

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ZEYTİN KARASUYUNUN BİYOLOJİK YOLLA
İYİLEŞTİRİLMESİNDE TANNAZ ENZİMİNİN ETKİSİ**

Bahar KANBEROĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Kodu: 612.01.00

Sunuş Tarihi: 24.11.2006

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Gaye ÖNGEN

Bornova-İZMİR

III

Bahar KANBEROĞLU tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak sunulan “**Zeytin Karasuyunun Biyolojik Yolla İyileştirilmesinde Tannaz Enziminin Etkisi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 24.11.2006 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği / oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Yrd. Doç. Dr. Gaye ÖNGEN

Raportör Üye : Prof. Dr. Murat ELİBOL

Üye : Yrd. Doç. Dr Mustafa ATEŞ

ÖZET

**ZEYTİN KARASUYUNUN BİYOLOJİK YOLLA
İYİLEŞTİRİLMESİNDE TANNAZ ENZİMİNİN ETKİSİ****KANBEROĞLU, Bahar****Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Bölümü****Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Gaye ÖNGEN****Kasım 2006, 277 Sayfa**

Zeytin karasuyunun renginin açılması ve fenolik bileşik içeriğinin düşürülmesinde, tannaz enziminin etkisinin incelenmesi amacı ile yapılan bu çalışmada, *Aspergillus section Nigri* grubu funguslar olan *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258, *Aspergillus foetidus var. pallidus* Ege-K 156 ve *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 kullanılmıştır. Mikrobiyal üretim ortamı % 50 zeytin karasuyuna, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ azot tuzları eklenmiştir. Çalkalamalı inkübatörde 200 devir/dakika, 28°C sıcaklıkta üretimler gerçekleştirilmiştir. *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265, zamana karşı üretimde %37.06 renk açılımı ve %42.56 toplam fenolik bileşik giderimi sağlamıştır. *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile 120 saatlik üretimler sonucu en yüksek g fenolik bileşik giderimi/g biyokütle oranı 0.198, Karbon/Azot oranının 10 olduğu %1.0 tannik asit (ağırlık/hacim) içeren NaNO_3 eklenmiş zeytin karasuyu içeren ortamda elde edilmiştir. En yüksek U hücre içi tannaz aktivitesi/g biyokütle oranı 5.19 yine aynı ortamda gerçekleşmiştir. Mikrobiyal üretimler ile karşılaştırmak için ticari tannaz ve lakkaz enzimleri de zeytin karasuyuna uygulanmıştır. Ticari enzim uygulamaları ile zeytin karasuyunda renk açılımı gerçekleşmezken, tannaz ve lakkazın aynı anda uygulanması %18.06 toplam fenolik bileşik giderimi sağlanmıştır.

Anahtar sözcükler: Zeytin karasuyu, tanen, tannaz, *Aspergillus*

ABSTRACT

THE EFFECT OF TANNASE ENZYME IN BIOLOGICAL
TREATMENT OF OLIVE MILL WASTE WATER

KANBEROĞLU, Bahar

MSc in Bioengineering

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Gaye ÖNGEN

November 2006, 277 Pages

In this study, in order to investigate the effect of tannase enzyme in decolorization and dephenolization of olive oil waste water, *Aspergillus* section Nigri strains *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258, *Aspergillus foeditus* var. *pallidus* Ege-K 156, and *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 were used. NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nitrogen salts were added to olive oil waste water (% 50). All fermentations were performed at 200 rpm and 28°C on rotary shaker. During the time-course of olive oil waste water degradation by *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265, 37.06 % decolorization and 42.56% dephenolization was achieved. At the end of 120 h cultivation with *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265, the highest g phenolic compounds removal/g biomass value 0.198 was obtained in a medium containing 1% (w/v) tannic acid and NaNO_3 was added as a nitrogen source with Carbon/Nitrogen 10. Besides the highest U intracellular tannase activity/g biomass value 5.19 was obtained again in the same medium. On the other hand, for the comparison with microbial cultivations commercial laccase and tannase enzymes were also applied to olive mill waste water. Although commercial enzyme applications did not result in decolorization, the application of laccase and tannase simultaneously achieved 18.06 % dephenolization.

Keywords: Olive oil waste water (OMW), tannin, tannase, *Aspergillus*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca biyoprosesler konusunda yetişmemde bana emeği geçen danışmanım Yrd. Doç. Dr. Gaye Öngen'e, tezimin ince tabaka kromatografisi analizlerini yapmamda bana karşı her aşamada yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Erdal Bedir ve öğrencileri; İsmail Akgün ve Şebnem Bıçkıcı'ya, mikrobiyolojik konularda her danıştığımda beni aydınlatan Prof. Dr. Rengin Eltem'e, sıvı azot temininde zorluk yaşamamamı sağlayan Prof. Dr. İsmet Gürhan'a, mikrobiyolojik çalışmalarda laboratuvarlarını kullanmam konusunda bana destek olan Arş. Gör. Özlem İmamoğlu, Yüksel Gezgin ve Zeynep Akbal'a, deneylerimde karamsarlığa düştüğümde desteklerini hissettirerek rahatlamama yardımcı olan arkadaşlarım Tuğba Keskin, Zeliha Demirel ve Arş. Gör. Dr. Şevket Karaçancı'ya, enzim aktivite tayin yöntemindeki sorularımı cevaplayan Dr. Bikas Pati'ye, tannaz preparatlarını koşulsuz bana yollayan Biocon ve Kikkoman firmalarına, tezimi tamamlamam konusunda bana daima destek olan anne ve babama, tezimi bitireceğime daima inanıp, bana moral veren arkadaşım Şebnem Kavaklı'ya ve tezimin tamamlanmasında emeği geçen diğer Biyomühendislik ve Ebiltem çalışanlarına, teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığınca destelenen 04-MÜH-003 no'lu proje kapsamında yürütülmüştür.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIX
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1 Zeytinyağı Üretimi	5
2.2 Zeytinyağı Üretimi Atıkları	8
2.2.1 Pirina	8
2.2.2 Zeytin Karasuyu	9
2.3 Fenolik Bileşikler	12
2.3.1 Ligninler	17
2.3.2 Tanenler	18
2.4 Zeytin Karasuyunun Çevresel Etkisi ve Arıtımındaki Güçlükler	25
2.5 Zeytin Karasuyu Arıtımında Kullanılan Yöntemler	27
2.5.1 Fiziksel ve Fizikokimyasal Yöntemler	27
2.5.2 Kimyasal Yöntemler	33
2.5.3 Biyolojik yöntemler	36
2.6 Ligninolitik Enzimler	43
2.6.1 Lignin peroksidaz	44
2.6.2 Mangan peroksidaz	45

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.6.3 Lakkaz.....	45
2.7 Tannaz.....	55
2.7.1 Mikrobiyal Tannaz Üretimi.....	57
2.7.2 Mikrobiyal Tannazın Biyoreaktörde Üretimi.....	88
2.7.3 Mikrobiyal Tannazın Fizikokimyasal Özellikleri.....	99
2.7.4 Tannazın Uygulama Alanları.....	109
3-MATERYAL VE METOT.....	115
3.1 Materyaller.....	115
3.1.1 Zeytin Karasuyu.....	115
3.1.2 Kullanılan Mikroorganizmalar.....	116
3.1.3 Kimyasallar.....	116
3.1.4 Enzimler.....	117
3.1.5 Kullanılan Başlıca Cihazlar.....	117
3.1.6 Tampon, Reaktif ve Çözeltiler.....	118
3.2 Metod.....	122
3.2.1 Mikrobiyal Üretim Öncesi Hazırlıklar.....	122
3.2.2 Süspanse Kültürdeki Üretimler.....	127
3.2.3 Üretim Sonrası İşlemler.....	128
3.2.4 Yaş Biyokütlede Yapılan İşlemler.....	129
3.2.5 Filtre Edilmiş Kültür Ortamında Yapılan Analizler.....	131
3.2.6 Ticari enzim preparatlarının uygulanması.....	142
3.2.7 İnce Tabaka Kromatografisi.....	145

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	147
4.1 Sentetik Ortamdaki Mikrobiyal Üretimler.....	148
4.1.1 Tannik Asit Agar Ortamına Nokta Ekim.....	148
4.1.2 Derin Kültürdeki Üretimler.....	152
4.2 Zeytin Karasuyu Ortamındaki Mikrobiyal Üretimler.....	161
4.2.1 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258 ile %50 ZKS'de Zamana Karşı Üretim.....	162
4.2.2 <i>Aspergillus foetidus</i> var. <i>pallidus</i> Ege-K 156 ile %50 ZKS'de Zamana Karşı Üretim.....	167
4.2.3 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile %50 ZKS'de Zamana Karşı Üretim	172
4.3 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile Proses Parametrelerinin Tannaz Sentezine Etkisinin İncelenmesi.....	182
4.3.1 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile Farklı C/N Oranlarında Tannaz Aktivitesine Azot Kaynaklarının Etkisinin Karşılaştırılması.....	183
4.3.2 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile C/N 10 Oranında Tannaz Aktivitesine Tannik Asidin İndüktör Etkisinin İncelenmesi.....	193
4.3.3 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile Farklı C/N Oranlarında Tannaz Aktivitesine Spor Süspansiyonunun ve Tannik Asidin Etkisinin İncelenmesi.....	204
4.4 Ticari Enzim Preparatlarının Uygulanması.....	217

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4.1 Zeytin Karasuyuna EDTA'nın Uygulanması.....	217
4.4.2 Zeytin Karasuyuna Tannaz Enzim Preparatının Uygulanması	219
4.4.3 Zeytin Karasuyuna Lakkaz Enzim Preparatının Uygulanması	226
4.4.4 Zeytin Karasuyuna Tannaz ve Lakkaz Enzim Preparatlarının Birlikte Uygulanması	237
5. ÖNERİLER	251
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	253
7. ÖZGEÇMİŞ	277

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1	Zeytinyağı Üretimi ve Akım Şeması.....	6
Şekil 2.2	Fenilpropanoit biyosentez yolağının genel hatları	12
Şekil 2.3	Basit Fenolikler	13
Şekil 2.4	ZKS’de tayin edilmiş basit fenolik bileşikler	15
Şekil 2.5	Oleuropein ve elenolik asidin yapısı.....	16
Şekil 2.6	Üç temel fenilpropan birimi içeren basitleştirilmiş bir lignin yapısı	17
Şekil 2.7	Lignin monomerleri	18
Şekil 2.8	Hidrolize olabilen tanenler ve bazı bileşenlerinin yapısal olarak karşılaştırılması.....	20
Şekil 2.9	Tannik asit.....	21
Şekil 2.10	Kondanse tanen	23
Şekil 2.11	ZKS’nin arıtımı için geliştirilen kombine sistemin akış şeması	36
Şekil 2.12	Lignin bozunma yolağı	44
Şekil 2.13	Lignine ait fenolik grupların lakkazca katalizlenen yükseltgenmeleri	46
Şekil 2.14	Tannik asidin yapısı ve tannazın hidrolitik ürünleri	56

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.15	Gallik asit birimlerinin daha yukarıda olanın fenolik grubu ile daha aşağıdaki asit grubu arasında oluşan despit bağına ait bir örnek 56
Şekil 2.16	Tannik asidin parçalanması 60
Şekil 3.1	Tannik asit çözeltisinin soğuk sterilizasyonu 123
Şekil 3.2	Toplam şeker tayini standart eğrisi grafiği 133
Şekil 3.3	Toplam fenolik bileşik tayini kafeik asit standart eğrisi grafiği.....134
Şekil 3.4	Toplam fenolik bileşik tayini gallik asit standart eğrisi grafiği.....135
Şekil 3.5	Toplam tanen tayini tannik asit standart eğrisi grafiği 138
Şekil 4.1	<i>Aspergillus</i> türlerinin TAA ortamında oluşturdukları ortalama koloni çapları, 28 °C, 4. gün 148
Şekil 4.2	<i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258'un TAA ortamındaki gelişimi 149
Şekil 4.3	<i>Aspergillus foetidus</i> var.pallidus Ege-K 156'un TAA ortamındaki gelişimi 150

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.4 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265'in TAA ortamındaki gelişimi	150
Şekil 4.5 Sentetik üretim ortamındaki pH değişimi, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat	153
Şekil 4.6 Sentetik üretim ortamındaki kuru ağırlık (g/l) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat	154
Şekil 4.7 Sentetik üretim ortamındaki toplam fenolik bileşik giderimi (%) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat.....	155
Şekil 4.8 Sentetik üretim ortamında 388 nm'deki absorbands değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat	156
Şekil 4.9 Sentetik üretim ortamında spektrofotometrik tannaz aktivite tayin metodu (Sharma et al., 2000) ile hücre içi relatif tannaz aktivite değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat	158
Şekil 4.10 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki pH, kuru ağırlık (g/l) ve şeker tüketimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C.....	161

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.11 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik giderimi (%) ve renk açılımı (%), 200 devir/dakika, 28 °C	164
Şekil 4.12 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C	165
Şekil 4.13 <i>Aspergillus foetidus</i> var.pallidus Ege-K 156 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki pH, kuru ağırlık (g/l) ve toplam şeker tüketimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C	167
Şekil 4.14 <i>Aspergillus foetidus</i> var.pallidus Ege-K 156 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik giderimi (%) ve renk açılımı (%), 200 devir/dakika, 28 °C	168
Şekil 4.15 <i>Aspergillus foetidus</i> var.pallidus Ege-K 156 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki 395 nm’deki absorbans değerleri (A_{395}), 200 devir/dakika, 28 °C	169

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.16 <i>Aspergillus foetidus</i> var.pallidus Ege-K 156 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C	170
Şekil 4.17 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki pH, kuru ağırlık (g/l) ve toplam şeker tüketimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C.....	171
Şekil 4.18 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik giderimi (%) ve renk açılımı (%), 200 devir/dakika, 28 °C	173
Şekil 4.19 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C	175
Şekil 4.20 Zamana karşı mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromotografisi, 254 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10:10:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde	178

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.21	
Zamana karşı mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromotografisi, 366 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde	179
Şekil 4.22	
Zamana karşı mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromotografisi, %5.0'lik FeCl_3 çözeltisine daldırılmış plakanın görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde	180
Şekil 4.23	
Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde pH değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C	183
Şekil 4.24	
Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde kuru ağırlık değerleri (g/l), 200 devir/dakika, 28 °C	184
Şekil 4.25	
Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde fenol giderimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C	185

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.26	Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde toplam şeker tüketimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C 186
Şekil 4.27	Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde renk açılımı (%), 200 devir/dakika, 28 °C 187
Şekil 4.28	Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde hücre içi tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C..... 188
Şekil 4.29	Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde hücre dışı tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C..... 189
Şekil 4.30	<i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile farklı C/N oranlarında azot kaynaklarının etkisinin karşılaştırılmasına ait mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromatografisi, 254 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde..... 191

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.31 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile farklı C/N oranlarında azot kaynaklarının etkisinin karşılaştırılmasına ait mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromatografisi, %5.0'lik FeCl ₃ çözeltisine daldırılmış plakanın görünümü, hekzan/etil asetat/metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde.....	192
Şekil 4.32 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması pH değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C	194
Şekil 4.33 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması kuru ağırlık değerleri (g/l), değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C.....	195
Şekil 4.34 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması toplam fenolik bileşik giderimi (%) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C	196
Şekil 4.35 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması toplam şeker tüketimi (%) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C	197
Şekil 4.36 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması A ₃₉₅ değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C	198

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)**Şekil****Sayfa**

- Şekil 4.37** C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması hücre içi tannaz aktivitesi değerleri (U/l), 200 çalkalama hızı, 28 °C..... 199
- Şekil 4.38** C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması hücre dışı tannaz aktivitesi değerleri (U/l), 200 çalkalama hızı, 28 °C..... 199
- Şekil 4.39** *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile C/N:10'da azot kaynaklarının ve %1.0 TA'in etkisinin karşılaştırılmasına ait mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromatografisi, 254 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde..... 202
- Şekil 4.40** *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile C/N:10'da azot kaynaklarının ve %1.0 TA'in etkisinin karşılaştırılmasına ait mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromatografisi, %5.0'lik FeCl₃ çözeltisine daldırılmış plakanın görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde..... 203

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.41	Farklı C/N oranında %1.0 TA ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki pH değerleri, 200 çalkalama hızı, 28 °C.....204
Şekil 4.42	Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki kuru ağırlık (g/l) değerleri, 200 çalkalama hızı, 28 °C 205
Şekil 4.43	Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki toplam fenolik bileşik giderimi (%), 200 çalkalama hızı, 28 °C 206
Şekil 4.44	Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki toplam şeker tüketimi (%), 200 çalkalama hızı, 28 °C 207
Şekil 4.45	Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki A ₃₉₅ değerleri, 200 çalkalama hızı, 28 °C.....208
Şekil 4.46	Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesinde hücre içi tannaz aktivitesi (U/l) değerleri, 200 çalkalama hızı, 28 °C 209

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)**Şekil****Sayfa**

- Şekil 4.47** Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesinde hücre dışı tannaz aktivitesi (U/l) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C 210
- Şekil 4.48** *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile C/N 10'da azot kaynağının NaNO₃ olduğu mikrobiyal üretimlerde spor süspansiyonunun ve %1.0 TA'in etkisinin karşılaştırılmasına ait ince tabaka kromatografisi, 254 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde..... 212
- Şekil 4.49** *Aspergillus tubingensis* ile C/N 10'da azot kaynağının NaNO₃ olduğu mikrobiyal üretimlerde spor süspansiyonunun ve %1.0 TA'in etkisinin karşılaştırılmasına ait ince tabaka kromatografisi, %5.0'lik FeCl₃ çözeltisine daldırılmış plakanın görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde..... 213

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.50	%10–100 ZKS’ye EDTA’nın uygulanmasında tannaz aktivitesi (U/l), 45 °C, su banyosu 217
Şekil 4.51	0.3–1.8 (hacim/ hacim) aralığında tannaz eklenmiş %100 ZKS’nin pH değişimi, 1 saat, 45°C, su banyosu 219
Şekil 4.52	0.3–1.8 (hacim/hacim) aralığında tannaz eklenmiş %100 ZKS’nin renk açılımı (%), 1 saat, 45°C, su banyosu 220
Şekil 4.53	%10 ve %100 ZKS’ye tannaz enziminin uygulanmasında zamana karşı tannaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika 222
Şekil 4.54	%10 ve %100 ZKS’ye tannaz enziminin uygulanmasında zamana karşı toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika.....223
Şekil 4.55	%10 ve %100 ZKS’ye tannaz enziminin uygulanmasında zamana karşı zamana karşı 395 nm’deki absorbans değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika 225
Şekil 4.56	2000–20000 U/ml aktivite aralığında lakkaz uygulanmasındaki 395 nm’deki absorbans değişimi, 45°C, su banyosu 226

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)**Şekil****Sayfa**

- Şekil 4.57** Farklı lakkaz aktivitelerinin ZKS’de bulunan toplam fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasına ilişkin veriler 227
- Şekil 4.58** %10 ve %100 ZKS’ye lakkaz enziminin uygulanmasında zamana karşı lakkaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika..... 229
- Şekil 4.59** %10 ve %100 ZKS’ye lakkaz enziminin uygulanmasında zamana toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika 230
- Şekil 4.60** %10 ve %100 ZKS’ye lakkaz enziminin uygulanmasında zamana karşı 395 nm’deki absorbands değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika..... 233
- Şekil 4.61** Ticari tannaz preparatının %100 ZKS ve %0.5–1.0 TA’e (ağırlık/hacim) ve ticari lakkaz preparatının %100 ZKS’ye uygulamasının ince tabaka kromatografisi, 254 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde..... 235

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.62	Ticari tannaz preparatının %100 ZKS ve %0.5–1.0 TA’e (ağırlık/hacim) ve ticari lakkaz preparatının %100 ZKS’ye uygulamasının ince tabaka kromotografisi, %5.0’lik FeCl_3 çözeltisine daldırılmış plakaların görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde 236
Şekil 4.63	%10 ve %100 ZKS’ye tannaz enziminin uygulanmasından sonra lakkaz uygulanmasında, zamana karşı lakkaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika 237
Şekil 4.64	%10 ve %100 ZKS’ye tannaz enziminin uygulanmasından sonra lakkaz uygulanmasında, zamana karşı toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika 238
Şekil 4.65	%10 ve %100 ZKS’ye tannaz enziminin uygulanmasından sonra lakkaz uygulanmasında, zamana karşı 395 nm’deki absorbans değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika 239

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)**Şekil****Sayfa**

Şekil 4.66	%10 ve %100 ZKS'ye lakkaz enziminin uygulanmasından sonra tannaz uygulanmasında, zamana karşı tannaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika.....	240
Şekil 4.67	%10 ve %100 ZKS'ye lakkaz enziminin uygulanmasından sonra tannaz uygulanmasında, zamana karşı toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika	240
Şekil 4.68	%10 ve %100 ZKS'ye lakkaz enziminin uygulanmasından sonra tannaz uygulanmasında, zamana karşı 395 nm'deki absorbands değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika	241
Şekil 4.69	%10 ve %100 ZKS'ye lakkaz ve tannaz enziminin aynı anda uygulanmasında zamana karşı lakkaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika	242
Şekil 4.70	%10 ve %100 ZKS'ye lakkaz ve tannaz enziminin aynı anda uygulanmasında zamana karşı tannaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika	243
Şekil 4.71	%10 ve %100 ZKS'ye lakkaz ve tannaz enziminin aynı anda uygulanmasında zamana karşı toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika	244

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.72	%10 ve %100 ZKS'ye lakkaz ve tannaz enziminin aynı anda uygulanmasında zamana karşı zamana karşı 395 nm'deki absorbans değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika 245
Şekil 4.73	Ticari tannaz ve lakkaz preparatlarının %100 ZKS'ye birlikte uygulamasının ince tabaka kromatografisi, 254 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde 247
Şekil 4.74	Ticari tannaz ve lakkaz preparatlarının %100 ZKS'ye birlikte uygulamasının ince tabaka kromatografisi, %5'lik FeCl ₃ çözeltisine daldırılmış plakaların görünümü, hekzan/etil asetat/ birim metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/ hacim / hacim) çözgen sisteminde 248

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Zeytinyağı bileşenleri.....	7
Çizelge 2.2 Prinanın bileşimi	9
Çizelge 2.3 Zeytin karasuyunun bileşimi	10
Çizelge 2.4 Klasik ve sürekli yöntemle zeytinyağı üretimi yapan tesislerden çıkan ZKS'lerin bileşimi	11
Çizelge 2.5 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması	14
Çizelge 2.6 Tanenlerin hidroliz ürünlerinin karşılaştırılması.....	24
Çizelge 2.7 ZKS'nin evsel atıksu ile karşılaştırılması	26
Çizelge 2.8 Zeytin karasuyunun biyolojik arıtımında kullanılmış mikroorganizmalar	40
Çizelge 2.9 Zeytin karasuyunun arıtımında etkili olan ve funguslarca sentezlenen ligninolitik enzim veya enzimler.....	49
Çizelge 2.10 Tannaz üretebilen mikroorganizmalar	58
Çizelge 2.11 Hücre içi tannaz için kullanılan hücre parçalama için yöntemler	62
Çizelge 2.12 Tannaz üretimi için kullanılan inkübasyon sıcaklıkları	66

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.13 Tannaz üretiminde kullanılan tannik asit derişimleri ve mikroorganizmaların tannik asit tolerans sınırları	68
Çizelge 2.14 Üç fungusun maksimum indüklenme oranları.....	69
Çizelge 2.15 Derin kültürde kullanılmış olan alternatif tanen kaynakları	70
Çizelge 2.16 Maksimum tannaz sentezi için glukoz derişimleri.....	72
Çizelge 2.17 Tannaz üretimi için kullanılan azot kaynakları	74
Çizelge 2.18 Tannaz üretimi için kullanılan mineral kaynakları	76
Çizelge 2.19 Tannaz üretimi ortamına eklenen mineral kaynaklarının tannaz aktivitesine ve biyokütleyle olan etkisi.....	77
Çizelge 2.20 Tannaz üretimi için kullanılan üretim süreleri	78
Çizelge 2.21 Tannaz üretimi için kullanılan inokulum yüzdesi ve/veya miktarı	79
Çizelge 2.22 Czapek-Dox Minimal ortamı içeriği	80
Çizelge 2.23 Diğer bir tannaz üretim ortamının içeriği.....	80
Çizelge 2.24 <i>Aspergillus niger</i> ile tannaz üretimi için kullanılan tipik bir ortam	81

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.25 Tannaz üretimi için derin kültürdeki çalkalama hızları.....	82
Çizelge 2.26 Derin kültürde tannaz aktivite tayininde kullanılmış yöntemler ve tannaz aktivite değerleri	85
Çizelge 2.27 Katı kültürde tannaz aktivite tayininde kullanılmış yöntemler ve tannaz aktivite değerleri	86
Çizelge 2.28 Derin kültür biyoreaktörlerdeki üretim parametreleri ve tannaz aktivite değerleri	93
Çizelge 2.29 Katı kültür biyoreaktörlerdeki üretim parametreleri ve tannaz aktivite değerleri	95
Çizelge 2.30 Sentezlenmiş olan tannazların optimum sıcaklıkları ve sıcaklık kararlılıkları.....	101
Çizelge 2.31 Tannaz aktivitesi üzerine inhibitif etki gösteren kimyasal madde, anyon veya katyonlar	103
Çizelge 2.32 Tannaz aktivitesi üzerine aktivatör etki gösteren kimyasal madde, anyon veya katyonlar	104
Çizelge 2.33 Mikrobiyal tannaz enzimi için kullanılan ayırma - saflaştırma basamakları.....	106
Çizelge 2.34 İmmobilize tannazın özellikleri	108

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.35 ZKS’de gelişmiş <i>Aspergillus niger</i> A10 suşunun ZKS’deki fenolik bileşikler parçalaması.....	112
Çizelge 3.1 Çalışmalarda kullanılan zeytin karasuyunun karakteristik özellikleri	115
Çizelge 3.2 Çalışmalarda kullanılan <i>Aspergillus</i> türleri ve stok ortamlarının dağılımı	116
Çizelge 3.3 Sentetik tannaz üretim ortamının kompozisyonu.....	124
Çizelge 3.4 Toplam şeker tayin yöntemi standart derişimleri	132
Çizelge 3.5 Fenol-Sülfürik Asit tayin yöntemi	132
Çizelge 3.6 Folin-Ciocalteau yöntemi	134
Çizelge 3.7 Toplam fenolik bileşik tayini analiz yöntemi	135
Çizelge 3.8 Toplam tanen yöntemi standart eğrinin derişimleri.....	136
Çizelge 3.9 Toplam tanen yöntemi.....	137
Çizelge 3.10 Lakkaz aktivitesi tayin yöntemi.....	138
Çizelge 3.11 Spektrofotometrik tannaz aktivite tayin yöntemi	140
Çizelge 3.12 Kolorimetrik tannaz aktivite tayin yöntemi.....	141

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1 %50 ZKS'deki üretim ortamlarında, <i>Aspergillus section Nigri</i> suşları ile verim (g giderilen fenolik bileşikler g ⁻¹ biyokütle), fenolik bileşik giderimi(%) ve renk açılımı (%), 200 devir /dakika, 28 °C, 48 saat ...	152
Çizelge 4.2 Sentetik üretim ortamında toplam fenolik bileşik miktarındaki değişim.....	156
Çizelge 4.3 Sentetik üretim ortamının genel sonuçları	160
Çizelge 4.4 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik değerleri (g/l).....	164
Çizelge 4.5 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimin genel sonuçları	166
Çizelge 4.6 <i>Aspergillus foetidus var.pallidus</i> Ege-K % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik değerleri (g/l).....	169
Çizelge 4.7 <i>Aspergillus foetidus var.pallidus</i> Ege-K 156 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimin genel sonuçları	171
Çizelge 4.8 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik miktarı değerleri (g/l)	173

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.9 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimin genel sonuçları	177
Çizelge 4.10 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258, <i>Aspergillus foetidus var.pallidus</i> Ege-K 156 ve <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile % 50 ZKS’de 5. günün sonundaki toplam fenolik bileşik giderimi (%), renk açılımı (%), maksimum hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerlerinin (U/ml) karşılaştırılması	182
Çizelge 4.11 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265’in 5. gün sonundaki toplam fenolik bileşik giderimi (%), renk açılımı (%), hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması	191
Çizelge 4.12 %50 ZKS’de C/N oranı ve %1.0 TA’in etkisinin incelenmesinde verim hesaplaması sonuçları.....	201
Çizelge 4.13 C/N 10’da NaNO ₃ eklenmiş %50 ZKS’de spor süspansiyonunun ve %1.0 TA’in etkisinin incelenmesinde verim hesaplaması.....	212
Çizelge 4.14 Tannaz ve lakkaz enzim preparatlarının birlikte uygulanmasında 0. ve 24. saat enzim aktivite değerleri, fenolik bileşik giderimi (%), 395 nm’deki 0. ve 24. saat OD değerleri	250

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ZEYTİN KARASUYUNUN BİYOLOJİK YOLLA
İYİLEŞTİRİLMESİNDE TANNAZ ENZİMİNİN ETKİSİ**

Bahar KANBEROĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Kodu: 612.01.00

Sunuş Tarihi: 24.11.2006

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Gaye ÖNGEN

Bornova-İZMİR

III

Bahar KANBEROĞLU tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak sunulan “**Zeytin Karasuyunun Biyolojik Yolla İyileştirilmesinde Tannaz Enziminin Etkisi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 24.11.2006 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği / oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Yrd. Doç. Dr. Gaye ÖNGEN

Raportör Üye : Prof. Dr. Murat ELİBOL

Üye : Yrd. Doç. Dr Mustafa ATEŞ

ÖZET

**ZEYTİN KARASUYUNUN BİYOLOJİK YOLLA
İYİLEŞTİRİLMESİNDE TANNAZ ENZİMİNİN ETKİSİ****KANBEROĞLU, Bahar****Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Bölümü****Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Gaye ÖNGEN****Kasım 2006, 277 Sayfa**

Zeytin karasuyunun renginin açılması ve fenolik bileşik içeriğinin düşürülmesinde, tannaz enziminin etkisinin incelenmesi amacı ile yapılan bu çalışmada, *Aspergillus section Nigri* grubu funguslar olan *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258, *Aspergillus foetidus var. pallidus* Ege-K 156 ve *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 kullanılmıştır. Mikrobiyal üretim ortamı % 50 zeytin karasuyuna, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ azot tuzları eklenmiştir. Çalkalamalı inkübatörde 200 devir/dakika, 28°C sıcaklıkta üretimler gerçekleştirilmiştir. *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265, zamana karşı üretimde %37.06 renk açılımı ve %42.56 toplam fenolik bileşik giderimi sağlamıştır. *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile 120 saatlik üretimler sonucu en yüksek g fenolik bileşik giderimi/g biyokütle oranı 0.198, Karbon/Azot oranının 10 olduğu %1.0 tannik asit (ağırlık/hacim) içeren NaNO_3 eklenmiş zeytin karasuyu içeren ortamda elde edilmiştir. En yüksek U hücre içi tannaz aktivitesi/g biyokütle oranı 5.19 yine aynı ortamda gerçekleşmiştir. Mikrobiyal üretimler ile karşılaştırmak için ticari tannaz ve lakkaz enzimleri de zeytin karasuyuna uygulanmıştır. Ticari enzim uygulamaları ile zeytin karasuyunda renk açılımı gerçekleşmezken, tannaz ve lakkazın aynı anda uygulanması %18.06 toplam fenolik bileşik giderimi sağlanmıştır.

Anahtar sözcükler: Zeytin karasuyu, tanen, tannaz, *Aspergillus*

ABSTRACT

THE EFFECT OF TANNASE ENZYME IN BIOLOGICAL
TREATMENT OF OLIVE MILL WASTE WATER

KANBEROĞLU, Bahar

MSc in Bioengineering

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Gaye ÖNGEN

November 2006, 277 Pages

In this study, in order to investigate the effect of tannase enzyme in decolorization and dephenolization of olive oil waste water, *Aspergillus* section Nigri strains *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258, *Aspergillus foeditus* var. *pallidus* Ege-K 156, and *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 were used. NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nitrogen salts were added to olive oil waste water (% 50). All fermentations were performed at 200 rpm and 28°C on rotary shaker. During the time-course of olive oil waste water degradation by *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265, 37.06 % decolorization and 42.56% dephenolization was achieved. At the end of 120 h cultivation with *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265, the highest g phenolic compounds removal/g biomass value 0.198 was obtained in a medium containing 1% (w/v) tannic acid and NaNO_3 was added as a nitrogen source with Carbon/Nitrogen 10. Besides the highest U intracellular tannase activity/g biomass value 5.19 was obtained again in the same medium. On the other hand, for the comparison with microbial cultivations commercial laccase and tannase enzymes were also applied to olive mill waste water. Although commercial enzyme applications did not result in decolorization, the application of laccase and tannase simultaneously achieved 18.06 % dephenolization.

Keywords: Olive oil waste water (OMW), tannin, tannase, *Aspergillus*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca biyoprosesler konusunda yetişmemde bana emeği geçen danışmanım Yrd. Doç. Dr. Gaye Öngen'e, tezimin ince tabaka kromatografisi analizlerini yapmamda bana karşı her aşamada yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Erdal Bedir ve öğrencileri; İsmail Akgün ve Şebnem Bıçkıcı'ya, mikrobiyolojik konularda her danıştığımda beni aydınlatan Prof. Dr. Rengin Eltem'e, sıvı azot temininde zorluk yaşamamamı sağlayan Prof. Dr. İsmet Gürhan'a, mikrobiyolojik çalışmalarda laboratuvarlarını kullanmam konusunda bana destek olan Arş. Gör. Özlem İmamoğlu, Yüksel Gezgin ve Zeynep Akbal'a, deneylerimde karamsarlığa düştüğümde desteklerini hissettirerek rahatlamama yardımcı olan arkadaşlarım Tuğba Keskin, Zeliha Demirel ve Arş. Gör. Dr. Şevket Karaçancı'ya, enzim aktivite tayin yöntemindeki sorularımı cevaplayan Dr. Bikas Pati'ye, tannaz preparatlarını koşulsuz bana yollayan Biocon ve Kikkoman firmalarına, tezimi tamamlamam konusunda bana daima destek olan anne ve babama, tezimi bitireceğime daima inanıp, bana moral veren arkadaşım Şebnem Kavaklı'ya ve tezimin tamamlanmasında emeği geçen diğer Biyomühendislik ve Ebiltem çalışanlarına, teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığınca destelenen 04-MÜH-003 no'lu proje kapsamında yürütülmüştür.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIX
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1 Zeytinyağı Üretimi	5
2.2 Zeytinyağı Üretimi Atıkları	8
2.2.1 Pirina	8
2.2.2 Zeytin Karasuyu	9
2.3 Fenolik Bileşikler	12
2.3.1 Ligninler	17
2.3.2 Tanenler	18
2.4 Zeytin Karasuyunun Çevresel Etkisi ve Arıtımındaki Güçlükler	25
2.5 Zeytin Karasuyu Arıtımında Kullanılan Yöntemler	27
2.5.1 Fiziksel ve Fizikokimyasal Yöntemler	27
2.5.2 Kimyasal Yöntemler	33
2.5.3 Biyolojik yöntemler	36
2.6 Ligninolitik Enzimler	43
2.6.1 Lignin peroksidaz	44
2.6.2 Mangan peroksidaz	45

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.6.3 Lakkaz.....	45
2.7 Tannaz.....	55
2.7.1 Mikrobiyal Tannaz Üretimi.....	57
2.7.2 Mikrobiyal Tannazın Biyoreaktörde Üretimi.....	88
2.7.3 Mikrobiyal Tannazın Fizikokimyasal Özellikleri.....	99
2.7.4 Tannazın Uygulama Alanları.....	109
3-MATERYAL VE METOT.....	115
3.1 Materyaller.....	115
3.1.1 Zeytin Karasuyu.....	115
3.1.2 Kullanılan Mikroorganizmalar.....	116
3.1.3 Kimyasallar.....	116
3.1.4 Enzimler.....	117
3.1.5 Kullanılan Başlıca Cihazlar.....	117
3.1.6 Tampon, Reaktif ve Çözeltiler.....	118
3.2 Metod.....	122
3.2.1 Mikrobiyal Üretim Öncesi Hazırlıklar.....	122
3.2.2 Süspanse Kültürdeki Üretimler.....	127
3.2.3 Üretim Sonrası İşlemler.....	128
3.2.4 Yaş Biyokütlede Yapılan İşlemler.....	129
3.2.5 Filtre Edilmiş Kültür Ortamında Yapılan Analizler.....	131
3.2.6 Ticari enzim preparatlarının uygulanması.....	142
3.2.7 İnce Tabaka Kromatografisi.....	145

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	147
4.1 Sentetik Ortamdaki Mikrobiyal Üretimler.....	148
4.1.1 Tannik Asit Agar Ortamına Nokta Ekim.....	148
4.1.2 Derin Kültürdeki Üretimler.....	152
4.2 Zeytin Karasuyu Ortamındaki Mikrobiyal Üretimler.....	161
4.2.1 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258 ile %50 ZKS’de Zamana Karşı Üretim.....	162
4.2.2 <i>Aspergillus foetidus</i> var.pallidus Ege-K 156 ile %50 ZKS’de Zamana Karşı Üretim.....	167
4.2.3 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile %50 ZKS’de Zamana Karşı Üretim	172
4.3 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile Proses Parametrelerinin Tannaz Sentezine Etkisinin İncelenmesi.....	182
4.3.1 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile Farklı C/N Oranlarında Tannaz Aktivitesine Azot Kaynaklarının Etkisinin Karşılaştırılması.....	183
4.3.2 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile C/N 10 Oranında Tannaz Aktivitesine Tannik Asidin İndüktör Etkisinin İncelenmesi.....	193
4.3.3 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile Farklı C/N Oranlarında Tannaz Aktivitesine Spor Süspansiyonunun ve Tannik Asidin Etkisinin İncelenmesi.....	204
4.4 Ticari Enzim Preparatlarının Uygulanması.....	217

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4.1 Zeytin Karasuyuna EDTA'nın Uygulanması.....	217
4.4.2 Zeytin Karasuyuna Tannaz Enzim Preparatının Uygulanması	219
4.4.3 Zeytin Karasuyuna Lakkaz Enzim Preparatının Uygulanması	226
4.4.4 Zeytin Karasuyuna Tannaz ve Lakkaz Enzim Preparatlarının Birlikte Uygulanması	237
5. ÖNERİLER	251
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	253
7. ÖZGEÇMİŞ	277

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1	Zeytinyağı Üretimi ve Akım Şeması.....	6
Şekil 2.2	Fenilpropanoit biyosentez yolağının genel hatları	12
Şekil 2.3	Basit Fenolikler	13
Şekil 2.4	ZKS’de tayin edilmiş basit fenolik bileşikler	15
Şekil 2.5	Oleuropein ve elenolik asidin yapısı.....	16
Şekil 2.6	Üç temel fenilpropan birimi içeren basitleştirilmiş bir lignin yapısı	17
Şekil 2.7	Lignin monomerleri	18
Şekil 2.8	Hidrolize olabilen tanenler ve bazı bileşenlerinin yapısal olarak karşılaştırılması.....	20
Şekil 2.9	Tannik asit.....	21
Şekil 2.10	Kondanse tanen	23
Şekil 2.11	ZKS’nin arıtımı için geliştirilen kombine sistemin akış şeması	36
Şekil 2.12	Lignin bozunma yolağı	44
Şekil 2.13	Lignine ait fenolik grupların lakkazca katalizlenen yükseltgenmeleri	46
Şekil 2.14	Tannik asidin yapısı ve tannazın hidrolitik ürünleri	56

