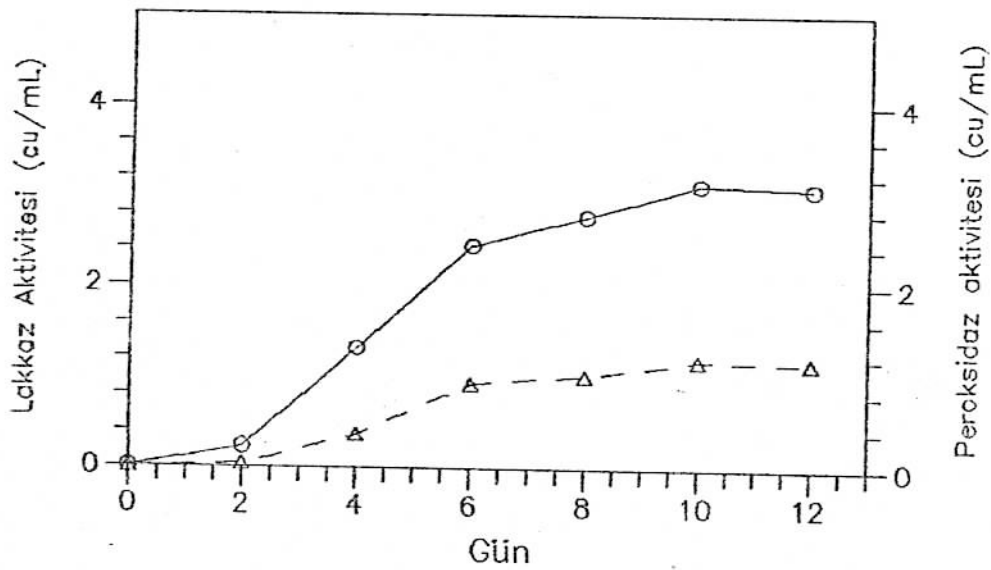
Şekil 3.48 *F. trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları; sıcaklık:20°C; pH:4.5; çalkalama hızı: 150 rpm; ekim miktarı:2mL/50mL vinas.
O----O Renk Miktarı □——□ pH Δ——Δ Üreme



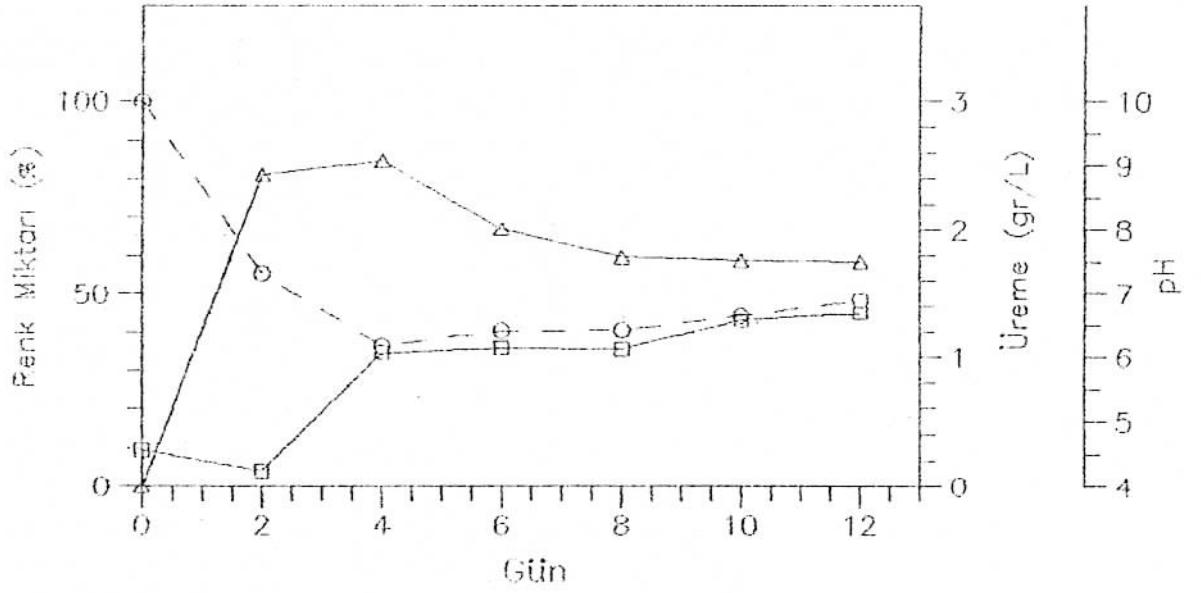
Şekil 3.49 *F. trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları; sıcaklık:20°C; pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2mL/50mL vinas.
O——O Lakkaz Δ----Δ Peroksidaz



Şekil 3.50 *F.trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.
Deney koşulları; sıcaklık:25°C; pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm;ekim miktarı:2mL/50mL vinas.
O-----O Renk Miktarı □——□ pH Δ——Δ Üreme



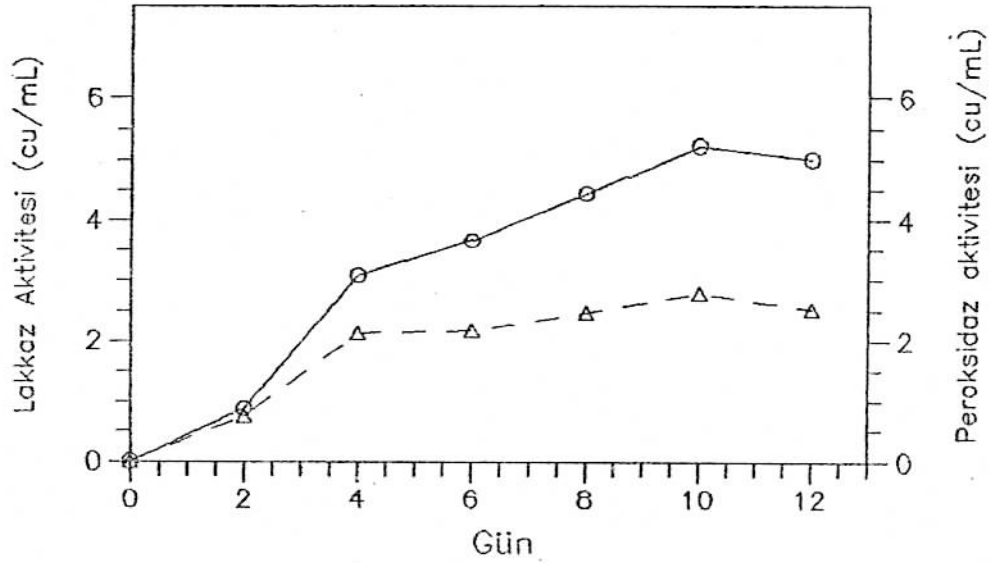
Şekil 3.51 *F.trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitele- rinin günlere bağlı değişimi.
Deney koşulları; sıcaklık:25°C; pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm;ekim miktarı:2mL/50mL vinas.
O——O Lakkaz Δ- - -Δ Peroksidaz



Şekil 3.52 *F.trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.

Deney koşulları; sıcaklık:30°C; pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2mL/50mL vinas.

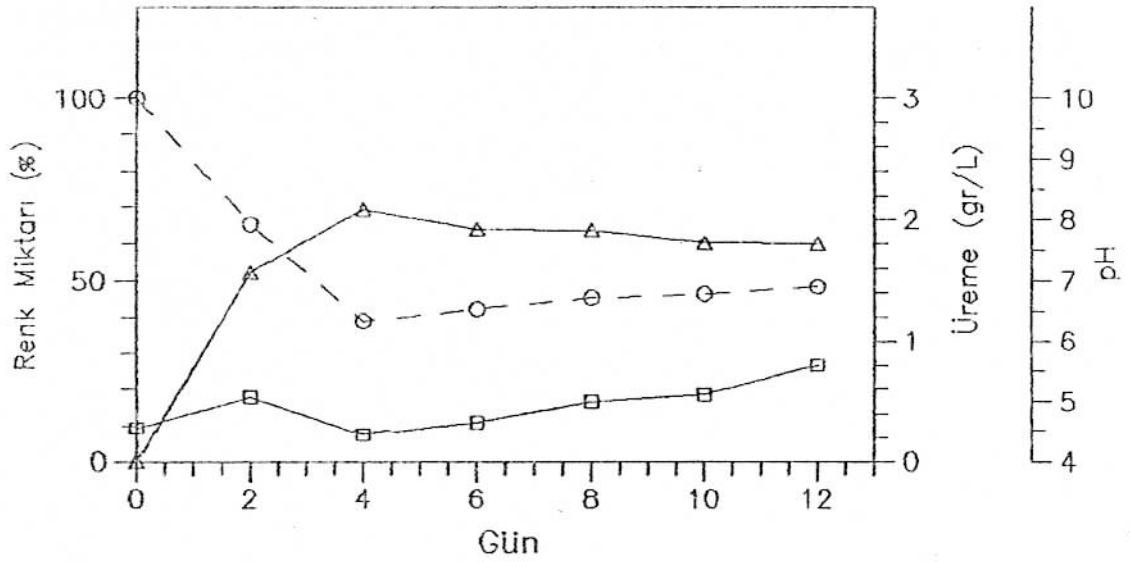
○-----○ Renk Miktarı □-----□ pH △-----△ Üreme



Şekil 3.53 *F.trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.

Deney koşulları; sıcaklık:30°C; pH:4.5; çalkalama hızı:150 rpm; ekim miktarı:2mL/50mL vinas.

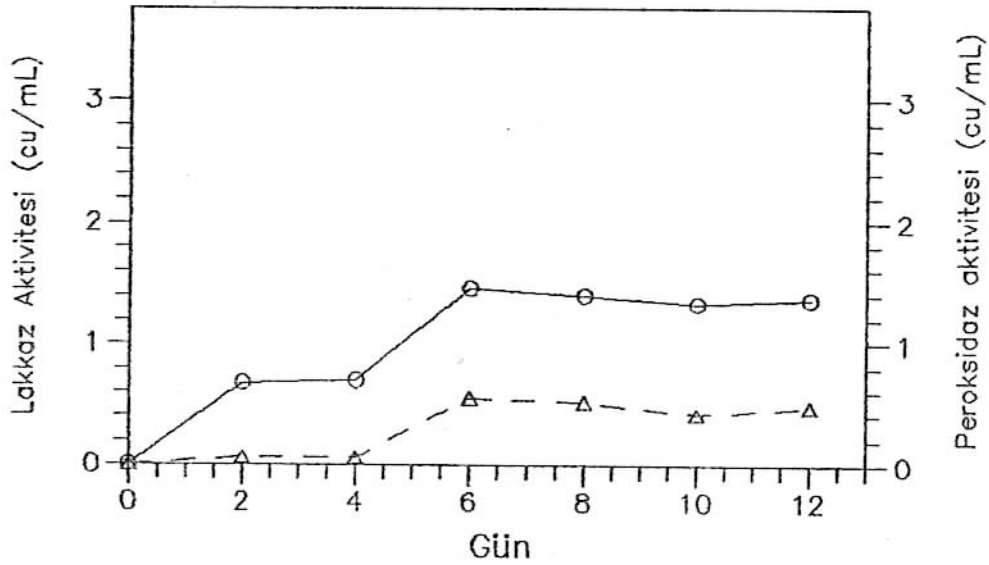
○-----○ Lakkaz △-----△ Peroksidaz



Şekil 3.54 *F.trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.

Deney koşulları; sıcaklık: 35°C; pH: 4.5; çalkalama hızı: 150 rpm; ekim miktarı: 2mL/50mL vinas.

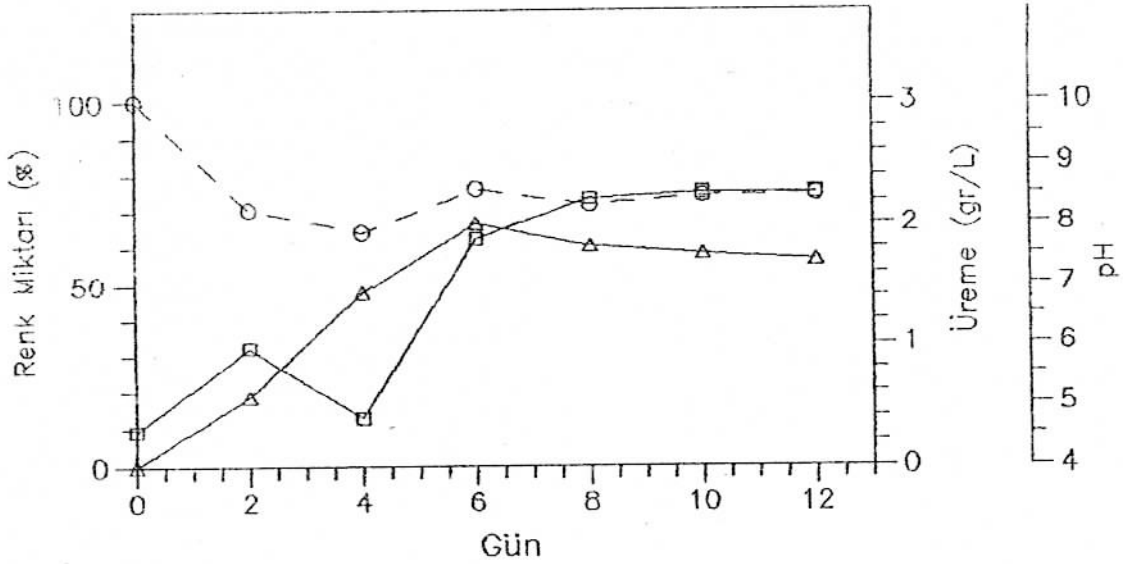
○-----○ Renk Miktarı □——□ pH △——△ Üreme



Şekil 3.55 *F.trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.

Deney koşulları; sıcaklık: 35°C; pH: 4.5; çalkalama hızı: 150 rpm; ekim miktarı: 2mL/50mL vinas.

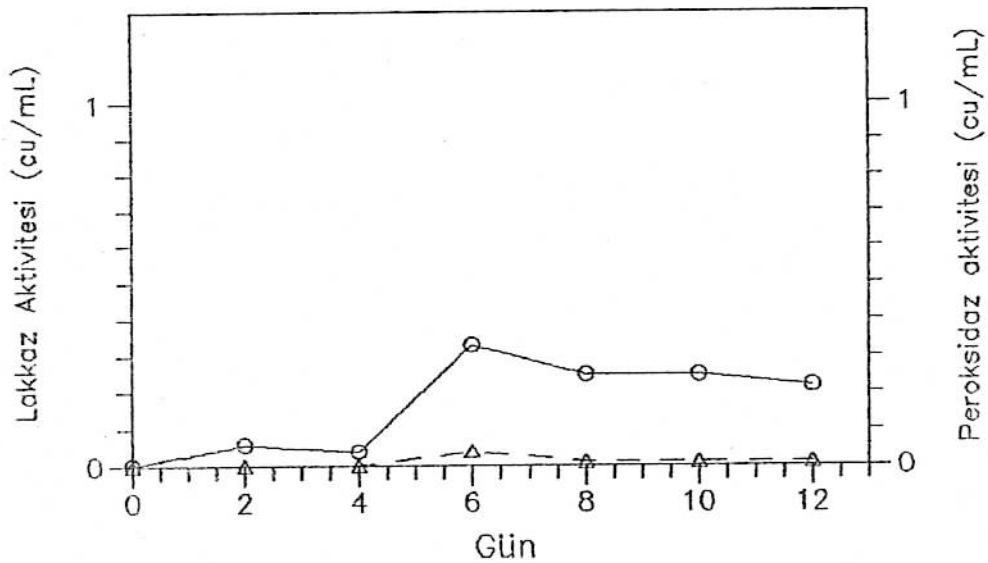
○——○ Lakkaz △---△ Peroksidaz



Şekil 3.56 *F. trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.

Deney koşulları; sıcaklık: 40°C; pH: 4.5; çalkalama hızı: 150 rpm; ekim miktarı: 2mL/50mL vinas.

○---○ Renk Miktarı □---□ pH △---△ Üreme



Şekil 3.57 *F. trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.

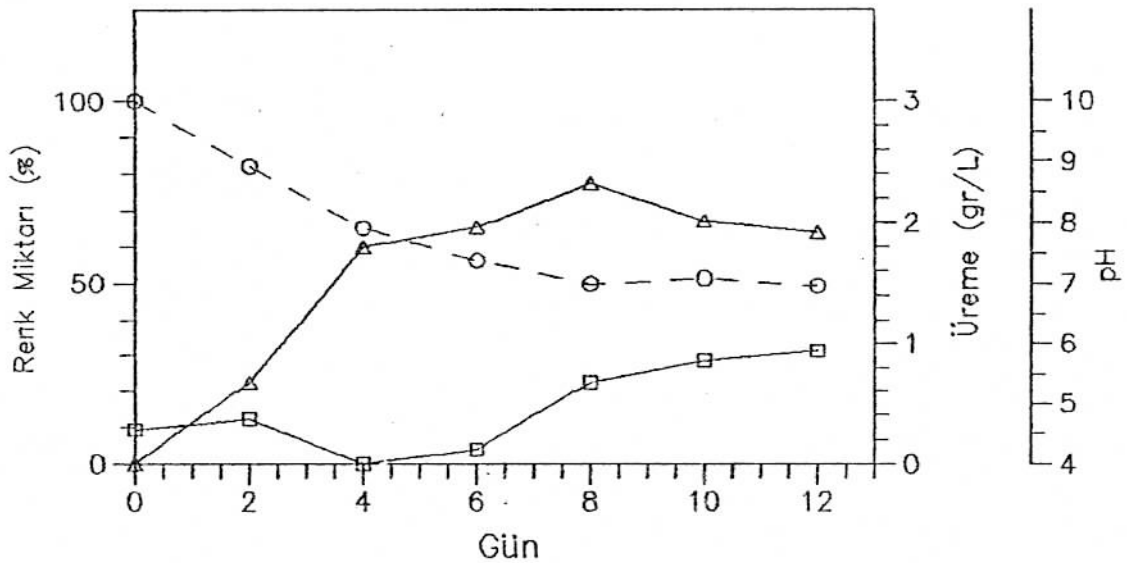
Deney koşulları; sıcaklık: 40°C; pH: 4.5; çalkalama hızı: 150 rpm; ekim miktarı: 2mL/50mL vinas.

○---○ Lakkaz △---△ Peroksidaz

3.4.3 Çalkalama hızının etkisi

Optimum sıcaklık ve pH değerleri saptandıktan sonra, bu koşullarda çalkalama hızının üreme ve renk giderimine etkisi ile, pH ve enzim değişimleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kültürler 50, 100, 150 ve 200 rpm çalkalama hızında 30°C ve pH 4.5'da üretilmişlerdir.

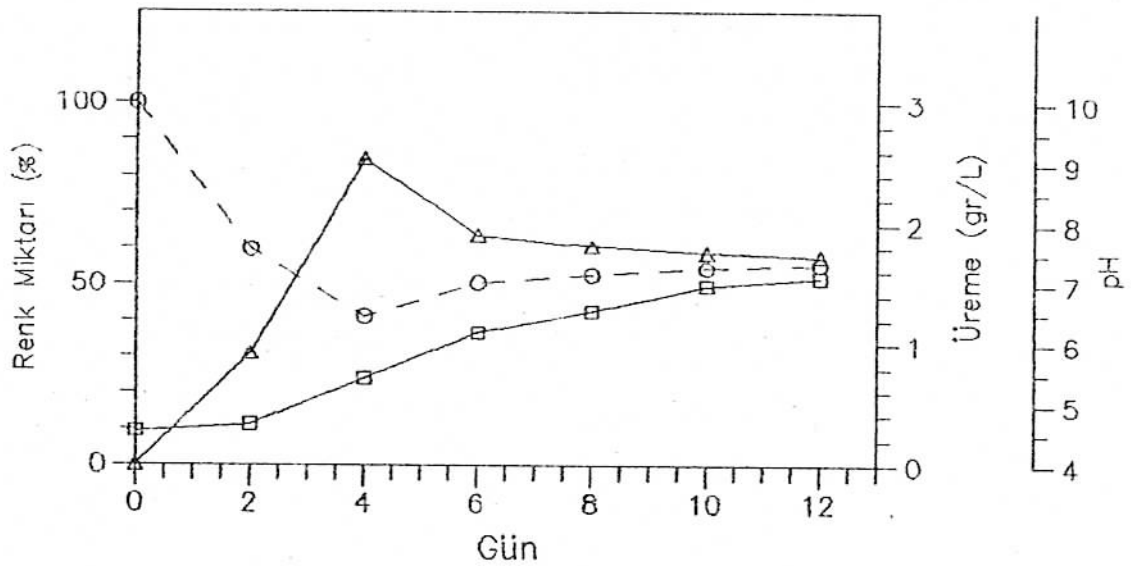
50 rpm çalkalama hızında kurulan çalışmada en yüksek renk giderimi ve biyokitle miktarı 8. günde saptanmıştır. Bu günde renk giderimi %50.65, biyokitle miktarı 2.316 g/L ve pH değeri de 5.36 bulunmuştur. Aynı günde lakkaz aktivitesi 0.83 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 0.65 cu/mL NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0619 ünite/mL olarak elde edilmiştir (Şekil 3.58 ve 3.59).



