

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ZEYTİNYAĞI FABRİKASI SIVI ATIĞININ *Rhodotorula glutinis* ve *Debaryomyces hansenii* MAYALARI İLE BİYOARITIMININ İNCELENMESİ**

**Alper KARAKAYA**

**Danışman: Prof. Dr. Serpil TAKAÇ**

**ANKARA**

**2011**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ZEYTİNYAĞI FABRİKASI SIVI ATIĞININ *Rhodotorula glutinis* ve *Debaryomyces hansenii* MAYALARI İLE BİYOARITIMININ İNCELENMESİ

Alper KARAKAYA

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

Gerçekleştirilen yüksek lisans çalışmasında, zeytinyağı fabrikalarının sıvı atığı zeytin karasuyunun (ZK) arıtılarak özelliklerinin iyileştirilmesi için bir biyoproses geliştirilmesi amaçlanmıştır. Aromatik hidrokarbonları metabolize edebilen *Rhodotorula glutinis* ve halofilik *Debaryomyces hansenii* biyoproseste kullanılacak model mayalar olarak seçilmiştir. Tez kapsamında öncelikle her iki maya da ZK içeren besi ortamlarına adapte edilmiş ve *R. glutinis*'in karasu ortamında daha dayanıklı olduğu ve ortamın kirletici özelliklerini daha iyi giderdiği belirlenerek bu maya ile ileri biyoarıtım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, *R. glutinis*'in kesikli ve sürekli sistemlerde çoğalması ve zeytin karasuyunun başlıca toplam fenol (TF) derişimi, kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) ve pH'ını nasıl değiştirdiği izlenmiştir. Zeytin karasuyunun kesikli sistemde biyolojik arıtımında incelenen parametreler, karasuya uygulanan santrifüj ve sterilizasyon, ZK seyreltme oranı, çoğalmaya destek besi maddesi maya özütünün varlığı, azot kaynağı tür ve derişimi, başlangıç pH değeri, sıcaklık, karıştırma hızı ve zamandır. Kesikli sistemde elde edilen bulgular değerlendirilerek, zeytin karasuyunun kesikli-beslemeli ve sürekli işletmeler ile biyoreaktörde arıtımı da incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda, *R. glutinis*'in uygun bir adaptasyon işleminden sonra seyreltilmemiş ZK ortamında çoğaldığı ve fenolik bileşenleri parçalayarak ortamın pH'ını artırdığı, TF derişimi ve KOİ'de azalma sağladığı belirlenmiştir. *R. glutinis* ile karasuyun biyoarıtımında en uygun kesikli işletim koşulları azot kaynağı olarak üre kullanımı ile yükseltilmiş başlangıç pH değeri, 30 °C ve 150 rpm'dir. Ayrıca ortama maya özütü eklemenin ve sterilizasyon ile santrifüj işlemlerinin biyoarıtım üzerine etkisi gözlenmemiştir. Toplam fenol parçalanması açısından en iyi koşullarda, zeytin karasuyunun TF değeri %89, KOİ değeri ise %18 giderilmiştir. Biyoarıtım sonucunda zeytin karasuyuna has keskin koku kaybolmuştur. Biyoreaktörde ise ortama ham ZK beslemesi ile sağlanan statik pH koşullarında kesikli-beslemeli ve sürekli işletimler ile arıtımlar yapılmıştır. Kesikli-beslemeli işletimde pH=8.0 statik koşulu süresince %19 TF giderimi sağlanmıştır. Bu süre sonunda pH kontrolü kaldırılan sistemde pH=8.3'e ulaştığı anda ise TF giderimi %80'dir. Sürekli beslemeli işletimde TF giderimi açısından (%89) en iyi koşul statik pH=9.35 olarak belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca, *R. glutinis*'in zeytin çekirdeğine tutuklanarak karıştırılmalı sistemde ZK arıtımında kullanım potansiyeli de incelenmiştir.

2011, 86 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Zeytin karasuyu, biyolojik arıtım, *Rhodotorula glutinis*, *Debaryomyces hansenii*

**ABSTRACT**  
Master's Thesis

INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL TREATMENT OF OLIVE MILL  
WASTEWATER BY *Rhodotorula glutinis* and *Debaryomyces hansenii* YEASTS

Alper KARAKAYA

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

This study aimed at developing a bioprocess that remediates olive mill wastewater (OMW), which represents a severe environmental problem. *Rhodotorula glutinis* that metabolizes aromatic hydrocarbons and *Debaryomyces hansenii* that is a moderate halophile were used as model yeasts in the bioprocess. First of all, both yeasts were adapted to OMW medium before being employed in bioremediation. *R. glutinis* was found to be more resistant towards OMW medium and to provide higher degree of reductions in total phenol (TP) concentration and chemical oxygen demand (COD); therefore, further bioremediation experiments were performed with this strain. In this context, growth of yeast as well as variations in the characteristics of OMW such as TP concentration, COD and pH were followed in batch, fed-batch and continuous systems. The effects of centrifugation and sterilization, dilution rate, the presence of nutrient supplement yeast extract, nitrogen source and concentration, initial medium pH, temperature, agitation rate and time were investigated with batch-wise experiments. It was found that *R. glutinis* was capable of surviving, decreasing TP and COD levels and increasing pH of undiluted OMW medium after an appropriate pre-adaptation period. The best bioremediation conditions for batch operation were found to be high initial medium pH provided by urea as nitrogen source, 30°C and 150 rpm. No effects of yeast extract introduced in the growth medium as well as sterilization and centrifugation of OMW on bioremediation process were observed. Under the best condition for TP removal, 89% and 18% reductions in TP content and COD level were achieved, respectively. Characteristic intense odor of OMW disappeared after bioremediation. According to the results of batch experiments, bioremediation was also carried out in bioreactors with fed-batch and continuous operations under static pH conditions provided by feeding undiluted OMW to the system. In the fed-batch operation performed at pH=8.0 static condition, 19% reduction in TP content was obtained. When medium pH of 8.3 was approached after switching off the pH control in the system, 80% removal of TP content was achieved. The highest removal of TP content (89%) was achieved at pH=9.35 static condition in the continuous system. In the study, the utilization of *R. glutinis* cells in bioremediation after immobilization on olive stones was also investigated.

2011,86 pages

**Key words:** Olive mill wastewater, biological remediation, *Rhodotorula glutinis*, *Debaryomyces hansenii*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmasının gerçekleşmesini sağlayan, bilimsel yöntem ve bilimsel etik anlamında doğru olanı gösteren, dürüst ve üretken bir bilim adamı olma yolunda kendisini her zaman örnek almaya çalışacağım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Serpil TAKAÇ'a,

Beni bu konuda çalışmaya yönlendiren ve teşvik eden, içimdeki araştırma ve merak duygusunu her daim canlı tutmada yardımcı olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Yahya LALELİ'ye,

Tez çalışmasını 109M290 nolu “Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Özelliklerinin İyileştirilmesi ve Antioksidan Üretiminde Kullanılması İçin Biyoproses Geliştirilmesi” projesi kapsamında maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a ve destekleyici kuruluşlar olan Taylıeli Zeytinyağı İşletmesi, Düzen Norwest Çevre Laboratuvarı ve Düzen Laboratuvarlar grubuna,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Alper KARAKAYA  
Ocak, 2011

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1 GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2 KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	<b>4</b>
2.1 Zeytin Karasuyu ve Özellikleri .....	4
2.2 Zeytin Karasuyu Arıtım Prosesleri .....	6
2.2.1 Fiziksel arıtım.....	6
2.2.2 Isıl arıtım .....	7
2.2.3 Fizikokimyasal işlemler .....	7
2.3 Zeytin Karasuyunun Biyoartımı .....	8
<b>3 MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>15</b>
3.1 Materyal .....	15
3.2 Yöntem.....	15
3.2.1 Mikroorganizma çoğalma ortamları .....	15
3.2.2 Erlende gerçekleşen biyoarıtımlar .....	16
3.2.3 Biyoreaktörde gerçekleşen biyoarıtımlar .....	16
3.2.4 Mikroorganizmaların tutuklanması .....	18
3.2.5 Tutuklanmış mikroorganizmalar ile zeytin karasuyu arıtımı .....	19
3.3 Analizler .....	19
3.3.1 Kuru hücre ağırlığı.....	19
3.3.2 Toplam fenol derişimi.....	20
3.3.3 Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) .....	21
3.3.4 pH ölçümü .....	21
<b>4 ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	<b>23</b>
4.1 <i>Rhodotorula glutinis</i> ve <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin Zeytin Karasuyunun Biyoarıtımında Kullanılabilirliklerinin Karşılaştırılması .....	23
4.1.1 <i>Rhodotorula glutinis</i> ve <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin zeytin karasuyu ortamına adaptasyonları .....	23

4.2	<i>Rhodotorula glutinis</i> ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı .....	33
4.2.1	Azot kaynağı ve azot derişimi etkisi.....	33
4.2.2	<i>Rhodotorula glutinis</i> 'in yüksek zeytin karasuyu ortamına adaptasyonu için kademeli biyoarıtım .....	43
4.2.3	<i>Rhodotorula glutinis</i> ile biyoarıtımda maya özütü etkisi.....	48
4.2.4	<i>Rhodotorula glutinis</i> ile biyoarıtımda önişlemlerin etkisi .....	49
4.2.5	<i>Rhodotorula glutinis</i> ile biyoarıtımda sıcaklık etkisi.....	51
4.2.6	<i>Rhodotorula glutinis</i> ile biyoarıtımda karıştırma hızı etkisi .....	53
4.2.7	Biyoarıtımda önişlem görmemiş ve ek nutrient içermeyen zeytin karasuyu kullanımı .....	54
4.2.8	Kesikli-beslemeli sistemde zeytin karasuyunun biyoarıtımı (Erlen denemeleri) .....	56
4.3	Biyoreaktörde <i>Rhodotorula glutinis</i> ile Zeytin Karasuyu Arıtımı.....	58
4.3.1	Kesikli-beslemeli işletim.....	59
4.3.2	Sürekli işletim.....	61
4.3.3	Sürekli işletimlerin karşılaştırılması .....	66
4.4	Tutuklanmış <i>Rhodotorula glutinis</i> ile Biyoarıtım .....	67
4.4.1	<i>Rhodotorula glutinis</i> 'in zeytin çekirdeklerine tutuklanması.....	67
4.4.2	Tutuklanmış <i>Rhodotorula glutinis</i> 'in biyoarıtımda kullanılması .....	68
<b>5</b>	<b>TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>69</b>
5.1.	Bütünsel Yaklaşım.....	69
5.2.	Teknik Değerlendirme .....	70
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>75</b>	
<b>EKLER.....</b>	<b>79</b>	
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>86</b>	

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3-1 Kesikli-beslemeli işletim ile çalışan biyoreaktör sistemi: (1) Ham ZK şişesi; (2) Peristaltik pompa; (3) Hava girişi; (4) Mekanik karıştırıcı; (5) pH probu; (6) Sıcaklık probu; (7) Geri soğutucu; (8) Biyoreaktör tankı.....	17
Şekil 3-2 Sürekli işletim ile çalışan biyoreaktör sistemi: (1) Ham ZK şişesi; (2) Peristaltik pompa; (3) Hava girişi; (4) Mekanik karıştırıcı; (5) pH probu; (6) Sıcaklık probu; (7) Geri soğutucu; (8) ZK tahliye şişesi; (9) Biyoreaktör tankı .....	18
Şekil 3-3 Toplam fenol derişimi için hazırlanan çalışma doğrusu (pirogallol cinsinden) ...	21
Şekil 4-1 <i>R. glutinis</i> ve <i>D. hansenii</i> 'nin %5 zeytin karasuyu içeren biyoarıtım ortamında çoğalma eğrileri (T=30 °C, N=150 rpm).....	25
Şekil 4-2 . <i>R. glutinis</i> ve <i>D. hansenii</i> ile yapılan %5 zeytin karasuyu içeren biyoarıtım ortamında toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm) .	25
Şekil 4-4 <i>R. glutinis</i> ve <i>D. hansenii</i> ile yapılan %5 zeytin karasuyu içeren biyoarıtım ortamında pH değerinin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm) .....	26
Şekil 4-3 <i>R. glutinis</i> ve <i>D. hansenii</i> ile yapılan %5 zeytin karasuyu içeren biyoarıtım sonunda KOİ ve TF giderimleri (T=30 °C, N=150 rpm) .....	26
Şekil 4-5 <i>D.hansenii</i> 'nin %10 ZK ortamında çoğalma eğrisi ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm).....	28
Şekil 4-6 <i>D. hansenii</i> ile %10 ZK ortamında yapılan biyoarıtımda pH değerinin ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 pm).....	28
Şekil 4-7 <i>R. glutinis</i> 'in %10 ZK ortamında çoğalma eğrisi ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm).....	30
Şekil 4-8 <i>R. glutinis</i> ile %10 ZK ortamında yapılan biyoarıtımda pH değerinin ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm).....	30
Şekil 4-9 <i>R. glutinis</i> ile %25 ZK ortamdaki çoğalma eğrisi ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm).....	31
Şekil 4-10 <i>R. glutinis</i> ile %25 ZK ortamında yapılan biyoarıtımda pH değerinin ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm).....	31
Şekil 4-11 %25 ZK agar ve %100 ZK agar ortamlarından %25 zeytin karasuyu içeren biyoarıtım ortamında aktarılan <i>R. glutinis</i> 'in çoğalma eğrileri (T=30 °C, N=150 rpm) .....	32
Şekil 4-12 <i>R. glutinis</i> ile %25 zeytin karasuyu ortamında 2, 3, 4 g/L amonyum sülfat derişiminin hücre çoğalmasına etkisi (T=30 °C, N=150 rpm) .....	34
Şekil 4-13 <i>R. glutinis</i> ile %25 zeytin karasuyu ortamında 2, 3, 4 g/L amonyum sülfat derişiminin pH değişimine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm).....	34

Şekil 4-14 <i>R. glutinis</i> ile %25 zeytin karasuyu ortamında 2, 3, 4 g/L amonyum sülfat derişiminin toplam fenol giderimine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm) .....	35
Şekil 4-15 <i>R. glutinis</i> ile yüksek amonyum sülfat derişimlerinde gerçekteştirilen biyoarıtımlarda kuru hücre derişiminin zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özüdü, T=30 °C, N=150 rpm).....	36
Şekil 4-16 <i>R. glutinis</i> ile yüksek amonyum sülfat derişimlerinde gerçekteştirilen biyoarıtımlarda pH'ın zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özüdü, T=30 °C, N=150 rpm).....	36
Şekil 4-17 <i>R. glutinis</i> ile 4 g/L amonyum sülfat derişiminde eşdeğer koşullarda gerçekteştirilen iki ayrı biyoarıtımda pH'ın zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özüdü, T=30 °C, N=150 rpm) .....	37
Şekil 4-18 <i>R. glutinis</i> ile farklı azot kaynakları varlığında gerçekteştirilen biyoarıtımlarda kuru hücre derişiminin zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özüdü, T=30 °C, N=150 rpm).....	38
Şekil 4-19 <i>R. glutinis</i> ile farklı azot kaynakları varlığında gerçekteştirilen biyoarıtımlarda pH'ın zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özüdü, T=30 °C, N=150 rpm) ....	39
Şekil 4-20 <i>R. glutinis</i> ile farklı üre derişimlerinde gerçekteştirilen biyoarıtımlarda kuru hücre derişiminin zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özüdü, T=30 °C, N=150 rpm).....	40
Şekil 4-21 <i>R. glutinis</i> ile farklı üre derişimlerinde gerçekteştirilen biyoarıtımlarda pH'ın zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özüdü, T=30 °C, N=150 rpm) .....	41
Şekil 4-22 <i>R. glutinis</i> ile 2.724 g/L üre derişiminde ve %50 zeytin karasuyu ile gerçekteştirilen biyoarıtımda kuru hücre derişiminin zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özüdü, T=30 °C, N=150 rpm) .....	42
Şekil 4-23 <i>R. glutinis</i> ile üre içeren ortamlarda gerçekteştirilen tüm biyoarıtımlarda pH'ın zamanla değişimi (%25, %50, %100 ZK, 1 g/L maya özüdü, T=30 °C, N=150 rpm) .....	43
Şekil 4-24 <i>R. glutinis</i> ile farklı karasu derişimindeki ortamlarda gerçekteştirilen biyoarıtımlarda pH'ın zamanla değişimi (1 g/L maya özüdü, T=30 °C, N=150 rpm) .....	44
Şekil 4-25 <i>R. glutinis</i> ile farklı karasu derişimindeki ortamlarda gerçekteştirilen biyoarıtımlarda kuru hücre derişiminin zamanla değişimi (1 g/L maya özüdü, T=30 °C, N=150 rpm) .....	45
Şekil 4-26 <i>R. glutinis</i> ile farklı üre derişimi ancak aynı başlangıç pH değerlerindeki ortamlarda gerçekteştirilen biyoarıtımlarda kuru hücre derişiminin zamanla değişimi (%100 ZK, 1 g/L maya özüdü, T=30 °C, N=150 rpm).....	47
Şekil 4-27 <i>R. glutinis</i> ile farklı üre derişimi ancak aynı başlangıç pH değerlerindeki ortamlarda gerçekteştirilen biyoarıtımlarda pH'ın zamanla değişimi (%100 ZK, 1 g/L maya özüdü, T=30 °C, N=150 rpm) .....	47
Şekil 4-28 <i>R. glutinis</i> ile yapılan %25 ZK içeren biyoarıtım ortamında maya özüdü varlığında ve yokluğunda pH değerinin ve kuru hücre derişiminin zaman ile değişimi (T= 30 °C, N=150 rpm).....	49
Şekil 4-29 Önişlemlerden santrifüjün <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımda pH değişimine etkisi (T= 30 °C, N=150 rpm).....	50



Şekil 4-30 Önişlemlerden santrifüj+ sterilizasyonun <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımda pH ve kuru hücre değişimine etkisi (T= 30 °C, N=150 rpm) .....	51
Şekil 4-31 <i>R. glutinis</i> ile yapılan %25 ZK içeren biyoarıtım ortamında farklı sıcaklıklarda pH değerinin zaman ile değişimi (N=150 rpm) .....	52
Şekil 4-32 <i>R. glutinis</i> ile yapılan %25 ZK içeren biyoarıtım ortamında farklı sıcaklıklarda kuru hücre derişiminin zaman ile değişimi (N=150 rpm) .....	53
Şekil 4-33 <i>R. glutinis</i> ile yapılan %25 ZK içeren biyoarıtım ortamında farklı karıştırma hızlarında kuru hücre derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C).....	54
Şekil 4-34 <i>R. glutinis</i> ile yapılan %100 ZK içeren biyoarıtım ortamında üre + maya özütü varlığında ve yokluğunda pH değerinin ve kuru hücre derişiminin zaman ile değişimi (T= 30 °C, N=150 rpm).....	56
Şekil 4-35 <i>R. glutinis</i> ile yapılan kesikli-beslemeli erlen denemesinde pH değeri, kuru hücre derişimi ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T= 30 °C, N=150 rpm) .....	58
Şekil 4-36 <i>R. glutinis</i> ile yapılan kesikli-beslemeli işletimde pH değeri, kuru hücre derişimi, toplam fenol derişimi ve ham ZK sarfiyatının zaman ile değişimi (T= 30 °C, N=250 rpm ).....	60
Şekil 4-37 <i>R. glutinis</i> ile yapılan sürekli işletim öncesi ön çoğalma ortamında ve sürekli işletimde (Deneme-I) pH değeri ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (Erlen: T=30 °C, N:150 rpm; Biyoreaktör: T= 30 °C, N=250 rpm) .....	62
Şekil 4-38 <i>R. glutinis</i> ile yapılan sürekli işletimde (Deneme-I) pH değeri, kuru hücre derişimi, toplam fenol derişimi ve ham ZK sarfiyatının zaman ile değişimi (T= 30 °C, N=250 rpm ).....	63
Şekil 4-39 <i>R. glutinis</i> ile yapılan sürekli işletim öncesi ön çoğalma ortamında ve sürekli işletimde (Deneme-II) pH değeri ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (Erlen: T=30 °C, N:150 rpm; Biyoreaktör: T= 30 °C, N=250 rpm ) .....	65
Şekil 4-40 <i>R. glutinis</i> ile yapılan sürekli işletimde (Deneme-II) pH değeri, kuru hücre derişimi, toplam fenol derişimi ve ham ZK sarfiyatının zaman ile değişimi (T= 30 °C, N=250 rpm ).....	66

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1</b> Zeytinyağı üretimi esnasında açığa çıkan karasu miktarları.....	4
<b>Çizelge 2.2</b> Dünya’da ve Türkiye’de son beş yıla ait zeytin yağ üretimi.....	5
<b>Çizelge 2.3</b> Türkiye’de Ege Bölgesi’nden alınan bir zeytin karasuyu örneğinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	6
<b>Çizelge 3.1</b> Kesikli-beslemeli ve sürekli işletilen biyoreaktör işletim koşulları.....	18
<b>Çizelge 4.1</b> Kesikli-beslemeli erlen denemesinde besleme ekleme zamanı ve miktarı..	52
<b>Çizelge 4.2</b> Sürekli işletim denemelerinin karasu arıtım etkinlikleri.....	61

## SİMGELER DİZİNİ

---

<b>BOİ</b>	Biyolojik oksijen ihtiyacı
<b>COD</b>	Chemical oxygen demand
<b>HPLC</b>	High pressure liquid chromatography (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi)
<b>KOİ</b>	Kimyasal oksijen ihtiyacı
<b>LiP</b>	Lignin peroksidaz
<b>MA</b>	Molekül ağırlığı
<b>MiP</b>	Mn bağımsız peroksidaz
<b>MnP</b>	Mangan peroksidaz
<b>MnPA</b>	Asidik mangan peroksidaz
<b>N</b>	Karıştırma hızı
<b>OMW</b>	Olive mill wastewater
<b>rpm</b>	Revolutions per minute
<b>S</b>	Standart sapma
<b>S<sup>2</sup></b>	Varyans
<b>T</b>	Sıcaklık
<b>TF</b>	Toplam fenol
<b>UYM</b>	Universal yeast medium
<b>ZK</b>	Zeytin karasuyu

---

# 1 GİRİŞ

Zeytin karasuyu, vejetasyon suyu veya siyah likör olarak da isimlendirilen zeytinyağı fabrikaları sıvı atığı, koyu kırmızı renkli, organik madde ve mineral madde bakımından zengin ve asidik ( $4.0 < \text{pH} < 6.7$ ) özelliindedir (Borja et al., 2006). Zeytin karasuyunun organik fraksiyonu başlıca şekerler, polifenoller, tanenler, polialkoller, pektinler ve lipidleri içerir (McNamara et al., 2008). Karasuda 30'dan fazla sayıda fenolik bileşen tanımlanmıştır. Bunların yapıları ve miktarları işletmenin bulunduğu bölgenin toprak ve iklim özellikleri ile kullanılan prosese göre önemli ölçüde değişmesine karşın toplam fenol (TF) miktarı % 0.5–1.8 arasındadır (Niaounakis and Halvadakis, 2006). Zeytin karasuyu, yüksek biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ; 100g/L'ye kadar), kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ; 220 g/L ye kadar) değerleri ve fitotoksik ve antibakteriyel polifenollerin varlığı nedeniyle yüzey ve yeraltı suları için önemli bir kirlilik riski oluşturmaktadır (Paraskeva and Diamadopoulos, 2006). Zeytin karasuyunun T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı tarafından gıda sanayi (zeytinyağı ve sabun üretimi, katı yağ rafinasyon için) kabul edilebilir değerleri; KOİ= 230-250 mg/L) ve pH=6-9'dur (Anonim 1999).

2009 yılı verilerine göre Dünya'da 2.9 milyon ton zeytinyağı üretimi gerçekleşmiştir. Türkiye'de ise aynı yıl için üretim 143 bin ton'dur (FAOSTAT, 2010). Zeytinyağı üretiminden açığa çıkan karasu miktarı Akdeniz ülkeleri için yıllık 30 milyon ton olarak verilmektedir (Ramos-Cormenzana et al., 1996).

Zeytin karasuyunun toprağa doğrudan verilmesi, toprağın gözeneklilik ve pH gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkiler. Ancak, karasuyun sulamada doğrudan kullanımındaki temel zorluk, fitotoksik etki gösteren ve bitki tohum gelişimini inhibe edebilen fenolik bileşenlerin yüksek derişimidir. Karasuyun koyu renkli polifenollerinin yüksek derişimi, akarsuların da rengini bozar; ayrıca, yüksek indirgen şeker derişimi mikroorganizmaların solunumunu stimüle eder ki bu da suda çözülmüş oksijen derişimini azaltarak canlıların yaşamını etkiler.

Zeytin karasuyunun arıtımında fiziksel, kimyasal, biyolojik ve birleşik prosesler kullanılmaktadır (McNamara et al., 2008). Fiziksel yöntemlere santrifüj, filtrasyon, adsorpsiyon, buharlaştırma ve kompostlama; kimyasal yöntemlere çöktürme, oksidasyon, fotooksidasyon; biyolojik yöntemlere ise aerobik ve anaerobik arıtmalar örnek verilebilir. Arıtım prosesi, teknik olarak uygun olmasının yanısıra yeterli, küçük ölçekli işletmelerde uygulanabilmesi için kolay ve ekonomik olmalı; ayrıca mevsimsel ve yöresel değişimleri de göz önüne alınmalıdır. Halen en çok uygulanan yöntem, atığın lagünlerde depolanması ve yaz mevsiminde buharlaşmasıdır (<http://web.deu.edu.tr/cevmer/dokuman/KarasuRaporu.pdf>).

Zeytin karasuyunun koyu renginin giderilmesinde, organik yükünün azaltılmasında ve fitotoksik etki gösteren bileşenlerin uzaklaştırılmasında birçok biyoproses ve mikroorganizma denenmiştir. Bu amaçla, başlıca, bakteri, fungus, birleştirilmiş bakteri-fungal sistemi, anaerobik mikroorganizmalar ve birleştirilmiş aerobik-anaerobik mikroorganizmalar kullanılmaktadır (McNamara et al., 2008). Kimyasal oksijen ihtiyacında, polifenol miktarında ve renkte önemli ölçüde azalma sağlayan etkili bir arıtım biyoprosesi, zeytin karasuyunun güvenli ve ekonomik olarak bertaraf edilmesini sağlayacaktır. Zeytin karasuyu arıtımı için birçok arıtım yöntemi mevcuttur ancak teknik bakımdan etkili ve ekonomik olarak sürdürülebilir bir sistem henüz geliştirilmemiştir.

Bu yüksek lisans çalışması, 2009 yılında başlatılan 109M290 nolu ve “Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Özelliklerinin İyileştirilmesi ve Antioksidan Üretiminde Kullanılması İçin Biyoproses Geliştirilmesi” başlıklı TÜBİTAK projesinin Düzen Laboratuvarlar Grubu, Düzen Norwest ve Taylıeli Zeytinyağı İşletmesi'nin desteği ile endüstriyel açılımı da sağlanabilecek bir alt-projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, zeytinyağı fabrikası sıvı atığının, model mayalar olarak seçilen *Rhodotorula glutinis* ve *Debaryomyces hansenii* serbest ve tutuklanmış formlarda kullanılarak geliştirilecek bir biyoproses içinde, yüksek kimyasal oksijen ihtiyacı ve toplam fenol derişimi gibi çevresel problem yaratan özelliklerinin iyileştirilmesi için biyoproses geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için öncelikle mayaların zeytin karasuyuna adaptasyon ve arıtım kapasiteleri kıyaslanmıştır. Yapılan ön denemelerde zeytin karasuyu ortamında daha başarılı olan mayanın *R. glutinis* olduğu belirlenmiş ve bu maya ile ortama

adaptasyon çalışmaları yapılmış, azot kaynağı ve derişimi, maya özütü, sıcaklık, karıştırma hızı etkileri ile sterilizasyon ve santrifüj gibi önişlemlerin etkileri incelenmiş ve ardından biyoreaktörde kesikli-beslemeli, ve sürekli işletimler ile daha büyük ölçekte denemeler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, zeytin çekirdeklerine tutuklama materyali olarak kullanılarak, tutuklanmış *R.glutinis* 'in biyoarıtımındaki kullanım potansiyeli de incelenmiştir.

## 2 KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Zeytin Karasuyu ve Özellikleri

Zeytin karasuyu; zeytinyağı üretimi esnasına yüklü miktarda açığa çıkan ve fenolik bileşenlerce zengin bir tarımsal yan üründür. Dünya zeytinyağı üretiminin %98'i Akdeniz ülkelerinde gerçekleşmektedir. Bu ülkelerde üretilen zeytinyağı miktarı yıllık yaklaşık 2.5 milyon ton olarak hesaplanmaktadır. (McNamara et al., 2008). Zeytinyağı, iki ve üç fazlı olmak üzere iki prosesle üretilmektedir. İki fazlı proseste, dekantörden sadece zeytinyağı ve posa ile karışık vejetasyon sıvısı açığa çıkarken üç fazlı proseste zeytinler kırıldıktan sonra sisteme dışardan su eklenir ve dekantörden posa, karasu ve zeytinyağı olmak üzere üç ayrı faz açığa çıkar. Dünya'da zeytinyağı üretimi sonucu yıllık açığa çıkan karasu miktarı çok değişkenlik göstermekle beraber bu değer Akdeniz ülkeleri için yaklaşık 30 milyon ton olarak hesaplanmıştır (Çizelge 2.1). Türkiye ise dünya zeytinyağı üretiminin %4.4'ünü karşılamaktadır. Türkiye yaptığı bu üretim ile Avrupa dışı ülkeler arasında ikinci, Avrupa ülkeleri arasında ise İspanya, İtalya ve Yunanistan'dan sonra dördüncü sıradadır. Buna karşın Türkiye'de zeytin karasuyunun deşarjına ilişkin özel bir düzenleme mevcut değildir (Niaounakis and Halvadakis, 2006 ). Çizelge 2.2'de son beş yıla ait Dünya ve Türkiye'deki zeytinyağı üretim miktarları yer almaktadır.

**Çizelge 2.1** Zeytinyağı üretimi esnasında açığa çıkan karasu miktarları (Niaounakis and Halvadakis, 2006 )

Ülke	Karasu miktarı (m <sup>3</sup> /yıl)
İspanya	2.8x10 <sup>6</sup> (2001)
İtalya	1.6x10 <sup>6</sup> (2004)
Yunanistan	785.000 (2005)
Tunus	550.000 (2003)
<b>Akdeniz ülkeleri toplam:</b>	<b>30x10<sup>6</sup> (1995)</b>

**Çizelge 2.2** Dünya’da ve Türkiye’de son beş yıla ait zeytinyağı üretimi (FAOSTAT, 2010). (\* resmi, resmi olmayan ya da tahmini veriler, \*\* resmi olmayan veriler)

Yıl	Üretim miktarı (ton)	
	Dünya *	Türkiye **
2009	2907985	143600
2008	2633317	99500
2007	2761099	142700
2006	2910680	137000
2005	2552216	115000

Zeytin karasuyunun organik yükünü şeker, tanen, pektin, lignin, fenoller ile lipidler oluşturur ve genel olarak asidik pH’dadır (Martins et al., 2008). Karasu içerdiği organik maddeler nedeniyle 200 g/L düzeylerinde kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) değerine sahiptir. Ayrıca içerdiği yüksek derişimlerdeki (10 g/L’ye varan düzeylerde) fenolik bileşikler de karasuyun karakteristik koyu renginden ve toksik etkisinden sorumludur (Jaouani et al., 2003). Bu özelliklerinden ötürü zeytin karasuyunun doğal alanlara deşarjı Akdeniz ülkelerinde sorun teşkil etmektedir. Türkiye’de Ege Bölgesi’nden alınan bir zeytin karasuyu örneğinin bazı temel özellikleri Çizelge 2.3’de verilmiştir.