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.15	Gallik asit birimlerinin daha yukarıda olanın fenolik grubu ile daha aşağıdaki asit grubu arasında oluşan despit bağına ait bir örnek 56
Şekil 2.16	Tannik asidin parçalanması 60
Şekil 3.1	Tannik asit çözeltisinin soğuk sterilizasyonu 123
Şekil 3.2	Toplam şeker tayini standart eğrisi grafiği 133
Şekil 3.3	Toplam fenolik bileşik tayini kafeik asit standart eğrisi grafiği.....134
Şekil 3.4	Toplam fenolik bileşik tayini gallik asit standart eğrisi grafiği.....135
Şekil 3.5	Toplam tanen tayini tannik asit standart eğrisi grafiği 138
Şekil 4.1	<i>Aspergillus</i> türlerinin TAA ortamında oluşturdukları ortalama koloni çapları, 28 °C, 4. gün 148
Şekil 4.2	<i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258'un TAA ortamındaki gelişimi 149
Şekil 4.3	<i>Aspergillus foetidus</i> var.pallidus Ege-K 156'un TAA ortamındaki gelişimi 150

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.4 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265'in TAA ortamındaki gelişimi	150
Şekil 4.5 Sentetik üretim ortamındaki pH değişimi, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat	153
Şekil 4.6 Sentetik üretim ortamındaki kuru ağırlık (g/l) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat	154
Şekil 4.7 Sentetik üretim ortamındaki toplam fenolik bileşik giderimi (%) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat.....	155
Şekil 4.8 Sentetik üretim ortamında 388 nm'deki absorbands değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat	156
Şekil 4.9 Sentetik üretim ortamında spektrofotometrik tannaz aktivite tayin metodu (Sharma et al., 2000) ile hücre içi relatif tannaz aktivite değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat	158
Şekil 4.10 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki pH, kuru ağırlık (g/l) ve şeker tüketimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C.....	161

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.11 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik giderimi (%) ve renk açılımı (%), 200 devir/dakika, 28 °C	164
Şekil 4.12 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C	165
Şekil 4.13 <i>Aspergillus foetidus</i> var.pallidus Ege-K 156 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki pH, kuru ağırlık (g/l) ve toplam şeker tüketimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C	167
Şekil 4.14 <i>Aspergillus foetidus</i> var.pallidus Ege-K 156 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik giderimi (%) ve renk açılımı (%), 200 devir/dakika, 28 °C	168
Şekil 4.15 <i>Aspergillus foetidus</i> var.pallidus Ege-K 156 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki 395 nm’deki absorbans değerleri (A_{395}), 200 devir/dakika, 28 °C	169

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.16 <i>Aspergillus foetidus</i> var.pallidus Ege-K 156 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C	170
Şekil 4.17 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki pH, kuru ağırlık (g/l) ve toplam şeker tüketimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C.....	171
Şekil 4.18 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik giderimi (%) ve renk açılımı (%), 200 devir/dakika, 28 °C	173
Şekil 4.19 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C	175
Şekil 4.20 Zamana karşı mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromotografisi, 254 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10:10:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde	178

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.21	
Zamana karşı mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromotografisi, 366 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde	179
Şekil 4.22	
Zamana karşı mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromotografisi, %5.0'lik FeCl_3 çözeltisine daldırılmış plakanın görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde	180
Şekil 4.23	
Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde pH değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C	183
Şekil 4.24	
Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde kuru ağırlık değerleri (g/l), 200 devir/dakika, 28 °C	184
Şekil 4.25	
Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde fenol giderimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C	185

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.26	Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde toplam şeker tüketimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C 186
Şekil 4.27	Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde renk açılımı (%), 200 devir/dakika, 28 °C 187
Şekil 4.28	Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde hücre içi tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C..... 188
Şekil 4.29	Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde hücre dışı tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C..... 189
Şekil 4.30	<i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile farklı C/N oranlarında azot kaynaklarının etkisinin karşılaştırılmasına ait mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromatografisi, 254 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde..... 191

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.31 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile farklı C/N oranlarında azot kaynaklarının etkisinin karşılaştırılmasına ait mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromatografisi, %5.0'lik FeCl ₃ çözeltisine daldırılmış plakanın görünümü, hekzan/etil asetat/metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde.....	192
Şekil 4.32 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması pH değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C	194
Şekil 4.33 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması kuru ağırlık değerleri (g/l), değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C.....	195
Şekil 4.34 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması toplam fenolik bileşik giderimi (%) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C	196
Şekil 4.35 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması toplam şeker tüketimi (%) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C	197
Şekil 4.36 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması A ₃₉₅ değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C	198

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)**Şekil****Sayfa**

- Şekil 4.37** C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması hücre içi tannaz aktivitesi değerleri (U/l), 200 çalkalama hızı, 28 °C..... 199
- Şekil 4.38** C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması hücre dışı tannaz aktivitesi değerleri (U/l), 200 çalkalama hızı, 28 °C..... 199
- Şekil 4.39** *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile C/N:10'da azot kaynaklarının ve %1.0 TA'in etkisinin karşılaştırılmasına ait mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromatografisi, 254 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde..... 202
- Şekil 4.40** *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile C/N:10'da azot kaynaklarının ve %1.0 TA'in etkisinin karşılaştırılmasına ait mikrobiyal üretimlerin ince tabaka kromatografisi, %5.0'lik FeCl₃ çözeltisine daldırılmış plakanın görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde..... 203

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.41 Farklı C/N oranında %1.0 TA ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki pH değerleri, 200 çalkalama hızı, 28 °C.....	204
Şekil 4.42 Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki kuru ağırlık (g/l) değerleri, 200 çalkalama hızı, 28 °C	205
Şekil 4.43 Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki toplam fenolik bileşik giderimi (%), 200 çalkalama hızı, 28 °C	206
Şekil 4.44 Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki toplam şeker tüketimi (%), 200 çalkalama hızı, 28 °C	207
Şekil 4.45 Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki A ₃₉₅ değerleri, 200 çalkalama hızı, 28 °C.....	208
Şekil 4.46 Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesinde hücre içi tannaz aktivitesi (U/l) değerleri, 200 çalkalama hızı, 28 °C	209

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)**Şekil****Sayfa**

- Şekil 4.47** Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesinde hücre dışı tannaz aktivitesi (U/l) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C 210
- Şekil 4.48** *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile C/N 10'da azot kaynağının NaNO₃ olduğu mikrobiyal üretimlerde spor süspansiyonunun ve %1.0 TA'in etkisinin karşılaştırılmasına ait ince tabaka kromatografisi, 254 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde..... 212
- Şekil 4.49** *Aspergillus tubingensis* ile C/N 10'da azot kaynağının NaNO₃ olduğu mikrobiyal üretimlerde spor süspansiyonunun ve %1.0 TA'in etkisinin karşılaştırılmasına ait ince tabaka kromatografisi, %5.0'lik FeCl₃ çözeltisine daldırılmış plakanın görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde..... 213

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.50	%10–100 ZKS’ye EDTA’nın uygulanmasında tannaz aktivitesi (U/l), 45 °C, su banyosu 217
Şekil 4.51	0.3–1.8 (hacim/ hacim) aralığında tannaz eklenmiş %100 ZKS’nin pH değişimi, 1 saat, 45°C, su banyosu 219
Şekil 4.52	0.3–1.8 (hacim/hacim) aralığında tannaz eklenmiş %100 ZKS’nin renk açılımı (%), 1 saat, 45°C, su banyosu 220
Şekil 4.53	%10 ve %100 ZKS’ye tannaz enziminin uygulanmasında zamana karşı tannaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika 222
Şekil 4.54	%10 ve %100 ZKS’ye tannaz enziminin uygulanmasında zamana karşı toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika.....223
Şekil 4.55	%10 ve %100 ZKS’ye tannaz enziminin uygulanmasında zamana karşı zamana karşı 395 nm’deki absorbans değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika 225
Şekil 4.56	2000–20000 U/ml aktivite aralığında lakkaz uygulanmasındaki 395 nm’deki absorbans değişimi, 45°C, su banyosu 226

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)**Şekil****Sayfa**

- Şekil 4.57** Farklı lakkaz aktivitelerinin ZKS’de bulunan toplam fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasına ilişkin veriler 227
- Şekil 4.58** %10 ve %100 ZKS’ye lakkaz enziminin uygulanmasında zamana karşı lakkaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika..... 229
- Şekil 4.59** %10 ve %100 ZKS’ye lakkaz enziminin uygulanmasında zamana toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika 230
- Şekil 4.60** %10 ve %100 ZKS’ye lakkaz enziminin uygulanmasında zamana karşı 395 nm’deki absorbans değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika..... 233
- Şekil 4.61** Ticari tannaz preparatının %100 ZKS ve %0.5–1.0 TA’e (ağırlık/hacim) ve ticari lakkaz preparatının %100 ZKS’ye uygulamasının ince tabaka kromatografisi, 254 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde..... 235

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.62	Ticari tannaz preparatının %100 ZKS ve %0.5–1.0 TA’e (ağırlık/hacim) ve ticari lakkaz preparatının %100 ZKS’ye uygulamasının ince tabaka kromotografisi, %5.0’lik FeCl ₃ çözeltisine daldırılmış plakaların görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde 236
Şekil 4.63	%10 ve %100 ZKS’ye tannaz enziminin uygulanmasından sonra lakkaz uygulanmasında, zamana karşı lakkaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika 237
Şekil 4.64	%10 ve %100 ZKS’ye tannaz enziminin uygulanmasından sonra lakkaz uygulanmasında, zamana karşı toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika 238
Şekil 4.65	%10 ve %100 ZKS’ye tannaz enziminin uygulanmasından sonra lakkaz uygulanmasında, zamana karşı 395 nm’deki absorbans değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika 239

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)**Şekil****Sayfa**

- Şekil 4.66** %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz enziminin uygulanmasından sonra tannaz uygulanmasında, zamana karşı tannaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika..... 240
- Şekil 4.67** %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz enziminin uygulanmasından sonra tannaz uygulanmasında, zamana karşı toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika 240
- Şekil 4.68** %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz enziminin uygulanmasından sonra tannaz uygulanmasında, zamana karşı 395 nm'deki absorbands değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika 241
- Şekil 4.69** %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz ve tannaz enziminin aynı anda uygulanmasında zamana karşı lakkaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika 242
- Şekil 4.70** %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz ve tannaz enziminin aynı anda uygulanmasında zamana karşı tannaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika 243
- Şekil 4.71** %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz ve tannaz enziminin aynı anda uygulanmasında zamana karşı toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika 244

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.72	%10 ve %100 ZKS'ye lakkaz ve tannaz enziminin aynı anda uygulanmasında zamana karşı zamana karşı 395 nm'deki absorbans değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika 245
Şekil 4.73	Ticari tannaz ve lakkaz preparatlarının %100 ZKS'ye birlikte uygulamasının ince tabaka kromatografisi, 254 nm UV lambası altındaki plaka görünümü, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sisteminde 247
Şekil 4.74	Ticari tannaz ve lakkaz preparatlarının %100 ZKS'ye birlikte uygulamasının ince tabaka kromatografisi, %5'lik FeCl ₃ çözeltisine daldırılmış plakaların görünümü, hekzan/etil asetat/ birim metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/ hacim / hacim) çözgen sisteminde 248

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Zeytinyağı bileşenleri.....	7
Çizelge 2.2 Prinanın bileşimi	9
Çizelge 2.3 Zeytin karasuyunun bileşimi	10
Çizelge 2.4 Klasik ve sürekli yöntemle zeytinyağı üretimi yapan tesislerden çıkan ZKS'lerin bileşimi	11
Çizelge 2.5 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması	14
Çizelge 2.6 Tanenlerin hidroliz ürünlerinin karşılaştırılması.....	24
Çizelge 2.7 ZKS'nin evsel atıksu ile karşılaştırılması	26
Çizelge 2.8 Zeytin karasuyunun biyolojik arıtımında kullanılmış mikroorganizmalar	40
Çizelge 2.9 Zeytin karasuyunun arıtımında etkili olan ve funguslarca sentezlenen ligninolitik enzim veya enzimler.....	49
Çizelge 2.10 Tannaz üretebilen mikroorganizmalar	58
Çizelge 2.11 Hücre içi tannaz için kullanılan hücre parçalama için yöntemler	62
Çizelge 2.12 Tannaz üretimi için kullanılan inkübasyon sıcaklıkları	66

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.13 Tannaz üretiminde kullanılan tannik asit derişimleri ve mikroorganizmaların tannik asit tolerans sınırları	68
Çizelge 2.14 Üç fungusun maksimum indüklenme oranları.....	69
Çizelge 2.15 Derin kültürde kullanılmış olan alternatif tanen kaynakları	70
Çizelge 2.16 Maksimum tannaz sentezi için glukoz derişimleri.....	72
Çizelge 2.17 Tannaz üretimi için kullanılan azot kaynakları	74
Çizelge 2.18 Tannaz üretimi için kullanılan mineral kaynakları	76
Çizelge 2.19 Tannaz üretimi ortamına eklenen mineral kaynaklarının tannaz aktivitesine ve biyokütleyle olan etkisi.....	77
Çizelge 2.20 Tannaz üretimi için kullanılan üretim süreleri	78
Çizelge 2.21 Tannaz üretimi için kullanılan inokulum yüzdesi ve/veya miktarı	79
Çizelge 2.22 Czapek-Dox Minimal ortamı içeriği	80
Çizelge 2.23 Diğer bir tannaz üretim ortamının içeriği.....	80
Çizelge 2.24 <i>Aspergillus niger</i> ile tannaz üretimi için kullanılan tipik bir ortam	81

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.25 Tannaz üretimi için derin kültürdeki çalkalama hızları.....	82
Çizelge 2.26 Derin kültürde tannaz aktivite tayininde kullanılmış yöntemler ve tannaz aktivite değerleri	85
Çizelge 2.27 Katı kültürde tannaz aktivite tayininde kullanılmış yöntemler ve tannaz aktivite değerleri	86
Çizelge 2.28 Derin kültür biyoreaktörlerdeki üretim parametreleri ve tannaz aktivite değerleri	93
Çizelge 2.29 Katı kültür biyoreaktörlerdeki üretim parametreleri ve tannaz aktivite değerleri	95
Çizelge 2.30 Sentezlenmiş olan tannazların optimum sıcaklıkları ve sıcaklık kararlılıkları.....	101
Çizelge 2.31 Tannaz aktivitesi üzerine inhibitif etki gösteren kimyasal madde, anyon veya katyonlar	103
Çizelge 2.32 Tannaz aktivitesi üzerine aktivatör etki gösteren kimyasal madde, anyon veya katyonlar	104
Çizelge 2.33 Mikrobiyal tannaz enzimi için kullanılan ayırma - saflaştırma basamakları.....	106
Çizelge 2.34 İmmobilize tannazın özellikleri	108

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.35 ZKS’de gelişmiş <i>Aspergillus niger</i> A10 suşunun ZKS’deki fenolik bileşikler parçalaması.....	112
Çizelge 3.1 Çalışmalarda kullanılan zeytin karasuyunun karakteristik özellikleri	115
Çizelge 3.2 Çalışmalarda kullanılan <i>Aspergillus</i> türleri ve stok ortamlarının dağılımı	116
Çizelge 3.3 Sentetik tannaz üretim ortamının kompozisyonu.....	124
Çizelge 3.4 Toplam şeker tayin yöntemi standart derişimleri	132
Çizelge 3.5 Fenol-Sülfürik Asit tayin yöntemi	132
Çizelge 3.6 Folin-Ciocalteau yöntemi	134
Çizelge 3.7 Toplam fenolik bileşik tayini analiz yöntemi	135
Çizelge 3.8 Toplam tanen yöntemi standart eğrinin derişimleri.....	136
Çizelge 3.9 Toplam tanen yöntemi.....	137
Çizelge 3.10 Lakkaz aktivitesi tayin yöntemi.....	138
Çizelge 3.11 Spektrofotometrik tannaz aktivite tayin yöntemi	140
Çizelge 3.12 Kolorimetrik tannaz aktivite tayin yöntemi.....	141

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1 %50 ZKS'deki üretim ortamlarında, <i>Aspergillus section Nigri</i> suşları ile verim (g giderilen fenolik bileşikler g ⁻¹ biyokütle), fenolik bileşik giderimi(%) ve renk açılımı (%), 200 devir /dakika, 28 °C, 48 saat ...	152
Çizelge 4.2 Sentetik üretim ortamında toplam fenolik bileşik miktarındaki değişim.....	156
Çizelge 4.3 Sentetik üretim ortamının genel sonuçları	160
Çizelge 4.4 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik değerleri (g/l).....	164
Çizelge 4.5 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimin genel sonuçları	166
Çizelge 4.6 <i>Aspergillus foetidus var.pallidus</i> Ege-K % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik değerleri (g/l).....	169
Çizelge 4.7 <i>Aspergillus foetidus var.pallidus</i> Ege-K 156 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimin genel sonuçları	171
Çizelge 4.8 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik miktarı değerleri (g/l)	173

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.9 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimin genel sonuçları	177
Çizelge 4.10 <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258, <i>Aspergillus foetidus var.pallidus</i> Ege-K 156 ve <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265 ile % 50 ZKS’de 5. günün sonundaki toplam fenolik bileşik giderimi (%), renk açılımı (%), maksimum hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerlerinin (U/ml) karşılaştırılması	182
Çizelge 4.11 <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265’in 5. gün sonundaki toplam fenolik bileşik giderimi (%), renk açılımı (%), hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerlerinin karşılaştırılması	191
Çizelge 4.12 %50 ZKS’de C/N oranı ve %1.0 TA’in etkisinin incelenmesinde verim hesaplaması sonuçları.....	201
Çizelge 4.13 C/N 10’da NaNO ₃ eklenmiş %50 ZKS’de spor süspansiyonunun ve %1.0 TA’in etkisinin incelenmesinde verim hesaplaması.....	212
Çizelge 4.14 Tannaz ve lakkaz enzim preparatlarının birlikte uygulanmasında 0. ve 24. saat enzim aktivite değerleri, fenolik bileşik giderimi (%), 395 nm’deki 0. ve 24. saat OD değerleri	250

1. GİRİŞ

Endüstriyel gelişim beraberinde çevre sorunlarını doğurmuştur. Çevre sorunları arasında üzerinde en çok durulana ise canlı ekosistemlerini doğrudan etkileyen çevre kirliliğidir. Çevre kirliliği, kısaca ekosistemlerde doğal dengeyi bozan ve insandan kaynaklanan ekolojik zararlar olarak tanımlanabilmektedir. Çevre kirliliği konusu dünyanın genelinde meydana gelen olumsuz değişimlerden ötürü sanayileşen Avrupa ve gelişmekte olan ülkelerin gündemine 1960'lı yıllarda girmiş ve 1970'li yılların başında ivme kazanarak uluslararası platformlarda tartışılır hale gelmiştir (www.cedgm.gov.tr).

Çevre kirliliği dünyada olduğu gibi ülkemizde de her geçen gün artan boyutları ile hava, su ve toprak kirlenmesi olarak önemini korumaktadır. Son zamanlarda plansız sanayileşme sonucu hiç bir önlem alınmadan ve kontrolsüz bir şekilde alıcı ortamlara bırakılan atıkların doğanın kendi dinamikleri içinde dönüşümü çoğu kez mümkün olmadığından çevre kirliliği günümüzde artarak sürmektedir (www.cedgm.gov.tr).

Endüstriyel atıklar sonucu kirlenen çevrenin temizlenmesi kirletilmesinin önlenmesine göre çok daha zor ve pahalı bir uygulamadır (www.zmo.org.tr). Bu sebep ile endüstriyel atıklarının çevre olan zararlarını en aza indiren teknolojiler önem kazanmıştır. Ayrıca bu atıkların yeniden değerlendirilerek hem çevresel etkilerinin ortadan kaldırılması hem de faydalı ürünlere dönüştürülmesi üzerinde durulmaktadır.

Endüstri dalları oluşturdukları baca gazları ile havaya, katı atıklar ile toprağa ve sıvı atıklar ile alıcı ortamlara kirlilik arz etmektedirler. Her endüstri öncelikle kullanılan hammaddelerin kimyasal içeriği ile doğrudan

ilişkili bir atıksu oluşturmaktadır. Bu atıksuların arıtılarak deşarj standartlarına uygun sınırlara getirilmesi gerekmektedir. Ancak atıksuların yapısında bulunan arıtılması zor ve çevreye zararlı etkileri olan bileşikler problem oluşturmaktadır. Bu bileşikler arasında aromatik fenol halkasına sahip bileşikler kapsayan fenolik bileşikler önemli yer tutmaktadır. Fenolik bileşikler, kağıt, kereste, kömür işleme, boya, tekstil, sentetik kauçuk, ilaç, petrol-motorin, zeytinyağı vb. endüstrilerin atıksularında bulunmaktadır. Bu atıksular, alıcı ortamlarda çeşitli çevresel etkilerle sonuçlanan renk değişimi ve zehirlilik problemlerine yol açmaktadırlar (Vinciguerra, et al., 1995; Rao and Viraraghavan, 2002).

Bitkisel yağ endüstrisinde sadece fiziksel yöntemler ile üretilen tek yağ olan zeytinyağı özellikle Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerin ekonomisinde önemli yer tutan bir ihraç ürünüdür. Son 35 yılda büyük çaptaki üretimin artması ile zeytinyağı endüstrisi atıksuyu olan zeytin karasuyunun çevreye olan olumsuz etkisi daha çok fark edilir hale gelmiştir. Zeytin karasu adından da anlaşıldığı gibi sahip olduğu koyu tonlardaki rengi ile alıcı ortamlarda göz ile görünür renk değişimine yol açmakta ve ışık geçirgenliğini engelleyerek güneş ışığının gerektiği ekolojik dengeyi de bozmaktadır. Ayrıca sahip olduğu yüksek organik madde içeriği ile bu ortamlardaki oksijenin hızla tükenmesine ve makro ve mikro canlı yaşamının zarar görmesine sebep olmaktadır. Asidik karakteri, yüksek mineral içeriği ve en önemlisi yapısındaki fenolik bileşikler karasuyun sulama suyu olarak kullanılması halinde toprağın, fitotoksisite ve antimikrobiyal etkilerden dolayı doğal ekosistemini bozmaktadır (Azbar, 2002). Karasuyunun yapısında bulunan antimikrobiyal etkiye sahip fenolik bileşik gruplarından biri tanenlerdir. Tanenler, hidrolize olabilen ve

kondanse tanenler olmak üzere temelde iki alt gruba ayrılmaktadır. Tanenler, antimikrobiyal bileşikler olmalarına rağmen, doğal yaşam süreçlerinde tanenleri metabolize edebilen mikroorganizmalar da mevcuttur. Bu mikroorganizmaların başında *Penicillium* ve *Aspergillus* genusundan bazı türler gelmektedir (Bhat et al., 1998). Zeytin karasuyunun özellikle aerobik biyolojik yöntemler ile fenolik bileşik içeriğinin düşürüldüğü ve renginde açılım sağlandığı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Beyaz çürükçül ve *Aspergillus* suşları karasuyun arıtımında yaygın olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada karasuyun fenolik içeriğinin düşürülmesi ve renginin açılmasında başarılı sonuçlar vermiş olan *Aspergillus* suşları kullanılarak tannaz enziminin funguslarca sentezlenmesinin sağlanması ve tannazın karasuyun arıtılmasındaki etkisinin ortaya konması hedeflenmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Zeytinciliğin, Akdeniz Bölgesinde 4000 yıllık bir geçmişi bulunmaktadır (www.maden.org.tr). Akdeniz ülkeleri olan İspanya, Portekiz, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus ve Fas dünya zeytinyağı üretiminin % 90'nını gerçekleştirmektedirler. Son 10 yılın üretim değerleri incelendiğinde, bu ülkelerin yıllık zeytinyağı üretimlerini arttırdıkları görülmektedir. Ancak İtalya ve İspanya'daki artış diğer ülkelere göre oldukça yüksek seyretmektedir. Bu ülkelerin üretimlerinin yanı sıra Avustralya ve ABD'de de zeytinyağı üretimi hızla artmaktadır. (www.maden.org.tr).

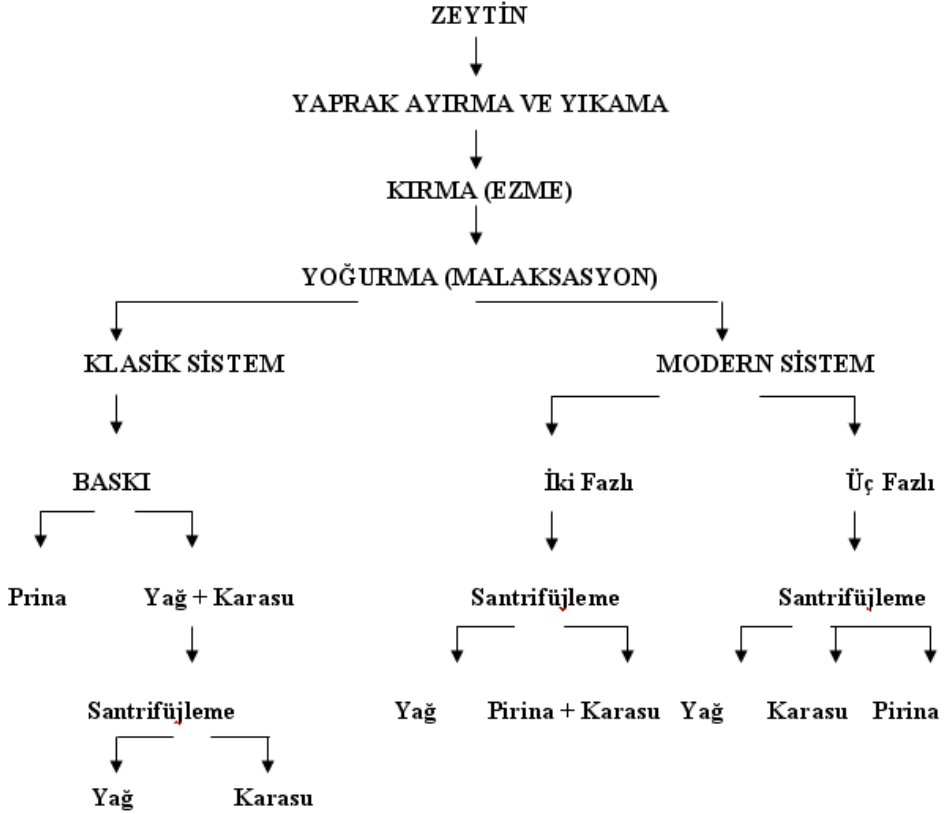
Türkiye'de Ege, Marmara, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde zeytin ağacı yetiştirilmektedir. Bu ağaçların %75.0'ı Ege, %14.0'ı Akdeniz, %9.3'ü Marmara, %1.7'si Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde bulunmaktadır. Türkiye, ortalama 99 bin ton zeytinyağı üretimi ile dünya üretiminin % 4.6'sını, 36.4 bin ton ihracatla ise dünya ihracatının %10'unu karşılamaktadır. İspanya, İtalya ve Yunanistan zeytinyağı üretimi bakımından en büyük üreticiler arasında ilk üç sırayı almaktadır. Türkiye ise dünya zeytinyağı üretiminde 5. sırada bulunmaktadır. 2001/2002 sezonunda ülkemizin zeytinyağı üretimi 200 bin tona ulaşmıştır. Zeytinyağının önemli bir bölümü rafine edilmiş olarak ihraç edilmektedir (www.maden.org.tr; www.maviegemuhendislik.com).

Dünya zeytinyağı üretiminin % 70'i Avrupa Birliği Ülkeleri tarafından tüketilmektedir. Akdeniz ülkeleri de göz önüne alındığında Dünya zeytinyağı tüketiminin % 75'i bu bölgede tüketilmektedir. Diğer taraftan zeytin ve zeytinyağı dünyada ve Avrupa'daki Akdeniz'e kıyısı

olmayan ülkeler için 1970’li yıllar sonrası aranan bir ürün haline gelmiştir. Bugün ABD, Kanada, Avustralya ve Japonya da zeytinyağı tüketen başlıca ülkeler arasında yer almaktadır. Dünyadaki önemli zeytinyağı ihracatçısı olan ülkeler arasında İspanya, İtalya, Yunanistan, Tunus ve Türkiye’dir. İspanya ürettiği yaklaşık 500 000 ton zeytinyağının % 25’ini ihraç etmektedir. Bu oran ülkemizde %15’ler civarında olup yıllara göre geniş bir aralıkta değişiklik göstermektedir (www.maden.org.tr).

2.1 Zeytinyağı Üretimi

Yaklaşık olarak 5 kg zeytinden 1 kg zeytinyağı üretilmektedir. Zeytinyağı üretim prosesi zeytinin kırılarak ezilmesi ve ezilmiş zeytinden posa ve zeytinyağının ayrılması işleminden oluşmaktadır. (Şekil 2.1). Ayırma işlemi sonrasında saf zeytinyağı üretilmektedir. Üretilmiş bu zeytinyağı doğrudan kullanıma sunulabildiği gibi, zeytinyağının pH değeri ve rengi ayarlanabilmektedir. Değişik özelliklerde zeytinyağı üretmek için ise rafineri ve harmanlama işlemleri uygulanabilmektedir (www.maden.org.tr).



Şekil 2.1 Zeytinyağı üretimi ve akım şeması (www.zae.gov.tr).

Zeytinyağının bileşimini esasen triaçilgliseroller ve %0.5-%1.0 gliseridik olmayan bileşenler oluşturmaktadır. Zeytinyağında yer alan major ve minor bileşenler Çizelge 2.1’de sunulmuştur. Ayrıca zeytinyağında, oksidasyona karşı direnç sağlayan en az 30 tane fenolik bileşik olduğu bildirilmektedir. Zeytinyağının fenolik içeriği birçok faktöre bağlı olmakla birlikte temelde yağın üretimi ve depolanma şartlarına bağlı olarak değişmektedir (Tuck and Hayball, 2002).

Çizelge 2.1 Zeytinyağı bileşenleri (www.zae.gov.tr).

Zeytinyağı Bileşenleri	
Major Bileşenler (%99)	Minor Bileşenler (%1)
Sabunlaşan Maddeler	Sabunlaşan Maddeler
Yağ asitleri	α-tokoferol
Oleik Asit (%56–83)	(Vit E)
Linoleik Asit (3.5–20.0)	(12–150 mg/kg)
Palmitik Asit (%7.5–20.0)	
Stearik Asit (% 0.5–5.0)	Steroller
Linolenik Asit (% <1.5)	(180–260 mg/ 100 g yağ)
	β -sitosterol (%96)
Gliseritler	Kampasterol (%3)
Triolein (OOO)	Stigmasterol (%1)
Palmitoil-dioleoil-gliserol (POO)	
Dioleoil-linoleoil-gliserol (OOL)	Fenolik Bileşikler
Palmitoil-oleoil-linoleoil-gliserol (POL)	(30–500 mg/kg)
Stearoil-dioleoil-gliserol (SOO)	Tirazol ve Hidroksitirazol
	Hidrokarbonlar
	(mg/100 g yağ)
	Skualen (136–708)
	β-karoten(3–36)
	Triterpenik Alkoller
	(255 mg/100g yağ)
	Siklo-artenol
	Alifatik Alkoller
	(290 mg/100g yağ)
	Fosfolipitler
	(40–135 mg/kg)
	Renk Vericiler
	Klorofiller (1–10 mg/kg)
	Feofitinler (0.2–24.0 mg/kg)
	Aroma Bileşenleri
	(250–500 mg/kg)

2.2 Zeytinyağı Üretimi Atıkları

Tarıma dayalı endüstrilerin içerisinde, tarımsal ürünün kimyasal bileşimi ile doğrudan ilişkili ve çevreye zararlı atıksular oluşturan endüstri kolları önemli yer tutmaktadır. Bu endüstri kolları, tarımsal ürünlerden kaynaklanan çevre kirliliğinin hızla artmasına sebep olmaktadır (Monteoliva-Sanchez et al., 1996). Zeytinyağı, nişasta, içki, pamuk ağartma ve kağıt işleme endüstrileri, dünya çapında yıllık olarak birkaç milyar litreye ulaşan, renkli, genellikle toksik ve zararlı atık sular oluşturmaktadırlar (Lacina et al., 2003). Zeytinyağı endüstrisinde üretimde klasik (pres) veya sürekli (santrifüj) üretim prosesleri kullanılmaktadır. Ayırma işleminden sonra pirina (zeytin katı atıkları ve zeytin çekirdeği) ve zeytin karasuyu (özsuyu) üretimden oluşan atıklar olarak ortaya çıkmaktadır (web.deu.edu.tr) (Şekil 2.1). Zeytinyağı üretimi sırasında hiçbir ilave kimyasal madde kullanılmamaktadır. Ancak oluşan atıksular yoğun bir kirletici potansiyele sahip olmaktadır (Oktav vd., 2003).

2.2.1 Pirina

Zeytinlerin mekanik yolla yağa işlenmesinden sonra arta kalan katı alt ürün “pirina” olarak adlandırılmaktadır. Pirina, yağı alınmak üzere pirina yağı çıkaran işletmelere gönderilmektedir ve burada çözgen özütlemesi (solvent ekstraksiyonu) ile yağı ayrılmaktadır. Arta kalan yağsız pirina, esas olarak lignin ve selüloz içermektedir. Yüksek ısıl değere sahip olan yağsız prina, kompostanabilinmekte veya yakılabilinmektedir (www.zae.gov.tr; web.deu.edu.tr).

Taze ve işlenmiş pirinanın ortalama bileşimi Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Pirinanın bileşimi (www.zae.gov.tr).

	Taze Pirina	İşlenmiş Pirina
Yağ	6.0 – 9.0	0.1 – 0.3
Çekirdek	42 – 54	9.0 – 11.0
Kabuk	10 -11	20 – 22
Hamur	21 – 33	10 – 15

Üretim yöntemi belirtirmemek ile birlikte 100 kg zeytinden ortalama 15–22 kg zeytinyağı, 35–45 kg pirina; 100 kg pirinadan ortalama 6.0–7.5 kg pirina yağı 60–70 kg kuru pirina elde edildiği bildirilmiştir (www.zae.gov.tr).

2.2.2 Zeytin Karasuyu

Zeytin karasuyu (ZKS); zeytinyağı üretiminin, koyu kırmızı renkli, koyu kahverengi-menekşe tonlarında ve hatta siyah renkte olabilen, organik ve mineral maddeler bakımından zengin, asidik nitelikte, miktarı kullanılan yağ çıkarma sistemine bağlı olarak değişen sıvı alt ürünü olarak tanımlanmaktadır (www.zae.gov.tr). Ayrıca zeytin çeşidine, zeytin ağaçlarının yetiştiği toprak ve iklim özelliklerine, zeytin hasat zamanına ve olgunluk derecesine, pektisit ve gübre kullanımına göre de özellikleri değişmektedir (Oruç, 2002).

Zeytinyağı üretimi atıksuları tipik olarak aşağıdaki yüzde bileşime sahiptir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 Zeytin karasuyunun bileşimi (Şengül vd., 2002).

	% (ağırlık/hacim)
Kuru ağırlık	18.5
Toplam Polifenoller	1.75
Tannik Polifenoller	0.45
Toplam şeker	4.90
Toplam azot	0.13
Protein	0.41
Kolloidler	2.96
Pektinler	0.70

2003 yılı verilerine göre, Türkiye’de zeytinyağı sektöründe dağınık halde bulunan, büyük çoğunluğu klasik sistemle üretim yapan, küçük ölçekli 813 adet yağ işletmesi bulunmaktadır. Son yıllarda işletmelerin kapasitelerinin artması ve modernleşmesi ile sürekli sistemle çalışan işletmelerin sayısında artış görülmektedir. 1982 yılında sürekli sistemle çalışan bir işletme mevcut iken, 1996 yılında bu sayı 154 olmuş ve 1998/99 sezonu itibari ile de 400’e ulaşmıştır. Kullanılan üretim yöntemi oluşan atıksuyunun özelliklerini etkileyen faktörlerde başı çekmektedir (web.deu.edu.tr).

Klasik ve sürekli yöntemle zeytinyağı üretimi yapan tesislerden çıkan ZKS’lerin bileşimleri Çizelge 2.4’te karşılaştırılmıştır.

Çizelge 2.4 Klasik ve sürekli yöntemle zeytinyağı üretimi yapan tesislerden çıkan ZKS'lerin bileşimi (Şengül, 1991).

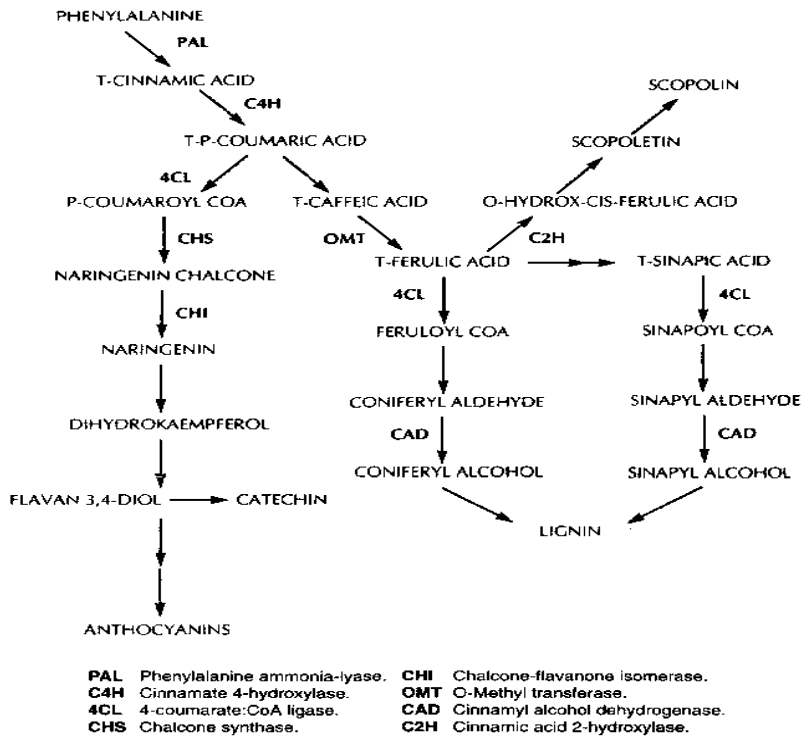
Parametre	Klasik Yöntemde Atılan Karasu	Sürekli Yöntemde Atılan Karasu
pH	4.5–5.0	4.7–5.2
Toplam Katı Madde	%12	%3
Toplam Uçucu Katı Madde	%10.5	%2.6
Toplam Mineral Katı Madde	%1.5	%0.4
Askıda Katı Madde	%0.1	%0.9
Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) (mg/l)	120 000–130 000	40 000
Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı (BOİ) (mg/l)	90 000–100 000	33 000
Şeker	%2–8	%1.0
Toplam azot	%5–2	%0.28
Organik Asitler	%0.5–1.0	-
Polialkoller	%1.0–1.5	%1.0
Pektin, tanen vb.	%1	%0.37
Polifenoller	%1.0–2.4	%0.5
Yağ	%0.03–10.00	%0.5–2.3

Klasik yöntem ile zeytinyağı üretimi yapan işletmelerden çıkan ZKS'nin kirlilik karakteristiği oldukça yüksek olurken (KOİ: 120 000–130 000 mg/l); sürekli yöntemde oluşan ZKS daha seyreltik halde bulunmaktadır (KOİ: 40 000 mg/l). Zeytinyağı üretimindeki son teknolojik gelişmeler sayesinde atıksu miktarı, atıksuyun pirina içinde yer alması sayesinde sıfıra indirilebilmektedir. Bu üretim tekniği avantajlı gibi görünse de, sulu pirinanın yakılması için gereken enerji oldukça yüksek olmaktadır (Rozzi and Malpei, 1996; web.deu.edu.tr). Bu yaklaşım ekonomik açıdan uygun bulunmamaktadır Sorunun ele alınırken öncelikle oluşan ZKS miktarını en aza indirecek ekonomik bir yöntemin geliştirilmesi ve ZKS'nin arıtımında zorluk yaratan organik bileşiklerin yapılarının, etki mekanizmalarının ve arıtımda yarattıkları sorunlarının aydınlatması gerekmektedir. ZKS'nin arıtımında yarattıkları problemlerden ötürü, fenolik bileşikler en çok üzerinde durulan bileşik sınıfı olmuştur.