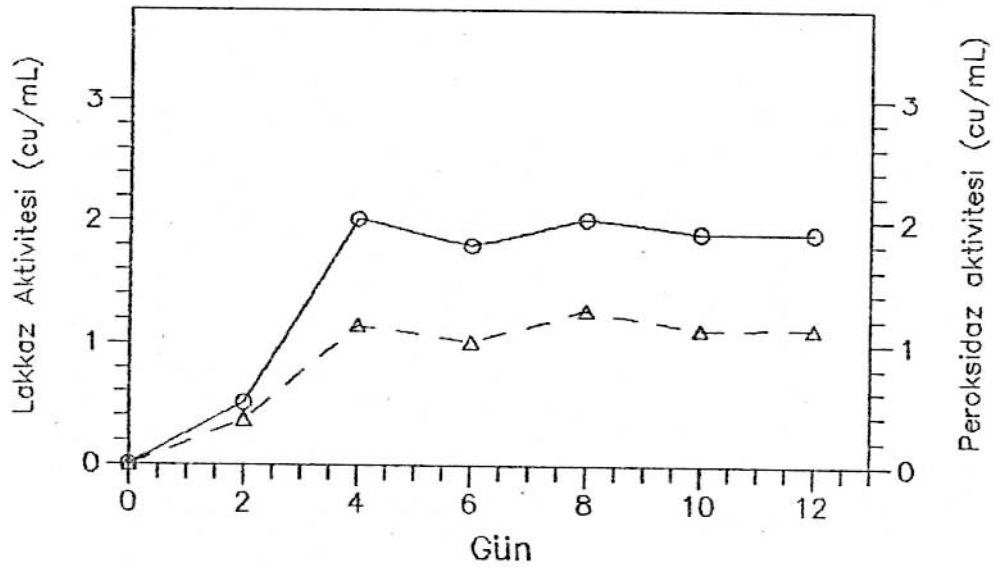
Şekil 3.58 *F. trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.

Deney koşulları; çalkalama hızı:50 rpm;sıcaklık:30°C; pH:4.5; ekim miktarı:2mL/50mL vinas.

O----O Renk Miktarı □—□ pH Δ—Δ Üreme

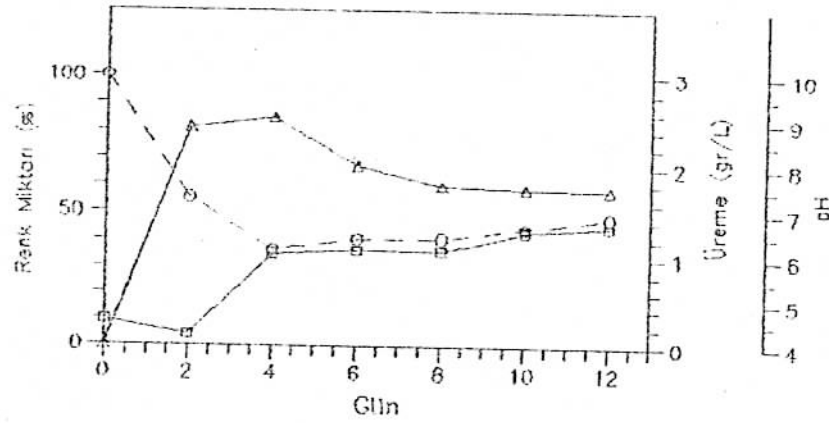


Şekil 3.60 *F.trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları;çalkalama hızı:100 rpm;sıcaklık:30°C; pH:4.5; ekim miktarı:2mL/50mL vinas.
O-----O Renk Miktarı □——□ pH Δ——Δ Üreme

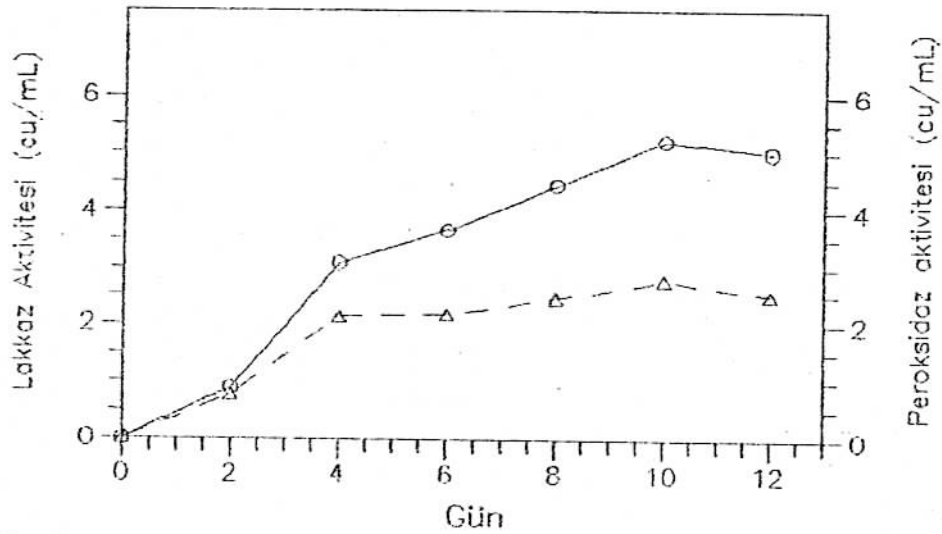


Şekil 3.61 *F.trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları;çalkalama hızı:100 rpm;sıcaklık:30°C; pH:4.5; ekim miktarı:2mL/50mL vinas.
O——O Lakkaz Δ----Δ Peroksidaz

150 rpm'de yürütülen çalışmada 4.günde renk giderimi %62.16, biyokitle miktarı 2.544 g/L ve pH 6.07 olarak saptanırken 3.08 cu/mL lakkaz aktivitesi, 2.13 cu/mL peroksidaz aktivitesi ve 0.0836 ünite/mL NADH peroksidaz aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 3.62 ve 3.63).

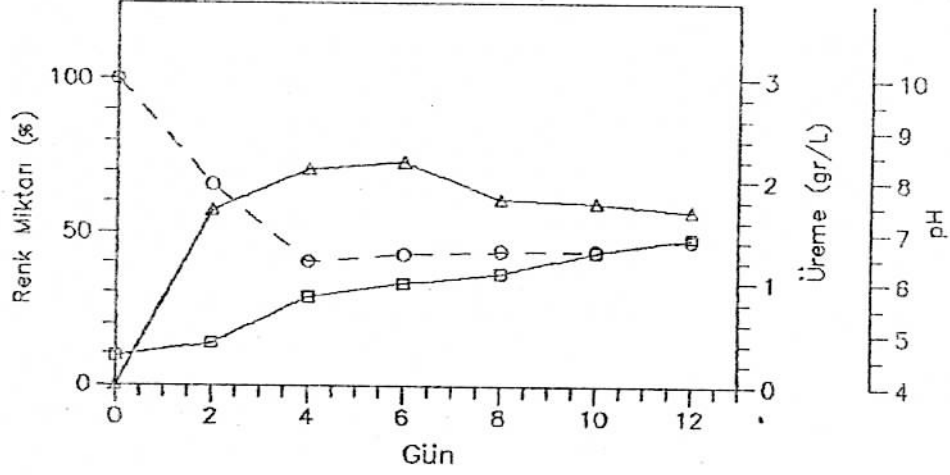


Sekil 3.62 *F.trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları;çalkalama hızı:150 rpm;sıcaklık:30°C;pH:4.5; ekim miktarı:2mL/50mL vinas. O----O Renk Miktarı □-----□ pH Δ-----Δ Üreme

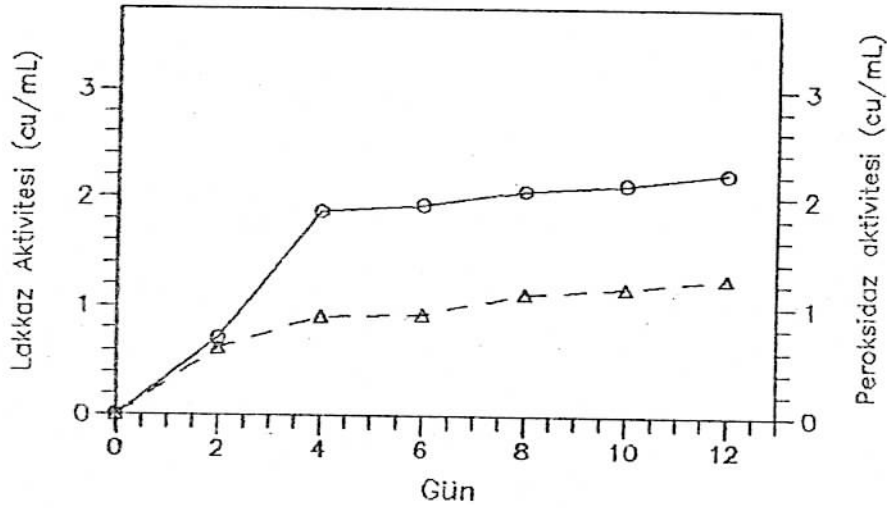


Sekil 3.63 *F.trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları;çalkalama hızı:150 rpm;sıcaklık:30°C;pH:4.5; ekim miktarı:2mL/50mL vinas. O-----O Lakkaz Δ-----Δ Peroksidaz

200 rpm'de kurulan çalışmada ise 4.günde 360.17 renk giderimi ve 2.120 g/L biyokitle elde edilmiştir. Bu günde pH 5.72'e yükselmiştir. Aynı gün için lakkaz aktivitesi 1.87 cu/mL, peroksidaz aktivitesi 0.91 cu/mL olarak elde edilmiştir (Şekil 3.64 ve 3.65).



Şekil 3.64 *F.trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.
Deney koşulları; çalkalama hızı: 200 rpm; sıcaklık: 30°C; pH: 4.5; ekim miktarı: 2mL/50mL vinas.
O---O Renk Miktarı □---□ pH Δ---Δ Üreme

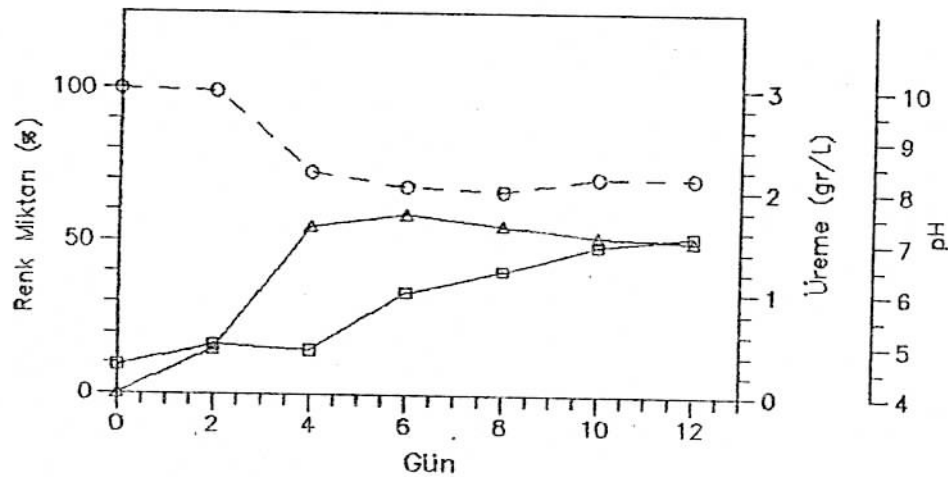


Şekil 3.65 *F.trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.
Deney koşulları; çalkalama hızı: 200 rpm; sıcaklık: 30°C; pH: 4.5; ekim miktarı: 2mL/50mL vinas.
O---O Lakkaz Δ---Δ Peroksidaz

3.4.4 Ekim miktarının etkisi

Optimum pH, sıcaklık ve çalkalama hızı saptandıktan sonra ekim miktarının üreme, enzim aktivitesi, ortam pH'sı ve rengi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla bu çalışma kurulmuştur. Yapılan çalışmada, bölüm 2.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanmış besiyerlerine bölüm 2.5' deki gibi üretilmiş stok *F.trogii* kültürlerinden, homojenizasyon sonrası steril koşullarda 0.1, 0.5, 1, 2 ve 5 mL eklenmiştir. Kültürler 30°C'de 150 rpm'de 12 gün inkübe edilmiştir.

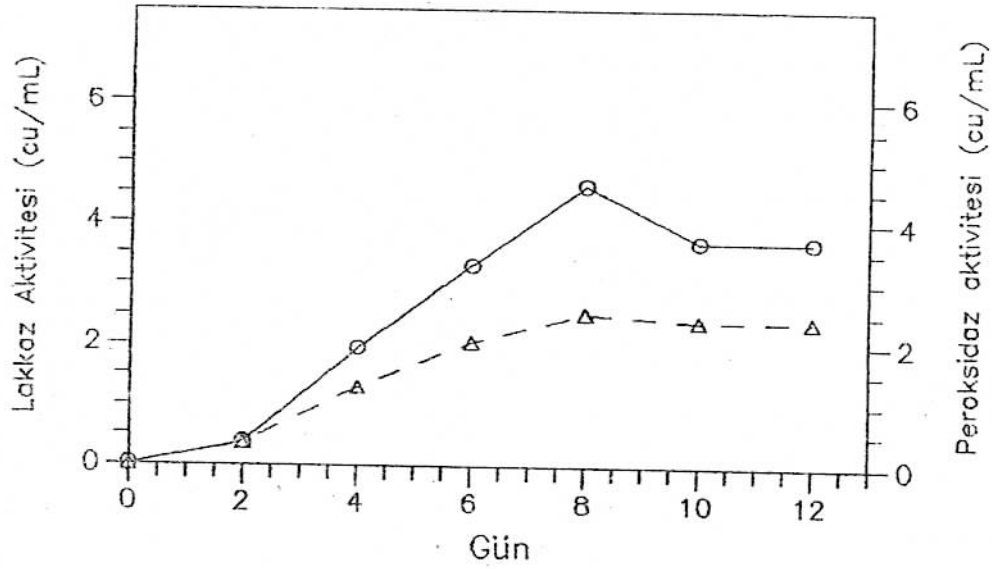
Ekim miktarının 0.1 mL olarak uygulandığı çalışmada en yüksek renk giderimi 8.günde %34.34 olarak gözlenirken biyokitle miktarı 6.günde 1.758 g/L olarak saptanmıştır. 6.günde pH 6.00'ya yükselmiştir. Bu günde lakkaz 2.04 cu/mL, peroksidaz 1.02 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi 0.0493 ünite/mL olarak ölçülmüştür (Şekil 3.66 ve 3.67).



Şekil 3.66 *F.trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.

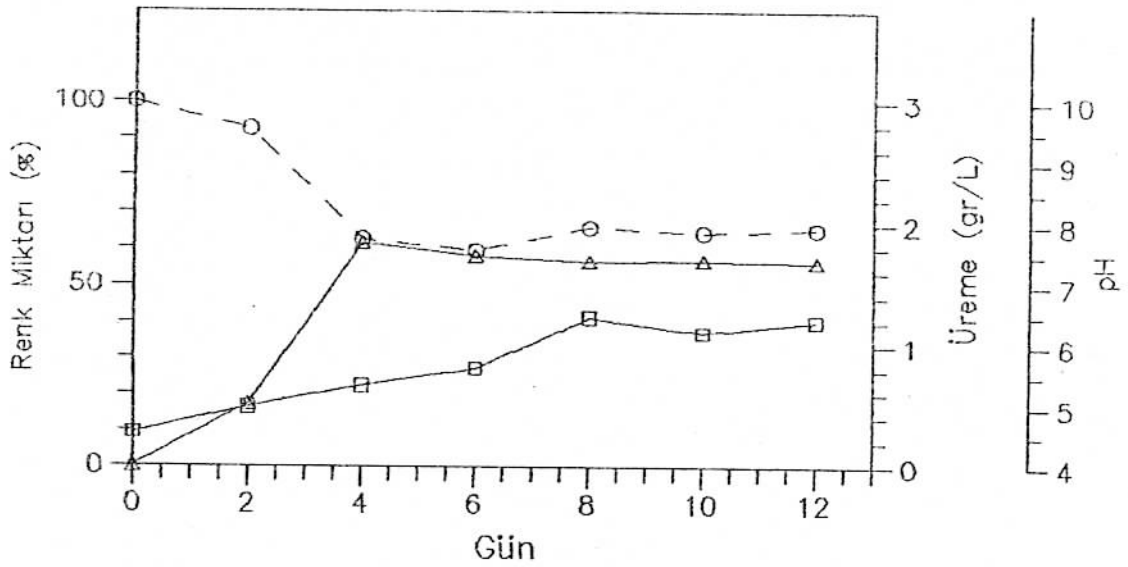
Deney koşulları; ekim miktarı:0.1mL/50mL vinas; çalkalama hızı:150 rpm; sıcaklık:30°C; pH:4.5.

○-----○ Renk Miktarı □——□ pH △——△ Üreme

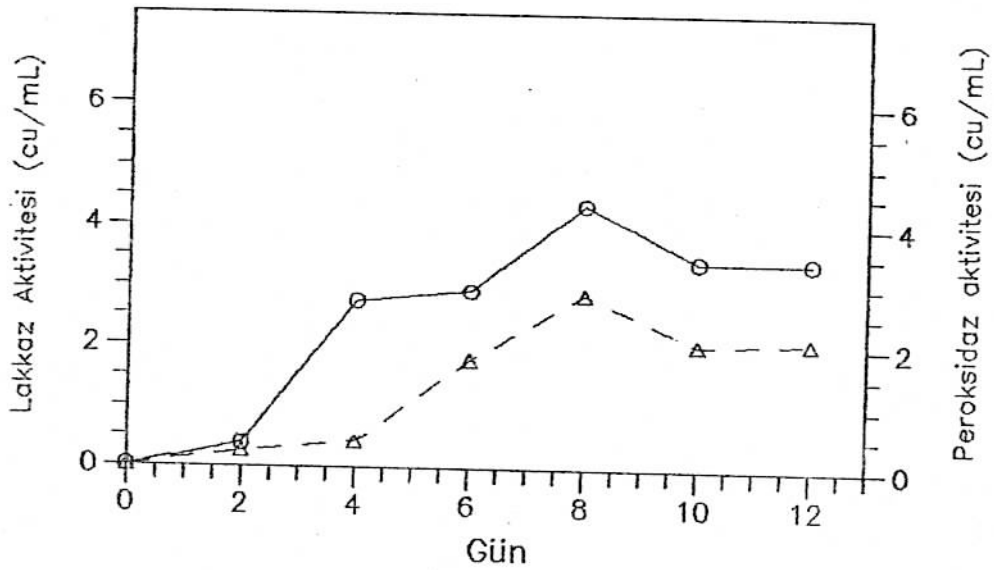


Şekil 3.67 *F.trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitele-
rinin günlere bağlı değişimi.
Deney koşulları; ekim miktarı:0.1mL/50mL vi-
nas; çalkalama hızı:150 rpm; sıcaklık:30°C;
pH:4.5.
○—○ Lakkaz Δ---Δ Peroksidaz

0.5 mL fungus ekilen kültürlerde en yüksek renk gide-
rimi 6.günde, %41.08 olarak gözlenirken, biyokitle miktarı
2.günde 1.846 g/L olarak tesbit edilmiştir. 6. günde pH de-
geri 5.62 , lakkaz 2.91, peroksidaz 1.77 cu/mL ve NADH pe-
roksidaz aktivitesi de 0.0251 ünite/mL değerini vermekte-
dir (Şekil 3.68 ve 3.69).