**Çizelge 2.3** Türkiye’de Ege Bölgesi’nden alınan bir zeytin karasuyu örneğinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (Düzen Norwest 2008)

Parametre	Birim	Değer
İletkenlik	mS/cm	7.89
pH	-	4.5
Toplam Kjedadhl azotu	mg/l	155.3
BOİ	mg/L	737.5
Fenol	mg/L	2.14
KOİ	mg/L	45.000
Tuzluluk	mS/cm	5.21



Zeytin karasuyuna toksik özellik kazandıran biyofenoller aslında yüksek antioksidan özelliğe sahip bileşiklerdir. Zeytin karasuyunun içerdiği 30'dan fazla fenolik bileşimin antioksidan özellik taşıyan en temel üç tanesi oleuropein, hidrokstitirozol ve tirozoldür. Bu maddeler farmasötik ve gıda endüstrilerinde kullanılmaktadır. Ancak biyofenollerin karasu ortamından ayrılarak saflaştırılması yüksek maliyetli işlemler gerektirdiğinden, saf preparatları piyasada yüksek fiyatlarla satılmaktadır. Zeytin karasuyunda bulunan antioksidan maddelerin geri kazanımı için çeşitli yöntemler mevcuttur. Patent literatüründe çözgen ekstraksiyonu, membran ayırma sistemleri, kromatografik teknikler ve integral işlemler kullanılarak yapılmış çalışmalar mevcuttur (Takaç ve Karakaya, 2009). Ancak bu maddelerin maliyetini düşürmek için sürdürülebilir sistemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

## **2.2 Zeytin Karasuyu Arıtım Prosesleri**

Zeytin karasuyunun arıtımında çeşitli yaklaşımlar vardır. Bunlar, fiziksel, ısı, fizikokimyasal, biyolojik ve kombine sistemler olarak genel başlıklara ayrılabilirler.

### **2.2.1 Fiziksel arıtım**

Zeytin karasuyunun *seyreltilmesi* fiziksel arıtım yaklaşımlarından birisidir. Karasuya su eklenerek organik yük derişiminin azaltılması hedeflenir, böylece biyolojik yıkılabilirliği de arttırılmış olur. Ancak su sıkıntısı bu yöntemin uygulanabilirliğini azaltmaktadır. *Çöktürme* ise bir diğer fiziksel arıtım yöntemidir. Karasuyun içerisindeki çözünmeyen maddeler ve askıdaki katı maddeler fiziksel olarak çökeldikten sonra organik yük bakımından daha zayıf olan karasu, çökelti fazından ayrılır. Bu işlem için özel çöktürme havuzları kullanılır. *Flotasyon*, karasuda çözünmeyen katı ve sıvı maddelerin ayrılması için uygulanan diğer bir yöntemdir. Karasuya hava verilerek gerçekleştirilen bu yöntem için özel bir sistem kullanılmaktadır. *Santrifüj* ile arıtımda ise karasu santrifüjlenerek üç farklı faz oluşumu sağlanır. En üste karasu içerisinde kalan yağ birikir, en alt fazda çözünmeyen katı fazlar kalır. Orta kısımda kalan karasu fazı ise başlangıç değerine göre organik yük

bakımından daha düşük değerdedir. Bu teknik aynı zamanda karasuyun içerisinde kalan yağın geri kazanımı için de uygulanmaktadır. *Filtrasyon* teknikleri de karasuyun arıtımı için kullanılan yöntemler arasındadır. Filtrasyon ile çözünmeyen ve askıdaki katı maddeler ayrılmaktadır. Fiziksel ktrme, flotasyon, santrifüj ve filtrasyon her ne kadar karasuyun organik yükünün azaltılarak KOİ düzeylerinin daha aŐaęı dzeyele çekilmesini sağlasa da sonuç olarak elde edilen işlem görmüş karasu halen düşük pH, tuz içeriği ve fenolik bileşen bakımından doğaya salınamayacak özelliktedir. Bu nedenle, bu uygulamalar karasu arıtımında bir önişlem olarak düŐünülebilir. Bu uygulamaların yanısıra membran teknolojileri kullanılarak yapılan arıtım iŐlemleri de bir diğer fiziksel arıtım yaklaŐımıdır. Mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon, nanofiltrasyon ve ters ozmoz kullanılarak karasuyu etkin bir Şekilde arıtmak mümkündür. Ayrıca gözenek çapları ayarlanmış ardışık membran sistemleri ile karasuyun fraksiyonlarına ayrılması, farmakolojik, kozmetik ve gıda endstrile rinde değeri olan bile Őiklerin karasudan geri kazanımı da sağlanabilmektedir (Takaç ve Karakaya, 2009). Her ne kadar bu sistemlerle etkin bir arıtım ve kazanım sağlanabilse de kullanılan membranların ve kurulan sistemlerin iŐletme maliyeti çok yüksektir (<http://web.deu.edu.tr/cevmer/dokuman/KarasuRaporu.pdf>).

### **2.2.2 Isıl arıtım**

En yaygın kullanılan ısıl arıtım yöntemlerinden birisi, karasuyu lagünlere doldurarak güneŐ enerjisi ile buharlaştırma yöntemidir. 7–8 hafta gibi uzun bir sürede gerçekleşen bu işlem esnasında karasudaki organik bileşiklerin kendi içerisinde doğal biyolojik yollardan yıkımı da gerçekleşmektedir. İŞletim maliyeti düşük olan bu sistem, açığa çıkan karasu miktarının çok fazla olmasından ötürü buharlaştırma havuzları için yer sıkıntısı doğurmaktadır. Bunun dışında distilasyon, kurutma, piroliz gibi diğer termal yöntemler de mevcuttur. (Niaounakis and Halvadakis, 2006)

### **2.2.3 Fizikokimyasal işlemler**

Fizikokimyasal yöntemler, karasuya kimyasal madde ekleyerek çöktürme, nötralizasyon,

flokulasyon, kimyasal oksidasyon ve adsorpsiyon işlemlerini kapsar. Nötralizasyon yönteminde katı maddelerin ayrılması ve karasuyun toplam yükünün sıfıra düşürülmesi sağlanır. pH, kimyasallar ile istenilen değere ayarlanır ve karasuya bir sonraki arıtım adımı için bir önışlem uygulanmış olur. pH'nın düşürülmesi yağların yağ asitlerine hidrolizini de sağlar. Flokulasyon ve kimyasal çöktürmede ise karasuya eklenen kimyasal ajanlar, karasu içerisindeki çözünmüş maddelerin çözünürlüğünü düşürerek ya da agregatlaşarak katı faz ya da çökelek oluşturulmasını sağlar. Flokulant olarak demir klorür, demir sülfat, alüminyum sülfat, sodyum silikat ve kireç kullanılan kimyasallar arasındadır. Adsorpsiyon yönteminde ise, karasu içerisindeki organik moleküllerin katı bir destek materyali üzerine tutunarak karasudan ayrılması sağlanır. Moleküllerin kullanılan destek materyalinin sadece görünen yüzeyine değil gözenekleri arasına da girerek adsorbe olması bu işlemin etkinliğini artırır. Bu yöntemde genellikle dolgulu kolonlar kullanılır. Kullanılan destek materyali bentonit, aktif karbon gibi materyaller olabilir. Kimyasal oksidasyonda ise, klor, klor türevleri, peroksit, ozon ya da potasyum permanganat gibi kimyasallar ya da bunların karışımları kullanılmaktadır. Fenton reaktifi de son yıllarda kullanılmaya başlanan kimyasallardandır (Niaounakis and Halvadakis 2006). Bunların yanında peroksit, ozon ve UV kombinasyonları gibi ileri oksidasyon teknikleri de uygulanmaktadır (Oktav vd., 2003, Uğurlu ve Kula 2007, Erkonak vd., 2008, Takaç ve Karakaya 2010).

### **2.3 Zeytin Karasuyunun arıtımı**

Zeytinyağı fabrikası sıvı atığının arıtılarak, kullanıldığı / bertaraf edildiği toprak ve suya zarar vermeyecek özelliklere getirilebilmesi için uygulanan çeşitli prosesler arasında biyolojik prosesler çevre dostu, güvenli ve birçok durumda da uygun maliyetlidir. Karasuyun biyolojik proseslerle arıtımına yönelik süreli ve patent literatüründe çok sayıda yayın yer almaktadır. Bu tür çalışmalarda, zeytin karasuyunun yapısında polifenoller, tanenler ve lignin bulunduğu için bu maddeleri parçalayabilen mikroorganizmalara odaklanılmıştır. Birçok bakteri ve fungus bu maddeleri kısmi olarak parçalayabilir.

Zeytin karasuyunun biyolojik arıtımında kullanılan funguslar; beyaz küf mantarı, *Aspergillus* sp. ve çeşitli mayalardır. Mayalara örnek *Trichosporon cutaneum*, *Candida*

*tropicalis* ve *Saccharomyces* sp. verilebilir. Diğer funguslar gibi, mayalar da kimyasal oksijen ihtiyacının azalmasında ve mono ve polifenollerin uzaklaşmasında etkilidir. Arıtımda birleşik bakteri-fungal sistemlerinin kullanımına da rastlanılmıştır. Örneğin, *Yarrowia lipolytica* 24 st'de karasudaki KOİ değerini %80 azaltırken aromatik bileşenleri dönüşmeden bırakmış; maya fermentasyonundan çıkan akım *Pseudomonas putida* ile işlem görünce 12-16 st'de KOİ'nda daha ileri azalma ve aromatiklerde uzaklaşma sağlanmıştır (McNamara et al., 2008). *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Phanerochaete* yüksek katabolik enzim aktivitesine sahiptirler ve çeşitli basit aromatikleri kullanırlar. *Phanerochaete flavid-alba*'nın yüksek Mn peroksidaz (MnP) ve lakkaz aktivitesi olduğu, renk giderimi ile aromatik bileşenleri ve toksisiteyi eş zamanlı olarak azalttığı bildirilmiştir. *Phanerochaete chrysosporium* 6 günde zeytin karasuyunun renk ve fenollerini %50 azaltmıştır. *Penicillium* zeytin karasuyunda çoğalarak 20 günde 21.5 g kuru hücre değerine ulaşmıştır. Bu funguslar karasuyun KOİ ve fenolik madde değerlerini azaltmış; pH değerini ise artırmışlardır. Beyaz küf mantarı *P. ostreatus* yüksek lakkaz ve Mn bağımsız peroksidaz (MIP) aktivitesi ile %49 dekoloryasyona neden olmuştur (Singh, 2006).

#### *Phanerochaete flavid-alba*:

Zeytin karasuyunun arıtılmasında çok çalışılan beyaz küf mantarıdır. Fenolik bileşenlerde %90 azalma sağladığı ve hücre dışı parçalayıcı enzimlerden lignin peroksidazın (LiP), MnP ve lakkazdan daha etkin olduğu gözlenmiştir (Hamman et al., 1999). Bir diğer çalışmada, karasuyun monomerik aromatik bileşenlerinin ve koyu renkli polimerik pigmentinin *P. flavid-alba*'nın hücre dışı ligninolitik enzimlerine etkisi incelenmiştir. Monomerik aromatik bileşenlerin olduğu ortamda lakkaz; karasu ile desteklenen ortamda modifiye MnP'ler; zeytin karasuyu veya polimerik pigment içeren ortamda ise lakkaz ve asidik Mn peroksidaz (MnPA) birikmiştir. Lakkaz, karasuyun toksik bileşenlerine karşı MnP den daha etkindir. MnPA ise polimerik pigmentlerin parçalanmasında lakkazdan daha etkili bulunmuştur (Ruiz et al., 2002).

*Phanerochaete chrysosporium*'un LiP ve MnP enzimlerinin zeytin karasuyunun renginin giderilmesindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada MnP fazla olduğu koşullarda renk gideriminin az (%25), LiP enziminin fazla olduğu koşullarda ise renk gideriminin fazla (>%70) olduğu belirlenmiştir. Düşük başlangıç KOİ değeri ile birlikte yüksek LiP

aktivitesinin sağlandığı koşullarda en yüksek renk giderimi elde edilmiştir (Sayadi and Ellouz, 1995).

*Pleurotus ostreatus:*

Zeytin karasuyunun biyoarıtımında hava kaldırmalı ve karıştırılmalı biyoreaktörler kullanılmıştır. Steril olmayan koşullarda ve kontrolsüz gerçekleştirilen proseste *P. ostreatus*'ın polifenol biyodönüşümü gerçekleştirdiği belirlenmiş; LiP, MnP ve lakkaz aktiviteleri izlenmiştir. Sonuçlar, çalışılan fungusun ham zeytin karasuyunda etkin bir şekilde çoğaldığını, polifenol azalımının besi maddelerinin kullanımına bağlı olduğunu ve %95'e kadar çıkabildiğini ve steril olmayan karasuda renk gideriminin iyi olmadığını göstermiştir (Olivieri et al., 2006). Bir diğer çalışmada, kesikli sistemde seyreltilmiş ve sterillemiş zeytin karasuyunda *P. ostreatus* önemli ölçüde fenolik madde uzaklaşmasına neden olmuştur. Çoğalma ortamında belirlenen tek ligninolitik enzim lakkazdır. Biyoreaktörde biyokütlenin artışı ile şeker tüketim hızı artmış, ancak fenolik fraksiyon oksidasyona direnmiştir. Yüksek seyreltme yapılmasının ve/veya başka bir muamelenin gerektiği bildirilmiştir (Aggelis et al., 2003). Çeşitli *Pleurotus* spp. türleri ile yapılan bir çalışmada besi maddesi eklemesi ve sterilizasyon dışında herhangi bir ön işlem olmadan hücrelerin zeytin karasuyunda çoğaldığı gözlenmiştir. Çoğalma ortamında yüksek lakkaz aktivitesi ve başlangıç fenol miktarında %69-76 azalma belirlenmiştir. En düşük fenol derişimine 12-15 gün sonra ulaşılmıştır. Ancak, kalan fenoliklerin toksisitesi orijinal fenolik bileşenlerden yüksek bulunmuştur (Tsioulpas et al., 2002).

*Geotrichum candidum:*

Pilot ölçekli kabarcık kolonda *Geotrichum candidum* ile zeytin karasuyunun renk giderimi incelenmiş; karıştırmanın, seyreltmenin ve havalandırmanın hücre çoğalmasını, polifenol hidrolizini ve renk giderimini hızlandırdığı bulunmuştur. En iyi koşullarda %70 KOİ giderilmiş ve tüm polifenol fraksiyonları oksitlenmiştir (Assas et al., 2000). *G. candidum* fungusunda LiP, MnP ve lipaz enzimleri üretimini, zeytin karasuyunun renk giderimini ve biyoparçalanmasını kontrol etmek amacıyla gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, seyreltme ve karbon ile azot derişimlerinin renk giderimine ve ligninolitik enzimler LiP ve MnP aktivitelerine önemli etkileri olduğu bulunmuştur. Kesikli ve kabarcık kolon sürekli biyoreaktörlerde KOİ ve renkte sırasıyla %60 ve %50 azalma sağlanmıştır. LiP ve MnP

aktiviteleri kesikli biyorektörde daha yüksek bulunmuştur. Sürekli prosesin performansı hidrolik kalma süresi 4 günden 1.7 güne düşürülünce renk giderimi ve biyoparçalanma sırasıyla %40 ve %45 azalmıştır (Asses et al., 2009).

*Phanerochaete chrysosporium:*

Zeytin karasuyu ultrafiltrasyon ile üç fraksiyona ayrılmış ve *P. chrysosporium*'un düşük molekül ağırlıklı fraksiyonda (MA < 8kDa) çoğaltıldığı zaman renk ve fenol uzaklaştırmanın yüksek; yüksek molekül ağırlıklı fraksiyonda (MA > 60kDa) çoğaldığı zaman çok zayıf olduğu belirlenmiştir. Düşük MA fraksiyonunda az miktarda LiP enzim aktivitesi gözlenmiştir. LiP indüksiyon ortamının kullanılması ise yüksek derecede renk giderimini sağlamıştır. Düşük MA fraksiyon, *P. putida* ve *A. eutrophus* veya aktif çamur karışımı zeytin karasuyunu iyi parçalamış; ancak yüksek MA fraksiyonda bu gözlenmemiştir (Sayadi et al., 2000). Bir diğer çalışmada, *P. chrysosporium*, *A. niger* ve *A. terreus* zeytin karasuyunda çoğalmıştır. *G. candidum* organik yükü azaltmış, ancak toplam fenol miktarını değiştirmemiştir. Çoğalan hücre miktarı organik madde ve fenol uzaklaşması ile bağlantılıdır. Fenol gideriminde etkinliğin *Phanerochaete chrysosporium* > *Aspergillus niger* > *Aspergillus terreus* sırası ile olduğu bulunmuştur (Garcia et al. 2000). Sayadi et al. (2005), bir başka çalışmalarında karasuyun tam detoksifikasyonu için aerobik, anaerobik ve ultrafiltrasyon işlemlerini birlikte kullanmışlardır. Bitkilerde bulunan lignini karbondioksit ve suya kadar parçalayan LiP enzimini üreten *Phanerochaete chrysosporium*, karasuyun renginden sorumlu olan mono ve poliaromatik bileşikleri de yıkarak koyu rengin önemli ölçüde giderilmesini sağlamaktadır. Çalışmada, aerobik arıtmıdan sonra anaerobik arıtım tankına alınan karasuyun tekrar aynı mikroorganizma ile anaerobik olarak arıtımı yapılırken biyogaz üretimi de gözlenmiştir. Anaerobik arıtımın ardından ise geriye kalan sıvının ultrafiltrasyon ile ileri arıtımı yapılmıştır. Aerobik ön arıtımı yapılmış karasu ile ön arıtım yapılmamış karasuyun anaerobik arıtmadaki metan üretim kapasiteleri kıyaslandığında, ön arıtımı yapılmış karasu ortamında iki kat daha fazla metan gazı açığa çıktığı gözlenmiştir. Aerobik ve anaerobik arıtımın ardından karasuda pH artışı, %50'ye yakın renk açılması, %80 ve %82 toplam fenol giderimi sağlandığı görülmüştür. Biyolojik arıtımın ardından yapılan ultrafiltrasyon işleminde de kalan sıvıda %57'ye varan KOİ ve %94 kadar renk giderimi sağlanmıştır.

#### *Aspergillus niger:*

Polisakkarit parçalayıcı enzimlerle zengin *Aspergillus niger* çoğalma ortamının, zeytin karasuyundan basit fenolikleri serbest bırakmadaki potansiyeli incelenmiştir. Fenolik bileşenler ile polisakkaritler arasındaki ester bağlarını hidrolizleyen enzimler karakterize edildikten sonra, *o*-difenolik bileşenlere spesifik enzim içeren ortam, karasuyun etanol ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen fenolik karışıma eklenmiştir. Büyük miktarda hidroksitirozol, daha az olarak tirozol, kafeik asit, *p*-kumarik asit and ferulik asit elde edilmiştir (Bouizda et al., 2005).

#### *Aspergillus flavus:*

Topraktan izole edilen *A. flavus*, okside olmuş zeytin karasuyu kullanılarak kesikli sıvı çoğalma ortamı optimize edildikten sonra renk ve KOİ giderimleri izlenmiş ve tannaz enzimi oluşumu nedeniyle sırasıyla %58 ve %46 giderimler sağlanmıştır (Kachauri et al., 2005).

Literatürde, mayalar kullanılarak zeytin karasuyunun arıtımı ile birlikte değerli ürün eldesine yönelik çalışmalar arasında lipaz üretimi önemli bir yer tutmaktadır:

#### *Yarrowia lipolytica* ve *Candida rugosa:*

Zeytin karasuyunda çoğalan *Yarrowia lipolytica*, KOİ değerini 24 st'de %80 azaltmış; aynı koşullarda 22.45 g/L biyokütle ve lipaz enzimi oluşmuştur. Proses sırasında organik ve inorganik maddelerin büyük bir kısmı tüketilmiştir (Scioli et al., 1997). İki tür *Y. lipolytica*'nın zeytin karasuyunda çoğalması ve lipaz gibi değeri yüksek madde üretim yeteneğinin incelendiği bir çalışmada, çoğalmayı ve zeytin karasuyunun parçalanmasını etkileyen faktörlerden azot desteği, hücre derişimi ve yüzey aktif madde ilavesinin etkileri incelenmiştir. Her iki tür de KOİ değeri 19 g/L ve toplam fenol derişimi 800 mg/L olan zeytin karasuyunda çoğalmıştır. Lipaz üretimi 6 g/L ye kadar amonyum sülfat eklenmesiyle artmış ve KOİ değerinde %80, toplam fenolde %70 azalma sağlanmıştır. Tween 80 hücre çoğalmasını artırmış ancak lipaz üretimin etkilememiştir. Sonuçlar, lipaz üretim koşulları ile KOİ uzaklaşması koşullarının aynı olmadığını göstermiştir (Lopes et al., 2008). Bir diğer çalışmada da benzer şekilde, *Y. lipolytica* ve *C. rugosa*'nın zeytin

karasuyunda çoğalma ve atığı parçalarken değerli bileşenler üretmesi incelenmiştir. Hücrelerin çoğalması ve karasuyun parçalanmasına bile şim, seyreltme ve eklenen besi maddelerinin etkileri belirlenmiştir. Hücreler, üç fazlı zeytinyağı fabrikasından alınan, seyreltilmemiş ve KOİ değeri 100-200 g/L arasında olan ortamlarda çoğalmış, hemen hemen ortamda bulunan tüm şekeri tüketmiş ve KOİ değerini önemli ölçüde azaltmışlardır. *Y. lipolytica* karıştırma hızı ve eklenen besi maddelerinden daha az etkilenmiştir (Gonçalves et al., 2008). Aynı araştırmacılar bir diğer çalışmalarında, *Y. lipolytica* ve *C. rugosa*'nın seyreltilmemiş zeytin karasuyunda çoğalabildiklerini ve lipaz üretimini gerçekleştirdiklerini bildirmiştir (Gonçalves et al, 2007). Brozzoli et al., (2007) ise, *C. cylindracea*'dan lipaz üretiminde zeytin karasuyunun substrat olarak kullanım potansiyelini inceledikleri çalışmalarında, besin maddeleri ile desteklenmiş ortamda enzim üretimini gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Zeytin karasuyunun lipaz üretim ortamı olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceği *Geotrichum candidu*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea* ve *Penicillium citrinum* kullanılarak incelenmiştir. Tüm mikroorganizmalar seyreltilmemiş karasuda çoğalmış; *C. cylindracea* en yüksek lipaz aktivitesini göstermiştir. Lipaz üretimi kullanılan azot kaynağına önemli ölçüde bağlı bulunmuştur (D'Annibale et al., 2006).

Gerçekleştirilmiş olan yüksek lisans çalışmasında kullanılan *Rhodotorula glutinis* ve *Debaryomyces hansenii* daha önce zeytin fabrikası sıvı atığının arıtımında kullanılmamış olan mayalardır. Ancak, *Rhodotorula glutinis*'in substrat olarak fenol kullanabildiği (Katayama-Hirayama et al., 1994) ve lakkaz ile oksidoredüktaz enzimlerine sahip olduğu (<http://www.uniprot.org>); *Debaryomyces hansenii*'nin ise halofilik bir tür olarak geniş bir substrat spektrumuna ve çevre çalışmalarında kullanım potansiyeline sahip olduğu (Breuer 2006) ve lakkaz enzimi içerdiği (<http://www.genome.ad.jp>) bilgileri rine ulaşılmıştır.

Endüstriyel biyoproseslerde, mikroorganizma veya enzimlerin uygun bir materyal içine veya üzerine aktivitelerini koruyarak hapsedilmesi / tutuklanması ile hazırlanan tutuklanmış biyokatalizörlerin kullanımı tercih edilir. Tutuklama ile hücreye kesikli biyoreaktörlerde defalarca, sürekli biyoreaktörlerde ise uzun süre kullanım özelliği kazandırılmış olur ki tutuklamanın bazı dezavantajlarına karşın bu özellikler endüstride tercih sebebi olmaktadır. Zeytin karasuyunun tutuklanmış hücreler kullanımı ile biyolojik arıtımına yönelik literatürde yer alan çalışmalar kısıtlıdır:



*Phanerochaete chrysosporium* polüretan köpüğe tutuklanarak kesikli biyoreaktörde ardışık olarak kullanılmış ve 85 st'de %70 renk giderimi sağlamış; *Aspergillus niger* poliüretan sünger parçalarına tutuklanarak kesikli reaktörde ardışık olarak kullanılmış ve 8 günde %67 fenol uzaklaştırmış; *Candida tropicalis* hücreleri Ca-alginat taneciklere tutuklanmış, kesikli sistemde kullanılmış ve 24 st'de %60 renk ve %36.5 renk giderimi sağlamıştır (Singh, 2006). Zeytin karasuyunun arıtılması için bazı mold türleri odun talaşına tutuklanmıştır. Çalışmada, KOİ'nin %60 azaldığı, polifenol parçalanmasının %87 gerçekleştiği ve pH değerinin 4.5 dan 6.6'ya çıktığı belirlenmiştir (Amhajji et al., 2005).

Tutuklanmış hücre hazırlanmasında kullanılacak materyal ve uygulanacak yöntem önemlidir. Selüloz ve türevleri birçok biyoproseste tutuklama materyali olarak kullanılmaktadır. Zeytin çekirdeği, hemiselüloz, selüloz ve lignin yanısıra protein, yağ, fenol ve şeker içeren lignoselülozik bir materyaldir. Bile şimi kaynağına göre değişmesine karşın %23.5 selüloz, %22.3 hemiselüloz ve %44.9 lignin olarak verilebilir (Demirbaş 2008). Zeytin çekirdeği başlıca elektrik enerjisi veya ısı üretiminde yakıt olarak kullanılır. Diğer kullanım alanları ise, aktif karbon eldesinde, furfural üretiminde, reçine üretiminde, hayvan yemi olarak kullanımı ile çeşitli atıklardan Cd(II), Pb(II), Ni(II), Cu(II) gibi ağır metalleri uzaklaştırmada biyosorbent olarak kullanımıdır (Rodríguez et al., 2008). Bu yüksek lisans çalışmasında, zeytin çekirdeğinin tutuklama materyali olarak kullanımı, zeytinyağı fabrikaları atığının değerlendirilmesini sağlayacak potansiyel bir diğer kullanım alanı olarak düşünülmüş ve bu şekilde tutuklanmış *Rhodotorula glutinis*'in zeytin karasuyu arıtımında kullanım potansiyeli incelenmiştir.

### 3 MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

Çalışmada ticari olarak sağlanan *Rhodotorula glutinis* (DSM 70398) ve *Debaryomyces hansenii* (NRRL Y-7426) mayaları kullanılmıştır. Ortam hazırlama ve analizlerde kullanılan kimyasallar analitik saflıkta, biyokimyasallar mikrobiyolojik saflıktadır. Deneyleerde kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler EK 1’de verilmiştir. Zeytin karasuyu (ZK), Biyolojik Bilimler Araştırma Geliştirme ve Üretim A.Ş. tarafından Taylheli Zeytin ve Zeytinyağı İşletmesi Balıkesir/Burhaniye fabrikasından (iki ve üç fazlı üretim) sağlanmıştır.

#### 3.2 Yöntem

##### 3.2.1 Mikroorganizma çoğalma ortamları

Mayalar agar içeren eğik tüplerde, petri kaplarında ve mikrobank™ (Pro-lab Diagnostics Microbank™) viallerde saklanmış ve belli zaman aralıkları ile sub-kültür yapılarak stok tazeleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından mikroorganizma stok ortamlarından sıvı biyoarıtım ortamlarına aktarılmıştır.

##### 3.2.1.1 Katı çoğalma ve adaptasyon ortamları

*Rhodotorula glutinis* ve *Debaryomyces hansenii* mayaları iki ayrı katı agar ortamında çoğaltılmışlardır. Birinci ortam UYM (Universal Yeast Medium), ikinci ortam ise bileşimi UYM ortamı ile aynı olan ancak damıtık su yerine zeytin karasuyu ile hazırlanan ortamdır (ZK agar). UYM ortam bileşimi 5 g/L pepton, 3 g/L maya özütü, 3 g/L malt özütü, 10 g/L

glukoz ve 15 g/L agardır. Hazırlanan katı ortam, 121 °C'ta 20 dk sterilize edilmiş (ALP CL-40M Sterilazatör) ve laminer akış kabininde (Biolab Faster BHG 2004-S) tüplere ve cam petri kaplarına paylaştırılarak agarın donması beklenmiştir. Mayalar, katı agar ortamında 24 st süre ile 30 °C'de inkübe edilmiş (Friocell 222) ve +4°C'de saklanmıştır.

### **3.2.1.2 Biyoarıtım ortamları**

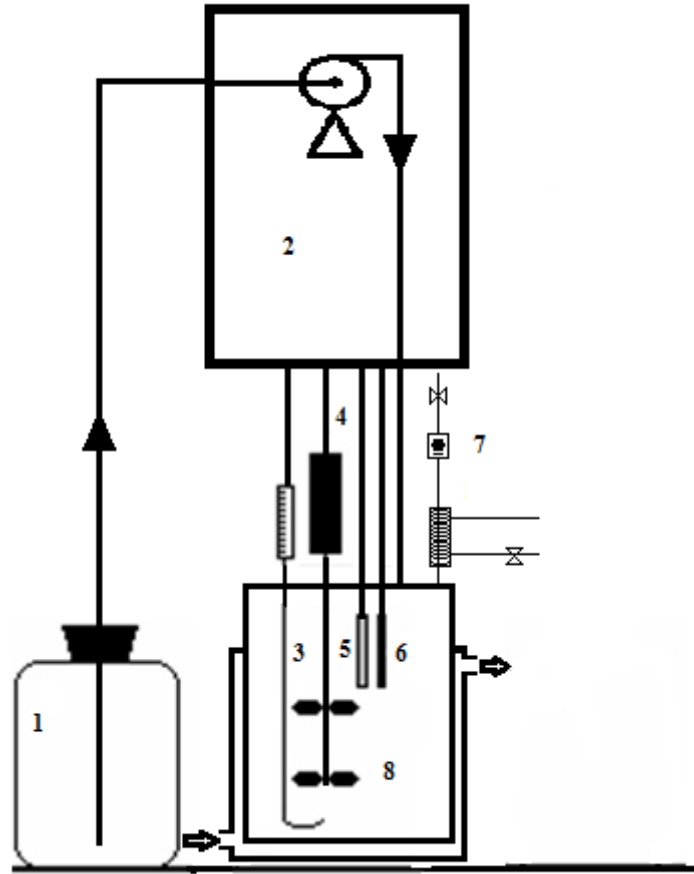
Stok ortamlardan sub-kültüvasyon yapılarak yeniden canlandırılan mayalar, zeytin karasuyu içeren sıvı biyoarıtım ortamlarına steril koşullarda aktarılmışlardır. Bazı biyoarıtım ortamlarına inokulasyon, zeytin karasuyu içeren sıvı çoğalma ortamlarında çoğalan mayaların aktarılmasıyla yapılmıştır. Ortamlar incelenecek parametrelere göre farklı zeytin karasuyu derişimi, azot kaynağı ve derişimi, sıcaklık, karıştırma hızı vb. koşullarında inkübe edilmişlerdir. Kullanılacak olan karasu 12.000xg'de 10 dk santrifüjlenmiştir (Hettich Rotina 35R). Ortamlar hazırlandıktan sonra ise 121 °C'de 20 dk sterilize edilmiştir. Santrifüj etkisinin ve sterilizasyonun incelendiği denemelerde ise bu işlemler uygulanmamıştır.