2.3 Fenolik Bileşikler

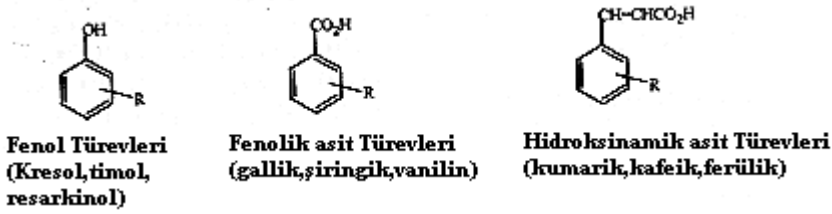
Bitkiler, biyolojik parçalama ve diğer ara ürün metabolizmalarının enerji dönüşümlerinde fonksiyon göstermeyen, geniş çeşitlilikte sekonder metabolitleri sentezleyebilmektedir. Başlıca bitki sekonder metabolitleri; alkaloidler, terpenler ve fenolik bileşiklerdir (www.users.muohio.edu).

Bitkilerdeki bütün fenolik bileşikler aynı metabolik yolağ ile sentezlenmektedir. Fenolik bileşikler, **fenilpropanoit yolağı** olarak da bilinen **şikimik asit yolağını** takip etmektedir (www.ansci.cornell.edu). Antosiyanidinler ve ligninin oluşumdaki ara basamaklar Şekil 2.2’te sunulmuştur.



Şekil 2.2 Fenilpropanoit biyosentez yolağının genel hatları (www.fao.org).

Bitkilerdeki fenolik metabolizma karmaşık olup, bilindik çiçek pigmentlerinden (antosiyanidinler), bitki hücre duvarının karmaşık fenoliklerine (lignin) kadar değişen kapsamlı bileşikler dizisini oluşturmaktadır (www.users.muohio.edu) (Çizelge 2.5).



Şekil 2.3 Basit fenolikler (www.bentham.org).

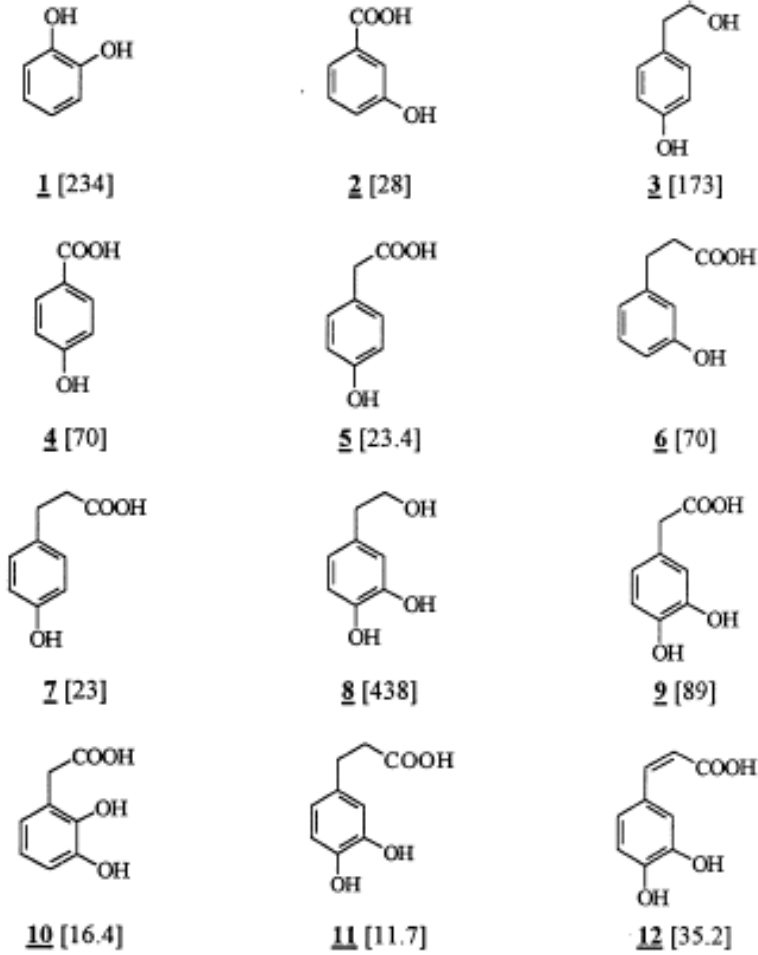
Tek bir fenol halkasına, alkol, aldehit veya karboksilik asit gruplarından birinin, halkada bulunan hidrojenle yer değiştirerek bağlanmasıyla oluşan bileşikler, **basit fenolikler** olarak sınıflandırılmaktadır (www.biology.ualberta.ca) (Şekil 2.3).

Polifenolik bileşikler ise birden fazla fenolik grubun (C_6H_5OH), çeşitli şekillerde bir araya gelerek oluşturduğu, bitkisel metabolitler olarak tanımlanmaktadır (www.tdcolive.net) (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması (www.biologie.unihamburg.de; Ergun Ergül, 2004).

Karbon sayısı	atomunun	Temel iskelet	Sınıf
6		C6	Basit fenoller benzokinonlar
7		C6 - C1	Fenolik asitler
8		C6 - C2	Asetofenon, fenil asetik asit
9		C6 - C3	Hidroksi kinnamik asit, polipropen kumarin, izokumarin
10		C6 - C4	Naftakinonlar
13		C6 - C1 - C6	Ksanton
14		C6 - C2 - C6	Stilbene, anthrakinon
15		C6 - C3 - C6	Flavonoitler, izoflavonoitler
18		(C6 - C3) ₂	Lignanlar, neolignanlar
30		(C6 - C3 - C6) ₂	Biflavonoitler
		(C6 - C3) _n	Ligninler
N		(C6) _n	Katekolmelanin
		(C6 - C3 - C6) _n	(kondense tanenler)

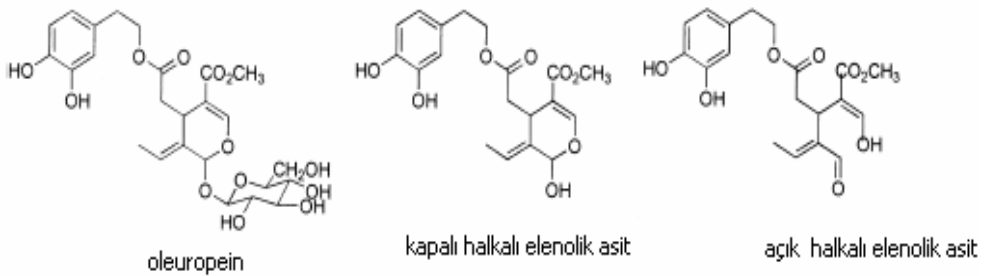
ZKS, hem basit hem de polimerik fenolik bileşikleri içermektedir. ZKS'nin içerdiği basit fenoliklerin, fitotoksik ve antimikrobiyal aktiviteler gösterdikleri bilinmektedir. (Dias et al., 2004). ZKS'de tayin edilmiş basit fenolik bileşikler Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4 ZKS’de tayin edilmiş basit fenolik bileşikler

- (1) Kateşol; (2) 3-hidroksibenzoik asit; (3) tirazol; (4) 4-hidroksibenzoik asit;
 (5) 4-hidroksifenilasetik asit; (6) 3-hidroksifenilpropionik asit;
 (7) 4-hidroksifenilpropionik asit; (8) 3,4-dihidroksifenil etanol (hidroksitirazol);
 (9) 3,4-dihidroksifenilasetik asit; (10) 2,3-dihidroksifenilasetik asit;
 (11) 3,4-dihidroksifenilpropionik asit; (12) 3,4-dihidroksisinamik asit.
 Kare parantez arasındaki değerler her bileşiğin zeytin karasuyundaki mg dm^{-3} olarak verilmiş derişimlerini ifade eder (D’Annibale et al., 1999).

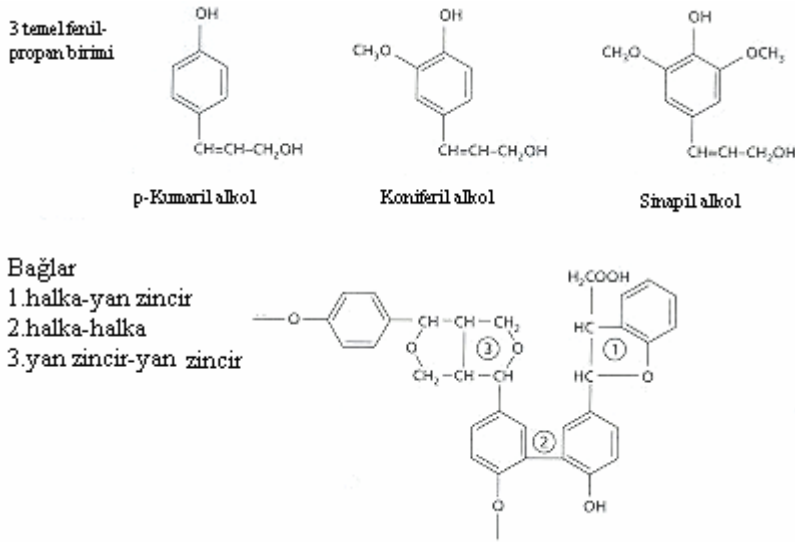
Oleuropein, hidroksitirazol (3,4-dihidroksifenil etanol) ve tirazölün zeytinyağında dolayısıyla da ZKS'de en çok bulunan fenolik bileşikler oldukları ifade edilmektedir. Bu bileşiklerin yapısal olarak birbiriyle ilişkileri bulunmaktadır (Şekil 2.4). Hidroksitirazölün, meta konumunda fazladan bir hidroksi grubuna sahip olması dışında tirazöl ile hidroksitirazölün, yapısal olarak özdeş oldukları gösterilmiştir. Oleuropein ise hidroksitirazöl ve elenolik asitten meydana gelmiş ester yapısındaki bir bileşik olup, bir sekoiridoyit glukozit olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.5). Acı-buruk bir tat veren oleuropeinin, yapraklarda bulunmasının zeytin ağaçlarını hastalık ve zararlılardan koruduğu kaydedilmiştir. Ayrıca zeytin yapraklarından izole edilen kalsiyum elenolatenin de virüs, bakteri ve fungusları yok etme özelliğine sahip olduğunu belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda oleuropein ve hidroksitirazölün, American Type Culture Collection (ATCC)'nin ve bazı klinik bakteriyel suşlara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları kaydedilmiştir (Tuck and Hayball, 2002; www.webnaturel.com).



Şekil 2.5 Oleuropein ve elenolik asidin yapısı (Tuck and Hayball, 2002).

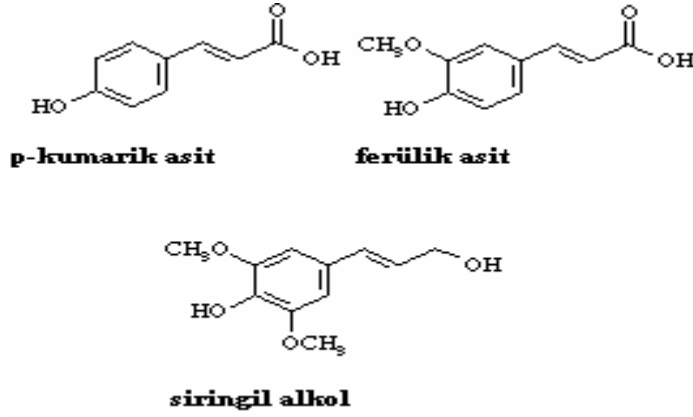
2.3.1 Ligninler

Selülozdan sonra doğada en çok bulunan ikinci biyopolimer olan lignin, bitkilerde sıra ile bağlanmış fenilpropanoit birimlerinin polimerleşerek oluşturduğu yapılardır. Karmaşık, büyük moleküler yapısı ve polisakkaritlerle sıkıca birleşmesi, analizini zorlaştırmaktadır (Kerem et al., 1992; Crennell et al., 2006; www.agbi.tsukuba.ac.jp). Lignin, Şekil 2.6'de basitleştirilmiş şekilde, sadece az sayıda kısımları ve bağlarıyla beraber gösterilmiştir (<http://helios.bto.ed.ac.uk>).



Şekil 2.6 Üç temel fenilpropan birimi içeren basitleştirilmiş bir lignin yapısı. Tüm molekül, karmaşık, binlerce fenilpropanoit birimini içeren, üç boyutlu bir iskelettir. (<http://helios.bto.ed.ac.uk>).

Ligninler üç temel yapı taşından meydana gelmiştir; p-kumarik asit, ferulik asit ve siringil alkol. Bu yapılar Şekil 2.7'de sunulmuştur (www.usm.maine.edu).



Şekil 2.7 Lignin monomerleri (www.usm.maine.edu).

ZKS'deki polimerik fenolik bileşiklerin, arıtımında problem yaratan en inatçı kısmı oldukları bildirilmiştir. Lignin benzeri yapıya sahip olan bu bileşiklerin, esasen ZKS'nin tipik renginden de sorumlu oldukları kabul edilmektedir. Diğer yandan ZKS'de bulunan basit fenoliklerin de (Şekil 2.4), yapısal olarak lignin monomerleri ile benzer oldukları bilinmektedir (Kissi et al., 2001; Dias et al., 2004).

2.3.2 Tanenler

Tanenler, ligninden sonra doğada ikinci en çok bulunan bitkisel fenoliklerdir. (Albertse, 2002). Tanenler;

- ✓ Serbest çoklu fenolik grup içeren yapıya sahip oligomerik yapılardır.
- ✓ Molekül ağırlıkları 500 ile 20 000 Da aralığındadır.
- ✓ Bazı yüksek molekül kütleli yapılar harici, suda çözünebilirler.

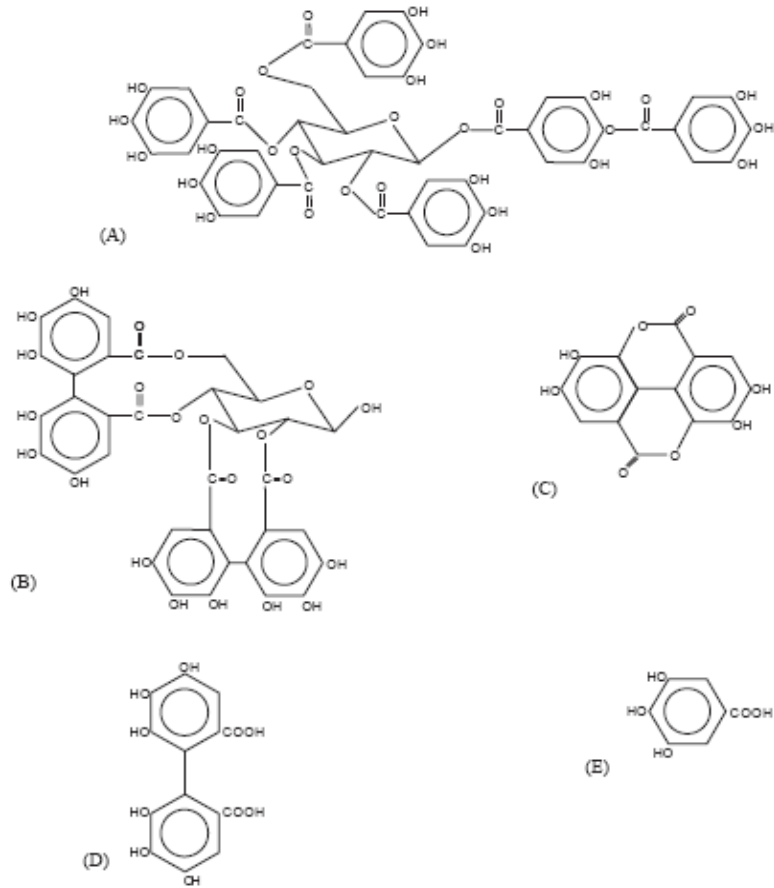
- ✓ Proteinlere bağlanma ve çözünemeyen veya çözünebilen tanen-protein kompleksleri oluşturma yeteneğindedirler. Ayrıca potansiyel metal iyonu şelatlayıcılarıdır.
- ✓ Buruk tat veren, antimikrobiyal ve antioksidan özellik gösteren bileşiklerdir (www.ansci.cornell.edu; www.users.muohio.edu).

Tanenler için çeşitli sınıflandırmalar yapılmaktadır. Ancak genellikle yapılarına bağlı olarak hidrolize olabilen tanenler ve kondanse tanenler olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır (www.ansci.cornell.edu).

2.3.2.1 Hidroliz Olabilen Tanenler

Çekirdek merkezi olarak poliol (genellikle D-glukoz) içeren moleküllerdir (Şekil 2.8). Bu poliollerin hidroksi grupları kısmen veya tümüyle gallik asit (-->gallotanenler) veya elajik asit (-->elaji tanenler) gibi fenolik gruplarla esterleşmiştir. Gallik asit ile esterleşen hidrolize olabilen tanenler **gallotanenler**, elajik asitle esterleşenler ise **elajitanenler** olarak adlandırılmaktadır. Bazı araştırmacılar, iki tane hidrolize olabilen tanen grubundan daha bahsetmektedirler. Bunlardan **taragallotanenlerde** çekirdekte gallik asit ve kinik asit yer alırken, **kafetanenlerde** ise çekirdekte kafeik asit ve kinik asit yer almaktadır.

Hidrolize olabilen tanenler ve ilişkili oldukları bileşikler Şekil 2.8’te verilmiştir.



Şekil 2.8 Hidrolize olabilen tanenler ve bazı bileşenlerinin yapısal olarak karşılaştırılması.

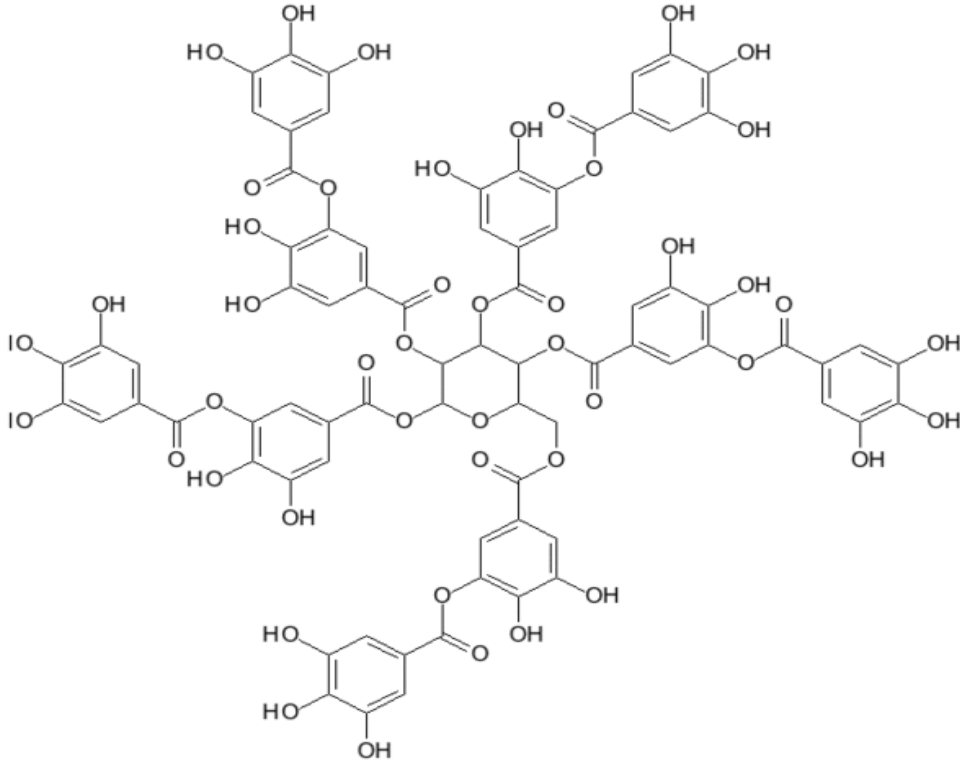
A. Gallotanen,

B. Elajitanenler, C. Elajik asit, D. Hekzahidroksidifenolik asit ve E. Gallik asit (Belmares et al.,2004).

2.3.2.1.1 Gallotanenler

Gallotanenler, elajitanenlere göre daha basit yapıdadırlar (www.users.muohio.edu). Her hidroliz olabilen gallotanen molekülü genellikle çekirdeğinde D-glukoz ve 6 ila 9 galloksi grubundan

oluşmaktadır. Çekirdek ile esterleşen fenolik gruplar, bazen gallik asidin dimerleri veya yüksek oligomerleri tarafından oluşturulurlar (her tek molekül “galloksi” olarak adlandırılır). Gallotanenlerin en bilineni; tannik asit (TA)’tir (www.ansci.cornell.edu) (Şeki 2.9).



Şekil 2.9 Tannik asit

MA 1700.1719; Formül: $C_{76}H_{52}O_{46}$ (www.genome.jp).

2.3.2.1.2 Elajitanenler

Elajitanenler, gallotanenlere göre daha zor kırılabilen C-C bağlarına sahip olan hidrolize olabilen tanen grubudur (Mingshum et al., 2006).

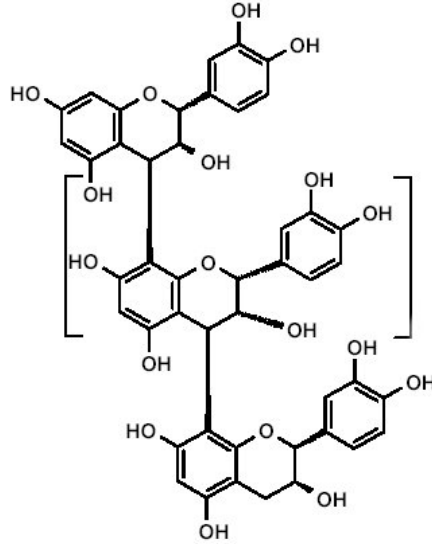
Elajitanenler, gallotanenlerin galloyil gruplarının yükseltgen yarıma reaksiyonları sonucu oluşmaktadırlar (www.users.muohio.edu). Hidrolizlerinde elajitanendeki heksahidroksidifenolik asit ile glukoz arasındaki ester bağları kırılmakta ve daha sonra heksahidroksidifenolik asit elajik aside dönüşmektedir (Shi et al., 2005). Elajik asidin, antitümör, antiperoksidizasyon, antiviral, antioksidasyon, ve antimutajenik etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir (Huang et al., 2005) (Şekil 2.8).

Hidrolize olabilen tanenler, suda az, alkol ve asetonda ise iyi çözünbilmektedirler (www.tr.wikipedia.org). Zayıf asit, zayıf bazlar ve sıcak su ile ayrıca enzim (tannaz) varlığında karbonhidrat ve fenolik asitleri vermek üzere hidrolize olabilmektedirler (<http://www.ansci.cornell.edu>). Bu hidroliz sonucu gallik asit, pirokateşik asit ve şeker gibi suda çözünbilen bileşikler ortaya çıkmaktadır (www.tr.wikipedia.org).

2.3.2.2 Proantosiyanidinler (Kondanse Tanenler)

Bu sınıfa ait tanenlerle, hidrolize olabilen tanenlerden arasındaki önemli fark, şeker içeren bir kısma sahip olmamalarıdır (Albertse, 2002). Kondanse tanenler, hidrolize karşı dirençli karbon-karbon bağlarıyla bağlanmış flavonoit birimlerinin (yani flavan-3-ol) oligomerleri veya polimerleridir (Şekil 2.10). 2 ila 50 arasında veya daha fazla flavonoid birimi içerebilirler. Proantosiyanidin polimerleri karmaşık yapıya sahiptirler. Proantosiyanidinler, sıkıştırılmış kimyasal yapılarından dolayı sıklıkla **kondanse tanenler** olarak adlandırılır. Fakat hidrolize olabilen

tanenler de kondenzasyon reaksiyonuna maruz kalırlar. Kondanse tanen terimindeki karışıklık bundan dolayıdır (www.ansci.cornell.edu).



Şekil 2.10 Kondanse tanen (www.staff.science.uva.nl).

Antosiyanidin pigmentleri, çiçeklerde, yapraklarda, meyvelerde, meyve sularında ve şaraptaki pembe, kırmızı, leylak rengi, menekşe rengi ve mavi renklerinin geniş bir dizisinden sorumludurlar. Ayrıca meyve ve şaraplara buruk tat vermektedirler. Kimyasal yapılarına ve polimerizasyonun seviyesine bağlı olarak, proantosiyanidinler sulu organik çözümlerde çözünür veya çözünmez (www.ansci.cornell.edu).

Hidrolize olabilen tanenlerin ve kondense tanenlerin özelliklerini birleştiren bir ara tanen grubu daha vardır. Bu tanen sınıfı “**kateşin tanenler**” olarak adlandırılmaktadır (Graham,1992). Çizelge 2.6’da tanenlerin hidroliz ürünleri karşılaştırılmıştır.

Çizelge 2.6 Tanenlerin hidroliz ürünlerinin karşılaştırılması (Halsam and Taner, 1970).

Hidrolize Olabilen Tanenler	Kateşin Tanenler	Kondanse Tanenler
1. Gallotanenler- Hidrolizleri gallik asit ve glukozu verir.	Kateşin ve epikateşin galatlar- Hidrolizleri kateşin, epikateşin ve gallik asidi verir.	Polimerik proantosyanidinler - Hidrolizleri flavan - 3, 4- diyoller ve flavan- 3 – oller gibi flavonoit monomerlerini verir.
1. Elajitanenler- Hidrolizleri elajik asit ve glukozu verir.		

Tanenler genellikle bitkilerin kök, odun, kabuk, yaprak ve meyvelerinde bulunmaktadır (www.tr.wikipedia.org). Hidrolize olabilen tanenler genelde bitkilerde az miktarda bulunurken, proantosyanidinler, doğada hidrolize olabilen tanenlere göre daha yaygın dağılmış olarak rastlanmaktadır. Kateşin tanenler en çok çay yaprağında bulunmaktadır (Graham,1992).

Zeytin, tanence zengin bir bitkidir (www.archwing.com). Zeytinin bünyesinde bulunan kimyasal bileşiklerin, zeytinin sıkılması esnasında ZKS'ye geçebileceği düşünüldüğünde, tanenlerin de ZKS'nin de organik içeriğinde yer alması beklenmektedir. Nitekim, Sayadi et al., (2000), ZKS'nin biyolojik olarak arıtılmasında sorun oluşturan fenolik bileşikleri tayin etmek amacı ile ZKS'yi ultrafiltrasyon ile kısımlara ayırdıktan sonra GC/MS (gaz kromatografisi/kütle spektrofotometresi) ve jel filtrasyonu ile bu kısımların karakterizasyonunu yapmıştır. ZKS'deki fenolik bileşikler molekül kütlelerine göre, düşük molekül kütleli polifenoller ($F_1 < 8$ kDa), orta molekül kütleli polifenoller ($8 \text{ kDa} < F_2 < 8$ kDa) ve yüksek molekül

kütleli polifenoller ($60 \text{ kDa} < F_3$) olarak üç kısma ayrılmıştır. ZKS'nin F_1 kısmının hidrolize olabilen ve kondense tanenler ile birlikte monomerik flavonoitleri ve antosiyanidinleri içerdiği bildirilmiştir.

2.4 Zeytin Karasuyunun Çevresel Etkisi ve Arıtımındaki Güçlükler

Ortalama olarak 1 ton zeytinin zeytinyağına işlenmesi sonucu açığa çıkan ZKS miktarı; kullanılan yöntemle göre $0.5\text{--}1.5 \text{ m}^3$ arasında olabilmektedir. Klasik sistem ($0.5\text{--}1.0 \text{ m}^3/1 \text{ ton zeytin}$), modern sisteme ($1.0\text{--}1.5 \text{ m}^3/1 \text{ ton zeytin}$) göre daha az, fakat daha konsantre ZKS oluşturmaktadır (Paraskeva and Diamadopoulos, 2006). Bu her yıl sezonluk üretim sonucu ciddi miktarda atık suyun oluşması anlamına gelmektedir ($3.0 \times 10^7 \text{ m}^3/\text{yıl}$) (Sayadi and Ellouz, 1995). ZKS yüzyıllardır mevcut olmasına rağmen çevreye verdiği zararlar son zamanlarda ön plana çıkmıştır. Bunda etkili olan sebepler şunlardır:

- ✓ Son 30 yılda zeytinyağı üretiminin fark edilir derecede artması,
- ✓ Önceleri işletmelerin küçük olması ve atıksularını direkt olarak araziye boşaltması; günümüzde ise işletmelerin daha büyük olması ve arıtma tesisi çıkışlarının kanalizasyona bağlanması,
- ✓ Devletin, geçmişe göre çevresel problemlere karşı hassasiyetinin artmasıdır (Rozzi and Malpei, 1996).

ZKS, süregelen araştırma ve elde edilen bulgulara rağmen arıtımın hedeflenen seviyeye ulaşmadığı bir atık su olmayı sürdürmektedir. ZKS arıtımında yaşanan güçlüklerin en önemli nedenleri ise,

- ✓ Yüksek organik içeriği ($100\text{--}220 \text{ g KOİ/l}$) ve $\text{KOİ} / \text{BOİ}$: $2.5\text{--}5.0$ oranına sahip olması (düşük oranda ayrışabilir),

- ✓ Geniş aralıkta değişen içerik değerlerine sahip olması,
- ✓ Asidik yapısı,
- ✓ Sezonluk üretim yapılması ve bir üretim sezonunun yaklaşık 2 ay sürmesi,
- ✓ Bakteriosit bileşikler içermesi (fenolik bileşikler; oleuropein),
- ✓ Fazla miktarda yağ kalıntısının ve askıda katının varlığıdır (www.tdcolive.net; www.biomatnet.org).

ZKS, evsel nitelikli atıksular ile karşılaştırıldığında çok daha yoğun bir kirliliğe sahip bulunmaktadır (Azbar vd., 2002) (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.7 ZKS'nin evsel atıksu ile karşılaştırılması (www.biomatnet.org).

Parametre	Zeytin Karasuyu	Evsel Atıksu
pH	4.5–6.0	7.0–7.5
KOİ (g/l)	15–220*	0.25–1.00*
BOİ (g/l)	23–100	0.1–0.4
Toplam Katı (g / l)	1–103	0.35–1.20
Yağ ve Gres (g/l)	1–23	0.05–0.15
Fenolik bileşikler (g/l)	0.02–80.00	-
Toplam Azot (g/l)	0.3–1.2	0.020–0.085

*ZKS, evsel atıksuya göre KOİ cinsinden 200 kat daha yoğundur.

ZKS, bu yüksek kirlilik karakteristiği nedeniyle, acilen çözülmesi gereken çevresel problemler arasında yer almaktadır (Oktav ve Özer, 2004). Zeytinyağı üretiminde başı çeken ülkeler arasında, Akdeniz'e kıyısı olan gelişmiş Avrupa ülkeleri yanında gelişmekte olan ülkeler de (Tunus ve Türkiye gibi) bulunmaktadır. Bu sebepten dolayı geliştirilen arıtım sisteminin ekonomik boyutu ve uygulanabilirliği öne çıkmaktadır.

Türkiye ekonomisinde de zeytinyağı bir ihraç ürünü olarak geniş yer tutmaktadır. Küçük işletmelerin çoğunlukta olduğu ülkemizde, geliştirilen

arıtım sisteminin, ekonomik maliyetinin düşük ve her işletme için uygulanabilir olması büyük önem taşımaktadır.

2.5 Zeytin Karasuyu Arıtımında Kullanılan Yöntemler

Evsel ve endüstriyel atıksular için geliştirilmiş bütün arıtım prosesleri ZKS'ye denenmiştir. Çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerin ZKS'ye uygulanması hala gözden geçirilmektedir. Ancak sezonluk bir atıksu olan ZKS'nin arıtılabilmesi için ekonomik ve kolay uygulanabilir bir yöntem tam anlamıyla ortaya konulamamıştır. İçerdiği fenolik maddelerin antibakteriyel etki göstermesi sebebiyle biyolojik arıtılmasında bir takım zorluklar söz konusuysa, fiziksel ve kimyasal arıtımında ise kısıtlı ölçüde başarı elde edilebilmiştir (Rozzi and Malpei, 1996; Coşkun ve Akbaş, 2000; İnan vd., 2002). ZKS'nin tek bir yöntemle arıtılmasının mümkün olmadığı ve birden çok yöntemin ardışık olarak uygulanmasının gerekliliği üzerinde durulmasına rağmen, ZKS için geliştirilmiş fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlere aşağıda yer verilmiştir.

2.5.1 Fiziksel ve Fizikokimyasal Yöntemler

Uygulamada fiziksel ve kimyasal yöntemlere, arıtılacak olan endüstriyel atıksu yüksek toksisiteye sahipse veya biyolojik olarak ayrışamayan atıkları içeriyorsa başvurulmaktadır. Çünkü klasik biyolojik atıksu arıtma yöntemleri, bu durumda yetersiz kalmaktadır (Oktav ve Özer, 2002). ZKS için arıtılmasında denenmiş fiziksel ve fizikokimyasal

yöntemler, klasik yöntemlerin yanında, ZKS için yapılmış özel tasarımları da içermektedir.

2.5.1.1 Yüzeyde Tutunma (Adsorpsiyon)

Bu yöntem, suda bulunan çözünmüş organik kirliliklerin giderilmesi amacıyla kullanılmaktadır. ZKS'ye renk veren, biyolojik olarak ayrışamayan veya biyolojik arıtımı inhibe edici bileşikler adsorbsiyon yöntemi kullanılarak aktif karbonla giderilebilmektedir. Ancak aktif karbonun yeniden kullanımı mümkün olmamaktadır. Adsorpsiyon yönteminde kullanılan aktif karbon yakıldığı için çok fazla katı atık oluşmaktadır. Bu atıkların yanması sonrasında oluşan yanma gazları da zehirlilik arz etmektedir. Ayrıca yetişmiş personele ihtiyaç duyulmaktadır. Tüm bunlar adsorpsiyon metodunun kullanımında karşılaşılan dezavantajları arasında yer almaktadır (Oktav ve Özer, 2002).

2.5.1.2 Lagünlerde Buharlaştırma

Zeytinyağı üretimi, yılın belli zamanlarında yapılmaktadır. Dönemsel üretimin söz konusu olduğu gıda endüstrilerinde genellikle atıksuların lagünlere verilip buharlaştırılarak arıtılması yoluna gidilmektedir. Bu yöntem, İspanya'da Çevre Koruma Otoriteleri tarafından ZKS'nin alıcı ortama verilmesini önlemek amacı ile uygulanmaktadır. Lagün hacimleri 2 ton zeytin için 1 m³ olarak öngörülmüştür (Kasırga, 1988; Oktav ve Şengül, 2003). Geniş alanlara ihtiyaç duyulması ve bu alanların her zaman yağ fabrikalarının yakınında bulunamaması nedeni ile, atıksuların

lagünlere taşınma sorunu ortaya çıkmış, ayrıca sızma tehlikesi sonucunda yeraltı suyunun kirlenme riski oluşmuştur. Bu sebep ile ZKS'nin lagünlerde buharlaştırılmasına karşı çıkmaktadır. Portekiz'de yapılan bir çalışmada ise, yüksek kirliliğe sahip ZKS'nin arıtımında, bir alternatif olarak, buharlaştırma panelleri kullanılmıştır. Genellikle yüksek KOİ'ye sahip atıksuların arıtımında kullanılan sistemde, plakaların üzerinden geçen ZKS filmi ile yarı doygun hava akımı arasındaki kütle transferi esasına dayanmaktadır. 30° eğimli plakalardan oluşan sistemde, etkili bir katı/sıvı faz ayrımı gözlenmektedir. Sıcaklık, rüzgâr gibi doğal faktörler sayesinde ayrılan sıvı kısım buharlaşmakta, katı kısım ise plakaların üzerinde kalmaktadır. Katı kısmın plakalardan sıyrılarak gübre amaçlı değerlendirilmesi mümkün olmaktadır (Duarte and Neto, 1996; Oktav ve Şengül, 2003).

Birden fazla ön arıtımın yönteminin ardışık olarak uygulandığı bir çalışmada ZKS'nin santrifüjleme, süzme, havalandırma gibi yöntemlerle ön arıtımı incelenmiştir. Ham atıksuyun santrifüjlenmesiyle elde edilen KOİ giderme verimi % 25–41 iken örneklerin pH'sı 2'ye getirildiği zaman elde edilen verim % 45-47'ye çıkmıştır. Örnek, 24 saat boyunca çökteldikten sonra üst suyu ayrılıp süzüldüğünde ise %30 verim sağlanmaktadır. Havalandırma denemelerinde ise ön arıtmadan geçirilmiş olan ZKS ile çalışılmıştır. pH ayarlaması ve santrifüjleme sonrası uygulanan havalandırmada, 5 saat sonunda ulaşılan KOİ giderme verimi % 59 iken, süzme sonrası havalandırmada veriminin % 53 olarak bulunduğu belirlenmiştir. ZKS'nin fiziksel ön arıtımında en uygun arıtım için, örneği asidik hale getirme, santrifüjleme ve havalandırma işlem adımlarının sırasıyla takip edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Oktav ve Özer, 2004).

