

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUTUKLANMIŞ *Rhodotorula glutinis* İLE ZEYTİNYAĞI FABRİKASI  
SIVI ATIĞININ BİYOARITIMI

Gaye BOZKOYUNLU

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2013

Her hakkı saklıdır

## TEZ ONAYI

Gaye BOZKOYUNLU tarafından hazırlanan “**TUTUKLANMIŞ *Rhodotorula glutinis* İLE ZEYTİNYAĞI FABRİKASI SIVI ATIĞININ BİYOARITIMI**” adlı tez çalışması 04.01.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof.Dr.Serpil TAKAÇ

### Jüri Üyeleri

**Başkan:** Prof.Dr.Zümriye AKSU

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye** : Prof.Dr.Serpil TAKAÇ

Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye** : Yrd.Doç.Dr.Ayşe KARAKEÇİLİ

Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

**Prof.Dr.İbrahim DEMİR**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TUTUKLANMIŞ *Rhodotorula glutinis* İLE ZEYTİNYAĞI FABRİKASI SIVI ATIĞININ BİYOARITIMI

Gaye BOZKOYUNLU

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

Çalışmada, zeytinyağı üretim fabrikalarının sıvı atığı zeytin karasuyunun tutuklanmış *Rhodotorula glutinis* hücreleri ile biyoarıtımı incelenmiştir. Tutuklama materyal ve yönteminin, biyoarıtım koşullarının ve işletim türünün ortamın pH değişimi ve toplam fenol derişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. *R. glutinis*, Ca-aljinat pelletleri, zeytin çekirdeği, agar, poliüretan köpük ve zeolit olmak üzere beş farklı materyale fiziksel adsorpsiyon veya hapsedme yöntemi ile tutuklanmış ve en uygun tutuklama materyali olarak Ca-aljinat pelletleri seçilmiştir. Tutuklama işlemindeki aljinat derişimi ve pellet çapı değiştirilerek, biyoarıtımların %3 Na-aljinat çözeltisi ile oluşturulan  $D_p=3$  mm çaplı pelletler ile yapılmasına karar verilmiştir. Tüm biyoarıtımlarda zaman ile ortamın pH değeri artmış ve bununla uyumlu olarak toplam fenol derişimi azalmıştır.  $TF_0=390-1187$  mg/L aralığında başlangıç toplam fenol derişiminin artması ile fenol giderim hızı artmış; ancak  $t=120$  st sonunda biyoarıtımlar tamamlanarak tüm ortamlarda %83-87 aralığında fenol giderimi sağlanmıştır. Tutuklanmış hücre miktarının biyoarıtıma etkisi 0.03-0.7 g yaş hücre/g pellet aralığında incelenmiş ve en yüksek hücre miktarında ilk 24 st sonunda %55 toplam fenol giderimi sağlanmıştır. Azot kaynağı olarak biyoarıtım ortamına eklenen üre, amonyum sülfattan daha yüksek hız ile fenol gidermiştir. Biyoarıtıma karıştırma hızının etkisi  $N=150, 200$  ve  $250$  rpm değerlerinde incelenmiş ve karıştırma hızının artması ile toplam fenol giderim hızının da arttığı belirlenmiştir. Tutuklanmış *R. glutinis* hücreleri kesikli sistemde her biri 48 st olan 5 ardışık işletimde kullanılmış ve ilk 3 işletimde aynı fenol giderim etkinliği sağlanırken sonrasında giderilen toplam fenol derişimi azalmıştır. Yarı kesikli işletimde aynı hücre miktarı ile gerçekleştirilen kesikli işleme göre daha fazla hacimde zeytin karasuyu arıtılmıştır. Ca-aljinat pelletlere tutuklanmış *R. glutinis* ile gerçekleştirilen biyoarıtımlarda en yüksek toplam fenol giderimi kesikli işletimde  $TF_0=1068$  mg/L,  $N=200$  rpm, 0.03 g yaş hücre/g pellet,  $T=30$  °C koşullarında  $t=96$  st de %84 olarak elde edilmiştir.

**Ocak 2013, 88 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Biyoarıtım, Fenol giderimi, *Rhodotorula glutinis*, Tutuklama, Zeytin karasuyu

## ABSTRACT

Master Thesis

### BIOREMEDIATION OF OLIVE MILL WASTEWATER BY IMMOBILIZED *Rhodotorula glutinis*

Gaye BOZKOYUNLU

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

Bioremediation of olive mill wastewater (OMW), which is a by-product of olive oil process, by immobilized *Rhodotorula glutinis* cells was studied. The effects of the type of immobilization material and method, bioremediation conditions and operating strategies on the variations of medium pH and total phenol concentration were investigated. *R. glutinis* was adsorbed or entrapped on five different materials such as Ca-alginate beads, olive stones, agar, polyurethane foam, zeolite; and Ca-alginate was found to be the best material. The most suitable pellets for bioremediation were chosen as  $D_p=3$  mm in diameter which were prepared using 3% Na-alginate solution among the investigated several pellet diameters and alginate concentrations. The medium pH value increased and total phenol concentration decreased with time. Throughout all bioremediations within  $TF_0=390-1187$  mg/L total phenol concentration range, higher removal rate of phenol was observed at higher phenol concentrations. After 120 hours, 83-87% phenol removal was achieved in all of the bioremediation media. The amount of immobilized cell concentration was changed in the range of 0.03-0.7 g wet cell/g pellet and 55% total phenol removal was obtained after 24 hours with the highest cell concentration. Urea, which was the supplemental nitrogen source, provided higher rate of phenol removal than ammonium sulphate. The increase of the agitation rate was also found to increase the phenol removal rate in the studied range ( $N=150, 200$  and  $250$  rpm). Immobilization *R. glutinis* cells provided the same phenol removal efficiency for the 3 of the 5 sequential usage, which were conducted for 48 hours in batch mode. The total phenol reduction was found to decrease for the rest of the media. Higher amount of OMW was bioremediated by fed-batch operation than batch operation, using the same amount of cells. The highest total phenol reduction was achieved as 84% after 96 hours, with the Ca-alginate entrapped *R. glutinis* cells in batch mode under  $TF_0=1068$  mg/L,  $N=200$  rpm, 0.03 g wet cell/g pellet and  $T=30$  °C conditions.

**January 2013, 88 pages**

**Key Words:** Bioremediation, immobilization, *Rhodotorula glutinis*, olive mill wastewater

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

İki senelik yüksek lisans çalışmamın sonuna gelmiş bulunuyorum. Bu süre zarfında, engin bilgilerinden faydalandığım, ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Serpil TAKAÇ'a teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam "TÜBİTAK 109M290: Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Özelliklerinin İyileştirilmesi ve Antioksidan Üretiminde Kullanılması İçin Biyoproses Geliştirilmesi" ve "Ankara Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü 12B4343001: Zeytin Karasuyunun Biyoarıtımında Kullanılmak Üzere *Rhodotorula glutinis*'in Tutuklanması" projelerinin kapsamında da yer almıştır. Bu tez çalışmasını projeler ile maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a ve Ankara Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkür ediyorum.

Laboratuvara ilk geldiğim zamanlarda hocam olduğu için mesafeli durduğum ancak zaman ilerledikçe dert ve sevinçlerimizi paylaşarak yakınlaştığımız, beni anlayan sürekli destek olan canım arkadaşım ve hocam Dr. Ayşe Ezgi Ünlü BÜYÜKTOPCU'ya teşekkür ediyorum.

İçtenliği ve yardımseverliği sayesinde laboratuvar ortamına çabuk uyum sağlamama yardımcı olan, yüksek lisans çalışmasını bitirince yanımızdan ayrılan ama hiç bağımızı kopartmadığımız sevgili Emine AKARDERE'ye teşekkür ediyorum.

Laboratuvara geldiğim ilk günden itibaren yaptığı deneylere beni dahil eden ve acemiliğimi üzerimden atlatmamı sağlayan, farklı düşünce tarzıyla çalışmalarına yön veren sevgili Alper KARAKAYA'ya teşekkür ediyorum.

Yaşamım boyunca beni koruyup kollayan, her zaman yanımda olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak bugünlere gelmemi sağlayan canım babam Turgay BOZKOYUNLU'ya ve canım annem Emine BOZKOYUNLU'ya çok teşekkür ediyorum, iyi ki varsınız.

Gaye BOZKOYUNLU  
Ankara, Ocak 2013

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI VE KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Zeytinyağı ve Üretim Prosesleri.....	4
2.2 Zeytin Karasuyu.....	7
2.2.1 Özellikleri.....	7
2.2.2 Zeytin karasuyundaki fenolik bileşenler.....	9
2.2.3 Zeytin karasuyunun çevre üzerine etkileri.....	10
2.2.4 Zeytin karasuyu arıtım yöntemleri .....	10
2.2.4.1 Fiziksel arıtım .....	10
2.2.4.2 Fizikokimyasal arıtım .....	11
2.3 Mikroorganizma/Enzim Tutuklama .....	13
2.3.1 Tutuklama materyal ve yöntemleri .....	14
2.3.1.1 Bağlama.....	14
2.3.1.2 Hapsetme.....	16
2.4 Kaynak Özetleri .....	18
2.4.1 Serbest hücreler ile zeytin karasuyu biyoarıtımı .....	18
2.4.2 Tutuklanmış hücreler ile zeytin karasuyu biyoarıtımı .....	20
2.5 <i>Rhodotorula glutinis</i> .....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1 Materyal .....	23
3.1.1 Zeytin karasuyu.....	23
3.1.2 Tutuklama materyalleri.....	23
3.2 Yöntem .....	24
3.2.1 Mikroorganizma ve saklama.....	24

3.2.2 Mikroorganizma çoğaltma .....	24
3.2.3 Mikroorganizma tutuklama .....	24
3.2.3.1 Ca-aljinat pelletlerine tutuklama.....	24
3.2.3.2 Zeytin çekirdeğine tutuklama .....	25
3.2.3.3 Agara tutuklama .....	26
3.2.3.4 Poliüretan köpüğe tutuklama .....	26
3.2.3.5 Zeolite tutuklama .....	27
3.2.4 Tutuklanmış <i>R. glutinis</i> 'in kesikli ve yarı kesikli işletim ile erlende gerçekleştirilen biyoarıtımda kullanımı .....	27
3.2.4.1 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanan <i>R. glutinis</i> 'in biyoarıtımda kullanımı .....	27
3.2.4.2 Zeytin çekirdeğine tutuklanan <i>R. glutinis</i> 'in biyoarıtımda kullanımı .....	28
3.2.4.3 Agara tutuklanan <i>R. glutinis</i> 'in biyoarıtımda kullanımı.....	28
3.2.4.4 Poliüretan köpüğe tutuklanan <i>R. glutinis</i> 'in biyoarıtımda kullanımı.....	28
3.2.4.5 Zeolite tutuklanan <i>R. glutinis</i> 'in biyoarıtımda kullanımı.....	28
3.2.5 Tutuklanmış <i>R. glutinis</i> 'in kolon sistemde gerçekleştirilen biyoarıtımda kullanımı .....	29
3.2.5.1 Zeytin çekirdeğine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ile kolon sistemde biyoarıtım.....	29
3.2.5.2 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ile kolon sistemde biyoarıtım.....	31
3.3 Analizler .....	32
3.3.1 pH ölçümü.....	32
3.3.2 Toplam fenol derişimi.....	32
3.3.3 Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) .....	33
3.3.4 Hücre derişimi .....	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	35
4.1 Agar, Zeolit ve Poliüretan Köpüğe Tutuklanmış <i>Rhodotorula glutinis</i> ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı .....	35
4.2 Zeytin Çekirdeğine Tutuklanmış <i>Rhodotorula glutinis</i> ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı .....	37
4.2.1 Başlangıç toplam fenol derişimi etkisi.....	37

4.2.2 Karıştırma hızı etkisi .....	38
4.2.3 Kesikli çalkalamalı ve geri döngülü dolgulu kolon sistemlerinin karşılaştırılması .....	40
4.3 Ca-Aljinat Pelletlerine Tutuklanmış <i>Rhodotorula glutinis</i> ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı .....	41
4.3.1 <i>Rhodotorula glutinis</i> 'in Ca-aljinat pelletlerine tutuklama koşullarının etkisi.....	41
4.3.1.1 Ca-aljinat pellet çapı etkisi.....	41
4.3.1.2 Na-aljinat derişim etkisi .....	42
4.3.1.3 Glutaraldehit ile çapraz bağlama .....	44
4.3.2 Tutuklanmış <i>Rhodotorula glutinis</i> ile biyoarıtım koşullarının etkisi.....	45
4.3.2.1 Başlangıç toplam fenol derişimi etkisi.....	45
4.3.2.2 Tutuklanmış hücre miktarı etkisi.....	52
4.3.2.3 Karıştırma hızı etkisi .....	54
4.3.2.4 Azot kaynağı türü etkisi.....	55
4.3.3 <i>Rhodotorula glutinis</i> tutuklanmış Ca-aljinat pelletleri ile biyoproses işletim türü etkisi.....	59
4.3.3.1 Kesikli işletimde kullanım sayısı.....	59
4.3.3.2 Yarı kesikli işletim.....	61
4.3.3.3 Dolgulu kolon sistemde işletim.....	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....	67
5.1 <i>R. glutinis</i> 'in Farklı Özellikteki Materyallere Uygun Yöntemler ile Tutuklanması .....	67
5.2 Ca-aljinat Pelletlerine Tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımında Uygun Kullanım Koşullarının Araştırılması .....	69
5.3 Ca-aljinat Pelletlerine Tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ile Biyoproses İşletim Türü Etkisi .....	73
KAYNAKLAR .....	75
EKLER.....	80
EK 1 Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler .....	81
EK 2 Çalışmada kullanılan cihazlar.....	82
EK 3 Toplam fenol derişimi kalibrasyon doğrusu ve analizlerin doğruluğu .....	83



<b>EK 4 Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) analizlerinin doğruluğu .....</b>	<b>85</b>
<b>EK 5 Yaş-kuru hücre kalibrasyon grafiği .....</b>	<b>86</b>
<b>EK 6 Poliüretan köpük, zeolit ve agar kullanılan biyoyarıtım ortamlarının fotoğrafı.....</b>	<b>87</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>88</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

L/D	Kolon boy/çap oranı
N	Karıştırma hızı (rpm)
Q	Hacimsel akış hızı (ml/dk)
S	Standart sapma
T	Sıcaklık (°C)
t	Zaman (dk, st)
V <sub>0</sub>	Başlangıç hacmi (ml)
V <sub>T</sub>	Toplam hacim (ml)
λ	Dalga boyu (nm)
x g	Yerçekimi ivmesi

### Kısaltmalar

GA	Glutaraldehit
KOİ	Kimyasal Oksijen İhtiyacı
TF	Toplam Fenol
TF <sub>0</sub>	Başlangıç Toplam Fenol Derişimi
UYM	Universal Yeast Medium
ZÇ	Zeytin Çekirdeği
ZK	Zeytin Karasuyu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Zeytinyağı ekstraksiyon prosesleri .....	5
Şekil 2.2 Avrupa’da kullanılan teknolojiler .....	7
Şekil 2.3 Tutuklama yöntemleri .....	14
Şekil 2.4 Ters misel ve kabarcık içine enzim hapsetme .....	17
Şekil 3.1 Ca-aljinata tutuklama deney düzeneği .....	25
Şekil 3.2. a. Zeytin çekirdeğine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımın incelendiği kolon sistemi şematik gösterimi, b. Tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımın incelendiği kolon sistemi fotoğrafı .....	30
Şekil 3.3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımın incelendiği sürekli işletim kolon sistemi şematik gösterimi .....	31
Şekil 4.1 Agar, poliüretan köpük ve zeolite tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ’in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında pH ve TF derişimlerinin zaman ile değişimi .....	35
Şekil 4.2 Agar, poliüretan köpük ve zeolite tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ’in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında toplam fenol giderimi .....	36
Şekil 4.3 Zeytin çekirdeğine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ’in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında pH ve TF derişimlerinin zaman ile değişimi .....	37
Şekil 4.4 Zeytin çekirdeğine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ’in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında pH’ın zaman ile değişimi .....	39
Şekil 4.5 Zeytin çekirdeğine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ’in kullanıldığı geri döngülü kolon sistemde yapılan biyoarıtımda tanktaki pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi .....	40
Şekil 4.6 Ca-aljinat pellet çapının biyoarıtıma etkisinin incelendiği ortamlarda zamanla pH ve toplam fenol derişiminin değişimi .....	42
Şekil 4.7 %3 ve 4 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ile yapılan biyoarıtımlarda zaman ile pH ve toplam fenol derişiminin değişimi .....	43
Şekil 4.8 %3 ve 4 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ile toplam fenol giderimi .....	44
Şekil 4.9 %0.5 ve 1 (a/h) GA ile muamele edilen biyoarıtım ortamları ve kontrol ortamının zamanla pH değişimi .....	45
Şekil 4.10 Serbest ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ’in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında ve kontrol ortamında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi .....	46
Şekil 4.11 Serbest ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ’in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında ve kontrol ortamında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi .....	47
Şekil 4.12 Serbest ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ’in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında ve kontrol ortamında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi .....	48
Şekil 4.13 Serbest ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> ’in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında ve kontrol ortamında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi .....	49
Şekil 4.14 %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış hücre içeren ve farklı TF <sub>0</sub> derişimlerine sahip biyoarıtım ortamlarında zaman ile pH ve toplam fenol derişiminin değişimi .....	50
Şekil 4.15 Başlangıç TF derişimleri farklı olan ZK’nın tutuklanmış ve serbest hücre ile biyoarıtım sonunda %TF giderimleri .....	51

Şekil 4.16	%3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> 'in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi.....	53
Şekil 4.17	Farklı karıştırma hızında gerçekleştirilen biyoarıtım ortamlarında zaman ile pH ve TF derişimlerinin değişimi .....	54
Şekil 4.18	Azot kaynağı olarak üre içeren, serbest ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> 'in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında ve kontrol ortamında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi.....	56
Şekil 4.19	Azot kaynağı olarak amonyum sülfat içeren, serbest ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> 'in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında ve kontrol ortamında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi.....	57
Şekil 4.20	Azot kaynağı olarak amonyum sülfat veya üre kullanılan biyoarıtımlarda %TF giderim sonuçları.....	58
Şekil 4.21	Hücre tutuklanmış Ca-aljinat pelletleri ile birlikte 0.005 M CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O veya 0.005 M CaCO <sub>3</sub> kullanılan biyoarıtım ortamlarında pH'ın zaman ile değişimi.....	60
Şekil 4.22	Hücre tutuklanmış Ca-aljinat pelletleri ile birlikte 0.005 M CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O veya 0.005 M CaCO <sub>3</sub> kullanılan biyoarıtım ortamlarının kullanım sayılarıyla %TF giderim değerleri .....	60
Şekil 4.23	Azot kaynağı olarak üre ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış hücre içeren biyoarıtım ortamında zaman ile pH ve toplam fenol derişiminin değişimi .....	62
Şekil 4.24	Azot kaynağı olarak amonyum sülfat ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış hücre içeren biyoarıtım ortamında zaman ile pH ve toplam fenol derişiminin değişimi .....	64
Şekil 4.25	%3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış <i>R. glutinis</i> 'in kullanıldığı kolon sistemde yapılan biyoarıtımda tanktaki pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi.....	66

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Zeytin meyvesinin bileşimi.....	4
Çizelge 2.2 Zeytinyağı üretim tekniklerinin karşılaştırılması.....	6
Çizelge 2.3 Zeytin karasuyunun kimyasal bileşimi .....	8
Çizelge 2.4 Zeytin karasuyundaki ana biyofenoller.....	9
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan zeytin karasularının (ZK) özellikleri.....	23
Çizelge 4.1 Farklı başlangıç toplam fenol derişimlerinde gerçekleşen biyoarıtımlarda başlangıç toplam fenol giderim hızları ile 48 st sonunda toplam fenol giderimleri .....	51
Çizelge 4.2 Farklı hücre miktarları ile gerçekleşen biyoarıtımlarda başlangıç toplam fenol giderim hız verileri ile 24 st sonunda toplam fenol giderimleri .....	53
Çizelge 4.3 Farklı karıştırma hızları ile gerçekleşen biyoarıtımlarda başlangıç toplam fenol giderim hız verileri ile 24 st sonunda toplam fenol giderimleri .....	55
Çizelge 4.4 Farklı azot kaynağı ile gerçekleşen biyoarıtımlarda başlangıç toplam fenol giderim hız verileri ile 24 st sonunda toplam fenol giderimleri.....	57
Çizelge 4.5 Yarı kesikli işletilen erlen sistemde besleme çözeltisinin ekleme zaman ve miktarları.....	62
Çizelge 4.6 Yarı kesikli işletimde zaman aralığı ile TF giderim değişimi .....	63
Çizelge 4.7 Yarı kesikli işletilen erlen sistemde besleme çözeltisinin ekleme zaman ve miktarları.....	64
Çizelge 4.8 Yarı kesikli işletimde zaman aralığı ile TF giderim değişimi .....	65

## 1. GİRİŞ

Dünyada “Akdeniz diyeti”ne olan ilgi nedeniyle zeytinyağı tüketiminin artışıyla birlikte son 10 yılda zeytinyağı sektörü daha fazla önem kazanmıştır. 2004/2005 ile 2009/2010 yılları arasında dünyadaki zeytinyağı üretiminin ortalama 2 793 200 ton/yıl olduğu bildirilmiştir. En fazla zeytinyağı üretimi, toplam üretimin %75.3 ile Avrupa Birliği ülkelerindedir. Bu ülkelerin sıralaması İspanya (%52.2), İtalya (%27.9) ve Yunanistan (%17.3) şeklindedir. Tunus (%5.9), Suriye (%4.8), Türkiye (%4.6), Fas (%3.2) ve Cezayir (%1.2) de zeytinyağı üretiminde diğer önemli ülkelerdir ([http://www.internationaloliveoil.org/production1\\_ang.,2011](http://www.internationaloliveoil.org/production1_ang.,2011),[http://www.internationaloliveoil.org/production2\\_ang.,2011](http://www.internationaloliveoil.org/production2_ang.,2011)).

Zeytinyağı üretiminde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Geleneksel olarak zeytinyağı ekstraksiyonu için kullanılan zeytin presleri, ilerleyen yıllarda yerini katılardan yağ ayıran santrifüj yöntemi ile elde edilen modern zeytinyağı üretimine bırakmıştır. Son zamanlarda sürekli 2-fazlı ve 3-fazlı santrifüj sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Zeytinyağı üretiminde -prosesse göre değişmesine karşın- fazla miktarda su kullanımı zeytin karasuyu adı verilen fazla atık su açığa çıkarmaktadır. Üç fazlı sistemde 2-fazlı sisteme göre daha fazla zeytin karasuyu açığa çıkmaktadır (McNamara vd. 2008).

Zeytin karasuyu oldukça fazla organik yüke sahip olup fitotoksik, mikrobiyal inhibitör etki gösteren fenolik bileşikler ve uzun zincirli yağ asitlerini içerir. Ana organik bileşikler şekerler (fruktoz, mannoz, glukoz, sakkaroz ve pentoz) ve polifenollerdir. Zeytin çekirdekleri ve meyvesindeki etli kısımda bulunan fenolik bileşikler sulu fazda yağa göre daha çok çözünür ve zeytin karasuyundaki derişimleri 0.5 ile 25 g/L aralığında değişir. Zeytin karasuyunda 30'dan fazla fenolik bileşiğin varlığı tespit edilmiştir. Zeytin karasuyu bileşimi; bölgeye, kullanılan prosesin türüne, günlük kullanım koşullarına ve bölgesel işletim yöntemlerine göre değişiklik göstermektedir. İçerdiği fitotoksik fenolikler nedeniyle zeytin karasuyu tarımsal üretimde sulama amaçlı kullanılamaz (McNamara vd. 2008).

Zeytin karasuyu arıtımı için ısıl prosesler, fizikokimyasal işlemler, değerli bileşiklerin ekstraksiyonu, biyolojik işlemler gibi birçok yöntem denenmiştir (Morillo vd. 2009). En çok kullanılan yöntem ise zeytin karasuyunun saklama havuzlarında buharlaştırılmasıdır (Roig vd. 2006).

Zeytin karasuyunun koyu renginin giderilmesinde, organik yükün azaltılmasında ve fitotoksik etki gösteren bileşenlerin uzaklaştırılmasında birçok mikroorganizma denenmiştir. Bu amaçla başlıca, bakteri, fungus, birleştirilmiş bakteri-fungal sistemi, anaerobik mikroorganizmalar ve birleştirilmiş aerobik-anaerobik mikroorganizmalar kullanılmaktadır (McNamara vd. 2008). Bu çalışmada kullanılan maya *Rhodotorula glutinis*'in çeşitli fenolik maddeleri metabolize ettiğine dair çalışmalar literatürde yer almasına karşın (Bilton ve Cain 1968, Cain vd. 1968, Gupta vd. 1986, Katayama-Hirayama 1991a,b) zeytin karasuyunun biyoarıtımında kullanımı oldukça kısıtlıdır. Çalışmada, *R. glutinis* hücreleri serbest ve tutuklanmış formda zeytin karasuyu biyoarıtımında kullanılmıştır. Literatürde tutuklanmış *R. glutinis* ile zeytin karasuyunun biyoarıtımına yönelik herhangi bir bilgi olmaması bu yüksek lisans çalışmasının başlıca özgünlüğüdür.

Gerçekleştirilen yüksek lisans çalışması, aynı zamanda 109M290 nolu ve “Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Özelliklerinin İyileştirilmesi ve Antioksidan Üretiminde Kullanılması İçin Biyoproses Geliştirilmesi” konulu TÜBİTAK; ve 12B4343001 nolu ve “Zeytin Karasuyunun Biyoarıtımında Kullanılmak Üzere *Rhodotorula glutinis*'in Tutuklanması” konulu Ankara Üniversitesi BAP projeleri ile desteklenmiştir.

Endüstriyel biyoproseslerde, mikroorganizma veya enzimlerin uygun bir materyal içine veya üzerine aktivitelerini koruyarak hapsedilmesi/tutuklanması ile hazırlanan tutuklanmış biyokatalizörlerin kullanımı tercih edilir. Biyokatalizör tutuklanmasında kullanılacak materyal ve yöntem seçimi önemlidir. Organik (doğal ve sentetik polimerler) ve inorganik (mineraller ve fabrikasyon maddeler) yapıda birçok malzeme tutuklama materyali olarak kullanılabilir. Kullanılacak materyale göre bağlama veya hapsedme gibi yöntemler kullanılır.

Bu yüksek lisans çalışmasında, zeytinyağı üretim fabrikalarının sıvı atığı olan zeytin karasuyunun biyoarıtımında, *Rhodotorula glutinis* mayasının tutuklanarak kesikli karıştırılmalı ve dolgulu kolon sistemlerde kullanılması, tutuklama materyalinin ve yönteminin karasuyun toplam fenol derişimi, kimyasal oksijen ihtiyacı, pH değişimi ve hücre derişimi üzerine etkilerinin incelenerek zeytin karasuyunun özelliklerini iyileştiren ve uzun kullanım süreli ve/veya yüksek kullanım sayılı tutuklanmış hücrelerin hazırlanması amaçlanmıştır.

Bu yüksek lisans çalışmasının deneyleri 3 ayrı alt projede gerçekleştirilmiştir.

1. Alt Proje: *R. glutinis*'in farklı özellikteki materyallere uygun yöntemler ile tutuklanması ve en uygun tutuklama materyalinin seçimi

- Tutuklanan hücre miktarı ve biyoarıtımdaki etkinliği incelenmiştir.

2. Alt Proje:Seçilen materyal ile tutuklanmış *R. glutinis* pelletlerinin iyileştirilmesi ve zeytin karasuyu arıtımında uygun kullanım koşullarının araştırılması

- Pellet çapı, hücre miktarı, zeytin karasuyu başlangıç toplam fenol derişimi, azot kaynağı türü etkisi, karıştırma hızı ile birlikte pellet sağlamlığının artırılması için gerekli koşullar ve pelletlerin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.

3. Alt Proje: Tutuklanmış *R. glutinis*'in kesikli, yarı kesikli ve dolgulu kolon sistemlerde kullanımının karşılaştırılması

- Zeytin karasuyu biyoarıtımında daha kısa sürede, daha yüksek hacimde ve daha fazla toplam fenol giderimi sağlayan en uygun işletim şekli (kesikli, yarı kesikli, dolgulu kolon) belirlenmiştir.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI VE KURAMSAL TEMELLER

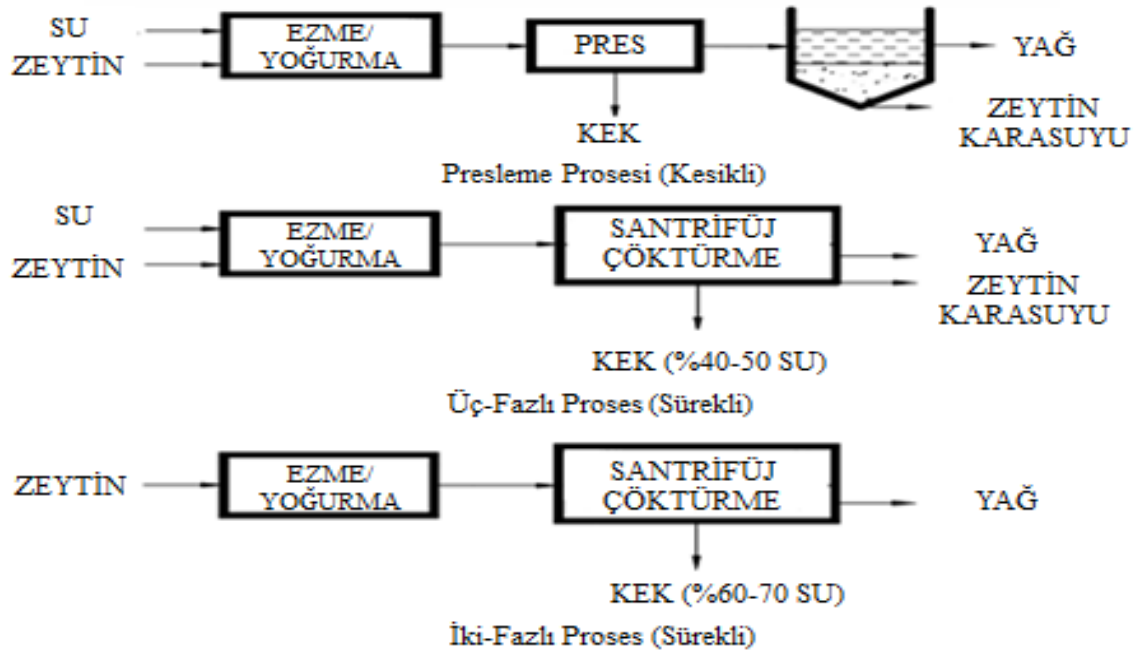
### 2.1 Zeytinyağı ve Üretim Prosesleri

Zeytinyağı ekstraksiyonu için hammadde olan zeytinin kimyasal bileşimi; zeytin türü, toprak türü, iklim koşulları ve yıllara bağlı olarak değişir. Genellikle %18-28 yağ, %40-50 su ve çekirdek, %30-35 meyve/etli kısım oluşur (Morillo vd. 2009). Çizelge 2.1’de zeytin meyvesinin bileşimi verilmiştir (Azbar vd. 2004).