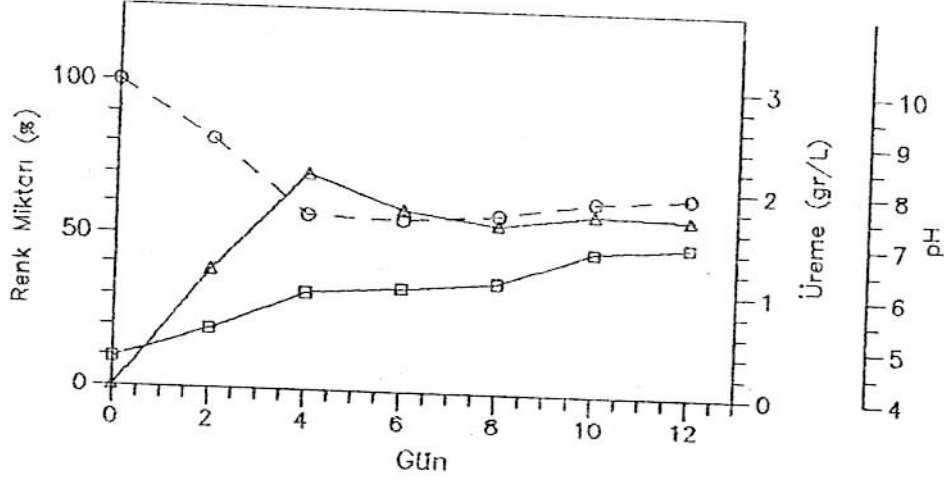


Şekil 3.68 *F. trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.
Deney koşulları; ekim miktarı:0.5mL/50mL vinas; çalkalama hızı:150 rpm; sıcaklık:30°C; pH:4.5.
O---O Renk Miktarı □—□pH △—△ Üreme

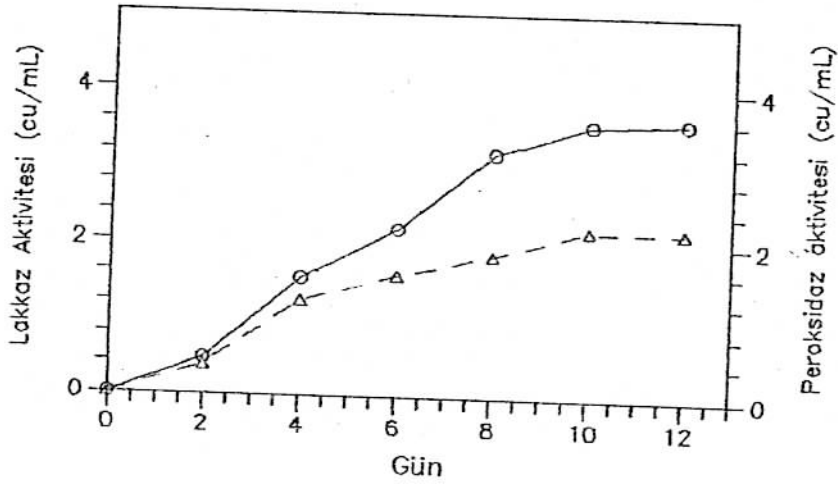


Şekil 3.69 *F. trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.
Deney koşulları; ekim miktarı:0.5mL/50mL vinas; çalkalama hızı:150 rpm; sıcaklık:30°C; pH:4.5.
O—O Lakkaz △---△ Peroksidaz

1 mL ekim yapılan kültürlerde en yüksek renk giderimi 6.günde %43.69 olarak bulunmuştur. Bu koşullarda elde edilen en yüksek biyokitle 2.116 g/L' dir. Bu günde yüksek enzim aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 3.70 ve 3.71).

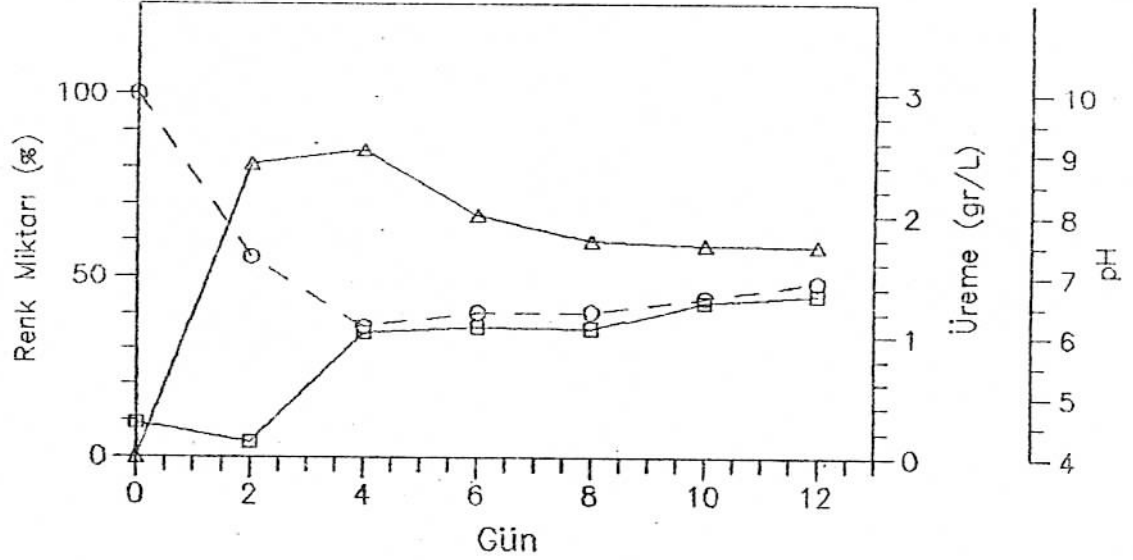


Şekil 3.70 *F.trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları; ekim miktarı:1mL/50mL vinas; çalkalama hızı:150 rpm; sıcaklık:30°C; pH:4.5. O----O Renk Miktarı □——□ pH Δ——Δ Üreme

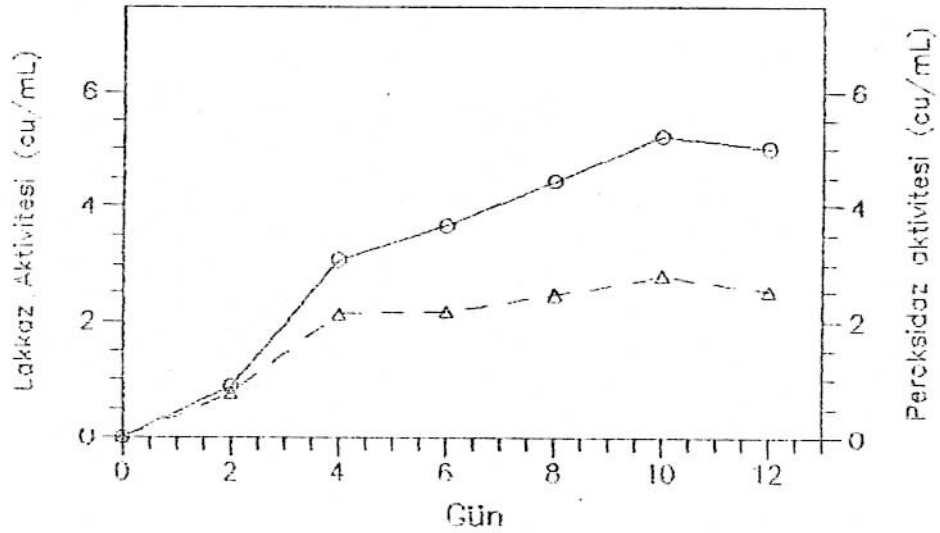


Şekil 3.71 *F.trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivite-lerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları; ekim miktarı:1mL/50mL vinas; çalkalama hızı:150 rpm; sıcaklık:30°C; pH:4.5. O——O Lakkaz Δ----Δ Peroksidaz

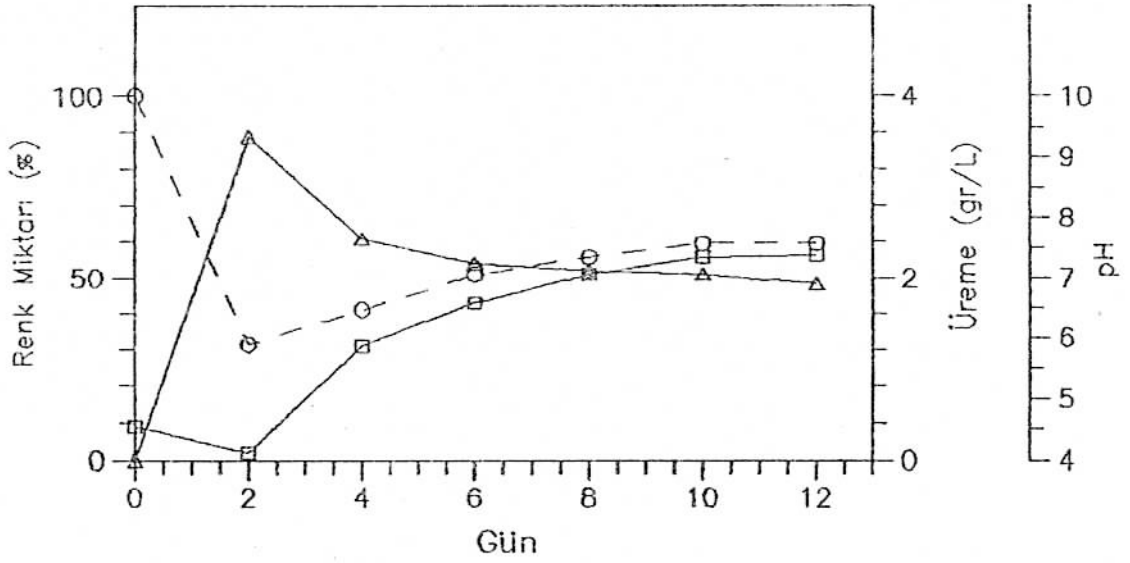
2 mL ekim yapılan kültürlerde 6.günde renk giderimi %62.16 ve biyokitle miktarı da 2.544 g/L iken 5 mL ekim yapılan çalışmalarda 3.548 g/L biyokitle ve %68.47 renk giderimi gözlenmiştir; Yüksek enzim değerleri de saptanmıştır (Şekil 3.72, 3.73, 3.74 ve 3.75).



Şekil 3.72 *F.trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları; ekim miktarı:2mL/50mL vinas; çalkalama hızı:150 rpm;sıcaklık:30°C; pH:4.5. O----O Renk Miktarı □——□ pH Δ——ΔÜreme

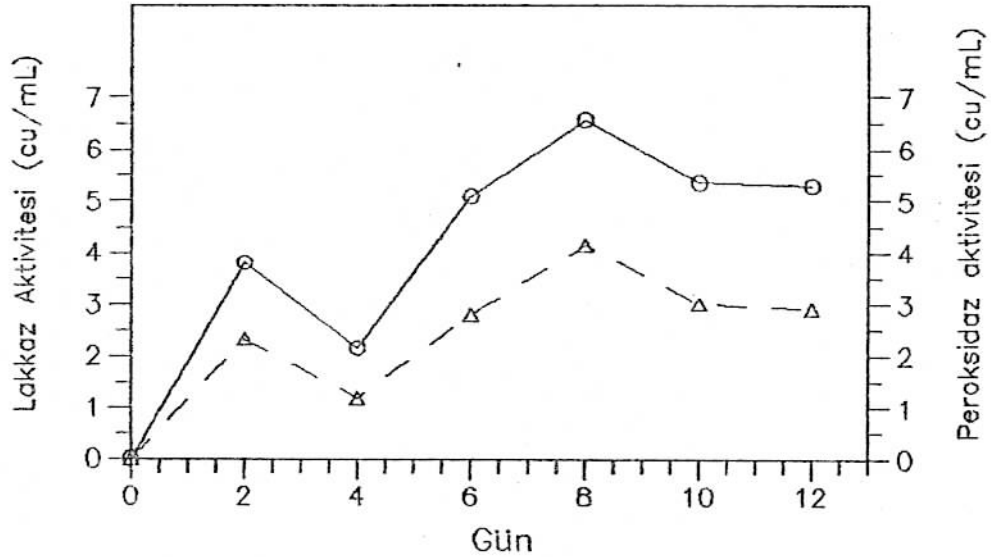


Şekil 3.73 *F.trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi. Deney koşulları; ekim miktarı:2mL/50mL vinas; çalkalama hızı:150 rpm;sıcaklık:30°C; pH:4.5. O——O Lakkaz Δ----Δ Peroksidaz



Şekil 3.74 *F.trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi.

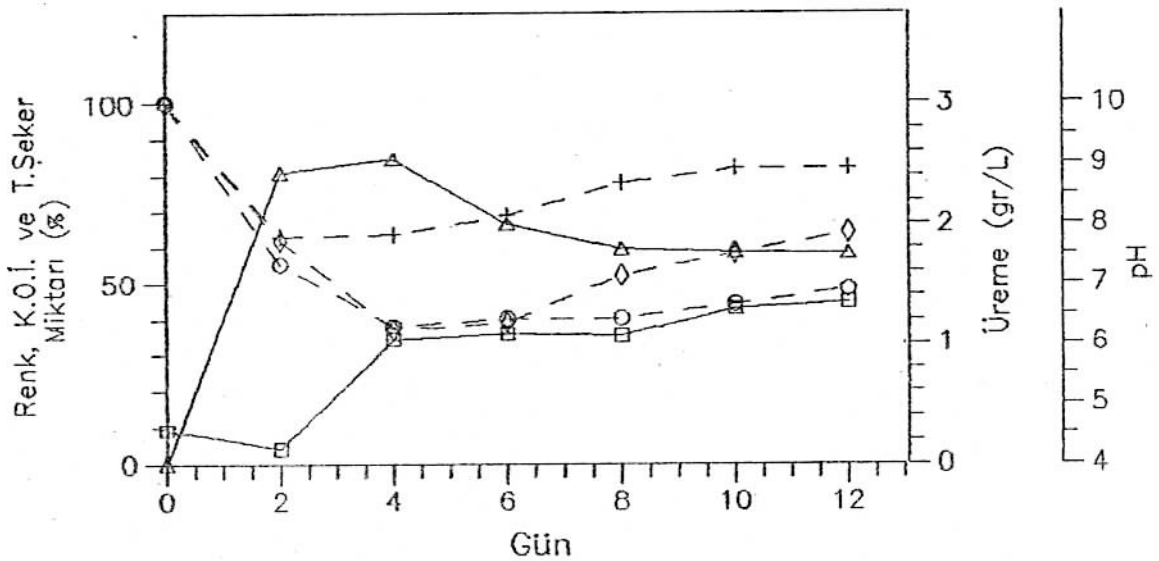
Deney koşulları; ekim miktarı:5mL/50mL vinas; çalkalama hızı:150 rpm;sıcaklık:30°C; pH:4.5.
 O---O Renk Miktarı □——□ pH Δ——Δ Üreme



Şekil 3.75 *F.trogii*'nin lakkaz ve peroksidaz aktivitelerinin günlere bağlı değişimi.

Deney koşulları; ekim miktarı:5mL/50mL vinas; çalkalama hızı:150 rpm;sıcaklık:30°C; pH:4.5.
 O——O Lakkaz Δ---Δ Peroksidaz

Optimum şartlar ortaya konduktan sonra *F.trogii* ile kurulan çalışmada pH, renk, kimyasal oksijen istemi (KOl), toplam şeker, biyokitle ve enzim değişimleri 30°C pH 4.5, 150 rpm ve 2 mL ekim miktarı koşullarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda %37.18 KOl, %63.22 toplam şeker ve %62.16 renk giderimi saptanırken, 2.544 g/L biyokitle elde edilmiştir (Şekil 3.76 ve Tablo 3.3).



Şekil 3.76 *F.trogii*'nin vinas ortamında üretimi sırasında pH, renk, KOl, toplam şeker ve biyokitle değişimi.

Deney koşulları; sıcaklık: 30°C; pH: 4.5; çalkalama hızı: 150 rpm; ekim miktarı: 2 mL/50 mL vinas.

O---O Renk Miktarı □---□ pH Δ---Δ Üreme
+---+ KOl ◇---◇ Toplam Şeker

Tablo 3.3 *F.trogii*'nin optimum kosullarda vinas besiyerinde üretimi sırasında pH, renk, KOI, toplam şeker, biyokitle ve enzim aktivitesi değişimleri

| Gün | 1* | 2* | 3* | 4* | 5* | 6* | 7* | 8* | 9* |
|-----|------|-------|------|------|------|------|------|--------|-------|
| 0 | 4.56 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 4.25 | 45.21 | 37.2 | 38.7 | 0.88 | 0.76 | 0.17 | 0.0082 | 2.432 |
| 4 | 6.07 | 62.16 | 36.7 | 63.2 | 3.08 | 2.13 | 1.73 | 0.0770 | 2.544 |
| 6 | 6.15 | 60.12 | 31.6 | 61.2 | 3.66 | 2.17 | 0.89 | 0.0430 | 2.006 |
| 8 | 6.13 | 60.00 | 22.7 | 48.3 | 4.44 | 2.46 | 0.83 | 0.0400 | 1.792 |
| 10 | 6.58 | 56.26 | 18.7 | 42.2 | 5.22 | 2.79 | 0.64 | 0.0300 | 1.760 |
| 12 | 6.69 | 52.18 | 18.7 | 36.4 | 5.01 | 2.52 | 0.64 | 0.0300 | 1.751 |

*1: pH

*2: Renk giderimi (%)

*3: KOI azalışı (%)

*4: Toplam şeker azalışı (%)

*5: Lakkaz aktivitesi (cu/mL)

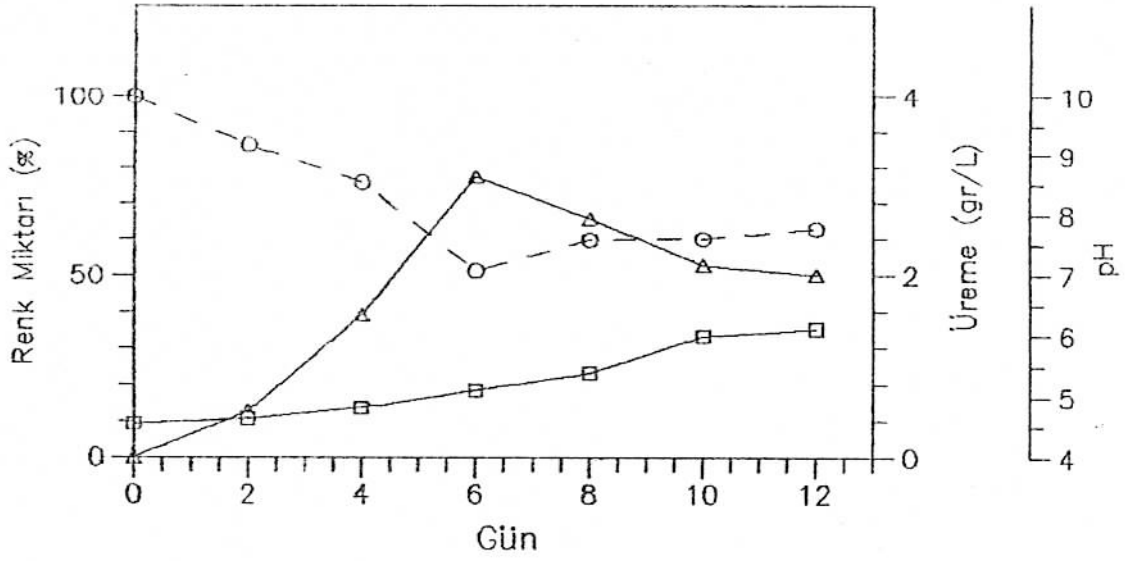
*6: Peroksidaz aktivitesi (cu/mL)

*7: NADH peroksidaz aktivitesi (nkatal/mL)

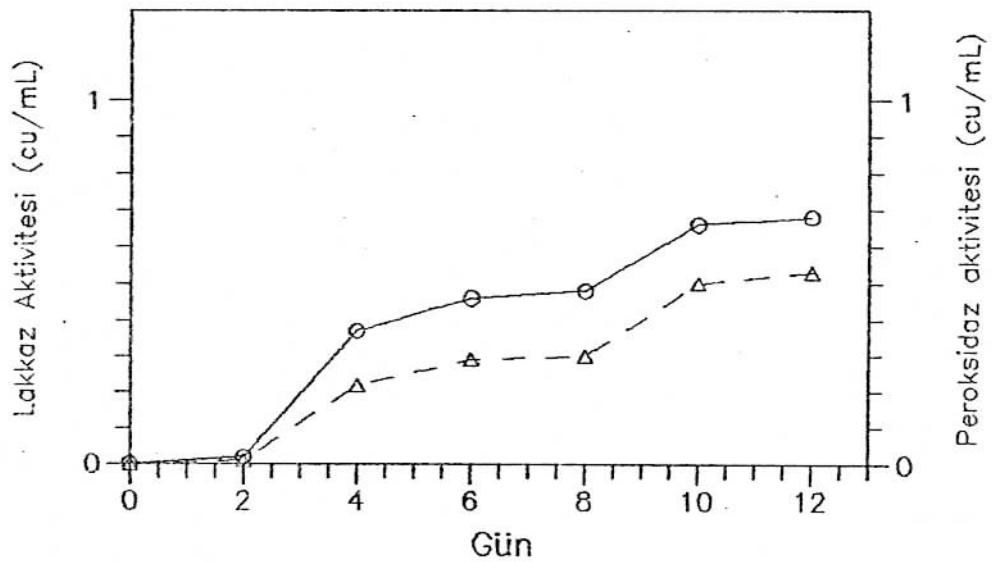
*8: NADH peroksidaz aktivitesi (ünite/mL)

*9: Biyokitle miktarı (g/L)

F.trogii optimum şartlarda statik olarak da üretilmiş ve bu koşullar altında pH, renk, biyokitle ve enzim aktivite değişimleri saptanmıştır. Statik inkübasyon sırasında en yüksek renk giderimi 6.günde %48.73 olarak saptanırken, biyokitle miktarı 3.088 g/L olarak bulunmuştur. Bu günde lakkaz 0.46 cu/mL, peroksidaz 0.29 cu/mL ve NADH peroksidaz aktivitesi de 0.0135 ünite/mL olarak gözlenmiştir. Aynı günde pH 4.56'dan 5.11'e yükselmiştir (Şekil 3.77 ve 3.78).