2.5.1.3 Vakumlu buharlaştırma

ZKS'nin arıtımında vakumlu buharlaştırma 1997 yılında İtalya'da yapılan bir çalışmada uygulanmıştır. Buharlaştırma, vakumlu evaporatörde, Basınç: 5 kPa; Sıcaklık: yaklaşık 38 °C (100 °F) koşullarında gerçekleştirilmektedir. Evaporatörde iki akım oluşmaktadır. Bunlar distilat (sürekli üretilmektedir) ve konsantre kısım (kesikli deşarj edilmektedir) olarak adlandırılmaktadır. Distilat, KOİ, 3000–4000 mg/l olan renksiz bir sıvı olup, C/N/P oranı ve pH ayarlaması sonrası biyolojik arıtıma tabii tutulmaktadır. Böylece arıtılmış su deşarj standartlarını sağlayabilmektedir. Konsantre kısım ise sulu formda olan, genellikle pirina ile karıştırılarak içeriğinde yağın geri kazanılması için sistemin başına geri döndürülmektedir. Bu sistemin inşa edilmesi kolaylığı üzerinde durulmakta ve ön ve ileri arıtım için rahatlıkla kullanılabileceği bildirilmektedir (Şengül vd., 2002).

2.5.1.4 Damıtma (Distilasyon)

ZKS'nin distilasyon metoduyla arıtımı konusu da değişik araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Oktav vd., (2001), yapmış oldukları laboratuvar ölçekli çalışmada, distilasyon yönteminin sürekli üretimden gelen ZKS'lere uygulanabilirliğini incelemişlerdir. KOİ konsantrasyonu 96000 mg/l olan ZKS numunesinden 600 ml alınarak, distilasyon işlemi uygulanmaktadır. İlk 50 ml, ikinci 50 ml ve son 400 ml'lik distilattan numuneler alınarak KOİ değerleri ölçülmektedir. Sırasıyla % 26, % 74 ve % 87 KOİ giderme verimleri elde edildiği bildirilmektedir. Vitolo et al.,

(1999) ZKS'nin arıtımı için distilasyon yöntemini kullanmışlardır. Elde edilen distilatın KOİ konsantrasyonu istenen deşarj standartlarını sağlayamadığı için bu suyun distilasyonu takiben biyolojik artıma yöntemlerinden birisi ile arıtılması önerilmektedir. Ayrıca, distilasyon düzeneğinde kalan katı fazın, bu düzeneğe enerji sağlamak amacıyla yakılması mümkün olabilmektedir (Oktav ve Şengül, 2003).

2.5.1.5 Membran Filtrasyonu

ZKS'nin arıtımında, kaba filtrasyondan sonra membran filtrasyon yöntemi (ters osmoz veya ultrafiltrasyon) kullanılabilir. Membran filtrasyonda ZKS iki faza ayrılır. Ön arıtmadan geçirilmiş ZKS, membran filtrasyon ünitesinden geçirildikten sonra; permeat (arıtılmış su) ve çamur (konsentrat veya retentat) elde edilir. Çamur; düzenli depolama alanına veya yakma tesisine gönderilebilir (Oktav ve Özer, 2002).

Membran proseslerin kullanımında karşılaşılan en önemli sorun, derişim faktörünün sınırlayıcılığıdır. Bu yöntemde atıksular distilasyon prosesine kıyasla daha az derişik olmaktadır. Ayrıca oluşan katı ve sıvı kısmın elden çıkarılmadan önce başka bir işlemde geçirilmesi gerekmektedir. Sıvı kısmın KOİ derişiminin kabul edilebilir seviyenin üzerinde olduğu da bildirilmektedir (Rozzi and Malpei, 1996; Oktav ve Özer, 2002).

ZKS'nin arıtımı için, bir Alamn-Hellenic ortaklığı olarak yürütülen bir proje kapsamında, Buharlaştırma, Hidroliz, Yükseltgeme, Ultrafiltrasyon (**EHO**-Evaporation, Hydrolase, Oxidation) Yöntemi uygulanmıştır. EHO Yöntemi, buharlaştırma, hidroliz ve yükseltgenme

kademelerinden oluşmaktadır. ZKS içeriğindeki bileşikler, kontrollü bir ısı verilmesi ile önce hidrolize edilmekte ve daha sonra ise hava ile okside edilmektedir. Proses aşağıdaki belirtilen basamakları kapsamaktadır:

- ✓ Çamurun giderimi: Çamurun yağ ekstraksiyonu veya yakıt olarak kullanımı,
- ✓ Kalıntı yağlı bileşiklerin atıksudan uzaklaştırılması için, seramik ultrafiltrasyon membran ünitesinin kullanımı,
- ✓ EHO ünitesinde, ZKS'deki fitotoksik etki oluşturan bileşiklerin uzaklaştırılması ve konsentratın yağ ekstraksiyonu veya yakıt olarak kullanımı veya gübre eldesinde kullanımı,
- ✓ Permeatın membran ünitesinden geçirilerek arıtılması ve arıtılmış suyun üretime geri döndürülmesi veya daha fazla arıtım için başka bir arıtma ünitesine gönderilmesi.

Bu tesisin kurulum maliyetinin yüksek olduğu, ancak kurulduktan sonra, tesisten elde edilen yağ ve gübre satışından sağlanan kazanç nedeni ile uygulanabilir olduğu bildirilmiştir (Şengül vd., 2002).

2.5.1.6 Elektroliz Yöntemi

Bu yöntem, anotta titanyum/platinyum, katotta ise paslanmaz çeliğin kullanıldığı bir elektrolitik yükseltgenme metodudur. Bu metodun ZKS için kullanımı hala laboratuvar ölçeğiyle sınırlı bulunmaktadır. Laboratuvar ölçekli oluşturulan kesikli sistem, 10 saat süre ile elektroliz yaptığında, sırasıyla %93.0 KOİ, %80.4 toplam organik bileşik, % 80.4 uçucu katı madde ve %99.4 toplam fenolik bileşik giderimi sağlanmaktadır. Bu yöntemin en önemli dezavantajı çok pahalı olmasıdır. 3 saatte 4.73

kwsaat/kg enerji gerekmektedir. 10 saatlik elektroliz süresi için 15 kwsaat/kg enerji ihtiyacı bulunmaktadır. Bu da 1 m³ su için 15000 kwsaat enerji tüketimi demektir. Distilasyon prosesinde dahi 700 kwsaat/m³ civarında enerji ihtiyacı olması, elektroliz yönteminin ZKS'nin tamamen yükseltgenmesi için uygun bir yöntem olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, bu yöntem ZKS'den toksik bileşiklerin giderilmesi için, ön arıtım olarak sunulabileceği bildirilmiştir (Oktav ve Özer, 2002).

Fiziksel ve fizikokimyasal yöntemlerin ZKS'ye uyarlanması, kullanılan yöntemlerin genellikle ZKS'yi hedeflenen deşarj standartlarına getiremedikleri veya ekonomik açıdan uygun olamadıkları sonucuna varılmıştır.

2.5.2 Kimyasal Yöntemler

ZKS için geliştirilmiş olan fizikokimyasal yöntemlere dayalı proses tasarımları incelendiğinde, enerji gereksinimi, ilk kurulum masrafı ve geniş çapta uygulanabilirliği yönünden dezavantajları göze çarpmaktadır. Oysa kimyasal yöntemler, ZKS'de bulunan bileşiklerin kimyasal affinitesine dayanan ve çoğunlukla uzmanlık gerektirmeyen yöntemlerdir. Kullanılan kimyasal maddenin, ucuz, kolay tedarik edilebilen (mümkünse bir atıktan sağlanan) ve toksik olmaması ise önem taşımaktadır. Bu yöntemler iki başlık altında incelenmektedir:

2.5.2.1 Kimyasal Cökeltim

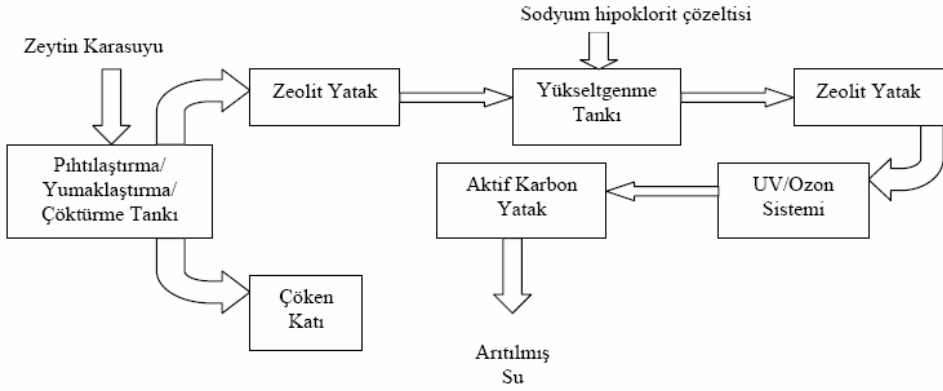
ZKS'nin kimyasal arıtımı amacı ile kullanılan kimyasal bileşiklerden bazıları FeCl_3 , H_2SO_4 , HCl ve Ca(OH)_2 'dir. Yapılan arıtılabilirlik çalışmalarında koagülant olarak genellikle Ca(OH)_2 kullanılmaktadır. Lolos et al., (1994), %28 askıda katı madde, % 77 yağ-gres giderme verimi, Tsonis et al.,(1989), %20-30 KOİ giderme verimi, Aktaş vd., (2001), % 42-46 KOİ, % 29-47 toplam katı madde, %41-53 uçucu katı madde, % 95-96 yağ-gres, % 63-74 polifenolik bileşik, %61-80 azot giderme verimlerini elde ettikleri kaydedilmektedir (Oktav ve Özer, 2002).

Mitrakas et al., (1996), yaptıkları çalışmada ZKS'ye H_2SO_4 ilavesi ile pH seviyesini pH 2'ye getirilmiş, asidik hale getirilmiş olan ZKS santrifüjleyerek yağ-gres ve KOİ giderme verimleri incelemiştir. Bu işlemler sonrasında elde edilen giderme verimleri % 47 yağ-gres, %68 KOİ olarak hesaplanmıştır (Oktav ve Özer, 2002).

2.5.2.2 Kimyasal Yükseltgenme

Hidroksil radikallerini açığa çıkararak KOİ ve fenolik bileşik gideriminin sağlandığı ozonlama veya ileri oksidasyon teknikleri, ZKS için de kullanılabilir. Beltrán et al., (1999), yapmış oldukları çalışmada, ozon, H_2O_2 ve UV kombinasyonunu bir alternatif olarak sunmaktadır. 3–4 g ozon, 10^{-3} M H_2O_2 derişiminde, 254 nm UV radyasyonunun kullanıldığı çalışmada % 80–90 KOİ giderme verimi sağlanmıştır 0.5 g ozon uygulandığı zaman hem fenolik bileşik içeriği hem de renk hemen hemen tamamen giderilmektedir (Oktav ve Özer, 2002).

Zeytinyağı işletmeleri arasında küçük işletmelerin sayısı da yadsınmayacak düzeydedir. Dağınık halde bulunan bu işletmeler için, ilk yatırım maliyetinin düşük olduğu ve fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal (ileri yükseltgeme teknikleri) yöntemlerin bir arada uygulandığı bir sistem geliştirilmiştir. İlk aşamada ZKS, pıhtılaştırma- yumaklaştırma-çöktürme işlemlerinin gerçekleştirileceği tanka alınmaktadır. Bu tankta ZKS önce pıhtılaştırma bölmesine alınarak pH değeri toz kireç ile istenen değere getirilmekte ve bu değerle tutulmaktadır. Daha sonra ZKS yumaklaştırma bölmesine alınmaktadır ve burada atıksuyun karakteristiğine göre belirlenen miktar ve özellikte yeni geliştirilmiş olan toz polimer çözeltisi eklenerek sudaki çözünmüş ve askıda bulunan katıların yumaklaşması sağlanmaktadır. Yumaklaşma aşamasından sonra ZKS çöktürme bölmesine alınarak bekletilmekte ve böylece çöktürme işlemi tamamlanmaktadır. Bu bölmede çökelen katı tankın altından alınmaktadır. Çökelen katı alındıktan sonra üstte kalan sıvı, zeolit yataktan geçirilmekte ve yükseltgeme tankına alınmaktadır. Yükseltgeme tankına alınan sıvı, sodyum hipoklorit çözeltisi eklenerek ve havalandırma yapılarak yükseltgenmektedir. Bu aşamadan sonra arıtılmış su önce bir zeolit yataktan sonrada bir UV/ozon sisteminden geçirilmektedir. Bu işlem ardışık olarak veya dolaşımla yapılabilmektedir. Son olarak arıtılmış su klor giderimi amacıyla bir aktif karbon yataktan geçirilmektedir. Bu yöntem ile, KOİ, fenolik bileşikler, BOİ₅, AKM ile yağ ve gres giderimi % 98–100 seviyelerinde gerçekleşmektedir. Deneme tesisinden çıkan arıtılmış ZKS'nin, "Kanalizasyona Deşarj Standartlarına" uygun olduğu saptanmıştır (İkizoğlu ve Haskök, 2005) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 ZKS'nin arıtımı için geliştirilen kombine sistemin akış şeması

2.5.3 Biyolojik Yöntemler

Fizikokimyasal yöntemlerin, yüksek yatırımlar gerektirmesi, uygulanabilirliği ve sürdürülebilirliği zor olan çözümler olmaları (Bkz. Bölüm 2.5.1), zeytinyağı üretiminin mevsimsel karakteri ile tezat oluşturmaktadır. Havalandırma lagünleri ve aktif çamur prosesi gibi geleneksel biyolojik arıtım yöntemleri ise ZKS'nin sahip olduğu kirleticilerin giderimde etkili olamamaktadır (Vinciguerra, et al., 1995; D'Annibale, et al., 1998). Bundan dolayı, bu kirleticilerin üstesinden gelebilecek biyolojik yöntemler, fenolik bileşik içeriğini düşürdüklerinden ve ZKS'yi çevreye daha zararsız hale getirdiklerinden araştırmaya değer bulunmuştur (Borja et al., 1995; Martínez et al., 1992; García et al., 2000).

2.5.3.1 Anaerobik Yöntemler

Anaerobik arıtım, havasız ortamda organik maddelerin asit ve metan üreten bakteriler tarafından ayrışmasını gerçekleştiren biyokimyasal bir prosestir (www.istanbul.edu.tr). Anaerobik arıtım sonucunda, organik maddeler, CH₄, CO₂ ve NH₃ gibi inorganik maddelere dönüştürülmektedir (www.biltek.tubitak.gov.tr). Anaerobik süreçler, KOİ derişiminin 1500 mg/l' den büyük olduğu atıksuların arıtımında kullanılmaktadır. ZKS'nin anaerobik arıtımın bazı avantajları vardır. Bunlar;

- ✓ Düşük miktarda atık çamur oluşması (aerobik arıtmıdan 20 kat daha az),
- ✓ Birden çok mikroorganizma çeşidinin bir arada kullanılması ile proses kontrolünün daha kolay sağlanması,
- ✓ Enerji elde edilebilmesi (biyogaz) ve
- ✓ ZKS'nin sezonluk bir atık olması ile bire bir örtüşen, aylarca besleme yapılmasa dahi kolaylıkla yeniden işletmeye alınabilme özelliğidir (Oktav ve Özer, 2002).

ZKS'nin anaerobik arıtımın dezavantajları ise başlangıçta seyreltme yapılmasının şart olmasıdır. Çünkü içeriğindeki aromatik bileşenler ve lipidler metan bakterileri üzerinde toksik etki yaratmaktadır (Filibeli ve Büyükkamacı, 2002). Seyreltme çoğu zaman bir çözüm gibi görünse de mevcut atığın hacmini arttırdığı için ve büyük ölçekte uygulanabilirliği olmadığından kabul görmemektedir.

Seyreltme yerine, anaerobik arıtım öncesi, aerobik ön arıtım aşamasının kullanılması bu sorunu çözmede iyi bir alternatif olarak sunulmaktadır. *Aspergillus niger* (Hamdi, 1991), *Aspergillus terreus*, *Geotrichum candidum*, *Azotobacter chroococcum* (Borja et al., 1995),

Phanerochaete chrysosporium (Gharsallah et al., 1999), *Lentinula edodes* (D'Annibale et al., 1998) ve *Pleurotus ostreatus* (Fountoulakis et al., 2002) bu amaç ile denenen mikroorganizmalar arasındadır. Aerobik ön arıtımın, ZKS'nin toksik etkisini azaltmakta, metan bakterilerinin daha iyi çalışmasını sağlayacak ortam koşullarının oluşturulmasında rol üstlenmektedir.

ZKS'nin arıtımında anaerobik lagünleme, anaerobik kontakt proses, yukarı akışlı anaerobik çamur yatak reaktör (UASB) ve anaerobik filtreler kullanılabilir. Fakat ZKS'nin arıtıldığı gerçek ölçekte bir tesis mevcut değildir. Çalışmalar pilot tesis ve laboratuvar ölçeğinde kalmıştır (Filibeli ve Büyükkamacı, 2002). ZKS'nin kesikli biyoreaktörde anaerobik arıtımı için geliştirilen sistemde, 1 l ZKS'den 57.1 l metan üretilmiştir. Fakat anaerobik kültürün 15–25 günlük adaptasyon periyoduna ihtiyaç duyması ve depolama masraflarını arttırması uygulanabilirliğini azalmıştır (Erguder et al., 2000). Anaerobik arıtım uzun süreler gerektiren bir proses olduğundan, yağ işletmesinden çıkan ZKS'nin bir süre depolanması gerekmektedir. Ayrıca oluşan biyogazın da nasıl depolanıp, taşınacağı tasarlanmalıdır. Küçük ölçekteki işletmelerin sektörde baskın olduğu düşünüldüğünde, ilk kurulum maliyeti yüksek olan bir sistemin yaygınlaşması mümkün değildir. Bu ve benzer sebepler, anaerobik arıtımın büyük ölçekte kullanımında engel teşkil etmektedir.

2.5.3.2 Aerobik Yöntemler

ZKS'nin çevreye olan zararlı etkisi, zeytinyağı üretimi için kullanılan üretim yöntemi ile doğrudan ilişkili olan ve 1.5–8.0 g/l aralığında değişen

fenolik bileşiklere bağlanmaktadır. Bu atıksuyun yarattığı diğer bir problem ise; farklı polimerizasyon seviyelerine sahip, ligninle ilişkili kromoforik maddelerden (renk verici madde) ileri gelen koyu renge sahip olmasındandır (D'Annibale, et al., 1996). Bu yüzden, araştırmalar, bu gruptan olan bileşikleri parçalama yeteneğindeki mikroorganizmalar üzerine yoğunlaşmıştır (García et al., 2000). Her mikroorganizmanın kompleks bir besi ortamına verdiği metabolik cevap spesifik olduğundan, farklı organizmaların ZKS'de denenmesi hala ilgi çekici bir araştırma konusu olmayı sürdürmektedir. Bu mikroorganizmaların ZKS'ye uygulandığı birçok çalışma yürütülmüştür. 2000 yılı sonrası olan yayınlar Çizelge 2.8'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.8 Zeytin karasuyunun biyolojik artımında kullanılmış mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Artım Koşulları ve Üretim Ortamı	Amaç Funguslar	Sonuçlar	Referans
	29°C	Beyaz Çürükçül Mikroorganizmalar	Toplam fenolik bileşik giderimi	
	250 ml erlen (standk) ZKS		Otoklavlanmış, %50 ZKS (%78.3)	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Otoklavlanmış Isıl işlem (120°C, 1 atm) (100°C)		Isıl işlem, %50 ZKS (%66.7)	
LGAM P69	%50 ZKS %100 ZKS	<i>Pleurotus ostreatus</i> LGAM P69'in ZKS'deki fenolik bileşikleri parçalamaya yeteneğinin incelenmesi ve bu ön artım işleminin anaerobik ortam üzerine etkisinin değerlendirilmesi	Isıl işlem, %100 ZKS (%64.7)	
	Toplam KOİ (1053737 ± 13870 mg/l)		Çözümün KOİ giderimi Otoklavlanmış, %50 ZKS (%10.0)	Fountoulakis et al., 2002
	Çözümün KOİ (581977 ± 1750 mg/l)		Isıl işlem, %50 ZKS (%12.0)	
	BOI ₅ (477807 ± 1570 mg/l)		Isıl işlem, %100 ZKS (%9.0)	
	Toplam fenolik bileşik içeriği: (10.2 ± 0.14 mg/l)			
	Çözümün fenol (8.2 ± 0.09 mg/l)			
	Artım Tankı			
<i>Phellinus pomaceus</i>	Seyreltilmiş ZKS KOİ (139,448 mg/l)	Karınayık organik bileşiklerin depolimerizasyonu için aktif çamur	KOİ (170.098 mg/l)	
	BOI ₅ (74,230 mg/l)	proses öncesi ön artım	BOI ₅ (122.794 mg/l)	Arexta et al., 2003
	Toplam fenolik bileşik içeriği (576 mg/l)		Toplam fenolik bileşik içeriği (581 mg/l)	
	30°C, 8 gün			
	250 ml erlen (standk)			
	Seyreltilmiş ZKS	Central Composite Design (CCD) yöntemi kullanılarak, banyo lifine immobilize edilmiş <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ile ZKS'nin arıtılması için deneysel bir model geliştirilmesi	Geliştirilen ikinci dereceden modelle beklenen maksimum değerler:	
	[%20, 30, 40 (hacim/hacim) ZKS]		KOİ giderimi (%64)	Ahmadi
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 1557	Maya özütü: 5 g/l		Toplam fenolik bileşik giderimi (%88)	
	(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.25, 0.5, 0.75 g/l)		Renk açılması (%48)	et al., 2006
	Glukoz (3.5, 7.0 g/l)		Aromatik bileşiklerin giderimi: (%39)	
	Toplam fenolik bileşik içeriği (5.2 g/l)			

Çizelge 2.8'in devamı

Mikroorganizma	Artım Koşulları ve Üretim Ortamı	Anaç <i>Penicillium</i> Türleri	Sonuçlar	Referans
<i>Penicillium</i> P4	28°C, 120 çalkalama hızı, 20 gün. 250 ml erlen (statik-çalkamalı) Seyreltilmiş ZKS Toplam fenolik bileşik içeriği (1.6 ± 0.18 g/l)	Biyokütle üretimi ve anti bakteriyel etkinin giderilmesi	Kuru Ağırlık (21.50 g/l) KOİ (% 60.75) Renk açılması (%80.20) Toplam fenolik bileşik giderimi (% 54.50)	Robles et al., 2000a
Mayalar				
<i>Geotrichum candidum</i>	3 gün 10 l havalandırılabilir biyoreaktör (0.5 vvm) Taze ve depolanmış ZKS (NH ₄) ₂ SO ₄ (1 g/l) Taze ZKS KOİ (120.0 g/l) Depolanmış ZKS KOİ (160.0 g/l)	Renk açılması	Taze ZKS KOİ (%65) Renk açılması (%75) Depolanmış ZKS KOİ (%25) Renk açılması (%0)	Assas et al., 2002
<i>Trichosporon cutaneum</i>	28°C, 8 gün 500 ml erlen Mineral ortamı eklenmiş Fenol-katesol-diğer fenol karboksilik asitlerin karışımı ve ZKS'ni fenolik kırmı KOİ (19-72 g/dm ³)	Organizma izolasyonu; Fenol-katesol-diğer fenol karboksilik asitlerin ve ZKS'ni fenolik kırmının parçalanması	KOİ (>%80) Toplam fenolik bileşik giderimi (>%80)	Chitroun et al., 2004
Bakteriler				
<i>Lactobacillus plantarum</i>	37 °C, Erlen, Anaerobik, Taze ZKS KOİ (150 g/l), Maya özütü (1 g/l).	Renk giderimi ve fenolik bileşikleri parçalanması	% 10 Seyreltilmiş ZKS Renk açılması (%58) KOİ (% 55) Toplam fenolik bileşik giderimi (% 46) Aromatik bileşikleri parçalamada en iyi suşlar:	Lamia and Mektar, 2003
<i>Comamonas</i> (suş AV1A)	30°C, 150 devir/dakika, 3 gün	ZKS'den aerobik bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve sentetik monosiklik aromatik bileşiklerin karışımının parçalanması	<i>Comamonas</i> (suş AV1A)	Di Gioia et al., 2002
<i>Ralstonia</i> (suş AV3BG)	100 ml erlen Mineral ortamı ve sentetik monosiklik aromatikler karışımı			
<i>Pseudomonas</i> (suş AV2A)				
<i>Sphingomonas</i> (suş AV6C)			<i>Sphingomonas</i> (suş AV6C)	

Çizelge 2.8'in devamı

Mikroorganizma	Arıtım Koşulları ve Üretim Ortamı	Amaç	Sonuçlar	Referans
Algler				
<i>Scenedesmus quadricauda</i> no. 76 (I)	5 gün, 25°C, pH 6.2 Alg yoğunluğu: 4x10 ⁶ hücre/ml Aydınlatma: 100 µE/m ² .s %10 ZKS	Fenolik bileşik giderimi	1:2 seyreltilmiş ters osmoz uygulanan ZKS % fenolik bileşik giderimi	Pinto et al., 2003
<i>Ankistrodesmus braunii</i> no. 202.7a (II)	Toplam fenolik bileşik içeriği (1.5 g/l) 1:2 seyreltilmiş ters osmoz uygulanan ZKS Toplam fenolik bileşik içeriği (1.0 g/l) Mikrotropik Kültür,	Serbest hücre İmmobilize hücre	A [*] K [†] (I) (II) (I) (II) 42 ± 35 55 48 ± 2 1 ± 1 ± 3 22 ± 26 29 38 ± 2 1 ± 2 ± 2	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> , Chich 8H Emerson.	30°C, 180 çalkalama hızı, pH 6.5, 55 W m ⁻² aydınlatma şiddeti, Kesikli fotobiyoreaktör (1 vvm) seyreltilmiş ZKS (%5-20)	ZKS'nin organik içeriğinin duyurulması, algal biyokütle ile yağ asitleri ve pigmentlerin sentezlenmesi	% 5 ZKS Protein içeriği (%20)	Sanchez et al., 2001
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 64314 (I)	Kesikli karıştırırmalı biyoreaktör Biyoreaktör /Çalışma Hacmi: 5 l/4l Azot Kaynağı (g/l) NH ₄ NO ₃ : 6 (NH ₄) ₂ SO ₄ : 4 Karıştırma hızı: 500devir/dakika	Seçilen mikroorganizmaların	KOI giderimi (%) (I) (II) (III) (IV) 75 73 63 46 Toplam fenolik bileşik giderimi (%) (I) (II) (III) (IV)	Garcia et al., 2000
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9142 (II)	Sıcaklık: 26°C, pH (4.5-6.5) Havalandırma hızı: 2 l/dakika KOI (82 000 mg/l)	ZKS'nin fenolik bileşiklerin giderilmesini ve kinetik davranışlarının incelenmesi	92 76 64 1 Toplam orto-difenolik bileşik giderimi (%) (I) (II) (III) (IV)	
<i>Aspergillus terreus</i> (III)	Toplam fenolik bileşik içeriği (1200 mg/l)		100 82 76 9	
<i>Geotrichum candidum</i> UAMH 6257 (IV)	Toplam orto-difenolik bileşik içeriği (200 mg/l)			

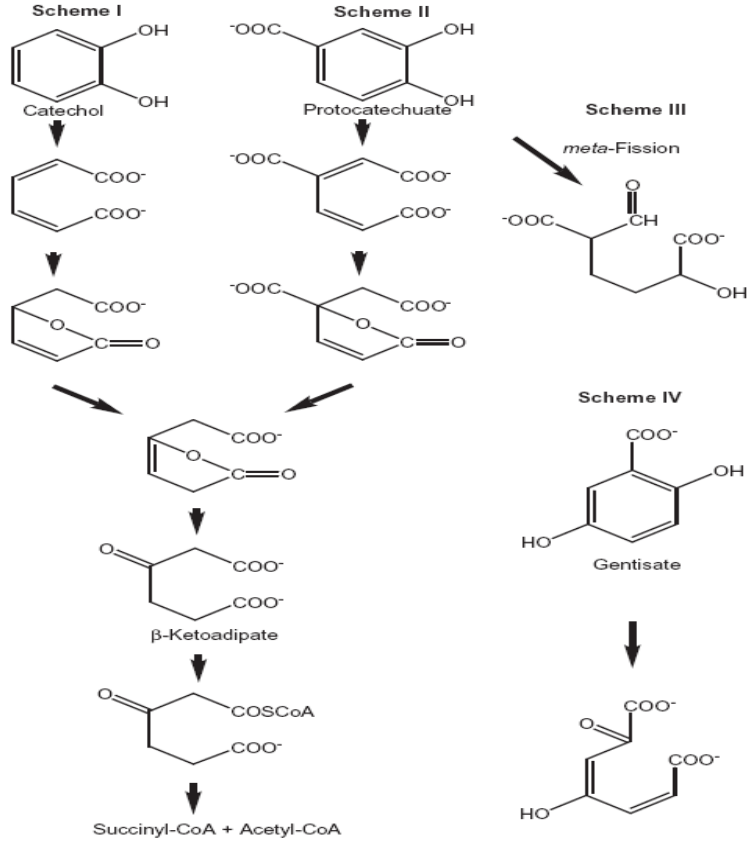
* Aydınlanlık

† Karanlık

Çizelge 2.8 incelendiğinde ZKS’de büyüme yeteneğindeki mikroorganizmaların kendilerine özgü giderimler sağladığı göze çarpar. ZKS’de meydana gelen bu biyodönüşümlerden mikroorganizmalarca sentezlenen bir takım enzimler sorumludur. Aromatik bileşiklerin, özellikle fungal yol ile parçalanmasında yer alan enzimler, organik atıkların biyoremediasyonunda ve biyolojik parçalanması için ilgi çekici olmuştur (Ramírez-Coronel et al., 2003). Bu enzimlerden, lakkazın da içinde bulunduğu ligninolitik enzimler en çok incelenen grubu oluşturmaktadır.

2.6 Ligninolitik Enzimler

Odunsu bitkilerin bileşeni olan ligninin, birçok mikroorganizma tarafından parçalanmaya karşı dirençli olduğu bilinmektedir. Beyaz çürükçül funguslar, geniş aralıktaki kirletenleri de içine alan, lignin ve diğer karmaşık ve biyolojik olarak zor bozunabilen bileşikleri yükseltgeyen çeşitli hücre dışı enzimleri üretebilmektedirler (www.nato.int). Bazı enzimler, yükseltgen olarak hidrojen peroksidi oluştururken, bir kısmı ise elektronları taşımaktadır. Bu enzimlerin işlevi, tek elektronların, lignin molekülüne taşımını içeren enzimatik yükseltgenme olup, daha sonra bu elektronlar, kontrolsüz zincir reaksiyonlarında, molekülün diğer kısımlarına taşınarak, polimerin parçalanmasını sağlamaktadırlar (<http://helios.bto.ed.ac.uk>) (Şekil 2.12). Bu enzimler; mangan peroksidaz, lignin peroksidaz ve lakkazdır.



Şekil 2.12 Lignin bozunma yolağı (<http://pubs.usgs.gov>).

2.6.1 Lignin peroksidaz (EC 1.11.1.14, ligninaz veya diarilpropan: hidrojen peroksit oksidoredüktaz)

Demir içeren lignin peroksidaz, hidrojen peroksitten (H_2O_2), iki elektron alıp daha sonra bunları tek elektronlar olarak lignin molekülüne geçirmektedir (Arora and Gill, 2000; D'Annibale et al., 2004b).

2.6.2 Mangan peroksidaz (EC 1.11.1.13; Mn(II): hidrojen peroksit oksidoredüktaz)

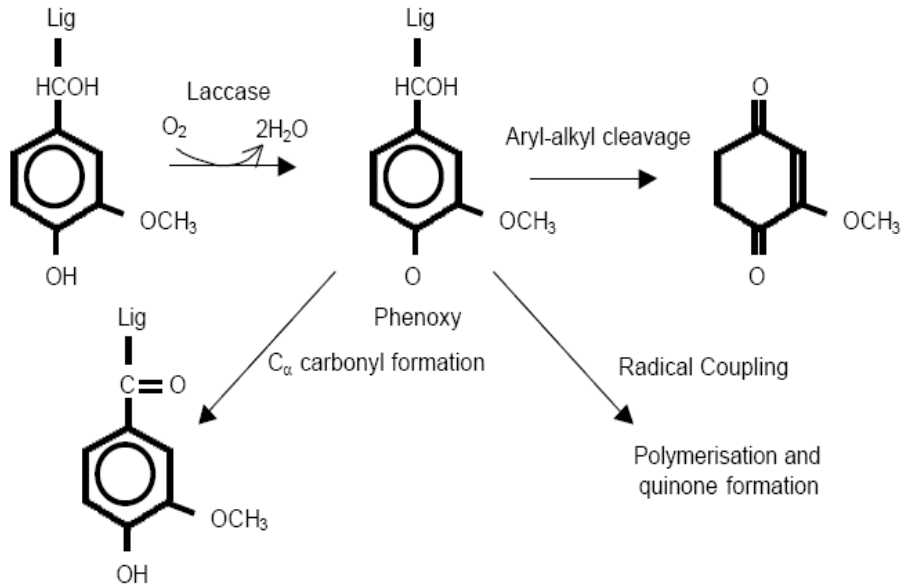
Lignin peroksidaz ile benzer şekilde etki etmektedir. Fakat mangani (H_2O_2 'den) elektronların lignine taşınımında ara ürün olarak yükseltgemektedir (Arora and Gill, 2000; D'Annibale et al., 2004b).

2.6.3 Lakkaz (EC 1.10.3.2; para-benzendiyol: oksijen oksidoredüktaz veya fenol oksidaz)

Lakkaz, fenolik olan ve fenolik olmayan bileşiklerin yükseltgenmesini katalizleyen mavi bakır oksidazların bir üyesidir (Arora and Gill, 2000). Her lakkaz molekülünde dört adet bakır atomu vardır. Bu bakırlar üç farklı çeşitte olup, UV/görünür spektrofotometre kullanılarak ayırt edilebilmektedirler (Palonen, 2004). Lakkaz, oksijenin dört elektronunun suya verilip, indirgenmesinin de aynı anda gerçekleştiği, mono-, di- ve polifenoller, aminofenoller, metoksifenoller, aromatik aminler ve askorbatı içeren, geniş kapsamlı organik ve inorganik sübstratların bir elektron yükseltgemelerini katalizlemektedir (Pazarlıoğlu et al., 2004).

Substrat açısından çok yönlülüğü, lakkazı birçok uygulama için ilgi çekici hale getirmiştir (Kiiskinen, 2004). Lakkaz, boyaların oksitlenmesinde, lignin ve lignosülfonatların polimerizasyonunda, şıra ve şarap hazırlanmasında ve atıksu arıtımında, pamuğun geleneksel olarak beyazlatılmasının geliştirilmesinde ve son zamanlarda kotların yıkanmasına kadar değişen yaygın uygulamalara sahiptir (Pazarlıoğlu et al., 2004).

Lakkaz oksijen varlığında ortamda bulunan aromatik bileşiğinin yükseltgenmesini sağlarken reaksiyon mekanizması peroksidazlarınkine benzemek ile birlikte, koenzim gerekmemekte, sadece moleküler oksijen yeterli olmaktadır. Lakkazı peroksidazlara göre daha kullanışlı kılan hidrojen peroksit ihtiyacı duymamasıdır (Vermette, 2000). Bu özelliğinden dolayı doğrudan lignini yükseltgeyebilmektedir (<http://helios.bto.ed.ac.uk>). Lakkazın enzimatik reaksiyonu sonucu serbest radikal oluşmaktadır. Substratın bir elektron yükseltgenmesi sonucu oksijenin dört elektron indirgenmesinin reaksiyon mekanizması ise aydınlatılamamıştır. İlk ürün kararlı olmadığı için enzimce katalizlenen ikinci bir yükseltgenmeye veya polimerizasyon, hidrasyon gibi enzimatik olayan reaksiyona uğramaktadır (Şekil 2.13) (Vermette, 2000).



Şekil 2.13 Lignine ait fenolik grupların lakkazca katalizlenen yükseltgenmeleri (Bar,2001).

Doğada yaygın olarak bulunan bir enzim olan lakkaza, bitki ve fungusların yanında bazı bakteri ve böceklerde de raslanmıştır (Kiiskinen, 2004). Ancak izole edilip, karakterizasyonu yapılan lakkazların çoğunluğu fungal kaynaklıdır (Palonen, 2004). Fungal lakkaz, Askomisetler, Deüteromisetler ve Basidamisetler'den izole edilmişse de lignin parçalanması üzerine olan çalışmalar, beyaz çürükçül Basidamisetler'e odaklanmamıştır (Bar, 2001). Farklı kaynaklara ait lakkazın fonksiyonu tümü ile ortaya konulamamıştır. Lakkazın, ligninin parçalanmasının yanında, sekonder metabolizmada pigment biyosentezinde yer aldığı tespit edilmiştir (Scherer and Fischer, 2001). Lakkazın yer aldığı diğer fizyolojik fonksiyonlar arasında bitkilerde lignin biyosentezi ve meyve kısmının oluşumu; mikroorganizmalarda ise sporlanma ve patojen davranıştan sorumlu olması sayılabilmektedir (Palonen, 2004).

Günümüzde özellikle odun parçalayan ve lignin ile ilişkili bileşikleri metabolize edebilen funguslara dayalı, düşük maliyetli biyolojik yöntemler gözden geçirilmektedir (Vinciguerra, et al., 1995). Beyaz çürükçül funguslar ve sentezledikleri ligninolitik enzimlerin, endüstriyel atıksuların ve çevresel kirletici olan geniş aralıktaki ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundaki olası uygulamaları son zamanlarda artarak önem kazanmıştır (Kissi et al., 2001). ZKS, parçalanmaya karşı dirençli fenoliklerce zengin bir atıksuyudur (Robles et al., 2000b) ve bu atıksudaki fenolik bileşiklerin yapısının lignin ile benzerliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Jaouani et al, 2006). Beyaz çürükçül funguslar başta olmak üzere ligninolitik enzim sentezleyebilen funguslar ile ZKS'de yürütülmüş çalışmalarda, ligninolitik enzim aktivitelerinin yanında, KOİ ve toplam fenolik bileşiklerin giderimi ile renk açılımı sağlanmıştır. Fungusların

ZKS'nin arıtımındaki etkinlikleri, arıtımı hedeflenen ZKS'nin kimyasal içeriği başta olmak üzere, fungusun türüne, suşa ve arıtım koşullara göre farklılık göstermektedir. ZKS'nin biyolojik olarak arıtılmasında etkili olan ligninolitik enzimlerin sentezlendiği tayin edilmiş, 2000 yılı sonrasındaki çalışmalar Çizelge 2.9'da sunulmuştur.