Çizelge 2.1 Zeytin meyvesinin bileşimi (Azbar vd. 2004)

İçerik	Etli kısım (%)	Çekirdek (%)	Tohum (%)
Su	50-60	9.3	30
Yağ	15-30	0.7	27.3
Şeker	3-7.5	41	26.6
Selüloz	3-6	38	1.9
Mineraller	1.2	4.1	1.5
Polifenoller	2-2.25	0.1	0.5-1
Azotlu bileşikler	2-5	3.4	10.2
Diğer	-	3.4	24

Zeytinyağı üretimi; presleme ile zeytinyağı ekstraksiyonu, 3-fazlı santrifüjlü ekstraksiyon veya 2-fazlı santrifüjlü ekstraksiyon proseslerinden biriyle gerçekleştirilir (Borja vd. 2006). Şekil 2.1’de ekstraksiyon proseslerinin akım şeması yer almaktadır (Azbar vd. 2004).



Şekil 2.1 Zeytinyağı ekstraksiyon prosesleri (Azbar vd. 2004)

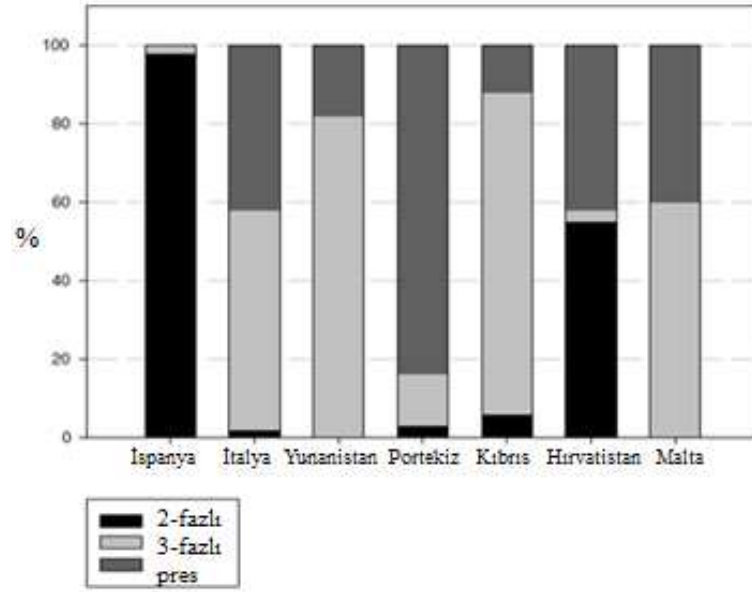
Zeytinyağı üretiminde kullanılan her proses farklı özellikte atıklar oluşturur (Borja vd. 2006). Presleme (kesikli) prosesinde zeytinler yıkanır, ezilir ve sıcak su eklenerek yoğrulur. Oluşan kek/hamur daha sonra yağ çıkarmak için preslenir. Preslemeden sonra oluşan sıvı atık; zeytin suyu, eklenen su ve atık yağ karışımını içerir. Zeytinyağı dikey santrifüj ya da çökeltme ile sudan ayrılır. Presleme teknolojisi az su gerektirir; ancak oldukça kirli atık su açığa çıkarır.

Üç-fazlı ve 2-fazlı sistemlerde yatay santrifüj, sürekli işleme olanak verir. Bu sistemlerin presleme teknolojisine göre üstünlükleri; fazla ürün oluşturması, küçük alan gerektirmesi ve az emek harcanmasıdır. Dezavantajı ise ilk yatırım maliyetlerinin yüksek olmasıdır (Azbar vd. 2004). Üç-fazlı santrifüjlü sistem, zeytin karasuyu adı verilen atık suyu iki-fazlı sisteme göre daha fazla üretir. Üç-fazlı santrifüjlü zeytinyağı üretim prosesinde genellikle %20 zeytinyağı, %30 yarı katı/sulu karışım ve %50 atık su oluşur. Zeytinin içerdiği su, yıkama suyu ve prosesten gelen su ile birleşerek zeytin karasuyunu oluşturur (Borja vd. 2006). İki-fazlı sistem, atık suyu %80 oranında azaltır ve %20 enerji tasarrufu sağlar. İki-fazlı sistemde atık su az olmasına karşın pirina adı verilen yarı katı/sulu karışım açığa çıkar (Niaounakis ve Halvadakis 2006). Çizelge 2.2’de zeytinyağı üretim tekniklerinin karşılaştırılması verilmiştir (Azbar vd. 2004).

Çizelge 2.2 Zeytinyağı üretim tekniklerinin karşılaştırılması (Azbar vd. 2004)

<b>Üretim Prosesi</b>	<b>Giren Akım</b>	<b>Giriş Miktarı</b>	<b>Çıkan Akım</b>	<b>Çıkış Miktarı (kg)</b>
Geleneksel	Zeytin	1 ton	Yağ	≈ 200
Presleme Prosesi	Yıkama suyu	0.1-0.12 m <sup>3</sup>	Katı atık	≈ 400
			Zeytin karasuyu	≈ 600
	Enerji	40-63 kWh	(%88 su+katı kısım ve yağ)	
Üç-Fazlı Sistem	Zeytin	1 ton	Yağ	≈ 200
	Yıkama suyu	0.1-0.12 m <sup>3</sup>	Katı atık	≈ 500-600
	Çöktürme için su	0.5-1 m <sup>3</sup>	Zeytin karasuyu	≈1000-1200
	Enerji	90-117 kWh	(%94 su)	
İki-Fazlı Sistem	Zeytin	1 ton	Yağ	≈ 200
	Yıkama suyu	0.1-0.12 m <sup>3</sup>	Katı+zeytin karasuyu	≈ 800-950
	Enerji	<90-117 kWh		

Son 10 yıldır İspanya'da 2-fazlı sistem kullanılmakta; ancak 2-fazlı sistemde oluşan çamurun bertarafı zor olduğu için diğer ülkeler 3-fazlı sistemi tercih etmektedirler (McNamara vd. 2008). Şekil 2.2'de Avrupa'da zeytinyağı üretiminde kullanılan teknolojiler karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



Şekil 2.2 Avrupa’da kullanılan teknolojiler(Roig vd. 2006)

## 2.2 Zeytin Karasuyu

Zeytinyağı üretiminde her yıl tahmini 10-30 milyon m<sup>3</sup> zeytin karasuyu açığa çıkmaktadır (McNamara vd. 2008). Zeytin karasuyunun özellikleri kullanılan prosesin türüne, iklim koşullarına ve bölgeye göre farklılık gösterir.

### 2.2.1 Özellikleri

Zeytin karasuyu; koyu siyah renk, kendine özgü kokusu, yüksek organik kirlilik (KOİ:40-220 g/L, BOİ:35-110 g/L), düşük pH:3-6, yüksek toplam organik bileşik (25-45 g/L), elektrik iletkenliği, yüksek polifenol içeriği (0.5-24 g/L) gibi özelliklere sahiptir (Niaounakis ve Halvadakis 2006). Çizelge 2.3’de 3-fazlı sistemden açığa çıkan zeytin karasuyunun bileşimi yer almaktadır.

Çizelge 2.3 Zeytin karasuyunun kimyasal bileşimi (Morillo vd. 2009)

<b>Parametre</b>	<b>Ortalama Değer</b>
pH	4.84
Organik madde (g/L)	55.80
Toplam organik karbon (g/L)	37.00
Na (g/L)	0.26
Mg (mg/L)	121.25
Ca (g/L)	0.35
Fe (mg/L)	81.70
Yoğunluk (g/cm <sup>3</sup> )	1.04
Yağlar (g/L)	6.39
Fenoller (g/L)	4.98
Karbonhidratlar (g/L)	7.16
KOİ (g/L)	124.67
BOİ (g/L)	65.00

Zeytin karasuyunun organik kısmı fazla miktarda proteinleri, yağları ve polisakkaritleri içerir. Ayrıca, mikrobiyal çoğalmayı engelleyen fitotoksik bileşenleri de içermektedir. Zeytinyağındaki fenolik bileşenler, zeytin karasuyunun antimikrobiyal ve fitotoksik özelliklerini belirler. Bu bileşikler, aslında zeytin bitkisi tarafından patojenlere karşı korunma amaçlı sentezlenmekte ve zeytinyağı ekstraksiyon prosesinde açığa çıkmaktadır (Morillo vd. 2009).

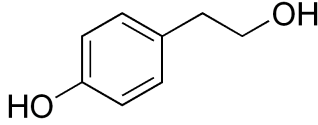
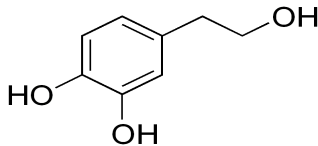
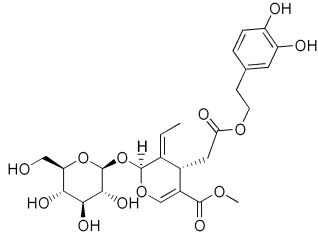
Zeytin karasuyu yüksek organik kirlilik nedeniyle oldukça ciddi çevre problemleri yaratır. Organik kirliliğe neden olan polifenollerin ise biyolojik olarak bozunması zordur. Fenolik bileşenler amfifiliktirler, bu nedenle bir kısmı yağ fazına geçerken büyük bir kısmı ise atık suya geçer. Fenolik bileşenleri içeren zeytin karasuyunun toksik özelliğinin evsel atık sudan yaklaşık 1000 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Morillo vd. 2009).

## 2.2.2 Zeytin karasuyundaki fenolik bileşenler

Fenolik bileşiklerin oluşumu meyveye (olgunluk, bitki türü), iklim koşullarına, saklama süresine ve kullanılan prosese bağlıdır. Zeytin karasuyunun fenol profili karmaşık ve değişkendir. Zeytin karasuyunun kararlı olmayışı nedeniyle içerisindeki fenoller saklama esnasında parçalanması zor olan yüksek molekül ağırlıklı polimerlere dönüşmeye eğilimlidir (Morillo vd. 2009).

Fenolik bileşenlerin karmaşıklığı literatürde aydınlatılmıştır (Morillo vd. 2009). Zeytin karasuyunda 30'dan fazla fenolik bileşiğin varlığı tespit edilmiştir (McNamara vd. 2008). Farklı özellikteki üç zeytinde ana fenolik bileşenlerin tirozol, hidroksitirozol, oleosid metil esteri, oleosid dimetil esteri ve oleuropein olduğu saptanmıştır (Morillo vd. 2009). Zeytin karasuyundaki ana biyofenoller çizelge 2.4'de verilmiştir (Takaç ve Karakaya 2009).

Çizelge 2.4 Zeytin karasuyundaki ana biyofenoller (Takaç ve Karakaya 2009)

Biyofenol	Kimyasal Yapısı	Özellikleri
Tirozol		IUPAC ismi: 4-(2-hidroksietil)fenol Molekül ağırlığı: 138.164 g/mol CAS No.: 501-94-0
Hidroksitirozol		IUPAC ismi: 4-(2-hidroksietil)-1,2-benzendiol Molekül ağırlığı: 154.16 g/mol CAS No.: 10597-60-1
Oleuropein		IUPAC ismi: 4S,5E,6S)-4-[2-[2-(3,4-dihidroksifenil)etoksi]-2-oksoetil]-5-etiliden-6-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)-2-tetrahidropirani]oksi]-4H-piran-3-karboksilik asit, metil ester Molekül ağırlığı: 540.514 g/mol CAS No.: 32619-42-4

### 2.2.3 Zeytin karasuyunun çevre üzerine etkileri

Koyu renk, yüksek biyolojik ve kimyasal oksijen ihtiyacı (BOİ-KOİ) ve fitotoksik bileşenlerin varlığı atıksuların kıyı sularına veya toprağa dökülmesini engeller. Zeytin karasuyunun direkt olarak toprağa dökülmesi toprağın gözeneklilik ve pH gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkiler. Zeytin karasuyunun direkt kullanımındaki esas engel yüksek derişimdeki fenolik bileşenlerin fitotoksik etki nedeniyle bitki tohumlarının çimlenmesini engellemesidir. Ayrıca zeytin karasuyu yüzey sularına döküldüğünde önemli etkilere sahiptir. Zeytin karasuyundaki yüksek derişimli koyu renkli polifenoller göllerin ve akarsuların rengini bozabilir. Yüksek derişimli indirgenmiş şekerler çözülmüş oksijen derişimini azaltarak mikrobiyal solumunu artırır (McNamara vd. 2008).

Zeytin karasuyunun kontrolsüz bir şekilde bertarafı Akdeniz ülkelerinde önemli problemlere yol açar (Morillo vd. 2009). Genellikle lagünlerde depolanıp yaz aylarında buharlaştırılır. Bazı ülkelerde zeytin karasuyu deşarjı hakkında yasal düzenleme söz konusu değildir. Sadece İtalya zeytin prosesi atığının yok edilmesi/geri dönüşümü hakkında mevzuata sahiptir (Niaounakis ve Halvadakis 2006).

### 2.2.4 Zeytin karasuyu arıtım yöntemleri

Zeytin karasuyu arıtım prosesleri; fiziksel, kimyasal, biyolojik veya bu yöntemlerin birleşimi olabilir. Arıtım prosesi; etkili olmalı, küçük ölçekte kolay ve ekonomik işletim imkanı sunmalıdır (McNamara vd. 2008). Kullanılan metotların hepsi bilimsel açıdan ilgi çekici olmasına rağmen genellikle endüstriyel ölçekte kullanılmazlar (Roig vd. 2006).

#### 2.2.4.1 Fiziksel arıtım

**Buharlaştırma:** Düşük yatırım gerektirmesi ve Avrupa ülkelerinde elverişli iklim koşulları nedeniyle yaygın olarak kullanılan yöntem, saklama havuzlarında zeytin karasuyunun depolanıp buharlaştırılmasıdır; ancak bu yöntemde geniş alanlara ihtiyaç

duyulur. Ayrıca kötü koku ve böcek oluşumu gibi birçok probleme neden olur (Roig vd. 2006). Bu yöntem, zeytin karasuyunun yüksek KOİ ve toksik özelliğini gideremez; sadece zeytin karasuyunun artırılmadan hacmi azaltılmış olur (McNamara vd. 2008). Zeytin karasuyu buharlaştırıldığında sulu çamur oluşur. Oluşan çamur katı atık sahasına bırakılır veya tarımda ya da yağ içeriğine bağlı olarak ısı kaynağı olarak da kullanılabilir (Roig vd. 2006).

**Toprağa direkt boşaltma:** Bazı çalışmalarda zeytin karasuyu toprağa dökülmüş, organik gübre olarak pozitif ya da negatif etkileri incelenmiştir. Yüksek besin değeri gibi pozitif etkilerinin yanı sıra mineral tuz içeriği, düşük pH ve fitotoksik bileşenlerin varlığı gibi negatif etkileri de mevcuttur. Zeytin karasuyunun bir diğer karakteristik özelliği ise patojenlere karşı yüksek antimikrobiyal kapasiteye sahip olmasıdır (Roig vd. 2006).

#### **2.2.4.2 Fizikokimyasal arıtım**

Kimyasal maddelerin eklenmesiyle suda çözünen organik bileşenlerin koagülasyon, çöktürme veya yok etme yoluyla arıtımdır (Roig vd. 2006). Karasuyun kimyasal arıtımı amacıyla kullanılan kimyasal bileşiklerden bazıları  $FeCl_3$ ,  $H_2SO_4$ ,  $HCl$  ve  $Ca(OH)_2$ 'dir. Yapılan kimyasal arıtılabilirlik çalışmalarında koagülant olarak genellikle  $Ca(OH)_2$  kullanılmıştır (Anonim 2003).

#### **2.2.4.3 Biyolojik arıtım**

Biyolojik arıtım çevresel açıdan uyumlu ve en ucuz yöntem olduğu için tercih edilmektedir. Bu tür proseste, zeytin karasuyundaki kimyasalları parçalayan ve/veya biyopolimer ve biyoyakıt gibi katma değerli bileşenlerin üretiminde atıkları değerlendiren mikroorganizmalar kullanılır. Mikroorganizma türü, zeytin karasuyu arıtımındaki koşullara da bağlı olarak aerobik veya anaerobik olabilir (Morillo vd. 2009).



**Aerobik biyolojik parçalama:** Aerobik biyolojik arıtım, genellikle atık sulardan kirleticileri uzaklaştırmak için kullanılır, amacı ise atık suların organik yükünü, koyu rengini ve zehirliliğini gidermedir. Genellikle aerobik bakteriler bazı düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklere karşı etkili olurken zeytin karasuyunun koyu rengine neden olan bazı büyük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklere karşı etkisizdir. Araştırmalar, mantarların hem basit hem de karmaşık fenol bileşiklerini parçalamada bakterilerden daha etkili olduklarını göstermiştir. Zeytin karasuyundaki aromatik bileşiklerin yapısı birçok lignin monomerine benzer ve ancak birkaç mikroorganizma lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkaz gibi ligninolitik enzimleri üreterek parçalamada etkindir. (Morillo vd. 2009).

Zeytin karasuyundaki fenolik bileşiklerin giderimiyle fitotoksik etkinin azaldığı saptanmıştır. Büyük ölçekte zeytin karasuyu arıtımında filamentus mantarların kullanımı, sürekli sistemde mantar pelletlerinin kullanımının zor olması ve birikimler nedeniyle birtakım problemler yaratır. Bu kısıtlamalar nedeniyle arıtımda mayalar kullanılabilir. *Geotrichum candidum*, *Candida tropicalis*, *Candida boidinii* ve *Saccharomyces* sp. gibi bazı mayalar zeytin karasuyu fenolik bileşikleri ve KOİ gideriminde etkilidir (Morillo vd. 2009).

**Anaerobik biyolojik parçalama:** Aerobik proseslere kıyasla bu yöntemin birçok üstünlüğü mevcuttur. Avantajları;

- Yüksek organik kirliliğe sahip beslemede çok iyi giderim/saflaştırma sağlanabilir
- Az besin gereklidir
- Az miktarda atık üretilir
- Biyogaz üretilebilir.

Zeytin karasuyunun kararsız yapısı (yüksek C/N oranı (~50), düşük pH) anaerobik parçalanma için probleme neden olur.

Zeytin karasuyunun kararsız yapısı ve toksik etkisi gibi problemlerin üstesinden gelmek için anaerobik parçalanmadan önce önışlemler uygulanabilir. Seyreltmenin yanı sıra aerobik biyolojik parçalama, bazı mantar türleri ile önışlem ve bazı azot kaynaklarının eklenmesi gibi önışlemler uygulanabilir.

Anaerobik ve aerobik biyobozunma karşılaştırıldığında, anaerobik proses genellikle ilk yatırım maliyeti yüksek olup fazla emek isteyen bir sistemdir. Ayrıca, zeytin karasuyunun üretildiği yerden arıtılacağı yere taşınması da maliyetlidir. Bununla birlikte, günümüzdeki çalışmalar biyoyakıt üretim potansiyeli nedeniyle anaerobik arıtmalar üzerine de odaklanmıştır (Morillo vd. 2009).

**Kompostlama:** Atıkların kullanılmasıyla gübre üretimini amaçlayan ve en çok kullanılan tekniklerden birisidir. Buğday/mısır sapsarı ve pamuk atıkları gibi birçok hacim arttırıcı (bulking) madde kompostlama için kullanılabilir (McNamara vd. 2008). Atıkların birkaç haftada fitotoksik etkisini azaltıp ekim alanının zenginleşmesini sağlar (Morillo vd. 2009). Ayrıca kompostlama ile bu tür atıkların toprağa direkt verilmesiyle meydana gelen negatif etkilerden de kaçınılmış olur (Roig vd. 2006).

### 2.3 Mikroorganizma/Enzim Tutuklama

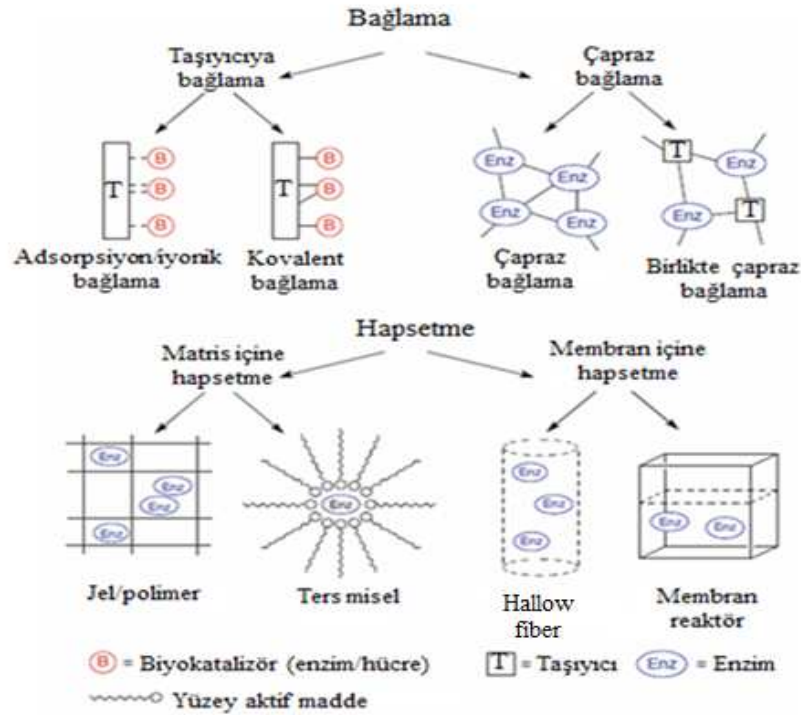
Uygulamada enzim katalizli reaksiyonlarda üç önemli dezavantaj söz konusudur.

- Birçok enzim, işletim koşullarında kararlı değildir ve otooksidasyon, parçalanma, denatürasyon nedeniyle katalitik aktivitelerini kaybedebilirler.
- Enzimler genellikle suda çözünen moleküller oldukları için hem sulu çözeltilerden geri kazanmak hem de substrat ve ürünlerden ayırmak zordur.
- Endüstriyel proseslerin verimliliği, enzimlerin yüksek derişimdeki substrat ve ürünlere toleransının kısıtlı olması nedeniyle genellikle düşüktür.

Biyokatalizörlerin tutuklanması ile bu problemlerin üstesinden gelinebilir (Faber 2011). Biyokatalizörler, enzimler veya enzim kaynakları olan hücrelerdir.

### 2.3.1 Tutuklama materyal ve yöntemleri

Tutuklanmış hücre hazırlanmasında kullanılacak materyal ve uygulanacak yöntem önemlidir. Organik (doğal ve sentetik polimerler) ve inorganik (mineraller ve fabrikasyon maddeler) yapıda birçok malzeme tutuklama materyali olarak kullanılabilir. Malzemenin seçiminde yüzey alanı, yenilenebilirlik, kimyasal, ısıl, mekanik dayanım, uygun şekil ve gözenek çapı temel alınan parametrelerdir. Kullanılacak materyale göre de bağlama (fiziksel adsorpsiyon, iyonik bağlama, kovalent bağlama, çapraz bağlama) veya hapsedme (matris veya membran içine hapsedme) gibi yöntemler uygulanır. Şekil 2.3'de tutuklama yöntemleri şematik olarak gösterilmiştir (Faber 2011).



Şekil 2.3 Tutuklama yöntemleri(Faber 2011)

#### 2.3.1.1 Bağlama

##### *Taşıyıcıya bağlama*

**Adsorpsiyon:** Biyokatalizörün suda çözünmeyen makroskopik bir taşıyıcıya adsorpsiyonu en kolay ve en eski yöntemdir. Adsorpsiyon, izole enzimlere ve tüm canlı

hücrelere uygulanabilir. Van der Waals kuvvetleri, iyonik etkileşim, hidrojen bağı gibi farklı ancak zayıf bağlar oluşur. Zayıf bağ nedeniyle enzim aktivitesinde azalma genellikle azdır; ancak taşıyıcıdan desorpsiyon/sızma; substrat derişimi, çözücü, sıcaklık, pH gibi reaksiyon parametrelerinde az da olsa değişikliğe neden olabilir.

Aktif kömür, alümina, silika, selüloz, gözenekleri kontrollü cam ve sentetik reçineler gibi birçok inorganik ve organik materyal taşıyıcı olarak kullanılabilir (Faber 2011).

**İyonik bağlama:** İyon değiştirici reçineler polar yüzeyleri nedeniyle proteinleri kolayca adsorplarlar, bu nedenle de enzim tutuklamada oldukça yaygın kullanıma sahiptirler. Karboksimetil selüloz, Amberlit IRA gibi katyon değiştirici reçineler ve *N,N*-diethylaminoethylselüloz, Sephadex gibi anyon değiştirici reçineler endüstriyel alanda kullanılırlar. Bağlama, fiziksel adsorpsiyondan daha kuvvetli olmasına karşın ortamdaki diğer iyonlardan kolaylıkla etkilenir. Bu nedenle enzim desorpsiyonunu önlemek için iyon derişimi ve pH korunumu iyonik bağlamada önemlidir (Faber 2011).

**Kovalent bağlama:** Enzim makroskopik taşıyıcıya kovalent bağlanırken kararlı kimyasal bağlar tersinmez bir şekilde oluşur, böylelikle dışarı sızma önlenmiş olur. Bu yöntemin dezavantajı ise aktivite kayıplarının gözlenebilmesidir. Kovalent bağlama genellikle iki adımda gerçekleştirilir:

- Reaktif grup ile taşıyıcının aktivasyonu
- Enzim bağlanması

Gözenekli cam kovalent bağlama için yaygın olarak kullanılan inorganik bir taşıyıcıdır. Polisakkarit türü doğal polimerler (selüloz, dekstran, nişasta, kitin, agaroz) iyi tanımlanmış gözenek boyutu nedeniyle inorganik materyallere alternatif olabilirler. Kovalent bağlama ile enzim tutuklama yöntemine yeni bir alternatif, uyarı-cevap diğer bir adıyla "akıllı" polimerlerdir. Sıcaklık, pH gibi küçük çevresel değişimlere yapısını değiştirerek cevap verir (Faber 2011).

### ***Çapraz bağlama***

Taşıyıcı kullanımı katalitik aktivitenin azalmasına neden olur. Bu durum, enzim moleküllerinin birbirine çapraz bağlanması ile aşılabılır. Böylece suda çözünmeyen büyük molekül kümeleri elde edilir. Enzim molekülleri ya birbirine çapraz bağlanır ya da inaktif moleküllere bağlanır. Çapraz bağlama ile tutuklamada en çok kullanılan biyofonksiyonel reaktiflere  $\alpha,\omega$ -glutaraldehit, dekstran polialdehit örnek verilebilir. Bu yöntem basit olmasına karşın bazı dezavantajları vardır. Yumuşak kümeler dolgulu kolonlarda kullanılamaz, ayrıca difüzyon problemleri nedeniyle aktiviteleri de kısıtlıdır (Faber 2011).