Şekil 3.77 *F.trogii*'nin optimum koşullarda vinas ortamında statik olarak üretimi sırasında pH, renk ve biyokitle değişimi. Deney koşulları; sıcaklık:30°C; pH:4.5; ekim miktarı:2mL/50mL vinas. O-----O Renk Miktarı □-----□ pH Δ-----Δ Üreme



Şekil 3.78 *F.trogii*'nin optimum koşullarda statik olarak üretimi sırasında lakkaz ve peroksidaz aktiviteleri. Deney koşulları; sıcaklık:30°C; pH:4.5; ekim miktarı:2mL/50mL vinas. O-----O Lakkaz Δ-----Δ Peroksidaz

3.5 Immobilize Hücrelerin Vinas Renk ve pH'sına Etkisi

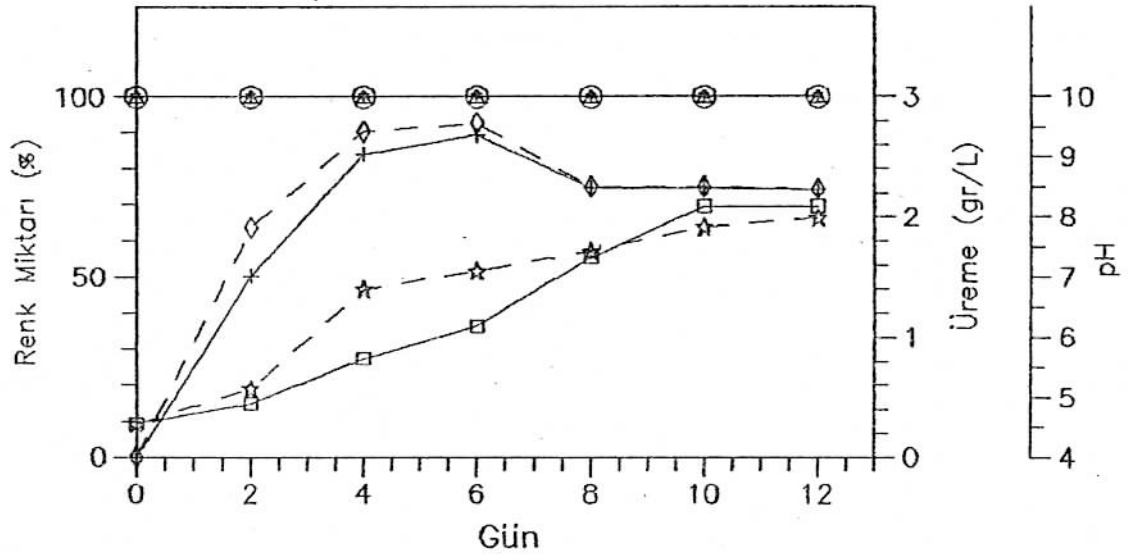
Tutuklamanın vinas renginin giderimi ve pH üzerine etkisinin saptanması amacı ile kurulan çalışmada , *C.versicolor* ve *F.trogii* Na aljinat ile tutuklandıktan sonra 50 ml'lik vinas ortamlarına steril koşullarda tutuklanmış hücre ünitelerinden (birimlerinden) 20 ve 50 şer adet eklenmiştir. Değişik miktarlarda eklenen tutuklanmış hücrelerin vinas renk ve pH'sına etkisi 12 gün süresince izlenmiştir. Tutuklanmış *C.versicolor* birimlerinden 20 adet eklenen çalışmada en yüksek renk giderimi %63.93 ile 8.günde saptanırken 50 adet tutuklanmış *C.versicolor* üniteleri eklenen çalışmada 8.günde %68.32 renk giderimi gözlenmiştir. 8.günde 20 ve 50 adet için pH değerleri 5.18 ve 5.10 değerlerine yükselmiştir (Şekil 3.79).

Tutuklanmış *F.trogii* ile yapılan çalışmada ise 20 adet eklenen çalışmada %52.18 ve 50 adet eklenen çalışmada ise %59.58 renk giderimi ölçülmüştür. Bu günde pH değerleri sırası ile 4.89 ve 4.91 dir. Sonuçlar şekil 3.80'de verilmiştir.

3.6 *Phanerochaete chrysosporium*' un Vinas Ortamında İn- kübasyonu Sırasında Ortam Renginin Giderimi ve Bi- yokitle Değişimi

Çalışma sırasında *P.chrysosporium* 40°C de pH 4.5 da inkübe edilmiş ve 12 gün süresince pH, renk ve biyokitle değişimi saptanmıştır. Statik inkübasyon koşullarında 2.680 g/L biyokitle elde edilirken çalkalamalı koşullarda 2.782 g/L biyokitle miktarına ulaşılmıştır.

P.chrysosporium'un inkübasyonu sırasında herhangi bir renk giderimi saptanamamıştır (Şekil 3.81). Sonuç olarak *P.chrysosporium*'un renk giderim aktivitesine sahip olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 3.81 *P.chrysosporium*'un vinas ortamında inkübasyonu sırasında üreme, pH ve renk değişimi.
Deney koşulları; sıcaklık:40°C; pH:4.5; ekim miktarı:2mL/50mL vinas.
○—○ Renk (st.) □—□ pH(st.) +—+ Üreme(st.)
△—△ Renk (ça.) ★---★ pH(ça.) ◇--◇ Üreme(ça.)

3.7 Hücresel Protein Miktarının Saptanması

Vinas ortamında inkübe edilen fungusların, üretim sonrasında protein yüzdeleri saptanmıştır. Elde edilen değerler Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.4 Fungusların protein yüzdeleri

| Fungus | Protein (%) |
|------------------------------------|-------------|
| <i>Funalia trogii</i> | 27.62 |
| <i>Coriolus versicolor</i> | 28.18 |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | 21.13 |

3.8 Hidrojen Peroksitin (H_2O_2) Vinas Ortamının pH'sı ve Renk Giderimi Üzerine Etkisi

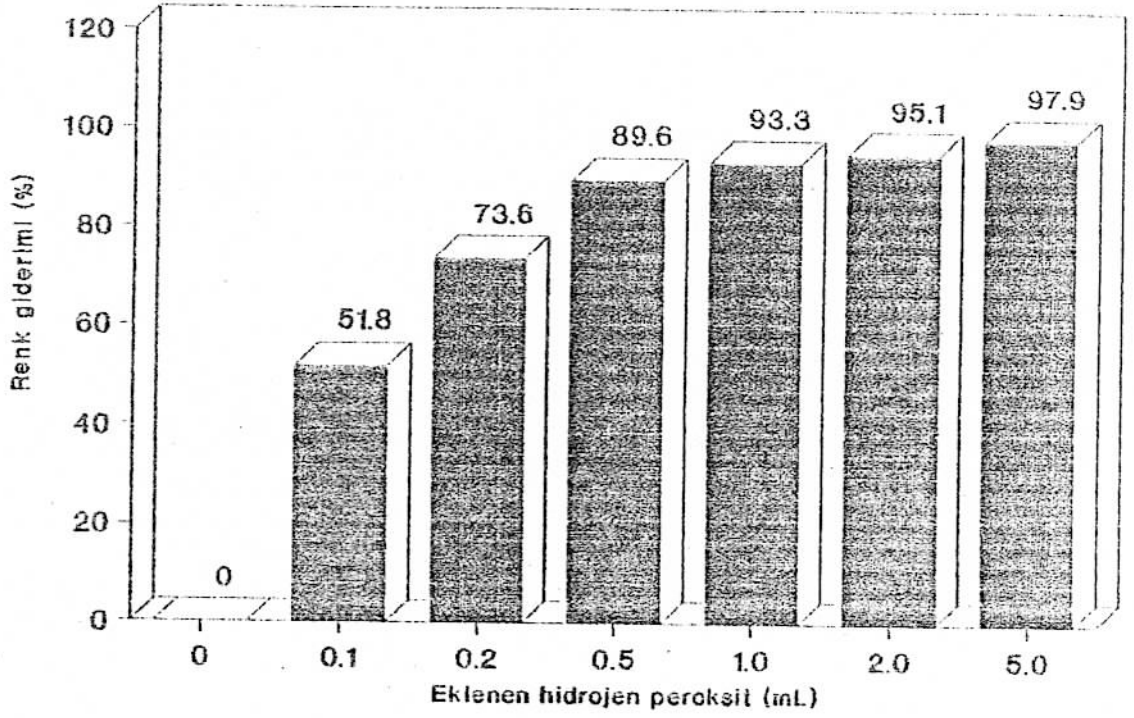
Vinas renginin giderimi üzerine H_2O_2 nin etkisinin olup olmadığının saptanması amacıyla yapılan bu çalışmada 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 ve 5 mL %37'lik H_2O_2 eklenen ortamlarda deneyler yürütülmüştür. Çalışma sonuçları Şekil 3.82, Tablo 3.5 ve 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.5 Farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 eklenmiş vinas ortamlarında renk değişimi

| GÜN | Hidrojen Peroksit Miktarı | | | | | |
|-----|---------------------------|------|------|------|------|------|
| | 0.1 | 0.2 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 5.0 |
| | Renk Değişimi (%) | | | | | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 35.2 | 43.8 | 50.8 | 59.0 | 70.6 | 80.5 |
| 2 | 43.6 | 56.8 | 70.5 | 76.5 | 83.4 | 88.4 |
| 3 | 46.8 | 59.6 | 73.4 | 79.3 | 85.0 | 90.0 |
| 4 | 50.4 | 66.3 | 79.7 | 85.0 | 87.9 | 90.3 |
| 5 | 51.2 | 70.0 | 83.4 | 88.4 | 92.1 | 95.0 |
| 6 | 51.8 | 71.5 | 84.5 | 90.5 | 93.3 | 96.3 |
| 7 | 50.8 | 72.7 | 86.5 | 91.8 | 94.5 | 97.7 |
| 8 | 49.4 | 73.6 | 87.4 | 92.3 | 95.1 | 97.7 |
| 9 | 46.0 | 73 | 87.4 | 92.4 | 95.1 | 97.9 |
| 10 | 34.2 | 70 | 89.6 | 93.3 | 95.1 | 97.9 |

Tablo 3.6 Farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 eklenmiş vinas ortamlarında pH değışimi

| GÜN | Hidrojen Peroksit Miktarı | | | | | |
|-----|---------------------------|------|------|------|------|------|
| | 0.1 | 0.2 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 5.0 |
| | pH Değişimi | | | | | |
| 0 | 4.45 | 4.45 | 4.45 | 4.45 | 4.45 | 4.45 |
| 1 | 4.48 | 4.51 | 4.44 | 4.38 | 4.32 | 4.21 |
| 2 | 4.48 | 4.50 | 4.43 | 4.37 | 4.31 | 4.22 |
| 3 | 4.43 | 4.43 | 4.38 | 4.30 | 4.24 | 4.13 |
| 4 | 4.37 | 4.37 | 4.29 | 4.24 | 4.18 | 4.06 |
| 5 | 4.38 | 4.38 | 4.29 | 4.24 | 4.18 | 4.06 |
| 6 | 4.35 | 4.35 | 4.26 | 4.21 | 4.15 | 3.99 |
| 7 | 4.36 | 4.29 | 4.24 | 4.19 | 4.10 | 3.94 |
| 8 | 4.28 | 4.20 | 4.16 | 4.09 | 3.99 | 3.89 |
| 9 | 4.30 | 4.23 | 4.13 | 4.06 | 3.97 | 3.89 |
| 10 | 4.26 | 4.17 | 4.04 | 3.96 | 3.97 | 3.89 |



Şekil 3.82 Farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında vinas renginin giderimi.
Deney koşulları; sıcaklık $30^\circ C$; pH:4.5; çalkalama hızı: 150 rpm.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada alkol fabrikası atığı vinasın renginin giderimi, arıtımı, değerlendirilmesi, beyaz çürükçül fungusların (özellikle ülkemizde yetişen *C.versicolor* ve *F.trogii*) bu süreçte kullanılabilirliğinin araştırılması, oksidasyondan sorumlu bazı ekstrasellüler enzimlerin sentezlenip sentezlenemediğinin araştırılması ve bu enzimlerin kirlilik problemine yol açan vinas renginin gideriminde rolünün olup olamayacağının tartışılması amaçlanmıştır.

Çalışmamız süresince yüksek enzim kapasitesine sahip olan beyaz çürükçül funguslar kullanılmıştır. Kullanılan funguslardan ikisi Malatya ve Adana bölgelerinden toplanmış ve sistematığı yapıldıktan sonra laboratuvarımızda kültüre alınmıştır.

Çalışmamızda bu fungusların kullanılmasının nedeni;

- 1- Yüksek enzim kapasitesine sahip olmaları,
- 2- Ülkemizden kolaylıkla elde edilebilmeleri,
- 3- Hayvan yemi olarak kullanılabilmeledir.

Her üç fungus da *Basidiomycetes* sınıfına dahil olan funguslardır. Yukarıda belirttiğimiz gibi yüksek enzim kapasitesine sahip olmaları bu gibi degradasyon sistemlerinde kullanılma olasılıklarını artırmaktadır.

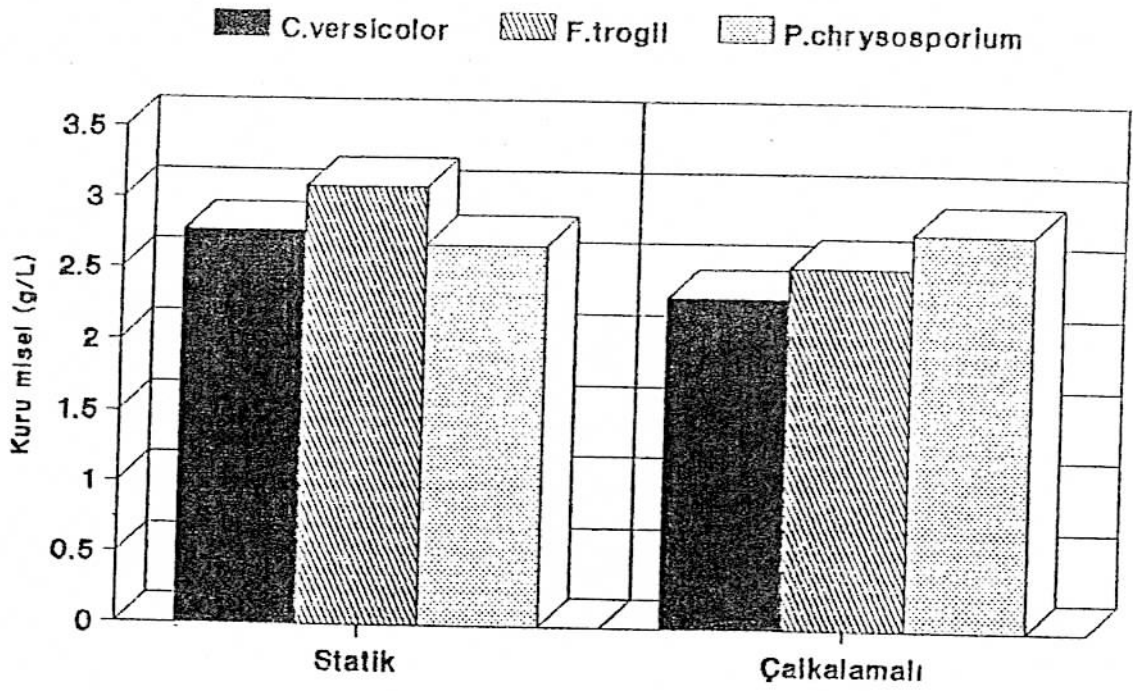
Çalışmanın ilk kısmında vinasın içeriği saptanmıştır (Tablo 3.1). Çalışma sonucu elde edilen değerler genelde literatür verileri ile uygunluk göstermişse de bazı farklılıklarda gözlenmiştir (Algur ve Gökalp 1991; Cardoso ve Nicoli 1981; Pena vd. 1986). Çalışmamız sırasında elde edilen bu değerlerle literatür verileri arasındaki farklar

fabrikaların bulunduğu yörelerden, melasın işleme kalitesinden, maya verimliliğinden ve üretim sistemlerindeki farklılıktan ileri gelebilir. İşletmede kullanılan melas, maya ve üretim sistemlerine bağlı olarak vinasın içeriğinin de değişebileceği kabul edilmektedir (Taygun 1984).

Çalışmamız süresince pH, sıcaklık, çalkalama ve ekim miktarlarının, fungusun üremesi ve kirlilik problemi yarattığı belirtilen vinasın rengi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

pH'nın etkisinin araştırılması için kurulan çalışmada *C.versicolor* ve *F.trogii* için en uygun pH aralığı 4.5 olarak saptanmıştır. Bu pH aralığında *C.versicolor* için 2.326 g/L kuru misel elde edilirken *F.trogii* ile 2.544 g/L kuru misel değerine ulaşılmıştır. Statik olarak kurulan çalışmada ise bu değerler sırası ile 2.770 g/L ve 3.088 g/L değerlerinde saptanmıştır. *P.chryso sporium* ile yürütülen çalışmalarda ise çalkalamalı koşullarda 2.782 g/L ve statik koşullarda 2.680 g/L kuru misel elde edilmiştir (Şekil 4.1). Değerlerin literatür verileri ile farklılık gösterdiği gözlenmiştir (Cardoso ve Nicoli 1981; Yazıcıoğlu vd. 1980). Verilerimiz daha önce rapor edilmiş sonuçlarla karşılaştırıldığında gözlenen bu farklılığın ekilen fungus miktarının, türünün, çalışmada kullanılan fungusların izole edildiği doğal ortamların, vinasın içeriğinin, vinası sulandırma oranının ve vinası katılan maddelerin farklı olmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Çalışmamız sırasında vinası hiçbir katkı maddesi eklenmemiştir.