Çizelge 2.9 Zeytin karasuyunun artımında etkili olan ve funguslarca sentezlenen ligninolitik enzim veya enzimler

Mikroorganizma	Artım Koşulları ve Üretim Ortamı	Amaç	Edili olduğu tıyım edinmiş enzimler	Sonuçlar	Referans
<i>Coriophila polyzona</i> (NCTC 38443)	30°C, 100 ml, 100 g/l Toplam fenolik bileşik içeriği (3.5 ± 0.3 g/l) KOH (101 ± 5 g/l) OD ₄₉₀ = 0.320, OD ₄₉₀ = 0.246 (100 kez seyreltilmiş) OD ₄₉₀ = 0.346 (1000 kez seyreltilmiş)	ZKS'nin reaksiyon açılması için fungusun lignolitik enzimlerinin indüksiyonu ve sentezlenmesi	Lac MnP LiP	Enzim Aktivite Değerleri (U/l) ZKS ₁ (D) ₁ 21 (D) ₂ 0 MnP 55 114.12 Lac 16 48.23 ZKS ₂ (D) ₁ 453.33 (D) ₂ 453.33 % Renk Açılımı (OD ₄₉₀) ZKS ₁ 89.00 58.82 ZKS ₂ 41.67 0	Jacuzzi et al., 2006
	KOH (g/l) 15 ZKS ₁ 50 A: 0.05 g maya özütü, 1 g KH ₂ PO ₄ ve 2.2 mM L-azotik asit diünyum tuzı (D) ₁ : A + 5 mM veratril alkol (D) ₂ : A + 10 mM veratril alkol + MnSO ₄ (100 µM Mn ²⁺)				
	28°C, 100 g/l kalıtıma hızı 250 ml erlen (ilk dört gün azotlu -yapılmalısı) %1.5 agar veya %2.9 PDA* (ağır/bacını) ile karıştırılmış ZKS (%20-5%100) KOH (130.5 g/l), OD ₄₉₀ = 21.2				
<i>Enuc-1</i>	Toplam fenolik bileşik içeriği (4.0 g/l) Sıcaklık: 30°C, pH: 6.0 500 ml erlen Sevreltilmiş ZKS KOH (62 g/l) Karbon kaynakları: Gliserol (g/l) veya	ZKS'nin biyolojik parçalanması	Lac MnP LiP	%20 ZKS + PDA KOH giderimi (% +5) Toplam fenolik bileşik giderimi (% 90) Renk açılması (% 73) ZKS+gl+20mM dar+va KOH giderimi (%) 49 Toplam fenolik bileşik giderimi (%) 41 Renk açılması (%) 65 LiP aktivitesi (U/l) ZKS+gl+20mM dar+80	Dias et al., 2004
	Ghiroz (g/l) (10g/l) Azot kaynakları: L-glutamat (20mM azot); diünyum tartrat (dar) (2/20 mM azot) Veratril alkol (va): 0.4 mM				
<i>Geotrichum candidum</i>		renk açılmasından sonraki LiP in türetilmesi için optimum koşulların değerlendirilmesi	LiP		Ayad et al., 2005

Mikroorganizma	Arıtım Koşulları ve Üretim Ortamı	Amaç	Ethili olduğu tayin edilmiş enzimler	Sonuçlar	Referans
<i>Lentimula edodes</i> (suş SC-495)	28°C, 80 çalkalama hızı, 10 gün, Inokulum miktarı: 0.45 g/l, Erlen Seyretilmemiş ZKS KOİ (43 000 mg/l) Renk Birimi: 24 000 Toplam fenolik bileşik içeriği (3.7 g/l) Toplam orto-difenolik bileşik içeriği (1.2 g/l)	ZKS'nin fitotoksik etkisinin azaltılıp, çevreye zararsız hale getirilmesi	Lac	<u>KOİ giderimi (%)</u> 67 ± 2 <u>Toplam fenolik bileşik giderimi (%)</u> 88 ± 5 <u>Renk açılması (%)</u> 70 Lac aktivitesi (IU/ml) 2.8 ± 0.2	D'Annibale et al., 2004a
<i>Panus tigrinus</i> CBS 577.79	<u>%50 ZKS</u> KOİ (85 000mg/l) Toplam fenolik bileşik içeriği (5.5 g/l) % 0.5 sülkroz + %0.1 maya özütü (ağırlık/hacim) Sıcaklık: 28°C <u>Derin Kültür</u> Inokulum büyüklüğü: 0.9 g/l Havalandırma hızı: 1 vvm <u>Karıştırılmalı tank biyoreaktörü (I)</u> Biyoreaktör /Çalışma Hacmi: 3l/2l Karıştırma hızı: 500devir/dakika Çözünmüş oksijen: %100 <u>Hava Kaldırılmalı Biyoreaktör (II)</u> Biyoreaktör /Çalışma Hacmi: 3l/2.5 l Katı Kültür <u>Döner Varil Biyoreaktör (III)</u> Biyoreaktör Hacmi: 20l 700 g parçalara ayrılmış mısır koçanı Nem içeriği: %65 Dönüş hızı: 4 devir/gün	ZKS'de hücre dışı Lac ve MnP üretimi	Lac MnP	<u>Enzim Aktivite Değerleri (U/l)</u> <u>Lac</u> 4600 370 ± 15 <u>MnP</u> 4300 410 ± 22 1309 292 ± 12	Fenice et al., 2003

Çizelge 2.9'un devamı

Mikroorganizma	Artırma Koşulları ve Üretim Ortamı	Amaç	Etkili olduğu tayin edilmiş enzimler	Sonuçlar	Referans
	28°C, 180 çalkalama hızı, 13 gün 250 mL erlen				
	ZKS ₁ ZKS ₂	ZKS'nin organik yükünün düşürülmesi, renk ve zararlı fenolik bileşimlerin giderilmesi	Lac MnP		
	KOI (mg/l) 85 000 43 000			ZKS ₁ ^u 123 ± 10 ZKS ₂ ^{uv} 187 ± 130	D'Amibale et al., 2004 b
	Toplam fenol içeriği: (g/l)	5.5 2.9		± 6.4	
	Renk Birimi	2700 2500		ZKS ₁ 1510 ± 89 ZKS ₂ 1510 ± 89	
	% 0.5 sakkaroz + %0.1 maya özütü (ağırlık/hacim)			ZKS ₁ ^z 3400 ± 130 ZKS ₂ ^z 3400 ± 130	
	(ZKS ₁ ^z , ZKS ₁ ^{uv} , ZKS ₂ ^z , ZKS ₂ ^{uv} , ZKS ₂ ^z)			ZKS ₁ ^u 890 ± 32 ZKS ₂ ^{uv} 1790 ± 57	
<i>Penus nigritus</i> CBS 577.79	Sıcaklık: 28°C İnokulum büyüklüğü: 0.9 g/l Karıştırma tank biyoreaktörü (I) Biyoreaktör /Çalışma Hacmi: 3l/2l Karıştırma hızı: 500devir/dakika Havalandırma hızı: 1 vvm Çözünmüş oksijen: %100 Hava Kaldırma Biyoreaktör (II) Biyoreaktör /Çalışma Hacmi: 3L/2L Havalandırma hızı: 0.3 vvm ZKS KOI (43 000 mg/l) Toplam fenol içeriği: (2.9 g/l) Renk Birimi: 2500	Karıştırma ve havalandırmanın, ZKS'nin organik yükünün azaltılmasına olan etkisinin incelenmesi	Lac MnP	KOI giderimi (%) (I): 60.4 (II): 60.9 Toplam fenolik bileşik giderimi (%) (I): 84 (II): 97.2 Renk açılması (%) (I): 76 (II): 75 Enzim Aktivite Değerleri (IU/l) Lac MnP (I) 3900 ± 249 (II) 4300 ± 23	D'Amibale et al., 2006

^z ZKS^z: Besin takviyesi yapılmış; ZKS^u: Aşıkada katı maddesi uzaklaştırılmış; ZKS^{uv}: Besin takviyesi yapılmış ve aşıkada katı maddesi uzaklaştırılmış

Çizelge 2.9'un devamı

Mikroorganizma	Arıtım Koşulları ve Üretim Ortamı	Amaç	Etkili olduğu tayin edilmiş enzimler	Sonuçlar	Referans
Statik Kültür					
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725	Düşük Molekül Kütelli Polifenoller ($F_1 < 8$ kDa) Orta Molekül Kütelli Polifenoller (8 kDa $< F_1 < 8$ kDa) Yüksek Molekül Kütelli Polifenoller (60 kDa $< F_1$)	Ultrafiltrasyonla kızamlara ayrılmış ZKS ile biyolojik artırımın zorlaştırıcı ve/veya inhibe eden fenoliklerin belirlenmesi	MnP LiP	LiP Aktivitesi (µkat/ml) F_1 kısmı F_2 kısmı 7.85 (5. gün) 1.86 (6. gün)	Sayadi et al., 2000
<i>Phanerochaete flavidol-alba</i> FPL 106507	250 ml erlen ZKS ZKS'nin monomerik aromatik bileşenleri (I) ve kahverengi polimerik pigment (II)	ZKS'nin ve fenolik bileşenlerinin fungusun hücre dışı ligninolitik enzimlerine olan etkisi	Lac MnP	Hücre Dışı Enzim Aktivitesi (nmol/dakika.ml) Lac MnP ZKS 22.00 884.62 (I) 11.17 - (II) 10.50 1182.69	Ruiz et al., 2002
<i>Pleurotus ostreatus</i> , (suş ATCC 34675) ve yeni izole edilmiş diğer <i>Pleurotus</i> türleri	26 ± 1°C, 110 devir/dakika 250 ml erlen ZKS (%10, 25, 50, 75, 100) Katı Kültür Sıvı Kültür (%10 agar) KOİ (140 g/l), BOİs (50 g/l) Toplam fenolik bileşik içeriği (3.4 g/l)	ZKS'nin fenolik bileşik giderimi	Lac	Toplam fenolik bileşik giderimi (% 76) Lac aktivitesi: 110.3 ± 40.3 U/l (0.089 U/mg protein)	Tzioulpas et al., 2002

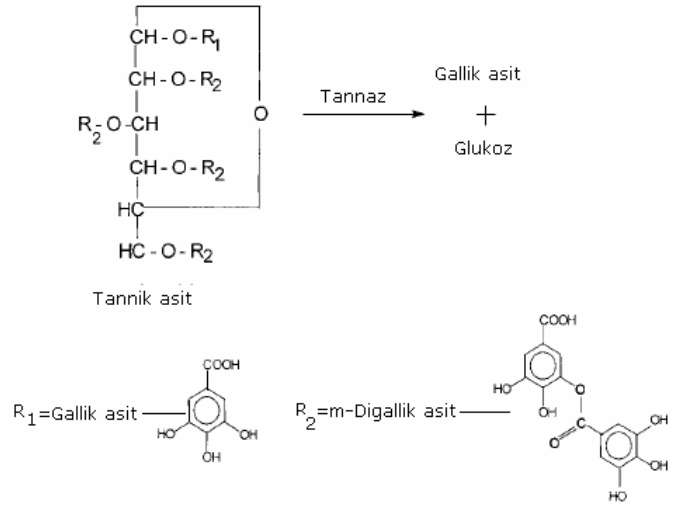
Çizelge 2.9'un devamı

Mikroorganizma	Arıtım Koşulları ve Üretim Ortamı	Amaç	Etkili olduğu tayin edilmiş enzimler	Sonuçlar	Referans
	26 ± 1°C Karıstırılmalı tank biyoreaktörü Biyoreaktör Hacmi: 3l			% Toplam fenolik bileşik giderimi (I) (II)	
<i>Pleurotium ostreatus</i> suş LGAM P113 (I)	Karıstırma hızı: 200± 2 devir/dakika Havalandırma hızı: 1 vvm, pH: 6.0 ± 0.3 % 2.5-37.5-50 ZKS	ZKS'nin fenolik içeriğinin ve fitotoksik etkilerinin azaltılması	Lac	% 25 85.07 85.97 ZKS % 37.5 84.94 86.14 ZKS	Aggelis et al., 2003
ve suş LGAM P115 (II)	Toplam fenolik bileşik içeriği (g/l) % 25 ZKS % 37.5 ZKS % 50 ZKS 2.21±0.10 3.32 ± 0.30 4.42 ± 0.36			% 50 85.07 86.20 ZKS	
				%20 ZKS KOİ giderimi (%) (I): 77 (II): 52	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (I)	28°C, 120 çalkalama hızı, 1l erlen %20-50 ZKS	ZKS'nin renk açılımı ve çevreye zararsız hale getirilmesinde	Lac	Toplam fenolik bileşik giderimi (%) (I): 82 (II): 62 Renk açılması (%) (I): 95 (II): 65 (I)	Kissi et al., 2001
<i>Pleurotium ostreatus</i> (II)	Toplam fenolik bileşik içeriği (12 g/l) OD ₅₉₅ = 16, KOİ (50 g/l), % 0.24 Patates dekstroz, (ağırlık/hacim) % 0.05 maya özütü, % 1maltoz (ağırlık/hacim)	<i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i> ve <i>Pleurotium ostreatus</i> 'ün etkilerinin karşılaştırılması	MnP LiP	Enzim Aktivite Değerleri (U/l) %20 ZKS Lac MnP LiP 0.85 0.30 1.79 %50 ZKS 0.63 0.33 1.45	

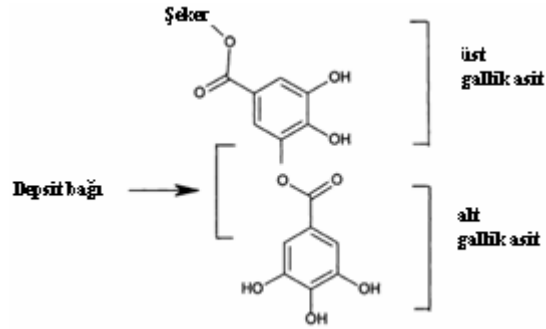
Beyaz çürükçüllerin başta olmak üzere başka fungusların da ZKS’de gelişip, ligninolitik enzimler ürettiğine dair çalışmalarda, toplam fenolik bileşiklerin giderimi, ligninolitik enzim aktiviteleri ve renk açılması arasında doğrudan bir bağlantı kurulamamıştır. Bu nedenle, ligninolitik enzimler dışında hangi enzimlerin bu mekanizmada rol oynadığı üzerinde durulmaktadır. ZKS tanen içeren bir atık olması sebebi ile, tannazın atımda etkili olan enzimlerden biri olması beklenmektedir.

2.7 Tannaz

Tannaz (tanen açıl hidrolaz, EC 3.1.1.20), TA gibi hidrolize olabilen tanenler ve gallik asit esterlerindeki ester ve depsit bağlarının (Şekil 2.15) hidrolizini katalizlemektedir. TA’ın tannaz ile hidrolizi sonucu gallik asit ve glukoz oluşmaktadır (Şekil 2.14) (Lekha and Lonsane, 1997; Sharma et al.,2000). Tannaz enziminin bilinen başlıca substratları yüzde spesifiklik sırasına göre; TA [100], metil gallat [20], etil gallat [9], *n*-propil gallat [10] ve isoamil gallat [9]’ tır (www.kikkoman.co.jp).



Şekil 2.14 Tannik asidin yapısı ve tannazın hidrolitik ürünleri (gallik asit ve glukoz) (Mondal et al.,2001).



Şekil 2.15 Gallik asit birimlerinin daha yukarıda olanın fenolik grubu ile daha aşağıdakinin asit grubu arasında oluşan despit bağına ait bir örnek (Mueller-Harvey, 2001).

Tannaz, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarca sentezlenebilmektedir. Endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal tannaz bitkisel ve hayvansal kaynaklı tannaza göre birçok avantaja sahip olduğundan daha yaygın kullanım bulmuştur.

2.7.1 Mikrobiyal Tannaz Üretimi

Tannaz enziminin mikrobiyal yol ile üretimi mikroorganizmaların, yüksek spesifik üreme hızına sahip olmaları, genetik uygulamalarının daha basit ve daha kısa sürede gerçekleştirilebilmesi gibi nedenler ile bitkisel ve hayvansal kaynaklara göre tercih edilmektedir. Tannaz üretebilen mikroorganizmalar Çizelge 2.10'da sunulmuştur. Ayrıca mikrobiyal tannazın, diğer kaynaklardan olan (bitkiler veya hayvanlar) tannazdan daha kararlı olduğu saptanmıştır (Purohit et al., 2006).

Ortam koşullarına bağlı olmaksızın sürekli sentezlenen ve mikroorganizmadaki veya kültür ortamındaki derişimi sabit kalan enzimlere “**bazal enzim**” denilmektedir. İndüklenebilen enzim ise, normal koşullarda eser miktarda bulunan, ancak ortama bir maddenin (indüktör) eklenmesi ile derişimi artan enzimler için kullanılmaktadır (www.webref.org; www.answers.com). Mikrobiyal tannaz; bazal, indüklenebilen, hücre içi ve hücre dışı olarak sentezlenebilen ve indüktör olmayan karbon kaynaklarının yüksek derişimlerinde katabolik baskılamaya uğrayabilen bir esterazdır.

Çizelge 2.10 Tannaz üretebilen mikroorganizmalar (♠ Zayıf Üretici, *Orta Üretici, •İyi Üretici, ♦En İyi Üretici) (Albertse, 2002).

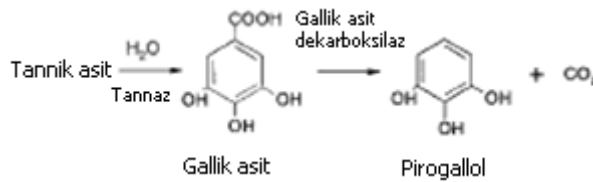
Bakteriler	
* <i>Achromobacter</i> türleri	Lewis and Starkey, 1969
• <i>Bacillus polymyxa</i>	Deschamps et al., 1983
• <i>Corynebacterium</i> türleri	Deschamps et al., 1983
• <i>Klebsiella planticola</i>	Deschamps et al., 1983
* <i>Pseudomonas solanacearum</i>	Deschamps and Lebeault, 1984
* <i>Selenomonas ruminatium</i>	Skene and Brooker 1995
Funguslar	
* <i>Aspergillus aureus</i>	Bajpai and Patil, 1996
♦ <i>Aspergillus awamori</i>	Bradoo et al., 1996
• <i>Aspergillus brasiliensis</i>	Van Diepeningen et al., 2004
• <i>Aspergillus carbonarius</i>	Van Diepeningen et al., 2004
* <i>Aspergillus fischeri</i>	Bajpai and Patil, 1996
• <i>Aspergillus foetidus</i>	Van Diepeningen et al., 2004
* <i>Aspergillus flavus</i>	Yamada et al., 1968
• <i>Aspergillus heteromorphus</i>	Van Diepeningen et al., 2004
♦ <i>Aspergillus japonicus</i>	Bradoo et al., 1996
♦ <i>Aspergillus niger</i>	Bradoo et al., 1996
♦ <i>Aspergillus oryzae</i>	Bradoo et al., 1996
* <i>Aspergillus rugulosus</i>	Bradoo et al., 1996
* <i>Aspergillus terreus</i>	Bajpai and Patil, 1996
• <i>Aspergillus tubingensis</i>	Van Diepeningen et al., 2004
• <i>Cryphonectria parasitica</i>	Farias et al., 1992
* <i>Cunninghamella</i> türleri	Bradoo et al., 1996
• <i>Fusarium solani</i>	Bradoo et al., 1996
* <i>Fusarium oxysporium</i>	Bradoo et al., 1996
* <i>Helicostylum</i> türleri	Bradoo et al., 1996
♠ <i>Neurospora crassa</i>	Bradoo et al., 1996
* <i>Penicillium acrellanum</i>	Bradoo et al., 1996
* <i>Penicillium caryophilum</i>	Bradoo et al., 1996
* <i>Penicillium charlesii</i>	Bradoo et al., 1996
* <i>Penicillium citrinum</i>	Bradoo et al., 1996
* <i>Penicillium digitatum</i>	Bradoo et al., 1996
* <i>Penicillium islandicum</i>	Ganga et al., 1977
• <i>Rhizopus oryzae</i>	Hadi et al., 1994
* <i>Syncephalastrum racemosum</i>	Bradoo et al., 1996
• <i>Trichoderma viride</i>	Bradoo et al., 1996
* <i>Trichoderma hamatum</i>	Bradoo et al., 1996
* <i>Trichoderma harzianum</i>	Bradoo et al., 1996
Mayalar	
• <i>Candida</i> türleri	Aoki et al., 1976
* <i>Debaryomyces hansenii</i>	Deschamps and Lebeault, 1984
• <i>Pichia</i> türleri	Deschamps and Lebeault, 1984

Tanenleri parçalayabilen fazla sayıda mikroorganizma olmasına rağmen, birçoğu sadece düşük tanen derişimlerine tolerans gösterebildiklerinden, verimlilikleri de düşük olmaktadır. Tanen parçalayabilen mikroorganizmaların başında funguslar gelmektedir. Mayalar ve bakteriler de tannaz üretimi için denenmiştir. Bakterilerin, fungus ve mayalara göre yüksek spesifik büyüme hızlarının olması, tannaz üretimi için bir avantaj olarak nitelendirilmektedir. Mayalar ile ilgili çalışmalar ise, 20 yıl öncesine dayanmaktadır ve son yıllarda mayaların tannaz üretimi için kullanıldığı, sadece bir çalışma bulunmaktadır (Kumar et al.,1999; Ayed and Hamdi, 2002).

Aspergillus türleri, en iyi tannaz üreticileri olarak bilinmektedir (Bhat et al., 1998). Siyah sporlu *Aspergillus* türlerinin, yüksek TA derişimlerini kullanabilmeleri, onları diğer funguslardan ayırmaktadır (Van Diepeningen et al., 2004). *Aspergillus niger* Aa-20 suşu, ağırlıkça %20 TA'te büyüeyebilen az sayıda mikroorganizma arasında yer almaktadır (Ramírez-Coronel et al., 2003). *Aspergillus niger*'in TA'teki büyüme yeteneği saprofit yaşam şartlarıyla ilişkilendirilebilmektedir. Çünkü doğada biyodönüşümü gerçekleştiren bitkiler, ağırlıkça %5-20 oranında tanen içermekte, hatta bazılarında bu miktar %40'a kadar çıkabilmektedir (Van Diepeningen et al., 2004). Tannaz üreten mikroorganizmaların, bu biyodönüşümdeki yeri, tanen içeren bitkisel atıkların parçalanması üzerine olmaktadır. Diğer yandan bitkilerde fitopatojenlerin saldırısına karşı savunma mekanizması geliştirilmesinde de rol oynamaktadır (Sabu et al., 2005b).

Gallik asit de bir karbon kaynağı olduğu için mikroorganizmaların bir kısmında tannaz hidrolizinden sonraki basamağı katalizleyen gallik asit

dekarboksilaz enzimine de rastlanmıştır. Bu enzim, hidroliz ürünü gallik asidi pirogallola dönüştürmekte ve CO₂ açığa çıkarmaktadır. Geçmişte yapılmış olan araştırmalarda, tannaz sentezleyebilen çeşitli gram negatif bakterilerde, gallik asit dekarboksilaz enzimine, gallik asit dekarboksilaz sentezleyen bakterilerde de tannaz enzimine rastlanmamıştır. *Pantoea agglomerans* T71, hem tannaz hem gallik asit dekarboksilaz sentezleyebildiği tayin edilmiş ilk bakteriyel suş olmuştur (Zeida et al.,1998). *Citrobacter freundii* TB3'ün TA'İ piruvata kadar parçalayabildiği ve daha sonra piruvatın da trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne girdiği tespit edilmiştir. Ara ürün olarak kültür ortamında piruvattan başka, pirogallol ve 2-hidroksimukomik aside rastlanmıştır (Kumar et al., 1999). *Bacillus licheniformis* KBR 6'nın, büyümenin ilk fazında oluşan ürünlerden sadece hazır karbon kaynağı olan glukozu metabolize ettiği ve gallik asidin ortamda 24. saate kadar parçalanmadan kaldığı ve 24. saatten sonra kullanıldığı bildirilmiştir (Mondal and Pati, 2000). Lewis and Starkey, (1969) *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus janthinellum* ve *Aspergillus frequentans*'un gallotanenleri oksalik asitlere kadar hidroliz ettiklerini tespit etmiştir. *Aspergillus flavus* ve *Paecilomyces* türleri ise sadece gallik asit üretebilmiştir. *Aspergillus japonicus* 'un da gallik asidi metabolize edebildiği tespit edilmiştir (Bradoo et al., 1997) (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 Tannik asidin parçalanması (Zeida et al.,1998).

Tannaz membrana bağlı bir enzim olarak bilinir ve aynı zamanda bir miktar hücre dışına da salgılanabilmektedir (Bradoo et al., 1997). Bakteriyel tannaz ise daima hücre dışı olarak üretilmektedir (Mondal et al., 2000; Mondal and Pati, 2000; Ayed and Hamdi, 2002). Fungal tannaz, büyük ölçüde hücre içi üretilmektedir. *Aspergillus aculeatus* DBF 9'un, üretimin 24. saatinde hücre içi ve hücre dışı tannazı eş zamanlı üretebildiği tespit edilmiştir (Banerjee et al., 2001). Hücre içi enzim miktarının daha yüksek olması, enzimin hücre dışına geçişinin hücre zarıyla engelleniyor olmasına veya enzimin bir membran proteini olarak sentezlenmesine bağlanabileceği bildirilmiştir (Barthomeuf et al, 1994). Hücre içi tannaz, hücre parçalama prosesinin gerektiği ek bir alt akım basamağını içermektedir. Literatürde tannaz için kullanılmış olan hücre parçalama yöntemleri Çizelge 2.11'de sunulmuştur. Bununla birlikte endüstriyel ölçekte hangi hücre parçalama yöntemlerinin tercih edildiğine dair bilgi mevcut değildir.

Çizelge 2.11 Hücre içi tannaz için kullanılan hücre parçalama için yöntemler

Kullanılan Hücre Parçalama Metodu	Fungus	Referanslar
Havanda asitle yıkanmış kum ile homojenize ederek parçalama	<i>Penicillium chrysogenum</i> NCIM-722	Rajakumar and Nandy, 1983
Önce dondurma, daha sonra havanda asitle yıkanmış kum ile parçalama	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425	Sharma et al., 1999; Sharma et al., 2000.
Havanda sıvı azot ile parçalama	<i>Aspergillus niger</i> Aa-20	Aguilar et al., 2001b
Asetat tamponu içinde, asitle yıkanmış kum ile homojenize ederek parçalama	<i>Aspergillus aculeatus</i> DBF 9 <i>Aspergillus fischerii</i> MTCC 150 <i>Aspergillus niger</i> MTCC 282 <i>Fusarium solani</i> MTCC 350 <i>Trichoderma viride</i> MTCC 167	Bajpai and Patil, 1997; Banerjee et al., 2001
Havanda kuarz kum kullanılarak parçalama	<i>Aspergillus</i> SHL 6	Huang et al., 2005
Fransız Presi ile parçalama	<i>Aspergillus awamori</i>	Seth and Chand, 2000
Dondurduktan sonra homojenizatör ile parçalama	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425	Bhardwaj et al., 2003
50 VC Sonikatör ile parçalama	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> MS 101 <i>Aspergillus niger</i> MTCC 2425 <i>Fusarium</i> türleri <i>Penicillium</i> türleri <i>Trichoderma</i> türleri	Murugan et al., 2006

Mikrobiyal tannaz üretimi, yüzey kültürü, derin kültür ve katı kültür ile gerçekleştirilebilmektedir (Lagemaat and Pyle, 2005). Ancak derin kültür ile üretimi daha yaygın olup, son zamanlarda katı kültürdeki çalışmalar artış göstermiştir (Ramírez-Coronel et al., 2003). Tannazın da katı kültürde üretimi gerçekleştirilen diğer enzimler gibi enzim veriminin büyüme ile ilişkili olduğu enzimler arasında yer aldığı bildirilmiştir (Sabu et al., 2005b). Ayrıca katı kültürün, tannaz üretkenliği, tanen dönüşümü,

sıcaklık-pH kararlılığı ve hücre dışı sentezlenmesi gibi avantaj sağladığı ifade edilmiştir (Kar et al.,1998; Lekha and Lonsane, 1994). Derin kültürde yöntemi kullanılarak üretilen tannaz enziminin katı kültür yöntemi kullanılarak üretilen tannaz enzime oranla daha düşük aktivite değerleri gösterdiği saptanmıştır. Ortaya çıkan bu sonuçta tannaz enziminin üretim ortamında ortaya çıkan değişimlere bağlı olarak enzimim parçalanması ile ilişkilendirilebileceğine işaret edilmiştir. Diğer yandan, katı kültürdeki nem düzeyinin düşük olmasından dolayı, substratın miktarı başına düşen ortam hacmi de düşük olmakta ve sonuçta katı kültürdeki aktivite değerleri genellikle derin kültüre göre daha yüksek değerler almaktadır (Aguilar et al., 2001a; Kumar et al., 2006).

Hem derin kültür ve hem de katı kültürde tannaz üretimini etkileyen başlıca üretim parametreleri; pH, sıcaklık, indüksiyon mekanizması, alternatif karbon kaynakları, azot kaynakları, mineral kaynakları, üretim süresi, inokulum miktarı veya yüzdesi ve karbon/azot oranıdır. Çalkalama hızı ve son ürün baskılaması ise sadece derin kültür için etkili proses parametreleridir.

2.7.1.1 pH

Tannaz üretimi için her iki kültür yönteminde de üretimin ortamının pH'sının genellikle pH 5.0 değerine ayarlandığı görülmektedir (Sharma et al., 2000; Mondal et al., 2001; Sabu et al., 2006). Mikroorganizma derin kültür ve katı kültürde, tannaz üretimi için farklı pH optimumlarına sahip olabilmektedir. Derin kültür ve katı kültürde tannaz üretimi için, *Rhizopus oryzae* RO IIT RB-13 NRRL 21498 ile yapılmış pH optimizasyon çalışmasında, katı kültür için optimum değer pH 4.5, derin kültür için pH

5.0 olarak kaydedilmiştir. Optimum pH değerlerindeki tannaz aktivite değerleri katı kültürde 18.89 U/ml, derin kültürde 24.07 U/ml olarak hesaplanmıştır (Kar and Banerjee, 2000). *Aspergillus* SHL 6 için inorganik tuz çözeltisi pH 5.0'e tamponlanmış olarak kullanılmış ve bu pH değerindeki tannaz aktivitesi 24.29 U/ml olarak bulunmuştur (Huang et al., 2005). Ayrıca pH 4.5, 5.5, 5.6 ve 6.0 değerlerinde de tannaz üretimi gerçekleştirilmektedir. *Aspergillus niger* suşları arasından en iyi tannaz üreticilerini belirlemek amacı ile TAA'da yapılan tarama için pH 4.5 tercih edilmiştir. Yapılan seçimde büyük koloni çapı oluşturan suşlar katı kültür fermentasyonunda tannaz üretimi için denenmiştir ve *Aspergillus niger* 11T25A5, 72 saatlik üretimin sonunda en yüksek aktiviteye (67.5 U/g) sahip olan *Aspergillus niger* suşu olmuştur (Pinto et al., 2001). *Aspergillus aculeatus* DBF 9 ile pH 5.5'teki tannaz üretiminde 48 saat boyunca 12 saatte bir yapılan analizler sonucu maksimum hücre içi tannaz aktivitesi 3.88 U/ml olarak 24. saatte, maksimum hücre dışı tannaz aktivitesi 1.00 U/ml olarak 36. saatte tayin edilmiştir (Banerjee et al., 2001). Farklı funguslardaki tannaz indüklenme mekanizmasını aydınlatmak amacı ile gerçekleştirilen çalışmada, *Aspergillus niger* MTCC 282, *Aspergillus fischerii* MTCC 150, *Fusarium solani* MTCC 350 ve *Trichoderma viride* MTCC 167'in tannaz üretim ortamlarının pH'ları sterilizasyon öncesinde pH 5.6'ya ayarlanmıştır. Bu pH'daki hücre içi tannaz aktiviteleri ise sırası ile 2.8, 50.3, 231.6, 84.2 (U/g misel kütlesi) olarak hesaplanmıştır (Bajpai and Patil, 1997). Depolanmış ZKS'den izole edilmiş *Lactobacillus plantarum* ile tannaz üretimi pH 6.0'da gerçekleştirilmiş ve en yüksek tannaz aktivitesi 6.0 U/ml olarak tespit edilmiştir (Ayed and Hamdi, 2002). *Aspergillus awamori* için derin kültürde tannaz üretimi pH aralığının; pH 4.0–6.0 arasında değiştiği ve bu aralığın altında aktivite değerlerinin çok düşük olduğu, üstünde ise fungusun büyüme hızının azalacağı

kaydedilmiştir (Seth and Chand, 2000). *Aspergillus japonicus*’ da enzim üretimi için pH (6.0–7.0), biyokütle için pH (4.0–7.0) en uygun aralıklar olarak tespit edilmiştir. *Aspergillus japonicus*, tannaz üretimi için 6.6’da pH optimumuna sahip olması ile diğer funguslardan ayrılmaktadır. *Aspergillus japonicus*’un pH 6.6’daki tannaz aktivite değeri 31.88 U/ml olarak bulunmuştur (Bradoo et al., 1997). *Citrobacter freundii* TB3 de tannaz üretiminin pH 6.7’de gerçekleştirilmesi ile diğer bakteriler arasında farklılık göstermektedir. Üretim boyunca pH 6.7’de seyreden pH’daki tannaz aktivite değerleri 6. saatte en yüksek değeri olan 1.87 U/ml’ye ulaşmış ve 24. saatin sonunda 0.16 U/ml’ye gerilemiştir (Kumar et al., 1999). *Bacillus licheniformis* KBR 6’nın tannaz üretim ortamında, glukozun metabolize edilmesi ve gallik asidin ortamda birikmesi ile ortam pH’sı duraklama evresinde (27–36. saat) pH 3.0’ün altına inmişken, ölüm evresinde tekrar pH 3.0 değerine kadar yükselmiştir. 27. saatteki tannaz aktivitesi 0.31×10^{-1} U/ml olarak tayin edilmiş ve duraklama evresinin sonunda (36. saat) ve ölüm evresinde tannaz aktivitesi tayin edilmemiştir (Mondal and Pati, 2000).

2.7.1.2 Sıcaklık

Tannaz üretiminin gerçekleştirildiği çalışmaların bir kısmında optimizasyon çalışması yapılarak optimum bir değer bulunmuşken, diğer kısmında ise doğrudan mikroorganizmanın optimum büyüme sıcaklığı kullanmıştır. Üretimler için kullanılan sıcaklık 28–37 °C aralığında bulunmaktadır. Hem katı kültür hem de derin kültür için 30°C en çok tercih edilen sıcaklık olmuştur (Çizelge 2.12).

Çizelge 2.12 Tannaz üretimi için kullanılan inkübasyon sıcaklıkları

İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Mikroorganizma	Referanslar
28	<i>Penicillium chrysogenum</i> NCIM-722	Rajakumar and Nandy, 1983; Zeida et al., 1998
	<i>Pantoea agglomerans</i> T71	Huang et al., 2005;
	<i>Aspergillus</i> SHL 6	Shi et al., 2005;
	<i>Aspergillus niger</i>	
	<i>Candida utilis</i>	
30	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425	
	<i>Aspergillus niger</i> Aa-20	Bradoo et al., 1997;
	<i>Aspergillus aculeatus</i> DBF 9	Bajpai and Patil, 1997
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Bhat et al., 1997;
	<i>Aspergillus versicolor</i>	Sharma et al., 1999;
	<i>Aspergillus flavus</i>	Kumar et al., 1999
	<i>Aspergillus caespitosum</i>	Sharma et al., 2000;
	<i>Aspergillus niger</i> MTCC 282	Aguilar et al., 2001b;
	<i>Aspergillus fischerii</i>	Banerjee et al., 2001;
	MTCC 150	Batra et al., 2005
	<i>Aspergillus japonicus</i>	Mondal et al., 2000;
	<i>Fusarium solani</i> MTCC 350	Sabu et al., 2005a;
	<i>Tricoderma viride</i> MTCC 167	Lagemaat and Pyle, 2001;
	<i>Bacillus licheniformis</i> KBR 6	Sabu et al., 2005b;
	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16620	Ramirez-Coronel et al., 2003;
	<i>Paecilomyces variotii</i>	Saxena and Saxena, 2004;
	<i>Penicillium glabrum</i> FST 99	Mahendran et al., 2006;
	<i>Penicillium variable</i> IARI 2031	Kumar et al., 2006
32	<i>Aspergillus niger</i> suşları	
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Pinto et al., 2001;
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Mondal et al., 2001;
		Kar and Banerjee, 2000
33	<i>Lactobacillus</i> türü (suş ASR-S1)	Sabu et al., 2006
35	<i>Bacillus licheniformis</i> KBR 6	Mondal and Pati, 2000
37	<i>Penicillium charlesii</i>	
	<i>Penicillium variable</i>	Batra and Saxena, 2005;
	<i>Penicillium crustosum</i>	Ayed and Hamdi, 2002;
	<i>Penicillium restrictum</i>	Kar and Banerjee, 2000
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	<i>Rhizopus oryzae</i>	

Çizelge 2.12’de bahsedilen sıcaklıklarda gerçekleştirilen üretimlerde elde edilmiş tannaz aktivite değerleri Çizelge 2.26 ve Çizelge 2.27’de sunulmuştur.

2.7.1.3 İndüksiyon Mekanizması

TA derişimi, tannazın indüksiyonu ve mikroorganizma çoğalması için en belirleyici faktör olarak nitelendirilmektedir. Fungusların doğrudan yüksek derişimlerde gallotanen içeren ortamlara inoküle edildiklerinde, çoğalamayabildikleri kaydedilmiştir. Gallotanen toleransının sınırı fungustan fungusa değişiklik göstermektedir. (Çizelge 2.13 ve Çizelge 2.15) Bu sınırın, fungus sürekli olarak artan derişimlerde gallotanen içeren ortamlara ekilirse genişletilebileceği ifade edilebilmektedir (Bajpai and Patil, 1997). TA derişimi, funguslar için; %1’den %20’ye kadar çıkabilmektedir (Ramírez-Coronel et al.,2003). Genellikle %1.0–3.0 arasındaki TA derişim tercih edilmektedir. Çünkü daha yüksek derişimlerde TA’in çözünme problemi baş göstermektedir (Bradoo et al., 1997). Ayrıca mikroorganizmaların genellikle TA tolerans sınırının altındaki bir TA derişiminde optimum tannaz aktivitesi verdikleri bildirilmektedir (Mondal et al., 2000). Örneğin; *Citrobacter freundii*’nin %5 TA derişimine kadar tolerans gösterdiği, ancak optimum tannaz aktivitesine %1 TA derişiminde ulaştığı kaydedilmiştir (Kumar et al., 1999).

Çizelge 2.13 Tannaz üretiminde kullanılan tannik asit derişimleri ve mikroorganizmaların tannik asit toleransı sınırları

Tannik asit derişimi (%)	Mikroorganizma	Referanslar
0.7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ayed and Hamdi, 2002
1.0	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus caespitosum</i> <i>Penicillium charlesii</i> <i>Bacillus licheniformis</i> KBR 6 <i>Penicillium variable</i> <i>Penicillium crustosum</i> <i>Penicillium restrictum</i>	Mondal and Pati, 2000 Batra and Saxena, 2005;
1.5	<i>Bacillus licheniformis</i> KBR 6 <i>Pantoea agglomerans</i> T71	Mondal et al., 2000; Zeida et al., 1998
2.0	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425 <i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus japonicus</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> NCIM-722 <i>Paecilomyces variotii</i>	Bradoo et al., 1997; Sharma et al., 1999; Sharma et al., 2000; Seth and Chand, 2000; Banerjee et al., 2001; Mahendran et al., 2006
3	<i>Fusarium solani</i> MTCC 350 <i>Tricoderma viride</i> MTCC 167	Bajpai and Patil, 1997
4	<i>Aspergillus fischerii</i> MTCC 150	Bajpai and Patil, 1997
5	<i>Citrobacter freundii</i> TB3	Kumar et al., 1999
1.25, 2.5, 5.0, 10.0	<i>Aspergillus niger</i> Aa-20	Aguilar et al., 2001b
15.0	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425	Bhat et al., 1997
20.0	<i>Aspergillus niger</i> MTCC 282	Bajpai and Patil, 1997

Optimum TA derişimi mikroorganizmanın, hücre içi ve hücre dışı tannazlarında dahi farklı değerlere sahip olabilmektedir. *Aspergillus aculeatus* DBF 9 için maksimum hücre içi tannaz sentezi (4.2 U/ml), 10 g/l TA derişiminde, maksimum hücre dışı tannaz sentezi (0.9 U/ml) ve büyüme ise 20 g/l TA derişiminde kaydedilmiştir (Banerjee et al., 2001).