### **3.2.2 Erişende gerçekleşen biyoarıtımlar**

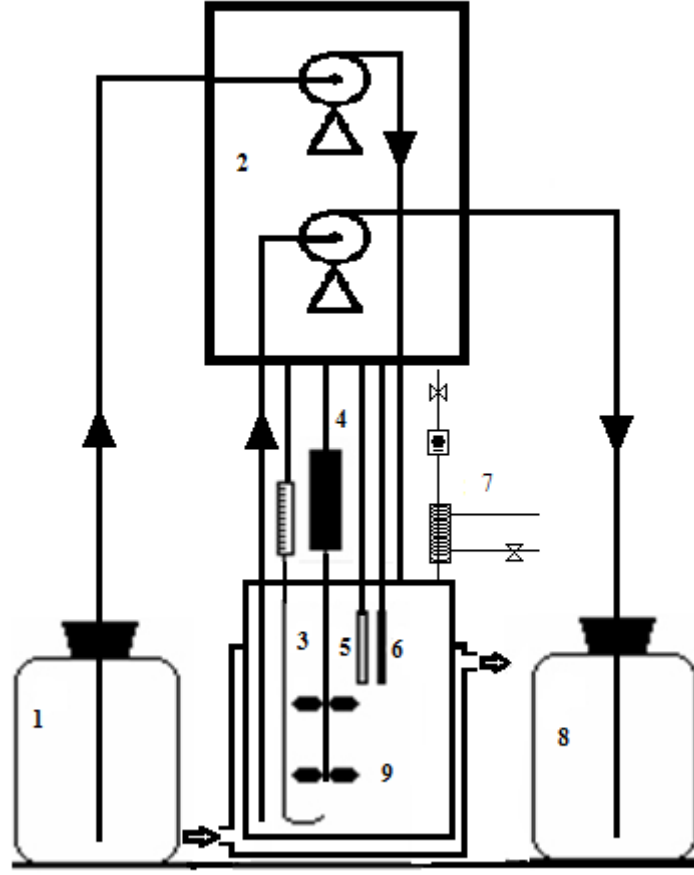
Erlen denemeleri 500 ml'lik erlenlerde 200 ml ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Erlenler mikrobiyolojik hava filtresi ile kapatılmıştır. Biyoarıtım çalkalamalı hava banyosunda gerçekleşmiştir (Shel Lab S16R-2 İnkübatör). Erlen denemelerinde farklı karıştırma hızları, sıcaklık, karasu derişimi, azot kaynağı ve derişimlerinde biyoarıtım incelenmiştir. Ayrıca biyoarıtıma santrifüj, sterilizasyon ve maya özütü etkileri de erlenlerde incelenmiştir.

### **3.2.3 Biyoreaktörde gerçekleşen biyoarıtımlar**

Biyoreaktör denemeleri, sıcaklık, karıştırma hızı, pH, gaz akış hızı ve köpük kontrol birimleri ile donatılmış biyoreaktörde (Sartorius Biostat B plus Twin) toplam 2 L hacimli tanklarda gerçekleştirilmiştir. Arıtlar kesikli-beslemeli ve sürekli işletimler ile yapılmıştır. Kesikli-beslemeli işletimde biyoreaktör tankına konulan 500 ml başlangıç ZK ortamına, katı agar veya sıvı çoğalma ortamından mikroorganizma aşılınmış ve belirli zaman aralıklarıyla zeytin karasuyu eklemiştir. Sürekli işletimde ise mikroorganizma 1 L başlangıç ZK ortamı içeren erlenlerde inkübe edildikten sonra, ortam biyoreaktör tankına alınıp sürekli olarak karasu beslemesi başlatılmıştır. Besleme akımı ile eş zamanlı olarak besleme hacmine eşit miktarda arıtılmış karasu ortamdan alınmıştır. Kesikli-beslemeli ve sürekli sistemler sırasıyla Şekil 3.1 ve 3.2’de gösterilmiştir. Biyoreaktör işletim parametreleri ise Çizelge 3.1’de yer almaktadır.



**Şekil 3-1** Kesikli-beslemeli işletim ile çalışan biyoreaktör sistemi: (1) Ham ZK şişesi; (2) Peristaltik pompa; (3) Hava girişi; (4) Mekanik karıştırıcı; (5) pH probu; (6) Sıcaklık probu; (7) Geri soğutucu; (8) Biyoreaktör tankı.



**Şekil 3-2** Sürekli işletim ile çalışan biyoreaktör sistemi: (1) Ham ZK şişesi; (2) Peristaltik pompa; (3) Hava girişi; (4) Mekanik karıştırıcı; (5) pH probu; (6) Sıcaklık probu; (7) Geri soğutucu; (8) ZK tahliye şişesi; (9) Biyoreaktör tankı.

**Çizelge 3.1** Kesikli-beslemeli ve sürekli işletimle n biyoreaktör işletim koşulları

Hava akış hızı (L/dk)	Karıştırma hızı (rpm)	Sıcaklık (°C)
0.6	250	30

### 3.2.4 Mikroorganizmaların tutuklanması

Mikroorganizma tutuklama denemeleri, tutuklama materyali olarak zeytin çekirdekleri

kullanılarak erlenlerde yapılmıştır. Tutuklama işleminden önce santrifüjlenmiş %100 ZK ile ön çoğalma ortamı hazırlanmıştır. Bu ortam 9.08 g/L üre ile desteklenerek otoklavda sterilize edilmiş ve ardından mikrobanklardaki *Rhodotorula glutinis* ile inokule edilerek inkübasyona bırakılmıştır. Tutuklama ortamı olarak ise santrifüjlenmiş ve sterillemiş ancak destek azot içermeyen %100 ZK kullanılmıştır. Yüzey adsorpsiyon yöntemi ile tutuklama için iki ayrı erlene 20'şer g zeytin çekirdeği konulmuştur. Erlenlerden birine 180 ml karasu eklenmiş, diğerine ise 170 ml zeytin karasuyu ve ön çoğalma ortamında hücrel aktivite gözlendikten sonra da 10 ml hücreli ortam aktarılmıştır. Diğer erlen ise kontrol erleni olarak kullanılmış ve inokulasyon yapılmamıştır. Her iki erlen de 30 °C ve 75 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosuna konularak hücrel aktivite izlenmiştir. Hücrel aktivite gözlendikten sonra erlenlerden zeytin çekirdekleri alınarak 120 °C de 3 st kurutulmuş ve ardından erlenler tartılmışlardır. İnokule edilmiş ve inokule edilmemiş (abiyotik) erlenlerden alınan zeytin çekirdekleri arasındaki ağırlık farkı, çekirdeklerin yüzeyine tutuklanmış hücre miktarını vermektedir.

### **3.2.5 Tutuklanmış mikroorganizmalar ile zeytin karasuyu arıtımı**

Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi zeytin çekirdeğine tutuklanan hücreler ortamdan alınmış ve hazırlanan yeni zeytin karasuyu ortamına konularak ve 30° C ve 150 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosunda biyoarıtım gerçekleşmiştir.

## **3.3 Analizler**

### **3.3.1 Kuru hücre ağırlığı**

Biyoarıtım ortamında alınan örnekler 12.000xg'de 10 dk santrifüjlendikten sonra çöken hücreler, darası bilinen bir petri kabına konularak 120 °C'de 3 st kurutulmuşlardır (Forced-Air Drying Oven ZRD 5110). Kurutma işleminden sonra petri kabındaki katının

ağırlığı hassas terazide (Mettler AB54-S) tartılarak kuru hücre ağırlığı mg/ml olarak hesaplanmıştır.

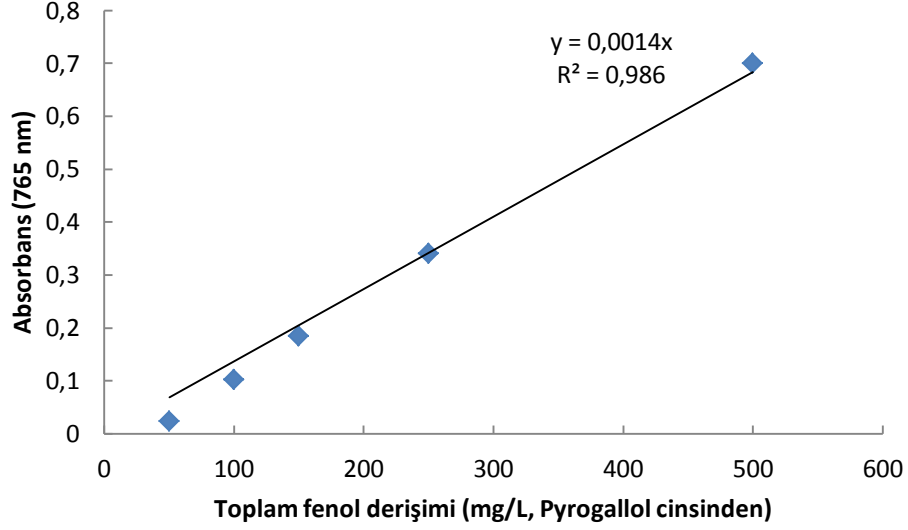
### 3.3.2 Toplam fenol derişimi

*Örnek hazırlama:* Örneklerin pH değerleri %37'lik HCl ile 2'ye getirildikten sonra, fenolik bileşenler etil asetat ile üç kez ekstrakte edilmiş ve susuz sodyum sülfat ile 30 dk kurutulmuştur. Döner buharlaştırıcıda (Heidolph) etil asetatı tamamen uzaklaştırılan örnekler, daha sonra etil alkol-su karışımında (60:40) tekrar çözülmüş ve toplam fenol derişim analizi için Folin-Ciocalteu yöntemi uygulanmıştır (Ayed et al., 2005).

*Folin-Ciocalteu yöntemi:* Toplam fenol derişim analizi için, yukarıdaki aşamalardan geçirile rek analize hazırlanan örnekten 20 µl cam tüplere alınmış; üzerine 1.58 ml saf su ve 100 µl Folin-Ciocalteu fenol reaktifi eklenmiştir. Çok iyi bir şekilde karıştırılan (vortekslenen) çözelti 8 dk bekletilmiştir. Bu süre sonunda 300 µl doygun sodyum karbonat çözeltisi eklenerek tekrar vortekslenen tüp, ağız kapatılarak 40 °C'deki su banyosunda 30 dk bekletilmiştir. Bu süre sonunda örneğin 765 nm'de absorbanısı okunmuştur (UV-1601 Shimadzu).

*Çalışma doğrusu:* Toplam fenol derişim analizinde standart olarak pirogallol kullanılmıştır. Pirogallolün etil alkol çözeltisi içinde hazırlanan farklı derişimleri ile çalışma doğrusu çizilmiş ve örneklerin toplam fenol derişimi pirogallol eşdeğeri olarak (mg prigallol/L) hesaplanmıştır. Hazırlanan çalışma doğrusu Şekil 3.3'de yer almaktadır. Fenol giderim yüzdesi ise Eş.(1) yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Fenol giderimi} = \frac{[(\text{Başlangıçtaki toplam fenol derişimi} - \text{Örneğin toplam fenol derişimi}) / (\text{Başlangıçtaki toplam fenol derişimi})] * 100}{(1)}$$



Şekil 3-3 Toplam fenol derişimi için hazırlanan çalışma doğrusu (pirogallol cinsinden)

### 3.3.3 Kimyasal oksijen ihtiyacı

Sıvı örneklerin kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) değerleri kapalı reflüks kolorimetrik yöntemi ile (APHA-5220C) Düzen Norwest Çevre Sağlık Hizmetleri Eğitim Danışmanlık Hizmetleri Ticaret A.Ş.de (Biyolojik Bilimler Araştırma Geliştirme ve Üretim A.Ş.) ölçülmüştür (APHA-AWWA, 1992).

### 3.3.4 pH ölçümü

Örneklerin pH değerinin zamanla değişimi pHmetre (Sartorius PP25) yardımıyla izlenmiştir.

### 3.3.5. Analizlerin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği



Zeytin karasuyunun biyolojik arıtımı ile ilgili yapılan analizlerin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini göstermek için tekrarlı analizlerde yapılmış ve elde edilen veriler kullanılarak standart sapma değerleri hesaplanmıştır (EK 2).

## 4 ARAŞTIRMA BULGULARI

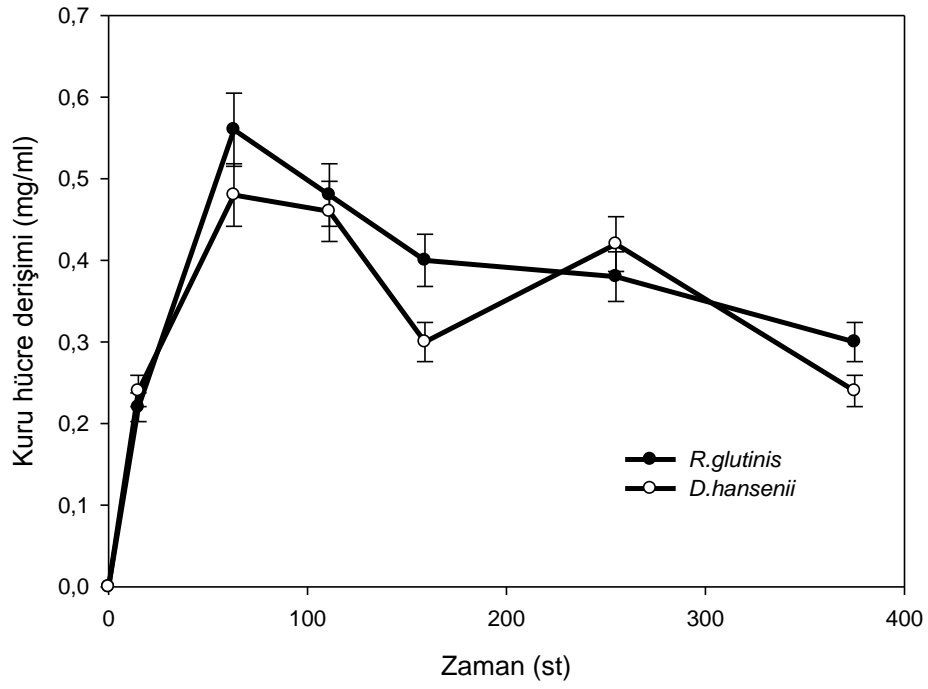
### 4.1 *Rhodotorula glutinis* ve *Debaryomyces hansenii*'nin Zeytin Karasuyunun Biyoarıtımında Kullanılabilirliklerinin Karşılaştırılması

#### 4.1.1 *Rhodotorula glutinis* ve *Debariomyces hansenii*'nin zeytin karasuyu ortamına adaptasyonları

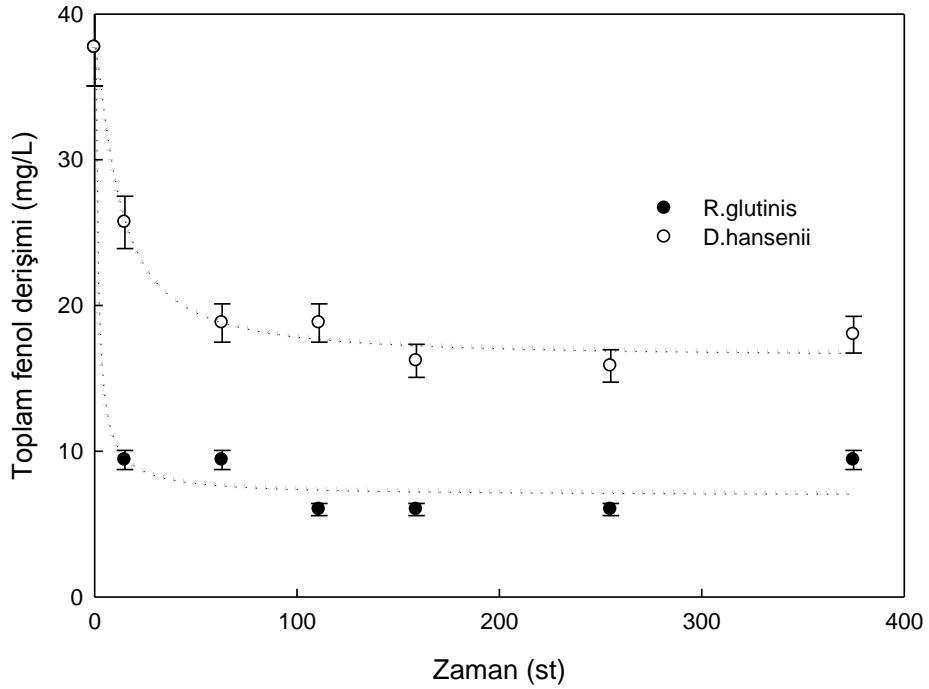
*Rhodotorula glutinis* ve *Debaryomyces hansenii* mayaları, zeytin karasuyu ortamındaki aktivitelerinin incelenmesi amacıyla, öncelikle UYM agar ortamından seyreltilmemiş karasu ortamına aktarılmıştır. Ancak, bu ortamlarda etkin bir hücresel aktivite gözlenmemesi üzerine, bu iki türün de karasu ortamına adapte edilmeleri için çeşitli denemeler yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle UYM ortamında çoğalan mikroorganizmalar, saf suya %10, 20 ve 30 (h/h) oranında karasu eklenerek hazırlanan UYM agar ortamlarına aktarılmıştır. İlk aktarımlarda hücre çoğalmasının uzun sürmesine ve çoğalmanın zayıf olmasına karşın 24 st'ten daha uzun inkübasyon sürelerinde ve karasu içeren agar ortamlarına tekrarlanan aktarımlar ile hücreler bu ortamlara adapte olmuş ve daha hızlı çoğalma göstermişlerdir. Bu şekilde yapılan ardışık aktarmalar sonucu her iki tür de %100 zeytin karasuyu içeren agar ortamlarında (ZK agar) çoğalma göstermişlerdir.

İkinci denemede, *Rhodotorula glutinis* ve *Debaryomyces hansenii*'nin sıvı zeytin karasuyu ortamındaki hücresel etkinliklerini incelemek amacıyla, her iki tür de %5 (h/h) karasu ile hazırlanan UYM agarlara aktararak 24 st boyunca inkübe edilmişlerdir. Denemede toplam fenol derişimi (TF)=780 mg/L, pH=4.22 ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ)=55013 mg O<sub>2</sub>/L olan karasu kullanılmıştır. Agar ortamında çoğaltılmış olan mayalar, daha sonra sıvı çoğalma ortamlarına aktarılmıştır. Çoğalma ortamlarının hazırlanmasında zeytin karasuyu 12000xg'de 10 dk santrifüjlenerek kullanılmıştır. Karasu, saf su ile %5'e (h/h) seyreltildikten sonra 1 M NaOH ile pH=5.0'a ayarlanmıştır. 2 g/L amonyum sülfat ve 1 g/L maya özütü eklenen toplam 200 ml'lik ortamlar, 500 ml'lik erlenlere konularak otoklavda sterilize edilmiştir. Mayalar iki ayrı erlendeki ortamlara

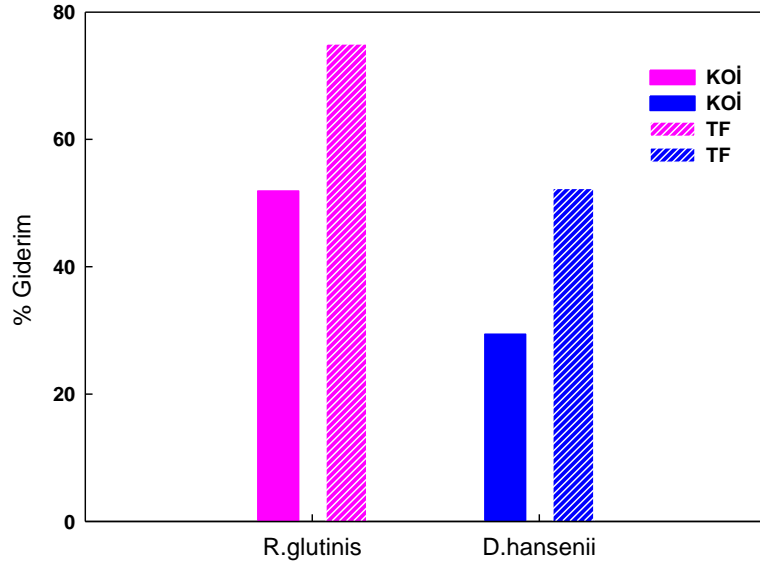
aktarıldıktan sonra, 150 rpm ve 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince belirli zamanlarda ortamlardan örnek alınarak pH değişimi, kuru hücre miktarı ve toplam fenol derişimi izlenmiştir. Ayrıca başlangıç ve bitişte alınan örneklerde KOİ analizi yapılmıştır. Yaklaşık 400 st süren denemede, her iki maya türünün de 50 st gibi bir süre sonunda logaritmik çoğalma fazının sonuna ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.1). Ulaşılan en yüksek biyokütle derişimleri ise *R. glutinis* ve *D. hansenii* için sırası ile 0.56 mg/ml ve 0.48 mg/ml'dir. Çoğalma sonundaki toplam fenol giderimi ise daha fazla çoğalmanın olduğu *R. glutinis* ortamında %75 ve *D. hansenii* ortamında ise %52 olarak bulunmuştur (Şekil 4.2, 4.3). Bu bulgu, fenol gideriminin biyokütle miktarı ile orantılı olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde KOİ gideriminde de benzer orantı görülmektedir. %5 karasu ortamında *D. hansenii* %24'lük KOİ giderimi sağlarken, *R. glutinis* %52 giderim sağlamıştır (Şekil 4.3). Yapılan çalışmalarda hücre çoğalması ve toplam fenol giderimi ile birlikte pH'da da artış gözlenmiştir. Her iki maya ile biyoarıtım sonunda ortamların pH değerleri 8.0'ın üzerine çıkmıştır (Şekil 4.4). Yapılan biyolojik arıtımlarda kontrol olarak maya aktarılmamış abiyotik ortam da aynı koşullarda tutulmuştur; ancak bu ortamda izlenen parametrelerde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu denemenin sonucu olarak *R. glutinis*'in zeytin karasuyu ortamında daha başarılı bir arıtım sağladığı belirlenmiştir.



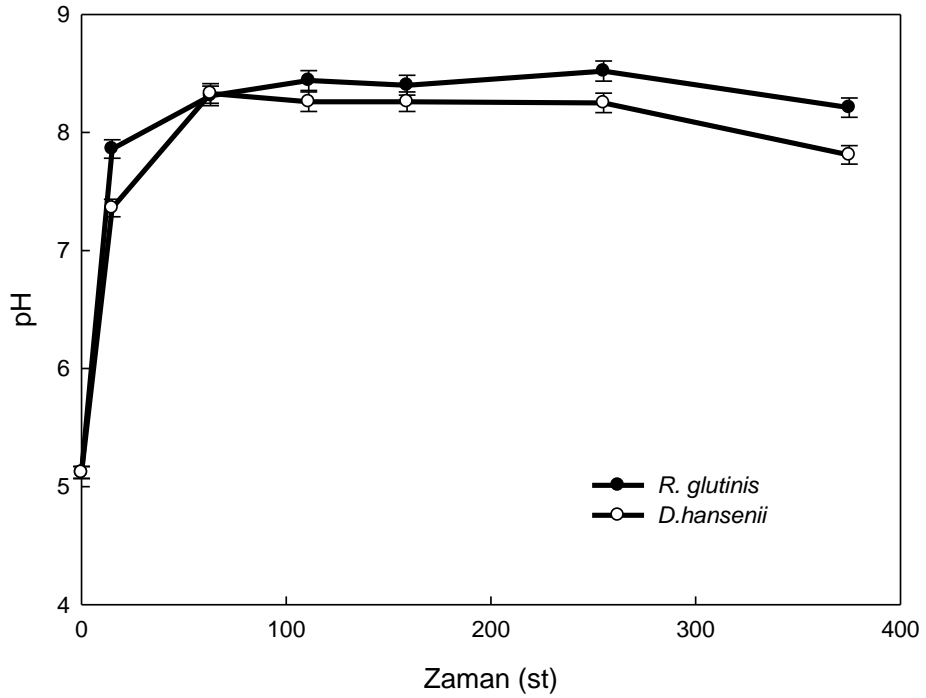
Şekil 4-1 *R. glutinis* ve *D. hansenii*'nin %5 zeytin karasuyu içeren biyoarıtım ortamında çoğalma eğrileri (T=30 °C, N=150 rpm)



Şekil 4-2 . *R. glutinis* ve *D. hansenii* ile yapılan %5 zeytin karasuyu içeren biyoarıtım ortamında toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)



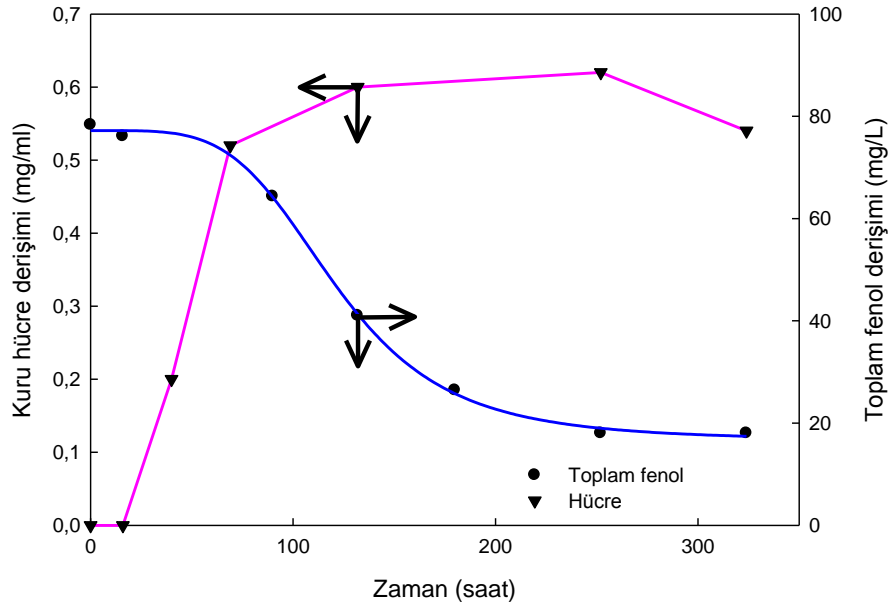
Şekil 4-3 *R. glutinis* ve *D. hansenii* ile yapılan %5 zeytin karasuyu içeren biyoarıtım sonunda KOİ ve TF giderimleri (T=30 °C, N=150 rpm)



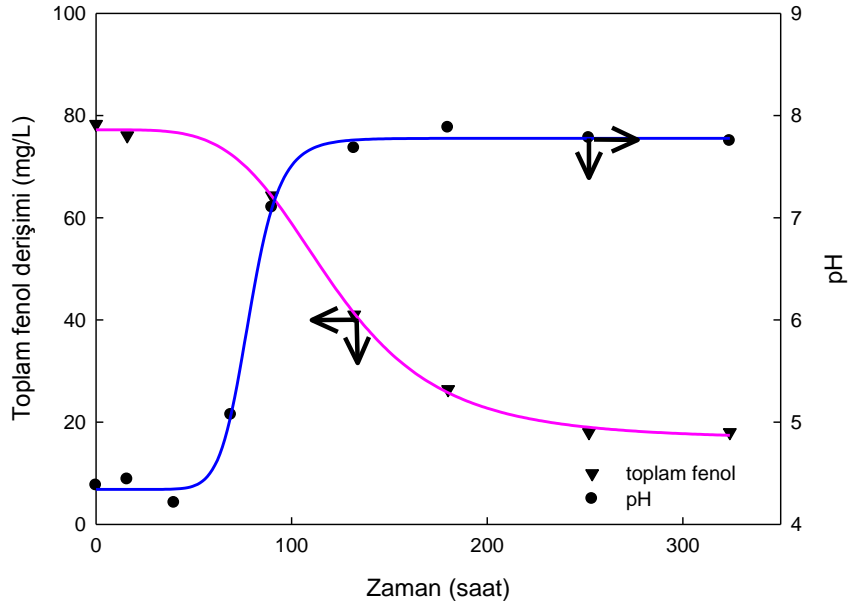
Şekil 4-4 *R. glutinis* ve *D. hansenii* ile yapılan %5 zeytin karasuyu içeren biyoarıtım ortamında pH değerinin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)

*Rhodotorula glutinis* ve *Debaryomyces hansenii*'nin zeytin karasuyunun fenollerini karbon kaynağı olarak kullanım potansiyellerinin görülmesinin ardından, sıvı ortamda %5'den daha yüksek karasu derişimine çıkılabilmesi için yeni bir deneme tasarlanmıştır. Seyreltik karasu ortamlarından başlanılarak, bu ortamlarda çoğalmış mayaların yeni hazırlanan daha derişik karasu ortamlarına aktarılarak, yeni ortama ileri adaptasyonlarına çalışılmıştır. Santrifüjlenmiş zeytin karasuyu ile hazırlanan ve %5, 10, 25 ve 40 karasu içeren 200 ml hacimli ortamlar, 2 g/L amonyum sülfat, 1 g/L maya özütü ile desteklenerek 500 ml erlenlerde otoklavda sterilize edilmiştir. Daha sonra UYM agar ortamında çoğaltılan mayalar ilk önce %5 karasu ortamına aktarılarak 150 rpm ve 30 °C' de çalışan çalkalamalı hava banyosuna konulmuştur. Bu ortamlarda hücre çoğalması gözlendikten sonra, ortamdaki 5 ml hücreli süspansiyon %10 karasu ortamına aktarılmıştır. %10 karasu ortamında çoğalma gözlenince bu ortamdaki %25 karasu ortamına ve ardından benzer şekilde %40 karasu ortamına hücreler logaritmik büyüme fazındalarken aktarılmıştır. Ortamlardan belirli zamanlarda alınan 5'er ml örneklerde kuru hücre ağırlığı, toplam fenol giderimi ve pH değerleri ölçülmüş; ayrıca %25 karasu ortamı için ilk ve son örneklerde KOİ tayini yapılmıştır.