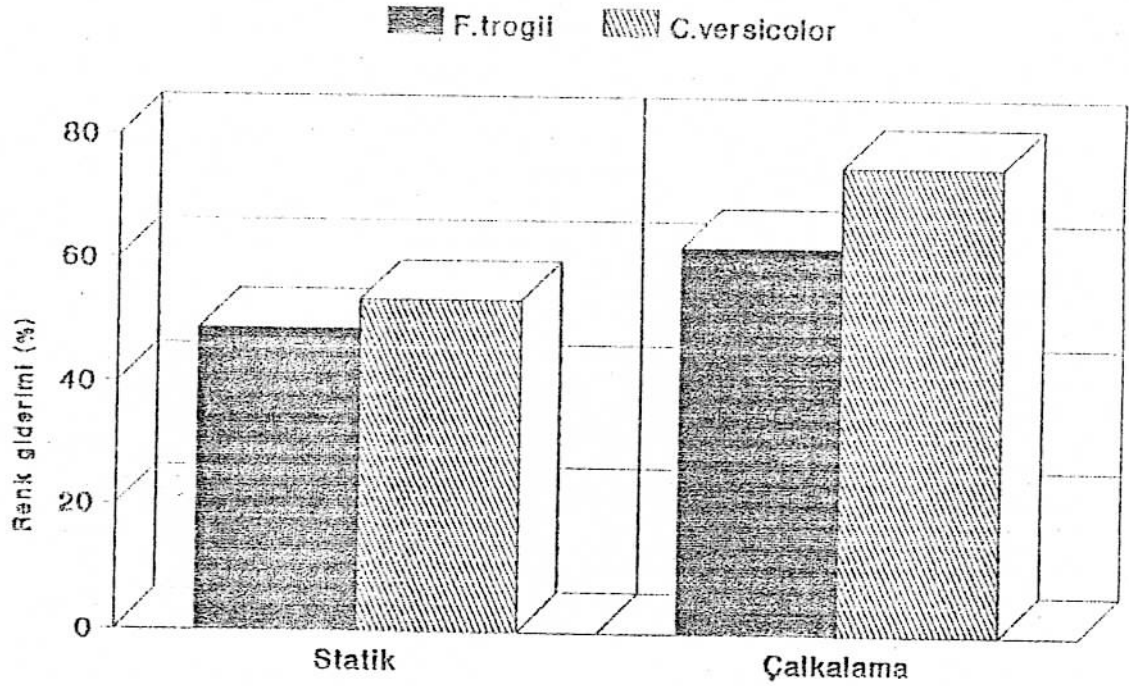
C.versicolor ve *F.trogii* ile yapılan çalışmalarda statik koşullarda çalkalamalı koşullara göre daha fazla kuru misel elde edilirken, *P.chryso sporium* için bunun tam



Şekil 4.1 Statik ve çalkalamalı koşullarda üretilen *C.versicolor*, *F.trogii* ve *P.chrysosporium*'un maksimum kuru misel değerlerinin karşılaştırılması.

tersi bir sonuç elde edilmiştir.

Yine 4.5 pH aralığında kurulan çalkalamalı üretim koşullarında *C.versicolor* için %75.32 renk giderimi gözlenirken *F.trogii* için %62.16 renk giderimi gözlenmiştir. Statik koşullarda ise bu değerler %53.40 ve %48.73 olarak saptanmıştır (Şekil 4.2).

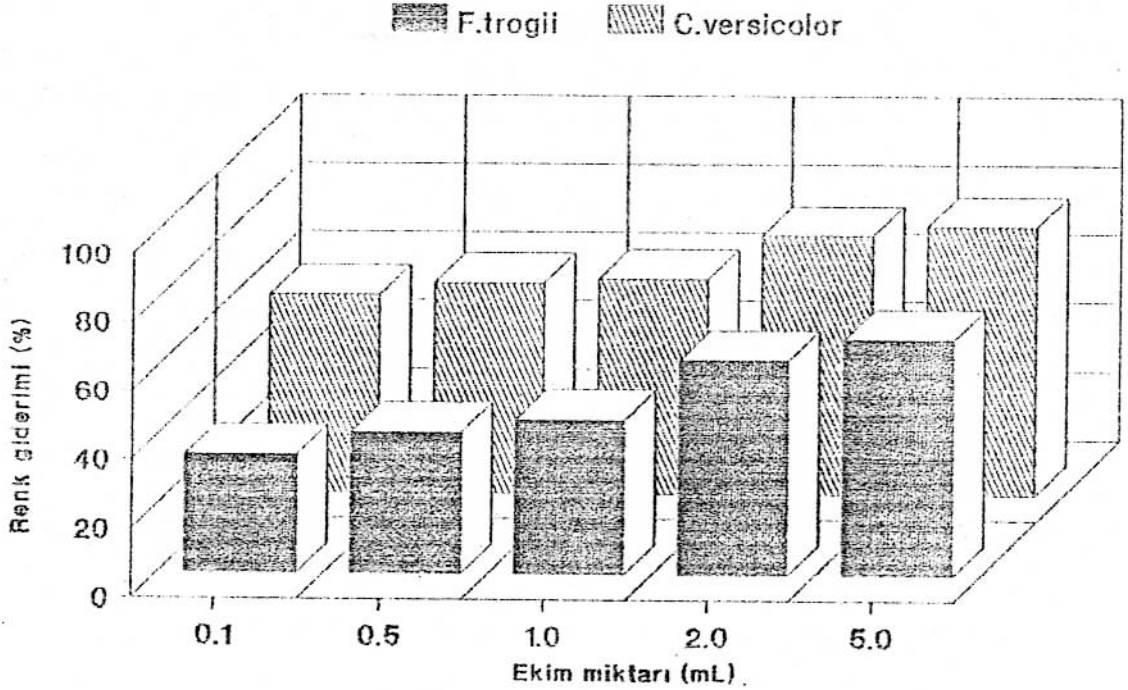


Sekil 4.2 Statik ve çalkalamalı koşullarda üretilen *C.versicolor* ve *F.trogii*'nin, maksimum renk gideriminin karşılaştırılması.

P.chrysosporium ile kurulan çalışmalarda ise herhangi bir renk giderimi gözlenememiştir. *P.chrysosporium* ile benzer sonuçlar rapor edilmiştir (Blondeau 1989).

Ohmomo vd. 1988, vinasın renginin giderimi için anaerobik mikroorganizmalarla yaptıkları çalışmada %28 renk giderimine ulaşıldığını rapor etmişlerdir. Yine Ohmomo vd. 1985a, *C.versicolor* Ps4a ile yaptıkları çalışmada %75 renk giderimine ulaşıldığını fakat bunun sağlanması için %0.5 glukoz, %0.05 pepton ve yüksek oranda fungus ekilmesinin gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamız sırasında vinası herhangi bir madde eklenmemiş olup ayrıca, düşük oranda fungus ekimi yapılmıştır. Yaptığımız çalışmada ekim miktarının renk giderimini artırdığı da saptanmıştır.

Örneğin optimum koşullarda 5 mL fungus süspansiyonu eklendiği zaman *C.versicolor* ile renk giderimi %78.10'a *F.trogii* ile %68.47'e yükselmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Ekim miktarına bağlı olarak fungusların oluşturduğu maksimum renk gideriminin karşılaştırılması.

Ohmomo vd. 1985a, ekim miktarına bağlı olarak renk gideriminin arttığını fakat, çok yüksek ekim miktarlarının (1.7 gr/100 mL) uygulandığı çalışmalarda yüksek oranda çözülmüş oksijen gerekeceğinden renk gideriminin azalacağını bildirmektedirler.

Bunun yanısıra çalışmamızda ekim miktarına bağlı olarak ortamda oluşan biyokitle değerleri de artmaktadır. Çalışmamızda *C.versicolor* için 3.312 g/L ve *F.trogii* için 3.548 g/L biyokitle değerlerine ulaşılmıştır (Şekil 3.35 ve Şekil 3.74).

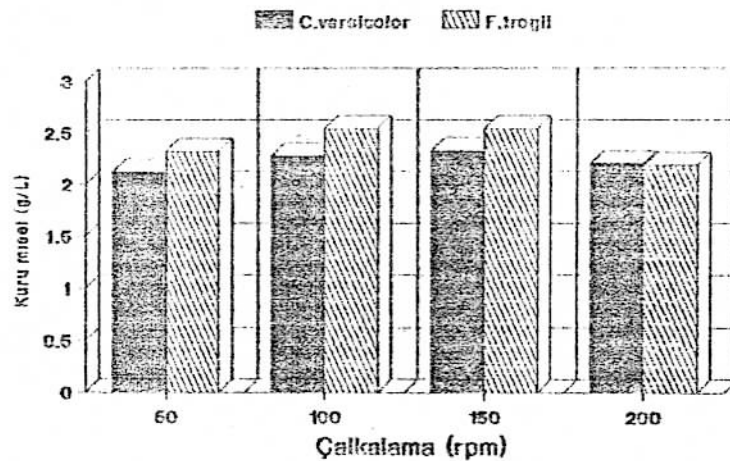
Sirianuntapiboon vd. 1988, zenginleştirilmiş vinas ortamında yaptıkları bir çalışmada *C.versicolor* ile %50

renk giderimine ulaştıklarını bildirmişlerdir.

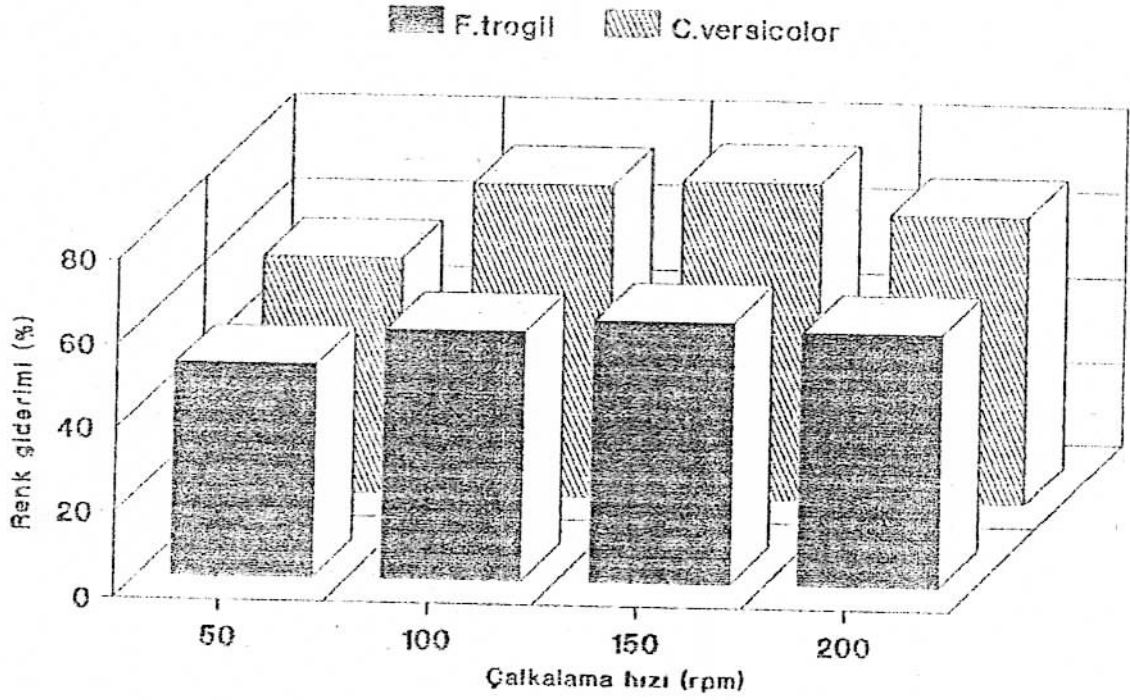
Çalışmamız sonucunda, hem *C.versicolor* ve hem de *F.trogii* için optimum pH 4.5 olarak saptanırken sıcaklık 30°C ve çalkalama hızı 150 rpm olarak saptanmıştır (Tablo 3.2 ve Tablo 3.3).

Çalkalama hızı artışında 150 rpm'e kadar biyokitle miktarı üzerinde pozitif bir etki gözlenirken 200 rpm'de biyokitle miktarı tekrar düşmeye başlamıştır (Şekil 4.4). Bunun nedeni, 150 rpm üzerinde (200 rpm) misellerin parçalanması olabilir (Martin 1983; Totti ve Nicoli 1983).

Çalkalama aerasyonu(oksijen transferini) artırmakta ve 150 rpm fungusların aktivitesi için yeterli oksijen transferini sağlamaktadır. 200 rpm'de renk gideriminde de bir düşme gözlenmektedir (Şekil 4.5). Çalışmalarda çalkalama hızınının 100 rpm'den daha fazla olmasının yüksek renk giderimi için gerekli olduğu bildirilmektedirler (Ohmomo vd. 1985 a).



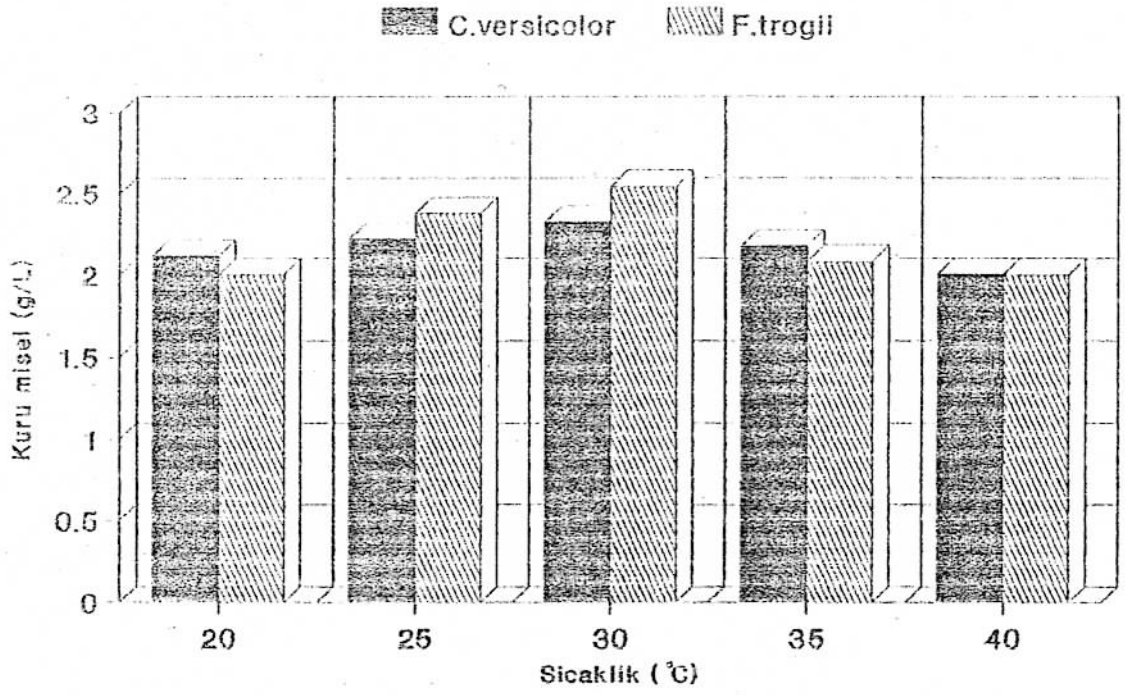
Şekil 4.4 Çalkalama hızına bağlı olarak *C.versicolor* ve *F.trogii*'nin maksimum kuru misel değerlerinin karşılaştırılması.



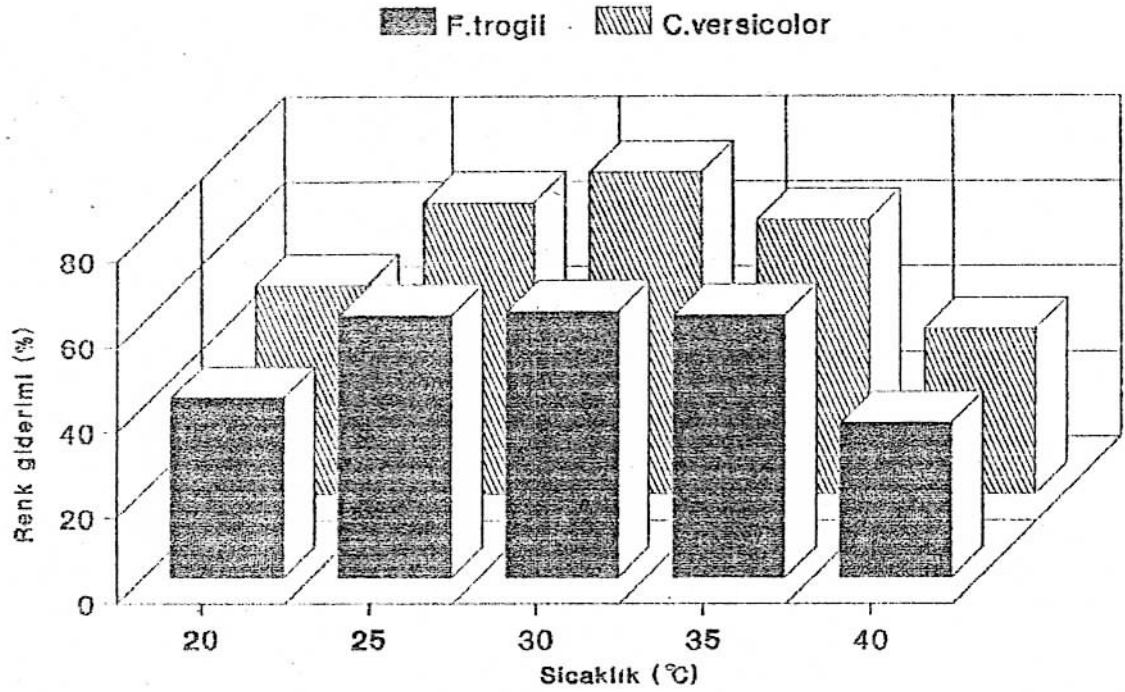
Şekil 4.5 Çalkalama hızına bağlı olarak *C.versicolor* ve *F.trogii* tarafından oluşturulan maksimum renk gideriminin karşılaştırılması.

C.versicolor ve *F.trogii* değişik pH'larda gösterdikleri fizyolojik özelliklere benzer olarak, 20°C dan 40°C' ta kadar olan geniş sıcaklık aralığında da yüksek adaptasyon özelliği göstermişlerdir. *C.versicolor* ile farklı ortamlarda yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar rapor edilmiştir (Sandhu ve Arora 1985). Fungusların 20-35°C sıcaklıklarda rahatlıkla üreyebildikleri bilinmektedir (Berry 1988; Litchfield 1968). Odun patojeni olan bu fungusların çok farklı ortamlara adaptasyonları önemlidir.

Araştırmamızda 30°C üzerinde renk giderimi ve üremenin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



Şekil 4.6 Farklı sıcaklıklarda *C.versicolor* ve *F.trogii* ile elde edilen maksimum kuru misel değerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.7 Farklı sıcaklıklarda *C.versicolor* ve *F.trogii* ile elde edilen maksimum renk gideriminin karşılaştırılması.

iki tür beyaz çürükçül fungus ile elde ettiğimiz optimum değerler, diğer beyaz çürükçül funguslarla, farklı ortamlarda yapılan çalışmalarda kullanılan değerlerle uygunluk göstermektedir (Gök 1985; Ünyayar 1988; Yeşilada 1988; Topaktaş ve Kolankaya 1991).

Araştırmamız sırasında *C.versicolor* ile daha yüksek renk giderimi saptanırken *F.trogii* ile daha yüksek kuru misel ağırlığı elde edilmiştir. Bununla birlikte, *C.versicolor* ile daha yüksek KOİ ve toplam şeker azalımı saptanmıştır (Tablo 3.2).

Deneylerimiz sırasında pH'nın yükseldiği de gözlenmiştir. Bunun nedeni, vinas içerisindeki protein ve amino asitlerin fungusun aktivitesi sonucu parçalanması ve amonyak çıkışı sonucunda ortam pH'sının bazikleşmesidir. Çalışmalarımız sırasında ortam pH'nın 7 - 8.5 değerlerine ulaştığı saptanmıştır (Şekil 3.7 ve Şekil 3.56). Benzer çalışmalarda da üreme sonucunda pH'nın yükseldiği rapor edilmektedir (Pena vd. 1986; Sant'Anna vd. 1986).