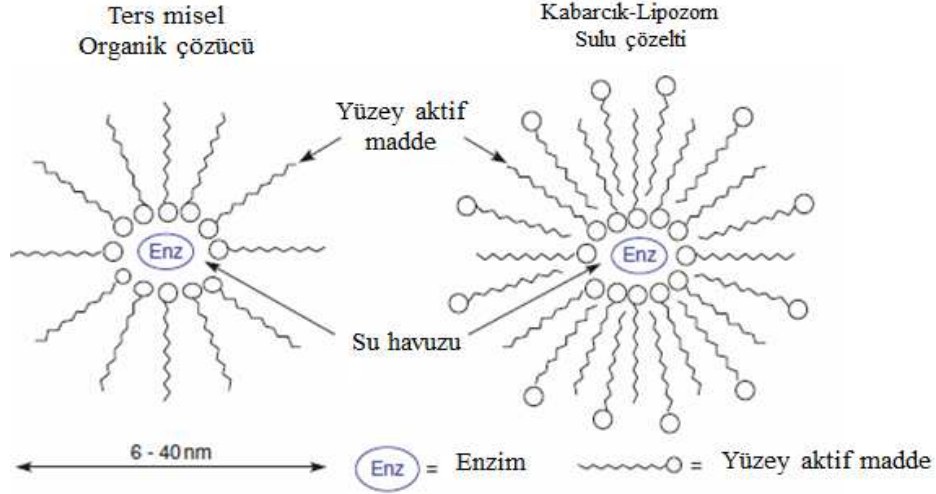
### **2.3.1.2 Hapsetme**

#### ***Matris içine hapsetme***

**Jel içine hapsetme:** Bazı durumlarda enzim direkt olarak bağlamayı tolere etmeyebilir; böyle durumlarda gözenekli matrise fiziksel olarak hapsedilebilir. Katalitik aktiviteyi koruyabilmek için substrat ve ürün molekülleri gözenekli yapıdan rahatça içeri girip dışarı çıkabilmelidir. Hapsetme, ılımlı bir yöntemdir ve canlı hücrelerin tutuklanmasında da kullanılabilir. Canlı hücreler için sık kullanılan biyolojik matrisler agar, aljinat veya  $\kappa$ -carrageenan'dır. Bu tür biyolojik matrislerin sıcaklık ve iyon değişimlerine karşı kararsız oluşu, düşük mekanik dayanım gibi bazı dezavantajları vardır. Bu durumun üstesinden gelmek için metal Si-alkoksitin hidrolitik polimerizasyonu ile oluşan daha kararlı bir yapı olan inorganik silika matrisler kullanılabilir. Bu proses sol-gel metodu olarak bilinir ve büyük ölçek işleme uygundur (Faber 2011).

**Misel ve kabarcık oluşumu:** Organik bir çözücü ve bir deterjan gibi su içeren bazı bileşenlerin karışımı, organik çözücünün sürekli fazda olduğu durumlarda şeffaf bir çözelti oluştururlar. Su, 6-40 nm çapa sahip mikroskobik damlalar oluşturur ve yüzey aktif madde ile damlaların etrafı sarılır. Oluşan yapı organik çözücü içine gömülü ve misel yapısı ters dönmüş haldedir. Bu yapıya “ters misel” adı verilir. Yığın fazda su

bulunduğu zaman miseller yüzey aktif madde ile simetrik çift katlı bir katmanla çevrelenebilirler; böylece “kabarcık” oluşur. Şekil 2.4’de ters misel ve kabarcık yapısı görülmektedir.



Şekil 2.4 Ters misel ve kabarcık içine enzim hapsetme(Faber 2011)

Kabarcık içine hapsedilen su “normal” sudan farklı olarak düşük donma noktası, yüksek viskozite, düşük hidrojen bağı gibi kimyasal ve fiziksel özelliğe sahiptir. Enzimler bu su havuzunda kalıp katalitik aktivitelerini koruyabilirler (Faber 2011).

**Membran içine hapsetme:** Enzimler bir membran ile sınırlı bir bölgeye hapsedilebilir. Aslında tutuklama işlemi olmadan enzim için sınırlı bir alan yaratır. Reaktör türüne göre çeşitlilik (hollow fiber, düz ve silindirik) gösterir. Küçük substrat ve/veya ürün molekülleri membran gözeneklerine rahatça difüzenirken büyük enzimler difüzenemez (Faber 2011).

**Sentetik membranlar:** Hassas biyolojik matrislere alternatif olarak poliamid veya polietersülfon temelli sentetik membranlar kullanılabilir. Sentetik membranlar, enzimlerin ultrafiltrasyon ile saflaştırılmasında kullanılmaktadır ve 500 ile 300 000 Da aralığını kapsayan belli bir gözenek boyutuna sahip olup ticari olarak mevcuttur. Biyokatalizör membran içine hapsedildiğinde ancak küçük substrat/ürün molekülleri kolayca bariyerin gözeneklerinden difüze olabilir. Bu yöntem, sürekli işleme olarak

verir; ayrıca kütle aktarım kısıtlamaları ve katalitik özelliklerin değişimi gibi dezavantajlardan da kaçınılmış olur (Faber 2011).

## 2.4 Kaynak Özetleri

Literatürde zeytin karasuyu biyoarıtımı ile ilgili birçok çalışma yer almasına karşın tutuklanmış mikroorganizmalar ile zeytin karasuyu biyoarıtım çalışmaları sınırlıdır. Bu bölümde, serbest mayalar ile gerçekleştirilen bazı zeytin karasuyu biyoarıtım çalışmaları ve hapsedme ya da yüzey adsorpsiyonu ile tutuklanmış mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen zeytin karasuyu biyoarıtım çalışmalarına yer verilmiştir.

### 2.4.1 Serbest hücreler ile zeytin karasuyu biyoarıtımı

Zeytin karasuyunda çoğalan *Yarrowia lipolytica*, karasuyun KOİ değerini 24 st'de %80 azaltmış; aynı koşullarda 22.45 g/L biyokütle ile lipaz enzimi oluşmuştur. Proses sırasında organik ve inorganik maddelerin büyük bir kısmı tüketilmiştir (Scioli vd. 1997).

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 bileşim, seyreltme ve eklenen besi maddelerinin etkileri belirlenmiştir. Hücreler, 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 vd. 2009). Aynı araştırmacılar bir diğer çalışmalarında, *Y. lipolytica* ve *C. rugosa*'nın seyreltilmemiş zeytin karasuyunda çoğalabildiklerini ve lipaz üretimini gerçekleştirdiklerini bildirmiştir (Gonçalves vd. 2007).

İki tür *Y. lipolytica*'nın zeytin karasuyunda çoğalması ve lipaz gibi değeri yüksek madde üretim yeteneğinin incelendiği bir diğer 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. Sonuçlar, lipaz üretim koşulları ile KOİ uzaklaşması koşullarının aynı olmadığını göstermiştir (Lopes vd. 2008).

*Panus tigrinus*, *Funalia trogii* ve *Trametes versicolor* beyaz urükül mantarları çalkalamalı erlenlerde zeytin karasuyu arıtımı ve fenoloksidaz enzim üretiminde kullanılmışlardır. *T. versicolor* %60 renk, %72 KOİ ve %87 fenol gidermiştir. *F. Trogii* ise 27000 U/g lakkaz enzimi üretmiştir. Ayrıca, *T. versicolor* kabarcık kolon biyoreaktörde çoğaltılarak sürekli işletim ile %65 KOİ ve %73 fenol giderimi sağlamıştır. *P. tigrinus* ise düşük performansından dolayı tercih edilmemiştir (Cerrone vd. 2011).

Bir diğer çalışmada, *C. oleophila* zeytin karasuyundan izole edilerek biyoarıtımda kullanılmıştır. Ek besin maddesi ilave edilmeden ham ZK kullanıldığında %50 organik yük ve %83 toplam polifenol giderimi elde edilmiştir (Amaral vd. 2012).

*Rhodotorula mucilaginosa* zeytin karasuyundan izole edilerek zeytin karasuyu ve ayrıca karasuda bulunan 6 fenolik bileşenin biyoarıtımında kullanılmıştır. Zeytin karasuyunda bulunan protokateşik asit, vanilik asit, p-kumarik asit ve tirozol bileşenlerini tamamen; gallik asit ve kateşolü sırasıyla %56 ve %44 oranında giderebilmiştir. *R. mucilaginosa*, kullanılan ZK arıtım ortamlarına göre %5.84-%34.81 fenol ve %38.38-%56.91 KOİ giderimi sağlamıştır (Jarboui vd. 2012).

Araştırma grubumuz tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda ise *Rhodotorula glutinis* zeytin karasuyu biyoarıtımında çoğaltılmış ve toplam fenol giderimi izlenmiştir. *R. glutinis* ile biyoarıtımda başlangıç zeytin karasuyu derişimi, azot kaynağı tür ve derişimi, sıcaklık ve karıştırma hızı etkisi incelenmiş ve biyoarıtım ortamındaki pH artışının toplam fenol giderimine karşılık geldiği belirlenmiştir. Zeytin karasuyunun herhangi bir önişlem görmeden kullanıldığı ve üre içeren biyoarıtım ortamında 30 °C sıcaklık ve 150 rpm karıştırma hızı koşullarında ortam pH değerı 8.9'a ulaşırken, 120 st sonunda %89 toplam fenol giderimi elde edilmiştir (Karakaya vd. 2012).



#### 2.4.2 Tutuklanmış hücreler ile zeytin karasuyu biyoarıtımı

*Lentinula edodes* poliüretan köpük üzerine tutuklanarak zeytin karasuyu arıtımı için her biri 8 gün süren ardışık üç kesikli işletimde kullanılmıştır. Tutuklama işleminde, gözenek boyutu 0.4-0.6 mm olan yaklaşık 30 adet poliüretan köpük, 200 ml ortam ve 5 ml hücre süspansiyonu içeren erlene konularak 28 °C ve 200 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosunda 5 gün tutulmuştur. Üzerine hücrelerin tutuklandığı köpükler; sakkaroz, maya özütü ve Tween 80 ile desteklenen 300 ml zeytin karasuyuna konulmuş ve 30 °C ve 30 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosunda 8 gün tutulmuştur. Üç işletim için sırasıyla %83.5, %88.5 ve %78 toplam fenol, ayrıca % 75, %72 ve %34 renk giderimi sağlanmıştır (D'Annibale vd. 1998).

*Coriolus versicolor* ve *Funalia trogii* hücreleri Ca-aljinat taneciklerine tutuklanmış ve kesikli sistemde kullanılmıştır. Tutuklanan hücreler 50 ml zeytin karasuyu içeren erlene konulmuş, 30 °C ve 150 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosunda 6 gün tutulmuştur. *C. versicolor* yaklaşık olarak %63 KOİ, %90 fenol ve %65 renk giderimi, *F. trogii* yaklaşık olarak %70 KOİ, %93 fenol ve %81 renk giderimi sağlamıştır (Yesilada vd. 1998).

*Candida tropicalis* YMEC14, Ca-aljinat taneciklerine tutuklanarak kesikli biyoreaktörde kullanılmıştır. 50 rpm'de çalışan kesikli biyoreaktörde hekzan içeren zeytin karasuyunda 24 saat sonunda % 69.7 KOİ, %69.2 monofenol ve %55.3 polifenol giderimi sağlamıştır (Ettayebi vd. 2003).

Bir diğer çalışmada, zeytin karasuyunun arıtılması için bazı küf türleri odun talaşına tutuklanmıştır. Deneyler karıştırılmalı erlenlerde gerçekleştirilmiş pH, polifenol ve KOİ değerleri izlenmiştir. Deneylerde, 10 g odun talaşı ve 5 ml besi yeri erlene konulmuş, ortama ekim yapılmış ve 50 ml zeytin karasuyu eklenmiştir. Erlen 30 °C'de çalışan çalkalamalı hava banyosunda 15 gün tutulmuştur. Bu süre sonunda KOİ'nin %60 azaldığı, polifenol parçalanmasının %87 gerçekleştiği ve pH değerinin 4.5 dan 6.6 ya çıktığı belirlenmiştir (Amhajji vd. 2005).

*Phanerochaete chrysosporium* “loofa” üzerine tutuklanarak kesikli sistemde kullanılmıştır. Yaklaşık 1 cm uzunluk ve 7 cm çapa sahip olan loofa diskler hazırlanmış, 1 saat sıcak saf suda bekletilmiş ve 50 °C’de kurutulmuştur. Kurutulan diskler erlene alınmış üzerine 18 ml zeytin karasuyu ve 2 ml hücre süspansiyonu eklendikten sonra 30°C’ de 8 gün çalkalamadan bekletilmiştir. Bu süre sonunda %90 toplam fenol, %50 KOİ, %60 renk ve %95 aroma giderimi sağlamıştır (Ahmadi vd. 2006).

*Phanerochaete chrysosporium* polüretan köpüğe tutuklanarak kesikli biyoreaktörde ardışık olarak kullanılmış ve 85 saatte %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-aljinat taneciklere tutuklanmış, kesikli sistemde kullanılmış ve 24 st’de %60 renk ve %36.5 fenol giderimi sağlamıştır (Singh 2006).

*Geotrichum candidum* kesikli sistemde kullanılmak üzere Ca-aljinat taneciklerine tutuklanmıştır. Tutuklanan hücreler 500 ml %75 zeytin karasuyu içeren erlene konulmuştur. Erlen, 25 °C ve 180 rpm’ de çalışan çalkalamalı hava banyosunda 14 gün tutulmuştur. %52 KOİ ve %49.1 toplam fenol giderimi sağlanmıştır (Bleved. 2011).

Poliüretan köpük üzerine/yüzeyine tutuklanmış *Pycnoporus coccineus* ve *Coriolopsis polyzona* beyaz çürükçül mantarları zeytin karasuyu biyoarıtımında kullanılmışlardır. Ardışık üç kesikli işletimde kullanılan *P. coccineus* ile yaklaşık %40 KOİ ve %50 renk giderimi sağlanırken, iki ardışık sistemde kullanılabilen *C. Polyzona* ile %45 KOİ ve %25 renk giderimi elde edilmiştir (Neifar vd. 2012).

## **2.5 *Rhodotorula glutinis***

*Rhodotorula glutinis*, karotenoid üreten (torulen, β-karoten) turuncu-kırmızı renkli bir mayadır (Malisorn ve Suntornsuk 2008). Spor oluşturmazlar, ender olarak ilkel yalancı misel yaptıkları saptanmıştır. Çoğalmaları çok yönlü tomurcuklanmayla olur. Doğada çok yaygın olarak bulunan bu mayalar hava ve toz ile bulaştıkları için laboratuvarlardaki en büyük kontaminasyon kaynağını oluştururlar. Çok yüksek oranda yağ içerirler (Anonim 2000).

Literatürde, tutuklanmış *R. glutinis*'in zeytin karasuyunun biyoarıtımında kullanımı bilgisi yer almamaktadır. *R. glutinis*'in farklı biyoproseslerde kullanılmak üzere tutuklamasına yönelik sınırlı sayıda çalışmaları ise aşağıda özetlenmiştir:

Asetofenon ve analoglarının asimetric indirgenmesinde Ca-aljinat jellerine tutuklanmış *R. glutinis* kullanılmıştır. Optimum koşullarda tutuklanmış *R. glutinis* ile 45 mM (5.4 g) substrattan (asetofenon) 35mM (4.3 g) ürün ((S)-1-feniletanol) elde edilmiştir. Verim %77 olarak hesaplanmıştır (Kurbanoglu vd. 2010a). Aynı araştırmacılar bir diğer çalışmada, sürekli işletim ile kirli alkol üretimi için Ca-aljinat jellerine tutuklanmış *R. glutinis* hücreleri kullanmıştır. Optimum koşullarda 30 gün sürekli işletim ile 10.8 mL (S)-1-feniletanol üretilmiş ve %75 verim sağlanmıştır (Kurbanoglu vd. 2010b).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

Analiz ve ortam hazırlamada kullanılan kimyasallar analitik saflıkta, biyokimyasallar mikrobiyolojik saflıktadır. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler EK 1’de, cihazlar ise EK 2’de verilmiştir.

##### 3.1.1 Zeytin karasuyu

Zeytin karasuyu, Taylıeli Zeytin ve Zeytinyağı İşletmesi’nden (Burhaniye/Balıkesir) sağlanmıştır. Çalışmada, ZK1, ZK2 ve ZK3 olarak adlandırılan farklı üretim dönemlerindeki zeytin karasuları kullanılmıştır. Zeytin karasuları -30°C’de saklanmıştır. Çizelge 3.1’de çalışmada kullanılan zeytin karasularının özellikleri yer almaktadır.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan zeytin karasularının (ZK) özellikleri

Zeytin karasuyu	pH	Toplam fenol derişimi (mg/L)
ZK1	4.30	1810
ZK2	4.42	1200
ZK3	4.57	1094

Kullanılacak olan zeytin karasuyu önce 12.000xg’de 10 dk santrifüjlenerek çözünmemiş katılardan ayrılmış; bu karasu ile hazırlanan biyoarıtım ortamları ise 121 °C’de 20 dk sterilize edildikten sonra biyoarıtım başlatılmıştır.

##### 3.1.2 Tutuklama materyalleri

Zeytin çekirdeği Taylıeli Zeytin ve Zeytinyağı İşletmesi’nden öğütülmüş formda, zeolit Rota Madencilik A.Ş’den mıcır halinde, poliüretan köpük ticari olarak bir yapı marketinden, agar ve Ca-aljinat ise ticari olarak sağlanmıştır.

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Mikroorganizma ve saklama

Çalışmada, ticari olarak sağlanan *Rhodotorula glutinis* (DSM 70398) mayası kullanılmıştır. *R. glutinis*, agar içeren eğik tüplerde (+4 °C) ve mikrobank™ viallerde (Pro-Lab Diagnostics Microbank™) (-30 °C) saklanmış ve belli zaman aralıkları ile stok tazeleme işlemi yapılmıştır.

### 3.2.2 Mikroorganizma çoğaltma

*Rhodotorula glutinis*, ZK-agar olarak adlandırılan katı ortamda çoğaltılmıştır. ZK-agar ortamı; 3 g/L maya özütü, 3 g/L malt özütü, 5 g/L pepton, 10 g/L glukoz ve 15 g/L agar içeren UYM (Universal Yeast Medium) ortamından farklı olarak 20 g/L agar içerecek şekilde ve damıtık su yerine zeytin karasuyu kullanılarak hazırlanmıştır. *R. glutinis*, ZK-agar ortamlarında T= 30 °C'de 24 st süre ile inkübe edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

Mayalar, zeytin karasuyu içeren sıvı ortamlarda çoğaltıldıktan sonra tutuklanmış olarak veya kontrol olarak kullanılacakları biyoarıtım ortamlarına doğrudan aktarılmışlardır.

### 3.2.3 Mikroorganizma tutuklama

*Rhodotorula glutinis*'i tutuklama materyalleri olarak Ca-aljinat pelletleri, öğütülmüş zeytin çekirdeği, agar, poliüretan köpük ve zeolit kullanılmıştır. Hücreler; Ca-aljinat pelletlerine ve agara hapsedme yöntemi ile zeytin çekirdeği, poliüretan köpük ve zeolite ise fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile tutuklanmıştır.

#### 3.2.3.1 Ca-aljinat pelletlerine tutuklama

Tutuklama işleminde, 25 ml Na-aljinat çözeltisi ile steril koşullarda farklı derişimlerde ZK ve azot kaynağı (üre veya amonyum sülfat) içeren sıvı ön çoğalma ortamından 48 st sonunda çöktürülen ve yaş ağırlığı bilinen hücre karıştırılmıştır. Karışım, peristaltik pompa yardımıyla oda sıcaklığında, sürekli karıştırılan 0.1 M CaCl<sub>2</sub> çözeltisi içerisine

damla damla ilave edilmiştir. Bu şekilde sodyum iyonları ile kalsiyum iyonları yer değiştirerek suda çözünmeyen ve içerisine hücrelerin hapsediği Ca-aljinat jel pelletleri oluşturulmuştur. 25 ml Na-aljinat çözeltisi ile ortalama 296 adet Ca-aljinat pelleti oluşmaktadır. Pellet çapının biyoarıtma etkisinin incelendiği deneylerin haricindeki tüm denemelerde pellet çapı  $D_p=3$  mm'dir. Hazırlanan pelletler, sağlam yapıda olmaları için  $+4$  °C'de 1 st 0.1 M  $CaCl_2$  çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Bu süre sonunda pelletler bir süzgeç yardımıyla ortamdan ayrılıp kalsiyum iyonlarının fazlası ve tutuklanmayan hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla fizyolojik su (%0.9 NaCl) ve ardından saf su ile yıkandıktan sonra kullanılacakları biyoarıtım ortamına alınmıştır. Tutuklama işlemi steril koşullarda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan tutuklama düzeneğinin fotoğrafı şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Ca-aljinata tutuklama deney düzeneği

### 3.2.3.2 Zeytin çekirdeğine tutuklama

Kuru ağırlığı 40 g olan öğütülmüş zeytin çekirdekleri,  $121$  °C'de 20 dk sterillemiştir. Steril zeytin çekirdekleri, 500 ml'lik erlendeki farklı derişimlerde ZK ve üre içeren 100

ml biyoarıtım ortamlarına konularak üzerine sıvı ön çoğalma ortamında (kullanılan biyoarıtım ortamı ile aynı bileşimde) 48 st çoğaltılan hücreler süspansiyon halinde (40 ml) ilave edilmiştir. Tutuklama işleminin gerçekleştirildiği erlenler, T= 30 °C ve N= 75 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosunda 48 st bekletilmiştir. Hücrelerin tutuklandığı zeytin çekirdekleri bir süzgeç yardımıyla steril koşullarda süzülerek kullanılacakları biyoarıtım ortamlarına alınmıştır.

### **3.2.3.3 Agara tutuklama**

%2 (a/h) agar çözeltisi hazırlanıp, 121 °C'de 20 dk sterillemiştir. Agar sıcaklığı yaklaşık 42 °C civarına geldiği zaman, 48 st sonunda sıvı ön çoğalma ortamında (TF<sub>0</sub>=330 mg/L ve 2.27 g/L üre) çoğaltılan hücreler 33.5xg'de 10 dk santrifüjlenerek çöktürülmüş ve yaş ağırlığı bilinen hücreler ile karıştırılıp petri kabına dökülerek jel haline gelmesi beklenmiştir. Bir pipet ucu yardımıyla küresel şekil verilen jeller ile birlikte küresel şekil verilemeyen kısım şekilsiz olarak 500 ml'lik erlendeki 100 ml biyoarıtım ortamına aktarılmıştır.

### **3.2.3.4 Poliüretan köpüğe tutuklama**

Kuru ağırlığı 0.3827 g olan ve yaklaşık 0.5 cm'lik poliüretan köpük küpler saf su içerisinde 121 °C'de 20 dk sterillemiştir. Başlangıç toplam fenol derişimi 330 mg/L olan ZK ve 2.27 g/L üre içeren 100 ml sıvı ön çoğalma ortamında hücreler 48 st çoğaltıldıktan sonra 33.5xg'de 10 dk santrifüjlenerek ayrılmıştır. Ayrılan hücreler tartılarak yaş ağırlığı belirlenmiştir. Steril poliüretan köpük küpler, 500 ml'lik erlendeki 100 ml- sıvı ön çoğalma ortamı ile aynı bileşime sahip- biyoarıtım ortamına konularak üzerine yaş ağırlığı bilinen hücreler aktarılmıştır. Tutuklama işleminin gerçekleştirildiği erlen, T=30 °C ve N=75 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosunda 1 st bekletilmiştir. Üzerine hücrelerin tutuklandığı köpükler bir süzgeç yardımıyla steril koşullarda süzülerek biyoarıtım ortamlarına alınmıştır.

### 3.2.3.5 Zeolite tutuklama

Zeolit, kullanılmadan önce yüzey alanını artırmak için öğütülmüş ve yaklaşık 1 mm çaplı olanları tutuklama işlemi için seçilmiştir. Zeolit, içerdikleri safsızlıkları uzaklaştırmak amacıyla saf su ile yıkanmış; 120 °C'de 3 saat kurutulup sabit tartıma geldikten sonra 121 °C'de 20 dk sterillemiştir. Başlangıç toplam fenol derişimi 330 mg/L olan ZK ve 2.27 g/L üre içeren 100 ml sıvı ön çoğalma ortamında hücreler 48 st çoğaltıldıktan sonra 33.5xg'de 10 dk santrifüjlenerek ayrılmıştır. Ayrılan hücreler tartılarak yaş ağırlığı belirlenmiştir. Steril zeolitler, 500 ml'lik erlendeki 100 ml- sıvı ön çoğalma ortamı ile aynı bileşime sahip- biyoarıtım ortamına konularak üzerine yaş ağırlığı bilinen hücreler aktarılmıştır. Tutuklama işleminin gerçekleştirildiği erlen, T=30 °C ve N=75 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosunda 1 st bekletilmiştir. Bekleme sonucunda ortamdan süzgeç yardımıyla ayrılan ve üzerine/gözeneklerine hücrelerin tutuklanmış olduğu zeolitler, kullanılacakları biyoarıtım ortamlarına alınmıştır.

### 3.2.4 Tutuklanmış *R. glutinis*'in kesikli ve yarı kesikli işletim ile erlende gerçekleştirilen biyoarıtımda kullanımı

*Rhodotorula glutinis* hücreleri uygun tutuklama yöntemi kullanılarak farklı materyallere tutuklandıktan sonra steril koşullarda zeytin karasuyu içeren sıvı biyoarıtım ortamlarına aktarılmışlardır.

Biyoarıtım ortamlarından belli zamanlarda alınan örnekler +4 °C ve 12.000xg'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Çökelti, sızan hücre ağırlığını belirlemek üzere; üst sıvı faz ise pH değeri, toplam fenol derişimi ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) belirlemek üzere ayrılmıştır.

#### 3.2.4.1 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanan *R. glutinis*'in biyoarıtımda kullanımı

Steril koşullarda hazırlanan pelletler, farklı derişimlerdeki zeytin karasuyu bulunan erlenlere konulduktan sonra T=30 °C ve N=150 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosuna yerleştirilmiş; kesikli veya yarı kesikli işletimlerle biyoarıtımlar gerçekleştirilmiştir. Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış hücre ve tutuklanan hücreye eş



değer miktarda serbest hücre içeren biyoarıtım ortamları paralel olarak hazırlanmıştır. Ayrıca hücre içermeyen Ca-aljinat pelletleri de kontrol amaçlı olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.4.2 Zeytin çekirdeğine tutuklanan *R. glutinis*'in biyoarıtımda kullanımı**

Steril koşullarda üzerine hücre tutuklanan zeytin çekirdekleri, farklı derişimlerde zeytin karasuyu bulunan erlenlere konulduktan sonra T=30 °C ve N=75 rpm'de (karıştırma hızı deneyleri hariç) çalışan çalkalamalı hava banyosuna yerleştirilerek biyoarıtımlar gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, biyoarıtım ortamına tutuklanmış halde aktarılan hücre miktarı belirlenememiştir.

#### **3.2.4.3 Agara tutuklanan *R. glutinis*'in biyoarıtımda kullanımı**

Steril koşullarda agar içerisine hapsedilen hücreler, farklı derişimlerde zeytin karasuyu bulunan erlenlere konulduktan sonra T=30 °C ve N=150 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosuna yerleştirilerek biyoarıtımlar gerçekleştirilmiştir. Biyoarıtım ortamında tutuklanmış halde yaş ağırlık olarak 0.3153 g hücre bulunmaktadır.

#### **3.2.4.4 Poliüretan köpüğe tutuklanan *R. glutinis*'in biyoarıtımda kullanımı**

Steril koşullarda üzerine/gözeneklerine hücre tutuklanan poliüretan köpükler, farklı derişimlerde zeytin karasuyu bulunan erlenlere konulduktan sonra T=30 °C ve N=150 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosuna yerleştirilerek biyoarıtımlar gerçekleştirilmiştir. Ancak bu deneylerde, biyoarıtım ortamına tutuklanmış halde aktarılan hücre miktarı belirlenememiştir.

#### **3.2.4.5 Zeolite tutuklanan *R. glutinis*'in biyoarıtımda kullanımı**

Steril koşullarda üzerine/gözeneklerine hücre tutuklanan zeolitler, farklı derişimlerde zeytin karasuyu bulunan erlenlere konulduktan sonra T=30 °C ve N=150 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosuna yerleştirilerek biyoarıtımlar gerçekleştirilmiştir. Ancak bu

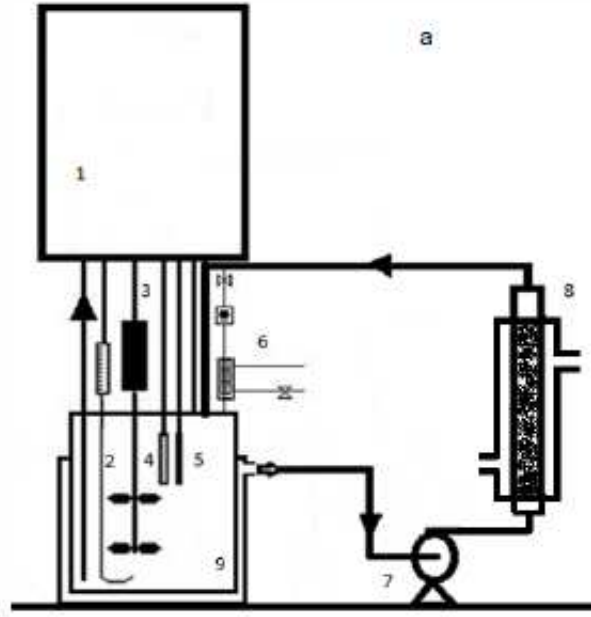
deneylerde, biyoarıtım ortamına tutuklanmış halde aktarılan hücre miktarı belirlenememiştir.

### **3.2.5 Tutuklanmış *R. glutinis*'in kolon sistemde gerçekleştirilen biyoarıtımda kullanımı**

Erlenlerde çalkalamalı sistemde yapılan kesikli ve yarı kesikli biyoarıtımların ardından, *R. glutinis* ile zeytin karasuyu biyoarıtımının endüstriye uygulanabilirliğinin denenmesi amacıyla dolgulu kolon sistemde deneyler gerçekleştirilmiştir. Kolon sistem denemelerinde tutuklama materyali olarak hem Ca-aljinat pelletleri hem de zeytin çekirdeği kullanılmıştır.

#### **3.2.5.1 Zeytin çekirdeğine tutuklanmış *R. glutinis* ile kolon sistemde biyoarıtım**

Zeytin çekirdeğine tutuklanan *R. glutinis* ile geri döngü ile kesikli olarak çalıştırılan kolon sistemde biyoarıtım gerçekleştirilmiş olup; kullanılan sistem şekil 3.2'de gösterilmiştir. Kullanılan kolon için  $L/D=10$ , geri döngü akış hızı  $Q=17.6$  ml/dk, kolonda kalma süresi 4 dk, sürekli hava gönderilen ve pH değeri izlenen depo tanktaki karıştırma hızı ise  $N=250$  rpm'dir.