*Debaruomeyces hansenii* %10 karasu ortamında 16 st süren bir uyum fazının ardından çoğalmaya başlayarak eş zamanlı olarak fenol tüketmeye başlamıştır (Şekil 4.5). Fenollerin yıkılmasıyla birlikte de pH değerinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.6). Biyoarıtım sürecinde %5 karasu ortamında 0.48 mg/ml olan en yüksek biyokütle derişimi ise %10 karasu ortamında 0.62 mg/ml düzeyinde kadar yükselmiştir. Bu ortamda toplam fenol giderimi ise %77 olarak hesaplanmıştır. %10 karasu ortamındaki hücreler üstel çoğalma fazında iken bu ortamdaki 5 ml hücreli süspansiyon %25 karasu ortamına aktarılmıştır. Ancak *D. hansenii* %25 karasu ortamında 430 st süren inkübasyon süreci sonunda çoğalmamıştır.



Şekil 4-5 *D.hansenii*'nin %10 ZK ortamında çoğalma eğrisi ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)

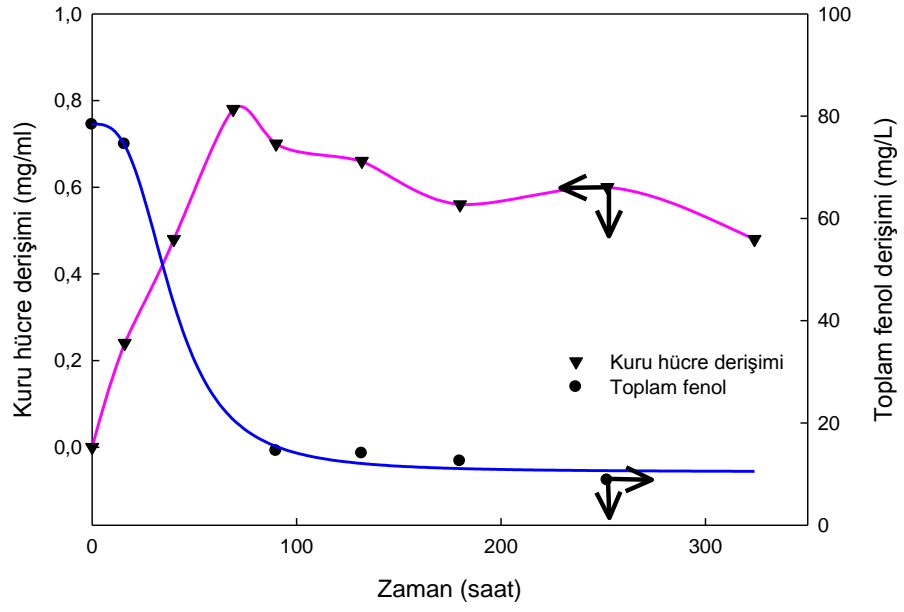


Şekil 4-6 *D. hansenii* ile %10 ZK ortamında yapılan biyoarıtımda pH değerinin ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 pm)

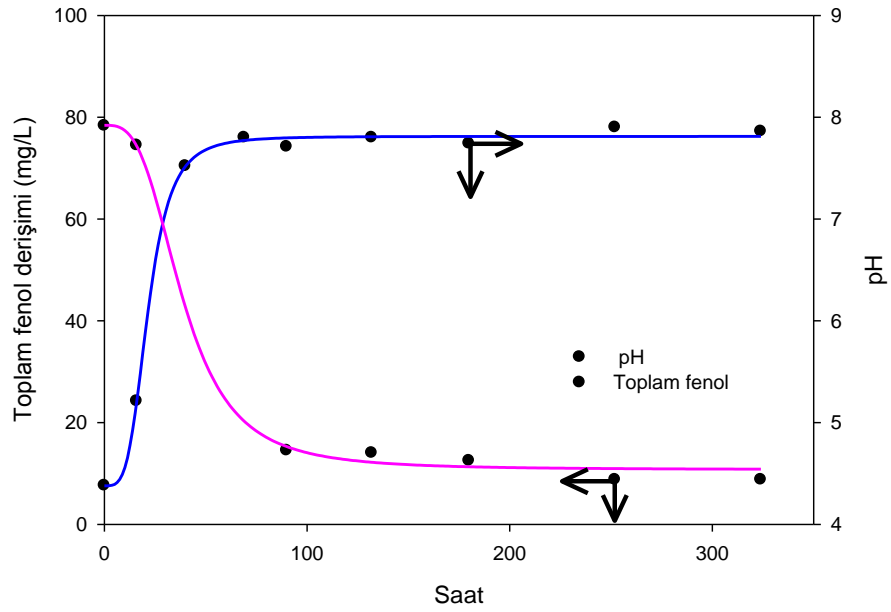
*Rhodotorula glutinis* ise % 10 zeytin karasuyu ortamında *Debaryomyces hansenii*'ye göre daha kısa bir uyum fazı göstererek hücre çoğalması ile birlikte fenollerini metabolize etmeye başlamıştır (Şekil 4.7). Fenollerin tüketilmesiyle birlikte de pH artışı gözlenmektedir (Şekil 4.8). *R. glutinis* %10 ZK ortamında 0.78 mg/ml biyokütle düzeyine kadar çoğalmış ve toplam fenol giderimi %87 olarak hesaplanmıştır. %10 zeytin karasuyu ortamından %25 ZK ortamına aktarılan *R. glutinis*, *D. hansenii*'nin aksine bu ortamda hücresel aktivite göstermiştir. *R. glutinis*, %25 ZK ortamında 212 st süren bir uyum fazından sonra çoğalarak fenol yıkımına başlamış (Şekil 4.9) ve ortamın pH değeri de artırmıştır (Şekil 4.10). Bu ortamda en yüksek biyokütle derişimi 1.48 mg/ml, toplam fenol ve KOİ giderimleri ise sırası ile %88 ve %55 olarak ölçülmüştür. %25 karasu ortamında hücre çoğalmasının ardından üstel çoğalma fazında ortamdan 5 ml hücre süspansiyonu alınarak yeni hazırlanan %25 ZK ortamına aktarım yapılmıştır. Bu ortamda da hücre çoğalması görülmüş ve yedniden %25 ZK ortamı hazırlanıp aynı işlem tekrarlanmıştır. Tekrarlayan aktarımlar sonucunda %25 lik ortamlarda toplam fenol giderimi sırası ile %55, 56 ve 58 olarak ölçülmüştür. Ortamlarda her aktarımda uyum fazının kısaldığı gözlenmiştir. Birinci %25 ZK ortamında uyum fazı 200 st iken üçüncü %25 ZK ortamında uyum fazı 100 st'in altına düşmüştür. Üçüncü %25 ortamından %40 karasu içeren ortama yapılan hücre aktarımında ise 430 st süren inkübasyon süreci hücresel aktivite gözlenmemiştir.

Bu deneme grubunda hem *Rhodotorula glutinis*'in hem de *Debaryomyces hansenii*'nin zeytin karasuyu ortamına adapte olabildiği görülmüştür. %25 karasu ortamına adapte olan *R. glutinis*'i muhafaza edebilmek için, %25 ve %100 karasu içeren agar ortamlarına (%25 ZK agar ve %100 ZK agar), %25 sıvı karasu ortamından hücre alınarak aktarım yapılmıştır. 30 °C'de 60 st süren inkübasyonun ardından çoğalan *R. glutinis* kültürleri daha sonraki denemelerde kullanılmak üzere buzdolabına konulmuştur.

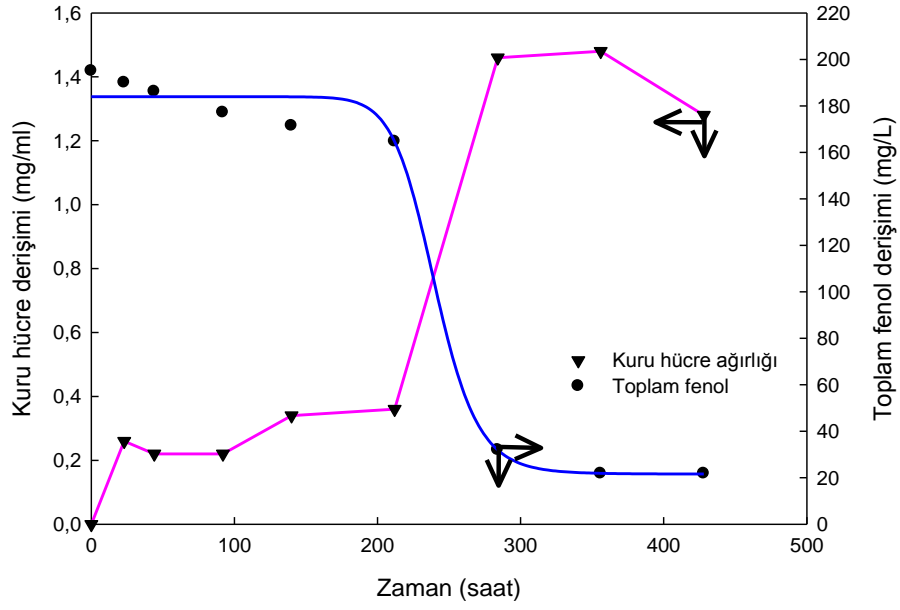




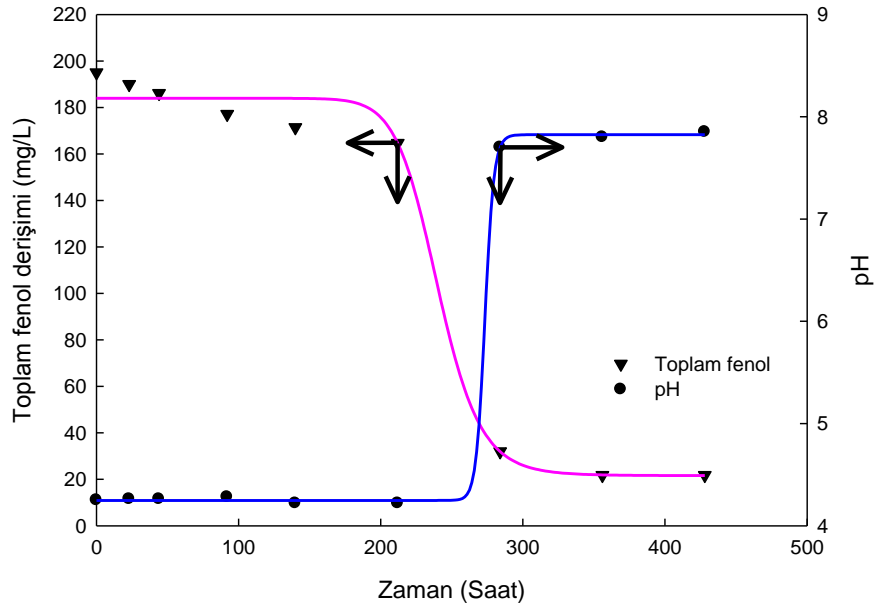
Şekil 4-7 *R. glutinis*'in %10 ZK ortamında çoğalma eğrisi ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)



Şekil 4-8 *R. glutinis* ile %10 ZK ortamında yapılan biyoarıtımda pH değerinin ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)



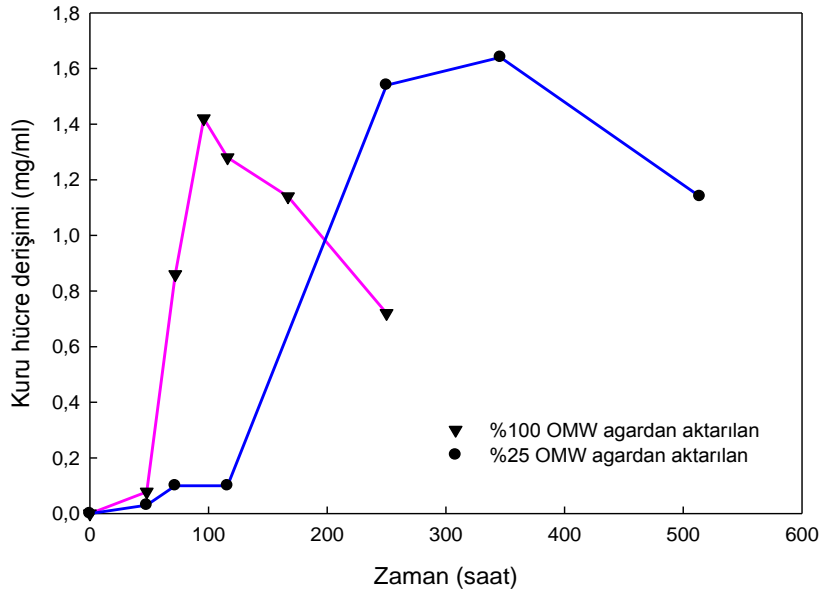
Şekil 4-9 *R. glutinis* ile %25 ZK ortamındaki çoğalma eğrisi ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)



Şekil 4-10 *R. glutinis* ile %25 ZK ortamında yapılan biyoarıtımda pH değerinin ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=150 rpm)

Katı ortamın zeytin karasuyuna adaptasyon etkisini incelemek amacıyla da ayrı bir deneme tasarlanmıştır. Bunun için UYM agar, %25 karasu içeren UYM agar (%25 ZK agar) ve

%100 karasu içeren UYM agar (%100 ZK agar) ortamları hazırlanarak dolapta muhafaza edilen hücrelerden sub-kültür yapılmıştır. Hazırlanan UYM agar ortamına UYM agardaki, %25 ZK agar ve %100 ZK agar ortamlarına ise dolapta muhafaza edilen %25 ZK agar ve %100 ZK agardaki *Rhodotorula glutinis* kültürlerinden aktarma yapılmıştır. İlk aktarımdaki 60 st süren inkübasyon süresinin, yeni aktarılan ortamlarda 24 ste düştüğü gözlenmiştir. Katı agar ortamlarındaki çoğalmanın ardından *R. glutinis*, bir önceki denemeye aynı şekilde hazırlanan 500 ml erlenlerdeki 200 ml 2 g/L amonyum sülfat, 1 g/L maya özütü destekli %25 karasu ortamlarına aktarılarak 30 °C, 150 rpm de çalışan çalkalamalı hava banyosuna konulmuştur. Yaklaşık 400 st süren inkübasyon süreci sonunda UYM agardan aktarılan mayalarda çoğalma gözlenmezken, %25 ZK agardan ve %100 ZK agardan aktarılan mayalar çoğalarak biyolojik etkinlik göstermişlerdir. %100 ZK agar ortamından aktarılan hücreler, %25 ZK agardan aktarılanlardan yaklaşık 154 st önce üstel çoğalma fazının sonuna ulaşmışlardır (Şekil 4.10). Uyum fazlarının farklılık göstermesine karşın her iki ortamda da toplam fenol giderimi eşit olup %88 olarak ölçülmüştür.



**Şekil 4-11** %25 ZK agar ve %100 ZK agar ortamlarından %25 zeytin karasuyu içeren biyoyarıtım ortamında aktarılan *R. glutinis*'in çoğalma eğrileri (T=30 °C, N=150 rpm)

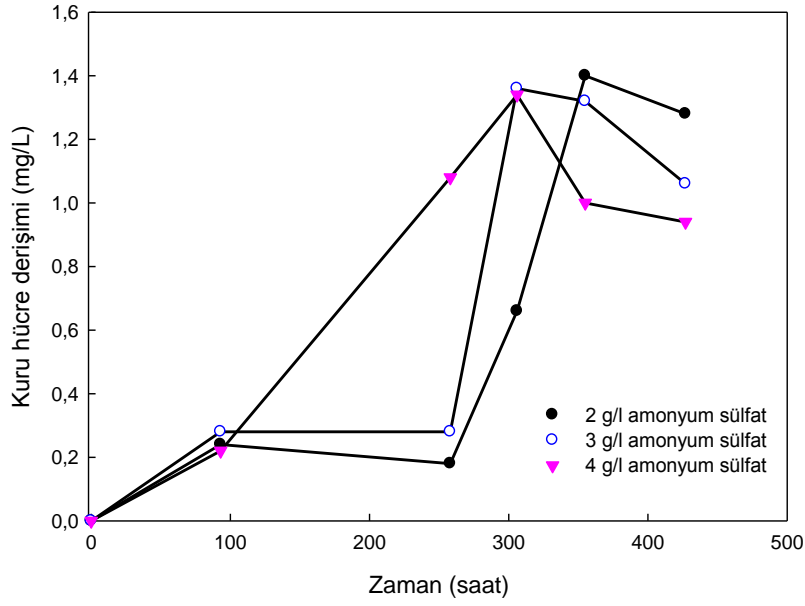
Bu deneme grubunda elde edilen sonuçlar *Rhodotorula glutinis*'in zeytin karasuyu ortamına daha iyi adapte olduğunu göstermiştir. Bu nedenle daha ileri arıtım ve adaptasyon denemelerine *R. glutinis* ile devam edilmesine karar verilmiştir.

## **4.2 *Rhodotorula glutinis* ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı**

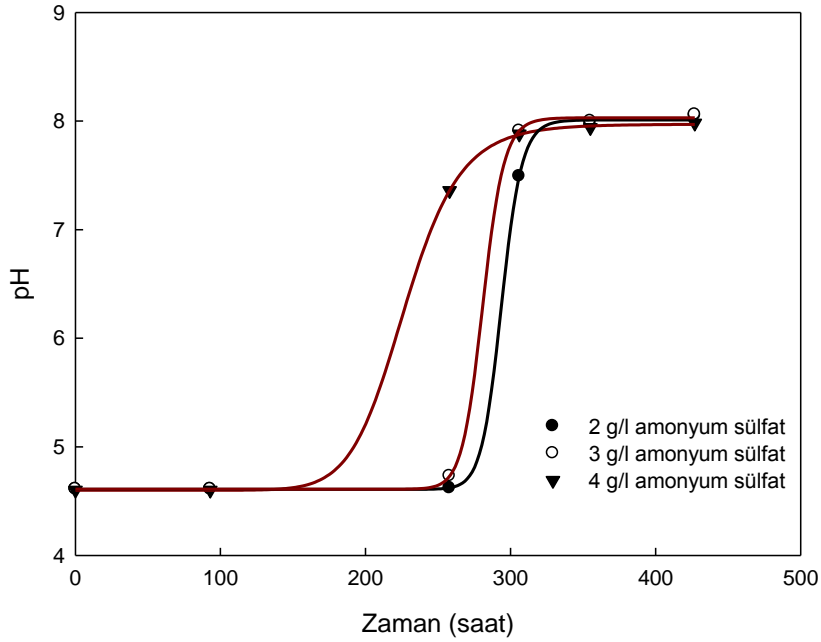
*Rhodotorula glutinis*'in zeytin karasuyu ortamında gösterdiği aktivitenin ardından, ortam koşullarının iyileştirilerek daha iyi biyoarıtım sağlanabilmesi amacıyla farklı parametrelerin denenmesi çalışmalarına başlanılmıştır. Biyoarıtım koşullarını iyileştirmek için ZK derişimi, azot kaynağı ve derişimi, sıcaklık, çalkalama hızı, santrifüj ve sterilizasyon gibi farklı parametrelerin etkisi ayrı ayrı incelenmiştir.

### **4.2.1 Azot kaynağı ve azot derişimi etkisi**

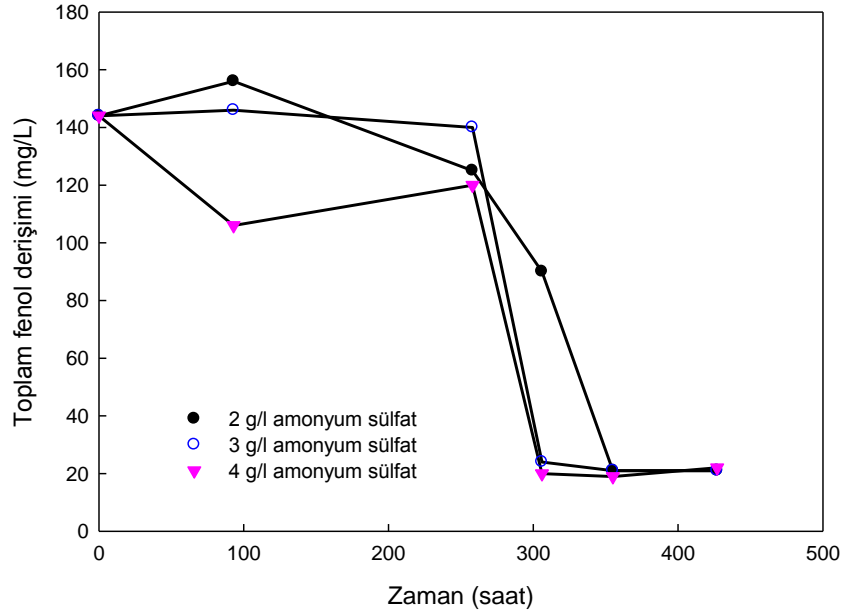
Hüresel çoğalmada önemli bir parametre olan başlangıç azot derişiminin etkisi öncelikle amonyum sülfat kullanılarak incelenmiştir. Denemede TF=622 mg/L, pH=4.6 ve KOİ=38453 mg O<sub>2</sub>/L olan zeytin karasuyu kullanılmıştır. 2, 3 ve 4 g/L amonyum sülfat içeren %25 karasu arıtım ortamları hazırlanırken zeytin karasuyu santrifüjlenmiş ve 1 g/L maya özütü ile desteklenmiştir. 500 ml hacimli erlenlere konulan 200 ml ortamlar, otoklavda sterilize edildikten sonra %100 ZK agarda çoğalmış *Rhodotorula glutinis* kültürleri ile inokule edilmiş ve ardından 30 °C ve 150 rpm de çalışan çalkalamalı hava banyosuna konulmuştur. Bu denemede, başlangıç azot miktarı arttıkça, hücrelerin uyum fazlarının kısaldığı gözlenmiştir. Ancak ulaşılan en yüksek biyokütle miktarında (Şekil 4.12), pH artışında (Şekil 4.13) ve toplam fenol gideriminde (Şekil 4.14) önemli ölçüde bir farklılık gözlenmemiştir. Biyoarıtım sonunda bütün ortamlarda toplam fenol giderimi %85 olarak hesaplanmıştır. KOİ giderimi ise başlangıç derişimleri 2, 3 ve 4 g/L amonyum sülfat olan ortamlar için sırası ile %34, 45 ve 45 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4-12 *R. glutinis* ile %25 zeytin karasuyu ortamında 2, 3, 4 g/L amonyum sülfat derişiminin hücre çoğalmasına etkisi (T=30 °C, N=150 rpm)



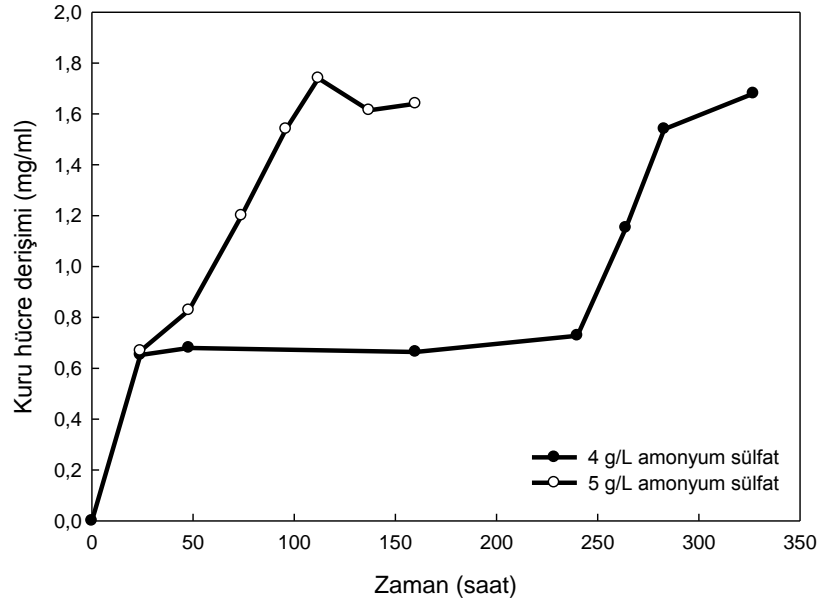
Şekil 4-13 *R. glutinis* ile %25 zeytin karasuyu ortamında 2, 3, 4 g/L amonyum sülfat derişiminin pH değişimine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm)



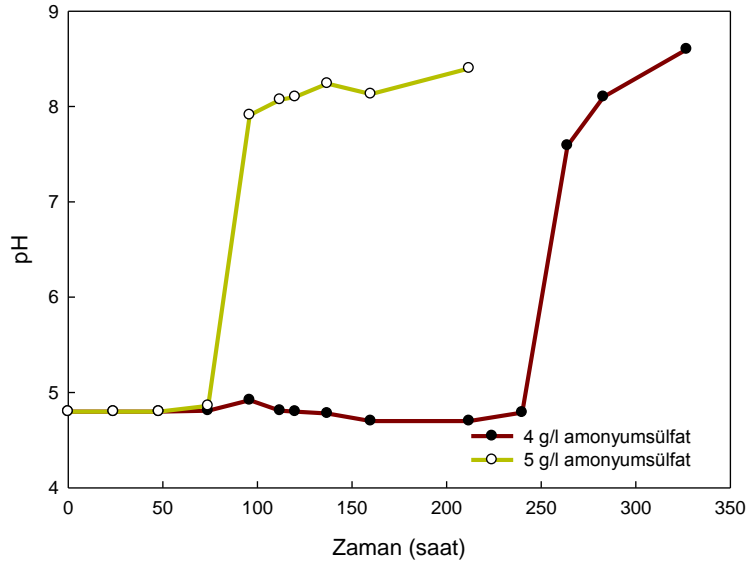
**Şekil 4-14** *R. glutinis* ile %25 zeytin karasuyu ortamında 2, 3, 4 g/L amonyum sülfat derişiminin toplam fenol giderimine etkisi (T=30 °C, N=150 rpm)

Bu denemeye ek olarak, *R. glutinis* hücrelerinin ZK ortamında azot derişimine doyum noktasını görmek amacıyla yeni bir deneme yapılmıştır. Denemede %25 zeytin karasuyu ile hazırlanan ortamlar 1 g/L maya özütü ile 4 ve 5 g/L amonyum sülfat ile desteklenmiştir. Ortamlar bir önceki denemeye aynı koşullarda inokule edilerek inkübasyona bırakılmışlardır.

Hücre çoğalma eğrilerine bakıldığı zaman 5 g/L amonyum sülfat ortamında, uyum fazı 4 g/L amonyum sülfat içeren ortama göre yaklaşık 200 st daha kısadır (Şekil 4.15). Ancak toplam fenol giderimleri her iki ortamda da benzer olarak %91 civarındadır. Her iki ortamda son pH düzeyleri de benzerdir ve 8.5 civarındadır (Şekil 4.16).

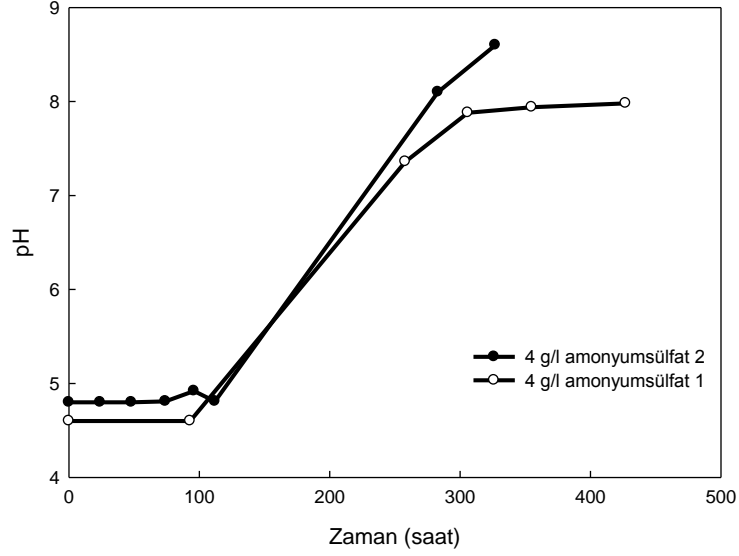


**Şekil 4-15** *R. glutinis* ile yüksek amonyum sülfat derişimlerinde gerçeleştirilen biyoarıtımlarda kuru hücre derişiminin zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özütü, T=30 °C, N=150 rpm)



**Şekil 4-16** *R. glutinis* ile yüksek amonyum sülfat derişimlerinde gerçeleştirilen biyoarıtımlarda pH'nın zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özütü, T=30 °C, N=150 rpm)

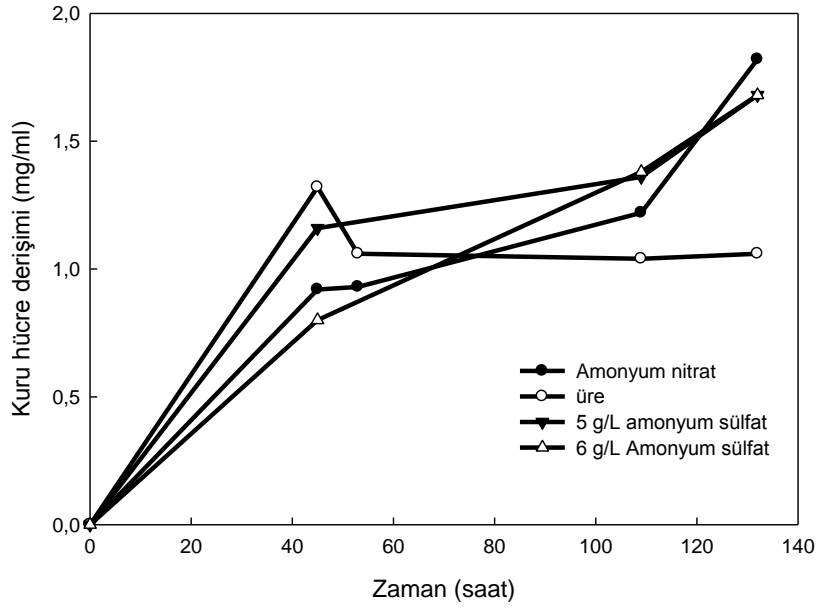
Bu denemedeki 4 g/L amonyum sülfat ortamıyla bir önceki denemedeki eşdeğer ortamlardaki hücre kinetikleri benzerlik göstermektedir ki bu durum denemelerin tekrarlanabilirliğini ortaya koymaktadır (Şekil 4.17).



**Şekil 4-17** *R. glutinis* ile 4 g/L amonyum sülfat derişiminde eşdeğer koşullarda gerçekleştirilen iki ayrı biyoarıtımda pH'n zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özütü, T=30 °C, N=150 rpm)

Amonyum sülfatla yapılan denemelerin ardından diğer azot kaynaklarının da biyoarıtıma etkisinin incelenmesi için yeni ortamlarla denemelere devam edilmiştir. %25 zeytin karasuyu (TF=900 mg/L, pH=4.31) ile hazırlanan dört ayrı ortama sırası ile 3.03 g/L amonyum nitrat, 2.27 g/L üre, 5 g/L amonyum sülfat ve 6 g/L amonyum sülfat eklenmiştir. Ortamlara eklenen amonyum nitrat ve üre miktarları, 5 g/L amonyum sülfat ortamının içerdiği azot miktarına denk olacak şekilde hesaplanmıştır. Diğer parametreler önceki deneme ile aynı olacak şekilde ortamlar steril lenerek biyoarıtım başlatılmıştır. Yaklaşık 130 st süren biyoarıtım süreci sonucunda bütün ortamlarda da hücresel aktivite gözlenmiştir (Şekil 4.18).