Çalışmamızın ilk günlerinde yüksek KOİ ve toplam şeker azalımı gözlenirken ilerleyen günlerde, özellikle fungus hücrelerinin otolizinin gözleendiği günlerde, KOİ ve toplam şeker değerlerinin yeniden arttığı gözlenmiştir. Ortamlardaki hücrelerin otolizini buna neden olabilir ki, bu günlerde hücre otolizi de artmaktadır. Algur ve Gökalp 1991, vinas ortamında yaptıkları çalışmada BOİ değerlerinde bizim sonuçlarımıza benzer değişimler gözlediklerini rapor etmişlerdir.

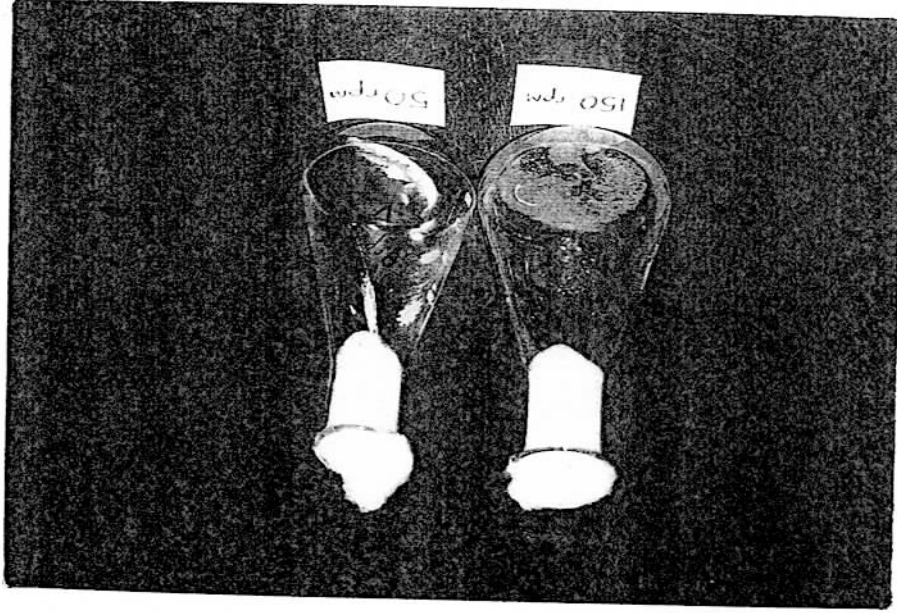
Ortam renginin belirgin bir düşüştü sonra yeniden yükselmesinin çeşitli nedenleri olabilir;

a) Fungusların otolizi sonucu ortam renginin artması,

b) Vinas ortamında bulunabilecek fenolik maddelerin, ortamda yüksek oranda sentezlenen lakkoz ve peroksidaz gibi oksidasyon enzimleri ile kinonlara okside edilmesi.

Renk miktarının belirgin bir düştüsten sonra ilerleyen günlerde artma eğilimi göstermesi daha önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir (Ohmomo vd. 1988).

Normal biyolojik yollarla giderilemeyen ve büyük bir kirlilik problemi oluşturdugu bildirilen rengin azaltısı, çalışmamızda makroskobik olarak da rahatlıkla gözlenebilmiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).

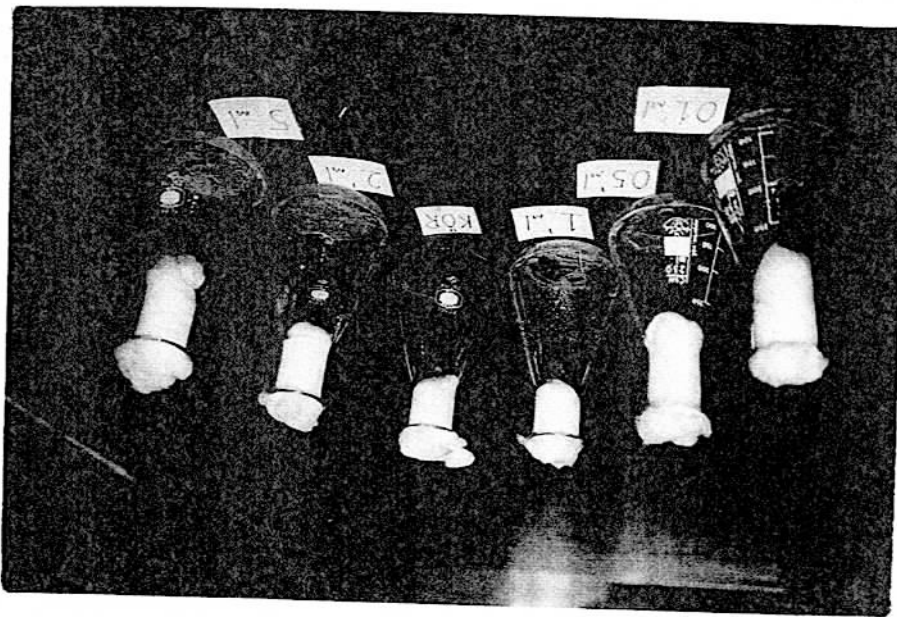


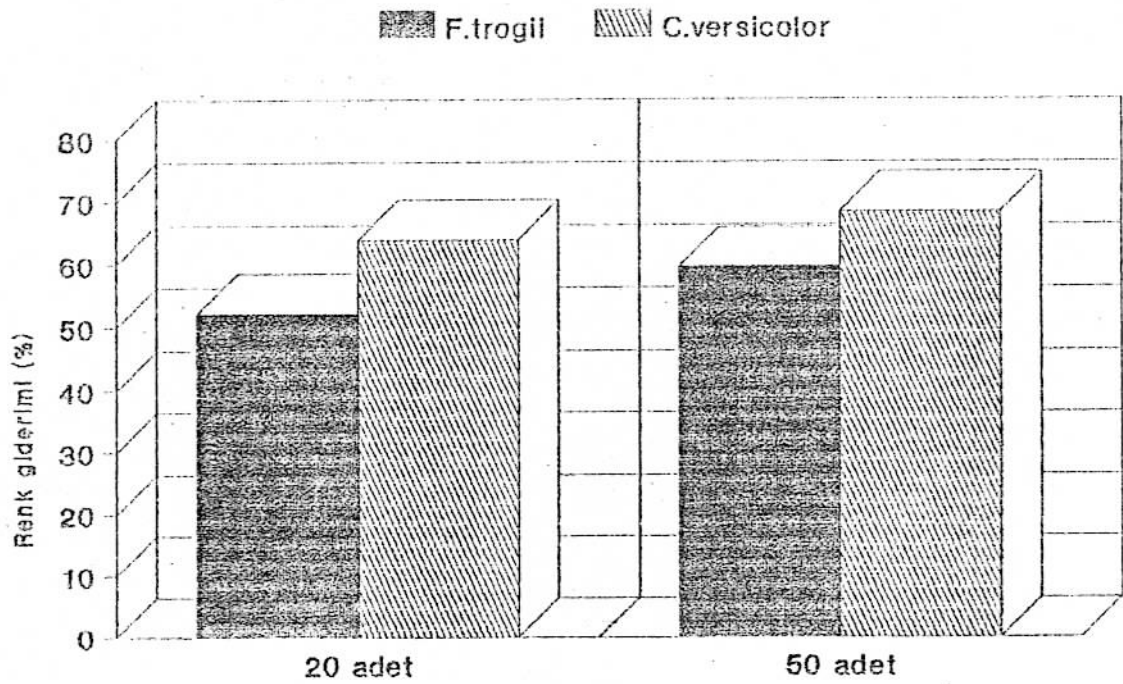
Şekil 4.8 Farklı Caikalama hızlarında yürütülen renk giderim çalışmalarından bir görüntü.

Anaerobik mikroorganizmalarla yapılan çalışmada, tutuklanmanın renk giderimi üzerindeki olumlu etkisi bildirilmiştir (Ohmomo vd. 1988). Bu çalışmada tutuklama sonucu renk giderim aktivitesinin 1.4 kat arttığı rapor edilmiştir. Kullanılan mikroorganizmaların oksijene ihtiyaç duymaması bu olumlu etkiyi açıklamaktadır.

Tutuklanmış *C.versicolor* ve *F.trogii* ile yaptığımız çalışmaları sonucu *C.versicolor* ile %68.32 ve *F.trogii* ile %59.68 renk giderimi elde edilmiştir. Bu değerlerin ortama eklenen tutuklanmış hücrelerin miktarına bağlı olarak arttığı da saptanmıştır (Şekil 4.10). Sonuçları serbest hücrelerle elde ettiğimiz sonuçlarla karşılaştırdığımızda, serbest hücrelere göre renk giderim aktivitesinin daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni kullandığımız fungusların aerobik sistemler olması ve tutuklama sonucu hücrelerin yeterli oksijen alamamasıdır. Buna bağlı olarak renk giderim aktivitesinde de azalma olmaktadır.

Şekil 4.9 Farklı ekim miktarlarında yürütülen bir çalışmada renk acılımlarının makroskopik görünümü.





Şekil 4.10 Farklı miktarlarda vinas ortamına eklenen tutuklanmış hücrelerin maksimum renk gideriminin karşılaştırılması.

Çalışma süresince kültür ortamlarındaki bazı ekstraseküller enzim değişimleri de incelenmiştir. Kültür ortamlarında lakkaz, peroksidaz, NADH peroksidaz (NADH oksidasyon aktivitesi), ligninaz, glukoz oksidaz, amino asit oksidaz ve alkol oksidaz aktiviteleri araştırılmıştır.

Ortamlarda yüksek lakkaz, peroksidaz ve NADH peroksidaz aktiviteleri gözlenirken ligninaz, glukoz oksidaz, amino asit oksidaz ve alkol oksidaz aktiviteleri saptanamamıştır.

Çalışmamızda kültür ortamlarında bu enzimlerin araştırılmasının nedenleri;

- 1- Lakkaz, peroksidaz ve ligninazın oksidasyon enzimleri olmaları ve özellikle peroksidaz enzimlerinin pekçok kimyasal bileşiği oksitleyebilmeleri (Blon-

deau 1989 ; Khaziyev vd. 1990),

- 2- NADH oksidasyon aktivitesi ve diğer oksidaz enzimlerinin H_2O_2 oluşumundan ve peroksidazların çalışmasından sorumlu olmaları (Asada vd. 1987; Kelley ve Reddy 1986; Methods in Enzymology 1975),
- 3- Hidrojen peroksitin ve hidrojen peroksitten oluşabilecek radikallerin yüksek oksidasyon yeteneğine sahip olmalarıdır.

Ligninaz enziminin pek çok özelliği ile peroksidaza benzer olduğu bildirilmiştir (Kirk ve Farrell 1987). Anaerobik koşullarda ligninaz enzimi peroksitleri oksitleyici olarak kullanmaktadır.

Kültür ortamlarında ligninaz ve glukoz aktivitelerinin saptanamaması, vinasın yüksek oranda azot içermesi ile ilgili olabilir. Çeşitli araştırmalarda yüksek azot içeren ortamlarda bu enzimlerin sentezinin baskılandığı bildirilmektedir (Dosoretz vd. 1989; Bonnarme ve Jeffries 1990). Yine ligninaz ve diğer oksidaz enzimlerinin çalıştığı ortamlarda gözlenememesi bu enzimlerin intrasellüler olmasından da ileri gelebilir. Bu enzimlerin intrasellüler olduğu rapor edilmiştir (Eriksson vd. 1986; Kelley ve Reddy 1986; Kelley vd. 1986; Garcia vd. 1987). Buna karşın ekstrasellüler ligninaz ve glukoz oksidaz aktiviteleri de bildirilmektedir.

Bu çalışmada *C.versicolor* ve *F.trogii* kültür ortamlarında yüksek lakkaz ve peroksidaz aktivitesi gözlenirken *P.chryso sporium* kültür ortamlarında ne lakkaz ne de peroksidaz aktivitesi gözlenememiştir. Bazı araştırmalarda *P.chryso sporium* kültür ortamlarında peroksidaz aktivitesi gözleendiği fakat bu aktivitenin *C.versicolor* gibi funguslar

tarafından sentezlenen peroksidaza göre çok daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Szklarz vd. 1989).

C. versicolor ve *F. trogii* funguslarının her ikisinde de lakkaz ve peroksidaz enzimlerinin primer fazda sentezinin başladığı, sekonder fazda sentezin devam ettiği gözlenmiştir. Sekonder fazda enzim düzeyinde artma da saptanmıştır. Çeşitli çalışmalarda bu enzimlerin sekonder fazda bulunduğu bildirilmektedirler. Bunun yanı sıra Szklarz vd. 1989, lakkaz aktivitesinin primer fazda da gözlemlendiğini bildirmektedir. Bulgularımız Szklarz vd. 1989'un sonuçlarını desteklemektedir.

pH, sıcaklık ve çalkalama optimizasyonu sırasında enzim ve fungal kütle artışı arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

C. versicolor ve *F. trogii* türleri yüksek lakkaz ve peroksidaz aktivitesi göstermiştir. Lakkaz enziminin her iki türde de peroksidaz enzimine göre daha yüksek miktarlarda sentezlendiği gözlenmiştir. Sonuçlarımız daha önceki bulgularla uygunluk göstermektedir (Yeşilada ve Bozcuk 1990 ; Yeşilada vd. 1991).

Çalışmamız sırasında her iki fungusun da iyi bir fenol oksidaz üreticisi olduğu gözlenmiş ve literatür verileri ile karşılaştırıldığı zaman deneyde kullandığımız fungusların yüksek enzim kapasitesine sahip oldukları ortaya konmuştur (Arora ve Sandhu 1986; Arora ve Sandhu 1987; Sandhu ve Arora 1985).

Vinasın rengini oluşturan maddenin, doğada sıklıkla rastlanan ve mikroorganizmalar tarafından yıkılması zor bir polimer olan, bir tür melanoidin olduğu bildirilmektedir (Ohmomo vd. 1988; Sirianuntapiboon vd. 1988).

Melanoidin humik asitle yüksek oranda benzerlikler gösteren bir maddedir . Ligninazın humus degradasyonundan sorumlu olabileceği bildirilmektedir. (Blondeau 1989)

Humik asit, peroksidaz için özgül olmayan bir substrattır ve peroksidaz enzimi ile oksitlenebilir (Blondeau 1989; Khaziyev vd. 1990).

Çalışmamız sırasında, lakkaz ve peroksidaz enzimlerinin yüksek oranda salınması ve renk gideriminin yüksek değerlere ulaşması, bu enzimlerin ve özellikle peroksidaz enziminin melanoidinin biyodegradasyonundan kısmen sorumlu olabileceğini göstermektedir. Ayrıca çalışmamız sırasında lakkaz ve peroksidaz aktivitesi göstermeyen *P. chrysosporium ME446'* nin renk giderim aktivitesi de göstermemesi bu bulgumuzu desteklemektedir. Lakkaz ve peroksidaz sentezinin başladığı primer fazda renk giderim aktivitesinin de gözlenmesi bu enzimlerin renk gideriminden sorumlu olabileceğini göstermektedir.

Humik asitin degradasyonunda, lignin degradasyonundan sorumlu olan sistemlerin bir kısmının veya tümünün rol aldığı bildirilmektedir (Blondeau 1989).

Belirtildiği gibi, humik asit ve melanoidinin benzer yapılarda olması ve humik asidin oksidasyon ve biyodegradasyonundan peroksidaz enziminin kısmen sorumlu olması görüşümüzü desteklemektedir.

Peroksidazın, yüksek oksidasyon kapasitesinden ötürü toprağa karışan toksik maddelerin (pestisit) yıkımından da sorumlu olduğu bildirilmektedir (Khaziyev vd 1990). Bu da peroksidazların yüksek oksidasyon kapasitesinden ileri gelmektedir.

Ohmomo vd. 1985b, *C. versicolor*'dan intrasellüler en-

zimleri saflaştırmışlar ve bu enzimlerden ikisini incelemişlerdir. Bu enzimlerden biri glukozaya bağımlı diğeri glukozaya bağımsız olarak renk giderim aktivitesi göstermiştir. Glukozaya bağımlı olmayan enzim %11 renk giderirken, glukozaya bağımlı enzim %13 renk gidermiştir. Her iki enzimin reaksiyon karışımına eklenmesi sonucunda renk giderimi %24'e yükselmiştir. Bu sonuç, renk giderim aktivitesinden sorumlu olan, pek çok enzimin oluşturduğu bir sistemin varlığını ortaya koymaktadır.

Peroksidaz enzimi, aktivasyonu için H_2O_2 'e ihtiyaç duymaktadır. Peroksidaz için ekstrasellüler bir H_2O_2 kaynağının saptanması için yaptığımız çalışmada, kültür ortamlarında yüksek NADH oksidasyon aktivitesi gözlenmiştir. Çalışmamızda NADH oksidasyon aktivitesi primer fazda başlayan ve sekonder fazda devam eden bir aktivite olarak saptanmıştır. Asada vd. 1986 ve 1987, NADH oksidasyon aktivitesi bildirmişler ve bu reaksiyonun H_2O_2 eklenmeden gerçekleşebileceğini rapor etmişlerdir. Yine Asada vd. 1987 ve Gleen ve Gold 1985'e göre NADH oksidasyon aktivitesi hidrojen peroksit ihtiyacı duymaktadır ve başlangıçta gerekli olan hidrojen peroksit asidik pH'da NADH'ın oksidasyonu sonucu oluşmaktadır.

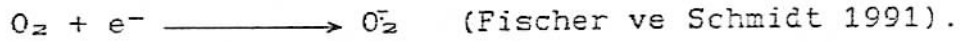
Yaptığımız çalışmada, reaksiyon için gerekli olan hidrojen peroksit, örnek eklenirken kültür filtratı ile birlikte gelmektedir. Bu da gözlenen aktivitenin çok yüksek değerlere ulaşmasını sağlamıştır.

Çalışmalarımızda NADH'ı oksitleyen peroksidaz aktivitesinin, reaksiyon karışımına Mn^{++} eklenmesi ile 2-3 kat arttığı ve peroksidazın mangana bağımlı olarak stimüle olduğu gözlenmiştir. Benzer sonuçlar farklı çalışmalarda bil-

dirilmektedir (Asada vd. 1986, 1987; Karhunen vd. 1990). Turp peroksidazı ile yaptığımız çalışmada peroksidazın, reaksiyon karışımına hidrojen peroksit eklenmeden NADH'ı oksitleyebileceği gözlenmiştir. Ayrıca, reaksiyon karışımına 0.2 mM MnSO₄ eklendiği zaman aktivitenin 3-4 kat arttığı saptanmıştır. Yine reaksiyon karışımına hidrojen peroksit eklenmesi sonucunda aktivitenin stimule olduğu gözlenmiştir. Bu bulgularımız daha önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir (Asada vd. 1986, 1987; Gleen ve Gold 1985; Paszczyński vd. 1986; Karhunen vd. 1990).

NADH oksidasyonunun gerçekleşmesi için süperoksit radikali gerekmektedir (Asada vd. 1987; Karhunen vd. 1990).

Süperoksit radikali oksijenin kısmi redüksiyonu sırasında O₂'ye bir elektron transferi sonucu oluşmaktadır.