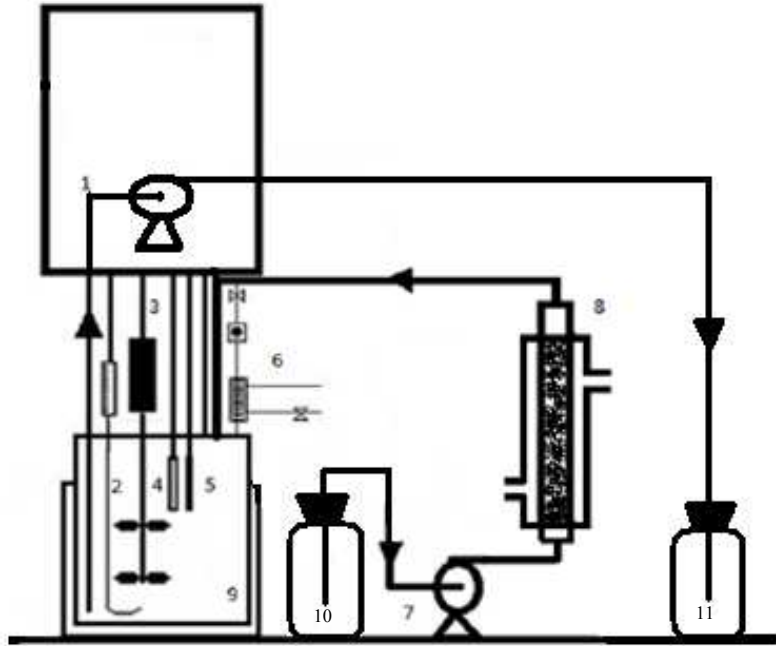


Şekil 3.2. a.Zeytin çekirdeğine tutuklanmış *R. glutinis* ile biyoarıtımın incelendiği kolon sistemi şematik gösterimi, b. Tutuklanmış *R. glutinis* ile biyoarıtımın incelendiği kolon sistemi fotoğrafı

1.Biyoreaktör kontrol ünitesi; 2. Hava girişi; 3. Mekanik karıştırıcı; 4. pH probu; 5. Sıcaklık probu; 6. Geri soğutucu; 7. Pompa; 8. Cam kolon; 9. Depo tank.

### 3.2.5.2 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis* ile kolon sistemde biyoyarıtım

Katı ZK-agar ortamında çoğaltılan hücreler 24 st sonunda kullanılacak biyoyarıtım ortamlarıyla aynı bileşime sahip sıvı ön çoğalma ortamına ( $TF_0=980$  mg/L, 9.08 g/L üre) aşılacaktır. Sıvı ortamda çoğaltılan hücreler tutuklandıktan sonra  $L/D=10$  olan cam kolona steril koşullarda aktarılmıştır. Biyoyarıtımda, ilk 96 st şekil 3.2 a'da gösterilen sistemde geri döngü ile çalışılmış, ardından şekil 3.3'de gösterilen sürekli sistem kullanılmıştır. Sistemdeki  $V=2$  L hacmindeki biyoreaktör tankı geri döngü deposu olarak kullanılmış ve deneye  $V_0=500$  ml olacak şekilde başlanılmıştır. Ca-aljinat pelletlerinin kullanıldığı biyoyarıtımda, ön çoğalma ortamından farklı olarak Ca-aljinat pelletlerinin sağlamlığını artırmak üzere biyoreaktör tankına 0.005 M  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ilave edilmiştir. Kolona yaklaşık 710 adet pellet konulmuştur. Sistemdeki akış hızı 24 ml/dk olup kolonda kalma süresi 2.6 dk'dır.



Şekil 3.3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis* ile biyoyarıtımın incelendiği sürekli işletim kolon sistemi şematik gösterimi

1. Biyoreaktör kontrol ünitesi; 2. Hava girişi; 3. Mekanik karıştırıcı; 4. pH probu; 5. Sıcaklık probu; 6. Geri soğutucu; 7. Pompa; 8. Cam kolon; 9. Depo tankı; 10. Ham ZK şişesi; 11. ZK tahliye şişesi

Geri döngü tankında karıştırma hızı  $N= 100$  rpm'de sabit tutulmuştur. Kolon ve tank sıcaklığı sirkülatör yardımıyla  $T= 30$  °C'da sabit tutulmuş ve ortama  $Q=0.6$  L/dk akış hızında hava beslenmiştir. Sistem önce geri döngülü, daha sonra pH değeri yükselip 8.00'e ulaşınca bu değere set edilerek sürekli işletimde çalıştırılmıştır. Sürekli işletimde biyoreaktör tankına ham ZK beslenirken yatışkın halin sağlanabilmesi amacıyla aynı miktarda ZK da tanktan atık şişesine alınmıştır. Belirli zamanlarda örnekler alınarak toplam fenol ve KOİ giderim analizleri yapılmıştır.

### **3.3 Analizler**

#### **3.3.1 pH ölçümü**

Biyoarıtım ortamından alınan örnekler,  $+4$  °C ve  $12.000xg$ 'de 10 dk santrifüjlendikten sonra, üst fazın pH değeri pHmetre ile izlenmiştir.

#### **3.3.2 Toplam fenol derişimi**

##### ***Ekstraksiyon***

Biyoarıtım ortamlarından belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin pH değerleri derişik HCl ile yaklaşık 2'ye getirildikten sonra, fenolik bileşenler etil asetat ile üç kez ekstrakte edilmiştir. Organik faz içerisinde kalan sulu fazı uzaklaştırmak için susuz sodyum sülfat ilave edilmiştir. Döner buharlaştırıcıda etil asetat kuruluğa kadar buharlaştırıldıktan sonra etil alkol-su karışımında (60:40) çözülmüş ve toplam fenol derişim analizi için Folin-Ciocalteu yöntemi uygulanmıştır(Ayedvd. 2005).

##### ***Folin-Ciocalteu yöntemi***

Toplam fenol derişim analizi için, ekstrakte edilen örneklerden 20 µl cam tüplere alınmış; üzerine 1.58 ml saf su ve 100 µl Folin reaktifi eklenmiştir. Vortekslenen örnekler 5 dk bekletilmiştir. Bu süre sonunda 300 µl doygun sodyum karbonat çözeltisi

ilave edilip tekrar vortekslenen tüpler, ağzı kapatılarak 40 °C'deki su banyosuna konulmuştur. Otuz dakika sonra örneklerin  $\lambda=765$  nm'de absorbanları okunmuştur.

### ***Kalibrasyon doğrusu ve hesaplama***

Toplam fenol derişim analizinde standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Farklı derişimlerde hazırlanan gallik asit çözeltileri ile kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Örneklerin toplam fenol derişimi, kalibrasyon doğrusu yardımıyla gallik asit eşdeğeri olarak (mg gallik asit/L) hesaplanmıştır. Kullanılan kalibrasyon doğrusu ile TF derişim analizlerinin doğruluğuna ait bilgiler EK 3'de yer almaktadır. Toplam fenol giderim yüzdesinin hesaplanmasında ise eşitlik (3.1) kullanılmıştır.

$$\%TF \text{ giderimi} = \frac{(\text{Örneğin başlangıç TF derişimi} - \text{Örneğin son TF derişimi})}{\text{Örneğin başlangıç TF derişimi}} * 100 \quad (3.1)$$

### **3.3.3 Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ)**

Sıvı örneklerden, 2.5 ml cam tüplere alınmış; üzerine 1.5 ml potasyum dikromat (0.017 M) ve 3.5 ml sülfürik asit-gümüş sülfat (g  $Ag_2SO_4/kg H_2SO_4= 5.5$ ) çözeltilisi ilave edilmiştir. Tüplerin kapakları sıkıca kapatılıp birkaç kez ters çevrilerek iyice karıştırılmıştır. Önceden 150 °C'ye ısıtılmış termoreaktöre yerleştirilen tüpler, 2 st bekletildikten sonra alınıp soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan örneklere 1-2 damla ferroin indikatör çözeltilisi ilave edilmiş ve 0.10 M demir amonyum sülfat (DAS) çözeltilisi ile titre edilmiştir. Dönüm noktası, mavi-yeşil rengin kiremit kırmızısına dönüştüğü yerdir. Aynı şekilde, örnek hacmine eş değer miktarda saf su eklenerek kör (tanık) deneme yürütülmüştür (APHA-1999). Örneklerin kirlilik oranına göre seyreltme yapılmış, gerekli seyreltme katsayısı kullanılarak gerçek KOİ değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamalarda kullanılan denklem eşitlik 3.2 ile verilmiştir.

$$KOİ \text{ (mg O}_2\text{/L)} = \frac{(A-B) * M * 8000}{\text{Örnek hacmi, mL}} \quad (3.2)$$

Burada:

A= K r (tanık) için harcanan DAS  zeltisi, mL

B=  rnek için harcanan DAS  zeltisi, mL

M= DAS  zeltisinin molaritesi, 0.10 M

8000= miliekivalent oksijen ağırlığı \*1000 mL/L

KOI  l m yönteminin doğruluğuna ait bilgiler EK 4'de yer almaktadır.

### **3.3.4 Hücre derişimi**

Kontrol amaçlı olarak serbest hücreler ile yapılan biyoarıtım deneylerinde ortamdan santrifüj ile (12.000xg, 10 dk, +4  C) ayırılan hücreler 85  C'de 24 st kurutulmuş, mg/ml olarak kuru hücre derişimi belirlenmiştir.

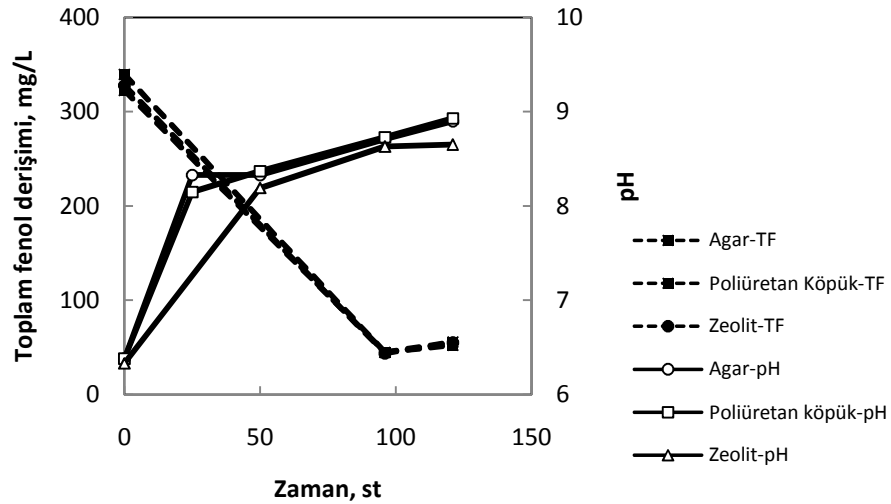
Ca-aljinat pelletlerinden sızan hücre miktarı ise biyoarıtım sonunda ortamda  ken katı madde miktarı olarak belirlenmiştir. Biyoarıtım ortamına sızan hücre miktarını belirleyebilmek amacıyla ise yaş-kuru hücre kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır (EK 5).

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada, uygun tutuklama yöntemi ile farklı materyallere tutuklanmış *Rhodotorula glutinis*, karıştırmalı ve dolgulu kolon sistemlerde kullanılarak biyoarıtım ortamlarında biyoarıtımın bir göstergesi olan pH, çöken katı madde miktarı, toplam fenol derişimi ve KOİ derişiminin zaman ile değişimleri incelenmiştir. Tüm biyoarıtımlar, serbest hücreler ile uygun olduğu belirlenen (Karakaya vd. 2012) T=30 °C sabit sıcaklıkta ve biyoarıtım ortamına üre azotu/ZK oranı 0.042 g/L sabit olacak şekilde azot kaynağı eklenerek gerçekleştirilmiştir.

##### 4.1 Agar, Zeolit ve Poliüretan Köpüğe Tutuklanmış *Rhodotorula glutinis* ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı

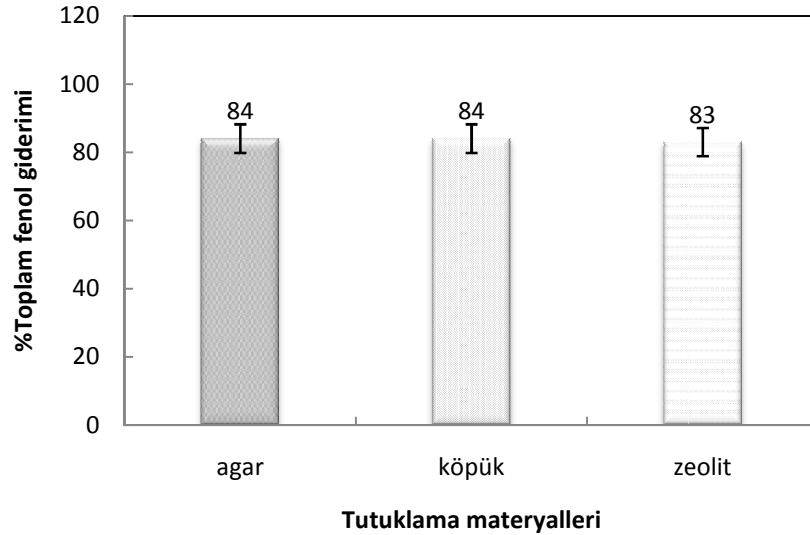
Agar, zeolit ve poliüretan köpüğe tutuklanmış *R. glutinis* ile; 330 mg/L (ZK2) başlangıç toplam fenol derişimine (TF<sub>0</sub>) sahip ZK ve azot kaynağı olarak 2.27 g/L üre içeren ortamlarda yapılan biyoarıtımlarda zamanla ortam pH'ı ve TF derişiminin değişimi şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Agar, poliüretan köpük ve zeolite tutuklanmış *R. glutinis*'in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında pH ve TF derişimlerinin zaman ile değişimi (TF<sub>0</sub>=330 mg/L(ZK2), 2.27 g/L üre, T=30 °C, N=150 rpm, 2.4513 g agar, 0.3827 g poliüretan köpük, 3.2486 g zeolit, 0.2827 g yaş hücre, V<sub>1</sub>=100 ml)



Şekil 4.2’de ise tutuklama materyali olarak kullanılan agar, poliüretan köpük ve zeolit ile gerçekleştirilen biyoarıtım ortamlarında toplam fenol giderim sonuçları yer almaktadır. Biyoarıtım ortamlarında 121 st sonunda agar, köpük ve zeolit için sırasıyla %84, 84 ve 83 TF giderimi sağlanmıştır.



Şekil 4.2 Agar, poliüretan köpük ve zeolite tutuklanmış *R. glutinis*'in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında toplam fenol giderimi ( $TF_0=330$  mg/L (ZK2), 2.27 g/L üre,  $T=30$  °C,  $N=150$  rpm, 2.4513 g agar, 0.3827 g poliüretan köpük, 3.2486 g zeolit, 0.2827 g yaş hücre,  $V_T=100$  ml,  $t=121$  st)

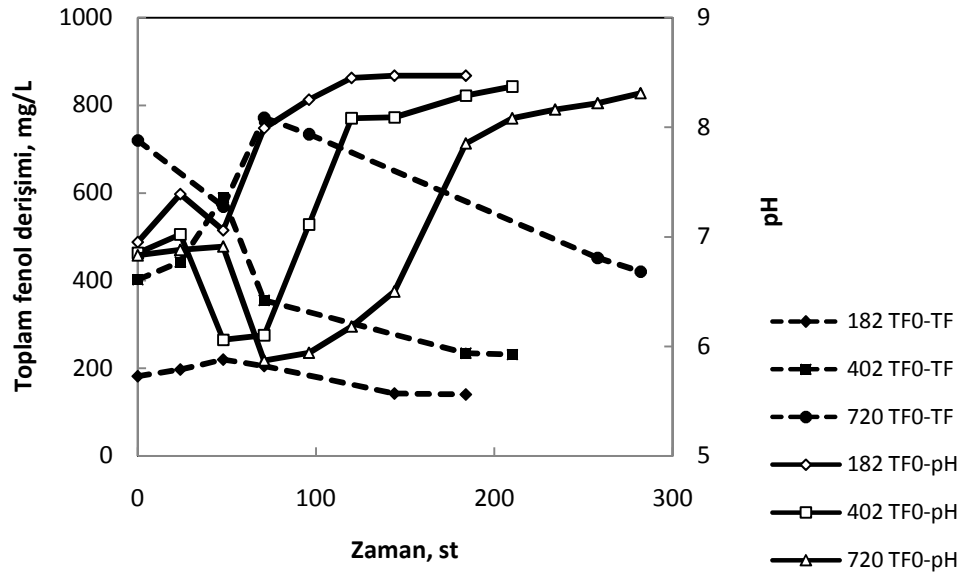
Üç farklı tutuklama materyali ile gerçekleştirilen biyoarıtımlarda toplam fenol giderimleri oldukça yüksek olmasına karşın; bu tutuklama materyallerinin kullanımında fiziksel sorunlarla karşılaşmıştır. Örneğin, agar içine hapsedilen hücreler biyoarıtım ortamına aktarılırken jele şekil vermede zorluklar yaşanmış ve agarın kullanıldığı ortamda zamanla köpürme meydana gelmiştir. Poliüretan köpük ve zeolit ile tutuklama işleminde ise tutuklanan hücre miktarı gravimetrik olarak belirlenememiştir. Ayrıca poliüretan köpüğün kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında 48 st'den sonra köpükte şekilsel deformasyonlar; zeolitin kullanıldığı ortamlarda ise zeytin karasuyunun bulanık hale geldiği gözlenmiştir. Agar, poliüretan köpük ve zeolitin tutuklama materyali olarak kullanıldığı biyoarıtım ortamlarının fotoğrafları EK 6'da verilmiştir.

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

Zeytinyağı üretim tesislerinin bir diğer atığı olan zeytin çekirdeklerine (ZÇ) tutuklanmış *R. glutinis* ile zeytin karasuyunun çalkalamalı erlenlerde gerçekleştirilen biyoarıtımlarda ZÇ/ZK ortam oranı=1/5 (g/ml) sabit tutulmuş ve başlangıç toplam fenol derişimi, karıştırma hızı ile geri döngülü kolon kullanımının etkileri incelenmiştir.

### 4.2.1 Başlangıç toplam fenol derişimi etkisi

Zeytin çekirdeğine tutuklanmış *R. glutinis* ile gerçekleştirilen biyoarıtımlarda, kullanılan ZK farklı yüzdelerde seyreltilerek TF<sub>0</sub>=182, 402 ve 720 mg/L başlangıç toplam fenol derişimlerinde çalışılmış ve ortamlarda zaman ile pH ve TF derişimlerinin değişimi Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Zeytin çekirdeğine tutuklanmış *R. glutinis*'in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında pH ve TF derişimlerinin zaman ile değişimi (T=30 °C, N=75 rpm, 40 g zeytin çekirdeği, V<sub>T</sub>=200 ml)

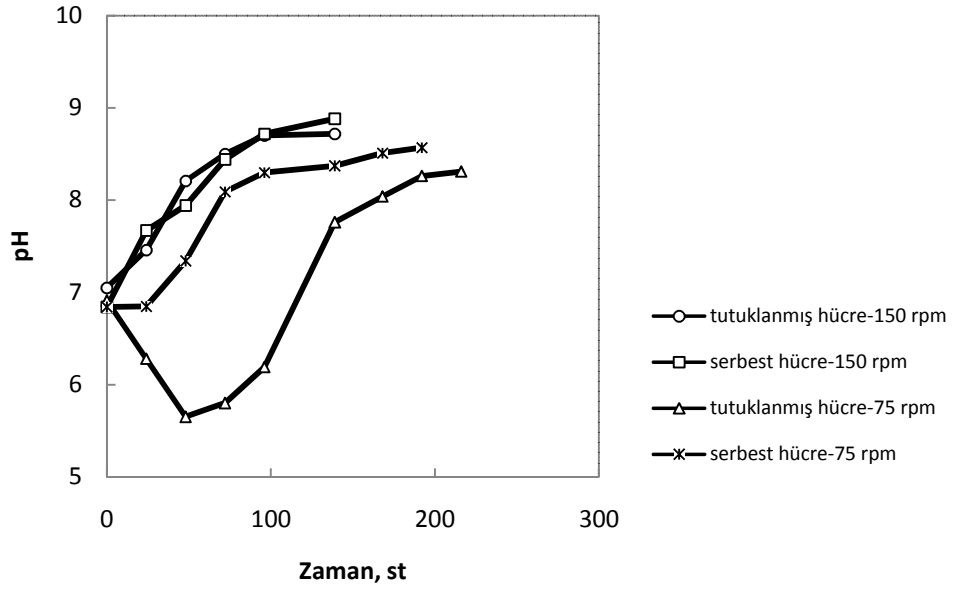
Zeytin çekirdeğine tutuklanmış *R. glutinis* hücreleri ile yapılan biyoarıtımlarda başlangıç toplam fenol derişiminin artmasıyla aynı derecede biyoarıtım için gereken süre uzamıştır (Şekil 4.3). Başlangıç toplam fenol derişimi 182 mg/L olan biyoarıtım

ortamında t=184 st sonunda %23 TF giderimini elde edilirken, yüksek ZK derişimlerinde (TF<sub>0</sub>=402 ve 720 mg/L) sırasıyla t=210 ve 282 st sonunda daha yüksek TF giderimi (%42) sağlanmıştır. Bu şekilde, ZÇ'ye tutuklanmış *R. glutinis* ile yüksek karasu derişimlerinde çalışılabileceği sonucuna varılmıştır.

N=75 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilen biyoarıtımlarda, ortam pH'ı zamanla önce azalmış, daha sonra artmıştır. Buna karşın, pH'ın azaldığı noktalarda toplam fenol derişiminin de arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.3). Zeytin çekirdeklerinden biyoarıtım ortamına fenol geçişinin buna sebep olacağı düşünülerek bir kontrol deneyi yapılmıştır. Aynı koşullarda 10 g zeytin çekirdeği saf suya konularak 75 rpm karıştırma hızında 92 st süre ile muamele edilmiştir. Bu süre sonunda zeytin çekirdeklerinden suya 24 mg/L toplam fenol geçişi olduğu belirlenmiştir. Buna göre, biyoarıtımlarda kullanılan 40 g zeytin çekirdeğinden ortama yaklaşık 100 mg/L toplam fenol geçişinin olduğu söylenebilir. Bu miktar, ortamlardaki toplam fenol derişimindeki artışa yaklaşık olarak karşılık gelmektedir (Şekil 4.3). Böylece biyoarıtımın başlangıcında gözlenen pH düşmesi ve toplam fenol derişimi artışının zeytin çekirdeklerinden gelen asidik özellikteki fenolik maddeler nedeniyle olduğu sonucuna varılmıştır.

#### **4.2.2 Karıştırma hızı etkisi**

Zeytin çekirdeğine tutuklanmış *R. glutinis* ile biyoarıtımda karıştırma hızının etkisini incelemek amacıyla N=75 ve 150 rpm karıştırma hızlarında biyoarıtımlar gerçekleştirilmiştir. Tutuklanmış ve serbest hücre ile yapılan biyoarıtımlarda zaman ile pH değişimi karşılaştırmalı olarak şekil 4.4'de yer almaktadır.



Şekil 4.4 Zeytin çekirdeğine tutuklanmış *R. glutinis*'in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında pH'nın zaman ile değişimi (TF<sub>0</sub>=373 mg/L (ZK1), 2.27 g/L üre, T=30 °C, N=75 rpm veya N=150 rpm, 40 g zeytin çekirdeği, V<sub>1</sub>=200 ml)

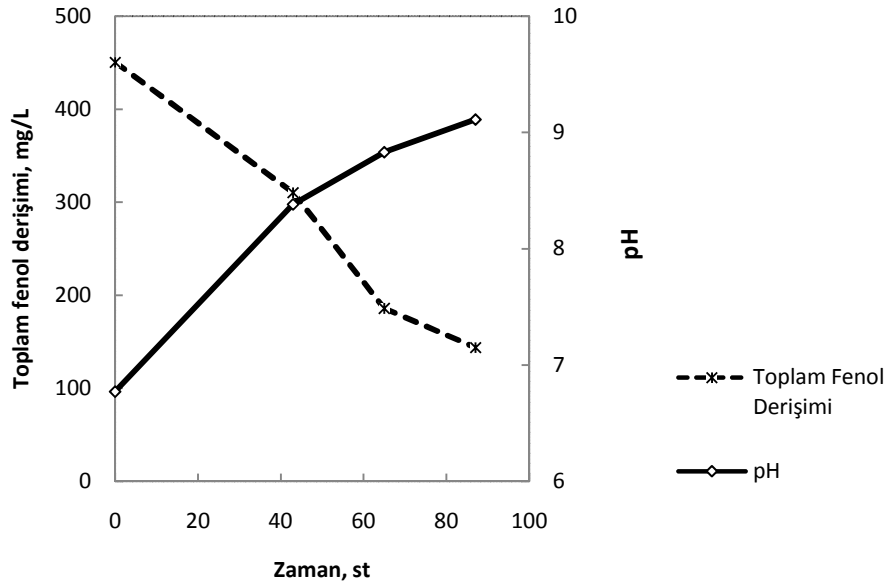
N=75 rpm'de gerçekleştirilen biyoarıtımlarda, ortam pH değeri önce azalıp daha sonra artmasına karşın N= 150 rpm'de herhangi bir azalma gözlenmemiştir. Bu durumun, yüksek karıştırma hızında kütle aktarım kısıtlamalarının daha az olması bunun sonucunda zeytin çekirdeğinden ortama fenol geçişinin daha kısa sürede ve daha hızlı olması sonucu gözlenmemesi nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Düşük karıştırma hızında serbest ve tutuklanmış hücreler ile yapılan biyoarıtımlarda ortamların pH değişimleri birbirinden farklı olsa da yüksek karıştırma hızında önemli bir fark yoktur. Tutuklanmış *R. glutinis* ile N=75 ve 150 rpm karıştırma hızlarındaki biyoarıtımların sonunda (t=216 ve 139 st) sırasıyla %45 ve 52 toplam fenol giderimleri elde edilmiştir. Sonuç olarak, ZÇ'ye tutuklanmış *R. glutinis* ile biyoarıtımın N=150 rpm karıştırma hızında yapılmasının uygun olduğuna karar verilmiştir.

#### 4.2.3 Kesikli çalkalamalı ve geri döngülü dolgulu kolon sistemlerinin karşılaştırılması

Zeytin çekirdeklerine tutuklanmış *R. glutinis* ile zeytin karasuyu biyoarıtımının geri döngülü kesikli kolon sistemde (Bölüm 3.2.5.1) yapılan biyoarıtım sonuçları, aynı koşullarda ZÇ'ye tutuklanmış *R. glutinis* ile kesikli çalkalamalı sistemde yapılan biyoarıtımla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Şekil 4.5'de geri döngülü kolon sistemde ZÇ'ye tutuklanmış *R. glutinis* ile gerçekleşen biyoarıtımda tankta zaman ile ortam pH ve toplam fenol derişiminin değışimleri yer almaktadır.



Şekil 4.5 Zeytin çekirdeğine tutuklanmış *R. glutinis*'in kullanıldığı geri döngülü kolon sistemde yapılan biyoarıtımda tanktaki pH ve TF derişiminin zaman ile değışimi (TF<sub>0</sub>=450 mg/L (ZK1), 2.27 g/L üre, T=30 °C, 28.7 g zeytin çekirdeği, V<sub>T</sub>=1000 ml tank hacmi)

Karşılaştırmak amacıyla kesikli çalkalamalı erlen sistemde yapılan biyoarıtımda (T=30 °C, N=150 rpm) ise 216 st sonunda %69 toplam fenol giderimi gerçekleşmiştir.

Geri döngülü dolgulu kolon sistemdeki biyoarıtım ile aynı koşullarda tutuklanmış hücrelerin kullanıldığı kesikli çalkalamalı sistemdeki arıtım karşılaştırıldığında 129 st

kadar kısa sürede yaklaşık aynı (%68-69) toplam fenol giderimi sağlanmıştır. Bu sonuçlar geri döngülü kolon sisteminin ZK biyoarıtımda kullanım potansiyelinin olduğu göstermektedir.

*R. glutinis*'in fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile zeytin çekirdeklerine tutuklanarak kullanıldığı biyoarıtım sistemlerinin hepsinde biyoarıtım süresince hücre sızması gözlenmiştir. Zeytin çekirdekleri ile mikroorganizmalar zayıf bağ oluşturdukları için karıştırma veya akış etkisiyle biyoarıtım sırasında desorpsiyon gerçekleşerek sızma olmaktadır. Hücre sızmasının kolon sistemde daha az olmakla beraber yapılan tüm biyoarıtımlarda önemli derecede olması nedeniyle zeytin çekirdekleri ile tutuklama ve biyoarıtım çalışmaları sonlandırılmış ve doğal bir polisakkarit olan aljinatın tutuklama materyali olarak kullanımına geçilmiştir.