Maksimum tannaz aktivitesini veren TA derişimi katı kültür ve derin kültür için farklılık göstermektedir. *Aspergillus niger* Aa-20'in derin

kültürdeki toplam tannaz aktivite değerleri (hücre içi ve hücre dışı) 50 g/l TA derişimine kadar sürekli olarak artarak en yüksek değeri olan 2700 IU/l değerine ulaşmış ve ardından düşüşe geçmiştir. Benzer şekilde katı kültürdeki tannaz aktivite değerleri 100 g/l TA derişimine kadar sürekli olarak artarak en yüksek değeri olan 18300 IU/l değerine ulaşmış ve ardından düşüşe geçmiştir (Aguilar et al., 2001b).

Tannaz aktivitesi, *Bacillus licheniformis* KBR 6'nın üretim ortamı bazal tuzları ve %1.0 glukoz (ağırlık/hacim) içerdiğinde 0.017 U/ml iken, üretim ortamı bazal tuzları ve %1.0 TA (ağırlık/hacim) içerdiğinde indüklenerek 10.12 kat artmış ve 0.172 U/ml olmuştur (Mondal and Pati, 2000).

Tannaz sentezini TA dışında, tanen kaynaklı hangi bileşiklerin indükleyip indüklemediğini karşılaştırmak amacı ile "İndüklenme Oranı" olarak ifade edilen bir değişken tanımlanmıştır. İndüklenme oranı ile farklı fungus gruplarının gösterdiği maksimum değerlere dair bir örnek Çizelge 2.14'te verilmektedir. *Tricoderma viride* MTCC 167, metil gallat ile en yüksek indüklenme oranı olan 40.7 değerini vermiştir (Bajpai and Patil, 1997).

Çizelge 2.14 Üç fungusun maksimum indüklenme oranları (Bajpai and Patil, 1997).

İndükleyici Madde	Mikroorganizma	Maksimum İndüklenme Oranları
		İndüklenme Oranı= $\frac{\text{İndüklenmiş tannaz aktivite değeri}}{\text{Bazal tannaz aktivite değeri}}$
Tannik asit	<i>Fusarium solani</i> MTCC 350	26.7
Gallik asit	<i>Aspergillus fischerii</i> MTCC 150	26.1
Metil gallat	<i>Tricoderma viride</i> MTCC 167	40.7

Tannik asit ve metil gallat gibi tannaz indüktörleri pahalı olduğundan, tanen içeren bitkilerin ve özellikle de tarımsal atıkların tannaz üretiminde substrat olarak kullanılmasına doğru bir yöneliş bulunmaktadır (www.agro.cmu.ac) (Çizelge 2.15).

Çizelge 2.15 Derin kültürde kullanılmış olan alternatif tanen kaynakları

Mikroorganizma	Tanen Kaynağı	Tanen Derişimi (%)	Referanslar
<i>Aspergillus</i> SHL 6	Meşe Palamudu Taneni	2.0	Huang et al., 2005
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425	Kübra Ağacı Taneni	15.0	Bhat et al., 1997;
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Caesalpinia digyna</i> tohum zarfı	10.0	Kar and Banerjee, 2000
<i>Penicillium variable</i> IARI 2031	Helile meyvesinin tozu	11.6	Saxena and Saxena, 2004

Mikroorganizmaların değişik tanen çeşitlerindeki, biyokütle artışı da farklılık göstermektedir. *Aspergillus niger* van Tieghem'in, TA ve kübra ağacının tanenindeki biyokütle artışı, 30 g/l tanen derişimine kadar birbiri ile çakışiktır ve kübra ağacındaki en yüksek biyokütle değerini (290.9 mg kuru ağırlık) bu derişimde vermiştir. TA için ise en yüksek değere (718.2 mg kuru ağırlık) 110 g/l'de ulaşmıştır. Fungus, her iki tanen ortamında da 150 g/l tanen derişimine kadar tolerans gösterebilmiştir. Başlangıçta her iki ortamda tespit edilen fungal büyümedeki benzerliğin, kübra ağacının yapısında bulunan kolay parçalanabilen bazı polifenolik bileşiklerin varlığına bağlanabileceği bildirilmiştir. Belli bir derişimden sonra ortaya çıkan farklılığın sebebi ise, tanenlerin parçalanmasında yer alan enzimlerin aktivitesini doğrudan etkileyen kimyasal yapıların farklılaşmasına bağlanabileceği ifade edilmiştir (Bhat et al., 1997).

2.7.1.4 Alternatif Karbon Kaynakları

Tanen olmayan karbon kaynaklarının varlığında çoğunlukla bazal tannaz aktivitesi mevcuttur. Ancak bazal tannaz aktivitesine sahip olmayan mikroorganizmaların da tespit edildiği bildirilmiştir. Örneğin, *Aspergillus niger* MTCC 282 suşunda, bazal enzim aktivitesi tayin edilmemiştir. Ancak bu mikroorganizma suşu ortama bir indüktörün katılması halinde tannaz sentezleyebilmiştir (Bradoo et al., 1997; Bajpai and Patil, 1997). Tannaz üretim ortamında indüktif olmayan (tanen içermeyen) karbon kaynaklarının etkisi, üretim tipine, enzimin hücre içi veya hücre dışı olmasına ve en önemlisi mikroorganizma suşuna bağlı olarak farklılık göstermektedir.

Tannaz üretiminde en çok etkisi gözden geçirilmiş, karbon kaynağı glukozdur. Bunun başlıca sebebi, glukozun tannazın bir hidroliz ürünü olmasıdır (Şekil 2.14). Ayrıca mikroorganizmaların büyümesini teşvik eden, tanenlere göre daha kolay kullanabilen bir monosakkarittir. Glukozdan başka, arabinoz, fruktoz, galaktoz, ksiloz, laktoz, sükroz, karboksimetil selüloz, çözünebilen nişasta, mısır nişastası ve mannitol gibi şekerler ile birlikte, pepton ve kazein gibi şeker olmayan substratların etkisi de incelenmiştir (Bradoo et al., 1997; Huang et al., 2005). *Aspergillus japonicus* ile tannaz üretiminde glukoz harici hiçbir karbon kaynağının, tannaz aktivitesini arttırıcı etkisi olmamıştır. Üretim ortamında %0.2 glukoz (ağırlık/hacim) bulunması tannaz aktivitesini 31.88 U/ml'den 33.13 U/ml'ye çıkarmıştır (Bradoo et al., 1997).

Glukozun tannaz üretimine olan etkisi, katı kültür ve derin kültürde farklılık göstermektedir. Örneğin; 20 g/l'den yüksek derişimlerde glukoz eklenmesi *Aspergillus niger* Aa-20'nin derin kültüründe şiddetli bir

katabolik baskılama ile sonuçlanmıştır. 6.25 g/l glukoz derişiminde 4.00×10^{-3} IU/g olan birim biyokütle başına tannaz aktivitesi, 20 g/l glukoz derişimine kadar artarak 4.66×10^{-3} IU/g değerine ulaşmış ve bu derişimden sonra düşüşe geçmiştir. Glukozun daha yüksek derişimleri, hazır bulunan karbon kaynağının kullanılabilirliğinden dolayı enzim üretimini baskılanmaktadır (Banerjee et al., 2001; Aguilar et al., 2001b).

Enzimin hücre içi veya hücre dışı olması, maksimum enzim sentezi için ihtiyaç duyulan glukozun miktarını değiştirmektedir. TA varlığında, *Aspergillus aculeatus* DBF 9 için maksimum hücre içi tannaz sentezi (4.28 U/ml), 0.5 g/l; ve hücre dışı için (0.89 U/ml), 1.0 g/l glukoz derişiminde kaydedilmiştir (Banerjee et al., 2001).

Mikroorganizmaların, maksimum enzim sentezi için ihtiyaç duyduğu glukoz derişimi, Çizelge 2.16'da sunulmaktadır.

Çizelge 2.16 Maksimum tannaz sentezi için glukoz derişimleri

Mikroorganizma	Glukoz Derişimi (g/l)	Referanslar
<i>Aspergillus aculeatus</i> DBF 9	0.5–1.0	Banerjee et al., 2001;
<i>Bacillus licheniformis</i> KBR 6	1.0	Huang et al., 2005
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.0	Mondal and Pati, 2000
<i>Aspergillus japonicus</i>	2.0	Ayed and Hamdi, 2002
		Bradoo et al., 1997

Aspergillus SHL 6'nın tannaz sentezine basit ve kompleks şekerlerin etkisini incelemek amacı ile yapılan denemede 5 g/l meşe palamudu taneni içeren üretim ortamına ayrıca 20 g/l derişiminde sakkaroz, glukoz, çözünebilen nişasta veya mısır nişastası eklenmiştir. Bu durumda glukozun

aksine, mikroorganizma tarafından glukozu açığa çıkaran sakkaroz, en yüksek tannaz aktivitesini (19.6 U/ml) ve elajik asit verimini (%10.4) veren şeker kaynağı olmuştur. Glukoz ise en yüksek biyokütleyi (0.42 g) ve sakkarozdan sonra en yüksek tannaz aktivitesini (13.2 U/ml) vermiştir (Huang et al., 2005).

Aspergillus niger ve *Candida utilis*'in elajitanen biyodönüşümlerinde, hem glukoz hem de sakkaroz elajik asit verimini arttırmada, etkili birer karbon kaynağı olmuştur. *Aspergillus niger*'in elajik asit verimini, glukoz, 2.17 kat artırırken; sakkaroz, 2.63 kat artırmıştır. *Candida utilis*'in elajik asit verimini, glukoz, 2.89 kat artırırken; sakkaroz, 3.17 kat artırmıştır. Sakkaroz, glukozu göre daha uygun bir karbon kaynağı olarak tayin edilmiştir (Shi et al., 2005).

2.7.1.5 Azot Kaynakları

Azot kaynağı, tannazın mikrobiyal üretiminde sınırlayıcı faktör olabilmektedir. Mevcut azot kaynağından başka ikinci bir azot kaynağının büyümeyi ve dolayısı ile de hemen akabinde enzim üretimini arttırabileceği bildirilmiştir (Sabu et al., 2005b). Literatürde tannaz üretimi için denenmiş olan inorganik azot kaynakları; NaNO_3 , NH_4NO_3 , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4Cl , NaNO_2 ; organik azot kaynakları ise maya özütü, üre, aspartik asit, glutamik asit, mısır ıslatma suyu, malt özütü ve peptondur (Çizelge 2.17). Bunların içinden en yaygın kullanılmış olan azot kaynağı NaNO_3 'tür. *Aspergillus japonicus* için azot kaynağı olarak NaNO_3 'in hem biyokütle (0.35 g/ml) hem de tannaz üretimi (33.33 U/ml) açısından en yüksek değerleri verdiği için tercih edildiği bildirilmiştir. NH_4NO_3 ,

NaNO₃'tan sonra biyokütle (0.30 g/ml) ve tannaz üretimi (25.00 U/ml) için en uygun azot kaynağı olarak tayin edilmiştir. Diğer azot kaynakları aktivite ve biyokütlede düşük sonuçlar vermiştir (Bradoo et al., 1997).

Çizelge 2.17 Tannaz üretimi için kullanılan azot kaynakları

Azot Kaynağı	Mikroorganizma	Azot Kaynağının Derişimi (g/l)	Referanslar
NaNO ₃	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425		
	<i>Aspergillus awamori</i>		
	<i>Aspergillus aculeatus</i> DBF 9		
	<i>Aspergillus fumigatus</i>		Rajakumar and Nandy, 1983;
	<i>Aspergillus versicolor</i>		Bhat et al., 1997;
	<i>Aspergillus flavus</i>		Bradoo et al., 1997;
	<i>Aspergillus japonicus</i>	3	Sharma et al., 1999;
	<i>Aspergillus caespitosum</i>		Sharma et al., 2000;
	<i>Penicillium chrysogenum</i> NCIM-722		Seth and Chand, 2000;
	<i>Penicillium charlesii</i>		Batra et al., 2005;
	<i>Penicillium variable</i>		Kar and Banerjee, 2000;
	<i>Penicillium crustosum</i>		Shi et al., 2005;
	<i>Penicillium restrictum</i>		
	<i>Rhizopus oryzae</i>	2.5	
(NH ₄) ₂ SO ₄	<i>Aspergillus niger</i> Aa-20	2.0	
	<i>Aspergillus niger</i>		
	<i>Candida utilis</i>		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	<i>Aspergillus niger</i> Aa-20	-	Aguilar et al., 2001b;
	<i>Aspergillus niger</i> 11T25A5	8.76	Pinto et al., 2001
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	Ayed and Hamdi, 2002;
NH ₄ NO ₃	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16620,	6	
	<i>Pantoea agglomerans</i> T71	2	Zeida et al., 1998
	<i>Aspergillus aculeatus</i> DBF 9	3	Banerjee et al., 2001
	<i>Paecilomyces variotii</i>	5	Bajpai and Patil, 1997;
	<i>Aspergillus niger</i> Aa-20	2.0	Mondal and Pati, 2000;
NH ₄ Cl	<i>Aspergillus fischerii</i> MTCC 150	10	Ramírez-Coronel et al., 2003; Mahendran et al., 2006;
	<i>Bacillus licheniformis</i> KBR 6	1.65	Sabu et al., 2005a,b;
		3	
KNO ₃	<i>Bacillus licheniformis</i> KBR 6	3.0	Mondal and Pati, 2000
	<i>Aspergillus SHL 6</i>	3	Bajpai and Patil, 1997;
	<i>Aspergillus ruber</i>	2	Huang et al., 2005;
Pepton	<i>Aspergillus fischerii</i> MTCC 150	1.90	Kumar et al., 2006
	<i>Aspergillus SHL 6</i>	2	Huang et al., 2005
Maya özütü	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425	3	Bhat et al., 1997
	<i>Pantoea agglomerans</i> T71	0.5	Zeida et al., 1998

Tanenler proteinlerle kompleks oluşturup, ortamdaki tanenin kullanımını kısıtladıklarından dolayı, proteinler genellikle tannaz üretimi için azot kaynağı olarak tercih edilmemektedir. Fakat *Aspergillus* SHL 6, en yüksek tannaz aktivite değerini (23.85 U/ml) azot kaynağı olarak pepton kullanıldığı zaman sağlamıştır. Bu çalışmada meşe palamudu taneninin bu suş tarafından parçalanmasının, bir proteinin azot kaynağı olarak kullanılmasından etkilenmediği bulunmuştur (Huang et al., 2005).

2.7.1.6 Mineral Kaynakları

Tannaz üretimi, her enzim gibi karbon ve azot kaynağı dışında, bazı mineralleri gerektirmektedir. Sadece TA bulunan ortamda, *Bacillus licheniformis* KBR 6, TA'nın %75'ini parçalayamazken, glukoz ve bazal tuzların varlığında ortamdaki mevcut tüm TA'ı parçalayabildiği bildirilmiştir. Bazal tuzlarının ortamda bulunması mikroorganizmanın büyüme hızını arttırmakta ve bunun sayesinde de enzim üretimi artmaktadır (Mondal and Pati, 2000).

Tannaz üretiminde tercih edilen ortamlar gözden geçirildiğinde, kullanılan mineral tuzları ve derişimleri de farklı şekillerde karşımıza çıkabilmektedir (Çizelge 2.18) Bunlar arasında, en sık kullanılanlar; K_2HPO_4 , $MgSO_4$, KCl ve $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 'dur. Bu dört mineralin elementlerini içeren mineral tuzları olan KH_2PO_4 ve $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ da kullanılmaktadır. Diğer mineraller ise üretim ortamına nadir olarak eser miktarda ilave edilmektedir.

Çizelge 2.18 Tannaz üretimi için kullanılan mineral kaynakları (Bradoo et al., 1997; Bajpai and Patil, 1997; Mondal et al., 2001; Banerjee et al., 2001; Ramírez-Coronel et al., 2003; Huang et al., 2005).

Mineral Kaynağı	Kullanıldığı Derişim Değerleri (g/l)
K ₂ HPO ₄	0.5, 1.0
KH ₂ PO ₄	0.17, 0.5, 1.0, 4.38, 5.0
KCl	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3, 0.37, 0.5, 0.88, 1.0
MgSO ₄	0.5, 1.0, 2.0
CaCl ₂	0.3, 1.0
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.44
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.1
CaCl ₂ .7H ₂ O	0.088
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01, 0.12, 0.125, 5.5
MnCl ₂ .6H ₂ O	0.018, 0.02
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.0088, 0.01
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ . H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.1, 8.6
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025
NaCl	0.005
Na ₂ EDTA	7.6

Aspergillus japonicus'un üretim ortamına % 0.2 (ağırlık/hacim) derişiminde mineral tuzlarının eklenmesinin tannaz aktivitesi ve biyokütle üzerinde nasıl bir etki yapacağı araştırılmıştır (Çizelge 2.19). Elde edilen sonuçlardan, bu mineral tuzlarının enzim aktivitesi ve biyokütle üzerinde olumlu bir etki yapmadığı, aksine o derişimde kullanıldıklarında, aktivite kaybına ve biyokütlerde azalmaya sebep oldukları bildirilmiştir. Aktivitedeki kayıp ve biyokütlerdeki azalış Çizelge 2.19'da sunulmuştur (Bradoo et al., 1997).

Çizelge 2.19 Tannaz üretimi ortamına eklenen mineral kaynaklarının tannaz aktivitesine ve biyokütleyle olan etkisi (Bradoo et al., 1997).

Katyonlar	%Derişim	Enzim Aktivite Kaybı (%)	Biyokütledeki Azalma (%)
CaCl ₂	0.2	95.45	12.12
CdCl ₂		100	6.06
Cu(NO ₃) ₂		74.24	9.09
Mg SO ₄		78.79	12.12
ZnSO ₄		86.36	21.21
HgCl ₂		100	6.06
MnCl ₂		87.88	15.15
CH ₃ CO ₂ Pb		100	21.21
FeSO ₄		90.91	6.06

*250 ml erlende, Czapek-Dox Minimal Ortamı, [50 ml, %1.0 TA (ağırlık/hacim) tek karbon kaynağı], 24 saat, 37 °C

2.7.1.7 Üretim Süresi

Tannaz aktivitesinin optimum olduğu süre, üretim tipi, kullanılan mikroorganizmanın suşu ve üretim ortamı bileşimi başta olmak üzere diğer proses parametrelerinin bir fonksiyonudur. Bakteriler için üretim süresi genellikle 24 saati geçmemektedir. Fakat *Citrobacter freundii* TB3, 6. saate maksimum tannaz aktivitesi (1.87 U/ml) göstermesine rağmen, 120 saate kadar üretim sürdürüldüğünde, bu bakteri suşunun ortamdaki %1.0 TA'nın (ağırlık/hacim) %90'nı parçalayabildiği bildirilmiştir (Kumar et al., 1999). Funguslar için derin kültürde 36 saat ile 120 saat arasında, katı kültürde ise en kısa 48 saat sürmekte ve 168 saate kadar çıkabilmektedir (Çizelge 2.20). Katı kültürün derin kültüre karşı birçok üstünlüğü bulunması rağmen, uzun süreler gerektirmesi bir dezavantajı olarak kabul edilmektedir.

Çizelge 2.20 Tannaz üretimi için kullanılan üretim süreleri

Üretim Süresi (Saat)	Mikroorganizma	Referanslar
20	<i>Bacillus licheniformis</i> KBR 6	Mondal et al., 2000
24	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pantoea agglomarans</i> T71 <i>Aspergillus japonicus</i>	Bradoo et al., 1997; Zeida et al., 1998; Ayed and Hamdi, 2002;
36	<i>Aspergillus aculeatus</i> DBF 9	Banerjee et al., 2001
46	<i>Aspergillus awamori</i> nakazawa	Mahapatra et al., 2005
48	<i>Aspergillus niger</i> Aa-20 <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus caespitosum</i> <i>Penicillium charlesii</i> <i>Penicillium variable</i> <i>Penicillium crustosum</i> <i>Penicillium restrictum</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	Aguilar al.,2001a; Aguilar et al., 2001b; Batra and Saxena, 2005; Kar and Banerjee, 2000
72	<i>Rhizopus oryzae</i> <i>Lactobacillus türü</i> (suş ASR-S1) <i>Paecilomyces variotii</i> <i>Penicillium variable</i> IARI 2031	Kar and Banerjee, 2000; Saxena and Saxena, 2004; Mahendran et al., 2006 Sabu et al., 2006
96	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16620 <i>Aspergillus ruber</i>	Sabu et al., 2005a; Sabu et al., 2005b; Kumar et al., 2006
120	<i>Aspergillus niger</i> Aa-20 <i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425 <i>Penicillium chrysogenum</i> NCIM-722 <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16620 <i>Citrobacter freundii</i> TB3	Sharma et al., 1999; Sharma et al., 2000; Rajakumar and Nandy, 1983; Sabu et al., 2005b; Ramírez-Coronel et al.,2003; Kumar et al., 1999
168	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425	Bhat et al., 1997
48–168	<i>Penicillium glabrum</i> FST 99	Lagemaat and Pyle, 2001

2.7.1.8 İnokulum Miktarı

Kültür ortamına aktarılan inokulum değeri, yüzde olarak ifade edilebildiği gibi, ml'deki veya katı substrat başına olan spor sayısı olarak da verilebilmektedir. Katı substrat başına spor sayısı, katı kültür için tercih

edilen bir ifade şekli olarak karşımıza çıkmaktadır. Tannaz üretimi için, inokulum değerleri katı kültürde 10^7 – 10^{10} adet/(g substrat) arasında iken, derin kültürde 10^7 adet/ml olarak kullanılmıştır (Çizelge 2.21).

Çizelge 2.21 Tannaz üretimi için kullanılan inokulumun yüzdesi ve/veya miktarı

İnokulum Miktarı/ İnokulum Yüzdesi	Mikroorganizma	Referanslar
%1	<i>Bacillus licheniformis</i> KBR 6 <i>Citrobacter freundii</i>	Kumar et al., 1999 Mondal and Pati, 2000; Mondal et al., 2000
%2	<i>Aspergillus aculeatus</i> DBF 9	Banerjee et al., 2001
2×10^7 spor/g kuru inert destek	<i>Aspergillus niger</i> Aa–20	Aguilar et al., 2001b;
%5 (2×10^7 spor/ml)	<i>Aspergillus niger</i> Aa–20	Aguilar et al., 2001b
%5	<i>Aspergillus</i> SHL 6	Huang et al., 2005
$3\text{--}4 \times 10^7$ spor/ml	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425	Sharma et al., 1999; Sharma et al., 2000
5×10^7 spor/g karbon kaynağı	<i>Aspergillus niger</i> Aa–20	Ramírez-Coronel et al., 2003;
5×10^7 spor/ml	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus japonicus</i> <i>Penicillium restrictum</i> <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus caespitosus</i> <i>Penicillium charlesii</i> <i>Penicillium variable</i> <i>Penicillium crustosum</i> <i>Penicillium variable</i> IARI 2031	Bradoo et al., 1997; Saxena and Saxena, 2004; Batra and Saxena, 2005;
8×10^8 hücre/ml	<i>Lactobacillus</i> türü (suş ASR-S1)	Sabu et al., 2006
10^9 – 10^{10} spor/ml	<i>Aspergillus ruber</i>	Kumar et al., 2006
1.1×10^{10} spor/ml		Sabu et al., 2005a;
4.4×10^{10} spor/ml	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16620	Sabu et al., 2005b
3.5×10^{10} spor/g tannik asit	<i>Penicillium glabrum</i> FST 99	Lagemaat and Pyle, 2001

2.7.1.9 Karbon/Azot Oranı

Üretim ortamının Karbon/Azot oranının tannaz üretimindeki etkisi üretimlerde fazla üzerinde durulmamış bir proses parametresi olarak göze çarpmaktadır.

Czapek-Dox minimal ortamı, %1.0 TA (ağırlık/hacim) eklenerek tannaz üretim ortamı olarak hem katı kültür hem de derin kültür için yaygın olarak kullanılmaktadır (Rajakumar and Nandy, 1983; Bradoo et al., 1997; Sharma et al., 2000; Pinto et al., 2001; Batra and Saxena, 2005) (Çizelge 2.22).

Çizelge 2.22 Czapek-Dox Minimal ortamı içeriği

Madde	Miktar (g/l)
NaNO ₃	3.0
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄	0.5
KCl	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01

✓ Ortamda % 1.0 TA olacak şekilde, steril TA çözeltisi eklenir.

Amonyum nitrat dışındaki bir azot kaynağını içeren, en yaygın kullanılan diğer ortamlar aşağıda sunulmuştur (Çizelge 2.23 ve Çizelge 2.24).

Çizelge 2.23 Diğer bir tannaz üretim ortamının içeriği* (Banerjee et al., 2001).

Madde	Miktar (g/l)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.0
MgSO ₄	1.0
KH ₂ PO ₄	0.5
CaCl ₂	0.3

✓ Ortamda % 1.0 TA olacak şekilde, steril TA çözeltisi eklenir.

* *Aspergillus aculeatus* DBF 9 ile 30 °C sıcaklıkta, 200 devir/dakika'da ve 16 saatlik üretim ortamı

Çizelge 2.24 *Aspergillus niger* ile tannaz üretimi için kullanılan tipik bir ortam (Belmares et al., 2004).

Madde	Miktar (g/l)
Tanenler	50
Glukoz	3.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.0
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1
NaCl	0.005

Czapek-Dox Minimal Ortamının C/N oranı 10.94, Çizelge 2.23'deki ortamınki 8.37, Çizelge 2.24'teki ortamınki ise 29.06 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçların ışığında, tannaz üretim ortamı için C/N oranının 10 veya 30 olması gerektiği önerilebilmektedir.

2.7.1.10 Çalkalama Hızı

Katı kültürdeki üretimler, sıklıkla durağan halde yürütülmektedir. Katı kültürde *Rhizopus oryzae* ile tannaz üretimi için optimum inkübasyon süresinin; 72 saat, derin kültür için ise; 48 saat olması karıştırmanın tannaz sentezi üzerinde kayda değer bir etkisinin olduğunu ifade etmektedir (Kar and Banerjee, 2000). Derin kültür için etkili bir proses parametresi olan çalkalama hızı, tannaz üretimi için 120 ile 250 devir/dakika arasında değişmektedir (Çizelge 2.25). Çalışmaların bir kısmında optimizasyon çalışması yapılarak optimum bir değer bulunmuşken, diğer kısmında ise doğrudan belirlenmiş bir çalkalama hızını kullanmıştır. 200 devir/dakika, tannaz üretiminde en çok tercih edilen çalkalama hızı olmuştur.

Çizelge 2.25 Tannaz üretimi için derin kültürdeki çalkalama hızları

Çalkalama Hızı	Mikroorganizma	Referanslar
120	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425 <i>Aspergillus</i> SHL 6	Sharma et al., 1999; Sharma et al., 2000; Huang et al., 2005
140	<i>Paecilomyces variotii</i>	Mahendran et al., 2006
150	<i>Penicillium variable</i> IARI 2031	Saxena and Saxena, 2004
160	<i>Aspergillus niger</i> MTCC 282 <i>Aspergillus fischerii</i> MTCC 150 <i>Fusarium solani</i> MTCC 350 <i>Tricoderma viride</i> MTCC 167	Bajpai and Patil, 1997
200	<i>Aspergillus aculeatus</i> DBF 9 <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus caespitosum</i> <i>Aspergillus niger</i> MS 101 <i>Aspergillus niger</i> MTCC 2425 <i>Fusarium</i> türleri <i>Penicillium</i> türleri <i>Penicillium charlesii</i> <i>Penicillium variable</i> <i>Penicillium crustosum</i> <i>Penicillium restrictum</i> <i>Bacillus licheniformis</i> KBR 6 <i>Trichoderma</i> türleri	Banerjee et al., 2001; Batra and Saxena, 2005 Mondal et al., 2000; Mondal et al., 2000; Murugan et al., 2006
220	<i>Aspergillus niger</i> Aa-20	Aguilar et al., 2001b
250	<i>Aspergillus awamori</i>	Seth and Chand, 2000

2.7.1.11 Son Ürün Baskılaması

Tannazın son ürün baskılaması, hidroliz ürünü gallik asidin, üretim ortamında birikmesi ile meydana gelmektedir. %1 TA veya %1 glukoz içeren ortamda, gallik asit %0.03 derişimde, *Aspergillus japonicus* için %92.7 inhibisyona sebep olmuştur. Bu sebepten dolayı, tannaz aktivitesindeki düşüşün, üretimin 48. saatinden sonra ortamda biriken

gallik aside bağlanabileceği bildirilmiştir (Bradoo et al., 1997). Gallik asidin, *Aspergillus niger* Aa-20 için bir indüktör veya inhibitör olup olmadığı derin kültür ortamında incelenmiştir. Gallik asit tek karbon kaynağı olarak kullanıldığı durumda, hücre içi veya hücre dışı olduğu belirtmemek ile beraber tannaz aktivitesini baskıladığı ve bazal aktivite değeri 500 IU/ml olmasına rağmen, gallik asit varlığında tannaz aktivitesinin tespit edilmediği belirtirmiştir (Aguilar et al., 2001b). Diğer yandan gallik asidin *Aspergillus fischerii* MTCC 150 için maksimum indüksiyon oranını veren indüktör olduğu bildirilmiştir (Bajpai and Patil, 1997) (Çizelge 2.14). Buradan gallik asidin ortamda göstereceği etkinin mikroorganizmadan mikroorganizmaya farklılık gösterebileceği sonucu çıkartılabilmektedir. Gallik asitten başka pirogallolların ve galaldehidin de tannazı yarışmalı olarak inhibe ettiği bildirilmiştir (Bradoo et al., 1997).

Yukarda bahsedildiği gibi tannaz üretimi çeşitli proses parametrelerinden etkilenmektedir ve tannaz aktivitesi üretimin etkinliğini ifade eden en önemli değişken olarak karşılaştırmada kullanılmaktadır.

Aspergillus japonicus için tannaz enziminin, büyümenin ilk fazında üretildiği ve daha sonra üretiminin azaldığı ifade edilmiştir. Maksimum enzim üretimine; 24. saatten sonraki bir saatte ulaşıldığı, 48. saatte düşüşün başladığı ve 72. saatte ise ciddi şekilde düştüğü kaydedilmiştir. 24., 48. ve 72. saatteki enzim aktivite değerleri sırası ile statik kültürde; 29.55- 25.91- 3.18 U/ml, çalkalamalı kültürde: 31.36, 27.73, 4.55 U/ml olmuştur. Biyokütle ise bunun aksine hem durağan hem çalkalamalı kültürde sürekli olarak artış göstermiştir 24., 48. ve 72. saatteki enzim aktivite değerleri sırası ile statik kültürde; 14.09–25.45–30.00; çalkalamalı kültürde; 18.64–32.27–34.09 (g kuru ağırlık/50ml) olarak tespit edilmiştir (Bradoo et al., 1997). *Bacillus licheniformis* KBR 6'nın maksimum tannaz sentezinin, büyümenin logaritmik evresinde (18–21 saat) gerçekleştiği bildirilmiştir.

Bu bakteriyel suş için logaritmik evredeki tannaz aktiviteleri 1.91×10^{-1} - 1.81×10^{-1} U/ml arasında değerler almıştır. Enzim üretiminin büyüme ile doğru orantılı olarak değişmesinden, hücrelerin hızlı bir şekilde artışının ortamda birikecek olan enzim miktarını da arttırmasının beklendiği belirtilmiştir (Mondal and Pati, 2000).

Genellikle endüstriyel enzimlerin aktivite tayininde kullanılan oturmuş az sayıda yöntem bulunmaktadır. Bunun aksine tannaz aktivite tayininde çok sayıda yöntem denenmiştir. Bu yöntemler, titriyometri, spektrofotometri, UV spektrofotometri, gaz kromatografisi veya yüksek performans sıvı kromatografisi gibi farklı tekniklere dayalı yöntemler olarak sınıflandırılabilir (Mondal et al., 2001). Bunun en büyük dezavantajı, farklı yöntemleri kullanmış olan çalışmaların geniş aralıkta farklılık göstermesi ile birlikte, kullanılan yöntemlere göre aktivite biriminin tanımının değişmesi ile karşılaştımanın zorlaşmasıdır.

Derin ve katı kültürün küçük ölçekteki üretimlerinde kullanılmış olan aktivite tayin yöntemleri ve tannaz aktivite değerleri Çizelge 2.26 ve 2.27’de karşılaştırılmıştır. Katı kültürde derin kültürden farklı olarak, relatif nem, katı taşıyıcı/substrat çeşidi, substrat miktarı ve katı-sıvı oranı gibi üretim parametreleri de gözden geçirilmektedir.

Çizelge 2.26 Derin kültürde tannaz aktivite tayininde kullanılan yöntemler ve tannaz aktivite değerleri

Tannaz Aktivite Tayin Metodu	Mikroorganizma	Tannaz Aktivite Değeri	Referans
Libuchi et al., 1966	<i>Penicillium chrysogenum</i>	3.6 U/mg protein	Rajakumar and Nandy, 1983
Libuchi et al., 1967	<i>Lactobacillus plantarum</i>	6 U/ml	Ayed and Hamdi, 2002
Libuchi et al., 1972	<i>Aspergillus japonicus</i>	33.06 U/ml (Hücre dışı)	Bradoo et al., 1997
Hagerman and Butler, 1978	<i>Bacillus licheniformis</i> KBR 6	0.21 U/ml	Mondal et al., 2000
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	8.3 IU/ml	
	<i>Aspergillus versicolor</i>	7.0 IU/ml	
	<i>Aspergillus flavus</i>	4.95 IU/ml	Kumar et al., 1999;
	<i>Aspergillus caespitosus</i>	4.47 IU/ml	Saxena and Saxena, 2004;
Deschamps et al., 1983	<i>Penicillium charlesii</i>	4.82 IU/ml	Batra and Saxena, 2005;
	<i>Penicillium variable</i>	4.70 IU/ml	
	<i>Penicillium crustosum</i>	4.70 IU/ml	
	<i>Penicillium restrictum</i>	4.47 IU/ml	
	<i>Penicillium variable</i> IARI 2031	33U/ml	
	<i>Citrobacter freundii</i>	1.87 U/ml	
belirlenmemiş	<i>Aspergillus</i> SHL 6	23.85 U/ml	Huang et al., 2005
belirlenmemiş	<i>Aspergillus niger</i> MTCC 282	2.8 U/g misel kütlesi	Bajpai and Patil, 1997
	<i>Aspergillus ficiformis</i> MTCC 150	50.3 U/g misel kütlesi	
	<i>Fusarium solani</i> MTCC 350	231.6 U/g misel kütlesi	
	<i>Tricoderma viride</i> MTCC 167	84.2 U/g misel kütlesi	
Skene and Brooker, 1995	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	0.7 U/mg protein	Sharma et al., 1999;
	<i>Aspergillus niger</i>	63 U/ml	
	<i>Candida utilis</i>	32 U/ml	Shi et al., 2005
Sharma et al., 2000	<i>Paecilomyces variotii</i>	420 U/ml (1.615 U/mg)	Mahendran et al., 2006
Mondal and Pati, 2000	<i>Aspergillus aculeatus</i> DBF 9 (Kırmızı Saflaştırılmış Enzim)	3.88 U/ml (Hücre içi)	1.00 U/ml (Hücre dışı)
			Banerjee et al., 2001

Çizelge 2.27 Katı kültürde tannaz aktivite tayininde kullanılmış yöntemler ve tannaz aktivite değerleri

Mikroorganizma	Katı Taşiyici/ Substrat	Relatif Nem (%)	Üretim Ortamı ve Parametreleri	Tannaz Aktivitesi ve Kullanılan Yöntem	Referanslar
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16620	5 g Buğday kepeği,	-	250 ml erlen	3.9 U/ml (Sharma et al., 2000)	Sabu et al., 2005a;
	5 g Palmiye çekirdeği küspesi + %5 TA (ağırlık/ağırlık)	53.5	250 ml erlen		
	5 g Demirhindi meyvesinin tohum tozu + %1 gliserol (hacim/ağırlık)		250 ml erlen	13.03 IU/g kuru substrat	Sabu et al., 2005b
		65.75	%1 KNO ₃ (ağırlık/ağırlık)	6.44 IU/g kuru substrat (Sharma et al., 2000)	
<i>Aspergillus niger</i> Aa-20	10 g Polüretan köpük + 2.5 g/l glukoz	-	250 ml erlen	Safılaşırılmış enzim aktivitesi: 0.84 µmol/dakika.(mg protein) HPLC yöntemi (Beverini and Metche, 1990)	Ramirez-Coronel et al., 2003;
Gubernadora tozu (3:7 oranında kültür ortamı ile doyurulmuş)	Petri kabi				
	Biküvel materyalde iletilme hızı		Gallik asit üretkenliği (g/l.saat)		
	NaNO ₃ ortamı	0.15	0.007	964 U/ml	
	(NH ₄) ₂ SO ₄ ortamı	0.19	0.008	1042U/ml (Sharma et al., 2000)	

Treviño-Cueto et
al., 2006

Çizelge 2.27'nin devamı

Mikroorganizma	Katı Taayıcı/ Substrat	Relatif Nem (%)	Üretim Ortamı ve Parametreleri	Tannaz Aktivitesi ve Kullanılan Yöntem	Referanslar
<i>Aspergillus niger</i> 11T25A5	10g Buğday kepeği + %0.8 TA (ağırlık/ağırlık)	-	125 ml erlen	67.5 U/g (Sanderson and Coggon, 1974)	Pinto et al., 2001
<i>Aspergillus ruber</i>	5 g <i>Spygium cumini</i> yaprağı	-	250 ml erlen Katı substrat/çözme sıvı: 1:2 (ağırlık/hacim)	69 U/g katı substrat (Mondal et al., 2001)	Kumar et al., 2006
<i>Lactobacillus türü</i> (cuş ASR-S1)	5 g Kahve küspesi+ %0.6 TA (ağırlık/ağırlık)	-	250 ml erlen 1ml hücre süspansiyonu Nem: %50	0.85 U/g kuru substrat (Sharma et al., 2000)	Sabu et al., 2006
<i>Penicillium glabrum</i> FST 99	0.7 g Poliuretan köpük, %5 TA (ağırlık/ağırlık)	-	250 ml erlen (durağam) Taayıcının ağırlığı/ sıvı büyümeye ortamı= 1.0 g:21.4 ml	12.4 µmol/ml dakika (Lekha and Lonsane, 1994)	Lagemaat and Pyle, 2001; Lagemaat and Pyle, 2005
<i>Rhizopus oryzae</i> RO HT RB-13 NRRL 21498	2g <i>Caesalpinia digyna</i> tohum zarfı	93	Katı Kültür-Petri kabı Yatak Yüksekliği: 0.15 cm Katı/sıvı oranı= 1:1	23.86 U/ml (Libuchi et al., 1966)	Kar et al., 1999; Kar and Banerjee, 2000; Kar et al., 2002

2.7.2 Mikrobiyal Tannazın Biyoreaktörde Üretimi

Tannaz endüstriyel bir enzim olmasına rağmen, yürütülmüş olan mevcut araştırmaların genellikle erlen boyutunda olması göze çarpmaktadır. Sayılı çalışmada ölçek büyütülerek biyoreaktörde tannaz üretimi gerçekleştirilmiş ve tannaz üretimine etki eden proses parametreleri belirlenmiştir. Çalışmalar laboratuvar tipi katı kültür ve derin kültür biyoreaktörlerinde gerçekleştirilmiştir.