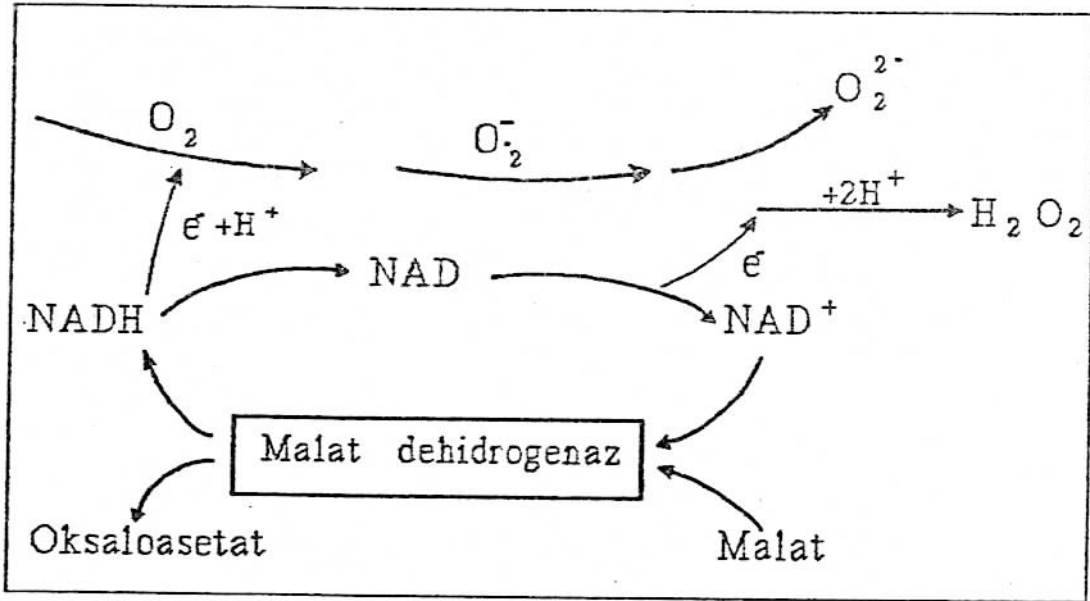
Beyaz çürükçül fungusların kültür ortamlarında NAD, NADP ve bunların redükte formları saptanmıştır (Kuwahara vd. 1984). NADH oksidasyon aktivitesi için gerekli olan NADH, hücre duvarına bağlı malat dehidrogenaz vasıtasıyla oluşabilir. Malat dehidrogenaz, malat ve koenzim olarak da NAD kullanarak oksaloasetat ve NADH oluşturma yeteneğindedir (Fischer ve Schmidt 1991, Şekil 4.11).

NADH oksidasyon mekanizması 2 şekilde gerçekleşebilir;

- 1- NADH, asidik pH'larda kendiliğinden yavaş yavaş oksitlenebilir ve süperoksit radikali oluşturabilir. Böylece Mn²⁺ varlığında H₂O₂ ve Mn³⁺ oluşabilir.
- 2- NADH peroksidaz enzimi aracılığı ile oksitlenebilir. Oksidasyon için süperoksit, Mn²⁺, NADH ve enzime gerek vardır (Asada vd. 1986; Bono vd. 1990;

Karhunen vd. 1990).

Mn^{2+} eksikliğinde reaksiyon için gerekli elektronlar moleküler oksijenin 2 kez tek elektron oksidasyonu sonucu oluşur ve H_2O_2 meydana gelir. Mn^{2+} varlığında ise bir elektron superoksitten diğer bir elektron da Mn^{2+} dan gelir. Mn^{2+} kuvvetli bir oksitleyicidir ve pek çok aromatik substratı oksitleyebilir (Karhunen vd. 1990; Paszczynski vd. 1986).



Sekil 4.11 Malat dehidrogenazın NADH ve oksijen ilişkisinde mümkün mekanizmalar (Fischer ve Schmidt 1991)

Çalışmamız sırasında vinas ortamında da mangana rastlanılmıştır. Vinas ortamında mangan bulunması, manganın çok yönlü olarak aromatik substratları oksitlemesi açısından önemlidir.

Ligninazın da NADH oksidasyon etkisine sahip olduğu bildirilmektedir (Asada vd. 1986, 1987; Karhunen vd. 1990).

Beyaz çürükçül funguslarda bu enzimler yanında, hidrojen peroksit üreten pek çok intrasellüler ve ekstrasellüler enzim bildirilmektedir. Bunlar arasında glukoz oksidaz, amino asit oksidaz, alkol oksidaz, glioksal oksidaz, ksant-

tin oksidaz, glikolat oksidaz ve superoksit dismutaz bulunmaktadır.

Çalışma sırasında vinas ortamlarına farklı miktarlarda hidrojen peroksit eklenmesi sonucu renk gideriminin arttığı saptanmıştır (Şekil 3.82). 0.1 mL H_2O_2 eklenen çalışmada 10 günlük inkübasyon sonucu %51.8 renk giderimi gözlenirken, 5 mL için bu değer %97.9'a ulaşmıştır. Yine 0.1 mL eklenen ortamlarda 1. günde %35.2 renk giderimi gözlenirken hidrojen peroksit miktarı artıkça 1. günde ki renk giderimi de artmıştır. Bu da kültür ortamlarımızda oluşabilecek H_2O_2 'nin de renk gideriminde rol oynayabileceğini göstermektedir. Pek çok odun çürükçülü fungusun H_2O_2 ürettiği saptanmıştır. Deneylerimiz sırasında kültür ortamlarımızda hidrojen peroksit olduğu anlaşılmıştır; H_2O_2 eklemeyen ham enzim kaynağını o-dianosidin ile reaksiyona bıraktığımızda hızlı bir şekilde OD'nin yükseldiği gözlenmiştir. Bu olay yalnızca H_2O_2 varlığında gerçekleşebileceği için kültür ortamlarında hidrojen peroksitin oluştuğunu açıklamıştır.

Lignin degradasyonu gibi degradasyon sistemlerinde, hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksi radikali ($\cdot OH$), süper oksit radikali (O_2^-) ve tekil oksijen ($O\cdot$) gibi ekstrasellüler redüklenmiş oksijen türleri rol almaktadır (Crawford ve Crawford 1984).

Hidrojen peroksitten oluşan hidrosi radikaller çok reaktiftir ve oksidasyon reaksiyonlarında pek çok organik bileşikle reaksiyona girebilir. $\cdot OH$ radikali özgül değildir ve biyolojik reaksiyonlarda yer almaktadır. $\cdot OH$ radikali, hidrojen peroksitten tek elektron oksidasyonu sonucu oluşabilir ve biyolojik sistemlerde 2 yolla oluştuğu düşünül-

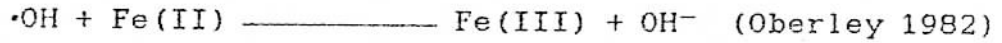
mektedir. Bunlardan birisi Fenton diğeri de Haber-Weiss reaksiyonudur (Forney vd 1982; Oberley 1982). Fenton reaksiyonu;



Demir ile katalizlenen Haber-Weiss reaksiyonu;



Bu reaksiyonlar sonucu oluşan hidroksi radikaller Fe(II) veya H₂O₂ ile reaksiyona girebilir;

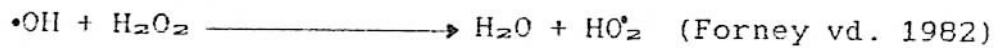


Bu reaksiyonların oluşabilmesi için metal ve metal komplekslerine ihtiyaç vardır ki çalışmalarımız sonucu vi-nas ortamında 20 ppm demir bulunduğu saptanmıştır.

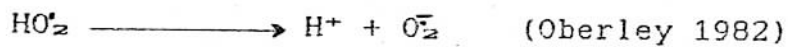
Haber-Weiss reaksiyonu için gerekli süperoksit radikali enzimatik olarak veya otooksidasyonla oluşabilmektedir. Otooksidasyon reaksiyonu için de mangan ve bakır gibi metal ve metal komplekslerine ihtiyaç vardır.

C.versicolor tarafından oluşturulan süperoksit radikalinin hücre dışına verildiği rapor edilmiştir (Forney vd. 1982).

Yukarıdaki reaksiyonlar dışında süperoksit radikali, hidroksi radikali ile hidrojen peroksit'in reaksiyonu sonucu oluşabilir.

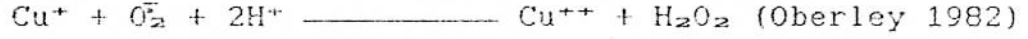
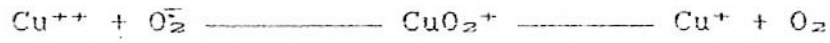


Sıvı ortamda;



Difenollerin otooksidasyonu sonucu da O₂⁻ oluşabilmektedir.

difenol (red.) + O₂ ————— difenol (oksi.) + O₂⁻
 O₂⁻ nin Cu(I) ile reaksiyonu sonucu H₂O₂ oluşabilir.



Vinas ortamında bakır, demir ve mangan gibi elementlerin varlığı saptanmıştır. Ayrıca fungusların enzimatik aktiviteleri sonucunda üreme ortamlarında H₂O₂ oluştuğu bulunmuştur.

Burada H₂O₂'nin renk gideriminden kısmen sorumlu olabileceği söylenebilir. Özellikle hidrojen peroksit reaksiyonları sonucu oluşabilecek •OH en azından başlangıç oksidasyon ve depolimerizasyon (dış ortamda) sorumlu olabilir ki, oluşacak düşük molekül ağırlıklı ürünler daha sonra fungus hücreleri aracılığı ile metabolize edilecektir.

Çalışmamızın en son kısmında ise adı geçen fungusların tek hücre proteini olarak değerlendirilme olasılığı araştırılmış ve degradasyon sonrası fungusların protein yüzdeleri saptanmıştır. Kullanılan fungusların yüksek protein içerdikleri gözlenmiştir (Tablo 3.4). *C.versicolor* ile %28.18, *F.trogii* ile %27.62 ve *P.chrysosporium* ile %21.13 protein değeri elde edilmiştir. Funguslarla yapılan çalışmalarda %19-57 protein değerlerine ulaşılabilir. *P.chrysosporium* ile %23 protein elde edildiği bildirilmiştir (Cardoso ve Nicoli 1981).

Tek hücre proteini olarak kullanılan fungusların diğer mikroorganizmalara göre çeşitli avantajları vardır. Bunlar arasında besin değerlerinin yüksek olması, toksik olmamaları, alerjik reaksiyon göstermemeleri, büyüme ortamından kolaylıkla alınabilmeleri sayılabilir. Yine nükleik asit içeriklerinin düşük olmasının da ayrı avantajları vardır

(Cardoso ve Nicoli 1981; Totti ve Nicoli 1983).

Beyaz çürükçül fungusların vinas ortamında üretilmesi sonucunda ekstrasellüler fazda bitki büyüme regülatörü olan absisik asit elde edilmiştir. Çalışma *C.versicolor*, *P.florida* ve *P.ostreatus* ile yapılmış ve sırasıyla 1.39, 1.22 ve 1.28 mg/L toplam absisik asit (ABA) değerleri elde edilmiştir (Yeşilada vd. 1990). Hofsten ve Ryden 1975, vinas ortamında yaptıkları bir çalışmada misel ve filtratların hormon benzeri maddeler içerdiğini rapor etmişlerdir. Sonuçlar, ekonomik açıdan çok önemli olan bitki büyüme regülatörlerinin adı geçen funguslardan elde edilebileceği fikrini desteklemektedir.

Ülkemizde ABA-fungus ilişkilerinin değişik yönlerden ele alınması ve incelenmesi özellikle tarımsal ekonomiye getireceği katkı bakımından yararlı olacaktır. Vinasın renginin giderilmesi sırasında organik asitler ve amino asitler de oluşabilecektir (Ohmomo vd. 1985a). Ayrıca çalışmalarımızda kullandığımız funguslar yüksek biyokitle değerleri vermişlerdir. Bu da vinasın bu funguslar için besiyeri olarak kullanılabilmesine işaret etmektedir.

Gelişmekte olan ülkelerde çevre kirliliği problemi gün geçtikçe artmaktadır. Şeker ve alkol üretiminin ekonomik açıdan önemli olduğu Türkiye gibi ülkelerde, üretim sonucu oluşan atıklar çevre kirliliği açısından problem oluşturmaktadır.

Alkol fabrikası atığı olan vinas funguslar aracılığı ile degradasyon işlemi uygulandığında hem endüstriyel bir atığın arıtılması ve hem de degradasyon ürününün pek çok yönden değerlendirilmesi gündeme gelebilecektir. Vinas ortamının koyu rengi bir kirlilik parametresidir. Çalışma-

mız sırasında %80'e yakın bir renk giderimine ulaşılabileceği saptanmıştır. Şüphesiz bu çeşit araştırmaların başarılı olabilmesi ve endüstriyel ölçeklere uygulanabilmesi, biyodegradasyonun biyokimyasal basamaklarının çok açık bir şekilde ortaya konması, ürünün yapı ve özelliklerinin anlaşılması ve mikroorganizmalar üzerindeki bilgilerin artmasına bağlıdır. Beyaz çürükçül fungusların degradasyon mekanizmalarının iyice araştırılması ve özellikle vinasın renginin gideriminden sorumlu olabilecek enzim sistemlerinin saptanması ve tamamıyla ortaya konmasının gerekliliği bu çalışmalarda gözlenmektedir. Araştırmada kullandığımız beyaz çürükçül funguslardan *P.chryso sporium* renk giderim aktivitesi göstermezken *F.trogii* ve özellikle *C.versicolor* yüksek renk giderim aktivitesi göstermiştir. Lakkaz, peroksidaz gibi oksidasyon enzimlerinin yanısıra, H_2O_2 'inde bu renk giderim aktivitesinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu üretim sürecinde tek hücre proteini olarak değerlendirilebilecek yüksek protein değerlerine ulaşılmıştır.

Bu sonuçlar farklı fungus türlerinin degradasyonda denenmesinin önemini göstermektedir. Bu sistemlerin geliştirilip alkol fabrikası atıklarının arıtım ve değerlendirilmesi sürecine uygulanması, hem renk gibi kirlilik problemini ortadan kaldıracak ve hem de tek hücre proteini, büyüme hormonu, organik asitler ve amino asitler gibi yararlı ürünlerin eldesini sağlayacaktır.

Bulgularımız, vinasın renginin gideriminde lignin degradasyonundan sorumlu olan sistemin tümünün veya bir kısmının rol alabileceği fikrini desteklemektedir.

KAYNAKLAR

- Aksöz, N., Aksöz, E., Cihangir, N.: *Bazı Gıda Endüstrisi Atık ve Artıklarını Kullanarak Gibberella fujikori'den Gibberellik Asit Üretimi*. Doğa Türk Biyoloji Dergisi. 15, 1 : 34-36 (1991).
- Algur, F. Ö., Kadioğlu, A.: *Şlempenin (Vinas) Çeşitli Bitki Tohumlarının Çimlenmesine Etkileri*. Doğa Türk Botanik Dergisi. 13, 2 : 117-123 (1989).
- Algur, F. Ö., Gökalp, Y. H.: *Batch Culture of Rhizopus arrhizus and Actinomucor elegans on Vinasse Medium for Biomass production and BOD reduction*. Doğa Türk Biyoloji Dergisi. 15 : 198-205 (1991).
- Ander, P., Eriksson, E. K.: *The Importance of Phenol Oxidase Activity in Lignin Degradation by the White-Rot Fungus Sporotrichum pulverulentum*. Archives of Microbiol. 109 : 1-8 (1976).
- American Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*: Published by the Association of Official Analytical Chemists. Inc. Fourteenth Edition : 1141 (1984).
- Aran, N.: *Endüstriyel Atıkların Mikrobiyolojik Yolla Değerlendirilmesi*. Gıda Dergisi. 4 : 155-160 (1978).
- Aran, N., Ücal, Ş.: *Vinas ve Peynir Suyundan Tek Hücre Protein (THP) Üretimi*. 2. Ulusal Kültür Koleksiyonları ve Endüstriyel Mikrobiyoloji (KÜKEM) Kongresi. 23-33 (1981).
- Arcuri, J. E., Slaff, G.; Greasham, R.: *Continuous Production of Thienamycin in Immobilized Cell Systems*. Biotechnol. Bioeng. 28 : 842-849 (1986).
- Arora, D. S., Sandhu, D. K.: *Laccase Production and Wood Degradation by a White-Rot Fungus Daedalea flavida*. Enzyme Microb. Technol. 7 : 405-408 (1985).
- Arora, D. S., Sandhu, D. K.: *Degradation of Lignocellulosic Residues by Polyporus versicolor and the Effect of Moisture Contents and Phenolic Compounds*. Acta Biotechnol. 6, 3 : 293-297 (1986).
- Asada, Y., Miyabe, M., Kikkawa M., Kuwahara, M.: *Oxidation of NADH by Peroxidase of a Lignin-Degrading Basidiomycete, Phanerochaete chrysosporium, and its Involment in the Degradation of a Lignin Model Compound*. Agric. Biol. Chem. 50,

2 : 525-529 (1986).

Asada, Y., Miyabe, M., Kikkawa, M., Kuwahara, M.: *An Extracellular NADH-Oxidising Peroxidase Produced by a Lignin-Degrading Basidiomycete, Phanerochaete chrysosporium*. J. Ferment. Technol. 65, 4 : 483-487 (1987).

Atalay, A.: *Deneysel Biyokimya*. Hacettepe Universitesi Fen Fakültesi Yayınları, Ders Kitapları Dizisi. 5 : 138 (1978).

Atlow, C. S., Aparo, B. L., Klibanow, M. A.: *Dephenolization of Industrial Waste Waters Catalyzed by Polyphenol Oxidase*. Biotechnol. Bioeng. 26 : 599-603 (1984).

Austin, H. C., Dosoretz, G. C., Grethlein, E. H.: *Ligninase Production by Immobilized Cultures of Phanerochaete chrysosporium Grown Under Nitrogen-Sufficient Conditions*. Enzyme Microb. Technol. 13 : 404-407 (1991).

Berry, R. D.: *Physiology of Industrial Fungi*. Blackwell Scientific Publications. 285 (1988).

Bettmann, H., Rehm, H. J.: *Degradation of Phenol by Polymer Entrapped Microorganisms*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 72-80 (1984).

Bettmann, H., Rehm, H. J.: *Continuous Degradation of Phenols by Pseudomonas putida P8 Entrapped in Polyacrylamide-Hydrazide*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 389-393 (1985).

Beunink, J., Rehm, H. J.: *Synchronous Anaerobic and Aerobic Degradation of DDT by an Immobilized mixed Culture System*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29 : 72-80 (1988).

Blondeau, R.: *Biodegradation of Natural and Synthetic Humic Acids by the White Rot Fungus Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 55, 5 : 1282-1285 (1989).

Bono, J. J., Goulas, P., Boe, F. J., Porlet, N., Seris, L. J.: *Effect of Mn(II) on Reactions Catalyzed by Lignin Peroxidase from Phanerochaete chrysosporium*. Eur. J. Biochem. 192 : 189-193 (1990).

Bonnarme, P., Jeffries, W. T.: *Mn(II) Regulation of Lignin Peroxidases and Manganese-Dependent Peroxidases from Lignin-Degrading White Rot Fungi*. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1 : 210-217 (1990).

Boominathan, K., Dass, B. S., Randall, A. T., Kelley, L. R., Reddy, A. C.: *Lignin Peroxidase-Negative Mutant of the White Rot Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. J. of Bacteriol. 172, 1 : 260-265 (1990).

- Brown, A. J., Alic, M., Gold, H. M.: *Manganese Peroxidase Gene Transcription in Phanerochaete chrysosporium : Activation by Manganese*. J. of Bacteriol. 173, 13 : 4101-4106 (1991).
- Bumpus, A. J., Tien, M., Wright, D., Aust, D. S.: *Oxidation of Persistent Pollutants by a White Rot Fungus*. Science. 228 : 1434-1436 (1985).
- Bumpus, A. J., Aust, D. S.: *Biodegradation of DDT (1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane) by the White Rot Fungus Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 53, 9 : 2001-2008 (1987).
- Cardoso, B. M., Nicoli, R. J.: *Single Cell Protein from the Thermotolerant Fungus Phanerochaete chrysosporium Grown in Vinasse; I. Production and Composition*. Nutrition Reports International. 24, 2 : 237-247 (1981).
- Crawford, R. L., Crawford, L. D.: *Recent Advances in the Studies of Mechanisms of Microbial Degradation of Lignins*. Enzyme Microb. Technol. 6 : 434-442 (1984).
- Clark, M. J., Switzer, L. R.: *Experimental Biochemistry*. W. H. Freeman and Company. 336 (1977).
- Çağlar, A.: *Biyoteknolojik ve Biyomühendislik. III. Ulusal Biyomühendislik Kongresi Tebliğleri*. Hacettepe Üniversitesi. Kimya Fakültesi. 379 (1981).
- Datta, A., Eettermann, A., Kirk, K. T.: *Identification of Specific Manganese Peroxidase among Ligninolytic Enzymes Secreted by Phanerochaete chrysosporium during Wood Decay*. Appl. Environ. Microbiol. 57, 5 : 1453-1460 (1991).
- Dosoretz, G. C., Chen, C. H., Grethlein, E. H.: *Effect of Environmental Conditions on Extracellular Protease Activity in Lignolytic Cultures of Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 52, 2 : 395-400 (1990).
- Edelman, J., Fewell, A., Solomons, L. G.: *Myco-Protein a New Food*. Nutrition Abstracts and Reviews in Clinical Nutrition. 53, 6 : 471-480 (1983).
- Eriksson, K. E.: *Swedish Developments in Biotechnology Related to the Pulp and Paper Industry*. Tappi. Journal. 68 : 46-55 (1985).
- Eriksson, E. K., Patersson, B., Vole, J., Musilek, V.: *Formation and Partial Characterization of Glucose-2-Oxidase, a Hidrojen Peroksit Producing Enzyme in Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23 : 257-262 (1986).