### **4.3 Ca-Aljinat Pelletlerine Tutuklanmış *Rhodotorula glutinis* ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı**

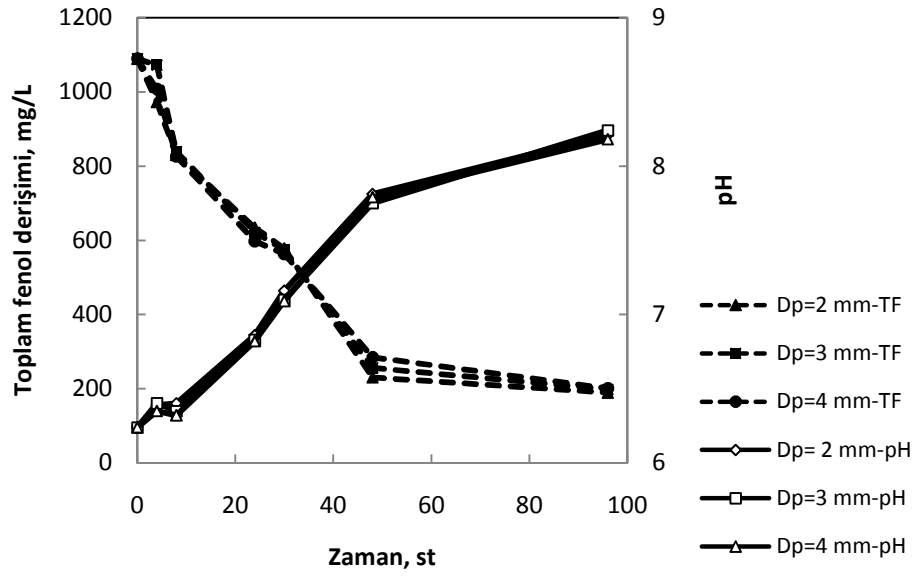
Zeytin karasuyunun biyoarıtımında fenol giderimi sağlayan *R. glutinis* hücreleri Ca-aljinat pelletlerine tutuklanarak, zeytin karasuyunun toplam fenol derişimi, çöken katı madde miktarı, KOİ derişimi ve pH değişimi üzerine etkileri incelenmiştir.

#### **4.3.1 *Rhodotorula glutinis*'in Ca-aljinat pelletlerine tutuklama koşullarının etkisi**

Ca-aljinat pelletlerine *R. glutinis* hücrelerini tutuklama işleminde; pellet çapı, sodyum aljinat derişimi ve glutaraldehit ile çapraz bağlama işleminin etkileri incelenmiştir.

##### **4.3.1.1 Ca-aljinat pellet çapı etkisi**

Biyoarıtımda Ca-aljinat pellet çapı etkisinin denenmesi için üç farklı steril pipet ucu kullanılmış ve  $D_p = 2, 3$  ve  $4$  mm çaplı küresel pelletler elde edilmiştir. Bu çapta pelletlerin kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında zaman ile pH ve toplam fenol derişiminin karşılaştırmalı değişimi şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6 Ca-aljinat pellet çapının biyoarıtıma etkisinin incelendiği ortamlarda zamanla pH ve toplam fenol derişiminin değişimi (TF<sub>0</sub>=1089 mg/L (ZK3), 9.08 g/L üre, T=30 °C, N=150 rpm, 0.03 g yaş hücre/g pellet, V<sub>T</sub>=100 ml)

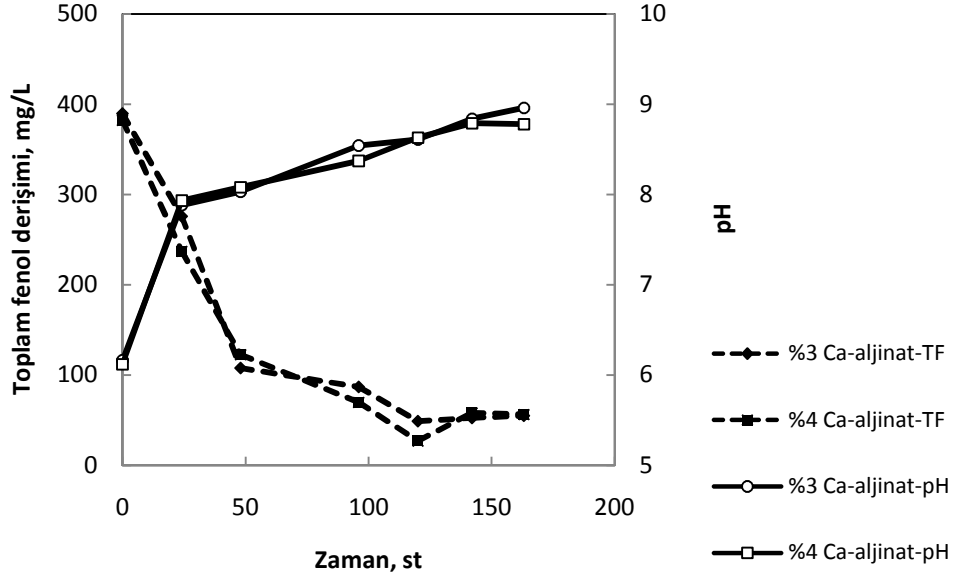
Farklı pellet çapları kullanıldığı ortamlarda toplam fenol derişiminin zaman ile değişiminde farklılık gözlenmemiştir. Bu nedenle ileri çalışmalara D<sub>p</sub>=3 mm çaplı Ca-aljinat pelletleri ile devam edilmiştir.

#### 4.3.1.2 Na-aljinat derişim etkisi

Ca-aljinat pelletlerinin dayanıklılığını etkileyen temel faktörlerden biri Na-aljinat çözeltilisinin derişimi olduğu için % 1.5, 2, 3 ve 4 (a/h) Na-aljinat çözeltileri kullanılarak Ca-aljinat pelletleri hazırlanmıştır. Hazırlanan pelletler, zeytin karasuyu içeren erlenlere konularak T=30 °C ve N=150 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosunda 7 gün boyunca tutulmuş ve bu süre sonunda pelletler süzülerek yapılarına bakılmıştır. Pelletlerde gözle görülür bir dağılma olmamasına rağmen Na-aljinat çözeltilisinin derişimi arttıkça pelletlerin daha sert ve dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle biyoarıtımlar, %3 ve 4 (a/h) Na-aljinat çözeltileri kullanılarak hazırlanmış pelletler ile gerçekleştirilmiştir.

### **%3 ve %4 Ca-aljinat pelletlerinin kıyaslanması**

TF<sub>0</sub> = 386mg/L başlangıç toplam fenol derişimine sahip ZK ve 2.27 g/L üre kullanılan biyoarıtımlar, %3 ve %4 Ca-aljinat pelletleriyle gerçekleştirilmiş olup; şekil 4.7’de bu ortamların pH ve TF derişimlerinin değişimi zamanla karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

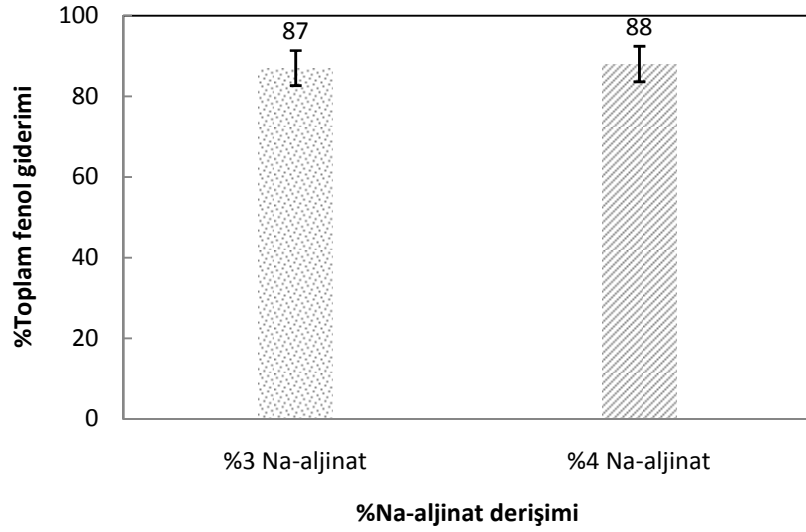


Şekil 4.7 %3 ve %4 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R.glutinis* ile yapılan biyoarıtımlarda zaman ile pH ve toplam fenol derişiminin değişimi (TF<sub>0</sub>=386 mg/L (ZK2), 2.27 g/L üre, 0.03 g yaş hücre/g pellet, T=30 °C, N=150 rpm, V<sub>T</sub>=100 ml)

Şekil 4.8’de ise %3 ve %4 Na-aljinat derişimine sahip çözeltilerle hazırlanan pelletler ile gerçekleştirilen tutuklanmış biyoarıtımlar sonundaki (t=163 st) %TF giderim sonuçları yer almaktadır.

%3 ve %4 Ca-aljinat pelletlerinin kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında 163 st sonunda toplam fenol gideriminde (%87 ve %88) önemli bir fark gözlenmemiştir. Difüzyon kısıtlamalarını biraz daha azaltabilmek amacıyla %3 Na-aljinat çözeltisi kullanılarak biyoarıtım deneylerine devam edilmiştir.

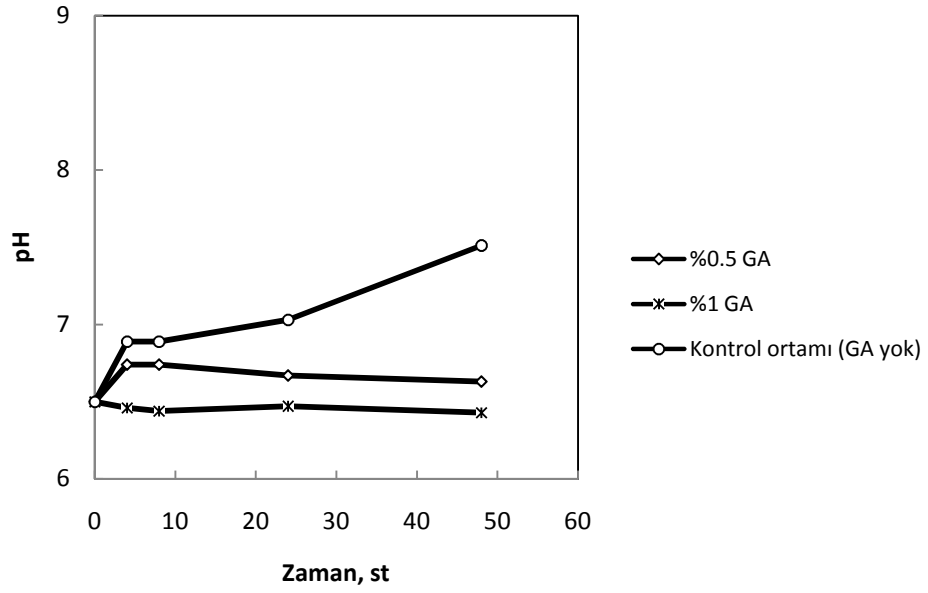




Şekil 4.8%3 ve %4 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis* ile toplam fenol giderimi (TF<sub>0</sub>=386 mg/L (ZK2), 2.27 g/L üre, 0.03 g yaş hücre/g pellet, T=30 °C, N=150 rpm, V<sub>T</sub>=100 ml, t=163 st)

#### 4.3.1.3 Glutaraldehit ile çapraz bağlama

Hazırlanan Ca-aljinat pelletlerinin sağlamlığını koruyabilmek ve pellet içinden biyoarıtım ortamına hücre sızmasını engelleyebilmek amacıyla %0.5 ve %1 glutaraldehit (GA) çözeltileri ile çapraz bağlama yapılmıştır. Ayrıca GA ile muamele yapılmadan aynı miktarda hücre içeren pelletler de kontrol amaçlı hazırlanmıştır. Hücreler %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklandıktan sonra +10 °C'de 10 dk çalkalamalı hava banyosunda GA çözeltileri ile muamele edilmiştir. Bu süre sonunda ortamlardan süzülen Ca-aljinat pelletleri saf su ile yıkandıktan sonra biyoarıtım ortamlarına aktarılmışlardır. Şekil 4.9'da %0.5 ve %1 GA çözeltileri ile muamele edilen biyoarıtım ortamlarının ve kontrol ortamının zamanla pH değişim grafiği gösterilmiştir. Glutaraldehit çözeltileri ile muamele edilen Ca-aljinat pelletlerinin kullanıldığı ortamlarda, mikrobiyal aktivitenin bir göstergesi olan pH değerinde artış gözlenmemiş olup biyoarıtım gerçekleşmemiştir. Ayrıca kontrol ortamı ile kıyaslandığında, %0.5 GA çözeltisi ile muamele edilen Ca-aljinat pelletlerinde az da olsa parçalanma gözlenirken %1 GA çözeltisi ile muamele edilen pelletler tamamen parçalanmıştır. Bu nedenle örneklerin TF analizleri yapılmamıştır.



Şekil 4.9%0.5 ve %1 GA ile muamele edilen biyoarıtım ortamları ve kontrol ortamının zamanla pH değişimi (TF<sub>0</sub>=1068 mg/L (ZK3), 9.08 g/L üre, 0.03 g yaş hücre/g pellet, T=30 °C, N=150 rpm, V<sub>T</sub>=100 ml)

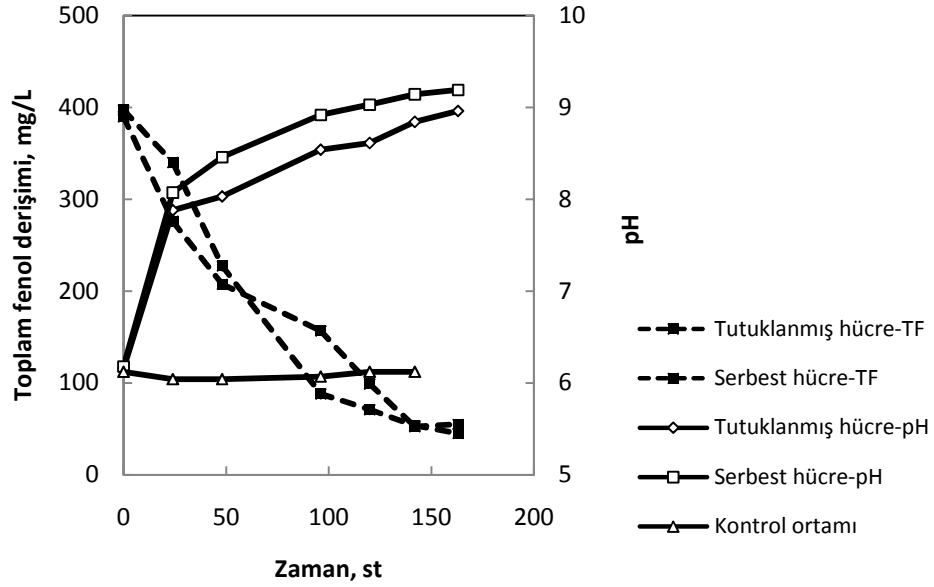
#### 4.3.2 Tutuklanmış *Rhodotorula glutinis* ile biyoarıtım koşullarının etkisi

Tutuklama koşullarının etkisinin incelendiği deneylerin sonuçlarına göre, %3 Na-aljinat çözeltisi kullanılarak hazırlanan D<sub>p</sub>=3 mm çaplı küresel Ca-aljinat pelletleri ile çalışmalara devam edilmiştir. Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis* ile gerçekleştirilen biyoarıtımlarda, başlangıç toplam fenol derişimi, tutuklanan hücre miktarı, karıştırma hızı ve azot kaynağı türünün biyoarıtıma etkisi incelenmiştir.

##### 4.3.2.1 Başlangıç toplam fenol derişimi etkisi

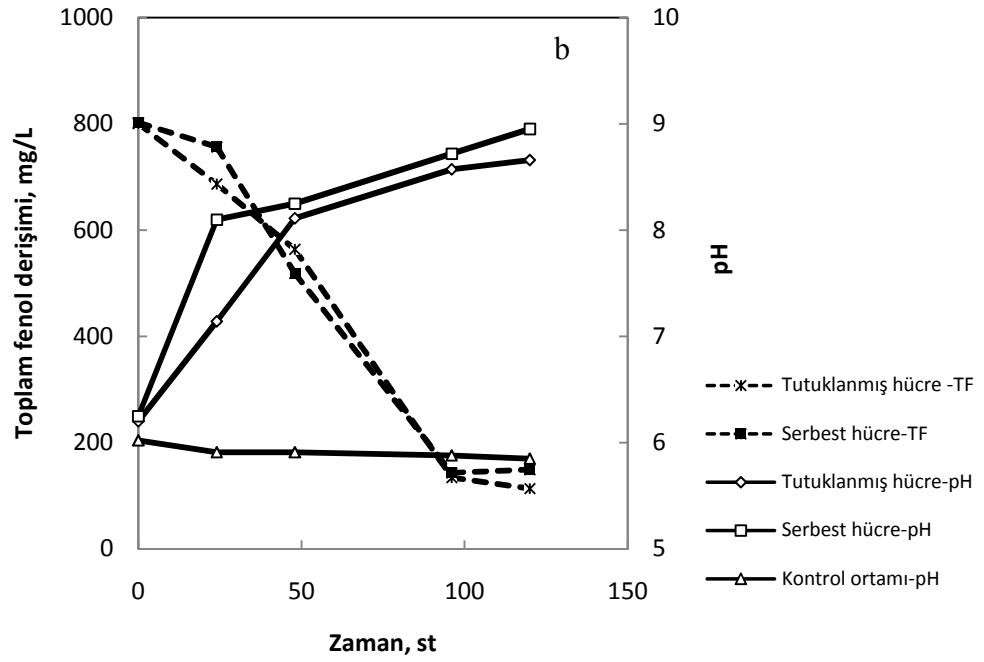
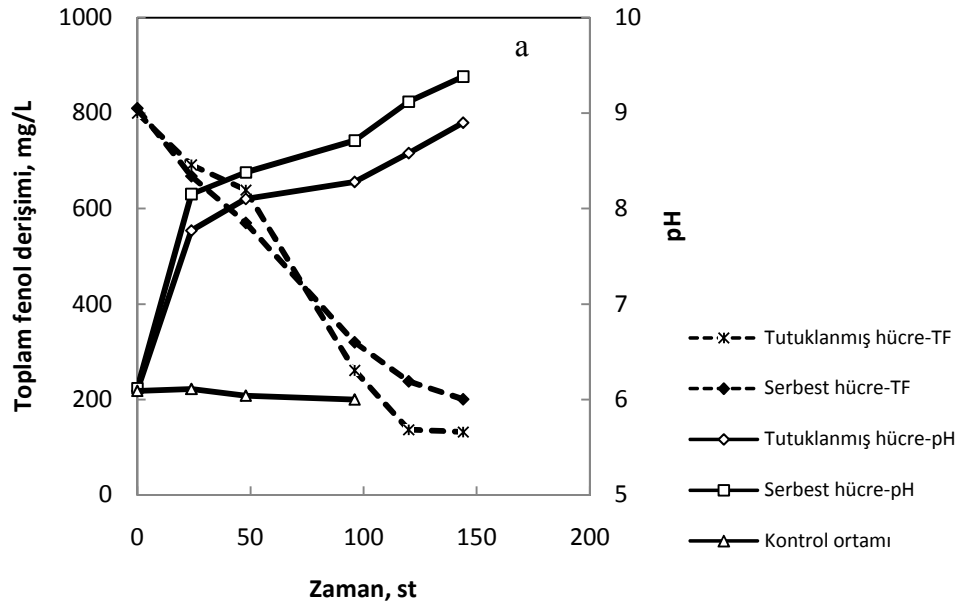
Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis* ile zeytin karasuyunun biyoarıtımında başlangıç fenol derişiminin etkisinin incelendiği deneyler, farklı yüzdelerde seyreltilerek hazırlanan 390, 800, 1042 ve 1187 mg/L TF<sub>0</sub> derişimine sahip karasu ve üre azotu/ZK oranı 0.042 g/L olacak şekilde üre içeren erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Bu deneylere paralel olarak serbest hücreler ile biyoarıtımlar da gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.10'da  $TF_0=390$  mg/L olan zeytin karasu ile hazırlanan serbest ve tutuklanmış *R. glutinis* içeren biyoarıtım ortamlarının ve hücre içermeyen kontrol ortamının zamanla pH ve TF derişiminin değişimi verilmiştir.



Şekil 4.10 Serbest ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis*'in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında ve kontrol ortamında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi ( $TF_0=390$  mg/L (ZK2), 2.27 g/L üre, 0.03 g yaş hücre/g pellet,  $T=30$  °C,  $N=150$  rpm,  $V_1=100$  ml)

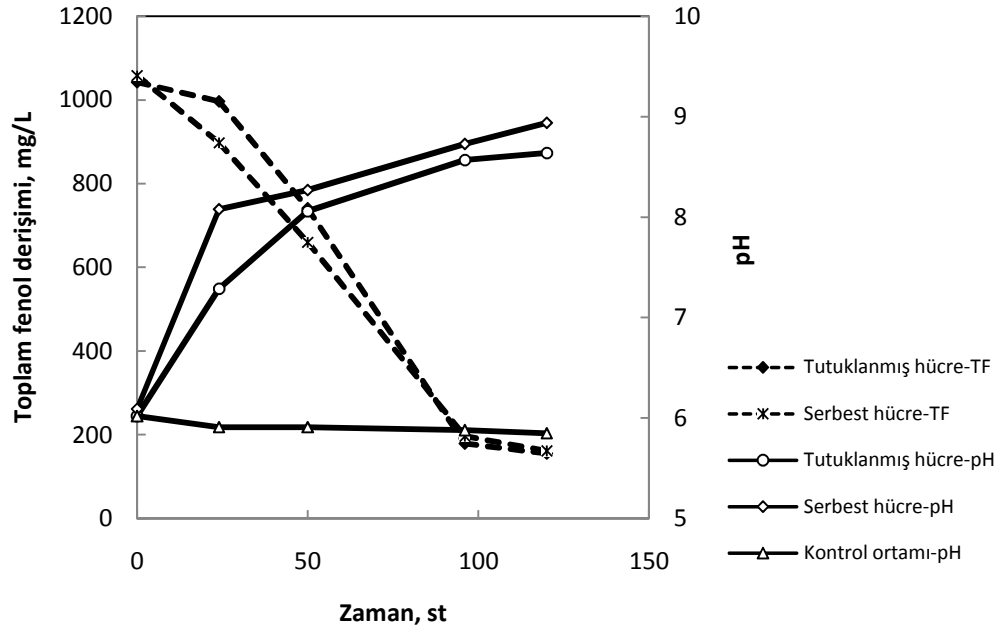
Şekil 4.11'de  $TF_0=800$  mg/L olan zeytin karasu ile hazırlanan serbest ve tutuklanmış *R. glutinis* içeren biyoarıtım ortamlarının ve hücre içermeyen kontrol ortamının zamanla pH ve TF derişiminin değişimi yer almaktadır. Deneyin tekraredilebilirliğini görebilmek amacıyla bu toplam fenol derişimine sahip ZK ile iki kez biyoarıtım gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.11 Serbest ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis*'in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında ve kontrol ortamında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi

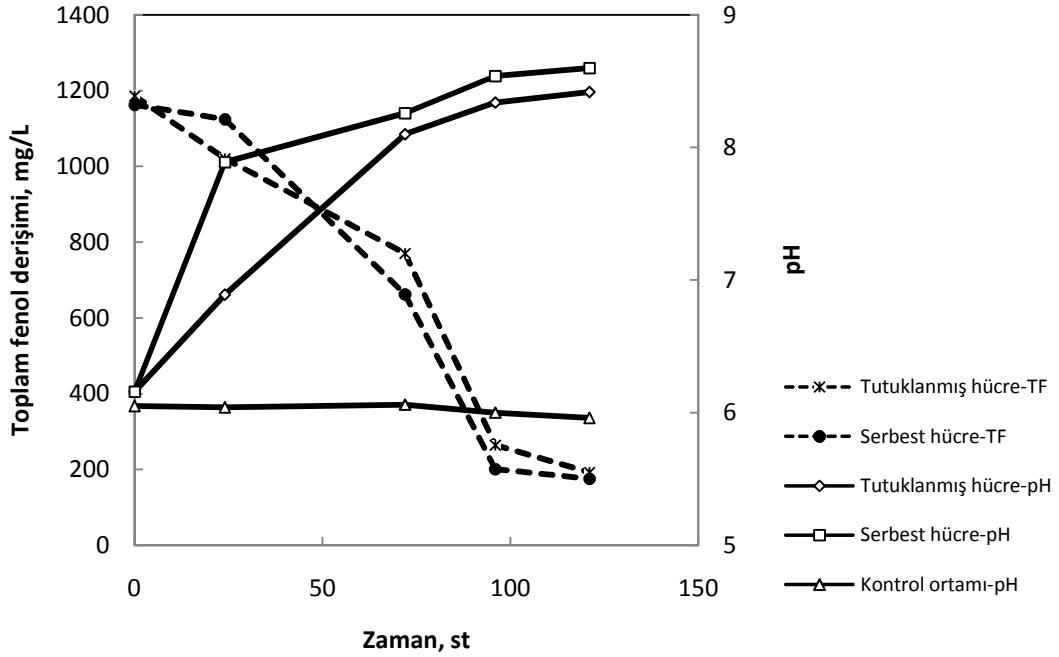
a.  $TF_0=800$  mg/L (ZK2), 4.54 g/L üre, 0.03 g yaş hücre/g pellet,  $T=30$  °C,  $N=150$  rpm,  $V_T=100$  ml b.  $TF_0=800$  mg/L (ZK2), 4.54 g/L üre, 0.03 g yaş hücre/g pellet,  $T=30$  °C,  $N=150$  rpm,  $V_T=100$  ml

Şekil 4.12’de  $TF_0=1042$  mg/L olan zeytin karasu ile hazırlanan serbest ve tutuklanmış *R. glutinis* içeren biyoarıtım ortamlarının ve hücre içermeyen kontrol ortamının zamanla pH ve TF derişiminin değişim grafiği gösterilmiştir.



Şekil 4.12 Serbest ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis*'in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında ve kontrol ortamında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi ( $TF_0=1042$  mg/L (ZK2), 6.81 g/L üre, 0.03 g yaş hücre/g pellet,  $T=30$  °C,  $N=150$  rpm,  $V_T=100$  ml)

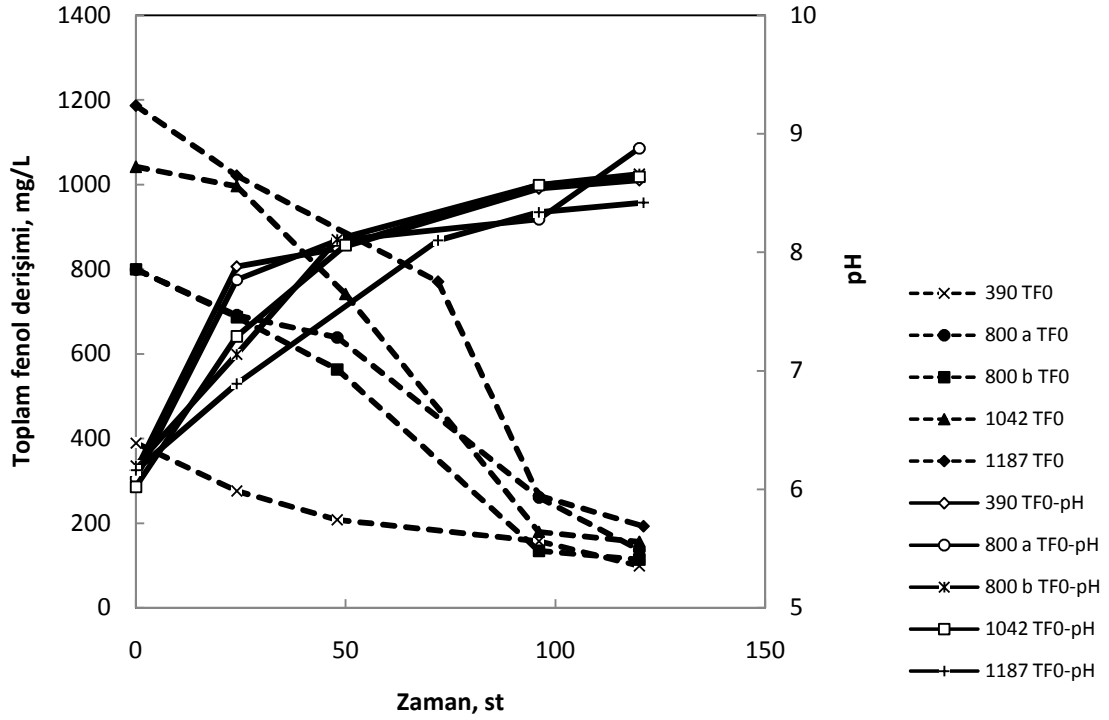
Şekil 4.13’de  $TF_0=1187$  mg/L olan zeytin karasu ile hazırlanan serbest ve tutuklanmış *R. glutinis* içeren biyoarıtım ortamlarının ve hücre içermeyen kontrol ortamının zamanla pH ve TF derişiminin değişimi verilmiştir.



Şekil 4.13 Serbest ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis*’in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında ve kontrol ortamında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi ( $TF_0=1187$  mg/L (ZK2), 0.03 g yaş hücre/g pellet,  $T=30$  °C,  $N=150$  rpm,  $V_T=100$  ml)

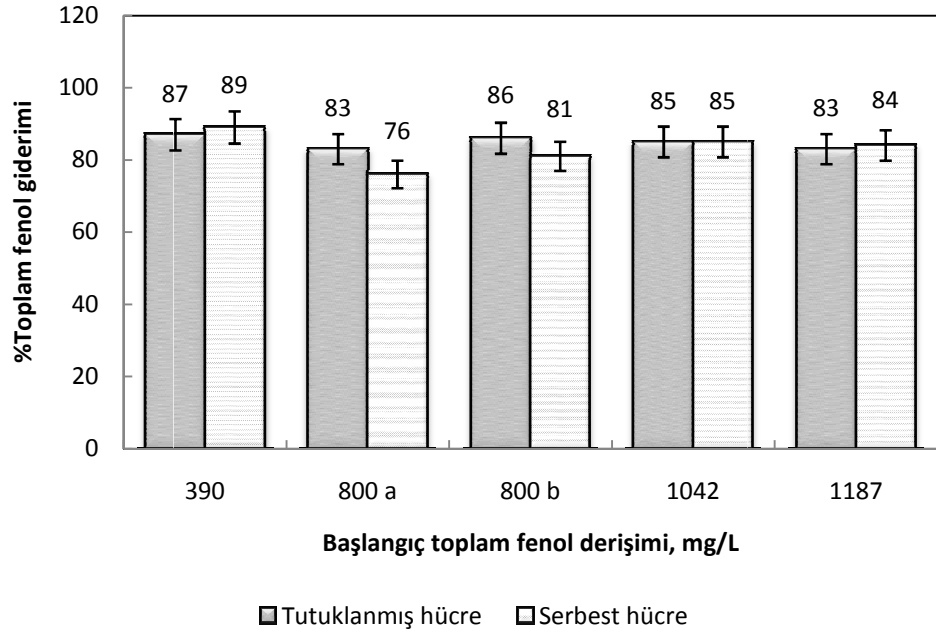
Farklı başlangıç toplam fenol derişimlerinde yapılan biyoarıtımlarda tutuklanmış hücreler ile serbest hücrelere kıyasla daha yavaş bir toplam fenol giderimi gözlenmiştir. Ayrıca, kontrol deneylerinde ortamda önemli bir parçalanma ya da oksidasyon olmadığı da belirlenmiştir.