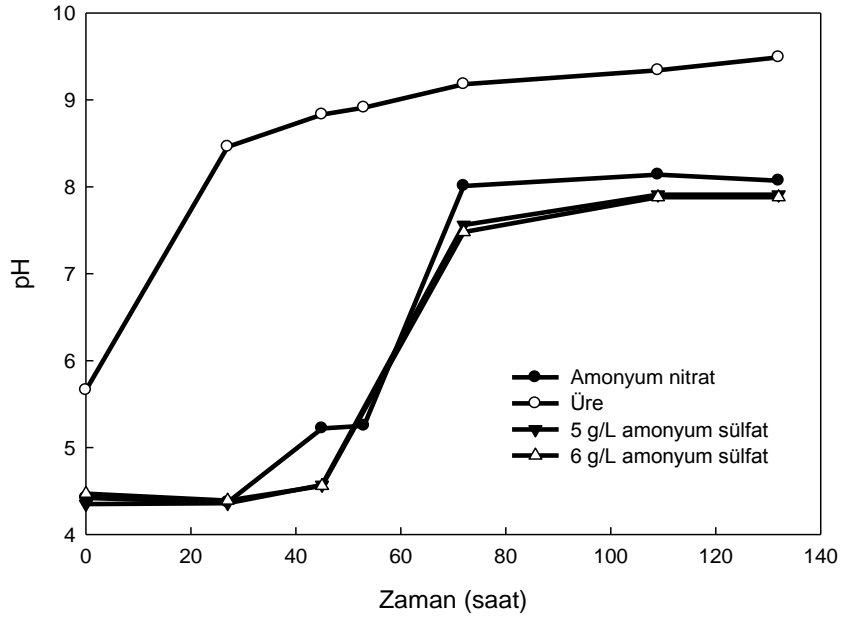




**Şekil 4-18** *R. glutinis* ile farklı azot kaynakları varlığında gerçekleştirilen biyoarıtımlarda kuru hücre derişiminin zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özütü, T=30 °C, N=150 rpm)

Farklı azot kaynakları içeren ortamlarda zamanla pH değişimlerine bakıldığında, üre içeren ortamın başlangıç pH'sının diğer ortamlardan daha yüksek olduğu gözlenmiş ve bu ortamda pH daha hızlı bir şekilde artıp diğer ortamlardan daha yüksek bir değere ulaşmıştır (Şekil 4.19). pH eğrilerine göre biyokimyasal kinetik açısından uyum fazlarında üre ortamı dışında bir fark görülmemiştir; ancak hücre çoğalma eğrileri benzerdir.

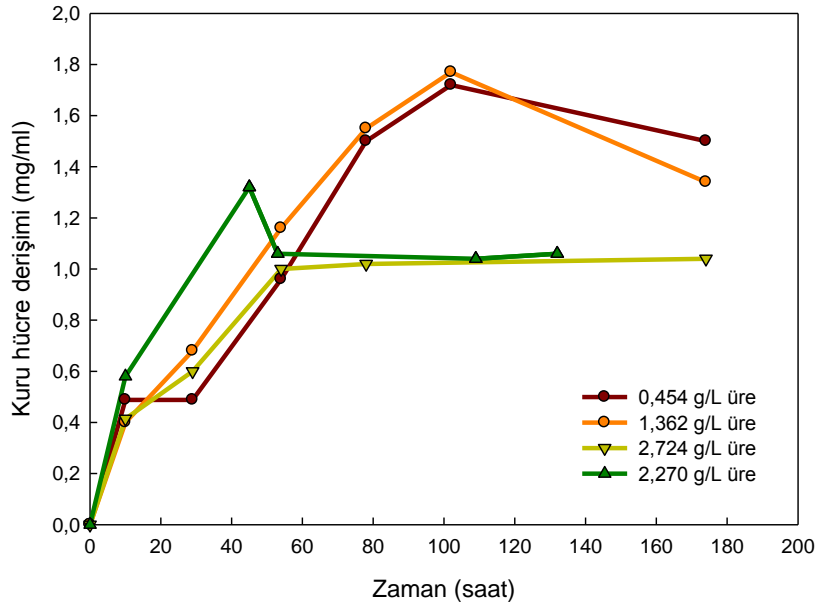
Biyoarıtım sonunda toplam fenol giderimleri ise amonyum nitrat içeren ortam için %86, üre içeren ortam için %87; 5 g/L ve 6 g/L amonyum sülfat içeren ortamlar için sırasıyla %82 ve 86 olarak hesaplanmıştır. Biyoarıtım sonundaki KOİ giderimleri ise amonyum nitrat, üre, 5 g/L ve 6 g/L amonyum sülfat ortamlarında sırası ile %44, %22, %44 ve %47 olarak hesaplanmıştır. 5 g/L ve 6 g/L amonyum sülfat ortamlarının biyoarıtım parametreleri ve ortam kinetikleri arasındaki benzerlik, bu ortamda azot bakımından doygunluğa ulaşıldığını göstermektedir.



**Şekil 4-19** *R. glutinis* ile farklı azot kaynakları varlığında gerçekleştirilen biyoarıtımlarda pH'nın zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özütü, T=30 °C, N=150 rpm)

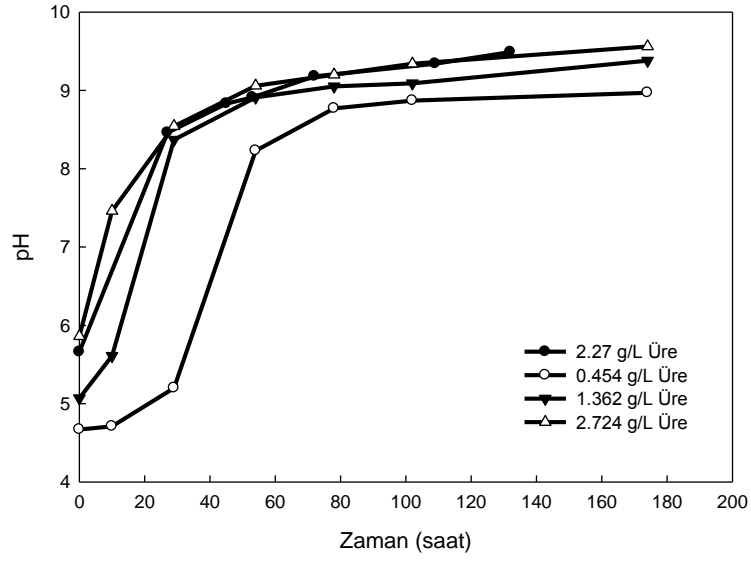
Bu denemede üre içeren ortamın başlangıç pH düzeyinin diğer ortamlardan daha yüksek olması ve ortam pH'sının diğer ortamlara göre daha hızlı artması önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Üre içeren ortamda toplam biyokütle miktarı diğer ortamlara göre daha az olsa da toplam fenol giderimi diğer ortamlardan daha yüksek çıkmış; ancak KOİ giderimi daha düşük hesaplanmıştır.

Bu denemenin ardından denemelere farklı üre derişimleri ile devam edilmesine karar verilmiştir. Bunun için %25 zeytin karasuyu ile (TF=900 mg/L, pH=4.31) sırasıyla 0.454, 1.362, 2.27 ve 2.724 g/L üre içeren ortamlar hazırlanarak bir önceki deneme ile aynı koşullarda biyoarıtımlar başlatılmıştır. Biyoarıtım süreci sonunda bütün ortamlarda hücresel aktivite gözlenmiştir (Şekil 4.20).



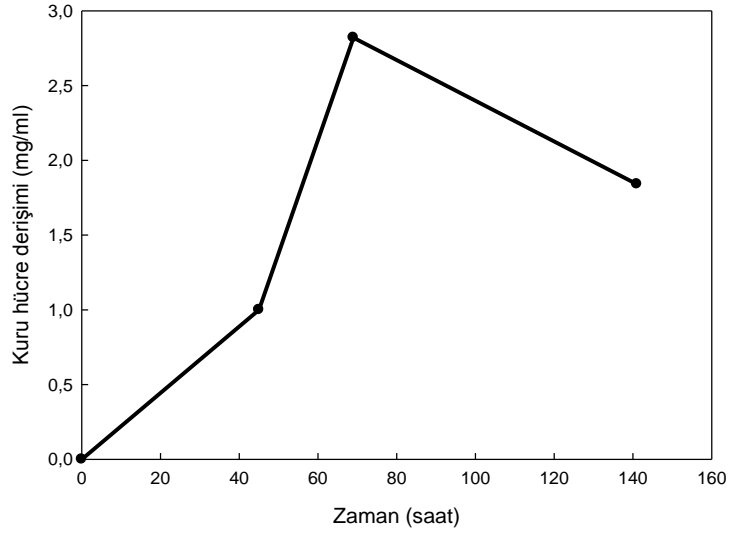
**Şekil 4-20** *R. glutinis* ile farklı üre derişimlerinde gerçekleştirilen biyoarıtımlarda kuru hücre derişiminin zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özütü, T=30 °C, N=150 rpm)

Hücre çoğalma eğrilerine göre başlangıç üre derişimi arttıkça toplam biyokütle miktarında azalma olmaktadır. Bu durum ürenin aynı zamanda hücreler üzerinde toksik etkisi yaptığını gösteriyor olabilir. Üre miktarı arttıkça ortamların başlangıç pH düzeyleri ve pH artış hızları artmaktadır (Şekil 4.21). Ortamların toplam fenol giderimleri artan üre derişimi için sırası ile %84, 86, 86 ve 86 olarak hesaplanmıştır. KOİ giderimleri de aynı sırayla %47, 32, 22 ve 33 olarak bulunmuştur



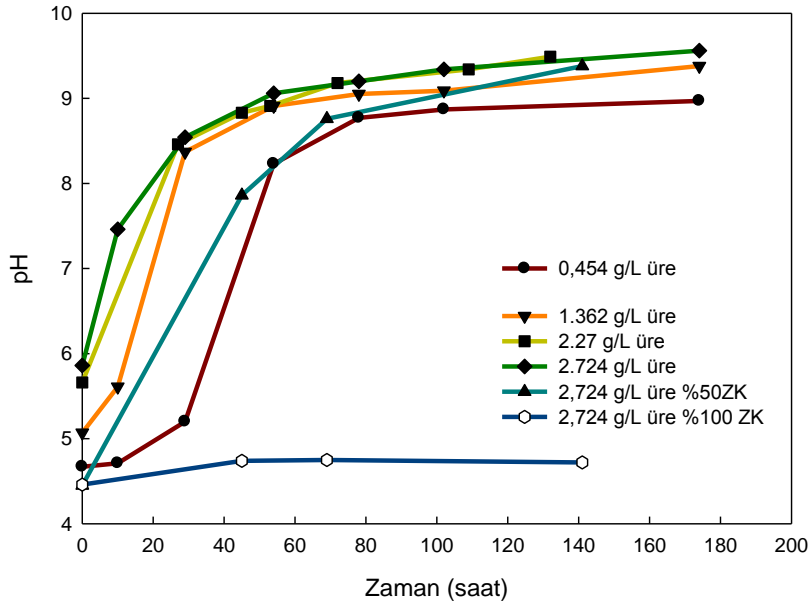
**Şekil 4-21** *R. glutinis* ile farklı üre derişimlerinde gerçekleştirilen biyoarıtımlarda pH'ın zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özütü, T=30 °C, N=150 rpm)

Ürenin zeytin karasuyu ortamında hücre çoğalmasına pozitif etkisinin daha yüksek karasu derişimlerinde denenmesi amacıyla 2.724 g/L üre içeren %50 ve %100 zeytin karasuyu ortamları hazırlanarak diğer ortamlarla aynı koşullarda biyoarıtım gerçekleştirilmiştir. Biyoarıtım süreci sonunda %50 zeytin karasuyu ortamında hücre çoğalması gözlenirken (Şekil 4.22) %100 karasu ortamında herhangi bir hüresel aktivite gözlenmemiştir.



**Şekil 4-22** *R. glutinis* ile 2.724 g/L üre derişiminde ve %50 zeytin karasuyu ile gerçekleştirilen biyoartımda kuru hücre derişiminin zamanla değişimi (%25 ZK, 1 g/L maya özütü, T=30 °C, N=150 rpm)

pH düzeyleri bakımından diğer ortamlar ile karşılaştırıldığında ise %50 karasu ortamının başlangıç pH düzeyinin, eşdeğer miktarda üre içeren %25 karasu ortamından daha düşük olduğu, ancak ulaşılan son pH düzeylerinin benzer olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.23). %50 zeytin karasuyu içeren ortamda toplam fenol ve KOİ giderimleri ise sırası ile %87 ve %26 olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4-23** *R. glutinis* ile üre içeren ortamlarda gerçekleştirilen tüm biyoarıtımlarda pH'ın zamanla değişimi (%25, %50, %100 ZK, 1 g/L maya özütü, T=30 °C, N=150 rpm)

Bu veriler ışığında artan üre derişiminin, her ne kadar biyokütle miktarını ve toplam KOİ giderimini düşürse de, ürenin yüksek karasu derişimlerinde hücrelerin yaşayabilmesi için önemli olduğu görülmüştür. Bu nedenle denemelere daha yüksek zeytin karasuyu içeren ortamlarda biyoarıtımın başarılabilmesi için, üre miktarının karasu derişimi ile orantılı olarak artırılarak devam edilmesi planlanmıştır.

#### 4.2.2 *Rhodotorula glutinis*'in yüksek zeytin karasuyu ortamına adaptasyonu için kademeli biyoarıtım

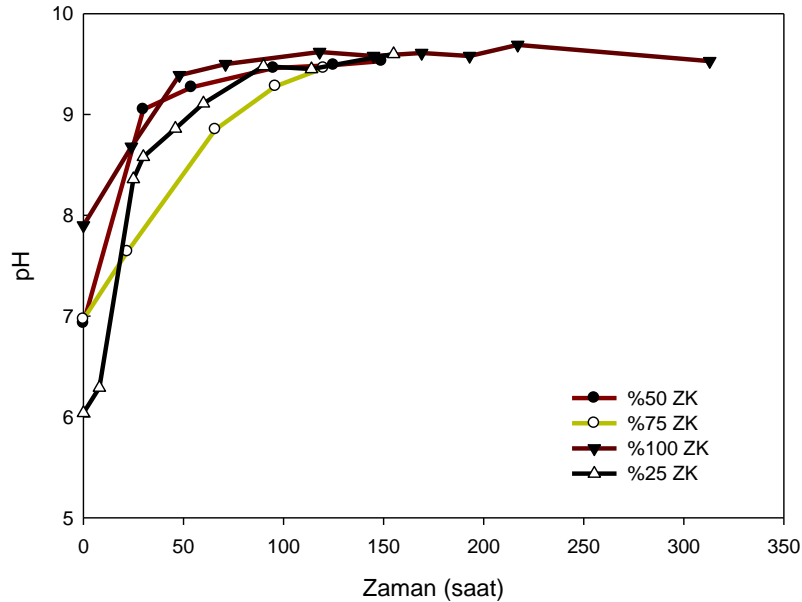
*Rhodotorula glutinis* hücrelerini daha yüksek zeytin karasuyu içeren ortama adapte edebilmek amacıyla farklı karasu derişimlerinde hazırlanan ortamlarda biyoarıtımlar gerçekleştirilmiştir.

Denemeler sırası ile %25, 50, 75 ve 100 zeytin karasuyu içeren ortamlarda yapılmıştır. %25 zeytin karasuyu ortamı 2.27 g/L üre içermektedir. Ancak %50, 75 ve 100 zeytin

karasuyu ortamlarında azot/karasu oranı (g/L) sabit olacak şekilde eklenen üre miktarı (2,27, 4,54, 6,81, 9,08 g/L) karasu ile orantılı olacak şekilde arttırılmıştır. Maya özütü derişimi tüm ortamlarda 1 g/L dir. Denemeler 500 ml hacimli erlenlerde 200 ml toplam ortam hacim ile 150 rpm karıştırma hızı ve 30 °C sıcaklıkta çalkalamalı hava banyosunda gerçekleşmiştir.

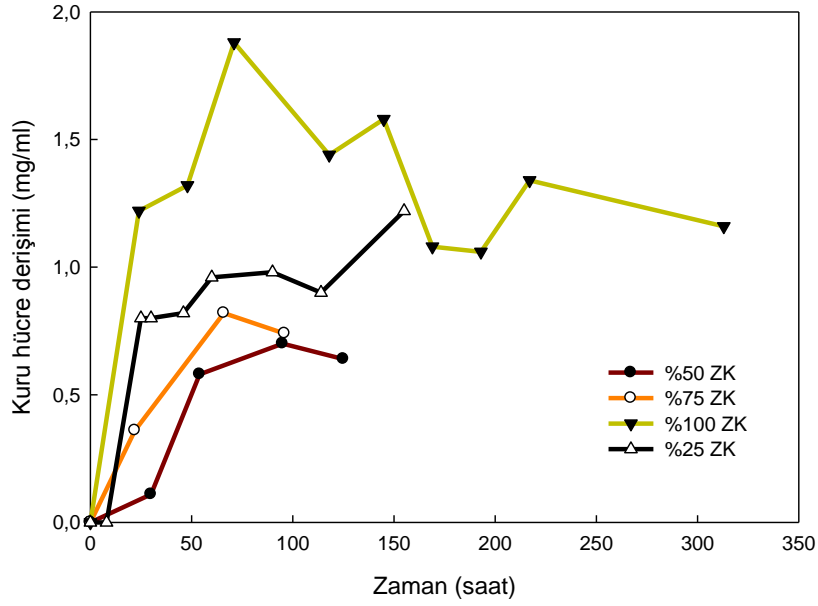
Denemeye %25 karasu ortamı ile başlanılmıştır. Öncelikle bu ortama %100 zeytin karasuyu ile hazırlanmış agar ortamında çoğalan mayalardan aktarım yapılmıştır. Bu ortamda hücre çoğalması gözlemlendikten sonra alınan 5 ml hücreli ortam %50 zeytin karasuyu ortamına aktarılmıştır. Daha sonra aynı işlemler diğer derişimdeki ortamlar için de sırası ile yapılmıştır.

Bu şekilde kademeli aktarım ile hücrelerin %100 zeytin karasuyu ortamında yaşamaları sağlanmıştır. Bütün ortamlarda başlangıç pH'ları üre miktarlarının farklı olmalarından ötürü farklılık göstermektedir; ancak sonuç olarak ulaşılan pH düzeyleri benzerdir (pH = 9.0-9.5) (Şekil 4.24).



**Şekil 4-24** *R. glutinis* ile farklı karasu derişimindeki ortamlarda gerçekleştirilen biyoarıtımlarda pH'nın zamanla değişimi (1 g/L maya özütü, T=30 °C, N=150 rpm)

%100 zeytin karasuyu içeren ortamda en fazla hücre derişimine ulaşılmıştır (Şekil 4.25). Bu da *R. glutinis* hücrelerinin zeytin karasuyunun organik yükünü etkili bir şekilde biyokütleyle dönüştürdüklerini göstermektedir. Kademeli biyoarıtım sonrasında %25, 50, 75 ve 100 karasu içeren ortamlarda toplam fenol giderimleri sırası ile % 82, 68, 62 ve 83 olarak hesaplanmıştır. KOİ giderimleri ise gene aynı sıra ile % 26, 17, 5 ve 10'dur.



Şekil 4-25 *R. glutinis* ile farklı karasu derişimindeki ortamlarda gerçekleştirilen biyoarıtımlarda kuru hücre derişiminin zamanla değişimi (1 g/L maya özütü, T=30 °C, N=150 rpm)

Azot kaynağı etkisini incelemek üzere yapılan denemelerin sonuçları, ürenin zeytin karasuyunun *R. glutinis* ile arıtımındaki etkisinin nasıl olduğunu net olarak açıklamaya yetmemektedir. Gerçek etkinin zeytin karasuyunun sterilizasyon işleminde üre ile etkileşimi üzerinden mi, yoksa üre eklenen ortamların başlangıç pH değerlerinin diğer ortamlara göre daha yüksek olması mı olduğunu anlamak üzere iki kontrol denemesi yapılmıştır.

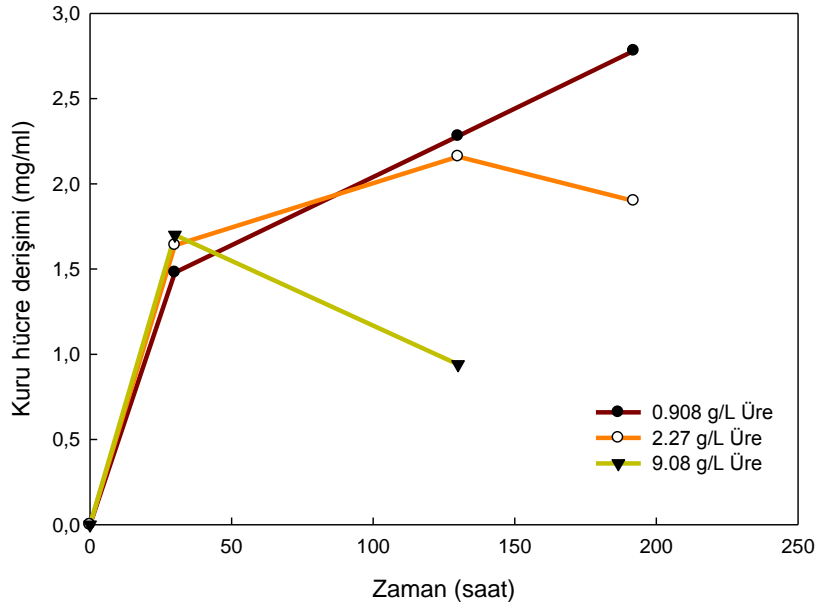
İlk denemede ürenin sterilizasyon sırasında zeytin karasuyu ile kimyasal etkileşim yapıp yapmadığı kontrol edilmiştir. Bu amaçla, pH= 4.38 olan zeytin karasuyu eş hacimde iki ortama bölünmüş; birinci ortam üre konularak, ikinci ortam ise üre konulmadan sterilize



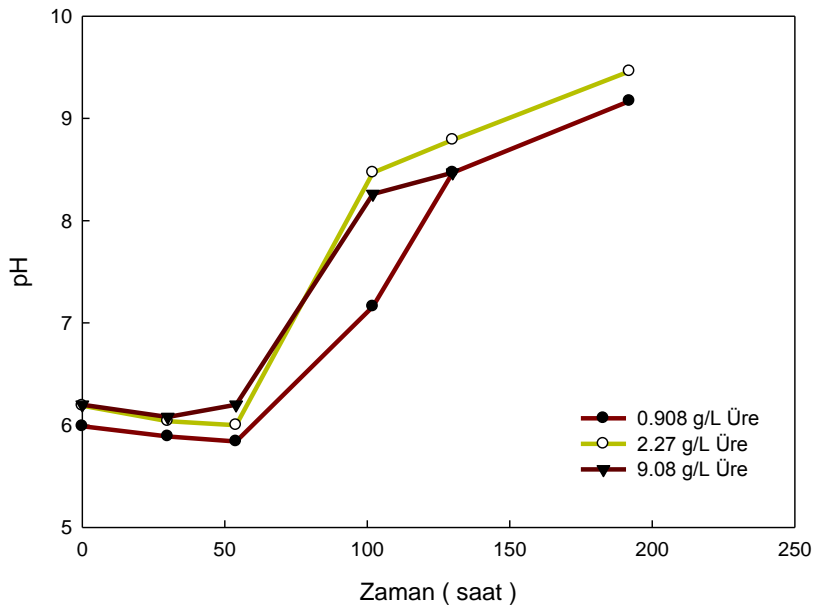
edilmiştir. Ayrıca ikinci ortama sterilizasyondan sonra eklenmek üzere derişimi birinci ortamla eşdeğer olacak şekilde hazırlanan üre çözeltisi de sterillemiştir. Sterilizasyondan sonra birinci ortam steril üre çözeltisi ile karıştırılmıştır. Daha sonra ortamlarda toplam fenol derişimleri ölçülmüş ve ayrıca ortamlardan ekstrakte edilen fenoller HPLC’de analizlemiştir. Bu denemeye ait gözlemler ile ortamların sterilizasyondan önce ve sonraki pH değerleri, TF düzeyleri ve HPLC kromatogramları EK 3’de verilmiştir.

Bu denemede, ham zeytin karasuyunun pH düzeyi sterillendikten sonra 0.1 birim kadar düşerken, üre içeren zeytin karasuyunun pH’sı 6.34’e yükselmiştir. Üre çözeltisinin pH’sında da yükselme olmuştur; ancak bu çözelti zeytin karasuyu ile karıştırıldığı zaman bile pH düzeyi ikinci ortamınki kadar yükselmemiştir. Bu durum sterilizasyon sırasında zeytin karasuyu ve üre arasında meydana gelen kimyasal etkileşimlere işaret etmektedir. Ancak, olabilecek bu derişimler yapılan HPLC analizleri ile belirlenememiştir. Farklı analizler ile bu etkileşim anlaşılabilir.

Zeytin karasuyunun *R. glutinis* ile biyolojik arıtımında ürenin etkisini anlamak amacıyla yapılan diğer deneme başlangıç pH değeri üzerinedir. Bu amaçla, %100 ZK (TF=400 mg/L, pH=4.33) ile hazırlanan 6 farklı 200 ml ortam sırası ile 2, 5 ve 20 g/L amonyum sülfat ve azot miktarları molar bazda eşit olacak şekilde 0.908, 2.27 ve 9.08 g/L üre ile desteklenerek sterilize edildikten sonra pH değerleri 1M NaOH ile 6.0±0.1’ getirilmiş ve 500 ml erlenlere konulmuştur. Ortamlar daha önceden %100 karasu ortamından alınan *R. glutinis* ile hazırlanmış immobilize mikrobank boncuklarla inokule edilerek 30 °C sıcaklık ve 150 rpm çalkalama hızında çalışan hava banyosuna konulmuştur. Yaklaşık 200 st süren biyoarıtım süreci boyunca amonyum sülfat içeren ortamlarda gelişim gözlenmezken, üre içeren ortamlarda hücreler çoğalmayı başarmışlardır. Daha önceki denemelerde de gözlendiği gibi üre miktarı arttıkça toplam biyoküttele azalma gözlenmiştir (Şekil 4.25). Daha önceki denemelerde 2 g/L amonyum sülfat varlığında %25 zeytin karasuyunda çoğaldığı gözlenen hücreler (Bölüm 4.2.1), aynı amonyum sülfat derişimi ancak %100 zeytin karasuyu ortamında -yani yüksek karasu derişiminde- çoğalmamışlardır. Ortamlarda zamanla pH derişimlerine bakıldığında ise üre içeren ortamlarda kinetiğin birbirine benzer olduğu görülmektedir (Şekil 4.27).



Şekil 4-26 *R. glutinis* ile farklı üre derişimi ancak aynı başlangıç pH değerlerindeki ortamlarda gerçekleştirilen biyoarıtımlarda kuru hücre derişiminin zamanla değişimi (%100 ZK, 1 g/L maya özütü, T=30 °C, N=150 rpm)



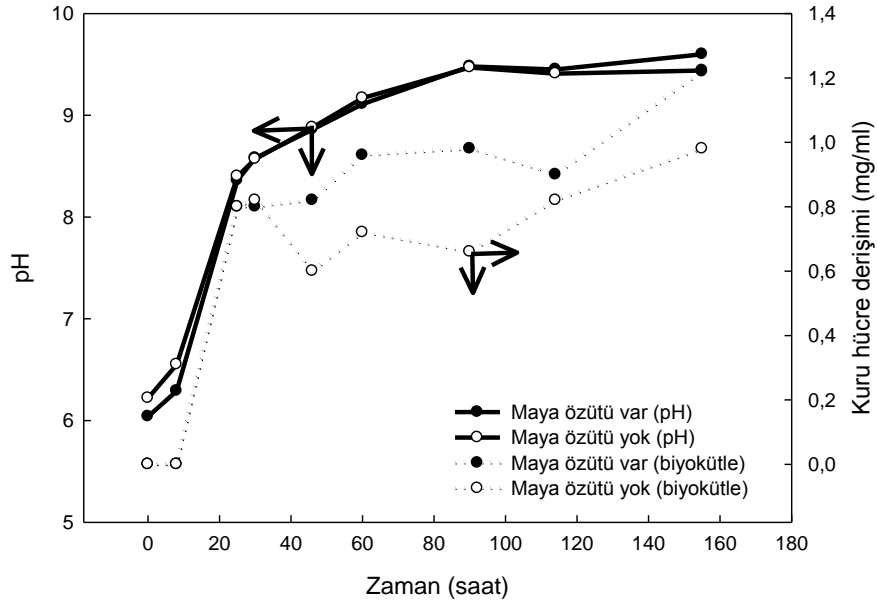
Şekil 4-27 *R. glutinis* ile farklı üre derişimi ancak aynı başlangıç pH değerlerindeki ortamlarda gerçekleştirilen biyoarıtımlarda pH'ın zamanla değişimi (%100 ZK, 1 g/L maya özütü, T=30 °C, N=150 rpm)

Üç ayrı derişimde üre içeren ortamlarda toplam fenol giderimi %88 olarak hesaplanmıştır . Bu denemeden elde edilen verilerden, ürenin zeytin karasuyu arıtımındaki etkisinin sadece başlangıç pH'sını yükseltmesinden kaynaklanmadığı, *R. glutinis'in* bu ortama adapte olması ve yaşabilmesinde önemli bir nutrient olduğu anlaşılmaktadır.

#### 4.2.3 *Rhodotorula glutinis* ile biyoarıtımda maya özütü etkisi

*Rhodotorula glutinis* ile yapılan biyoarıtımlarda ortam bileşenlerinden maya özütünün etkisi, maya özütü olmaksızın gerçekleştirilen bir deneme ile incelenmiştir. Çalışma, 500 ml hacimli erlenlerde 200 ml toplam ortam hacmi ile 150 rpm karıştırma hızı ve 30 °C sıcaklıkta yapılmıştır. Biyoarıtım ortamında %25 ZK (TF=400 mg/L pH=4.33) ve 2.27 g/L üre bulunmaktadır. Zeytin karasuyu biyoarıtımdan önce 12000xg de 10 dk santrifüjlenmiş ve ardından 120 °C'de 20 dk süre ile sterillenmiştir. *R. glutinis* hücreleri %100 ZK ile hazırlanan agar çoğalma ortamından biyoarıtım ortamına aktararak denemeler başlatılmıştır.