- Eriksson, E. K.: *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. Wood Sci. Technol. 24 : 79-101 (1990).
- Faison, D. B., Kirk, K. T.: *Factors Involved in the Regulation of a Ligninase Activity in Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 49, 2 : 299-304 (1985).
- Ferschl, A., Loidl, M., Ditzelmüller, G., Hinteregger, C., Streichsbier, F.: *Continuous Degradation of 3-Chloroaniline by Calcium-Alginate-Entrapped Cells of Pseudomonas acidovorans CA28 : Influence of Additional Substrates*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35 : 544-550 (1991).
- Fışkın, K; Ünyayar, A; Yeşilada, Ö.: *Beyaz Çürükçül Fungusların Lakkaz ve Peroksidaz Aktivitelerine Bağlı Lignin Degradasyonu*. Doğa Türk Biyoloji Dergisi. 13, 3: 141-148 (1989).
- Fischer, K., Schmidt, I.: *Active Enzymes in Wood Chips and their Action on Lignin during outside Storage*. Wood Sci. Technol. 25 : 281-287 (1991).
- Forney, J. L., Reddy, A. C., Tien, M., Aust, D. S.: *The Involment of Hydroxy Radical Derived from Hydrogen Peroxide in Lignin Degradation by the White Rot Fungus Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 257, 19 : 11455-11462 (1982).
- Garcia, S., Latge, P. J., Prevost, C. M., Leisola, M.: *Wood Degradation by White Rot Fungi. Cytochemical Studies using Lignin Peroxidase-Immunoglobulin-Gold complexes*. Appl. Environ. Microbiol. 53 : 2384-2387 (1987).
- Gleen, K. J., Gold, H. M.: *Purification and Characterization of an Extracellular Mn(II)-Dependent Peroxidase from the Lignin-Degrading Basidiomycete, Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Biochem. Biophysic. 242, 2 : 329-341 (1985).
- Gök, S.: *Arpa ve Buğday Samanının Sindirimini Artırılması Üzerine Araştırmalar*. H. Üniv. Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi. Aralık (1985).
- Hammel, E. K., Kalyanaraman, B., Kirk, K. T.: *Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Dibenzo (p)-dioxins by Phanerochaete chrysosporium Ligninase*. J. Biol. Chem. 261, 36 : 16948-16952 (1986).
- Hammel, E. K., Moen, A. M.: *Depolymerization of a Synthetic Lignin In Vitro by Lignin Peroxidase*. Enzyme Microb. Technol. 13 : 15-18 (1991).
- Huoponen, K., Ollika, P., Kalin, M., Walther, I., Mantsala, P., Reiser, J.: *Characterization of Lignin Peroxidase-*

- Encoding Genes from Lignin-Degrading Basidiomycetes*. Gene. 89 : 145-150 (1990).
- Ikizoğlu, E.: *Mikrobiyal Hücre Immobilizasyon Yöntemleri*. KÜKEM Dergisi. 5, 2 : 60-61 (1982).
- Karhunen, E., Kantelinen, A., Paavalo, N. L. M.: *Mn-Dependent Peroxidase from the Lignin Degrading White Rot Fungus *Phlebia radiata**. Arch. Biochem. Biophys. 279, 1 : 25-31 (1990).
- Kelley, R. L., Reddy, A. C.: *Identification of Glucose Oxidase Activity as the Primary Source of Hydrogen Peroxide Production in Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium**. Arch. Microbiol. 144 : 248-253 (1986).
- Kelley, R. L., Ramasamy, K., Reddy, A. C.: *Characterization of Glucose Oxidase-Negative Mutants of a Lignin Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium**. Arch. Microbiol. 144 : 254-257 (1986).
- Kennedy, J. F., Cabral, J. M. S.: *Immobilizing Living Cells and their Applications*. Appl. Biochem. Biotech. 4 : 189-280 (1983).
- Khaziyev, K. F., Gulko, Y. A.: *Some Properties of the Humus Peroxidase Complex*. Pachvo. 2 : 30-36 (1990).
- Kida, K., Ikbali, Sonoda, Y., Kawase, M., Nomura, T.: *Influence of Mineral Nutrients on High Performance during Anaerobic Treatment of Waste Water from a Beer Brewery*. J. Ferment. Bioeng. 72, 1 : 54-57 (1991).
- Kirk, T. K., Farrell, R. L.: *"Enzymatic Combustion". The Microbial Degradation of Lignin*. Ann. Rev. Microbiol. 41 : 465-505 (1987).
- Kolankaya, N., Sağlam, N., Cansunar, E.: *Biological Decolorization of Waste Black Kraft Liqueur*. KÜKEM Dergisi. 5, 2 : 91 (1982).
- Kolankaya, N., Arısoy, M., Sağlam, N., Cansunar, E.: *Ağartma Tesisi Atık Sularında *Pleurotus sajor-caju* ile Renk Giderimi*. Doğa Türk Müh. ve Çev. D. 13, 3 : 415-428 (1989).
- Koutinas, A. A., Toutoutzidakis, G., Kana, K., Kouinis, I.: *Methane Fermentation Promoted by -Alumina Pellets*. J. Ferment. Bioeng. 72, 1 : 64-67 (1991).
- Kuwahara, M., Ishida, Y., Miyagawa, Y., Kawakami, C.: *Production of Extracellular NAD and NADP by a Lignin Degrading Fungus, *Phanerochaete chrysosporium**. J. Ferment. Technol. 62, 3 : 237-242 (1984).

- Linko, S., Zhonk, C. L.: *Central Composite Experimental Design in the Optimization of Lignin Peroxidase Production in Shake Cultures by Free and Immobilized Phanerochaete chrysosporium*. J. Ferment. Technol. 62, 3 : 237-242 (1991).
- Lovland, J., Harper, J. M., Frey, A. L.: *Single Cell Protein for Food—a Review*. Lebensm-Wiss-Technol. 9, 3 : 131-142 (1976).
- Litchfield, H. J.: *The Production of Fungi*. IN: Mateles, R. I., Tannenbaum, S. R. ed. Single Cell Protein I. Cambridge. p. 309-329 (1968).
- Livingston, G. A., Willacy, A.: *Degradation of 3,4-dichloroaniline in Synthetic and Industrially Produced Wastewaters by mixed Cultures Freely Suspended and Immobilized in a Packed-Bed Reactor*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35 : 551-557 (1991).
- Njoku, C. C., Antai, S. P.: *Lignocellulose Degradation and Crude Protein Formation by Three Lignolytic Streptomyces Strains*. Letters in Appl. Microbiol. 4 . 133-136 (1987).
- Ohmomo, S., Aoshima, I., Tozawa, Y., Sahurada, N., Ueda, K.: *Purification and Some Properties of Melanoidin Decolorizing Enzymes, P-III and P-IV from Mycelia of Coriolus versicolor Ps4a*. Agric. Biol. Chem. 49, 7 : 2047-2053 (1985 a).
- Ohmomo, S., Itoh, N., Watanabe, Y., Kaneko, Y., Tozawa, Y., Ueda, K.: *Continuous Decolorization of Molasses Waste Water with Mycelia of Coriolus versicolor Ps4a*. Agric. Biol. Chem. 49, 9 : 2551- 2555 (1985 b).
- Ohmomo, S., Daengsubha, W., Yoshikawa, H., Yui, M., Nozaki, K., Nakajima, T., Nakamura, I.: *Screening of Anaerobic Bacteria with the Ability to Decolorize Molasses Melanoidin*. Agric. Biol. Chem. 52, 10 : 2429-2435 (1988).
- Oberley, W. L.: *Superoxide Dismutase*. Vol. I-II. CRC Press, Inc. Vol.I:152, Vol.II:177 (1982).
- Oruç, N., Gök, M.: *Eskişehir Şeker-Alkol Fabrikası Sıvı Atığı Sımpeninin Tarım Topraklarında Yarattığı Kirlilik*. Cev. Biyo. Sympos. Ankara. 26 (1990).
- Oztan, Y.: *Çevre Kirlenmesi*. Karadeniz Univ. Orman Fak. Genel Yayın No: 94. Trabzon. 176 (1985).
- Platt, W. M., Hader, Y., Chet, I.: *The Decolorization of the Polymeric Dye Poly Blue (Polyvinylamine Sulfonate-Anthroquinone) by Lignin Degrading Fungi*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 394-396 (1985).

- Paszczynski, A., Huynh, V., Crawford, R.: *Comparison of Ligninase-I and Peroxidase M2 from the White-Rot Fungus Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 244, 2 : 750-765 (1986).
- Paszczynski, A., Pasti, B. M., Goszczynski, D. L., Crawford, L. D., Crawford, L. R.: *New Approach to Improve Degradation of Recalcitrant Azo Dyes by Streptomyces spp. and Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme Microb. Technol. 13 : 378-384 (1991).
- Pekin, B.: *Mikroorganizmaların Immobilizasyonunda Genel İlkeler ve Immobilize Mikroorganizmaların Önemi*. KÜKEM Dergisi. 5, 2 : 56 (1982).
- Pena, G. L. M., Sardinero, E., Sarrano, G. P., Schnabel, I., Garrido, J.: *Continuous Production of Volatile Fatty Acids by Acidogenesis of Sugar Beet Vinasse*. Environ. Tech. Letters. 7 : 479-486 (1986).
- Rosalem, L. P., Tauk, M. S., Nunes, C. M.: *Effect of Temperature, pH, Time of Cultivation and Nutrients on the Production of Fungi Imperfecti in Distillery Slops (Vinasse)*. Rev. Microbiol. Sao Paulo. 16, 4 : 299-304 (1985).
- Rosenberg, S. L.: *Physiological Studies of Lignocellulose Degradation by the Thermotolerant Mold Chrysosporium prunosum*. Symp. on the Biol. Transformation of Lignocellulose. 12 : 133-142 (1980).
- Sahasrabudhe, S. R., Modi, A. J., Modi, V. V.: *Dehalogenation of 3-chlorobenzoate by Immobilized Pseudomonas sp. B13 Cells*. Biotech. Bioeng. 31 : 889-893 (1988).
- Sandhu, K. D., Arora, S. D.: *Laccase Production by Polyporus sanguineus under Different Nutritional and Environmental Conditions*. Experientia. 4 : 355-356 (1985).
- Sant'Anna, S. E., Teixeira, E., Moretto, E.: *Crescimento De Morchella Crassipes (Vent) Pers. Em Meio Sintetico E Vinhaça*. Rev. Microbiol., São Paulo. 17, 1 : 10-14 (1986).
- Sazcı, A., Acan, L.: *Tutuklanmış Enzim ve Hücrelerin Üretim ve Kullanılmaları*. Doğa Türk Bio. D. 10, 1 : 121-126 (1986).
- Shannon, J. L., Stevenson, E. K.: *Growth of Fungi and BOD Reduction in Selected Brewery Wastes*. J. Food Science. 40 : 826-829 (1975).
- Silva, T. S. E. M., Nicoli, R. J.: *Production and Nutritive Value of Single Cell Protein from Fusarium oxysporum var. lini Grown in Vinasse*. J. Ferment. Technol. 63, 1 : 91-94

(1985).

Sirianuntapiboon, S., Somchai, P., Ohmomo, S., Atthasam-punna, P.: *Screening of Filamentous Fungi Having the Ability to Decolorize Molasses Pigments*. Agric. Biol. Chem. 52, 2 : 387-392 (1988).

Smith, E. J.: *New Studies in Biology: Biotechnology*. Second Edition. Arnold Edward. 131 (1988).

Solomons, G. L.: *Single Cell Protein*. Critical Rev. in Bitech. Boca Raton Florida CRC Press. (1983).

Srivastava, N., Sahai, R.: *Effects of Distillery Waste on the Performance of Cicer arietinum L.* Environmental Pollution. 43 : 91-92 (1987).

Standart Methods: *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Fourteenth Edition. American Public Health Association. 1138 (1979).

Szklarz, D. G., Antibus, K. R., Sinsabaugh, L. R., Linkins, E. A.: *Production of Phenol Oxidases and Peroxidases by Wood Rotting Fungi*. Mycologia. 81, 2 : 234-240 (1989).

Tauk, M. S., Gambaie, V.: *Pfeitos da Agitação, pH, Tempo e Nutrientes na Produção de Biomassa de Candida guilliermondii em Meios de Vinhaca*. Rev. Microbil., Sao Paulo. 13, 1 :12-21 (1982).

Taygun, N.: *Maya Fabrikası Atık Suyunun Arıtımı*. Şeker D. 115/30 : 43-48 (1984).

Telefoncu, A.: *Enzim Immobilizasyonunda Kullanılan Kimyasal Yöntemler*. KÜKEM Dergisi. KÜKEM 1. Kongresi Özel Sayısı. 2, 1 : 6-18 (1979).

Telefoncu, A.: *Immobilize Fungusların Endüstriyel Uygulamaları*. KÜKEM Dergisi. 5, 2 : 73-76 (1982).

Topaktaş, A., Kolankaya, N.: *Pleurotus Sajor-caju Ligninaz Enzimi ile Buğday Samanının Sindirilebilirliğinin Arttırılması*. Doğa Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi. 15 : 155-165 (1991).

Totti, S. D., Nicoli, R. J.: *Vinasse as Substrate for Production of Microbial Protein from Fusarium oxysporum var. lini*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 25 : 297-304 (1987).

Tsay, S. S., To, Y. K.: *Citric Acid Production Using Immobilized Conidia of Aspergillus niger TMB 2022*. Bitech. Bioeng. 29 : 297-304 (1987).

Türkiye Çevre Sorunları Vakfı: *Türkiye Çevre Sorunları*.

478. Kasım. (1989).

Ülkü, G.: *2872 Sayılı Çevre Kanunu ve Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliğinin Fabrikalarımıza Getirdiği Yükümlülükler ve Gerekli Atıksu Analizleri El Kitabı*. Şeker Enstitüsü. Eylül (1989).

Ünyayar, A.: *Bio-pulp Üretiminde Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanılması*. H. Üniv. Fen Bilimleri Enst. Bilim Uzmanlığı Tezi. Şubat (1988).

Vanetti, D. C. M., Silva, O. D., Borges, C. A.: *Crescimento de Bacterias do Genero Bacillus em Vinhaça Suplementada ou Nao Com Ureia e Fosfato de Sodio*. Rev. Microbiol., Sao Paulo. 14, 4 : 233-238 (1983).

Weigand, E., Kirchgessner, M.: *Protein and Energy Value for Pigs*. Animal Feed Science and Technology. 5 : 221-231 (1989).

Wiseman, A.: *Principles of Biotechnology*. Surrey University Press. 217 (1986).

Wood, A. D.: *Plant Products and the New Technolgy: Useful Biodegradation of Lignocellulose*. Edited by Fuller, W. K., Gallon, R. J., Ann. Proc. Pytochem. Soc. Eur. Oxford University Press. 26 : 295-309 (1985).

Worthington Biochemical : Cat No. WC 780. Printed in USA. 210 (1978).

Yeşilada, Ü.: *Delignifikasyon İşleminde Pleurotus türlerinin Kullanımı Üzerine Araştırmalar*. İnönü Üniv. Fen Bilimleri Enst. Bilim Uzmanlığı Tezi. Haziran (1988).

Yeşilada, Ü., Bozcuk, A. N.: *Alkol Fabrikası Atığının Renginin Gideriminde Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanımı*. Çevre Biyolojisi Semp. 68 : 17-19 Ekim Ankara (1990).

Yeşilada, Ü., Topçuoğlu, Ş. F., Ünyayar, A., Ünyayar, S., Fışkın, K., Bozcuk, S.: *Şlempe (vinasse) İçeren İnkübasyon Ortamında Bazı Beyaz Çürükçül Funguslarda Absisik Asit (ABA) Üretimi*. X. Ulusal Biyoloji Kongresi. Erzurum. : 31-37 (1990).

Yeşilada, Ü., Ünyayar, A., Fışkın, K.: *Coriolus versicolor 'un Lakkaz ve Peroksidaz Enzim Aktivitelerinin Şlempeli Ortamda Saptanması*. Doğa Türk Biyoloji Dergisi. 15 : 152-157 (1991).

Yazıcıoğlu, T., Çelikkol, T., Ücal, Ş., Aran, N., Ömeroğlu, S.: *Some Trials on the Utilization of Whey, Black Water of Olive and Vinasse for Production of SCP in Turkey*. TÜBİTAK Marmara Scientific and Industrial Research Institute.

Nutrition and Food Technology Unit. Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Enstitüsü Matbaası. Gebze. 42 : 1-23 (1986).

Zhank, Z. Y., Zylstra, J. G., Olsen, H. E., Reddy, A. C.: *Identification of cDNA Clones for Ligninase from Phanerochaete chrysosporium Using Synthetic Oligonucleotide Probes*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 137, 2 : 649-656 (1986).

ÖZGEÇMİŞ

Bu çalışma İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde yapılmıştır.

20. 3. 1963 tarihinde Lefkoşa/Kıbrıs'ta doğdu. İlk okuldan sonra 1981 yılında Türk Maarif Kolejini tamamladı. 1981 yılında Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdi ve 1985 yılında Lisans eğitimini tamamladı. 1986 yılında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bilim Dalına Yüksek Lisans öğrencisi olarak girdi ve Delignifikasyon İşleminde *Pleurotus* Türlerinin Kullanımı Üzerine Araştırmalar adlı tezle 1988 yılında Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında 1987 yılından itibaren görev yapmaktadır. Yayınlanan eserleri aşağıdadır;

Yeşilada, Ö., Ünyayar, A., Fişkin, K., Gözükkara, E.: *Statik İnkübasyon Sırasında Beyaz Çürükçül Fungusların Lakkaz ve Peroksidaz Aktiviteleri*. KÜKEM Dergisi. 12, 2: 91-96 (1989).

Fişkin, K., Ünyayar, A., Yeşilada, Ö.: *Beyaz Çürükçül Fungusların Lakkaz ve Peroksidaz Aktivitelerine Bağlı Lignin Degradasyonu*. Doğa Türk Biyoloji Dergisi. 13, 3: 141-148 (1989).

Yeşilada, Ö., Bozcuk, A. N.: *Alkol fabrikası Atığının Renginin Gideriminde Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanımı*. Çevre Biyolojisi Semp. 68: 17-19 Ekim Ankara (1990).

Yeşilada, Ö., Topçuoğlu, Ş. F., Ünyayar, A., Ünyayar, S., Fişkin, K., Bozcuk, S.: *Şlempe (Vinasse) İçeren İnkübasyon Ortamında Bazı Beyaz Çürükçül Funguslarda Absisik Asit (ABA) Üretimi*. X. Ulusal Biyoloji Kongresi. Erzurum : 31-37 (1990).

Ünyayar, A., Topçuoğlu, Ş. F., Yeşilada, Ö., Ünyayar, S., Fişkin, K., Bozcuk, S.: *Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon*

Ortamlarında Üretilen *Phanerochaete chrysosporium* ME 446'da Absisik Asit Üretimi ve Enzim sentezi. X. Ulusal Biyoloji Kongresi Erzurum 18-20 Temmuz 39-50 (1990)

Topçuoğlu, Ş. F., Yeşilada, Ü., Ünyayar, A., Ünyayar, S., Bozcuk, S., Fışkın, K.: *Polyporus versicolor* Fungusunda Bir Metabolit Olarak Absisik Asit (ABA) Üretimi. Çevre Biyolojisi Semp. 76: 17-19 Ekim Ankara. (1990).

Yeşilada, Ü., Ünyayar A., Fışkın, K.: *Coriolus versicolor*'un Lakkaz ve Peroksidaz Aktivitelerinin Şlempeli Ortamda Saptanması. Doğa Türk Biyoloji Dergisi. 15: 152-157 (1991).