Şekil 4.14’de farklı TF<sub>0</sub> derişimine sahip ZK ve tutuklanmış hücre ile gerçekleştirilen biyoarıtımlarda zamanla karşılaştırmalı olarak pH ve TF derişim grafiği yer almaktadır.



Şekil 4.14 %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış hücre içeren ve farklı TF<sub>0</sub> derişimlerine sahip biyoarıtım ortamlarında zaman ile pH ve toplam fenol derişiminin değişimi (0.03 g yaş hücre/g pellet, T=30 °C, N=150 rpm, V<sub>1</sub>=100 ml)

Şekil 4.15’de ise TF<sub>0</sub> derişimleri farklı olan ZK’nın tutuklanmış ve serbest hücre ile biyoarıtım sonunda (t=120 st) %TF giderim sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.15 Başlangıç TF derişimleri farklı olan ZK'nın tutuklanmış ve serbest hücre ile biyoarıtım sonunda %TF giderimleri (0.03 g yaş hücre/g pellet, T=30 °C, N=150 rpm, V<sub>T</sub>=100 ml, t= 120 st)

Arıtım ortamlarında 96 st'den sonra toplam fenol giderimi yaklaşık aynı değere ulaşmıştır, ancak ilk 48 st boyunca başlangıç toplam fenol derişimi farklı biyoarıtımlarda başlangıç toplam fenol giderim hızları farklı olup çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı başlangıç toplam fenol derişimlerinde gerçekleşen biyoarıtımlarda başlangıç toplam fenol giderim hızları ile 48 st sonunda toplam fenol giderimleri

Başlangıç toplam fenol derişimi (mg/L)	Başlangıç toplam fenol giderim hızı (mg/L st)	Başlangıç toplam fenol giderim hızı (mg/g yaş hücre st)	Toplam fenol giderimi (%) t= 48 st
390	3.17	0.94	47
800 a	7.64	2.27	20
800 b	8.67	2.58	30
1042	9.01	2.68	29
1187	11.93	3.55	35

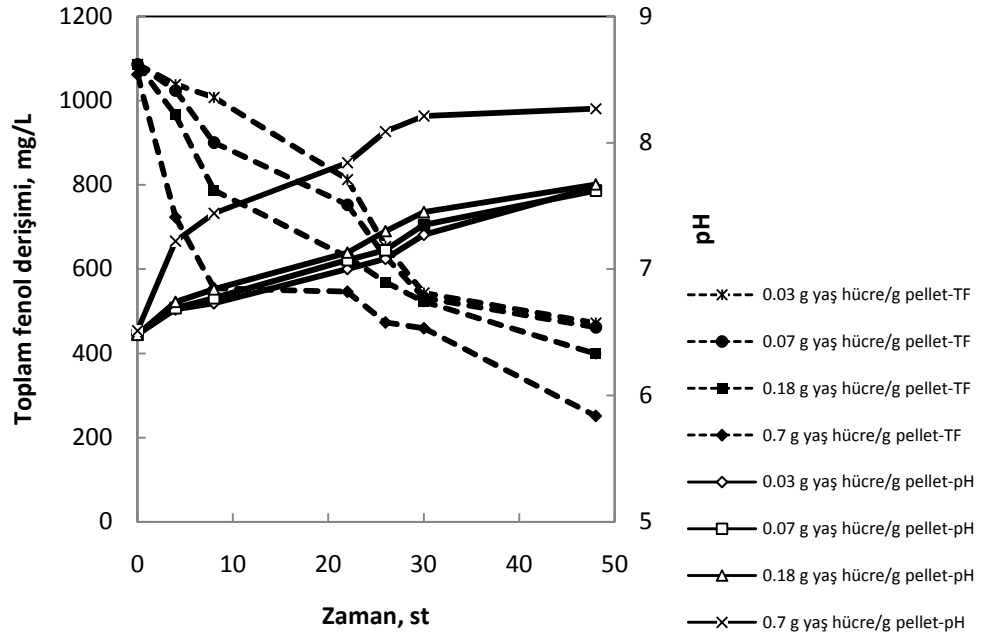


Sonuçlar değerlendirildiğinde, başlangıç fenol derişiminin artması ile fenol giderim hızının arttığı ancak biyoarıtım yeterince uzun süre gerçekleştirilirse düşük ve yüksek başlangıç fenol derişimlerinde aynı fenol giderimi (%83-87) sağlanabileceği görülmektedir. Bu sonuç, yüksek derişimlerinde zeytin karasuyunda bulunan fenollerin *R. glutinis* üzerine inhibisyon etkisi yapmadığını göstermesi açısından da olumludur. Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis* hücreleri ile seyreltilmemiş zeytin karasuyu biyoarıtımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Başlangıç toplam fenol derişimi etkisinin incelendiği bu deney grubunda, 48 st sonunda biyoarıtım ortamlarında ölçülen katı madde miktarları (sızma)  $TF_0 = 390, 800 a, 800 b, 1042$  ve  $1187$  mg/L için sırasıyla 0.14, 0.23, 0.18, 0.26 ve 0.24 g olup artan  $TF_0$  derişimi ile orantılı olarak artmıştır.

#### **4.3.2.2 Tutuklanmış hücre miktarı etkisi**

Hücre miktarının biyoarıtıma etkisini incelemek için biyoarıtımlarda kullanılan hücre miktarı; 0.03, 0.07, 0.18 ve 0.7 g yaş hücre/g pellet olarak değiştirilmiştir. Tutuklanmış hücre miktarının etkisini daha rahat bir şekilde gözleyebilmek üzere bu deney setinde 4 saatte bir ortamlardan örnek alınmıştır. Biyoarıtımın bir göstergesi olan ortamdaki pH artışı, tutuklanmış hücre miktarının artmasıyla birlikte daha kısa sürede gerçekleşerek platoya ulaşmıştır. Şekil 4.16'da farklı miktarlarda hücre içeren *R. glutinis* pelletleri ile gerçekleştirilen biyoarıtım ortamlarının zaman ile pH ve TF derişimlerinin değişim verilmiştir.



Şekil 4.16%3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis*'in kullanıldığı biyoyarıtım ortamlarında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi (TF<sub>0</sub>=1074 mg/L (ZK3), 9.08 g/L üre, T=30 °C, N=150 rpm, V<sub>T</sub>=100 ml)

Çizelge 4.2'de artan hücre miktarı ile başlangıç toplam fenol giderim hızları ve ilk 24 st sonundaki %TF giderim sonuçları verilmiştir.

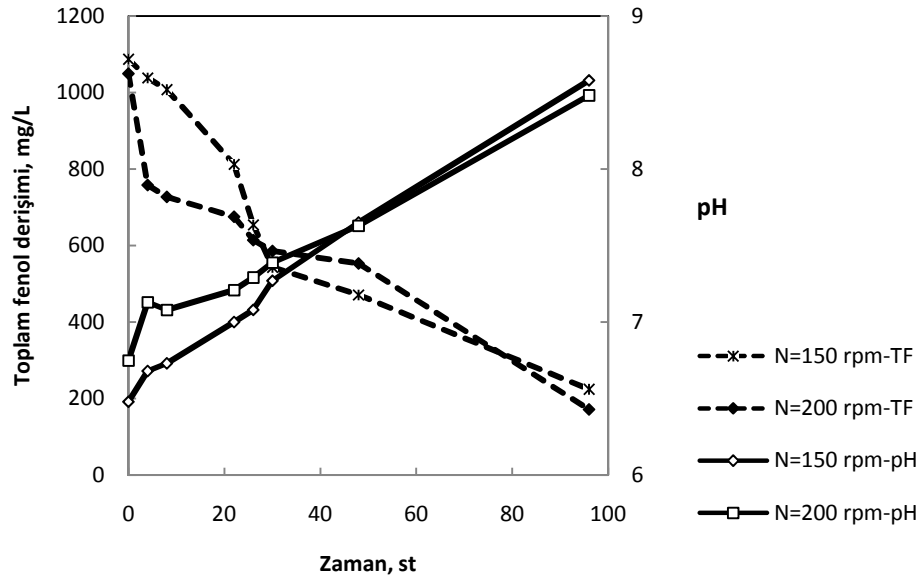
Çizelge 4.2 Farklı hücre miktarları ile gerçekleşen biyoyarıtımlarda başlangıç toplam fenol giderim hız verileri ile 24 st sonunda toplam fenol giderimleri

Tutuklanmış hücre miktarı (g yaş hücre/g pellet)	Başlangıç toplam fenol giderim hızı (mg/L st)	Toplam fenol giderimi (%) t=24 st
0.03	8.87	25
0.07	15.62	31
0.18	22.95	42
0.7	87.71	55

Tüm biyoarıtım ortamlarında ilk 48 saatte toplam fenol giderimi hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 4.16). Kırk sekiz st süren biyoarıtım sonunda ise %57-76 aralığında toplam fenol giderimi sağlanmıştır.

#### 4.3.2.3 Karıştırma hızı etkisi

Karıştırma hızının biyoarıtıma etkisini incelemek amacıyla biyoarıtımlar, N=150, 200 ve 250 rpm olmak üzere üç farklı karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. N=250 rpm karıştırma hızında Ca-aljinat pelletleri parçalandığı için şekil 4.17'de 150 ve 200 rpm karıştırma hızında elde edilen zaman ile biyoarıtım ortamlarının pH ve TF derişiminin değişim grafiğine yer verilmiştir.



Şekil 4.17 Farklı karıştırma hızında gerçekleştirilen biyoarıtım ortamlarında zaman ile pH ve TF derişimlerinin değişimi (TF<sub>0</sub>= 1068 mg/L (ZK3), 9.08 g/L üre, 0.03 g yaş hücre/g pellet, 30 °C, V<sub>T</sub>=100 ml)

t=96 st süren biyoarıtımlarda, N=150 ve 200 rpm için sırasıyla %79 ve %84 TF giderimi elde edilmiştir. Karıştırma hızının artışı ile birlikte kütle aktarım kısıtlamaları azaldığı için daha kısa sürede daha fazla toplam fenol giderimi sağlanmıştır.

Karıştırma hızının artışı ile birlikte ilk 24 saatte daha hızlı bir şekilde toplam fenol giderimi gerçekleşmiş olup çizelge 4.3’de 24 st sonundaki karıştırma hızı ile başlangıç toplam fenol giderim hızları ve ilk 24 st sonundaki %TF giderim sonuçları verilmiştir.

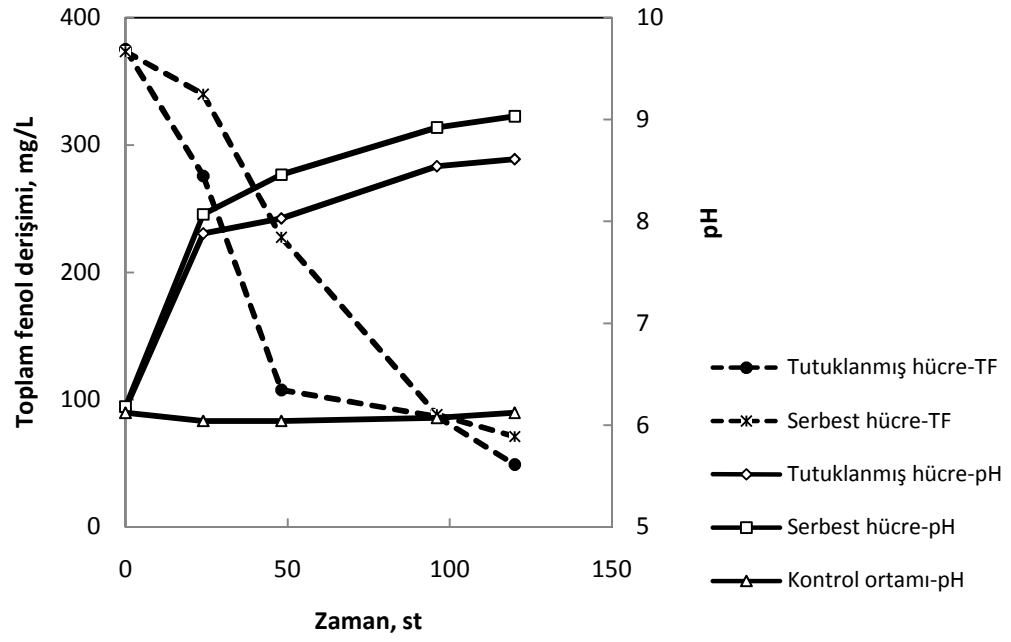
Çizelge 4.3 Farklı karıştırma hızları ile gerçekleşen biyoarıtımlarda başlangıç toplam fenol giderim hızları ile 24 st sonunda toplam fenol giderimleri

<b>Karıştırma hızı (rpm)</b>	<b>Başlangıç toplam fenol giderim hızı (mg/L st)</b>	<b>Başlangıç toplam fenol giderim hızı (mg/g yaş hücre st)</b>	<b>Toplam fenol giderimi (%) t=24 st</b>
150	8.87	2.64	25
200	53.51	15.92	36

#### 4.3.2.4 Azot kaynağı türü etkisi

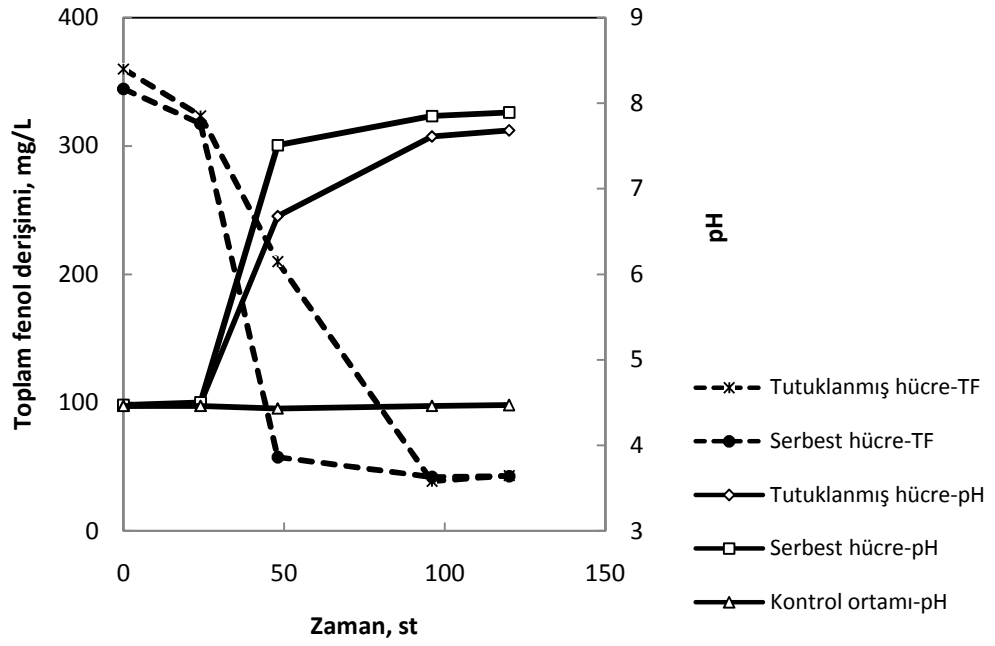
Biyoarıtımı etkileyen önemli parametrelerden biri de azot kaynağı türüdür. Serbest *R. glutinis* hücreleri ile laboratuvarımızda gerçekleştirilen çalışmada; azot kaynağı olarak amonyum nitrat, üre ve amonyum sülfat kullanılmış olup her üç azot kaynağının da arıtımda kullanılabilceği gösterilmiştir (Karakaya vd. 2012). Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis* hücreleri ile gerçekleştirilen bu çalışmada ise benzer şekilde azot kaynağı olarak amonyum sülfat ve üre kullanılmıştır. Çalışmada, üre azotu/ZK (g/L) oranı sabit olacak şekilde eklenen üre miktarı zeytin karasuyu derişimi ile orantılı olacak şekilde artırılmıştır. Üreye molar bazda eşit olacak şekilde de amonyum sülfat kullanılmıştır.

Şekil 4.18’de  $TF_0=375$  mg/L olan ZK ve 2.27 g/L üre ile hazırlanan serbest ve tutuklanmış *R. glutinis* içeren biyoarıtım ortamlarının ve hücre içermeyen kontrol ortamının zamanla pH ve TF derişimlerinin değişimi verilmiştir.



Şekil 4.18 Azot kaynağı olarak üre içeren, serbest ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis*'in kullanıldığı biyoreaktör ortamlarında ve kontrol ortamında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi ( $TF_0=375$  mg/L (ZK2), 2.27 g/L üre, 0.03 g yaş hücre/g pellet,  $T=30$  °C,  $N=150$  rpm,  $V_T=100$  ml)

Şekil 4.19'da  $TF_0=375$  mg/L olan ZK ve 5 g/L amonyum sülfat ile hazırlanan serbest ve tutuklanmış *R. glutinis* içeren biyoreaktör ortamlarının ve hücre içermeyen kontrol ortamının zamanla pH ve TF derişimlerinin değişimi gösterilmiştir.



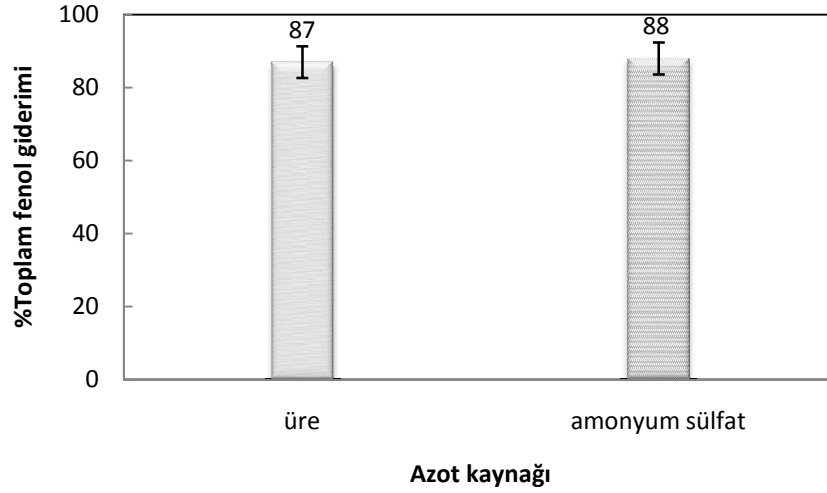
Şekil 4.19 Azot kaynağı olarak amonyum sülfat içeren, serbest ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis*'in kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında ve kontrol ortamında pH ve TF derişiminin zaman ile değişimi (TF<sub>0</sub>=375 mg/L (ZK2), 5 g/L amonyum sülfat, 0.03 g yaş hücre/g pellet, T=30 °C, N=150 rpm, V<sub>1</sub>=100 ml)

Çizelge 4.4'de ise farklı azot kaynağı ile başlangıç toplam fenol giderim hızları ve ilk 24 st sonundaki %TF giderim sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.4 Farklı azot kaynağı ile gerçekleşen biyoarıtımlarda başlangıç toplam fenol giderim hızları ile 24 st sonunda toplam fenol giderimleri

Azot kaynağı	Başlangıç toplam fenol giderim hızı (mg/L st)	Başlangıç toplam fenol giderim hızı (mg/g yaş hücre st)	Toplam fenol giderimi (%) t=24 st
Üre	6.74	2.00	29
Amonyum sülfat	3.99	1.19	10

Şekil 4.20’de ise azot kaynağı olarak amonyum sülfat veya üre kullanılan, tutuklanmış hücreler ile kesikli işletimle gerçekleştirilen biyoarıtımların sonundaki (t= 120 st)%TF giderim sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.20 Azot kaynağı olarak amonyum sülfat veya üre kullanılan biyoarıtımlarda %TF giderim sonuçları (TF<sub>0</sub>=375 mg/L (ZK2), 0.03 g yaş hücre/g pellet, T=30 °C, N=150 rpm, V<sub>T</sub>=100 ml, t=120 st)

Üre içeren ortamda 120 st sonunda %87 TF giderimi sağlanırken, aynı miktarda amonyum sülfat içeren ortamda 120 st sonunda %88 TF giderimi gerçekleşmiştir. Sonuçlar, çalışılan koşullarda üre varlığında daha yüksek hızda fenol giderimi sağlandığını ancak yeterince uzun süre sonunda önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir.

Azot kaynağı olarak amonyum sülfat kullanımı sonucunda biyoarıtım ortamında çöken katı madde miktarı azalmıştır. 5 g/L amonyum sülfat ve 375 mg/L TF<sub>0</sub> derişimine sahip ZK'nın kullanıldığı arıtım ortamında 120 st sonunda gözlenen katı madde miktarı 0.07 g iken; 2.27 g/L üre ve 375 mg/L TF<sub>0</sub> derişimine sahip ZK'nın kullanıldığı ortamdaki 0.14 g olarak hesaplanmıştır.

Azot kaynağı olarak amonyum sülfat kullanılan biyoarıtımlarda çöken katı madde miktarı üre kullanılan duruma göre az olmasına karşın; yüksek  $TF_0$  derişimine sahip ZK ile yapılan biyoarıtımlarda amonyum sülfat varlığında hücresele aktivite gözlenememiştir. Bu nedenle biyoarıtım deneylerinde azot kaynağı olarak üre kullanılmıştır.

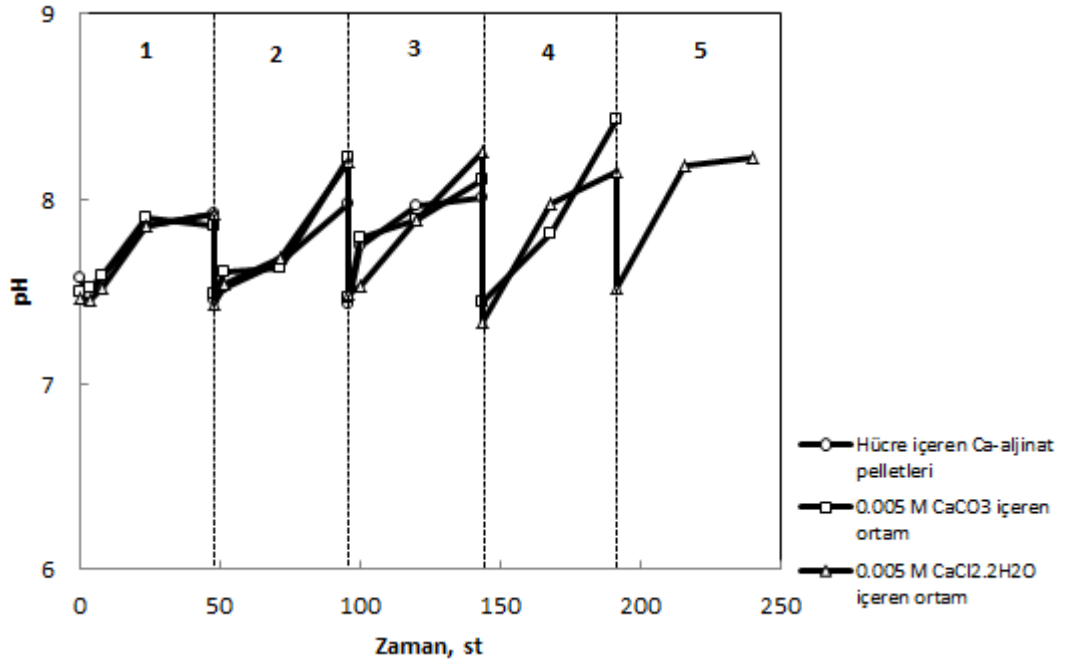
#### **4.3.3 *Rhodotorula glutinis* tutuklanmış Ca-aljinat pelletleri ile biyoproses işletim türü etkisi**

Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis* hücreleriyle kesikli sistemde yapılan biyoarıtımlar ile arıtıma etki eden parametreler incelendikten sonra Ca-aljinat pelletleri ile kesikli işletimlerde ardışık biyoarıtımlar gerçekleştirilerek pelletlerin kullanım sayısı incelenmiştir. Yarı kesikli işletimde ise, öncelikle fazla miktarda ZK biyoarıtımı hedeflenmiştir. Ortama farklı zamanlarda asidik özellikte olan ham ZK beslemesi yapılarak hücresele aktivite sonucu artan pH değerinin düşürülmesi, dolayısıyla biyoarıtım ortamında çöken katı madde miktarının da azaltılması amaçlanmıştır. Dolgulu kolon sistemde *R. glutinis* pelletlerinin uzun süreli kullanımı ile daha fazla miktarda ZK arıtımının olup olmayacağını anlaşılması planlanmıştır.

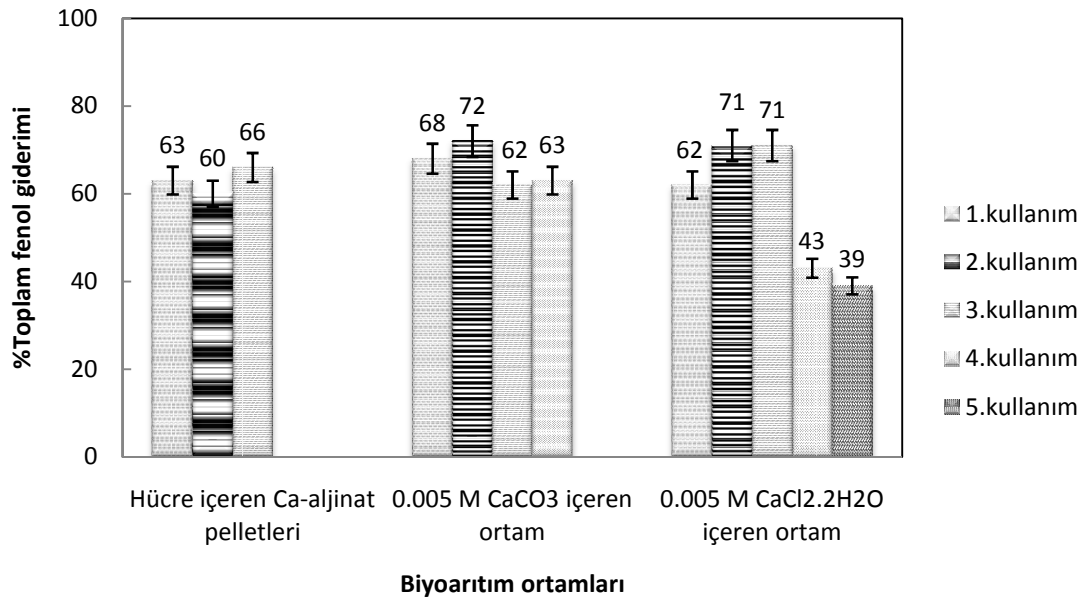
##### **4.3.3.1 Kesikli işletimde kullanım sayısı**

*Rhodotorula glutinis* içeren Ca-aljinat pelletlerinin tekrar kullanılabilirliğini incelemek üzere kesikli işletim ile ardışık biyoarıtımlar yapılmıştır. Ca-aljinat ile gerçekleştirilen diğer çalışmalardan farklı olarak üç biyoarıtım ortamı paralel hazırlanmıştır. Ortamlardan birine hücre tutuklanmış Ca-aljinat pelletleri aktarılmış, diğerlerine ise Ca-aljinat pelletlerinin dayanımını artırmak için 0.005 M  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ve 0.005 M  $CaCO_3$  ilave edilmiştir. Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis* hücreleri biyoarıtım ortamından ( $TF_0=1049$  mg/L (ZK3), 9.08 g/L üre) her 48 st sonunda bir süzgeç yardımıyla süzülerek alınmış ve tekrar kullanım için aynı koşullarda hazırlanan taze biyoarıtım ortamlarına aktarılmıştır. Ortamlarda zamanla pH değişimleri şekil 4.21’de, her 48 st’de bir ulaşılan toplam fenol giderimleri ise şekil 4.22’de gösterilmiştir.