Şekil 4.28'de pH ve kuru hücre derişiminin zamanla değişimi yer almaktadır. Hücre çoğalması ile uyumlu olarak ortamda zamanla pH artışı olmuş ve pH=9.5 civarında sabitlenmiştir. Hücre çoğalma eğrilerinde ise maya özütü içeren ve içermeyen ortamlarda uyum fazı ve logaritmik çoğalma fazları benzerlik gösterirken ileri saatlerde maya özütü içeren ortamda daha fazla biyokütle ölçülmüştür. Ancak yüksek hücre derişimi daha fazla toplam fenol giderimi sağlamamıştır. Maya özütü içeren ve içermeyen biyoarıtımlarda sırası ile %82 ve %85 toplam fenol %27 ve %45 KOİ giderimi sağlanmıştır. Bu bulgular ışığında, %25 karasu ortamına eklenen 1 g/L maya özütünün *Rhodotorula glutinis* 'in bu ortamdaki biyolojik etkinliğine olumlu etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.



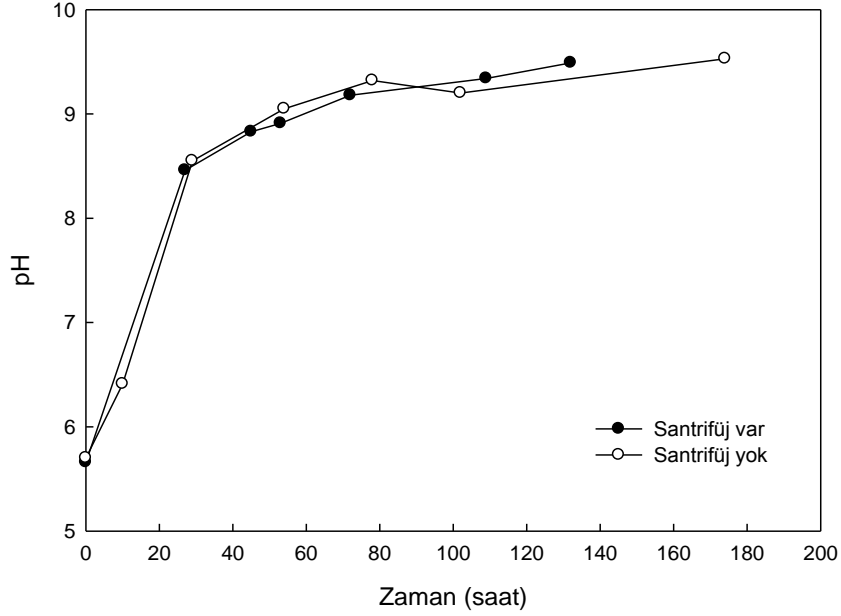
**Şekil 4-28** *R. glutinis* ile yapılan %25 ZK içeren biyoarıtım ortamında maya özütü varlığında ve yokluğunda pH değerinin ve kuru hücre derişiminin zaman ile değişimi (T= 30 °C, N=150 rpm)

#### 4.2.4 *Rhodotorula glutinis* ile biyoarıtımda öniflemlerin etkisi

*Rhodotorula glutinis* ile yapılan biyoarıtımlarda fiziksel öniflemlerden biyoarıtımdan önce zeytin karasuyuna uygulanan santrifüj ve santrifüj + sterilizasyonun etkileri 500 ml hacımlı erlenlerde 200 ml toplam ortam hacım ile 150 rpm karıştırma hızı ve 30 °C sıcaklıkta çalkalamalı hava banyosunda incelenmiştir.

Öniflemlerden santrifüj biyoarıtıma etkisinin incelendiği çalışmalarda biyoarıtım ortamında %25 ZK, 2.27 g/L üre ve 1 g/L maya özütü bulunmaktadır. Ortamlardan sadece bir tanesi 12000xg'de 10 dk santrifüjlenmiş ve her iki örnek de 120 °C'de 20 dk süre ile sterillemiştir. *R. glutinis* hücreleri %100 ZK (TF=900 mg/L, pH=4.31) ile hazırlanan agar çoğalma ortamından biyoarıtım ortamına aktarılmıştır. Şekil 4.29'de santrifüjlenmiş ve santrifüjlenmemiş ortamlar ile yapılan biyoarıtımlarda zamanla pH değerinin artışı karşılaştırmalı olarak verilmiştir; eğriler birbiri ile çakışmaktadır. Çalışmalarda pH'daki artışın hücre çoğalması ile ilintili olduğu belirlendiği için bu değişimden iki farklı

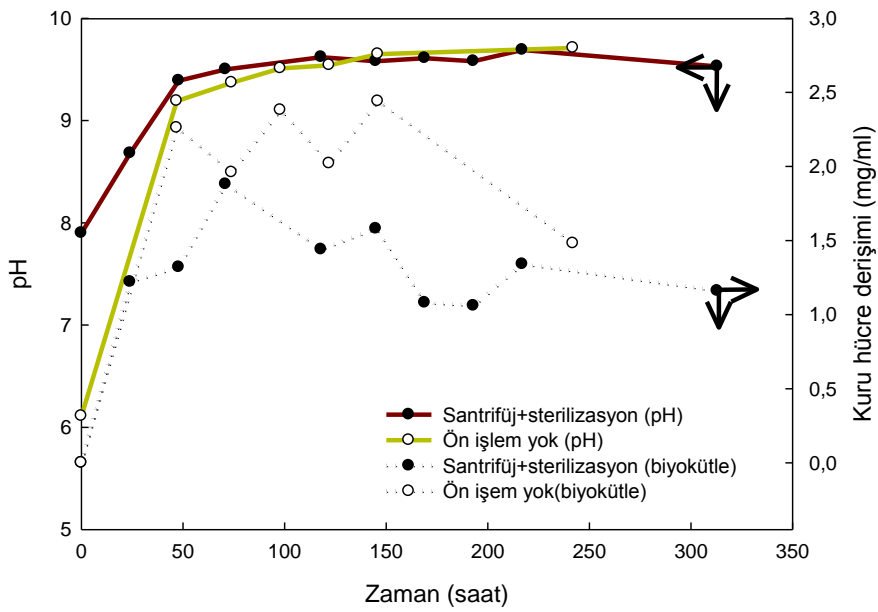
biyoarıtımdaki hücre çoğalma kinetiklerinin de aynı olduğu anlaşılmaktadır. Santrifüj uygulanmış ve uygulanmamış ortamlardaki toplam fenol giderimleri ise sırasıyla % 86 ve 82 olarak bulunmuştur. KOİ giderimleri ise sırasıyla %22 ve %32 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, *R. glutinis* ile yapılan biyoarıtımdan önce zeytin karasuyunu santrifüjlemenin bir olumlu bir etkisi olmadığını göstermektedir.



Şekil 4-29 Önişlemlerden santrifüjün *R. glutinis* ile biyoarıtımda pH değişimine etkisi (T= 30 °C, N=150 rpm)

Önişlem olarak santrifüj + sterilizasyon etkisinin incelendiği çalışmada ise biyoarıtım ortamında %100 ZK (TF=400 mg/L, pH=4.33), 9.08 g/L üre ve 1 g/L maya özütü bulunmaktadır. Ortamlardan sadece bir tanesi 12.000xg de 10 dk santrifüjlenmiş ve ardından 120 °C’de 20 dk süre ile sterillenmiştir. Diğer ortama herhangi bir önişlem uygulanmamıştır. *R. glutinis* hücreleri %100 ZK ile hazırlanan agar çoğalma ortamından biyoarıtım ortamına aktarılmıştır. Şekil 4.29’da santrifüjlenmiş + sterillenmiş ve herhangi bir önişlem uygulanmamış ortamlar ile yapılan biyoarıtımlarda zamanla pH değerinin ve kuru hücre derişiminin artışları karşılaştırmalı olarak yer almaktadır. Önişlem gören ortamın başlangıç pH’sının daha yüksek olması, otoklavda yüksek sıcaklıkta meydana gelen kimyasal değişimler nedeniyledir. Ancak biyoarıtım süresince her iki ortamda ulaşılan pH düzeyleri aynıdır (pH=9.5). Hücre çoğalma eğrile ri incelendiği zaman ise

uyum fazlarında benzerlik görülmektedir; ancak önışlem görmemiş ortamda biyokütle miktarı daha fazladır. Bunun nedeni, santrifüj ile başlangıçta ortamdaki ayrılmamış katı maddelerin de ölçülmüş olmasıdır. Önışlem görmüş ve görmemiş ortamlarda toplam fenol giderimleri ise sırasıyla %83 ve %82 olarak KOİ giderimleri ise %10 ve %19 olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular zeytin karasuyuna uygulanan santrifüj+ sterilizasyon önışleminin %100 ZK ortamında *R. glutinis*'in biyolojik aktivitesine olumlu etkisinin olmadığını göstermektedir.



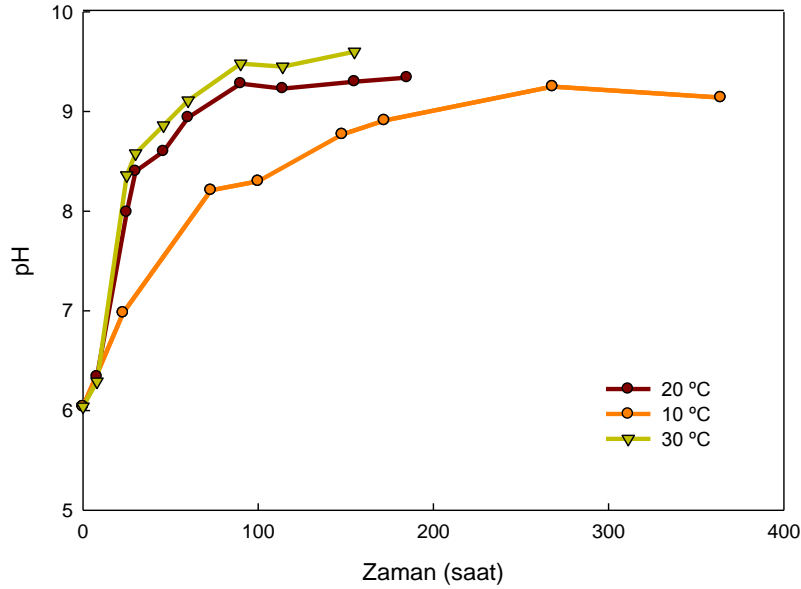
Şekil 4-30 Önışlemlerden santrifüj+ sterilizasyonun *R. glutinis* ile biyoarıtımda pH ve kuru hücre değışimine etkisi (T= 30 °C, N=150 rpm)

#### 4.2.5 *Rhodotorula glutinis* ile biyoarıtımda sıcaklık etkisi

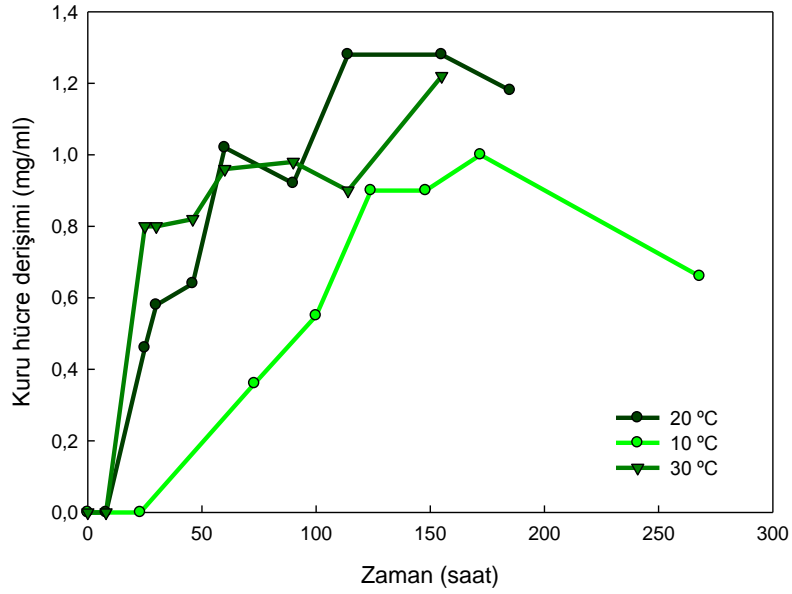
*Rhodotorula glutinis* ile zeytin karasuyunun biyoarıtımında sıcaklık etkisi 10, 20 ve 30 °C değeri için %25 ZK (TF=900 mg/L, pH=4.31), 500 ml hacimli erlenlerde 200 ml toplam ortam hacmi ile 150 rpm sabit karıştırma hızında incelenmiştir. Biyoarıtım ortamı %25 ZK, 2.27 g/L üre, 1 g/L maya özütü içermektedir. Zeytin karasuyu biyoarıtımdan önce 12000xg'de, 10 dk santrifüjlenmiş ve ardından 120 °C'de 20 dk süre ile sterillemiştir. *R. glutinis*

hücreleri % 100 ZK ile hazırlanan agar çoğalma ortamından biyoarıtım ortamına aktarılarak denemeler başlatılmıştır.

Çalışılan üç sıcaklıkta da zamanla hücre derişiminin ve pH değerinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.31). Sıcaklık artışı ile hücrelerin uyum fazları kısalmakta ve çoğalma hızları artmaktadır. Ancak 20 ve 30 ° C sıcaklıklarda çoğalma hızlarında ve ulaşılan biyokütle miktarlarında çok önemli bir fark yoktur. Hücreler çoğalmalarını tamamladıkları zaman ortamların pH değerleri 9.0-9.5 aralığında sabitlenmektedir. Ortamlardaki fenol giderimi de sıcaklıkla artmaktadır. 10, 20 ve 30 °C sıcaklıklarda toplam fenol giderimi sırası ile %72, 78 ve 82 olarak hesaplanmıştır. KOİ giderimi ise 10, 20 ve 30 °C sıcaklıktaki biyoarıtımlar için için sırası ile %17, 31 ve 26 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, *R. glutinis* için denenen sıcaklıklar arasında en iyi biyolojik arıtım sıcaklığının 30 °C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4-31 *R. glutinis* ile yapılan %25 ZK içeren biyoarıtım ortamında farklı sıcaklıklarda pH değerinin zaman ile değişimi (N=150 rpm)



**Şekil 4-32** *R. glutinis* ile yapılan %25 ZK içeren biyoarıtım ortamında farklı sıcaklıklarda kuru hücre derişiminin zaman ile değişimi (N=150 rpm)

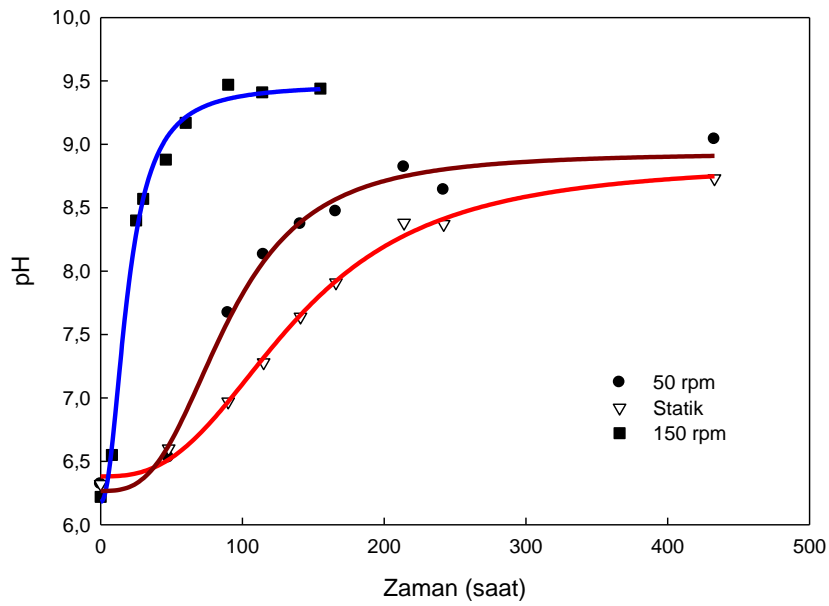
#### 4.2.6 *Rhodotorula glutinis* ile biyoarıtımda karışırma hızı etkisi

*Rhodotorula glutinis* ile zeytin karasuyunun biyoarıtımında karışırma hızının etkisi statik, 50 ve 150 rpm karışırma hızlarında gerçekleştirilen denemeler ile incelenmiştir. Denemelerde %25 ZK (TF=400 mg/L, pH=4.33), kullanılmış, 500 ml hacimli erlenlerde 200 ml toplam ortam hacmi ile 30 °C sabit sıcaklıkta çalışılmıştır. Biyoarıtım ortamı %25 ZK ve 2.27 g/L üre içermektedir. Zeytin karasuyu biyoarıtımdan önce 12000xg'de 10 dk santrifüjlenmiş ve ardından 120 °C'de 20 dk süre ile sterillemiştir. *R. glutinis* hücreleri %100 ZK ile hazırlanan agar çoğalma ortamından biyoarıtım ortamına aktararak denemeler başlatılmıştır.

*R. glutinis* ile statik, 50 ve 150 rpm karışırma hızlarında yapılan biyoarıtımlarda elde edilen sonuçlar, karışırma hızının arttıkça ortamın pH değerindeki artış hızının arttığını ve 8.5-9.5 aralığında sabitlendiğini göstermiştir (Şekil 4.33). Yapılan tüm denemelerde zamanla ortamın pH artışının hücre çoğalması ile paralellik gösterdiği gözlenmiş olduğu



için, bu veriler aynı zamanda karıştırma hızının artışı ile hücrelerin uyum fazlarının ve toplam biyoarıtım süresinin kısalacağını da göstermektedir. Statik ortamda ve 50 rpm karıştırma hızında biyokütle miktarı çok düşük olduğu için sağlıklı ölçümler yapılamamış ve bu nedenle hücre çoğalma grafiği çizilmemiştir. Toplam fenol giderimi de karıştırma hızının artması ile artmaktadır. Statik, 50 ve 150 rpm koşullarında elde edilen toplam fenol giderimleri sırasıyla % 72, 80 ve 85'dir. KOİ giderimi ise aynı sıra ile %36, 23 ve 45 olarak ölçülmüştür. Bu denemeler sonucunda yüksek karıştırma hızında daha iyi biyoarıtım gerçekleştiği belirlenmiştir.



**Şekil 4-33** *R. glutinis* ile yapılan %25 ZK içeren biyoarıtım ortamında farklı karıştırma hızlarında kuru hücre derişiminin zaman ile değişimi (T=30 °C)

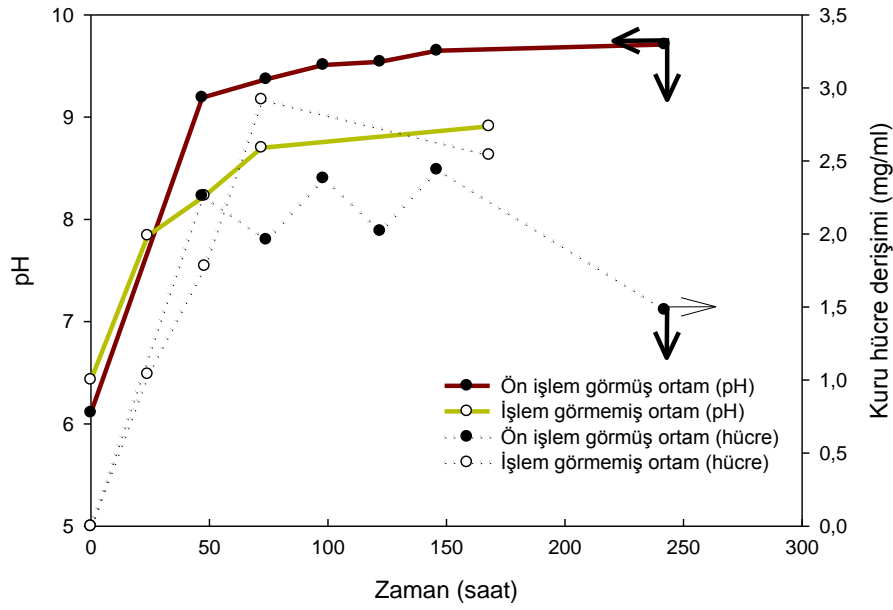
#### 4.2.7 Biyoarıtımda önişlem görmemiş ve ek nutrient içermeyen zeytin karasuyu kullanımı

*Rhodotorula glutinis* ile zeytin karasuyunun biyoarıtımının ortamda herhangi bir destek besin maddesinin olmamasının etkisi, 500 ml hacimli erlenlerde 200 ml toplam ortam hacmi ile 150 rpm sabit karıştırma hızında 30 °C sıcaklıkta çalkalamalı hava banyosunda

incelenmiştir. Biyoarıtım ortamı santrifüjlenmemiş ve sterillenmemiş %100 ZK (TF=400 mg/L, pH=4.33), oluşmaktadır. Deneme, 9.08 g/L üre ve 1 g/L maya özütü içeren 100% zeytin karasuyu ortamında çoğalmış olan *R. glutinis* hücrelerinin (5 ml), hiçbir ön işlem görmemiş, azot ve maya özütü takviyesi yapılmamış 100 ml %100 zeytin karasuyuna aktarılması ile başlatılmıştır.

9.08 g/L üre + 1 g/L maya özütü içeren ve içermeyen ortamların biyoarıtımlarında pH ve kuru hücre derişimlerinin zamanla değişimi incelenmiştir (Şekil 4.34). Veriler ön işlem görmemiş sadece %100 ZK içeren ortamda da *R. glutinis* hücrelerinin çoğaldığını ve zamanla pH değerinin arttığını göstermektedir. Ancak, nutrient desteği içeren %100 ZK ortamı ile kıyaslandığında destek içermeyen ortamın son pH düzeyi daha düşük seviyede kalmıştır. Bunun ortamdaki ürenin etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hücre çoğalması ve pH değerleri farklılık göstermesine karşın her iki ortamda da yüksek fenol giderimi gözlenmiştir. Toplam fenol giderimi nutrient desteği içeren ve içermeyen ortamlarda sırası ile %82, %89 ve KOİ giderimleri ise aynı sırayla %19 ve %18 olarak hesaplanmıştır.

Bu denemeden elde edilen verilere göre karasuyun *R. glutinis* ile biyoarıtımında ek besin desteğine ihtiyaç olmadığı sonucu çıkarılabilir. Ancak aynı zamanda görülmüştür ki her ne kadar toplam fenol ve KOİ giderimine etkisi olmasa da hücrelerin yüksek derişimdeki karasu ortamında yaşayabilmeleri ve uyum fazlarının kısılması için üreye ihtiyaçları vardır. Bununla birlikte %100 katı zeytin karasuyu ortamından %100 ZK ortamına doğrudan aktarılan hücreler yaşayamazken (Bölüm 4.2.1) yüksek üre derişimi içeren karasu ortamında çoğalmış mayalar sıvı süspansiyon halinde toplam hacmin % 2.5 miktarında hiçbir işlem görmemiş ve destek nutrient içermeyen karasu ortamında biyoarıtımı başarmışlardır.



**Şekil 4-34** *R. glutinis* ile yapılan %100 ZK içeren biyoarıtım ortamında üre + maya özütü varlığında ve yokluğunda pH değerinin ve kuru hücre derişiminin zaman ile değişimi (T= 30 °C, N=150 rpm)

#### 4.2.8 Kesikli-beslemeli sistemde zeytin karasuyunun biyoarıtımı (Erlen denemeleri)

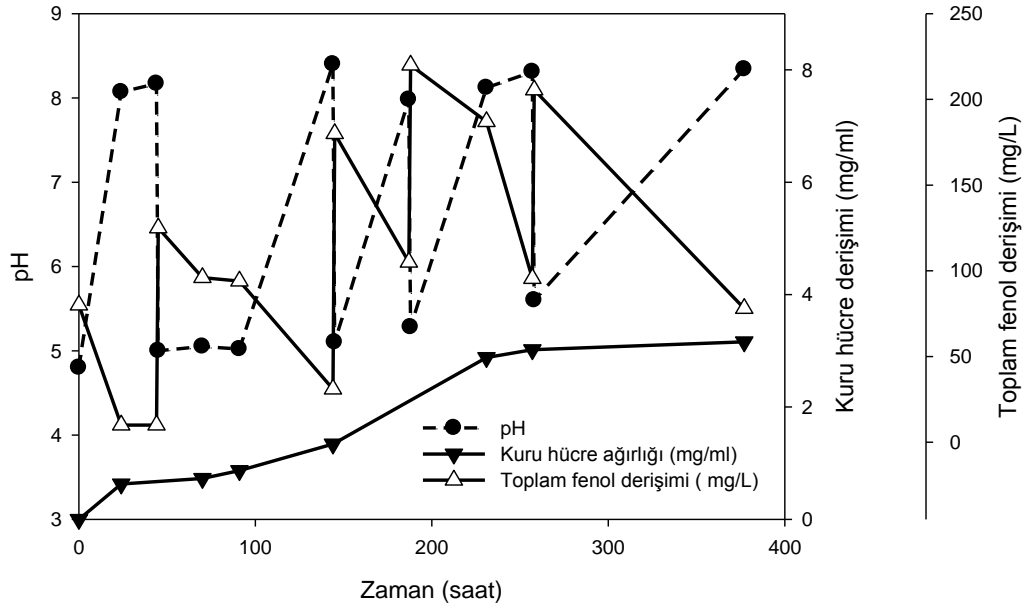
Biyoreaktör denemelerine geçilmeden önce beslemeli sistemde biyoarıtımın uygulanabilirliğini görmek amacıyla erlenlerde kesikli-beslemeli bir işletim yapılmıştır. Deneme için öncelikle %10 zeytin karasuyu ortamı hazırlanmış (TF=622 mg/L, pH=4.6); santrifüjlenen 100 ml ortam 1 g/L maya özütü ve 4 g/L amonyum sülfat ile desteklenerek otoklavda sterilize edilmiştir. Ortama besleme yapmak için kullanılacak olan stok ZK (%100) ise aynı şekilde 1g/L maya özütü ve 4 g/L amonyum sülfat ile desteklenerek santrifüj edildikten sonra sterillenmiştir. %10 ZK ortamı bir erlene alınarak, ZK agarda çoğalan *Rhodotorula glutinis* mayaları ile inokule edilmiştir. Biyoarıtım süresinde pH değeri izlenerek hücresel aktivite gözlenmiş ve pH belli bir düzeye ulaşıncaya (pH=8.0±0,4) ortama %100 ZK ortamı eklenerek toplam ortam hacmi artırılmıştır. Biyoarıtım boyunca dört kere bu işlem tekrarlanmış ve bu şekilde toplam hacim 250 ml'ye çıkarılmıştır. Son stok ZK ekleme adımında ise, ortamdaki 50 ml ZK alınıp yerine 50 ml stok ZK eklenmiştir.

Stok ZK ekleme miktarları ve zamanları Çizelge 4,1 de, toplam fenol derişimi, pH ve kuru hücre derişiminin zamanla değişimleri ise Şekil 4.35’de verilmiştir.

**Çizelge 4.1** Kesikli-beslemeli erlen denemesinde besleme ekleme zamanı ve miktarı

Besleme zamanı (t,st)	Besleme hacmi (V, ml)
44	27.7
144	37.6
187	47.6
257	+/- 50.0

Bu denemede, biyoarıtım süreci boyunca ortama toplamda 144 ml karasu eklenmiştir. Bu miktar üzerinden hesap yapıldığı zaman, biyoarıtım sonunda (t=377 st) ortamdaki toplam zeytin karasuyu derişimi %61.5 ve toplam fenol giderimi %73’dür. Kullanılan stok zeytin karasuyunun KOİ değeri 38453,25 mg O<sub>2</sub>/L iken 377. stin sonunda ortamdaki alınan örneğin KOİ değeri 23648,7488 mg O<sub>2</sub>/L olarak ölçülmüştür. Bu değerlere göre toplam KOİ giderimi %38 olarak hesaplanmıştır. Bu şekilde kesikli biyoarıtımda belirli zamanlarda ham ZK ekleyerek daha yüksek derişimlere çıkılabileceği görülmüştür.



Şekil 4-35 *R. glutinis* ile yapılan kesikli-beslemeli erlen denemesinde pH değeri, kuru hücre derişimi ve toplam fenol derişiminin zaman ile değışimi (T= 30 °C, N=150 rpm)

#### 4.3 Biyoreaktörde *Rhodotorula glutinis* ile Zeytin Karasuyu Arıtımı

Erlende yapılan kesikli-beslemeli biyoarıtımın ardından, *Rhodotorula glutinis* ile zeytin karasuyu biyoarıtımının endüstriye uygulanabilirliğinin görülmesi amacıyla, biyoreaktörde kesikli-beslemeli ve sürekli işletimler yapılmıştır. Biyoreaktör denemelerinde %100 ZK (TF=400 mg/L, pH=4.33) kullanılmıştır. Her iki tür işletimde de öncelikle erlenlerde mikroorganizmaların ön çoğalması yapılmış, hüresel aktivite gözlemlendikten sonra ortamlar biyoreaktör tankına alınarak süreç başlatılmıştır. Erlenlerde yapılan tüm denemelerde pH artışı ile toplam fenol gideriminin ilişkili olduğu görülmüştür. Sürekli işletimdeki biyoreaktör denemelerinde kemostat koşullarını sağlamak için bu ilişkiden yararlanılmıştır. Biyoarıtım ortamının pH düzeyi sistem tarafından eşzamanlı olarak izlenmekte ve kaydedilmektedir. Ortamın pH değeri belli bir düzeye set edildiği durumda, biyoreaktörün kontrol birimi asitliği istenilen düzeyde tutabilmek için asit ya da baz pompalarını çalıştırmaktadır. Zeytin karasuyu biyoarıtımında pH değeri artma eğiliminde olduğu için, asit pompası ham ZK (sterillenmemiş ve santrifüjlenmemiş) içeren stok şişesine

bağlanmıştır. pH değeri istenilen düzeye ulaştığı zaman sistem asitliğini bu düzeyde tutmak üzere asit pompası ile ortama ZK beslemektedir. Sürekli sistemde ortam hacmini sabit tutmak için asit pompasıyla senkronize bir şekilde çalışan bir diğer pompayla bir tahliye bağlantısı eklenmiştir. Tahliye bağlantısı biyoreaktör tankının dibinden, ortama eklenen ham karasuya eş hacimde sıvı çekmekte ve tahliye tankında toplamaktadır. Bu şekilde biyoreaktör içindeki hacim sabit tutularak kemostat koşulları sağlanmaya çalışılmıştır. Kesikli-beslemeli işletimde ise tahliye bağlantısı bulunmamaktadır (Şekil 3.1, 3.2).