2.7.2.1 Derin Kültür

Derin kültür, yüksek oksijen talebini karşılayabilmek için yeterli hızlarda oksijenin beslendiği ve katı kültüre göre enerji giderlerinin daha fazla olduğu homojen bir sistem olarak nitelendirilmektedir. Derin kültürdeki tannaz üretiminde, katabolik baskılamayı engellemek için, substratın kesikli besleme ile verileceği otomatik bir sisteme ihtiyaç duyulmaktadır (Viniegra-González, et al., 2003).

Tannaz üretiminin derin kültür biyoreaktörde denendiği son yıllarda yapılmış üç çalışma bulunmaktadır (Çizelge 2.28). Bu çalışmalarda *Aspergillus awamori*, tabakhane atıklarından izole edilmiş suşlar ve rekombinant *Pichia pastoris* kullanılmıştır.

Aspergillus awamori, hücre içi tannaz üretimi için derin kültür biyoreaktörde denenmiştir ve Response Surface Method (RSM) ile proses parametreleri optimize edilmiştir (Çizelge 2.28). Biyoreaktörde tannaz üretimi gerçekleştirilmeden önce, hücre artışı, enzim sentezi ve gallik asit oluşumu üzerine proses parametrelerinin (karıştırma hızı, karbon ve azot

kaynağı çeşidi/derişimi ve pH) etkisini belirlemek amacı ile çalkalamalı inkübatörde üretimler gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçların ışığında biyoreaktörde üretimlere geçirmiştir. Hücre artışı ile çözünmüş oksijen seviyesinin düşmesinin enzim sentezine olumlu etkisi olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden, karıştırma ve havalandırma hızı proses boyunca sabit tutulmuş, önceden belirlenmiş bir çözünmüş oksijen seviyesine ulaşmak için fermentasyon boyunca değiştirilmemiştir. Ayrıca havalandırma hızının 0.75 vvm'in üstüne çıkarılması, tanenlerin yükseltgenmesi ile sonuçlanmıştır. Substrat derişiminin, 45 g/l'nin üstüne çıkarılması halinde ise gallik asit hücre yüzeyinde birikmiş ve biyokütle artışını kısıtlamıştır. RSM ile yapılan optimizasyonun sonuçları; düşük substrat derişimlerinde (<25 g/l), karıştırma hızındaki artışın enzim aktivitesini düşürdüğünü göstermiştir. Yüksek substrat derişiminde ve düşük karıştırma hızında gallik asit hücre yüzeyinde birikirken, yüksek karıştırma hızının da kayma gerilimine yol açıp enzim sentezini olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır (Seth and Chand, 2000).

Tabakhane atıklarından izole edilmiş, tannaz üretme yeteneğindeki fungusların, önce petride oluşturdıkları koloni çapları incelenmiş, daha sonra bu mikroorganizmalardan en başarılı olanlar ile derin kültür biyoreaktörde tannaz üretimi gerçekleştirilmiştir (izelge 2.28). Derin kültürdeki tannaz aktivite değerleri ile katı besi ortamında oluşturdıkları koloni çapları, birbiri ile uyumlu sonuçlar vermiştir. *Aspergillus niger* MS 101, hücre içi ve hücre dışı tannaz üretiminde en yüksek aktivite değerlerini veren suş olmuştur (Murugan et al., 2006).

Rekombinant proteinlerin üretimi için kullanılan bir vektör olan metilotropik maya türü *Pichia pastoris*, belirli ortamlarda, yüksek miktarda

biyokütle oluşturmaktadır. Rekombinant *Pichia pastoris* ile biyoreaktörde gerçekleştirilen kesikli besleme tannaz üretiminde 7000 IU/l aktiviteye ulaşılmıştır (Çizelge 2.28). Bu katı kültürdeki tannaz aktiviteleriyle karşılaştırıldığında, üretkenlikte 3.5 kat artış sağlamıştır. Bu enzimin saflaştırılması ile 50 000 IU/g aktiviteye sahip saf tannaz elde edilmiştir (Zhong et al., 2004).

2.7.2.2 Katı Kültür

Tannaz üretiminin katı kültür biyoreaktörde denendiği çalışmalar, genellikle erlen ve petrideki küçük ölçekteki üretimlerle karşılaştırılmalı olarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.25 ve 2.27).

Katı kültürde üretim ortamının karıştırılması, sporlaşmayı inhibe etmektedir. Havalandırma ise katı parçacıklar tarafından oluşturulan karışımı ile sağlanmaktadır ve substrat tanecikleri arasındaki boşluklar da havalandırmayı kolaylaştırılmaktadır (Sabu et al., 2006).

Penicillium glabrum FST 99 ile tannaz enzimi üretimi erlende statik halde ve laboratuvar ölçekli döner tip bir biyoreaktörde 0.7 devir/dakika hızında karıştırılmalı olarak gerçekleştirilmiştir. Döner tip biyoreaktördeki üretimde spor inokülasyonu yapılmamış olan katı substrat, sürekli olarak beslenmiştir. Biyoreaktördeki ve erlendeki sonuçların değerlendirilmesi ile biyoreaktörde karıştırma sonucu oluşan kayma geriliminden dolayı statik kültüre göre daha düşük biyokütle, tannaz verimi ve spor oluşumu tespit edilmiştir (Çizelge 2.27 ve 2.29). Ancak 0.7 dönüş/dakika'dan düşük dönüş hızlarının enzim verimini ve spor oluşumunu artırırken, aynı zamanda biyoreaktörün etkin karıştırılmasını sağlayıp sağlayamayacağı araştırılmamıştır (Lagemaat and Pyle, 2001).

Birbirinden bağımsız olarak, *Aspergillus niger* Aa-20 suşunun hem küçük ölçekte hem de biyoreaktörde kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur (Çizelge 2.27 ve 2.29). Ancak hem üretim koşullarının aynı olmaması hem de enzim aktivite tayin metodlarını farklı olmasından dolayı, sonuçların karşılaştırılması mümkün olamamaktadır.

Katı kültürde, mikrobiyal üreme sonucu fazla miktarda ısı açığa çıkmakta ve bu ısı fermantasyon ortamının sıcaklığında ani bir artışa sebep olmaktadır. Açığa çıkan bu ısının, katı kültür ortamından uzaklaştırılması, ısı değiştiricinin olmaması ve katı substrat içindeki zayıf ısı transferi gibi sebeplerden dolayı zor olmakta ve katı substratta nem kaybına hatta kurumaya sebep olabilmektedir. Isının, mikroorganizma büyümesine olumsuz etkileri olduğu gibi, ısıl dayanımı olmayan ürünlerde denatürasyona da sebep olabilmektedir. Mikrobiyal üremenin oluşturduğu ısının sebep olduğu bu olumsuzlukların üstesinden gelebilmek için, modifiye katı kültür fermantasyonu (MKKF) geliştirilmiştir. MKKF’nda katı substratın üzerinde durduğu ve sıvı kültür ortamına daldırılarak, sıvı kültür ortamı ile sürekli olarak temas halinde bulunması sağlanan bir bölme mevcuttur ve katı substratın fermentasyonu burada gerçekleşmektedir. MKKF’nu yataktaki ısı birikimini en aza indirmektedir. Oluşan ürün, sıvı kültür ortamına geçtiğinden, fermantasyonun gerçekleştiği bölmede ürün birikimi olmamaktadır. Bu da mikroorganizmayı, geri besleme inhibisyonundan korumaktadır.(Kar et al., 1999). *Rhizopus oryzae* RO IIT RB-13 NRRL 21498 ile biyoreaktörde gerçekleştirilen MKKF ile petri kabındaki üretim ile karşılaştırıldığında, MKKF’da tannaz aktivitesinin 32.76 U/ml ile 23.86 U/ml olan petri kabındaki aktiviteden daha yüksek olduğu görülmüştür. *Rhizopus oryzae* RO IIT RB-13 NRRL 21498’in enzim aktivitesi 72. saate kadar artmış ve

ardından azalmıştır. Bu artışı takip eden azalışın çeşitli sebeplerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Bu olasılıklar;

- ✓ Substratın yetersiz kalması,
- ✓ Katabolik baskılama,
- ✓ Hücrelerin lizize uğramasına sebep olan, kateşik asit, 2,6-dihidroksi benzoik asit, pirogallol vb. toksit bileşiklerin salgılanması,
- ✓ Gallik asidin oluşması ile ilişkili olan metabolik düzenlemedir (Kar et al., 1999).

MKKF için kullanılan substrat, 5–40 g arasında kullanılarak optimum substrat miktarı, 20 g olarak tayin edilmiştir. 20 g substratın üstünde, hem tannaz aktivitesinde hem de gallik asit üretiminde düşüşün sebebinin, ara ürün olan hidrolizatlara (1,2,3,4,6-pentagalloyil glukoz; 2,3,4,6-tetragalloyil glukoz; monogalloyil glukoz vb.) bağlanabileceği bildirilmiştir. Bu hidrolizatlar, enzimin aktif merkezine yarışmalı veya yarışmasız olarak bağlanabilmektedir. Gallik asidin kendisi de bir yarışmalı inhibitör olarak etki etmektedir. Dahası, gallik asidin hidroksi grupları, enzimde konformasyon değişimlerine sebep olan, aktif merkezde bulunan aminoasitlerle hidrojen bağları oluşturabilmektedir. Diğer yandan substratın artması yatak boyunu arttıracığından, yatak boyunca sıvı difüzyonunun yetersiz kalmasına yol açmaktadır. Bu da substratın gallik aside olan hidrolizinin tamamlanamaması ile sonuçlanmaktadır (Kar et al., 1999; Kar and Banerjee, 2000). Ayrıca *Rhizopus oryzae* RO IIT RB–13 NRRL 21498 ile gerçekleştirilen MKKF’da fermentasyon süresi katı kültür ve derin kültürdeki 120 saatten 72 saate düşmüştür (Kar and Banerjee, 2000).

Çizelge 2.28 Derin kültür biyoreaktörlerdeki üretim parametreleri ve tannaz aktivite değerleri

Mikroorganizma	Tannaz Aktivite Değerleri Hücre içi enzim	Hücre dışı enzim	Üretim Ortamı ve Parametreleri	Tannaz Aktivite Tayin Metodu	Referans
<i>Aspergillus awamori</i>	5497.2 IU/l (771 IU/g kuru hücre)	-	Biyoreaktör Hacmi: 3 l TA derişimi: 25–45 g/l Azot Kaynağı: NaNO ₃ (3g/l) %5 inokulum (hacim/hacim) Karıştırma hızı: 300–400 devir/dakika Sıcaklık: 37 °C; pH: 4.0–6.0, Havalandırma hızı: 0.75 vvm Üretim süresi: 60 saat	Libuchi et al., 1967	Seth and Chand, 2000
(U/ml)					
<i>Aspergillus flavus</i>	1.1	9.1	Karıştırma Tank Tipi Biyoreaktör (Çalışma hacmi: 3.5 l) TA derişimi: %2 (ağırlık/hacim) Azot Kaynağı: NH ₄ NO ₃ (2 g/l) Karıştırma hızı: 400 devir/dakika Sıcaklık: 30 °C; pH: 5.5		Murugan et al., 2006
<i>Aspergillus niger</i> MS 101	3.6	16.77			
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 2425	3.0	9.7			
<i>Fusarium</i> türleri	1.8	6.1	Çözünmüş Oksijen Derişimi: %30	Mondal et al., 2001	
<i>Penicillium</i> türleri	0.1	3.0			
<i>Trichoderma</i> türleri	3.0	8.5			

Çizelge 2.28'in devamı

Mikroorganizma	Tannaz Aktivite Değerleri Hücre içi enzim (U/ml)	Hücre dışı enzim (U/ml)	Üretim Ortamı ve Parametreleri	Tannaz Aktivite Tayin Metodu	Referanslar
Rekombinant <i>Pichia pastoris</i> *	7000 IU/l		Biyorektör Hacmi: 7l	HPLC yöntemi Beverini and Metche, 1990	Zhong et al., 2004
			%10 inokulum (hacim/hacim)		
			Sıcaklık: 30 °C; pH: 5.0		
			Çözümün oksijen: %30		
			Havalandırma hızı: 2 vvm		
			Üretim ortamı bileşimi:		
			(NH ₄) ₂ SO ₄ 20 g/l, Gliserol 40 g/l; KH ₂ PO ₄ 12 g/l; CaSO ₄ · 2H ₂ O 1 g/l ve pH 5.0'e tamponlanmış 4.35 ml PTM1 (CuSO ₄ · 5H ₂ O 6.0 g/l; NaI 0.08 g/l; MgSO ₄ · H ₂ O 3.0 g/l; ZnCl ₂ 20.0 g/l; HBO ₃ 0.02 g/l; FeSO ₄ · 7H ₂ O 65 g/l; CoCl ₂ 0.5 g/l; biyotin 0.2 g/l; NaMnO ₄ · 2H ₂ O 0.2 g/l ve H ₂ SO ₄ 4 ml/l)		

* *Aspergillus oryzae*'den tannaz geni klonlanmıştır.

Çizelge 2.29 Katı kültür biyoreaktörlerdeki üretim parametreleri ve tannaz aktivite değerleri

Mikroorganizma	Katı Taşıyıcı/ Substrat	Relatif Nem (%)	Üretim Ortamı ve Parametreleri	Tannaz Aktivite Değerleri	Tannaz Aktivite Tayin Metodu	Referanslar
<i>Aspergillus niger</i> Aa-20	10 g Polimetan küpük +tannik asit (12.5,25,50,100 g/l)	65	Dolgu kolon biyoreaktör (25x180 mm) Havalandırma: 20mLhava/(g destek malzemesi).dakika	6.25 IU	HPLC yöntemi Beverini and Metche, 1990	Aguilar et al.,2001a
<i>Penicillium glabrum</i> FST 99	0.7 g Polimetan küpük, %5 (ağırlık/hacim) tannik asit	-	Yatay dönelü Biyoreaktör, 0.7 dönüş/dakika Taşıyıcının ağırlığı/ sıvı büyüme ortamı= 1.0 g:21.4 mL	6.8 µmol/mL.dakika	Lekha and Lonsane, 1994	Lagemaat and Pyle, 2001; Lagemaat and Pyle, 2005
<i>Rhizopus oryzae</i> RO III RB-13 NRRL 21498	20g <i>Caesalpinia digyna</i> tohum	93	Modifiye Katı Kültür- GROWTEK Biyoreaktör Yatak Yüksekliği: 1.5 cm Katı/sıvı oranı= 0.4:1 Gallik asit verimi:%90.9	32.76 U/ml	Lübuchi et al., 1966	Kar et al., 1999; Kar and Banerjee, 2000; Kar et al.,2002

Çizelge 2.29'un devamı

Mikroorganizma	Katı Taşınıcı/ Substrat	Relatif Nem (%)	Üretim Ortamı ve Parametreleri	Tannaz Aktivite Değerleri	Tannaz Aktivite Tayin Metodu	Referanslar
<i>Rhizopus oryzae</i> RO IIT RB-13 NRRL 21498 ve <i>Aspergillus</i> <i>foeniculus</i> GMRB013 MTCC 3557	35 g karışık substrat (<i>Caesalpinia</i> <i>digyna</i> tohum zarfı ve helile meyvesinin tozunun karışımı)	80	Modifiye Katı Kültür- GROWTEK Biyoreaktör Yatak Yüksekliği: 1.5 cm Katı/sıvı oranı= 0.4:1 Sıcaklık:30°C İnokulum hacmi: 3 mL Gallik asit verimi:%94.8 İnokulum hacmi: 3 ml 96 saat inkübasyon	41.3 U/ml	Libuchi et al., 1967	Banerjee et al., 2005

Mikrobiyal dönüşümlerde, genellikle tek bir mikroorganizmanın çoğalabilmesi için optimum şartların sağlanmaya çalışılmaktadır. Tek kültürlerin aksine, karışık kültür yönteminde ise, birden çok mikroorganizma bir arada yaşamını sürdürmektedir. Atıksu arıtımında kullanılan aktif çamur prosesi, karışık kültür için en çok verilen örnekler arasında yer almaktadır. Karışık kültür, üreme ve ürün oluşumunda tek kültürle sağlanamayan ilerlemeler sağlayabilmektedir. Karışık kültürün, enzimin üretiminde artışa sebep olduğu da bildirilmiştir (Pandey et al., 1999).

Doğada katı kültür fermantasyonu, daha çok karışık kültürde gerçekleşmektedir. Tannaz enziminin karışık kültürle üretilmesinde *Aspergillus foetidus* GMRB013 MTCC 3557 ve *Rhizopus oryzae* RO IIT RB-13 NRRL 21498 kullanılmıştır. MKKF biyoreaktördeki üretim, *Rhizopus oryzae* RO IIT RB-13 NRRL 21498 'in tek kültürüyle gerçekleştirilen MKKF'una göre tannaz aktivitesini 32.76 U/ml'den 41.30 U/ml'ye artırırken, gallik asit verimi de buna paralel olarak %90.9'den %94.8'ye çıkmıştır (Çizelge 2.29). Aynı mikroorganizmaların, karışık kültür sporlarının, UV, ısı ve 3-nitro,5-metil guanidin ile mutasyona uğratılması sonucu, elde edilen en iyi mutant olan SCPR 337 ile tannaz aktivitesi; 53.6 U/ml'ye; gallik asit verimi ise % 95.2'ye kadar ilerletilebilmiştir ve optimum aktiviteye ulaşılan süre 48 saatten 30 saate kısalmıştır. SCPR 337'in gecikme evresinin çok kısaldığı hatta kalmamış olabileceği ve tannazla beraber, proteaz ve amilaz da üretebilmesinin büyük ölçekte enzim üretimi için kullanılabilmesine imkan sağlayacağı bildirilmiştir (Banerjee et al., 2005; Purohit et al., 2006).

Bir elajitanen kaynağı olarak bilinen meşe palamudunun (*Quercus aegilops*), atıklarını içeren topraktan izole edilmiş iki mikroorganizma, *Aspergillus niger* ve *Candida utilis* olarak tayin edilmiştir. *Aspergillus niger* ve *Candida utilis*, meşe palamudu taneninin parçalanmasında çalkalamalı kültürde farklı karakteristik göstermişlerdir. *Aspergillus niger*, daha düşük elajitanen toleransı (20 g/l) ile birlikte, daha yüksek tannaz aktivitesi (63 U/ml) göstermiştir. *Candida utilis* ise aksine daha yüksek elajitanen toleransına (25 g/l) sahip olup, daha düşük tannaz aktivitesi (32 U/ml) göstermiştir. Kültürlerin biyokütle miktarındaki artış 660 nm'deki optik dansite ölçümüne göre tayin edilmiştir. En yüksek optik dansite değerine *Aspergillus niger* 6. günde (OD₆₆₀:1.450), *Candida utilis* ise 8. günde (OD₆₆₀:1.175) ulaşmıştır. *Aspergillus niger*'in geçikme evresi (2 gün) daha uzun olmasına rağmen, gecikme evresinden sonra daha hızlı çoğalarak, biyokütlesi 6. günde en yüksek değere ulaşmıştır. *Candida utilis* daha kısa geçikme evresine (1 gün) sahip olmasının yanında, gecikme evresinden sonra daha yavaş çoğalarak biyokütlesi ancak 8. günde en yüksek değere ulaşmıştır. *Candida utilis*'in, *Aspergillus niger*'den farklı olarak tannazla beraber polifenol oksidaz enzimi de sentezleyebildiği tespit edilmiştir. Elajitaneni metabolize etmelerindeki farklılıktan dolayı, bu iki mikroorganizma bir arada daha verimli bir biyodönüşüm sağlamak için, karışık kültürde denenmiştir. Karışık kültür, enzim aktivitelerinde ve elajik asit veriminde ilerleme sağlanmıştır. *Aspergillus niger* ve *Candida utilis* tek kültürlerinde sırası ile 63 ve 32 U/ml, tannaz aktivitesi göstermişken, karışık kültürde aktivite 66 U/ml'ye yükselmiştir. Polifenol oksidaz aktivitesi ise, 29 U/ml'den 47 U/ml'ye artmıştır. Elajik asit verimi, *Aspergillus niger* için 1.47, *Candida utilis* için 1.78 kat artmıştır. Bunun

yanında, birlikte daha çabuk büyüyerek, en yüksek biyokütle değerine 4. günde (OD₆₆₀: 1.800) ulaşmışlardır ve ortamdaki tüm elajitaneni (25 g/l) 7. günde parçalayabilmişlerdir. Bu iki mikroorganizmanın karışık kültürünün, tek kültüre göre daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır (Shi et al., 2005).

Polifenol oksidaz, tanenlerin yükseltgen kırılma ve yarıma reaksiyonlarında rol oynamaktadır. *Candida utilis*'in tek kültüründe *Aspergillus niger*'in %50'si kadar tannaz aktivitesi göstermesine rağmen, *Aspergillus niger*'in parçaladığı tanenin %80'i kadar tanen parçalayabilmesi, polifenol oksidazın da elajitanen parçalanmasına katıldığını göstermektedir (Shi et al., 2005).

Benzer şekilde TA'in parçalanmasında da tannazdan başka enzimlerin rol oynayabileceği bildirilmiştir (Van Diepeningen et al., 2004). Beyaz çürükçül fungus olan *Coriolopsis gallica*, bira endüstri atıksuyunun arıtımında kullanılmıştır ve tanen giderimi sağlayabilmiştir. Bu fungusun tannaz üretemediği tayin edildiği halde, TA'in tek karbon kaynağı olduğu, petri denemesinde, TA'i metabolize edebilmesi, TA'in biyodönüşümünde tannazdan başka, en az bir enzimin daha yer aldığını göstermiştir (Yagüe et al., 2000).

2.7.3 Mikrobiyal Tannazın Fizikokimyasal Özellikleri

Literatürde rapor edilmiş tannazların molekül kütlesi 186 ile 300 kDa arasında değişmektedir. Fakat *Aspergillus niger* Aa-20 suşundan saflaştırılmış tannaz, 90 kDa ile şu ana kadar tayin edilmiş en küçük molekül kütlesine sahiptir. Genelde, derin kültürle üretilmiş tannazlar, 4.0 çevresinde izoelektrik noktaya (pI) ve 30 ve 40 °C arasında optimum

sıcaklığa sahiptir. Optimum pH 5.0 ve 7.0 arasındadır. Fungal kaynaklardan elde edilen tannazın, daha geniş pH ve sıcaklık aralıklarında aktif olduğu tespit edilmiştir (Ramírez-Coronel et al.,2003; Purohit et al.,2006).

Tannaz, optimum pH'sı 5.5 çevresinde olan, asidik bir protein olarak kabul edilmektedir (Lekha and Lonsane, 1997). pH'nın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi, protonasyon ve deprotonasyonuna uğrayan aktif merkezdeki aminoasitlerin yapısına bağlıdır (Dixon and Webb, 1966). Literatürde *Aspergillus* türlerinin üretilmiş tannazların pH aralıkları incelendiğinde, aktivite için (pH 5.0–6.0); kararlılık için ise (pH 3.5–8.0) olduğu tespit edilmiştir. *Penicillium* türlerinden üretilmiş tannazın da benzer bir pH ilişkisi bulunmaktadır (Belmares et al., 2004). *Aspergillus niger* van Tieghem suşunun ürettiği tannazın iki optimum pH değeri bulunmuştur. Birincisi pH 6.0'da; ikincisi ise 4.5'tir. İki optimum pH'ya sahip olması farklı galloyil esterazların varlığına bağlanabileceği bildirilmiştir (Sharma et al.,1999).

Üretilmiş tannazların sıcaklık kararlılığı da farklılık göstermektedir (Çizelge 2.30). Yüksek sıcaklık optimumu ve termal kararlılığı olan enzimler endüstriyel uygulamalar için tercih edilmektedir (Sharma et al., 1999). Çizelge 2.30'da 70 °C'ye kadar kararlı kalabilen tannazların da olduğu görülmektedir.

Çizelge 2.30 Sentezlenmiş olan tannazların optimum sıcaklıkları ve sıcaklık kararlılıkları (Albertse, 2002).

Mikroorganizma	Optimum Sıcaklık	Sıcaklık Kararlılığı	Referanslar
Fungal tannaz			
<i>Aspergillus aculeatus</i> DBF 9**	Hücre içi: 60°C	-	Banerjee et al., 2001
<i>Aspergillus flavus</i>	Hücre dışı: 50°C 50 – 60°C	≤ 70°C	Yamada et al., 1968;
<i>Aspergillus oryzae</i>	30–40°C	55°C	Pourrat et al., 1982 Beverini and Metche, 1990; Iibuchi et al., 1968
<i>Aspergillus niger</i>	35°C	≤ 50°C	Halsam and Tanner, 1970
<i>Aspergillus niger</i> Aa-20*	70°C	60–70°C	Ramírez-Coronel et al., 2003
<i>Penicillium chrysogenum</i>	30–40°C	45°C	Rajakumar and Nandy, 1983
<i>Paecilomyces variotii</i> *	40°C	30–50°C -	Mahendran et al., 2006
<i>Chryphonectria parasitica</i>	30°C	25– 40°C	Farias, et al., 1992;
			Iibuchi et al., 1968
Maya tannazı			
<i>Candida</i> sp. K-1	50°C	≤ 50°C	Aoki et al., 1976
Bakteri tannazı			
<i>Bacillus licheniformis</i> KBR 6*	60 °C	20–70 °C	Mondal and Pati, 2000

**Kısmen saflaştırılmış tannaz

* Saflaştırılmış tannaz

Aspergillus aculeatus DBF 9'un hücre dışı tannazının hücre içi olana göre sıcaklık hassasiyeti göstermesinin, hücre içi proteazların etkisinden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Banerjee et al., 2001).

10 g/l NH_4NO_3 ve %0.1 TA (ağırlık/hacim) içeren sıvı üretim ortamına *Aspergillus niger* Aa-20 ile inokülasyon yapıldıktan sonra poliüretan köpüklere absorblanmış üretim ortamında 30 °C'de, 120 saat boyunca gerçekleştirilen katı kültür fermentasyonunda üretilmiş ve ardından saflaştırılmış olan tannazın aminoasit dizisinin, β -glukozidaz ile

özdeş olduğu saptanmıştır ve bu tannaz aynı zamanda selobiyaz aktivitesi de göstererek, selobiyoza glukoza hidroliz edebilmiştir. Ancak TA varlığında, herhangi bir β -glukozidaz enzim aktivitesi tayin edilememiştir. Bu, tannazın hem esteraz ve hem de selobiyaz aktivitesi gösterdiğine dair ilk bilgi olarak verilmiştir (Ramírez-Coronel et al., 2003).

Enzimlerin büyük çoğunluğu, maksimum aktivitelerini gösterebilmek için, ortamda metal iyonlarının varlığına ihtiyaç duymaktadır. Genellikle metal iyonlarının düşük derişimi, enzim için kofaktör olarak etki edip, katalitik aktiviteyi artırırken, yüksek derişimler, enzim aktivitesinin tümüyle kaybolmasına dahi sebep olabilmektedir. Enzim reaksiyonlarının, metal iyonlarıyla aktivasyonu, maksimum katalitik aktivite veriminin sağlanmasında etkili olduğu için, endüstriyel uygulamalar için önem taşımaktadır (Kar et al., 2003)

Farklı mikroorganizmalarca üretilmiş tannazların aktivitesi üzerine çeşitli kimyasal maddelerin ve özellikle de metal tuzlarının etkisi birçok çalışmada gözden geçirilmiştir. Ancak her mikroorganizma için indüktör ve inhibitör etkisi farklılık göstermektedir (Bhardwaj et al., 2003).

Çizelge 2.31 Tannaz aktivitesi üzerine inhibitif etki gösteren kimyasal madde, anyon veya katyonlar

Tannazın Elde Edildiği Mikroorganizma	Kimyasal Madde/Anyon/Katyon	Derişim (mM)	EnzimAktivitesindeki % İnhibisyon	Referanslar
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem MTCC 2425	Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)	20	0	Bhardwaj et al., 2003
	ZnCl ₂		58	
	MgSO ₄		33	
	CdCl ₂		55	
	MnCl ₂		54	
	CaCl ₂		41	
<i>Penicillium chrysogenum</i> NCIM-722	ZnCl ₂	20	22	Rajakumar and Nandy, 1983
	ZnSO ₄ .7H ₂ O		45	
	FeSO ₄ .7H ₂ O		45	
	MgSO ₄ .7H ₂ O		17	
	MnSO ₄ .4H ₂ O		22	
	CuSO ₄ .5H ₂ O		53	
	NiCl ₂ .6H ₂ O		42	
	Co(NO ₃).6H ₂ O		36	
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16620	Ca(CH ₃ COO) ₂	100	33	Sabu et al., 2005a;
	Mg ²⁺		95.23	
	Cu ²⁺		100.00	
	Fe ²⁺		100.00	
	Ca ²⁺		85.71	
	Zn ²⁺		100.00	
<i>Rhizopus oryzae</i> RO IIT RB-13 NRRL 21498	Mn ²⁺	1.0	100.00	Kar et al., 2003
	Ba ²⁺		94.62	
	Ca ²⁺		13.38	
	Zn ²⁺		78.73	
	Hg ²⁺		86.21	
	Ag ⁺		17.59	
	Fe ³⁺		100.00	
	Co ²⁺		100.00	
	CaCO ₃		71.88	
	NaOH		28.12	
	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈		53.12	
	EDTA		70.32	
	1,10- <i>o</i> -fenantroleyin		12.01	
	Dimetilsülfoksit (DMSO)		80.94	
	β- Merkaptotanol		31.67	

Çizelge 2.32 Tannaz aktivitesi üzerine aktivatör etki gösteren kimyasal madde, anyon veya katyonlar

Tannazın Elde Edildiği Mikroorganizma	Kimyasal Madde/Anyon/Katyon	Derişim	Enzim Aktivitesindeki % Artış	Referanslar
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16620	K ⁺	100 mM	35.10	Sabu et al., 2005a
<i>Rhizopus oryzae</i> RO IIT RB-13 NRRL 21498	Mg ²⁺	1.0 mM	37.93	Kar et al., 2003
	Hg ⁺		5.0	
	Na ₂ S ₂ O ₃		120.44	
	NaBr	% 0.1 (ağırlık/hacim)	64	
	(NH ₄) ₂ SO ₄		2.53	
	NH ₄ NO ₃		18.73	
	NH ₄ Cl		300.65	
	(NH ₄) ₂ SO ₄ .FeSO ₄ .6H ₂ O		71.01	

Rhizopus oryzae RO IIT RB-13 NRRL 21498'den MKKF ile üretilmiş tannazın aktivitesi üzerine, Tween 40 ve Tween 80 [%0.025–0.50 (hacim/hacim)], Tween 60 [0.05-1.0% (hacim/hacim)], sodyum lauri sülfat (SLS) [%0.05-1.0 (ağırlık/hacim)], Triton X-100 [%0.03-0.5 (hacim/hacim)], üre (0-4M) ve soya sosunun [%0.05-1.0 (ağırlık/hacim)] belirtilen derişim aralıklarında olan etkileri incelenmiştir. Tween 40, [%0.025–0.40 (hacim/hacim)] aralığında aktivatör gibi davranıp aktiviteyi %36 arttırmış, [%0.40–0.50 (hacim/hacim)] aralığında ise inhibitör gibi davranıp aktiviteyi %31.6 azaltmıştır. Benzer şekilde Tween 80, [%0.025–0.050 (hacim/hacim)] aralığında aktivatör gibi davranıp aktiviteyi %10.71 arttırmış, [%0.050–0.50 (hacim/hacim)] aralığında ise inhibitör gibi davranıp aktiviteyi %96.43 azaltmıştır. Üre de (0–1.5M) aralığında aktivatör gibi davranıp aktiviteyi %119.44 arttırmış, (1.5–4.0 M) aralığında ise inhibitör gibi davranıp aktiviteyi %77.78 azaltmıştır. [%1.0 (hacim/hacim)] Tween 60'ın %100; [%1.0 (ağırlık/hacim)] SLS'nin

%88.14; ve [%0.5 (hacim/hacim)] Triton X-100'ün %79.45; [%1.0 (ağırlık/hacim)] soya sosu %96.92 aktivite kaybına sebep olduğu tespit edilmiştir (Kar et al., 2003).

Aspergillus awamori nakazawa'dan statik-derin kültür ile üretilmiş ve ardından saflaştırılmış tannaz aktivitesi üzerine, SLS [%0.1–5.0 (ağırlık/hacim)], üre (1.0–8.0 M) ve EDTA'nın diamonyum tuzunun (1–10 mM), belirtilen derişim aralıklarında olan etkileri incelenmiştir. SLS'nin [%3 (ağırlık/hacim)], ürenin 5M ve EDTA'nın diamonyum tuzunun 7 mM derişimde, %100 aktivite kaybına yol açtığı bulunmuştur (Mahapatra et al., 2005).

Üzerinde durulan kimyasal maddelerin aktivatör ve inhibitör etkilerinin derişim aralığına bağılı olarak farklılık gösterebilmesi, ayrıca farklı kaynaklara ait tannazlar için aktivatör ve inhibitör kavramının da değışken olmasından ötürü, üretilmiş olan her tannaz için kimyasal maddelerin yaptığı etkilerin yeniden belirlenmesi gerekmektedir.

Tannaz, geniş uygulama alanı olan bir enzim olduğundan, saflaştırılması ve karakterizasyonu için süregelen araştırmalar da eskiden beri gerçekleştirilmektedir (Mahapatra et al., 2005). Çizelge 2.33'te farklı mikroorganizmalardan elde edilmiş tannazların saflaştırılmasında izlenen stratejiler verilmiştir.

İmmobilize enzim, endüstriyel uygulamalarda enzimin tekrar kullanılabilirliğini sağlaması, ürün ayırımının mümkün olması, enzimi daha kararlı hale getirmesi ve dolgulu yatak reaktörlerde sürekli kullanılabilmesini içeren avantajlar sunmaktadır (Mahendran et al., 2006). Derin kültürde, üretilmiş olan tannazın büyük bir kısmı hücreye bağılı kaldığından, üretilen biyokütle de biyokatalizör olarak tekrar kullanılabilir (Belmares et al., 2004). İmmobilize edilmiş ve serbest tannazın özelliklerinin karşılaştırılması Çizelge 2.34'te sunulmuştur.

Çizelge 2.33'ün devamı

Tamamın Elde Edildiği Mikroorganizma	Üretildiği Kültür	Ayırma-Safılaştırma İşlemleri	Referans
Kültür	Kültür	Yöntemi	Derin
<i>Aspergillus japonicus</i>	X ^{††}	✓ Filtrasyon (Whatman No.1) ✓ 1 M HCl ile pH ayarlama (pH 3.0) ✓ %0.1 TA (ağırlık/hacim)+ %0.1 PEG 6000 (ağırlık/hacim) ✓ Santrifugasyon (8.000 x g, 15 dakika) ✓ Supernatantın pH'sinin ayarlanması (pH 4.5) ✓ %0.1 TA+ %0.1 PEG 6000 ✓ Santrifugasyon (8.000 x g, 15 dakika) ✓ Çökeleğin 0.01 M, pH 6.0 forfat tamponunda çözülmesi	Cupta et al., 1997
<i>Paecilomyces variotii</i>	X	✓ Kültür ortamının ayrılması ✓ Santrifugasyon (10.000 x g, 15 dakika, +4 °C) ✓ Amonyum sülfat çöktürmesi ✓ Dializ (asetat tamponuna karşı) ✓ İyon Değişirme Kromatografisi (DEAE-selüloz kolon) ✓ Jel Filtrasyon Kromatografisi (Sephadex G-200 kolon)	Mahendran et al., 2006
<i>Penicillium chrysogenum</i> NCIM-722	X	✓ Kültür ortamının ayrılması ✓ Hücre Parçalama (Bkz Çizelge 2.10) ✓ Santrifugasyon (8.000 x g, 15 dakika) ✓ Amonyum sülfat çöktürmesi ✓ DEAE-selüloz kolon Kromatografisi ✓ Jel Filtrasyon (Sephadex G-200 kolon)	Rajakumar and Nandy, 1983
Rekombinant <i>Pichia pastoris</i> *	X	✓ Ultrafiltrasyon -30kDa moleküler kütlesi Amicon Membran (Millipore) ✓ 1.6x10 cm DEAE Sefaroz Kromatografisi	Zhong et al., 2004

†† Statik halde, üretilmiş, hücre dışı tımanaz.

* *Aspergillus oryzae*'den tımanaz geni klonlanmıştır.

Çizelge 2.34 İmmobilize tannazın özellikleri

Tannazın Elde Edildiği Mikroorganizma	Destek Matzemeleri	İmmobilizasyon yöntemleri	Serbest Enzim Özellikleri	İmmobilize Enzim Özellikleri	Referans
<i>Aspergillus oryzae</i>	Koloidal kitin, kitozan, Dowex 50W, DEAE Sefadex A-25, akrilamit, Na-aljinat	Fiziksel adsorpsiyon, iyonik bağlanma, kovalent bağlanma, hapsetme	✓ Optimum pH: 5.5	✓ Kitozan ile optimum değerler	Abdel-Naby et al., 1999
			✓ Optimum sıcaklık: 40°C	✓ Aktivite verimi: %26.60	
			✓ K_m : 12.5 mg/ml	✓ 17 kez kullanımı: %85 ilk aktivite	
			✓ V_{max} : 83 U mg ⁻¹ protein	✓ Optimum pH: 4.5	
			✓ Optimum sıcaklık: 55°C	✓ Optimum sıcaklık: 55°C	
			✓ K_m : 20.0 mg/ml	✓ K_m : 20.0 mg/ml	
<i>Aspergillus niger</i> van Teighem	Konkanavalin A-Sefharoz CL-4B	Biyosafinite etkileşimi	✓ K_m : 0.3 mM	✓ K_m : 0.6 mM	Sharma et al., 2002
			✓ V_{max} : 0.013 µmol/dakika	✓ V_{max} : 0.02 µmol/dakika	
			✓ Ester hidroliz dönüşümü: %40	✓ 3 kez kullanımı: %100 ilk aktivite	
				✓ 6 kez kullanımı: %81 ilk aktivite	
				✓ Ester hidroliz dönüşümü: %30	
<i>Aspergillus niger</i>	Koaservat kalsiyum aljinat membranla	Mikrokapsülasyon	✓ Optimum pH: 5.0	✓ Aktivite verimi: %36.8	Yu et al., 2004
			✓ Optimum sıcaklık: 30°C	✓ Optimum pH: 6.0	
			✓ K_m : 0.011 µM	✓ Optimum sıcaklık: 40°C	
			✓ V_{max} : 416 µmol/dakika mg	✓ K_m : 0.041 µM	
				✓ V_{max} : 131 µmol/dakika mg	
				✓ 15 kez kullanımda hala karalı	
<i>Panacilomyces variotij</i>	Sodyum aljinat bilyeler	Hapsetme	✓ %1.0 TA (ağırlık/ hacim) ile inkubasyon 6 saatte en yüksek hidrolizi sağlanmıştır (%98). Süre sonunda ilk aktiviteinin %85'ini korumuştur.		Mahendran et al., 2006

2.7.4 Tannazın Uygulama Alanları

Tannaz, günümüzde endüstriyel kullanımı yaygınlaşmamış bir enzim olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum yüksek enzim maliyetinden ve tannaz enziminin fazla miktarda üretilmemesinden kaynaklanmaktadır (Lagemaat and Pyle, 2001). Tannaz son zamanlarda ürün sunuluşuna bağlı olarak farklı katalitik birimler ile **Biocon** (Hindistan), **Kikkoman** (Japonya), **ASA Specilaenzym GmbH** (Almanya) ve **JFC GmbH** (Almanya) tarafından ticarileştirilmiştir (Belmares et al.,2004).