Şekil 4.21 Hücre tutuklanmış Ca-aljinat pelletleri ile birlikte 0.005 M CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O veya 0.005 M CaCO<sub>3</sub> kullanılan biyoarıtım ortamlarında pH'nın zaman ile değişimi (TF<sub>0</sub>=1049 mg/L (ZK3), 9.08 g/L üre, 0.03 g yaş hücre/g pellet, T=30 °C, N=150 rpm, V<sub>T</sub>=100 ml)



Şekil 4.22 Hücre tutuklanmış Ca-aljinat pelletleri ile birlikte 0.005 M CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O veya 0.005 M CaCO<sub>3</sub> kullanılan biyoarıtım ortamlarının kullanım sayılarıyla %TF giderim değerleri (TF<sub>0</sub>=1049 mg/L (ZK3), 9.08 g/L üre, 0.03 g yaş hücre/g pellet, T=30 °C, N= 150 rpm, V<sub>T</sub>=100 ml)

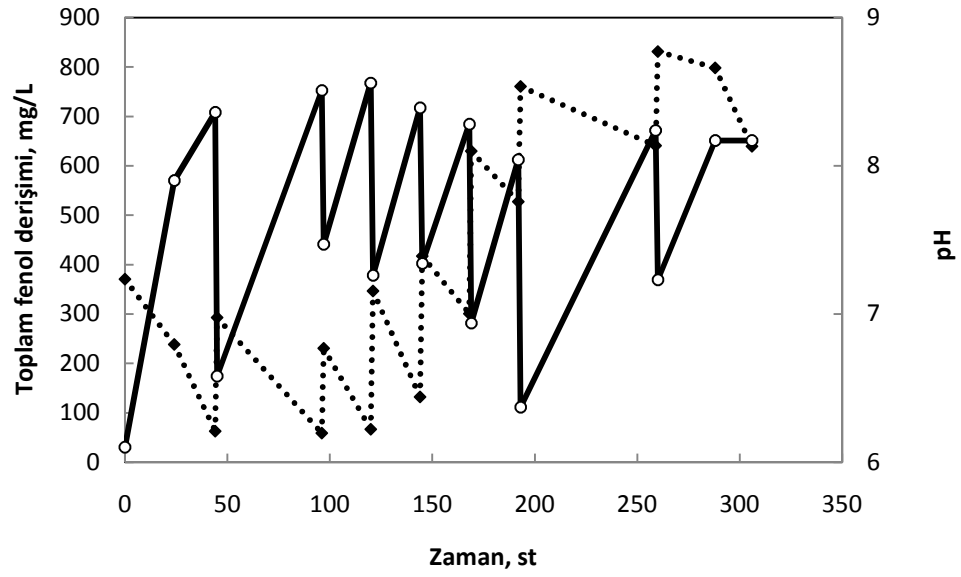
İncelenen her üç biyoarıtım ortamında da her kullanımda zamanla pH değerleri artmıştır. Ancak  $Ca^{+2}$  iyonları içermeyen ortamda biyoarıtımda 3 ardışık kullanım gerçekleştirilebilirken, 0.005 M  $CaCO_3$  ve 0.005 M  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  içeren biyoarıtımlarda ise sırasıyla 4 ve 5 ardışık kullanım gerçekleşmiştir.

Biyoarıtım ortamına eklenen  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ve  $CaCO_3$  ile sağlanan  $Ca^{2+}$  iyonları, pellet dayanıklılığını artırdığı için Ca-aljinat pelletlerinin kullanım sayısı artmıştır.  $Ca^{+2}$  iyonları içermeyen ortam ile  $CaCO_3$  varlığındaki biyoarıtımların sonunda (sırasıyla  $t=144$  ve  $t=192$  st) pelletler parçalandığı için deneyler sonlandırılmıştır.  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  bulunan ortamda pelletler  $CaCO_3$  içeren ortama göre daha fazla kullanılmasına karşın  $t=240$  st sonunda mikrobiyel aktivite dolayısıyla TF giderimi azaldığı için kesikli işletimde ardışık kullanıma devam edilmemiştir.

Biyoarıtım sonunda ortamda çöken katı madde miktarı;  $Ca^{+2}$  iyonları içermeyen, 0.005 M  $CaCO_3$  ve 0.005 M  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  içeren biyoarıtım ortamlarında sırasıyla 0.08 ( $t=3 \times 48$  st), 0.14 ( $t=4 \times 48$  st) ve 0.02 g ( $t=5 \times 48$  st)'dir.

#### **4.3.3.2 Yarı kesikli işletim**

Daha fazla miktarda zeytin karasuyu arıtımı sağlamak üzere yarı kesikli işletim kullanılmıştır. Ayrıca yarı kesikli işletimde, üre içermeyen ham ZK santrifüjlendikten sonra sterillenerek besleme çözeltisi olarak kullanılmıştır.  $TF_0$  derişimi 341 mg/L olan ZK, azot kaynağı olarak üre veya amonyum sülfat ve %3 Ca-aljinat pelletlerini içeren biyoarıtım ortamının pH'ı arttığı zaman ortama besleme çözeltisinden (ZK2, pH=4.42) belirli hacimlerde eklenmiştir. Böylece ortam pH'ı, başlangıç değerinin altına inmeden belli bir aralıkta (pH=6.0-8.5) tutulmuştur. Şekil 4.23'de tutulan hücreler ile yarı kesikli işletilen, 341 mg/L  $TF_0$  derişimine sahip ZK ve 2.27 g/L üre içeren biyoarıtım ortamında zamanla pH ve TF derişiminin değışimi karşılaştırmalı olarak yer almaktadır.



Şekil 4.23 Azot kaynağı olarak üre ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış hücre içeren biyoyarıtım ortamında zaman ile pH ve toplam fenol derişiminin değişimi ( $TF_0=341$  mg/L (ZK2), 2.27 g/L üre, 0.03 g yaş hücre/g pellet,  $T=30$  °C,  $N=150$  rpm,  $V_0=100$  ml)

Deney süresince ortama 7 kere besleme çözeltisi ilave edilmiştir. Çizelge 4.5’de besleme çözeltisi ekleme zaman ve miktarı, çizelge 4.6’de ise zamanla %TF giderim değerleri verilmiştir.

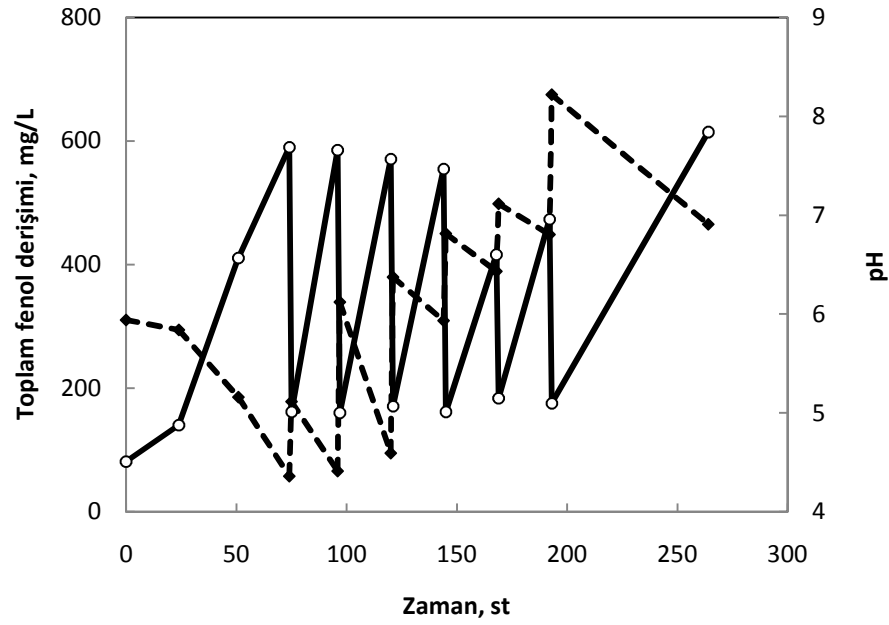
Çizelge 4.5 Yarı kesikli işletilen erlen sistemde besleme çözeltisinin ekleme zaman ve miktarları ( $TF_0=341$  mg/L (ZK2), 2.27 g/L üre)

Besleme süresi (st)	Hacim (ml)
44	15
96	10
120	15
144	20
168	30
192	30
259	30

Çizelge 4.6 Yarı kesikli işletimde zaman aralığı ile TF giderim değişimi ( $TF_0=341$  mg/L (ZK2), 2.27 g/L üre)

Zaman aralığı (st)	%TF giderimi
0-44	83
45-96	80
97-120	71
121-144	62
145-168	28
169-192	16
193-259	16
260-288	-
289-306	20

Şekil 4.24’de ise tutuklanmış hücreler ile yarı kesikli işletilen, 341 mg/L  $TF_0$  derişimine sahip ZK ve 5 g/L amonyum sülfat içeren biyoyarıtım ortamında zamanla pH ve TF derişiminin değişimi karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.24 Azot kaynağı olarak amonyum sülfat ve %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış hücre içeren biyoarıtım ortamında zaman ile pH ve toplam fenol derişiminin değişimi (TF<sub>0</sub>=341 mg/L (ZK2), 5 g/L amonyum sülfat, 0.03 g yaş hücre/g pellet, T=30 °C, N=150 rpm, V<sub>0</sub>=100 ml)

Deney süresince ortama 6 kere besleme çözeltilisi ilave edilmiştir. Çizelge 4.7'de besleme çözeltilisi ekleme zaman ve miktarı, çizelge 4.8'de ise zamanla %TF giderim değerleri yer almaktadır.

Çizelge 4.7 Yarı kesikli işletilen erlen sistemde besleme çözeltilisinin ekleme zaman ve miktarları (TF<sub>0</sub>=341 mg/L (ZK2), 5 g/L amonyum sülfat)

Besleme süresi (st)	Hacim (ml)
75	10
97	15
121	20
145	30
169	20
193	30

Çizelge 4.8 Yarı kesikli işletimde zaman aralığı ile TF giderim değişimi ( $TF_0=341$  mg/L (ZK2), 5 g/L amonyum sülfat)

Zaman aralığı (st)	%TF giderimi
0-74	81
75-96	63
97-120	72
121-144	19
145-168	14
169-192	10
193-264	31

$TF_0=341$ mg/L derişimine sahip ve 2.27 g/L üre ile başlatılan biyoarıtımda en fazla toplam fenol giderimi 0-44 st.leri arasında %83; 5 g/L amonyum sülfatiçeren ortamla başlatılan biyoarıtımda ise 0-74 st.leri arasında %81 olarak elde edilmiştir.

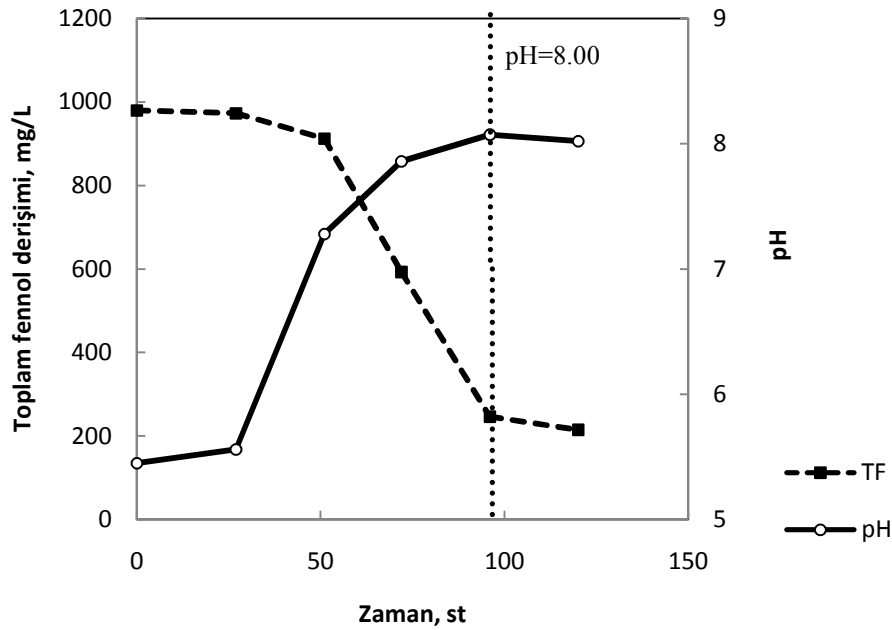
Yarı kesikli işletimler ile biyoarıtım süresince ( $t=306$  ve 264 st) zeytin karasuyu eklemesi nedeniyle zamanla toplam fenol giderimi azalmış ancak; bu şekilde daha fazla miktarda zeytin karasuyu arıtımı sağlanmıştır. Zamanla TF gideriminin azalmasının nedeni ara zamanlarda ortama seyreltilmemiş zeytin karasuyu beslenmesidir.

Bu işletim ile 2.27 g/L üre içeren ortamda yaklaşık 140 st'den sonra, 5 g/L amonyum sülfat içeren ortamda ise yaklaşık 120 st'den sonra biyoarıtımın sonlandırılabilceği görülmüştür. Ayrıca azot kaynağı olarak üre kullanılan biyoarıtımda %37 ( $t=306$  st), amonyum sülfat kullanılan biyoarıtımda ise %30 ( $t=264$  st) KOİ giderimi elde edilmiştir.

#### 4.3.3.3 Dolgulu kolon sistemde işletim

Kesikli ve yarı kesikli işletimin ardından daha büyük hacimde daha fazla zeytin karasuyu arıtmak amacıyla dolgulu kolon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Hücresel

aktivitenin göstergesi olan pH artarken toplam fenol giderimi sağlanmıştır. t=120 st süren biyoyarıtımda ilk 96 st geri döngü ile işletilen sistemde, ortam pH değeri 8.00'e ulaştığında bu değere set edilerek sürekli işleme geçilmiştir. Şekil 4.25'de kolon sistemde yapılan biyoyarıtımda tanktaki zamanla pH ve TF derişiminin karşılaştırmalı değışimi verilmiştir.



Şekil 4.25 %3 Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis*'in kullanıldığı kolon sistemde yapılan biyoyarıtımda tanktaki pH ve TF derişiminin zaman ile değışimi ( $TF_0=980$  mg/L (ZK3), 9.08 g/L üre,  $T= 30$  °C, 0.03 g yaş hücre/g pellet,  $V_T=500$  ml tank hacmi)

İlk 96 st geri döngü ile çalıştırılan sistemde %75 TF giderimi sağlanmıştır. pH değeri 8.00'e set edildikten sonra (t=96 st) ise ortama 200 ml santrifüjlenmiş ham ZK steril olarak beslenmiştir. Bu şekilde, biyoreaktörde  $V_T=700$  ml zeytin karasuyu artırılmıştır. Bu sistemde biyoyarıtım sonunda (t=120 st) %78 TF giderimi elde edilmiştir. Ortamda ölçülen katı madde miktarı t=120 st sonunda 3.88 g'dır. Ayrıca KOİ giderimi %19(t=120 st) olarak hesaplanmıştır.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Zeytin karasuyu, karmaşık fenol profili nedeniyle parçalanması zor bir substrattır. Yüksek kimyasal ve biyolojik oksijen ihtiyacı değerleri ve fitotoksik polifenollerin yüksek derişimi nedeniyle yüzeysel ve yeraltı suları için önemli bir kirlilik riski oluşturmaktadır. Zeytin karasuyunun, organik yükün azaltılmasında, fitotoksik etki gösteren polifenollerinin uzaklaştırılmasında ve koyu renginin giderilmesinde çeşitli mikroorganizmalar denenmiş; ancak uygulamaya yönelik istenilen özellikleri sağlayan mikroorganizma ve biyoproses henüz geliştirilememiştir.

Endüstriyel biyoproseslerde, mikroorganizma veya enzimlerin uygun bir materyal içine veya üzerine aktivitelerini koruyarak hapsedilmesi/tutuklanması ile hazırlanan tutuklanmış biyokatalizörlerin kullanımı tercih edilir. Tutuklama materyali ve yönteminin seçiminde ise kullanılan hücrenin ve biyoprosesin özellikleri ile kolay ve uygulanabilir olması önem taşımaktadır. Tutuklanmış hücreler birçok proste biyokatalizör olarak kullanılmalarna karşın, zeytin karasuyunun biyoarıtımında endüstriyel kullanımı olmadığı gibi, literatürde de konu ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır.

### 5.1 *R. glutinis*'in Farklı Özellikteki Materyallere Uygun Yöntemler ile Tutuklanması

Hapsetme veya fiziksel adsorpsiyon yöntemleri ile *R. glutinis*; Ca-aljinat pelletleri, öğütölmüş zeytin çekirdeği, agar, poliüretan köpük ve zeolite tutuklanmıştır. Agar, poliüretan köpük ve zeolitin tutuklama materyali olarak kullanıldığı çalışmalarda sorunlarla karşılaşmıştır. Agara hapsetmede pelletlere küresel şekil verilememiş ve agarın kullanıldığı biyoarıtım ortamında zamanla köpürme meydana gelmiştir. Poliüretan köpük ve zeolit ile tutuklama işleminde ise tutuklanmış hücre miktarı belirlenememiş ve tutuklama işleminin ardından aktarıldıkları biyoarıtım ortamlarında tutuklama materyalinden hücre desorpsiyonunun fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca poliüretan köpüğün kullanıldığı biyoarıtım ortamlarında 48 st'den sonra köpükte şekilsel deformasyonlar; zeolitin kullanıldığı ortamlarda ise zeytin karasuyunun bulanık hale geldiği gözlenmiştir (EK 6).



Çalışmada kullanılan tutuklama materyallerinden bir diğeri öğütölmüş zeytin çekirdeğidir. Zeytin karasuyunun oluştuğı prosesin bir diğeri atığının biyoarıtımda değeriendirilmesi amacıyla seçilen zeytin çekirdekleri, lignoselülozik yapıda, gözenekli ve mekanik dayanımı yüksek bir materyaldir. Ayrıca, zeytin karasuyunun biyoarıtımında karşılaşılan geniş pH aralığında (pH= 4-9) dayanıklı olması önemli bir avantajdır. Biyoarıtımda farklı başlangıç toplam fenol derişimi ve karıştırma hızlarında çalışılmıştır. Kesikli işletim ile karıştırmalı ve geri döngölü sistemlerde gerçekleştirilen biyoarıtımlarda, döngü yapılan dolgulu kolonda daha kısa sürede aynı biyoarıtım değerinin sağlandığı belirlenmiştir. Zeytin çekirdeğine tutuklanmış *R. glutinis* ile ulaşılan en yüksek toplam fenol giderim değeri %69'dur. Ancak zeytin çekirdeğine tutuklanmış hücre miktarının belirlenememesi ve hücre sızmasının kolon sistemde daha az olmakla beraber yapılan tüm biyoarıtımlarda önemli derecede olması nedeniyle zeytin çekirdekleri ile tutuklama ve biyoarıtım çalışmaları sonlandırılmıştır.

*Rhodotorula glutinis*'in tutuklandığı bir diğeri materyal ise Ca-aljinat jelidir. Ca-aljinat jeli; tutuklama yönteminin basitliği, ılımlı koşullarda gerçekleşmesi ve hücrelere zarar vermemesi nedeniyle tutuklama işleminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılacak olan tutuklama materyalinin zeytin karasuyuna dayanıklı olması; ayrıca biyoarıtım süresince ortam pH değeri arttığı için geniş pH aralığında (pH=4-9) da kararlı bir yapıya sahip olması gerekmektedir. Literatürde öncelikle Ca-aljinat pelletleri ile çalışılması gereken pH aralığına bakılmış; ancak bununla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, pelletlerin zeytin karasuyuna dayanımını gözleyebilmek üzere ön denemeler yapılmıştır. Bunun için, santrifüjlenmiş ham ZK (pH=4.42) ve pH değeri yaklaşık 10 civarına getirilen (NaOH ile) ham ZK kullanılmıştır. Hazırlanan boş pelletler, her iki ortama konulmuş ve T=30 °C ve N=150 rpm'de çalışan çalkalamalı hava banyosunda 7 gün boyunca bekletilmiştir. Bu süre sonunda her iki ortamda da pelletlerin yapısında bir deformasyon gözlenmemiş, sadece başlangıçta hazırlanan pelletlerin daha sert olduğu, sıvı ortamda bekletildikten sonra ise daha yumuşak olduğu gözlenmiştir. Buna göre, Ca-aljinat pelletleri ile geniş pH aralığında çalışılabileceği sonucuna varılmıştır.

## 5.2 Ca-aljinat Pelletlerine Tutuklanmış *R. glutinis* ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımında Uygun Kullanım Koşullarının Araştırılması

Pellet çapının biyoarıtıma etkisinin incelendiği çalışmada, farklı çaplarda ( $D_p= 2, 3$  ve  $4$  mm) oluşturulan küresel pelletler zeytin karasuyu biyoarıtımında kullanılmış ve biyoarıtım üzerine önemli bir etkisi gözlenmemiştir. Bu sonuç, pellet içinde önemli bir difüzyon direncinin olmadığını göstermektedir.

Na-aljinat derişiminin artırılmasıyla pelletlerin yapısı güçlendirilebilir. Bu amaçla, farklı derişimlerde Na-aljinat çözeltileri (%1.5, 2, 3 ve 4) kullanılarak Ca-aljinat pelletleri hazırlanmış; yüksek derişimde Na-aljinat çözeltisi ile daha dayanıklı pelletler oluşturulduğu gözlenmiştir. Bu nedenle biyoarıtımlar, %3 ve 4 (a/h) Na-aljinat çözeltileri kullanılarak hazırlanmış pelletler ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca %3 ve 4 Na-aljinat çözeltileri ile hazırlanan Ca-aljinat pelletleri hücre sızması bakımından da karşılaştırılmıştır. %3 ve 4 Na-aljinat çözeltileri kullanıldığında biyoarıtım sonunda ( $t=163$  st) sırasıyla 0.15 g ve 0.11 g çöken katı madde miktarı elde edilmiştir. Hem toplam fenol giderimi hem de sızma açısından önemli bir fark gözlenmemesi nedeniyle ileri biyoarıtımlarda kütle aktarım kısıtlamalarını azaltabilmek amacıyla %3 Na-aljinat çözeltisi kullanılmıştır.

Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış hücreler başlangıçta pelletlerin içinde ve/veya yüzeyinde homojen olarak dağılırken ilerleyen zamanlarda besin elementlerince zengin olan yüzeye yakın kısımlarda hücrelerin çoğalması nedeniyle hücre sayısı artmakta ve bir kısmı fermentasyon ortamına sızmaktadır. Pelletlerin üzerinde ve yüzeye yakın kısımlarda çoğalan hücreler pelletlerden kolayca ortama geçmekte ve bu yolla oluşan hücre sızması; jel matrisin mekanik dayanıklılığı, gözenek büyüklüğü gibi fiziksel özelliğine, mikroorganizma türüne, başlangıç hücre derişimine ve ortam koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Göksungur ve Güvenç 2002).

0.03 g yaş hücre/g pellet ve  $N=200$  rpm'de gerçekleştirilen çalışmada, pelletlerde parçalanma gözlenmemesine karşın hücre miktarı artırılarak (0.7 g yaş hücre/g pellet) aynı karıştırma hızında yapılan deneyde ise pelletler tamamen dağılmıştır. Pellet içerisine hapsedilen hücre miktarının artmasıyla pellet yapısının daha kolay bozulduğu,

ayrıca pelletlerden biyoyarıtım ortamına hücre difüzyonun da daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu durum, hücre sızmasının başlangıç hücre derişimine bağı olduğunu doğrulamaktadır.

Ca-aljinat pelletlerinden hücre sızmasını engellemek amacıyla glutaraldehit ile çapraz bağlama yöntemi denenmiş; pelletler çalkalamalı sistemde (N=150 rpm, T=10 °C, 10 dk) %0.5 ve %1 GA çözeltileri ile muamele edilmiştir. Her iki ortamda da hücresel aktivite gözlenmemiştir. Bu durumun üstesinden gelebilmek için GA derişiminin azaltılması veya 10 dk olarak uygulanan çalkalama süresinin kısaltılması ile çapraz bağlama işlemi denenebilir. Ayrıca %0.5 GA çözeltisi ile muamele edilen Ca-aljinat pelletlerinde az da olsa parçalanma gözlenirken; %1 GA çözeltisi ile muamele edilen pelletler tamamen parçalanmıştır. Benzer bulgular literatürde de yer almaktadır.

Cheetnam vd. (1979), Ca-aljinat pelletlerinin %0.01 (a/h) kloramfenikol çözeltisi içerisinde çalkalanması sonucunda %85 oranında; %0.01 glutaraldehit ile muamelesi sonucunda ise hücre sızıntısının %50-65 oranında azaltılabileceğini, ancak her iki durumda da hücre canlılığında önemli azalmalar olduğunu belirlemişlerdir. Boyaval ve Goulet (1988), elde ettikleri Ca-aljinat pelletlerini polietilenimin ile muamele ettiklerinde, hücre kaybının azalmadığını ve pelletlerde büzüşme meydana geldiğini belirtmişlerdir. Pelletlerin GA çözeltisinde tutularak hücre sızıntısının engellenmesinin ise hücrelerin hemen hemen tamamını öldürdüğünü belirlemişlerdir. Hücrelerin canlılığının zarar görmesi nedeniyle başarılı sonuçlar elde edilememiş ve bazı araştırmacılar Ca-aljinat pelletlerinin dışını kaplayarak hücre sızıntısını engellenmesi üzerine çalışmalar yapmıştır. Vorlop vd. (1987), Ca-aljinat pelletleri oluştuktan sonra dış yüzeyini hücre içermeyen bir aljinat tabakası ile kaplayarak pelletlerden hücre kaybını engellemeye çalışmışlardır. Tanaka vd. (1986), *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerini iki tabakalı aljinat lifi içerisinde tutuklayarak hücre sızıntısını engellemişlerdir. Bu sistemde içte bulunan tabaka hücreleri hapsederken dış aljinat tabakası ise hücre sızmasını önlemiştir.

Ca-aljinat pelletlerinin tutuklama materyali olarak kullanılmasındaki problemlerden biri  $Mg^{2+}$ ,  $K^{+}$  gibi bazı katyonların kalsiyum aljinat yapısındaki kalsiyum iyonları ile yer

değiştirmesi ve aljinata bağlanarak jelin parçalanarak dağılmasına neden olmasındır (Chetthamvd. 1979). Bu durum, ortamda  $Ca^{2+}$  iyonunun bulundurulması ile önlenebilir. Üç fazlı santrifüj sistem ile elde edilen zeytin karasuyunun yapısında da  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $K^+$  gibi katyonların bulunduğu bilinmektedir (Niaounakis ve Halvadakis 2006). Bu çalışmada, Ca-aljinat pelletlerinin parçalanarak dağılmasını önlemek amacıyla biyoarıtım ortamlarına 0.005 M  $CaCO_3$  ve  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  eklenmiştir.  $Ca^{2+}$  iyonu içermeyen paralel yürütölen kontrol ortamında 3x48 st sonra pelletlerde gözle görölür dağılma varken  $Ca^{2+}$  iyonu bulunan biyoarıtım ortamlarında 5x48 st sonuna kadar dağılma gözlenmemiştir. Guoqiangvd. (1991), Ca-aljinata tutuklanmış *L. casei* hücreleri ile glukozdan laktik asit üretiminde oluşun laktik asitin kalsiyumu bağlayarak pelletleri parçaladığını gözlemlemişler; ancak fermentasyon sırasında ortamda  $CaCO_3$  bulundurarak bu sorunu çözmüşlerdir. Gilson ve Thomas (1995), Ca-aljinata tutuklanmış *S. cerevisiae* ile etil alkol üretiminde fermentasyon sıvısına %56  $CaCl_2$  ilave ederek pelletlerin parçalanmasını engellemişlerdir.

Fenolik bileşikler mikroorganizma çoğalmasına inhibisyon etkisi yapabileceği için, zeytin karasuyunun biyoarıtımında seyreltilmeden kullanılabilceğinin gösterilmesi önemlidir. Bu nedenle, çalışmada farklı derişimlerde ZK ile çalışılmıştır. Başlangıç toplam fenol derişiminin etkisinin incelendiği deney grubunda, biyoarıtımlar farklı yüzdelerde seyreltilerek;  $TF_0=390, 800, 1042$  ve  $1187$  mg/L olan zeytin karasuyu ile gerçekteştirilmiştir. Başlangıç fenol derişiminin artması ile fenol giderim hızı artmıştır. Ancak uzun süre gerçekteştirilen biyoarıtımlar sonucunda tüm biyoarıtım ortamlarında yaklaşık aynı fenol gideriminin (%83-87) sağlanabileceği görölmüştür. Biyoarıtımlarda ilk 48 st içinde fenol giderim hızında ve derecesinde de önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu sonuç, Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis* hücreleri ile seyreltilmemiş zeytin karasuyu biyoarıtımının başarılı bir şekilde gerçekteştirildiğini göstermiştir. Ahmadi vd. (2006) “loofa” üzerine tutuklanmış *Phanerochaetechrysosporium*'u zeytin karasuyu biyoarıtımında kullanmışlardır. Çalışmada kullanılan karasu seyreltilmediği takdirde hüresel aktivite gözlenmemiş, bu nedenle zeytin karasuyu hacimce %20, 30 ve 50 olarak seyreltilmiş ve başlangıç toplam fenol değerleri 1200, 1800 ve 3000 mg/L olarak ölçölmüştür. 5 gün süren biyoarıtımlarda sırasıyla %80, 90 ve 60 TF giderimi sağlanmıştır.

Tutuklanmış hücre miktarının artırılmasıyla birlikte daha hızlı toplam fenol giderimi sağlanabileceği düşünülmüş ve bu amaçla ilk çalışmalarda 0.03 g yaş hücre/g pellet olan hücre miktarı artırılarak 0.07, 0.18 ve 0.7 g yaş hücre/g pellet değerleri ile de çalışılmıştır. En yüksek yaş hücre miktarı ile gerçekleştirilen bu biyoarıtımda daha hızlı fenol giderimi sağlanarak ilk 24 st sonunda %55 toplam fenol giderimi elde edilmiştir. 0.03, 0.07 ve 0.18 g yaş hücre/g pellet değerlerinde ise ilk 24 st sonunda sırasıyla %25, 31 ve 42 toplam fenol giderimi sağlanmıştır. Bu, hücre miktarının artması ile daha hızlı fenol giderimi sağlandığını göstermektedir.