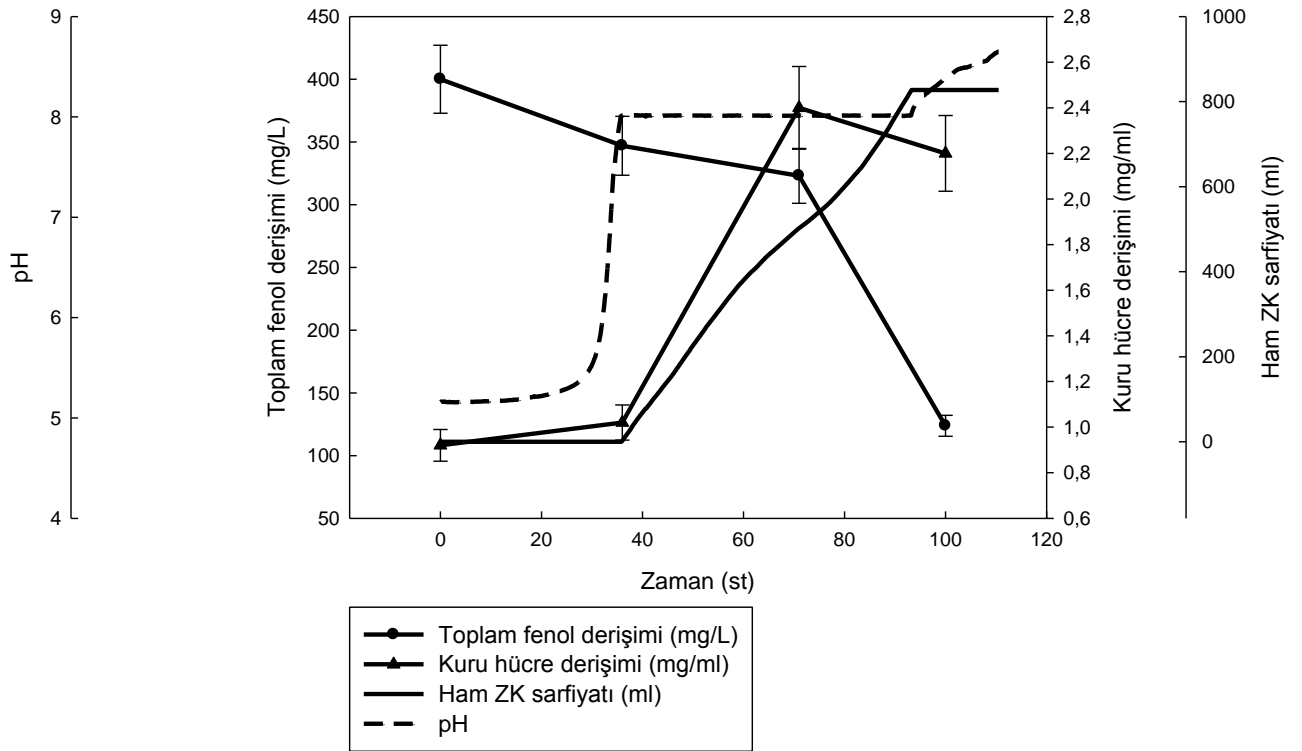
#### **4.3.1 Kesikli-beslemeli işletim**

Kesikli-beslemeli (yarı-kesikli) işletim ile biyoarıtım için öncelikle %100 ZK santrifüjlenip pH değeri 6.0'a ayarlandıktan sonra 2.27 g/L üre ile desteklenmiştir. Otoklavda sterilize edilen 100 ml ortam 250 ml'lik erlene alınarak sıvı ZK ortamında çoğalan 10 ml maya süspansiyonu ile inokulasyon yapılmıştır. Çalkalamalı hava banyosunda inkübasyona bırakılan ön çoğalma ortamında hücresel aktivite gözlemlendikten sonra, 400 ml 2.27 g/L üre içeren ve herhangi bir önişlem görmemiş olan %100 ham ZK ortamına eklenerek biyoarıtım süreci başlatılmıştır. Besleme ortamı olarak ise önişlem görmemiş ve destekleyici nutrient içermeyen ham ZK kullanılmıştır.

Başlangıç anında biyoreaktördeki ortamın pH değeri 5.15'dir. Süreç başlatılarak biyoreaktörün pH değeri 8.0'a set edilmiştir. 35 st sonra ortam pH'ı 8.0'a gelmiş ve sistem pH değerini bu düzeyde tutabilmek için ortama sabit debi ile ham ZK pompalamaya başlamıştır. Statik pH=8.0 koşullarında biyoarıtım 58 st boyunca sürdürülmüştür. Bu süreç boyunca toplamda 827 ml ham ZK ortama beslenmiştir. Bu değer 14 ml/st ZK sarfiyatına denktir. Statik pH=8.0 sürecinin başında (t=36 st) ve ortalarında (t=71 st) ortamdan alınan örneklerdeki toplam fenol giderimi sırası ile %13 ve %19'dur. pH kontrolü 58 st sonunda kapatılarak sistem kendi haline bırakılmıştır. Bu noktadan sonra ortam pH düzeyi artmaya devam etmiştir. Ortam pH düzeyi 8.3'e ulaştığı anda (t=100 st) ortamdan örnek alınarak toplam fenol tayini yapılmış ve toplam fenol giderimi % 80 olarak hesaplanmıştır.

Biyoreaktörde pH, kuru hücre derişimi, toplam fenol derişimi ve ham ZK sarfiyatının zaman ile değişimi Şekil 4.36’de gösterilmiştir.

Kurulan bu sistem ile ulaşılan veriler kesikli beslemeli erlen denemesinde (Bölüm 4.2.9) elde edilen verileri desteklemektedir. Bu şekilde, *R. glutinis* zeytin karasuyu ortamında çoğalmaya başladıktan sonra kontrollü olarak hiçbir işlem görmemiş ZK eklenerek biyoarıtımın sürdürülebileceği görülmüştür.



Şekil 4-36 *R. glutinis* ile yapılan kesikli-beslemeli işletimde pH değeri, kuru hücre derişimi, toplam fenol derişimi ve ham ZK sarfiyatının zaman ile değişimi (T= 30 °C, N=250 rpm )

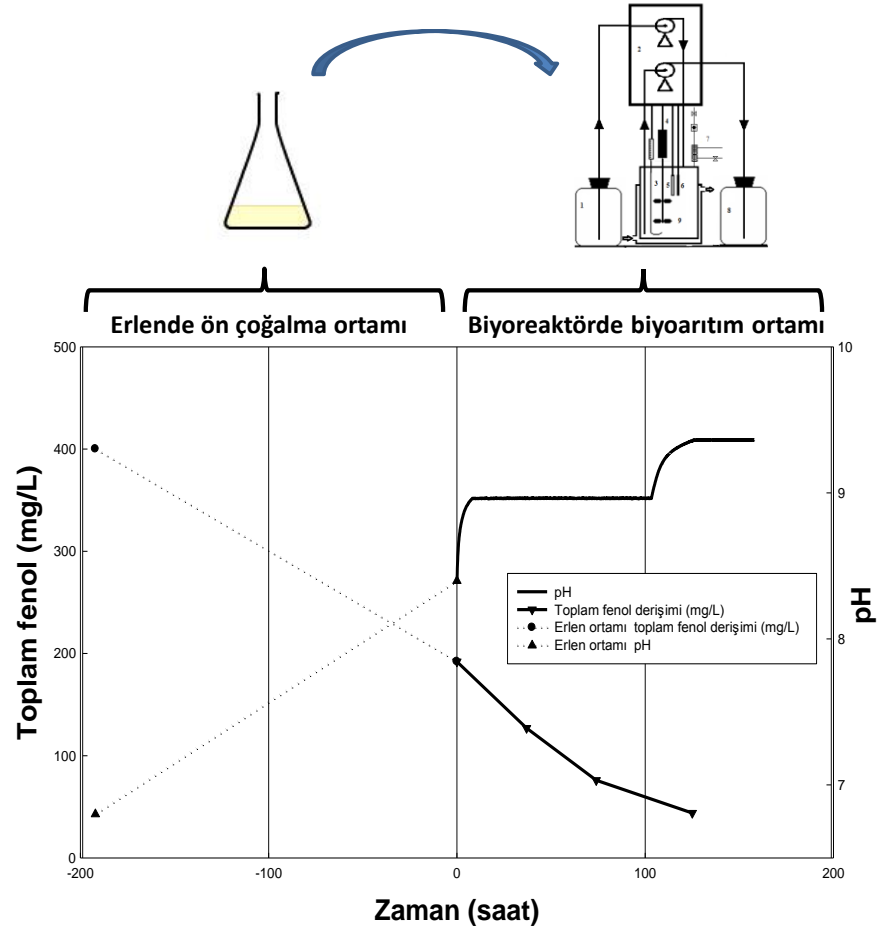
### 4.3.2 Sürekli işletim

#### *Deneme-I*

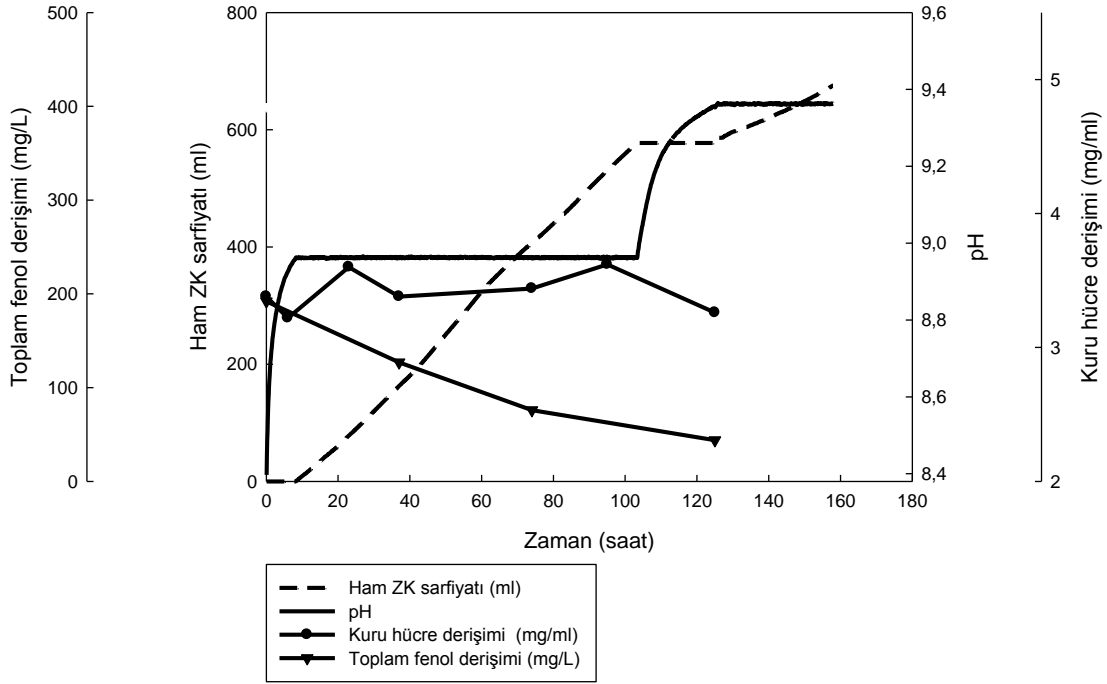
Deneme-I'de 1 L %100 ham ZK'nın pH değeri 6.0'a ayarlanmış ve 2.27 g/L üre ile azot takviyesi yapıldıktan sonra otoklavda steril edilmiştir. Ardından ortamlar 500 ml erlenlerde toplam 200 ml hacimlere bölüştürülerek inokule edilmiştir. Başlangıç pH düzeyi 6.8 olan ön çoğalma ortamlarının pH'ları yaklaşık 170 st sonra 8.4 civarına gelmiş ve ortam biyoreaktör tankına alınarak deneme başlatılmıştır. Deneme-I'deki ön çoğalma ortamı ve biyoreaktör ortamının pH ve toplam fenol derişiminin zamanla değışimi Şekil 4.37'de, biyoreaktördeki pH değeri, kuru hücre derişimi, toplam fenol derişimi ve ham ZK sarfiyatının zaman ile değışimi ise Şekil 4.38'da yer almaktadır.

Ortamın pH değeri önce 9.0'a set edilmiştir. 8 st sonra pH=9.0 olmuş ve pompa çalışarak ortama ham ZK beslenirken aynı anda da ortamdan kemostat koşullarında çalışmak amacıyla aynı hacimde arıtılmış karasu çekilmeye başlanmıştır.





**Şekil 4-37** *R. glutinis* ile yapılan sürekli işletim öncesi ön çoğalma ortamında ve sürekli işletimde (Deneme-I) pH değeri ve toplam fenol derişiminin zaman ile değişimi (Erlen: T=30 °C, N:150 rpm; Biyoreaktör: T= 30 °C, N=250 rpm)



**Şekil 4-38** *R. glutinis* ile yapılan sürekli işletimde (Deneme-I) pH değeri, kuru hücre derişimi, toplam fenol derişimi ve ham ZK sarfiyatının zaman ile değişimi (T= 30 °C, N=250 rpm )

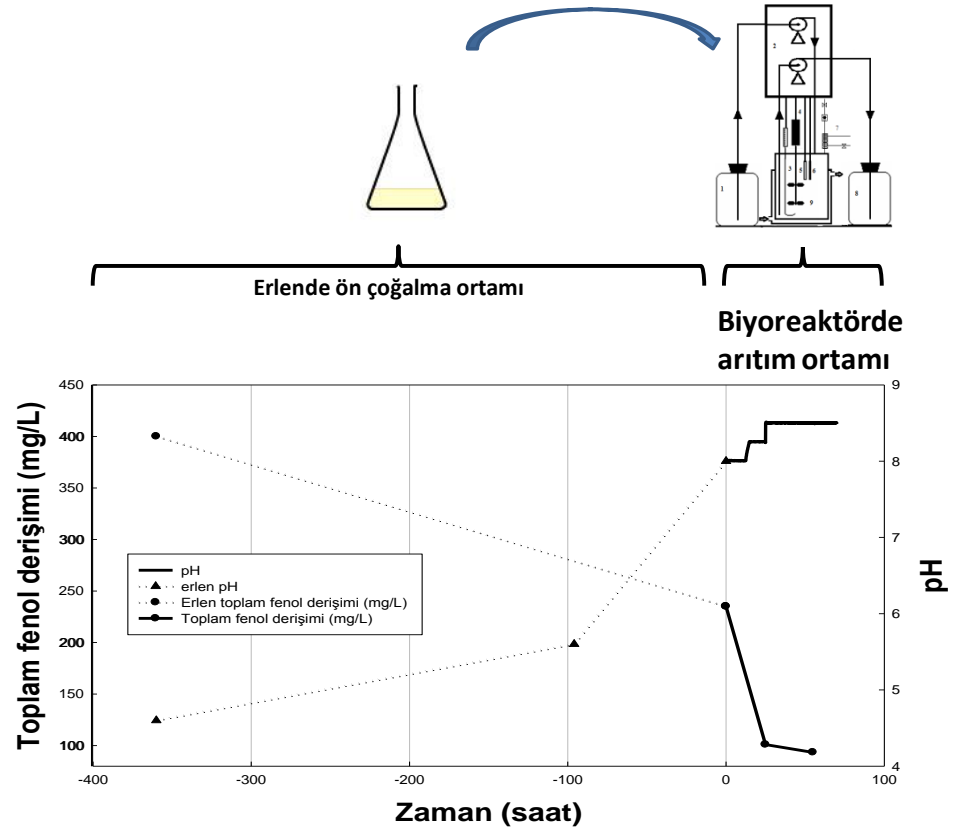
Sistemde, pH=9.0 koşulunda 103 st süresince toplam 576 ml karasu sarfiyatı yapılmıştır. Bu sarfiyat 6 ml/st ZK sarfiyatına eşittir. pH=9.0 süreci içerisinde iki farklı zamanda örnek alınmıştır. Bu örneklerde yapılan analizlerde toplam fenol derişiminin süreç boyunca düşme eğiliminde olduğu görülmüştür. Girdi olarak ham ZK'nın toplam fenol derişimi göz önünde bulundurulduğunda, bu süreç içerisindeki ilk örnekleme noktasında (t=37.st) toplam fenol giderimi %68, ikinci noktada (t=74 st) ise %81 olarak hesaplanmıştır.

pH=9.0 süreci sonrasında ortam pH değeri 9.35'e set edilmiştir. Sistem, pH=9.35 olana dek ortama ham ZK pompalamaya ara vermiştir. 22 st sonra ortam pH düzeyi 9.35 değerine ulaşmış ve yeniden ham karasu sarfiyatı başlamıştır. pH=9.35 süreci 32 st boyunca sürdürülmüştür. Bu süreç boyunca toplamda 98 ml ham karasu sarfiyatı gerçekleşmiştir. Bu değer 3 ml/st ZK sarfiyatına eşittir. Toplam fenol giderimi ise süreç sonunda %89 olarak hesaplanmıştır.

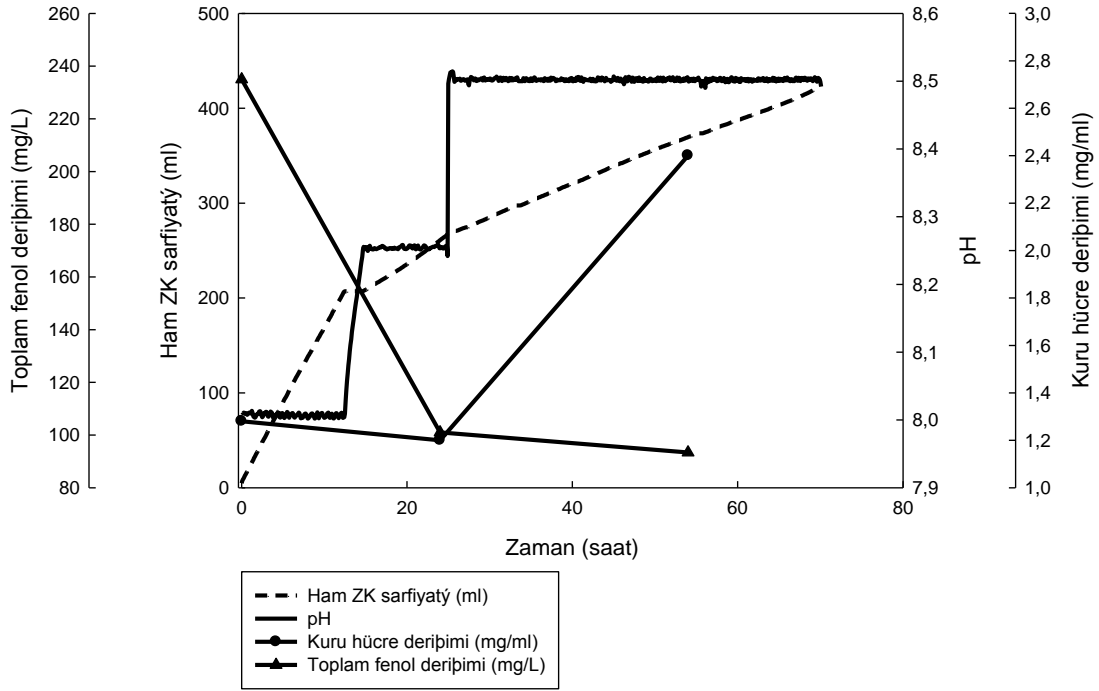
## ***Deneme-II***

Deneme-II, Deneme-I ile aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir; ancak ön çoğalma ortamına destekleyici madde olarak üre konulmamıştır. Ön çoğalma ortamı olarak 180 ml ZK erlene konularak Deneme-I'den alınan 20 ml hücreli ortam ile inokule edilmiştir. Sonrasında erlen çalkalamalı hava banyosuna konularak hücrelerin yeni ortamda çoğalması beklenilmiştir. Hücresel aktivite gözlemlendikten sonra ortam hacmi kademeli olarak 1 L'ye çıkarılmıştır. Ardından 1 L ön çoğalma ortamı biyoreaktör tankına alınarak biyoarıtım başlatılmıştır. Deneme-II'deki ön çoğalma ortamı ve biyoreaktör ortamının pH ve toplam fenol derişiminin zamanla değişimi Şekil 4.39'da, biyoreaktörde pH değeri, kuru hücre derişimi, toplam fenol derişimi ve ham ZK sarfiyatının zaman ile değişimi ise Şekil 4.40'da yer almaktadır.

Sistemde başlangıç olarak pH değeri 8,0'a set edilmiştir. 12 st süren pH=8.0 koşullarında 207 ml karasu sarfiyatı gerçekleşmiştir. Bu miktar 17 ml/st ZK sarfiyatına denk gelmektedir. Daha sonra sistem pH değeri 8.25'e set edilmiştir. Ortam pH'sının bu değere ulaşması yaklaşık 2 st sürmüştür. 10 st sürdürülen pH=8.25 sürecinde ise 59 ml karasu sarfedilmiştir; bu değer ise 5.9 ml/st ZK sarfiyatına eşittir. Son olarak sistem pH=8.5 koşullarında çalıştırılmıştır. 44 st süren pH=8,5 kemostat süreci boyunca 153 ml ham ZK sarfiyatı yapılmıştır. Bu değer 3,5 ml/st ZK sarfiyatına denktir. Toplam fenol giderimleri ise pH=8, pH=8.25 ve pH=8.5 koşulları için sırası ile %41, 74 ve 77 olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4-39** *R. glutinis* ile yapılan sürekli işletim öncesi ön çoğalma ortamında ve sürekli işletimde (Deneme-II) pH değeri ve toplam fenol derişiminin zaman ile değışimi (Erlen: T=30 °C, N:150 rpm; Biyoreaktör: T= 30 °C, N=250 rpm )



**Şekil 4-40** *R. glutinis* ile yapılan sürekli işletimde (Deneme-II) pH değeri, kuru hücre derişimi, toplam fenol derişimi ve ham ZK sarfiyatının zaman ile değışimi (T= 30 °C, N=250 rpm )

#### 4.3.3 Sürekli işletimlerin karşılaştırılması

Yapılan sürekli sistem biyoyarıtım denemelerinde görülmüştür ki, *Rhodotorula glutinis* adaptasyon işlemlerinin ardından önişlem görmemiş karasuyun arıtımını belirli ölçüde sağlayabilmektedir. Denenen parametrelere göre toplam fenol giderimi açısından en iyi arıtım koşulunun Deneme-I'deki pH=9.35 süreci olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2). Bu koşullarda 1 L biyoreaksiyon ortamında dakikada 0.05 ml karasuyun arıtımı gerçekleştirilebilmektedir. Bu veriler endüstriyel uygulamada orta ölçekli bir işletmeye kurulabilecek bu şekilde çalışan 5 tonluk bir biyoreaktör ile st'te 15 L karasu arıtılabileceğini göstermektedir.

Denenen parametrelere göre toplam fenol giderimi açısından, statik pH değeri arttıkça verim artmaktadır. Ancak pH=8.0 statik koşulunda birim zamanda ortama verilen ve ortamdan alınan zeytin karasuyu miktarı daha fazla olduğu için toplam fenol giderimi verimliliği daha fazla gibi gözükmemektedir. Ancak bu koşullarda toplam fenol giderimi çıktı açısından diğer koşullardan daha düşüktür.

**Çizelge 4.2** Sürekli işletim denemelerinin karasu arıtım etkinlikleri

	<i>Deneme-I</i>		<i>Deneme-II</i>		
<b>Statik pH süreci</b>	9	9.35	8	8.25	8.5
<b>Zeytin karasuyu arıtım kapasitesi (ml arıtılan ZK/L biyoreaktör hacmi/dk)</b>	0.1	0.05	0.28	0.098	0.058
<b>Toplam fenol giderim verimliliği (mg toplam fenol/L/st)</b>	1.944	1.068	2.7552	1.74	1.071
<b>Toplam fenol giderimi (%)</b>	81	89	41	74	77
<b>KOİ giderimi (%)</b>	33	27	33	37	34

#### 4.4 Tutuklanmış *Rhodotorula glutinis* ile Biyoarıtım

##### 4.4.1 *Rhodotorula glutinis*'in zeytin çekirdeklerine tutuklanması

*Rhodotorula glutinis* 'in zeytin çekirdeklerine adsorpsiyon ile ne derecede tutuklandığının belirlenmesi için bir ön deneme yapılmıştır. Ön çoğalma ortamı olarak 250 ml erlene konulan 100 ml %100 ZK ortamına 9.08 g/L üre katıldıktan sonra otoklavda sterillemiş ve mikrobank ortamında muhafaza edilen maya ile inokule edilerek 30 °C ve 150 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosuna konulmuştur. Tutuklama materyali olarak ise 20 g zeytin çekirdeği 170 ml %100 ZK (TF=400, pH=433) içine konularak ortam 500 ml

erlende sterillenmiştir. Daha sonra bu ortama hücrel aktivite ve pH artışı gözlenen ön çoğalma ortamından 100 st sonra alınan 10 ml ortam aktarılmıştır. Bu denemeye paralel olarak 20 g zeytin çekirdeği 180 ml %100 ZK ortamına konularak sterillenmiş; ancak hücre inoküle edilmemiştir.

Her iki erlen de 30 °C ve 75 rpm koşullarında çalışan çalkalamalı hava banyosuna konulmuştur. 144 st sonra tutuklama ortamında hücrel aktivite ve pH artışı görülmüştür. Bu noktada erlenlerden zeytin çekirdekleri çıkarılarak kurutulmuş ve tartılmıştır. İnokulasyon yapılan ortamdaki zeytin çekirdekleri abiyotik ortamdakinden 0.467 g daha fazla bulunmuştur. Bu şekilde tutuklama 0.023 g kuru hücre/ g çekirdek olacak şekilde gerçekleşmiştir. Aynı st'te sıvı ortamdan alınan örnekte ise 2.8 mg/ml kuru hücre ölçülmüştür.

#### **4.4.2 Tutuklanmış *Rhodotorula glutinis* 'in biyoarıtımda kullanılması**

Zeytin çekirdeklerine tutuklanmış *Rhodotorula glutinis* ile biyoarıtımın incelenmesi için Bölüm 4.4.1'de anlatıldığı gibi şekilde 144 st süren tutuklama işleminin ardından, zeytin çekirdekleri ortamdan alınarak 9.08 g/L üre ile desteklenerek santrifüjlenmiş ve otoklavda sterilize edilmiş 100 ml ZK (TF=400 mg/L, pH=4.33) ortamına aktarılmıştır. 68 st süren 30 °C ve 150 rpm koşullarındaki biyoarıtım sonunda 5.2 olan başlangıç pH düzeyi 8.3 e yükselerek hücrel aktivite ve biyoarıtım gerçekleştiği görülmüştür. Bu ortamda toplam fenol giderimi ise %19 olarak bulunmuştur.

## 5 TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1. Bütünsel Yaklaşım

Yeryüzü güneşten aldığı enerji sayesinde, kendi içerisinde termodinamik ve kütle korunumu açısından bir denge halindedir. Bu dinamik denge, mikro ve makro ölçekteki madde döngüleriyle sağlanmaktadır. Ve yeryüzünde yaşayan canlıların bu denge üzerindeki etkisi çok büyüktür. Canlılar birbirinden tamamen bağımsızmış gibi görünen farklı madde döngülerini birbirlerine bağlarlar ve bu sayede bir dinamik denge hali sağlanmış olur. Ancak insanoğlu, doğadaki bu döngülerden bağımsız işleyen sistemler kurmaktadır. Bu sistemler; şehirler, binalar, gemiler ve fabrikalar gibi iç işleyiş bakımından doğadan bağımsız ancak girdi ve çıktı bakımından tamamen doğaya bağımlı olan sistemlerdir. Bu sistemler doğanın ürettiğini alır, tüketir ve sistem içerisinde kullanamayacağı atığı doğaya geri bırakır. Bu atıklar doğa tarafından döngü içerisine tekrar dahil edilirler.

Son yüzyıldaki istatistiksel veriler göstermektedir ki doğa, bu sistemlerin açığa çıkardığı atıkları yeterli ölçüde karşılamamaya başlamıştır. Bu durumun en iyi göstergesi atmosferdeki karbondioksit düzeyleridir. Sanayi devriminden sonra atmosfer karbondioksit düzeyi üstel artışa geçmiştir. Ancak insanoğlu gelinen noktayı geriye döndürebilecek teknoloji ve bilgi birikimine sahiptir. Bunu yapabilmenin en güzel yolu ise kurulan sistemleri işleyiş bakımından doğal döngüye uyumlu hale getirmektir. Bu uyumluluk sürecinin bir parçası da bu sistemlerden çıkan atıkların doğal döngülerine en kısa sürede ve en zararsız biçimde geri katılımlarını sağlamaktır.

Doğal koşullarda dalında yetişen bir zeytin tanesi zamanı geldiğinde toprağa düşer, meyvesi canlılar tarafından katabolize edilerek yeniden biyokütle, enerjiye, o bitkinin yeniden fotosentezde kullanacağı karbondioksit ve suya dönüşür. Çekirdeği de uygun koşullar bulduğunda, yaşlanarak ölen ağaçların yerini alacak yeni bir birey meydana getirir. İnsanoğlu ise bu zeytinleri dalından toplayarak fabrikalara götürür, içinden yağını



çıkartır, geriye kalan posayı ve suyu doğaya geri bırakır. Ancak bu kez durum dalından düşen zeytininkinden farklıdır. Meydana gelen atıklar toksik fenolik bileşikler bakımından daha konsantredir ve deşarj edildikleri çevrede bulunan bitkiler ve mikroorganizmalar yüksek hacimde ve yüksek derişimdeki fenolik içeriği olan atığı tolere edemeyerek ölürler.

Zeytinyağı üretimi sırasında açığa çıkan sıvı atığın toksik özelliklerini düşürebilecek çok etkin fiziksel ve kimyasal yöntemler mevcuttur. Ancak bu yöntemler de yukarıda bahsedilen doğal döngülere uyumluluk ilkesinden uzaktırlar; çünkü bu teknikler de sonuç olarak atık üretirler. Sürdürülebilirlik kavramı tam bu noktada önem kazanmaktadır. Biyoteknolojik teknikler, sistemlerin sürdürülebilirliğinin sağlanması açısından oldukça elverişlidir. Sistemlerden çıkan artıkların tekrar sistem içerisinde geri kazanımının sağlanması, enerji kullanım etkinliği açısından önemlidir. Bu şekilde değerlendirilemeyen atıkların ise doğaya bırakılmadan önce kirletici yüklerinin ılımlı düzeylere indirilmesi gerekmektedir. Bu şekilde doğadaki madde döngülerine en kısa ve en zararsız şekilde katılmaları sağlanmış olur.

Zeytinyağı fabrikasından çıkan sıvı atık da aynı şekilde sistem içerisine geri kazandırılabilir ya da sürdürülebilir bir işlem ile atık özellikleri iyileştirilebilir. Ancak bu atığın bu şekilde bertarafına ilişkin uygulanabilir bir sistem henüz geliştirilmemiştir. Bu yüksek lisans tezinde, biyoteknolojik teknikler kullanılarak zeytinyağı fabrikası sıvı atığının özelliklerinin iyileştirilmesi amaçlanmıştır.