Tutuklanmış hücreler ile çalışılan sistemlerde karıştırma hızı kütle aktarımını etkileyen önemli bir parametredir. Bu çalışmada da, karıştırma hızının incelendiği deney grubunda, N=150, 200 ve 250 rpm değerlerinde çalışılmıştır. N=250 rpm'de gerçekleştirilen biyoarıtımlarda Ca-aljinat pelletleri parçalanırken, N=150 ve 200 rpm'de pellet yapısında deformasyon olmamıştır. t=96 st süren biyoarıtımlarda, N=150 ve 200 rpm için sırasıyla %79 ve %84 TF giderimi elde edilmiştir. Karıştırma hızının artışı ile birlikte kütle aktarım kısıtlamaları azaldığı için daha kısa sürede daha fazla toplam fenol giderimi sağlandığı sonucuna varılmıştır.

Biyoarıtım ortamına eklenen azot kaynağı da hücrelerin yaşaması için önemli bir parametredir. Bu çalışmada, azot kaynağı olarak amonyum sülfat ve üre kullanılmıştır. Üre içeren ortamda, aynı miktarda azot içeren amonyum sülfat ortamına göre daha yüksek hızda fenol giderimi sağlanmış; ancak yeterince uzun süre sonunda önemli bir etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca amonyum sülfat kullanımı sonucunda biyoarıtım ortamında çöken katı madde miktarı da daha azdır; ancak yüksek başlangıç toplam fenol derişimine sahip zeytin karasuyu ile yapılan biyoarıtımlarda amonyum sülfat varlığında hücrel aktivite gözlenmemiştir. Bu nedenle biyoarıtım deneylerinde azot kaynağı olarak üre kullanılmıştır. Serbest *R. glutinis* hücreleri ile laboratuvarımızda gerçekleştirilen bir diğer çalışmada; azot kaynağı olarak amonyum nitrat, amonyum sülfat ve üre kullanılmış olup her üç azot kaynağının da arıtımda kullanılabileceği gösterilmiştir. Üre, amonyum nitrat ve amonyum sülfat varlığındaki biyoarıtımların sonunda TF derişiminde sırasıyla %87, 86 ve 82 azalma elde edilmiştir. Bu sonuçlar, azot kaynağı olarak biyoarıtım ortamında üre varlığında daha kısa sürede pH artışı

sağladığını ve TF gideriminde daha etkin olduğunu göstermektedir (Karakaya vd. 2012).

### **5.3 Ca-aljinat Pelletlerine Tutuklanmış *R. glutinis* ile Biyoproses İşletim Türü Etkisi**

Tutuklama işlemi, hazırlanan pelletlere arka arkaya veya sürekli reaktörlerde kullanım imkanı sunar. Pelletlerin ardışık kullanımını incelemek amacıyla  $TF_0=1049$  mg/L olan ZK ile 9.08 g/L üre içeren ve 0.03 g yaş hücre/g pellet koşullarında gerçekleştirilen biyoarıtımda, hücreler her 48 st sonunda steril olarak süzülüp aynı bileşime sahip taze biyoarıtım ortamına alınmıştır. Böylece pelletler ardışık olarak 3 kez kullanılmıştır ve biyoarıtım sonunda ( $t=3 \times 48$  st) pelletler parçalanmıştır. Ardışık 3 kullanım için sırasıyla %63, 60 ve 66 toplam fenol giderimi elde edilmiştir. Hücre sızması, ortamda  $Ca^{2+}$  iyonu bulundurulmuş önlenmiştir. Bu şekilde aynı pellet arka arkaya 5x48 st deforme olmadan ve çok fazla aktivite kaybı olmadan kullanılabilmişlerdir. D'Annibale vd.(1998), poliüretan köpük üzerine tutuklanmış *Lentinula edodes* ile herbiri 8 gün süren ardışık üç kesikli işletimde kullanmışlardır. Sakkaroz, maya özütü ve Tween 80 ile desteklenen zeytin karasuyuna alınan hücreler ile üç işletim için sırasıyla %83.5, %88.5 ve %78 toplam fenol giderimi sağlanmıştır.

Çalışmada kesikli işletimden farklı olarak, fazla miktarda karasu arıtmak amacıyla yarı kesikli işletim türü de denenmiştir. Bu deney grubunda,  $TF_0= 341$  mg/L olan ZK ile birlikte azot kaynağı olarak üre (2.27 g/L) ve amonyum sülfat (5 g/L) ayrı ayrı kullanılmıştır. Üre içeren biyoarıtım ortamında en fazla toplam fenol giderimi 0-44 st.leri arasında %83; amonyum sülfat içeren ortamda ise 0-74 st.leri arasında %81 olarak elde edilmiştir. Üre kullanılan ortamda amonyum sülfata göre daha kısa sürede daha fazla toplam fenol giderimi sağlanmıştır. Üre ve amonyum sülfat varlığında yapılan yarı kesikli biyoarıtımlarda sırasıyla 250 ml ( $t=360$  st) ve 225 ml ( $t=264$  st) zeytin karasuyu arıtılmıştır. Yarı kesikli işletimler ile seyreltilmemiş zeytin karasuyu beslenmesi nedeniyle zamanla toplam fenol giderimi azalmış ancak; bu şekilde daha fazla miktarda zeytin karasuyu arıtımı sağlanmıştır. Gonçalves vd. (2012), *Candida cylindracea* CBS 7869, *Candida rugosa* CBS 2275 ve *Yarrowia lipolytica* W29 kullanarak kesikli ve yarı kesikli işletimlerle hem zeytin karasuyu biyoarıtımı hem de

lipaz üretimi üzerine çalışmışlardır. Kullanılan zeytin karasuyunun başlangıç KOİ ve toplam fenol derişimi sırasıyla 261 g/L ve 7.9 g/L'dir. *C. cylindracea* CBS 7869, *C. rugosa* CBS 2275 ve *Y. lipolytica* W29 ile sırasıyla %4, 27 ve 1 fenol giderimi ve %50'den fazla KOİ giderimi elde edilmiştir. Lipaz üretiminin yanısıra yarı kesikli işletim ile karasuyun organik yükünün önemli derecede azaltıldığını da belirtmişlerdir.

Çalışmada, dolgulu kolon kullanılarak fazla miktarda zeytin karasuyu biyoarıtımı amaçlanmıştır. t=120 st süren biyoarıtımda ilk 96 st geri döngü ile işletilen sistemde, ortam pH değeri 8.00'e ulaştığında bu değere set edilerek sürekli işleme geçilmiştir. İlk 96 st geri döngü ile çalıştırılan sistemde %75 TF giderimi sağlanmıştır. pH değeri 8.00'e set edildikten sonra (t=96 st) ise ortama 200 ml santrifüjlenmiş ham ZK steril olarak beslenmiştir. Bu şekilde, biyoreaktörde  $V_T=700$  ml zeytin karasuyu arıtılmıştır. Bu sistemde biyoarıtım sonunda (t=120 st) %78 TF giderimi elde edilmiştir. Bu sonuçlar, yatışkın koşullar sağlanarak işletilecek bir dolgulu kolon sistemin ZK biyoarıtımda kullanım potansiyelinin olduğu göstermektedir. Literatürde ise Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış mikroorganizma ile zeytin karasuyu biyoarıtımında kolon sistemde gerçekleştirilen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, Ca-aljinat pelletlerine tutuklanmış *R. glutinis* ile gerçekleştirilen biyoarıtımlarda en yüksek toplam fenol giderimi kesikli işletimde  $TF_0=1068$  mg/L (seyreltilmemiş ZK), N=200 rpm, 0.03 g yaş hücre/g pellet, T=30 °C koşullarında t= 96 st de %84 olarak elde edilmiştir. Ayrıca bu biyoarıtımda %22 KOİ giderimi sağlanmıştır. Yarı kesikli işletim ile üre varlığında kesikli işleme göre daha fazla miktarda (250 ml) zeytin karasuyu arıtılmıştır. Kolon sistemde ise 700 ml zeytin karasuyu 120 st'de %78 toplam fenol giderimi ile kullanılabilmiştir. Çalışma süresince *R. glutinis*, zeytin karasuyundaki fenolik bileşenleri parçalayarak yüksek toplam fenol giderimi sağlamıştır. Ancak KOİ giderimi fenol giderimi kadar yüksek değildir. Bu çalışma, endüstriyel ölçüğe uygulandığı zaman arıtılacak zeytin karasuyu miktarı fazla olacağı için sürekli işletim ile ileri biyoarıtımlar gerçekleştirilmelidir.

## KAYNAKLAR

- Ahmadi, M., Vahabzadeh, F., Bonakdarpour, B., Mehranian, M. and Mofarrah, E. 2006. Phenolic removal in olive oil mill wastewater using loofah-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 22; 119-127.
- Amaral, C., Lucas, M.S., Sampaio, A., Peres, J.A., Dias, A.A., Peixoto, F., Anjos, M.R. and Pais, C. 2012. Biodegradation of olive mill wastewaters by a wild isolate of *Candida oleophila*. International Biodeterioration & Biodegradation, 68; 45-50.
- Amhajji, A., Faid M. and Elyachioui M. 2005. A process for the treatment of olive mill waste waters by immobilized cells. Grasas y Aceites, 56 (2); 121-124.
- Anonim. 2000. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü. 522 s., Ankara.
- Anonim. 2003. Zeytin Karasuyu Arıtım Projesi D.E.Ü. Çevre Mühendisliği Bölümü, 94 s., İzmir.
- Anonymous. 2011. Web sitesi: [http://www.internationaloliveoil.org/production1\\_ang](http://www.internationaloliveoil.org/production1_ang). Erişim Tarihi: 19.08.2011.
- Anonymous.2011.Web sitesi:[http://www.internationaloliveoil.org/production2\\_ang](http://www.internationaloliveoil.org/production2_ang). Erişim Tarihi: 19.08.2011.
- Anonymous.1999. APHA-AWWA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20<sup>th</sup> edition.American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- Ayed, L., Asass, N., Sayadi, S.and Hamdi, M. 2005. Involvement of Lignin Peroxidase in The Decolourization of Black Olive Mill Wastewaters by *Geotrichum candidum*. Letters in Applied Microbiology, 40(1); 7-11.
- Azbar, N., Bayram, A., Filibeli, A., Muezzinoglu, A., Sengul, F. and Ozer, A. 2004. A Review of Waste Management Options in Olive Oil Production. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 34 (3); 209-247.



- Bilton, R.F. and Cain, R.B. 1968. The metabolism of aromatic acids by microorganisms. A reassessment of the role of o-benzoquinone as a product of protocatechuate metabolism by fungi. *Biochem. J.*, 108; 829-832.
- Bleve, G., Lezzi, G., Chiriatti M.A., D'Ostuni, I., Tristezza, M., Di Venere D., Sergio, L., Mita, G. and Grieco, F. 2011. Selection of non-conventional yeasts and their use in immobilized form for the bioremediation of olive oil mill wastewaters. *Bioresource Technology*, 102; 982-989.
- Borja, R., Rinco'n, B. and Raposo, F. 2006. Anaerobic biodegradation of two-phase olive mill solid wastes and liquid effluents: kinetic studies and process performance. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 81; 1450-1462.
- Boyaval, P. and Goulet, J. 1988. Optimal conditions for production of lactic acid from cheese whey permeate by Ca-alginate-entrapped *Lactobacillus helveticus*, *Enzyme Microb. Technol.*, 10 (12); 725-728.
- Cain, R.B., Bilton, R.F. and Darrah, J.A. 1968. The metabolism of aromatic acids by microorganisms. Metabolic pathways in the fungi. *Biochem. J.*, 108; 797-828.
- Cerrone, F., Barghini, P., Pesciaroli, C. and Fenice, M. 2011. Efficient removal of pollutants from olive washing wastewater in bubble-column bioreactor by *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 84; 54-259.
- Cheetham, P.S.J., Blunt, K.W. and Bucke, C. 1979. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels, *Biotechnol. Bioeng.*, 21; 2155-2168.
- D'Annibale, A., Crestini, C., Vinciguerra, V. and Sermanni, G.G. 1998. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology*, 61; 209-218.
- Ettayebi, K., Errachidi, F., Jamai, L., Tahri-Jouti, M.A., Sendide, K. and Ettayebi, M. 2003. Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. *FEMS Microbiology Letters*, 223; 215-219.
- Faber, K. 2011. *Biotransformations in Organic Chemistry*. Springer, 6<sup>th</sup> Ed., 423, London.
- Gilson, C.D. and Thomas, A. 1995. Ethanol production by alginate immobilised yeast in a fluidised bed bioreactor, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 62; 38-45.

- Gonçalves, C., Lopes, M., Aguedo, M. and Belo, I. 2009. Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresource Technology*, 100; 3759-3763.
- Gonçalves, C., Lopes, M., Alves, M. and Belo, I. 2007. Use of olive mill wastewater by lipolytic yeasts. *J Biotechnol Abstract*, 86; 179.
- Gonçalves, C., Oliveira, F., Pereira, C. and Belo, I. 2012. Fed-batch fermentation of olive mill wastewaters for lipase production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 87; 1215-1218.
- Göksungur, Y., Güvenç, U. 2002. Kalsiyum aljinatta hücre immobilizasyonu ve biyoteknolojideki uygulamaları. *E.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü*, 27(6); 511-518, İzmir.
- Guoqiang, D., Kaul, R. and Mattiasson, B. 1991. Evaluation of alginate-immobilized *Lactobacillus caesi* for lactate production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36 (3); 309-314.
- Gupta, J.K., Jebsen, C. and Kneifel, H. 1986. Sinapic acid degradation by the yeast *Rhodotorula glutinis*. *J. Gen. Microbiol.*, 132; 2793-2799.
- Jarboui, R. Baati H, Fetoui F, Gargouri A, Gharsallah N. and Ammar E. 2012. Yeast performance in wastewater treatment: case study of *Rhodotorula mucilaginosa*. *Environ Technol.*, 33 (7-9); 951-60.
- Karakaya, A., Laleli Y. and Takaç S. 2012. Development of process conditions for biodegradation of raw olive mill wastewater by *Rhodotorula glutinis*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 75; 75-82.
- Katayama-Hirayama, K., Tobita, S. and Hirayama, K. 1991a. Metabolic pathway of phenol in *Rhodotorula rubra*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 37; 379-388.
- Katayama-Hirayama, K., Tobita, S. and Hirayama, K. 1991b. Degradation of phenol by yeast *Rhodotorula*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 37; 147-156.
- Kurbanoglu, E.B., Zilbeyaz, K., Ozdal, M., Taskin, M. and Kurbanoglu, N.I. 2010a. Asymmetric reduction of substituted acetophenones using once immobilized *Rhodotorula glutinis* cells. *Bioresource Technology*, 101; 3825-3829.
- Kurbanoglu, E.B., Zilbeyaz, K., Ozdal, M., Taskin, M., Kurbanoglu, N.I. and Algur, O.F. 2010b. Continuous production of (S)- 1-phenylethanol by immobilized

- cells of *Rhodotorula glutinis* with a specially designed process. *Tetrahedron: Asymmetry*, 21; 461-464.
- Lopes, M., Araujo, C., Aguedo, M., Gomes, N., Gonçalves G., Teixeira, J.A. and Belo, I., 2008. The use of olive mill wastewater by wild type *Yarrowia lipolytica* strains: medium supplementation and surfactant presence effect. *J Chem Technol Biotechnol.*, 84; 533-537.
- Malisorn, C. and Suntornsuk W. 2008. Optimization of  $\beta$ -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology*, 99; 2281-2287.
- McNamara, C.J., Anastasiou, C.C., O'Flaherty, V. and Mitchell, R. 2008. Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration&Biodegradation*, 61; 127-134.
- Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A. and Russell, N.J. 2009. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 82; 25-39.
- Neifar, M., Jaouani, A., Martínez, M.J. and Penninckx, M.J. 2012. Comparative Study of Olive Oil Mill Wastewater Treatment Using Free and Immobilized *Corioloropsis polyzona* and *Pycnoporus coccineus*. *The Journal of Microbiology*, 50 (5); 746-753.
- Niaounakis, M. and Halvadakis, C.P. 2006. Olive Processing Waste Management Literature Review and Patent Survey. Second ed., Waste Management Series. Volume 5, Elsevier B.V., p. 14; 23-64.
- Roig, A., Cayuela, M.L. and Sanchez-Monedero, M.A. 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26, 960-969.
- Scioli, C. and Vollaro, L. 1997. The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Wat. Res.*, 31(10); 2520-2524.
- Singh, H. 2006. *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*, Wiley Interscience pp. 53-61.
- Takaç, S. and Karakaya, A. 2009. Recovery of Phenolic Antioxidants from Olive Mill Wastewater. *Recent Patanets on Chemical Engineering*, 2; 230-237.

- Tanaka, H., Kurosawa, H. and Murakami, H. 1986. Ethanol production from starch by a coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*, *Biotechnol. Bioeng.*, 28; 1761-1768.
- Vorlop, K.D., Steinert, H.J. and Klein, J. 1987. Cell immobilization within coated alginate beads or hollow fibers formed by ionotropic gelation-preventing cell grow out, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 501; 339-342.
- Yesilada, O., Sik, S. and Sam, M. 1998. Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14; 37-42.

## **EKLER**

**EK 1** Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler

**EK 2** Çalışmada Kullanılan Cihazlar

**EK 3** Toplam Fenol Derişimi Kalibrasyon Doğrusu ve Analizlerin Doğruluğu

**EK 4** Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Analizlerinin Doğruluğu

**EK 5** Yaş-Kuru Hücre Kalibrasyon Grafiği

**EK 6** Agar, Poliüretan Köpük ve Zeolit Kullanılan Biyoarıtım Ortamlarının Fotoğrafı

**EK 1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler**

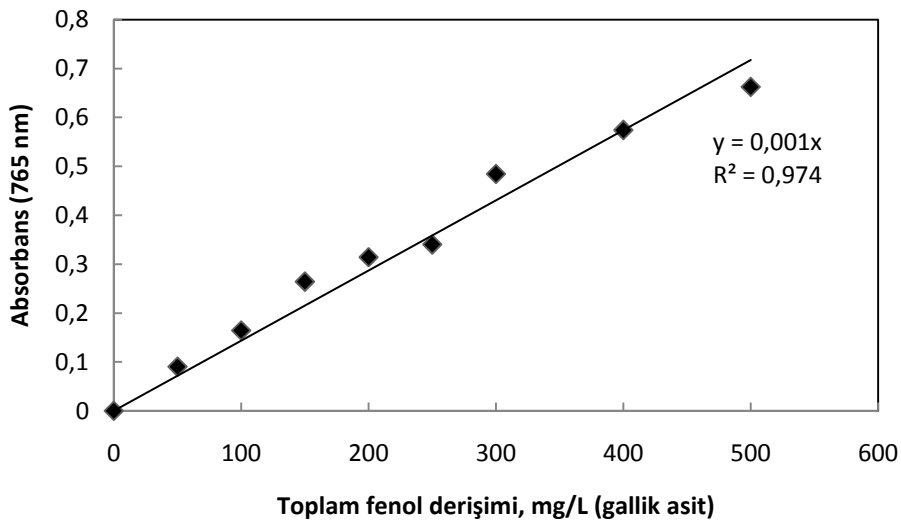
<b>Kimyasal</b>	<b>Firma</b>	<b>Katalog No</b>
Agar	Applichem	A0949
Aljinik asit sodyum tuzu	Sigma	180947
Amonyum demir (II) sülfat hekzahidrat	Merck	103791
Amonyum sülfat	Sigma	A4915
Civa (II) sülfat	Merck	104481
Etanol	Riedel de Haen	32221
Etil asetat	Sigma	27227
Ferroyin indikatör çözeltisi	Merck	109161
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma	F9252
Gallik asit	Sigma	G7384
Glukoz monohidrat	Applichem	A1349
Glutaraldehit çözeltisi	Sigma-Aldrich	G7651
Gümüş sülfat	Merck	101534
Hidroklorik asit	Sigma	32221
Kalsiyum klorür dihidrat	Applichem	A4689
KOİ referans çözeltisi	Hach	22539-29
Malt özütü	Fluka	70167
Maya özütü	Fluka	70161
Pepton	Fluka	70171
Potasyum dikromat	Merck	104864
Sodyum bikarbonat anhidroz	Scharlau	SO0116
Üre	Merck	108488

## EK 2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

<b>Cihaz</b>	<b>Model</b>
Laminer Akış Kabini	Biolab Faster BHG 2004-S
Sterilizatör	ALP CL-40M
Çalkalamalı Hava Banyosu	Edmund Bühler TH 30; Shel Lab S16R-2
Biyoreaktör	Sartorius Biostat B plus Twin
HPLC	Waters Alliance
UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu UV-1601
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Rotina 35 R
Döner Buharlaştırıcı	Heidolph
Terazi	Mettler AB54-S; Scaltec
pHmetre	Sartorius PP25
Ultrasaf Su Cihazı	Millipore
Etüv; Kurutucu	Friocell 222; Zhichang- ZRD 5110
KOİ Termoreaktör	Wise Therm

### EK 3 Toplam Fenol Derişimi Kalibrasyon Doğrusu ve Analizlerin Doğruluğu

Zeytin karasuyu örneklerine ait toplam fenol derişimleri gallik asit eşdeğeri (mg/L) olarak hesaplanmıştır. Gallik asitin etil alkol çözeltisi içinde hazırlanan farklı derişimleri ile çizilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi şekil 1’de verilmiştir. Kalibrasyon doğrusu hazırlanırken ve örnekler analizlenirken üç paralel analiz yapılarak ortalamaları alınmıştır.



Şekil 1 Toplam fenol derişimi hesabında kullanılan kalibrasyon grafiği

Toplam fenol derişim ölçümünde analizlerin doğruluğunu belirlemek üzere yapılan denemelerde, gallik asitin etil alkol çözeltisi içinde hazırlanan 300 mg/L derişimine sahip çözeltisi kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak; 8 ayrı tüpe 5’er ml çözelti konulmuş, daha sonra Bölüm 3.3.2’de anlatıldığı şekilde ekstraksiyon ve Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenol derişim ölçümü yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak şekil 1’de verilen grafiğe göre TF derişimi bulunmuştur.



Çizelge 1'deki veriler eşitlik EK 3.1'e uygulandığında, toplam fenol tayini yönteminin standart sapması 7.44 olarak bulunmuştur. Bulunan standart sapma değeri (S), toplam fenol derişimine ait değerlerin ortalamasının % 2.39'na karşılık gelmektedir.

Çizelge1 Toplam fenol tayini yöntemine ait standart sapma değerinin hesaplanması

$x_i$ (mg/L)	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
315	4	16
325	14	196
301	-10	100
310	-1	1
311	0	0
307	-4	16
313	2	4

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x_{ort})^2}{n-1}} \quad (\text{EK 3.1})$$

Burada:

S= standart sapma

$x_i$ = örneğe ait değer

$x_{ort}$ = örneklere ait ortalama değer

n= örnek sayısı

#### **EK 4 Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Analizlerinin Doğruluğu**

Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) analizleristandard APHA-5220C yöntemine göre ölçülmüştür (APHA 1999). KOİ ölçümünde analizlerin doğruluğunu belirlemek üzere yapılan denemelerde ticari olarak sağlanan KOİ referans çözeltisi (1000 mg O<sub>2</sub>/L) 4 kat seyreltilerek kullanılmış ve 10 paralel deneme yürütülmüştür. Çizelge 2’de örneklerin eşitlik 3.2 yardımıyla hesaplanan KOİ değerleri verilmiştir. Bulunan standart sapma değeri KOİ derişimlerinin %10’udur.

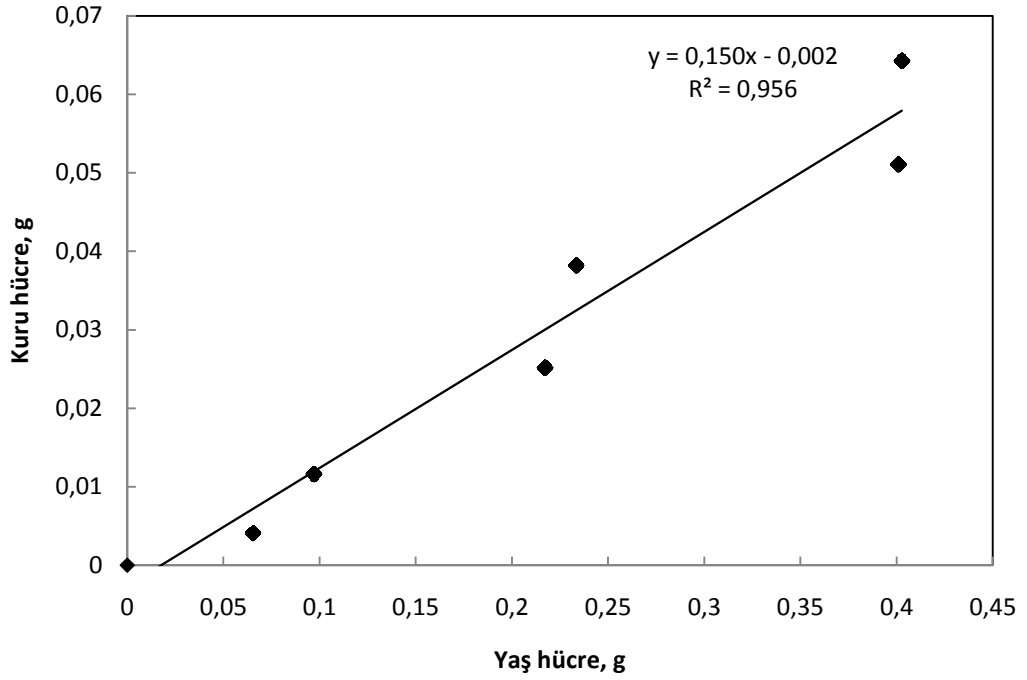
Çizelge 2 Örneklerin KOİ değerleri

<b>Örnek</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
(mg O <sub>2</sub> /L)	281	264	303	316*	286	267	301	292	273	258

\*Hesaplamaya alınmayan değer

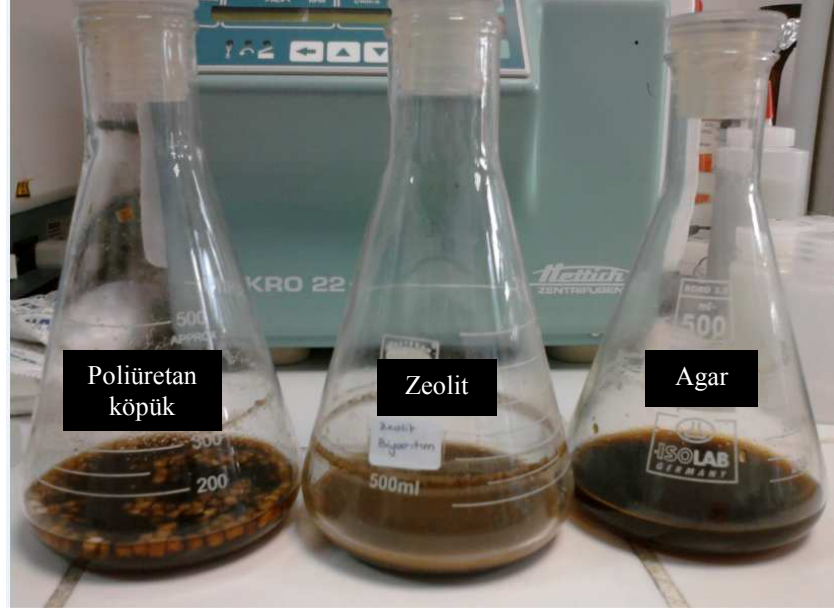
## EK 5 Yaş-Kuru Hücre Kalibrasyon Grafiği

Sıvı ön çoğalma ortamından ( $TF_0 = 386 \text{ mg/L}$  ve  $2.27 \text{ g/L}$  üre) belirli hacimlerde (5, 10, 20, 30, 40, 50 ml)  $33.5 \times g$ 'de 10 dk santrifüjlenerek çöktürülen hücreler darası alınmış santrifüj tüplerinde tartılarak yaş ağırlıkları belirlenmiş;  $85^\circ C$ 'de 24 st kurutulmuştur. Sabit tartıma geldikten sonra darası alınmış petri kaplarında tartım yapılarak g olarak kuru hücre miktarı hesaplanmıştır. Hazırlanan yaş-kuru hücre kalibrasyon grafiği şekil 2'de gösterilmiştir. Tüm biyoarıtım deneylerinde bu kalibrasyon grafiği kullanılarak yaş ağırlığı bilinen hücrenin kuru ağırlığı hesaplanmış ve biyoarıtım sonunda ortamda çöken katı madde miktarları belirlenmiştir.



Şekil 2 Yaş-kuru hücre kalibrasyon grafiği

**EK 6** Poliüretan Köpük, Zeolit ve Agar Kullanılan Biyoartım Ortamlarının Fotoğrafı



## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Gaye BOZKOYUNLU

**Doğum Yeri** : Ankara

**Doğum Tarihi:** 03.07.1986

**Medeni Hali** : Bekar

**Yabancı Dili** : İngilizce

### **Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):**

Lise : Bartın Köksal Toptan Lisesi (2003)

Lisans : Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü(2010)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı  
(Eylül 2010-Ocak 2013)

### **Yayımları:**

1. **Bozkoyunlu, G.**, Karakaya, A., Laleli, Y., Takaç, S. 2011 “Employment of immobilized *Rhodotorula glutinis* in olive mill wastewater treatment”. **European Biotechnology Congress**. Current Opinion in Biotechnology, 22S: S15-S152, OP12. İstanbul, Turkey.
2. **Bozkoyunlu, G.**, Takaç, S. 05/09/2012. Ca-Aljinat Jel Pelletlerine Tutuklanmış *Rhodotorula glutinis* ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımında Azot Kaynağı Türü Etkisi, **Onuncu Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi (UKMK-10)** Bildiri Özetleri Kitabı, P34, İstanbul.