## 5.2. Teknik Değerlendirme

Gerçekleştirilen yüksek lisans çalışmasında, *Rhodotorula glutinis* ve *Debaryomyces hansenii* mayaları literatürde ilk kez kullanılarak erlen ve biyoreaktör denemeleri ile zeytin karasuyu biyoarıtımı incelenmiştir. Biyoarıtım için öncelikle mayaların toksik olan bu ortama adaptasyonları sağlanmış, ardından ortama daha iyi uyum gösteren *R. glutinis* ile azot kaynağı ve derişimi, sıcaklık, çalkalama hızı, maya özütü, santrifüj ve sterilizasyon etkileri incelenmiştir. Biyoreaktör denemelerinde ise -özellikle sürekli işletim ile-

biyoarıtım denemelerinin büyük ölçekte uygulanabilirliği hakkında önemli fikirler edinilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür ki *R. glutinis* ve *D. hansenii* karasuyun toksik etkisine karşı direnç geliştirebilmektedirler. Ancak biyoarıtımdan önce mutlaka bir adaptasyon aşaması gerekmektedir. Katı çoğalma ortamına zeytin karasuyu katılması, bu ortamda çoğalan mayaların karasuya adaptasyonunu sağlayabilmektedir. Bununla birlikte zeytin karasuyu ortamına katılan üre, *R. glutinis*' in bu ortamda yaşayabilme kapasitesini etkin bir şekilde arttırmaktadır.

Her ne kadar hücrelerin ortama alışması için çeşitli ön adaptasyon teknikleri ve üre ilavesi gerekse de, bazı erlen ve biyoreaktör denemeleri göstermiştir ki, hücreler bir kere bu ortama adapte olduktan sonra biyoarıtım ortamına seyreltilmemiş, destek azot içermeyen, santrifüj ve sterilizasyon gibi ön işlemler görmemiş karasu beslemesi yapıldığında biyoarıtım sorunsuzca devam etmektedir. Biyoarıtım sonucunda elde edilen sıvı; toplam fenolik içerik bakımından oldukça düşüktür. Ancak kimyasal oksijen ihtiyacı giderimi, bu derece etkin değildir ve renkte de herhangi bir açılma görülmemiştir. Buna karşın, karasuyun karakteristik keskin kokusu yok olmuş ve asitlik düşerek pH düzeyi alkali bölgeye yükselmiştir. Toksisiteden ve keskin kokudan sorumlu olan bileşikler daha çok düşük moleküler ağırlıklı ve monofenollerdir. Koyu renkten sorumlu olanlar ise yüksek kütleli polimerize olmuş fenollerdir. Elde edilen sonuçlar göstermiştir ki, *R. glutinis* yüksek zincirli fenollerin yıkımında etkin değildir ve monofenollerin karasuyun KOİ yüküne katkısı azdır.

*Phanerochaete chrysosporium* ve *P. ostreatus* mikroorganizmalarıyla yapılan biyoarıtımlarda karasuyun renginde %50'ye varan dekolorizasyon sağlandığı kaydedilmiştir. Ancak toplam fenol gideriminde bu tez çalışmasında olduğu kadar etkin bir giderim sağlanamamıştır (Singh, 2006). Bu verilerden anlaşılmaktadır ki karasuyun biyoarıtımında birden fazla mikroorganizmayla kombine sistemler kurularak daha iyi arıtım sağlamak mümkün olabilecektir.

Yapılan denemelerde, çalkalama hızı, sıcaklık, santrifüj, sterilizasyon, maya özütü gibi parametrelerin de biyoarıtıma etkisi incelenmiştir. Statik, 50 ve 150 rpm koşullarında yapılan denemelerde toplam fenol giderimi seyreltilmiş karasu ortamında sırasıyla %72, 80 ve 85 olarak ölçülmüştür. Literatürde seyreltilmemiş karasuyuyla yapılan *Trametes versicolor* ile statik ve 150 rpm’de yapılan denemede toplam fenol giderimi sırası ile %39 ve %70 olarak ölçülmüştü (Ergül vd. 2009 ). Bu çalışmada denenen parametreler arasındaki en iyi biyoarıtım sağlayan sıcaklığın 30 °C ve çalkalama hızının 150 rpm olduğu, ortama maya özütü ilavesinin, santrifüj ve sterilizasyonun ise herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür. Erlenlerde bu koşullarda seyreltilmemiş, santrifüj ve sterilize edilmemiş karasuyuyla *R. glutinis* ile yapılan, 150 st süren biyoarıtımda %89 TF giderimi ve %18 KOİ giderimi sağlanmıştır.

Biyoarıtım ortamlarında pH’nın hücre büyümesi ve toplam fenol derişimi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Ortamlarda hücreler çoğaldıkça ve fenoller yıkıldıkça pH’da artış olmaktadır. Denemelerde hücresel aktivitenin indikatörü olarak pH dikkate alınmıştır. Ayrıca biyoreaktör denemelerinde statik pH koşullarında arıtımın sağlanması için bu ilişkiden faydalanılmıştır.

*R. glutinis* ile çok sayıda fenolik bileşen içeren zeytin karasuyunun biyoarıtımı çalışmalarında ulaşılan en önemli bulgulardan biri de ortama konulan ürenin varlığıdır. Biyoarıtım ortamına üre eklenmesinin, diğer azot kaynakları amonyum sülfat ve amonyum nitrattan farklı sonuçlar vermesi, nutrient özelliği ve ortam pH’sının ayarlanması dışında başka etkileri olduğunu da düşündürmüştür.

Ürenin, *R. glutinis* ’in zeytin karasuyu ortamındaki yaşayabilme kapasitesini ne şekilde arttırmaya yardımcı olduğunu anlamak için yapılan denemelerde görülmüştür ki üre eklendikten sonra sterilize edilen zeytin karasuyu ortamının pH düzeyi artmaktadır. Ürenin biyoarıtıma olumlu etkisinin pH artışından mı kaynaklandığını anlamak için molar bazda denk azot derişimi içerden amonyum sülfat ve üre ortamların pH değerleri eşitlenmiş ve bu şekilde yapılan biyoarıtımlarda görülmüştür ki amonyum sülfat ortamında mayalar %100 zeytin karasuyunda yaşayamazken üre ortamında çoğalmış ve fenol giderimi

sağlanabilmiştir. Yapılan bu deney ile ürenin ortam pH'sını arttırmasıyla mayanın fenolik ortama adaptasyon ve fenollerini kullanma kapasitesinin doğrudan ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

Fenolik bileşikler hücre membranını parçalayarak bakterisidal etki gösterirler. Bununla birlikte fenol toksisitesi enerji transformasyonu ile ilgili aktiviteleri, membran bariyer ve membran protein fonksiyonlarını bozarak hücre ölümüne neden olur. Ancak bazı mikroorganizmalar birçok mekanizma üzerinden fenole karşı direnç geliştirebilirler. Bu mekanizmalardan biri hücre membranındaki *cis*- konfigürasyonundaki doymamış yağ asitlerinin *trans*- forma izomerizasyonudur. Bu tür adaptasyon mekanizmaları hücre membranının yapısal sağlamlığını arttırarak fenollere karşı dayanımını arttırmaktadır (Tay et al., 2006).

Fenolik bileşikler aynı zamanda enzimatik inhibisyon ile de toksik etki gösterirler. Ancak mikroorganizmalar bu bileşikleri parçalayan enzimleri üreterek fenollerini katabolize ederler. Fenolik maddelerin parçalanmasında görev yapan enzimler, mikroorganizma türüne, kullanılan substrata ve koşullara göre değişmesine karşın oksidoredüktaz grubu enzimlerdir ve zeytin karasuyundaki fenollerin parçalanmasında başlıca lakkaz (EC 1.10.3.2), lignin peroksidaz (LiP; EC 1.11.1.14), Mn peroksidaz (MnP; EC 1.11.1.13) ve tirozinaz (polifenol oksidaz; EC 1.14.18.1) enzimleri aktivite gösterir.

Zeytin karasuyunun içerisinde temel olarak bulunan fenolikler 4-(2-hidroksi etil)fenol (tirazol), 4-(2-hidroksietil)-1,2-benzendiol (hidroksitirozol)'dür. Ürenin hidroksifenol bileşikleriyle tepkimeye girerek difenil karbonat, fenilkarbamit, 4-hidroksibenzamid, salisilamid ve hidroksi difenil üre grubu bileşikler verdiği bilinmektedir. (WeiWei and Sun, [http://www.chem.queensu.ca/Conferences/CHEMRAWN/Sun\\_STUDY%20ON%20THE%20REACTION%20OF%20UREA%20WITH%20PHENOL%20OVER%20ZINC%20COMPOUNDS.ppt](http://www.chem.queensu.ca/Conferences/CHEMRAWN/Sun_STUDY%20ON%20THE%20REACTION%20OF%20UREA%20WITH%20PHENOL%20OVER%20ZINC%20COMPOUNDS.ppt)). Ancak yukarıda bahsedildiği gibi üre yüksek sıcaklıklarda hidroksifenol bileşikleriyle tepkimeye girerek yeni bileşikler oluşturmaktadır. Oluşan yeni bileşiklerin hücre üzerindeki oluşturduğu stres, üresiz formlarından daha düşük olabilir. Ayrıca üre formundaki bu bileşikler de maya tarafından salgılanana lakkaz enzimi

tarafından yıkılmaktadır. Yapılan bir çalışmada *N', N'*-dimetil-*N*-(4-hidroksifenil)üre grubu bileşiklerin de lakkaz enzimi tarafından yıkıma uğradıkları gösterilmiştir (Jolivalt et al, 1999) Yapılan literatür taraması, elde edilen deneysel bulgular kullanılarak ve kontrol denemeleri ile analizler yapılarak üre-adaptasyon ilişkisi bu şekilde yorumlanmaya çalışılmıştır; ancak netleşmesi için daha ileri enzimatik ve biyoarıtım çalışmaları yapılmalıdır.

Biyoreaktör denemelerinde kesikli-beslemeli ve sürekli sistem ile biyoarıtım gerçekleştirilmiştir. Kesikli beslemeli sistemde statik pH=8.0 koşullarında biyoarıtım 58 st boyunca sürdürülmüştür. Bu süreç boyunca toplamda 827 ml ham ZK ortama beslenmiştir. Süreç boyunca t=36 st ve t=71 st zamanlarında ortamdan alınan örneklerdeki toplam fenol giderimi sırası ile %13 ve %19'dur. pH kontrolü kapatıldıktan sonra sistem pH sı artmıştır ve pH=8.3 noktasında toplam fenol giderimi %80 olarak ölçülmüştür. Sürekli sistem denemelerinde ise en iyi arıtımın sağlandığı statik pH koşulu, erlen ön çoğalma ortamının üre ile desteklendiği pH=9.35 koşuludur. Bu koşullarda gerçekleşen sürekli işletimde %89 toplam fenol giderimi sağlanmıştır. Ancak arıtım kapasitesi düşüktür (0.05g ml ZK/L biyoreaksiyon hacmi/dk). Endüstriyel ölçekte uygulama için arıtım kapasitesinin arttırılmasına yönelik optimizasyon çalışması yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Aggelis G., Iconomou D., Christouc M., Bokas D. , Kotzailias S., G. Christou G., Tsagou V., Papanikolaou S.. 2003. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater usin *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research*, 37; 3897–3904.
- Amhajji A., Faid M., ElYachioui M. 2005 A process for the treatment of olive mill waste waters by immobilized cells. *Grasas y Aceites* 56(2); 121-124.
- Anonim 2008d, <http://web.deu.edu.tr/cevmer/dokuman/KarasuRaporu.pdf>.
- Anonim 2009 b, <http://www.genome.ad.jp>
- Anonim 2009 c, <http://www.uniprot.org>
- Anonim 2010 a, <http://faostat.fao.org/site/636/default.aspx#ancor>.
- Anonim. 1999. Türk Çevre Mevzuatı Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği Türkiye Çevre Vakfı Yayını, Ankara.
- Assas N., Marouani L., Hamdi M. 2000. Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotrichum candidum*. *Bioprocess Engineering*. 22; 503-507.
- Asses N., Ayed L., Bouallagui H., Rejeb I.B., Gargouri M., Hamdi M.2009. Use of *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture. *Bioresource Technology* 100; 2182–2188.
- Borja R., Raposo F., Rincón B. 2006. Treatment technologies of liquid and solid wastes from two-phase olive oil mills. *GRASAS Y ACEITES*, 57 (1); 32-46.
- Breuer U., Harms H.2006. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23; 415-437.
- Brozzoli V., Crognale S., Petruccioli M., Federici F., D’Annibale A. 2007. *Candida cylindracea*: A model organism to study the possibility of usin olive mill wastewaters as a substrate for lipase production, *J Biotechnol Abstracts* S145; 23.
- D’Annibale A., Sermanni G., Federici F., Petruccioli M.. 2006. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technology*, 97; 1828–1833.
- Demirbaş, A. 2008 Producing bio-oil from olive cake by fast pyrolysis. *Energy Sources*, Part A, 30; 38-44.

- Ergul, F, S Sargin, G Ongen, and F Sukan. 2009. "Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*." *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63; 1-6.
- Erkonak H., Söğüt O.Ö., Akgün M. 2008. Treatment of olive mill wastewater by supercritical water oxidation. *Journal of Supercritical Fluids*, 46 (2); 142-148.
- García I.G., Jiménez Peña P.R., Bonilla Venceslada J.L., Martín Martín A., Martín Santos M.A., Ramos Gómez E. 2000. Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*. 35; 751–758.
- Gonçalves C., Lopes M., Aguedo M., Belo I., Olive mill wastewater valorization: Use by non-conventional yeasts;  
<http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/8014>; erişim tarihi: Eylül 2008
- Hamman O.B., Rubai A. T., Martinez J.1999. Decolorization of olive oil mill wastewaters by *Phanerochaete flavido-alba*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, (18:11); 2410–2415.
- Jaouani A., Sayadi S., Vanthourhout M., Penninckx M.. 2003. Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme and Microbial Technology*, 33; 802-809.
- Jolivalt C., Raynal A., Caminade E., Kokel B., Goffie F., Mougin C. 1999. "Transformation of N,N-dimethyl-N-(hydroxyphenyl) ureas by laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*." *Environmental Science & Technology*, 51; 676-681.
- Kachouri S., Halaoui S., Lomascolo A., Asther M., Hamdi M. 2005. Decolourization of black oxidized olive-mill wastewater by a new tannase-producing *Aspergillus flavus* strain isolated from soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21; 465–1470.
- Katayama-Hirayama K., Tobita S., Hirayama K.1994. Biodegradation of phenol and monochlorophenols by yeast *Rhodotorula glutinis*. *Water Science and Technology*, 30 (9); 59–66.
- Lopes M., Araújo C., Aguedo M., Gomes N., Gonçalves G., Teixeira J.A., Belo, I.2008. The use of olive mill wastewater by wild type *Yarrowia lipolytica* strains: medium supplementation and surfactant presence effect. *Journal of Chemical*

*Technology & Biotechnology*, 84(4); 533-537.

- Martins F., Gomes-Laranjo J., Amaral C., Almeida J., Peixoto F.. 2008. Evaluation of olive oil mill wastewaters acute toxicity: A study on the mitochondrial bioenergetics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69; 480–487
- McNamara J C., Anastasiou C C., O’Flaherty V., Mitchell R. 2008. Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61; 127–134.
- Niaounakis M., Halvadakis C. P. 2006. Olive Processing Waste Management: Literature Review and Patent Survey. Elsevier, P 517, Amsterdam.
- Oktav E., Çatalkaya E.Ç., Şengül F. 2003. Zeytinyağı endüstrisi atık sularının kimyasal yöntemlerle arıtımı. DEÜ Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 5(3); 11-21.
- Olivieri G., Marzocchella A., Salatino P., Giardina ,P., Cennamo G., Sannia G. 2006. Olive mill wastewater remediation by means of *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Eng. J.*, 31; 180–187.
- Paraskeva P., Diamadopoulos E. 2006. Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 81; 475–1485.
- Ramos-Cormenzana A., Juirez-Jimenez B., Garcia-Pareja M.P..1997. Antimicrobial Activity of Olive Mill Waters (Alpechin) and Biotransformed Mill Wastewater Waste- Olive Oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 96; 283-290.
- Rodriguez R., Lama A., Rodriguez R., Jimenez A., Guillen R., Fernandez-Bolanos J. 2008. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology* 99; 5261–5269.
- Ruiz J.C., Rubai T., Perez J., Lopez J.M. 2002. Effect of olive oil mill wastewater on extracellular ligninolytic enzymes produced by *Phanerochaete flavidobalbi*. *FEMS Microbiology Letters* 212; 41-45.
- Sayadi S., Allouche N., Jaoua M., Aloui F.2000. Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry*. (5; 725–735.
- Sayadi S., Ellouz R.1995. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology*, 1098–1103.



- Scioli C. and Vollaro L. 1997. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Wat. Res.*, 31; 2520-2524.
- Singh H. 2006. Mycoremediation: Fungal *Bioremediation*, Wiley Interscience, USA, p.592, pp.53-61.
- Takaç S, Karakaya A. Decolorization and total phenolic content reduction of olive mill wastewater by means of chemical treatments. 19<sup>th</sup> International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA2010 & 7<sup>th</sup> European Congress of Chemical Engineering -ECCE-7, 28 August-1 September 2010, Prague, Czech Republic
- Takaç, S., Karakaya, A. 2009. Recovery of Phenolic Antioxidants from Olive Mill Wastewater. *Recent Patents on Chemical Engineering*. 2(3); 230-237 .
- Tay H.J., Tay L.T.S., Tu L., Yeaow K., Ivanov V. 2006. BIOGRANULATION TECHNOLOGIES FOR WASTEWATER TREATMENT. ELSEVIER, United Kingdom, 277.
- Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D., Aggelis G. 2002. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology* 84; 251–257.
- Uğurlu M, Kula İ., 2007. Decolourization and Removal of Some Organic Compounds from Olive Mill Wastewater by Advanced Oxidation Processes and Lime Treatment. *Env. Sci. Pollut. Res.* 14 (5); 319-325.
- WeiWei P.W., Sun  
[http://www.chem.queensu.ca/Conferences/CHEMRAWN/Sun\\_STUDY%20ON%20THE%20REACTION%20OF%20UREA%20WITH%20PHENOL%20OVER%20ZINC%20COMPOUNDS.ppt](http://www.chem.queensu.ca/Conferences/CHEMRAWN/Sun_STUDY%20ON%20THE%20REACTION%20OF%20UREA%20WITH%20PHENOL%20OVER%20ZINC%20COMPOUNDS.ppt)

## **EKLER**

EK 1 Deneylerde kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler

EK 2 Analizlerin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği

EK 3 Ürenin kimyasal etkisi.

## EK 1 Deneylerde kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler

Çizelge EK 1-1 Deneylerde kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler

<i>Kimyasal</i>	<i>Firma</i>	<i>Katalog No</i>
<b>Agar</b>	Scharlau	07-004
<b>Etanol</b>	Sigma Aldrich	34870
<b>Hidroklorik asit</b>	Riedel-de Haën	07102
<b>Malt özütü</b>	Scharlau	07-080
<b>Maya özütü</b>	Scharlau	07-079
<b>Pepton</b>	Fluka	70171
<b>Üre</b>	Merk	108488
<b>Glukoz</b>	Applichem	A1349
<b>Amonyum sülfat</b>	Sigma	A4915
<b>Amonyum nitrat</b>	Sigma	A9642
<b>Folin-ciocalteu reaktifi</b>	Sigma	9252
<b>Pirogallol</b>	Sigma	254002
<b>Etil asetat</b>	Sigma	27227
<b>Sodyum hidroksit</b>	Sigma-Aldrich	06203

## EK 2 Analizlerin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği

### Toplam fenol derişimi tayin yöntemi:

Toplam fenol (TF) derişim yönteminin doğruluğunu ölçmek üzere yapılan deneyde 13.11.2010'da Burhaniye'den gelen zeytin karasuyu kullanılmıştır. Bu amaçla, 5 ayrı tüpe 5'er ml santrifüjlenmiş ve pH'sı %37 HCl ile 2 ye ayarlanmış karasu konulmuştur. Örnekler etil asetatla 3'er kere ekstakte edildikten sonra organik fazlar toplanmış ve döner buharlaştırıcıda buharlaştırılmıştır. Buharlaştırıcı balonlarının dibinde kalan fenolik kalıntı 5 ml etanol su çözeltisiyle çözülmüştür. Daha sonra Folin-Ciocalteau yöntemiyle toplam fenol derişim ölçümü yapılmıştır (Bölüm 3.3.2). Kullanılan zeytin karasuyunun fenol içeriğinin çok yüksek olduğu tahmin edilerek fenol ekstraktları kimyasal reaksiyondan önce 2 kat seyreltilmiştir. Toplam fenol tayininde 3 paralel örnek ile çalışılmıştır (Çizelge EK 2-1).

Çizelge EK 2-1 Folin-Ciocalteau TF derişim ölçümünde örneklerin absorbands değerleri

ZK No	Abs1(765nm)	Abs2(765nm)	Abs3(765nm)
1	0,668	0,632	0,710
2	0,646	0,752	0,867*
3	0,724	0,657	0,650
4	0,632	0,617	0,669
5	0,717	0,666	0,706

\*Hesaplamaya alınmayan değer

Elde edilen absorbands değerlerinden Şekil 3.3'de verilen standart grafiğine göre TP derişimleri ve standart sapma ve varyansları hesaplanmıştır (Çizelge EK 2-2).

Çizelge EK 2-2 Hesaplanan 5 farklı TF derişimi, standart sapma (S) ve varyans (S<sup>2</sup>) değerleri

ZK	1	2	3	4	5	S	S <sup>2</sup>
TF g/L	1,876	1,957	1,896	1,789	1,949	0,067722	0,004586

Bu denemede toplam fenol yönteminde 5 eşit hacime bölünmüş ZK örnekleri ayrı ayrı ekstrakte edilmiş ve bu ekstraktlardan renk reaksiyonu ile elde edilen absorbans değerlerinden TF düzeyleri hesaplanmıştır. Bir başka denemede ise tek bir ZK örneği ekstrakte edildikten sonra ekstrakt 5 eşit hacime bölünerek Folin-Ciocalteau yöntemiyle TF derişim tayini yapılmıştır. Bu ekstraktlara ait absorbans, hesaplanan TF derişimleri, standart sapma ve varyans verileri Çizelge EK 2-3 te verilmiştir.

**Çizelge EK 2-3** Aynı ZK ekstraktına ait 5 farklı TF derişimi için renk reaksiyonu absorbans, standart sapma ve varyans verileri

<b>Ekstrakt</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>S</b>	<b>S<sup>2</sup></b>
<b>Absorbans (765 nm)</b>	0.835	0.936	0.863	0.886	0.969	0.05422	0.002939

Hesaplanan standart sapma değeri Çizelge EK 2-2 deki verilere göre değerlerin ortalamasının %3.5'i kadardır. Bu değer kabul edilebilir bir aralıktadır.

### **KOI analizi**

KOI analizleri Düzen Norwest Çevre, Gıda ve Vet. Sağ. Hiz. Eğt. Danş. Tic. A.Ş. tarafından yapılmıştır. Metot Dedeksiyon Limiti < 11,2. Ölçüm belirsizliği  $\pm$  % 5,6'dır.

### **Kuru hücre ağırlığı**

Kuru hücre ağırlığı ölçümlerinin doğruluğunu hesaplamak için biyoarıtım ortamından aynı zamanda alınan 6 örnekten paralel olarak Bölüm 3.3.1'de anlatıldığı gibi kuru hücre derişimi ölçülmüştür. Bu denemeye ilişkin veriler Çizelge EK 2-4 te verilmiştir.

**Çizelge EK 2-4** Biyoarıtım ortamından aynı zamanda alınan 6 örneğin kuru hücre derişimi, standart sapma ve varyans verileri

<b>Örnek</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>S</b>	<b>S<sup>2</sup></b>
<b>Kuru hücre derişimi (mg/ml)</b>	0.72	0.52	0.70	0.66	0.68	0.72	0.075542	0.005706

Hesaplanan standart sapma değeri Çizelge EK 2-4 deki verilere göre değerlerin ortalamasının %11'i kadardır.

### EK 3 Ürenin kimyasal etkisi

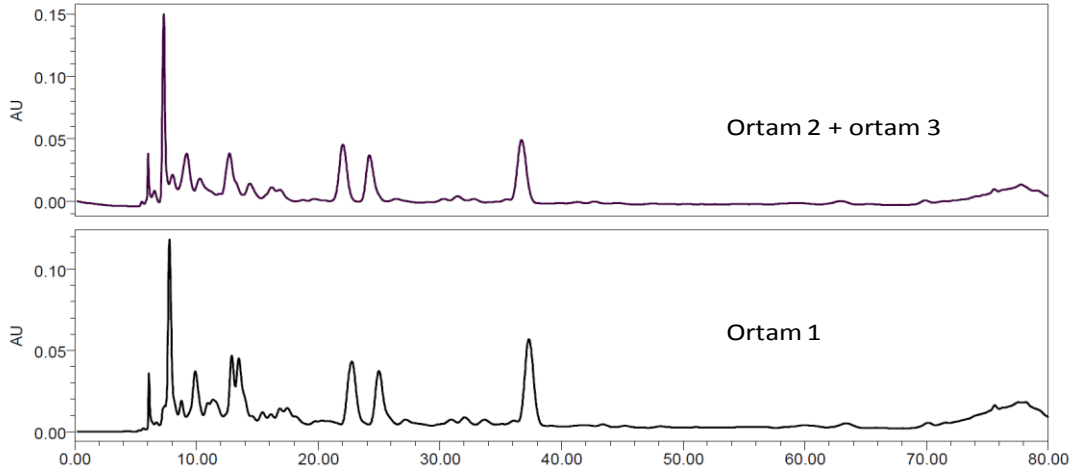
Ürenin zeytin karasuyu ortamındaki kimyasal etkisini anlamak üzere yapılan deneme sonunda pH değeri 4.38 olan ham ZK (Ortam 1), üre ile sterillendiği zaman zaman ortamın pH'ı 6.34'e yükselmiştir. Zeytin karasuyu (Ortam 2) tek başına otoklava konulduğu zaman ise pH değeri değişmemiştir. Sulu çözeltilerdeki üre (Ortam 3) sterillenince pH'sı 7.85'den 9.48 e yükselmiştir. Ancak sterilizasyondan sonra bu ortamlar (Ortam 2 ve 3) karıştırılsa da eşderişimlerde ZK ve üre içeren ortam (Ortam 1) kadar pH yükselmemiştir (Çizelge EK 3-1). Bu sonuç, üre ve ZK'nın yüksek sıcaklıkta reaksiyona girdiği anlamına gelebilir.

Sterilizasyondan sonra ZK + üre içeren ortamların toplam fenol derişimlerine bakılmıştır. Üre ile birlikte sterilize olan ZK ortamının toplam fenol derişimi diğer ortamdaki biraz daha düşük değerdedir. Ardından aynı ortamların fenol ekstraktları HPLC'de analizlenmiştir. HPLC analiz koşulları Çizelge EK 3-2'de yer almaktadır. HPLC kromatogramlarına göre yeni bir bileşik oluşumu veya azalan fenolik madde yoktur (Şekil EK 3-1).

Bu denemeden elde edilen verilere göre ZK ile üre arasında sterilizasyon sırasındaki yüksek sıcaklık ve basınç altında kimyasal tepkime olmaktadır. Ancak HPLC analizleri ile bu tepkimenin fenolik bileşenler üzerinden mi, yoksa zeytin karasuyundaki diğer maddeler üzerinden mi olduğu anlaşılamamıştır. Ortamın pH düzeyini artıran bu kimyasal derişimlerin tam olarak ne oldukları başka analiz yöntemleri ile anlaşılabılır.

**Çizelge EK 3-1** Ürenin kimyasal etkisini anlamak üzere yapılan denemelerde ortamların pH ve TF derişimleri

Ortam	pH (sterilizasyondan önce)	pH (sterilizasyondan sonra)	TF derişimi (mg/L)
Ortam 1 (ZK + üre)	4.38	6.34	142
Ortam 2 (ZK)	4.40	4.30	-
Ortam 3 (üre çözeltilisi)	7.85	9.48	-
Ortam 2 + Ortam 3	-	4.60	159



Şekil EK 3-1 Ortam 1 ve (Ortam 2 + Ortam3) e ait HPLC kromatogramları

Çizelge EK 3-2 a. HPLC analiz koşulları

Değişken	Değer
<b>Cihaz</b>	Waters Alliance 2695
<b>Kolon</b>	XTerra RP18 (Waters)
<b>Kolon boyutu</b>	4.6 mm x 150 mm, 5 µm
<b>Hareketli faz akış hızı</b>	0.33 ml/dk
<b>Kolon sıcaklığı</b>	25 °C
<b>Dedektör</b>	UV-VIS Dual Absorbance Detector (Waters 2487)
<b>Dalga boyu</b>	254 nm
<b>Enjeksiyon hacmi</b>	20 µl

b. HPLC analizinde uygulanan gradyen program

Zaman(dk)	A mobil fazı % (ACN:H <sub>2</sub> O 70:30)	B mobil fazı % (%0.1 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
<b>0</b>	20	80
<b>60</b>	30	70
<b>70</b>	50	50
<b>80</b>	20	80



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Alper Karakaya  
Doğum Yeri :Antalya  
Doğum Tarihi :03.02.1983  
Medeni Hali :Bekar  
Yabancı Dili :İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :Antalya Lisesi 2001  
Lisans :Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 2008  
Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji  
Yüksek Lisans Programı, 2011

### Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

1. TÜBİTAK; 109M290'nolu "Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Özelliklerinin İyileştirilmesi ve Antioksidan Üretiminde Kullanılması İçin Biyoproses Geliştirilmesi"; Proje Bursiyeri. 2009-2011
2. Düzen Laboratuvarlar Grubu; Yönetici Asistanı, 2008.
3. DPT 07/DPR/003'nolu Kırsal Kesim Biyogaz Teknolojilerinin Geliştirilmesi ve Yaygınlaştırılması; Proje Araştırmacısı. 2007.
4. Ege Üniversitesi Hastanesi Simüle Hasta laboratuvarı; Simüle hasta, 2006.

### Yayımları:

#### *Makaleler:*

1. Takaç, S., Karakaya, A., 2009. Recovery of Phenolic Antioxidants from Olive Mill Wastewater, Recent Patents on Chemical Engineering, 2(3); 230-237.

*Sözlü sunumlar:*

1. Karakaya, A., Akardere, E., Laleli, Y., Takaç, S., 13-15.4.2010 Phenolic Antioxidant Production during Bioremediation of Olive Mill Wastewater by *Rhodotorula glutinis*. COST Action CM0903 UBIOCHEM, Book of Abstracts, 57, Cordoba, Spain.
2. Karakaya, A., Laleli, Y., Takaç, S. 16-19.6.2010. Adaptation of *Rhodotorula glutinis* to Olive Mill Wastewater for Bioremediation. BEC2010, 5<sup>th</sup> International Bioengineering Congress, Abstract Book 43, Izmir, Turkey.

*Poster sunumlar:*

1. Karakaya, A., Laleli, Y., Takaç, S., 27-30/9/2009, Biological Treatment of Olive Mill Wastewater by *Rhodotorula glutinis* and *Debaryomyces hansenii*, Biotech METU 2009, International Symposium on Biotechnology Developments and Trends, Abstract Book 81, Ankara, Turkey.
2. Takaç S, Karakaya A., 28 August-1 September 2010. Decolorization and Total Phenolic Content Reduction of Olive Mill Wastewater by means of Chemical Treatments. 19<sup>th</sup> International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA2010 & 7<sup>th</sup> European Congress of Chemical Engineering -ECCE-7, Prague, Czech Republic