Endüstriyel uygulamalar için daha yüksek aktivitelere tannaz üretme yeteneğine sahip olan mikrobiyal suşlara dair süregelen araştırmalar devam etmektedir (Sharma et al., 2000). Derin kültürde tannaz üretimi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır ve büyük ölçekte sadece derin kültür yöntemi ile üretilmektedir. Katı kültürün tannaz üretimindeki bu problemleri çözüp, daha yaygın kullanılabilmesine fırsat vereceği ön görülmektedir. Katı kültür, derin kültüre göre, üretim verimi yönünden daha avantajlı durumda bulunmaktadır (Lagemaat and Pyle, 2005).

Tannaz endüstriyel olarak önemli bir enzimdir ve yaygın olarak, gıda, hayvan yemi, içecek, biracılık, eczacılık ve kimyasal endüstrisinde uygulama alanına sahiptir (Sharma et al.,2000; Sabu et al.,2005a; Adachi et al.,1968; Aguilar and Sanchez, 2001)

Tannazın gıda endüstrisindeki başlıca uygulamaları; çayın işlenmesi, bira, şarap ve meyve sularının berraklaştırılması üzerinedir (Aguilar and Sanchez, 2001). Wright, (2002), Mukubani çayına tannaz enziminin uygulanmasında, 1 kg Mukubani çayı için, 2 g tannaz kullanılmıştır. Kullanılan ticari enzim numunesi, liyofilize edilmiş Kikkoman marka

tannaz olup, 5000 U/g enzim aktiviteye sahiptir. Buradan, 1 kg çay için, 10 000 ünitelik tannaza ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır. Çizelge 2.24, 2.25, 2.26 ve 2.27 incelendiğinde, farklı aktivite tayin metodlarıyla hesaplanmalarına rağmen, 1 kg çay için kullanılacak tannazın aktivitesiyle ciddi mertebe farkı olduğu görülmektedir. Yıllık çay üretimi de düşünüldüğünde, ihtiyaç duyulan yüksek aktiviteye sahip enzim miktarı, tannazın ticari olarak kullanımını ekonomik açıdan kısıtlamaktadır.

Hayvan yemlerinin beslenme özelliklerinin iyileştirilmesinde tannaz, bitki hücre duvarının daha kolay sindirilmesini sağlamak için, duvarda mevcut olan dehidrodimer çapraz bağların hidrolizinde kullanılmaktadır (Batra and Saxena, 2005). Gallotanenlerin tannaz ile parçalanma ürünü olan gallik asit ise gıda ve farmasotik endüstrisinde önem arz eden propil gallat ve trimetoprimin kimyasal sentezinde kullanılmaktadır (Sabu et al., 2005b). Gallik asit, geçmişte Hindistan'da yaygın olan helile meyvesinin taneninden fungal türlerle üretilmeye çalışılmışsa da, tanen hidrolizi sonucu üretilen gallik asidin, fungusların diğer bir enzim sistemiyle parçalandığı tespit edildiğinden başarılı olunamamıştır (Rajakumar and Nandy, 1983). *Aspergillus japonicus*' un da gallik asidi metabolize edebildiği, filtre edilmiş kültür ortamındaki nicel analizlerle kanıtlanmıştır (Bradoo et al., 1997). Propil gallat, gıda endüstrisinde antioksidan olarak ve yarı iletken endüstrisinde, ışığa duyarlı reçinelerin üretiminde kullanılmaktadır (Kar and Banerjee, 2000). Tannazın potansiyel kullanımı; polifenolik bileşiklerle kirlenmiş atıksuların arıtımı içindir (Aguilar et al., 2001a).

Endüstriyel atıksular, ait oldukları endüstri koluna bağlı olarak değişen ve karakteristik olan bir takım organik kirleticileri içermektedir.

Atıksuların yüksek organik içeriğinin, canlı ekosistemi üzerine olan olumsuz etkilerinden ötürü, deşarj standartlarına uygun hale getirilmesi zorunlu kılınmıştır. Bu organik kirleticiler, her biri üzerine etkili olan enzimler için birer substrat olarak değerlendirebilmektedir.

Tanenler de endüstriyel atıksularda bulunan ve canlı ekosistemi üzerine antimikrobiyal etkileri bulundukları bilen bir organik kirletici sınıfı olarak karşımıza çıkmaktadır. Tanen içeren başlıca atıksular deri, bira ve şarap endüstrisi atıksuları ile ZKS olarak bilinmektedir. Özellikle deri endüstrisi atıksuyu, çevre için tehlike oluşturan, yüksek miktarda tanen içermektedir ve bu bileşiklerin zararsız hale getirilmesi için tannaz enziminin kullanılması son zamanlarda gündeme gelmiştir (Belmares et al., 2004).

ZKS ise %0.45 (ağırlık/hacim) oranında tanen içeren bir atık su olup, tanenlerin ZKS'nin koyu tonlardaki renginden sorumlu olduklarından bahsedilmektedir (Çizelge 2.3). ZKS'deki tanen içeriğinin, doğrudan tannaz enzim numunesi uygulanarak veya tanenleri biyodönüşüme uğrattığı tayin edilmiş mikroorganizmalarca istenilen aralığa düşürülmesinin mümkün olması beklenmektedir.

ZKS'daki biyodönüşümü zor olan bileşik gruplarını parçalayarak, biyokütle üretebilen mikroorganizmalardan en sık rastlanana *Aspergillus niger*'dir. ZKS'de tek hücre proteinin üretiminde kullanılan mayaların, sadece şeker, lipid ve pektinleri biyodönüşüme uğratabildikleri ve fenolik bileşikler üzerine etkili olamadıkları kaydedilmiştir. *Aspergillus niger*, tanenleri de içine alan polifenollerini hidrolize edebilen enzimleri sentezleyebilmektedir. ZKS'nin tanen içeriğinin, arıtımda etkili olan mekanizmaların aydınlatılması için ilk kez *Aspergillus niger* A10 suşu

kullanılmıştır. %100 ZKS’de, *Aspergillus niger* A10 suşunun, fenolik bileşiklerde ve özellikle de tanenler üzerindeki etkisi derin kültürde incelenmiştir (Çizelge 2.35)

Çizelge 2.35 ZKS’de gelişmiş *Aspergillus niger* A10 suşunun ZKS’deki fenolik bileşikleri parçalaması (Hamdi et al., 1991).

	Toplam fenolik (g/l)	Hidrolize olabilen tanenler (g/l)	Kondense tanenler (g/l)	Monomerik flavonoitler (g/l)	Basit fenolikler (g/l)
ZKS	18.20	7.00	2.30	1.50	6.40
Biyodönüşüme Uğramış ZKS	7.68	1.85	1.70	1.33	2.85
Verimlilik (%)	57.8	73.5	26.1	22.0	55.5

✓ 150 devir/dakika’da, 35°C’de, 6 günlük mikrobiyal üretim sonucu elde edilmiştir.

Çizelge 2.33’te görüldüğü gibi *Aspergillus niger* A10, tanenlere karşı dirençli bir mikroorganizma olup, tanen biyodönüşümünü sağlayabilmiştir (Hamdi et al., 1991).

Bakterilerin, funguslara göre, tanenlere karşı daha az dirençli oldukları bilinmekte ve tanen parçalayabilseler dahi, toleransları düşük olmaktadır. *Lactobacillus plantarum*’un tannaz üretebilen bakteriler arasında olduğu bildirilmiştir ve ayrıca çalışmada kullanılan mikroorganizma ZKS’den izole edilmiştir (Ayed and Hamdi, 2002). *Lactobacillus plantarum*’un ZKS’nin renk açılımı ve fenol giderimi üzerine etkisinin araştırılmasında, mikroorganizma, %10 ZKS’de rengin %58’ini, KOİ’nin %55’ini ve fenolik bileşiklerin % 46’sını giderebilmiştir. Tannazın bu atıksuyun depolimerizasyonundan ve renk açılmasından sorumlu başlıca enzim sistemi olabileceği sonucuna varılmıştır (Lamia and Moktar, 2003).

ZKS'den izole edilmiş bir suş olan *Aspergillus niger* HA37 ile ZKS, tannaz üretim ortamı olarak ilk kez kullanılmıştır. Çalışmanın birincil hedefi; ZKS'nin tannaz üretim ortamı olarak, sentetik ortam ile karşılaştırılmasıdır. *Aspergillus niger* HA37'un tanenleri ve bazı yüksek molekül kütleli fenolik bileşikler de ortamdan uzaklaştırması ise bir avantaj olarak görülmektedir. *Aspergillus niger* HA37'un %25 ZKS'de, 72. saatten sonra fenolik içeriği 0.9'dan 0.26 g/l'ye düşürdüğü ve KOİ ise %71 giderim sağladığı tespit edilmiştir. Tannaz enzimi aktivite değerleri; 0.37–0.65 U/ml arasında saptanmıştır ve en yüksek değerini 28. saatte almaktadır. Bu suş %1 TA (ağırlık/hacim) derişimine kadar tolerans gösterebilmiştir ve bu derişimdeki en yüksek tannaz aktivite değeri 1.5 U/ml olarak bulunmuştur. Tannazın, ZKS'deki tanenlerin ilk hidroliz basmağında yer aldığı ve oluşturduğu monomerik bileşiklerin fungusun başka metabolik yollarına girmiş olmasının muhtemel olduğunun üzerinde durulmuştur (Aissam et al., 2005).

ZKS'de renk açılması ve KOİ'nin düşürülmesinde yapılan taramada iyi sonuçlar veren *Aspergillus flavus* F2'nin tannaz üretebildiği de tespit edilmiştir. Üretimlerde kullanılan ZKS, havanın oksijeni ile yükseltgenmesi için 6 hafta boyunca oda sıcaklığında depolanmıştır. Üretime, % 0.1 NH₄SO₄ (ağırlık/hacim) eklenerek başlanmış, üretim %20 ZKS'de, 30°C'de, 100 devir/dakika'da 7 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Üretim parametrelerinin optimizasyonundan sonra, diğer koşullar aynı olmak ile beraber %10 ZKS'ye % 0.1 NH₄SO₄, %0.05 maya özütü ve %0.1 glukoz (ağırlık/hacim) eklenerek sürdürülmüştür. *Aspergillus flavus*'un ilk KOİ değeri; 160.1 g/l ve OD_{390nm} değeri 277 olan %10 ZKS'de 6. günün sonucunda rengin %58'ini ve KOİ'nin ise %46'sını giderebildiği tespit

edilmiştir. Hücre içi tannazdan bahsedilmemektedir ve bahsedilen aktivite hücre dışı tannaz aktivitesidir. Tannaz, büyümenin logaritmik fazı boyunca sentezlenmiştir ve 3. günde en yüksek aktivite değeri olan 8000 U/l'ye ulaşmıştır. Tannazla beraber lakkazın da kültürün 3. ve 4. gününde sentezlendiği (aktivite $\approx$ 300 U/l) tayin edilmiştir. Fakat mangan ve lignin peroksidaz aktivitesi tayin edilmemiştir (Kachouri et al., 2005).

Bu çalışmada, ZKS'deki fenolik bileşikleri parçalayabilen funguslar kullanılarak fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması ve yüksek katma değerli tannaz enziminin üretilmesi, ZKS'nin kirlilik karakteristiğinin iyileştirilmesi ve bu basamağın ZKS'yi tarım sulama suları kriterlerine uygun düzeye getirecek bir yöntemin içinde yer alması amaçlanmıştır. Bu amaç ile ZKS'de *Aspergillus* section Nigri grubu funguslar kullanılarak çalkalamalı inkübatörde zamana karşı üretim yapılarak, tannaz enzim aktivitesi, biyokütle miktarları, fenolik bileşiklerin giderilme oranı, kullanılan şeker miktarları ve ZKS'nin rengindeki değişiklikler izlenmiştir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1 Materyaller

3.1.1 Zeytin Karasuyu

Çalışma boyunca, Ayvalık, Burhaniye, Gömeç, Ayvalık, Torbalı, Tire, Ortaklar, Çine Milas'ta faaliyet gösteren zeytinyağı işletmelerinden ve Tariş'in sürekli sistem kapınalarından temin edilen ZKS, derin dondurucuda -18 °C sıcaklıkta ve 2 litrelik plastik kaplarda dondurularak saklanmıştır. Gerektiğinde çözülüp daha sonra +4°C de saklanarak takip eden uygulamalar için kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan ZKS'nin özellikleri Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Çalışmalarda kullanılan zeytin karasuyunun karakteristik özellikleri (Güngör, 2004).

Parametre	Değer
✓ İletkenlik (mS cm ⁻¹)	10.53 ± 0.08
✓ Toplam Fenolik bileşik (g l ⁻¹)	5.4 ± 0.2
✓ BOİ (g l ⁻¹)	37.30 ± 5.3
✓ KOİ (g l ⁻¹)	144.2 ± 10.3
✓ Toplam Katı Madde (g l ⁻¹)	98.13 ± 7.87
✓ Askıda katı madde (g l ⁻¹)	71.53 ± 5.28
✓ Uçucu Katı Bileşikler (g l ⁻¹)	86.07 ± 11.25
✓ Toplam Organik Karbon (TOC) (%)	3.2 ± 0.65
✓ Kalıntı Yağ Miktarı (%)	1.5 ± 0.05
✓ Azot N (%)	0.071 ± 0.0025
✓ pH	4.83 ± 0.05

3.1.2 Kullanılan Mikroorganizmalar

Denemelerde kullanılan mikroorganizmalar (Çizelge 3.2), Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Biyoproses Laboratuvarı, Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu'nda bulunan suşlardır. Suşlar ana stokta bulundukları ortama göre patates dekstroz agar (PDA- Oxoid) veya malt ekstrakt agarda (MEA- Oxoid) 28°C sıcaklıkta çoğaltılmış ve +4°C de saklanmıştır.

Çizelge 3.2 Çalışmalarda kullanılan *Aspergillus* suşları ve stok ortamlarının dağılımı

Patates Dekstroz Agar (PDA)	Malt Ekstrakt Agar (MEA)
✓ <i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258	✓ <i>Aspergillus carbinorus</i> Ege-K
✓ <i>Aspergillus foeditus</i> var. <i>pallidus</i> Ege-K 156	✓ <i>Aspergillus niger</i> Ege-K 1
✓ <i>Aspergillus niger</i> Ege-K 3	✓ <i>Aspergillus niger</i> Ege-K 5
✓ <i>Aspergillus niger</i> Ege-K 2	
✓ <i>Aspergillus niger</i> Ege-K 4	
✓ <i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265	

3.1.3 Kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar; Merck, Carlo Erba, Fluka, Riedel de Häen, Sigma, Panreac, Oxoid, J.T. Baker ve BDH markalarından birine sahip olup, tümü analitik saflıktadır.

3.1.4 Enzimler

Denemeler için, referans enzimler olarak ticari lakkaz ve tannaz preparatları kullanılmıştır. Tannaz enzimi; NEOTANNASE L, *Aspergillus*

niger'den elde edilmiş sıvı preparat olup, Biocon firmasından temin edilmiştir. Enzim aktivite değeri, Biocon firmasının tayin yöntemine göre; 90–98 U/ml aralığındadır. Lakkaz enzimi; Novozyme firmasından temin edilmiş liyofilize preparat DeniLite® II' dir.

3.1.5 Kullanılan Başlıca Cihazlar

pH-metre (Inolab),
 Spektrofotometre (Jenway 6400 VIS),
 Otoklav (Hirayama-Hiclave-HVE–50),
 Santrifüjler (Eppendorf ve Hecttich),
 Etüv (Memmert),
 Statik İnkübatör (Sanyo),
 Çalkalayıcılı İnkübatörler (Gerhardt ve Certomat),
 Isıtıcı ve Karıştırıcı (Gerhardt),
 Analitik Hassas Terazî (Sartorius),
 Analitik Kaba Terazî (Precisa),
 Homojenizatör (IKA Yellow line),
 Derin Dondurucu (Uğur),
 Vorteks (Heidolph Reax),
 Vakum Pompası (ABM- Bremse vakum pompası).

3.1.6 Tampon, Reaktif ve Çözeltiler

3.1.6.1 Toplam Şeker Tayininde Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler

Glukoz Standart Çözeltisi (%0.01 ağırlık/hacim): 0.01 g glukoz (Merck), tartılarak bir miktar destile suda çözündürülerek daha sonra 100 ml hacme tamamlanmıştır. Stok çözelti +4°C’ de saklanmıştır.

Fenol Çözeltisi (%5.0 ağırlık/hacim): 5.0 g fenol (Riedel de Häen), tartılarak beherde bir miktar destile su ile ısıtılarak çözündürülmüştür. Fenolün tümüyle çözünmesinden sonra 100 ml hacme tamamlanmıştır. Stok çözelti +4°C’ de saklanmıştır.

Derişik Sülfürik Asit: %95–98 saflıktaki H_2SO_4 (Panreac), kullanılmıştır.

3.1.6.2 Toplam Fenolik Bileşik Tayininde Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler

Kafeik Asit Standart Çözeltisi (100 mg/l): 0.01 g kafeik asit (Sigma), tartılarak bir miktar destile suda çözündürülerek daha sonra hacmi 100 ml’ye tamamlanmıştır. Stok çözelti +4°C’ de saklanmıştır.

Gallik Asit Standart Çözeltisi (% 0.02 ağırlık/hacim): 0.02 g gallik asit (Sigma), tartılarak bir miktar destile suda çözündürülmüş daha sonra 100 ml hacme tamamlanmıştır. Stok çözelti +4°C’ de saklanmıştır.

Na_2CO_3 Çözeltisi (%20 ağırlık/hacim): 20 g sodyum karbonat (Merck), tartılarak beherde bir miktar destile su ile ısıtılmış tümü ile

çözünmesinden sonra 100 ml hacme tamamlanmıştır. Stok çözelti oda sıcaklığında saklanmıştır.

Folin Reaktifi (1/4): 25 ml Folin-Ciocalteu reaktifi (Merck), 100 ml'ye destile su ile seyreltilmiş ve siyah bir şişede saklanmıştır.

3.1.6.3 Toplam Tanen Tayininde Kullanılan Reaktifler ve Çözeltiler

Asetat Tamponu (0.2 M pH 5.0): pH 5.0 olacak şekilde sodyum asetatın üzerine asetik asit ilave edilmiştir.

Asetik Asit Çözeltisi (0.2 M; $\rho=1.05 \text{ g/cm}^3$): % 100 saflıktaki asetik asit reaktifinden (Riedel de Häen) 1.144 ml alınarak, son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sodyum asetat trihidrat Çözeltisi (0.2 M): 13.608 g sodyum asetat trihidrat (Panreac) tartılarak hacmi 500 ml'ye tamamlanmıştır.

Tannik Asit Çözeltisi (% 0.1 ağırlık/hacim): 0.01 g TA (Riedel de Häen), tartılarak asetat tamponunda çözdürülmüş ve hacmi 10 ml'ye tamamlanmıştır.

NaCl Çözeltisi (0,17 M): 2.4837 g NaCl (Merck), tartılarak asetat tamponunda çözdürülmüş ve hacmi 250 ml'ye tamamlanmıştır.

Bovin serum albümin (BSA) Çözeltisi (1mg/ml): 0.25 g BSA (Sigma), tartılarak asetat tamponunda hazırlanmış, 0.17 M NaCl çözeltisinde çözdürülmüş ve hacmi 250ml'ye tamamlanmıştır.

Trietanolamin Çözeltisi (%5.0 hacim/hacim): 25.0 ml trietanolamin (Sigma), alınarak, hacmi 500 ml' ye tamamlanmıştır.

SDS Çözeltisi (%1.0 ağırlık/hacim): 5.0 g SDS (BDH) tartılarak, %5.0'lik trietanolamin çözeltisinde çözündürülmüş ve hacmi 500 ml'ye tamamlanmıştır.

HCl Çözeltisi (0.01 N): % 37'lik derişik HCL reaktifinden (Riedel de Häen) 0.208 ml alınarak, hacmi 250 ml' ye tamamlanmıştır.

FeCl₃ Çözeltisi (0.01 M): 0.081105 g FeCl₃ (Sigma) tartılarak, 0,01N HCl çözeltisinde çözündürülmüş ve hacmi 50 ml' ye tamamlanmıştır.

3.1.6.4 Lakkaz (Fenol Oksidaz) Enzimi Kinetik Aktivite Tayininde Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler

ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)] Çözeltisi (1mM): 0.05487 g ABTS (Fluka) tartılarak hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sitrat Tamponu (0.1 M pH 5.0): pH 5.0 olacak şekilde sitrik asit üzerine sodyum sitrat ilave edilmiştir.

Sitrik asit çözeltisi (0.1 M): 2.101 g sitrik asit monohidrat (Merck) tartılarak, hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sodyum sitrat çözeltisi (0.1 M): 2.941 g trisodyum sitrat trihidrat (Carlo Erba) tartılarak, hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.6.5 Tannaz Enzimi Spektrofotometrik Aktivite Tayininde Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler

Sitrat Tamponu (0.05 M pH 5.0): pH 5.0 olacak şekilde sitrik asit üzerine sodyum sitrat ilave edilmiştir.

Sitrik asit çözeltisi (0.05 M): 1.050 g sitrik asit monohidrat (Merck) tartılarak, hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sodyum sitrat çözeltisi (0.05 M): 1.470 g trisodyum sitrat trihidrat (Carlo Erba) tartılarak, hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Metanolik rodanin çözeltisi (%0.667 ağırlık/hacim): 0.667 g rodanin (Fluka) tartılarak, hacmi metanolde (J.T. Baker) 100 ml'ye tamamlanmıştır.

0.5 N KOH çözeltisi: 2.8055 g KOH (Merck) tartılarak, hacmi metanolde 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.6.6 Tannaz Enzimi Kolorimetrik Aktivite Tayininde Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler

Asetat Tamponu (0.2 M pH 5.0): pH 5.0 olacak şekilde sodyum asetatın üzerine asetik asit ilave edilmiştir.

Asetik Asit Çözeltisi (0.2 M; $\rho=1.05 \text{ g/cm}^3$): % 100 saflıktaki asetik asit reaktifinden (Riedel de Häen) 1.144 ml alınarak, son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sodyum asetat trihidrat Çözeltisi (0.2 M): 13.608 g sodyum asetat trihidrat (Panreac) tartılarak, hacmi 500 ml'ye tamamlanmıştır.

Tannik Asit Çözeltisi (% 0.5 ağırlık/hacim): 0.125 g TA tartılarak, asetat tamponunda çözündürülmüş ve hacmi 25 ml'ye tamamlanmıştır.

NaCl Çözeltisi (0.17 M): 2.4837 g NaCl (Merck) tartılarak, asetat tamponunda çözündürülmüş ve hacmi 250 ml'ye tamamlanmıştır.

BSA Çözeltisi (1mg/ml): 0.25 g BSA (Sigma) tartılarak, asetat tamponunda hazırlanmış, 0.17 M NaCl çözeltisinde çözdürülmüş ve hacmi 250ml'ye tamamlanmıştır.

Trietanolamin Çözeltisi (%5.0 hacim/hacim): 25.0 ml trietanolamin (Sigma) alınarak, hacmi 500 ml'ye tamamlanmıştır.

SDS Çözeltisi (%1.0 ağırlık/hacim): 5.0 g SDS (BDH) tartılarak, %5.0'lik trietanolamin çözeltisinde çözdürülmüş ve hacmi 500 ml'ye tamamlanmıştır.

HCl Çözeltisi (0.01 N): % 37'lik derişik HCL reaktifinden (Riedel de Häen) 0.208 ml alınarak, hacmi 250 ml' ye tamamlanmıştır.

FeCl₃ Çözeltisi (0.01 M): 0.081105 g FeCl₃ (Sigma) tartılarak, 0.01N HCl çözeltisinde çözdürülmüş ve hacmi 50 ml' ye tamamlanmıştır.

3.2 Metod

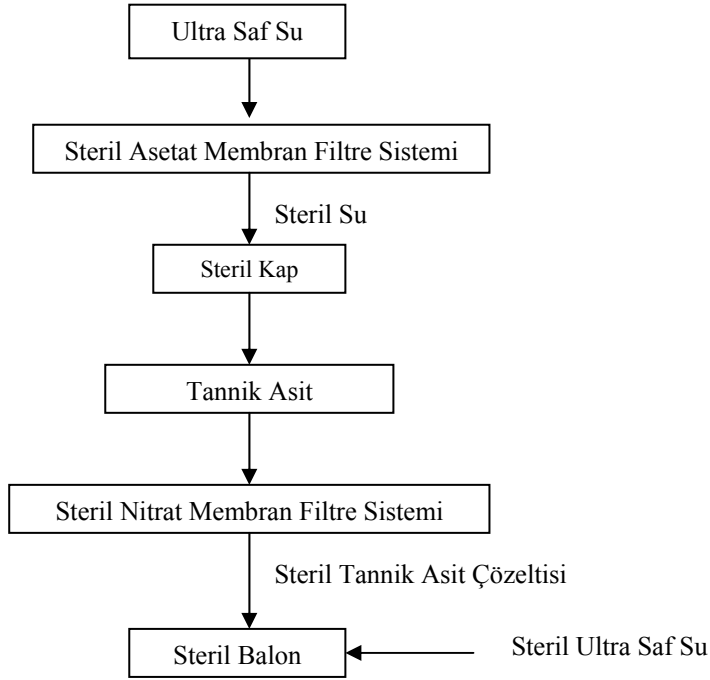
3.2.1 Mikrobiyal Üretim Öncesi Hazırlıklar

3.2.1.1 Tannik Asidin Soğuk Sterilizasyonu

TA, selüloz nitrat membran (çap: 25 mm; gözenek büyüklüğü:0.45 µ), kullanılarak steril edilmiştir (Sharma et al., 1999).

Steril TA çözeltisi, iki aşamalı filtre sisteminden geçirilerek hazırlanmıştır. (Şekil 3.1) İlk aşamada, suyun sterilizasyonu için selüloz asetat membrandan (**Whatman**, çap: 25 mm; gözenek büyüklüğü:0.45 µ) kullanılmış ve filtre yükünü hafifletmek için ultra saf su tercih edilmiştir. İkinci aşamada ise hazırlanan tannik asit çözeltisi selüloz nitrat

membrandan (**Sartorius**, $\text{\AA}$: 25 mm; gözenek büyüklüğü:0.45 μ) geçirilmiştir. Hazırlanan stok çözelti, +4 °C de bir ay süreyle muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Tannik asit çözeltisinin soğuk sterilizasyonu

3.2.1.2 Sentetik Tannaz Üretim Ortamının Hazırlanması

Tannaz üretim ortamı olarak, Czapek-Dox minimal ortamına, %1 (ağırlık/hacim) TA eklenerek kullanılmıştır (Bradoo et al., 1997).

Çizelge 3.3 Sentetik tannaz üretim ortamının kompozisyonu

Bileşen	Miktar (g/l)
NaNO ₃ (Merck)	3.0
K ₂ HPO ₄ (Riedel de Häen)	1.0
MgSO ₄ (Merck)	0.5
KCl (Merck)	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O (Carlo Erba)	0.01

* Ortamda % 1.0 (ağırlık/hacim) TA olacak şekilde eklenen steril TA çözeltisi.

Otoklavda sıcaklık etkisiyle meydana gelebilecek değişimleri en aza indirmek için, üretim ortamlarının azot ve mineral kaynakları, otoklav sonrasında birleştirilmiştir. Azot ve mineral kaynaklarının derişik çözeltileri balon jode hazırlanmış ve otoklavlanabilen şişeye aktarılıp 121°C de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir. Filtre ile sterilize edilmiş TA derişik çözeltilisinden de ortama eklenmiş ve litredeki derişime denk gelen bileşen miktarları elde edilmiştir.

3.2.1.3 Tannik Asit Agar Ortamının Hazırlanması ve Nokta Ekim

Çalışmalarda kullanılması planlanan *Aspergillus* suşlarının, TA'ı metabolize edip edemediklerinin tayin edilmesi için, petrilerde nokta ekim denemesi yapılmıştır (Pinto et al., 2001). Nokta ekim için kullanılan agarlı besi ortamı (TAA); %1 (ağırlık/hacim) TA Czapek-Dox minimal ortamına %2 (ağırlık/hacim) bakteriyolojik agar (Oxoid), eklenerek elde edilmiştir.

Suşlar ana stokta bulundukları ortama göre PDA veya MEA içeren eğik agarda, 28–30 °C 'de, 7 gün boyunca çoğaltılmış ve buradan TAA ortamına, iki paralel halinde nokta ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler

tekrar 28–30 °C 'de, 4 gün tutulup, fungusların TA'ı metabolize edip etmedikleri incelenmiştir.

Vida kapaklı kültür tüplerine steril olarak porsiyonlanmış TA eğik agar, ZKS ile yapılan üretimlerde, inokulum hazırlama ortamı olarak da kullanılmıştır. Hazırlanan eğik agar ortamları, +4 °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.4 Sentetik Tannaz Üretim Ortamının Dalga Boyu Taraması

Kontrolün (mikrobiyal üreme gerçekleşmemiş TA içeren kültür ortamı), optimum absorbans verdiği dalga boyu taranmıştır ve 388 nm'de en yüksek optik dansite değerini verdiği için, 388 nm olarak tayin edilmiştir.

3.2.1.5 Sentetik Lignin Agar Ortamının Hazırlanması ve Nokta Ekim

Fungusların lignin benzeri bileşikler parçalama yeteneklerinin değerlendirilmesi için, Indulin AT (Sigma)'nin tek karbon kaynağı olduğu bir besi ortamı hazırlanmıştır.

Indulin AT'nin suda çözünmesini sağlamak amacıyla 0.1 N NaOH çözeltisinden bir miktar ekleyip, her seferinde bir süre karıştırılıp, ısıtılmıştır. Tam çözünme gerçekleştikten sonra, TAA ortamı hazırlanırken kullanılan azot ve mineral kaynakları, litrede karşılık gelen derişimleri sağlayacak şekilde (Çizelge 3.3) derişik çözeltilerinden ortama eklenmiştir. Ortam pH'sını asidik yapmak için 0.1 N HCl çözeltisi kullanılmıştır. Toplam hacimde %2 bakteriyolojik agarı sağlayacak olan agar miktarı ayrı bir şişede bir miktar suda eritilmiştir. Indulin AT'nin bulunduğu ortam,

agar ortamı ve HCl çözeltisi 121°C de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. HCl çözeltisinden otoklavdan sonra ne kadar eklenmesi gerektiğini hesaplamak için, öncelikle aseptik olmayan koşullarda, otoklavdan çıkan ortam ve HCl çözeltisiyle beraber pH metre ile bir ön deneme yapılmıştır. Otoklavdan çıkan agar 50°C nin altına düşmeden pH'sı ayarlanmış ortama aseptik şartlarda eklenmiştir.

Aspergillus aculeatus Ege-K 258, *Aspergillus foetidus var.pallidus* Ege-K 156 ve *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265, ana stokta bulundukları ortama göre PDA veya MEA içeren eğik agarda, 28–30 °C 'de, 7 gün boyunca çoğaltılmış ve buradan Indulin AT agar ortamına, iki paralel halinde nokta ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler tekrar 28–30 °C'de, 4 gün tutulup, funguslarının Indulin AT'yi metabolize edip etmedikleri incelenmiştir.

3.2.1.6 İnokulum Kültürlerinin Hazırlanması

Hazırlanan spor süspansiyonları, inokulum olarak kullanılmıştır. Spor süspansiyonu, eğik agar ortamlarında, 28°C' de, 7 gün inkübe edilmiş funguslara, steril Tween 80 çözeltisi eklenerek elde edilmiştir. Eğik agar ortamından, fungusun kaldırılması öze yardımıyla olmuştur. Fungusların spor sayımı Thoma Liefе (0.1000 mm) lamı ile yapılmıştır (Gürgün ve Halkman, 1990).

Sentetik ortamda yapılan üretimlerde, eğik agar olarak, PDA; ZKS'deki üretimlerde ise TAA, kullanılmıştır.

3.2.1.7 Tween 80 Cözeltisinin hazırlanması

Viskoz Tween 80 reaktifinden (Merck), 0.1 ml (bir damla) alınarak, hacmi su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanmış olan çözelti, 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

3.2.2 Süspanse Kültürdeki Üretimler

Süspanse kültürdeki üretimler, sentetik ortamda ve ZKS ortamında gerçekleştirilmiştir. Üretim ortamları, 250 ml erlenlerde, 50 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Erlenlerin ağzı pamuklandıktan sonra üstüne alüminyum folyo sarılmıştır. Bu şekilde hazırlanan erlenler, 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir. Steril erlenlere, aseptik koşullarda % 2 spor süspansiyonu (hacim/hacim) steril pipetle aseptik şartlarda eklenmiştir.

3.2.2.1 Sentetik Ortamdaki Üretimler

Azot ve mineral kaynaklarının ve TA'nın hazırlanmış olan derişik çözeltilerinden, 50 mL ortama kaç ml eklenmesi gerektiği hesaplandıktan sonra, kalan hacim kadar erlenlere saf su eklenmiştir. Ağzı pamuklanan erlenlerle birlikte, azot ve mineral çözeltileri aynı koşullarda steril edilmiştir. Azot, mineral ve TA çözeltilerinin, 50 mL'de bulunması gereken miktarları, aseptik koşullarda, steril pipet yardımıyla, erlenlere ilave edilmiştir ve böylece üretim ortamı elde edilmiştir.

Sentetik ortamdaki üretimler, 28°C'de, 200 devir/dakika'da ve 48 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2 Zeytin Karasuyu Ortamındaki Üretimler

Bu üretimler ZKS'nin inhibitif etkisini azaltmak amacıyla 1:2 oranında destile su ile seyreltilmiş ZKS'de (%50 ZKS) gerçekleştirilmiştir. %50 ZKS'ye, Czapek-Dox minimal ortamı bileşenleri olan azot ve mineral kaynakları eklenmiştir. Mineraller eklenirken, litredeki miktarlarına bağlı kalınmıştır. Azot kaynağı olan NaNO_3 ise farklı C/N oranlarını sağlamak amacıyla her seferinde, ZKS'nin toplam şeker analizi sonucu elde edilen yaklaşık karbon içeriğine göre hesaplanıp eklenmiştir.

Azot kaynağının tannaz aktivitesi üzerindeki etkisinin incelenmesinde, sentetik azot kaynakları denenmiştir. Eşit kütlerde $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Merck) ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Carlo Erba) tartılarak, %50 ZKS'ye mineral kaynaklarıyla beraber yine farklı C/N oranlarını sağlayacak şekilde eklenmiştir.

%50 ZKS'deki üretimler, *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258, *Aspergillus foetidus var.pallidus* Ege-K 156 ve *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile 28°C' de ve 200 devir/dakika'da ve 120 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Üretim Sonrası İşlemler

3.2.3.1 Biyokütlenin Kültür Ortamından Filtre Edilerek Ayrılması

Çalkalamalı inkübatörden alınan erlenlerin, inokulum yapılmamışlar erlenlerle birlikte pH değerlerinin ölçülmesinden sonra, üremenin gerçekleştiği erlenlerdeki fungal biyokütle, 70 °C' de sabit tartıma

getirilmiş Gooche krezelerden (No 1), nüçe erleni ve vakum pompası yardımıyla süzülerek ayrılmıştır.

3.2.3.2 Fungal Biyokütlenin Belirlenmesi

Gooche krezelerdeki (No 1) fungal biyokütle, tekrar 70°C’ deki etüve konup 12 saat bekletilmiştir. Boş krezelerin ağırlığı ile 12 saat sonunda sabit tartıma gelen değer arasındaki fark alınmış ve sonuçlar g kuru biyokütle l⁻¹ olarak verilmiştir.

3.2.4 Yaş Biyokütlede Yapılan İşlemler

Hücre içi ve hücre dışı bir enzim olan tannazın, hücre içi enzim aktivitesi tayini için, ilk aşamada üremenin gerçekleştiği erlenlerdeki fungal biyokütle, üretim ortamından ayrılmıştır. Bu amaçla çalkalamalı inkübatörden alınan erlenler, Gooche krezelerden (No 1), nüçe erleni ve vakum pompası yardımıyla süzölmüştür.

3.2.4.1 Hücre Parçalama

Mikrobiyal tannaz, hem hücre içi hem de hücre dışı olarak bulunabilmektedir. Tannaz için kullanılan hücre parçalama yöntemleri Çizelge 2.11’de verilmiştir. Gooche krezelerdeki yaş biyokütle, denenen hücre parçalama metoduna göre farklı işlemlere tabi tutulmuştur. Hücre parçalama için iki metot denenmiştir:

3.2.4.1.1 Mekanik Parçalama

Sentetik ortamdaki üretimlerden sonra, Gooche krozelerden (No 1), nüçe erleni ve vakum pompası yardımıyla süzülerek ayrılan yaş biyokütle, bir kez sitrat tamponu (0.05 M, pH 5.0) ile yıkanmıştır. Kurutma kâğıdı ile kurutulduktan sonra, yaş ağırlık tartılmış ve sitrat tamponunda (0.05 M, pH 5.0), misel kütesinin %10'luk süspansiyonu (ağırlık/hacim) oluşturulmuştur. Daha sonra, bir gece derin dondurucuda (-20 °C' de) bırakılmıştır. Derin dondurucudan çıkarıldıktan beş dakika sonra, buz-su karışımı banyosunda, ani ısı değişimleri dengelenerek 20.000 devir/dakika'ya ayarlı homojenizatörde 8–10 dakika süreyle parçalanmıştır (Bhardwaj et al., 2003).

3.2.4.1.2 Sıvı Azot ile Parçalama

ZKS'deki üretimlerden sonra, Gooche krozelerden (No 1), nüçe erleni ve vakum pompası yardımıyla süzülerek ayrılan yaş biyokütle, fizyolojik tuz çözeltisiyle, üç kez yıkandıktan sonra, Gooche krozelerden, seramik havana alınmıştır. Havanda yaş biyokütlenin üzerine sıvı azot eklenip, tokmakla granüllü hale getirilmiştir. Daha sonra ise asetat tamponunda (0.2 M, pH 5.0) süspanse hale getirilmiştir (Aguilar et al., 2001).

3.2.4.2 Hücre İçi Enzim Aktivite Tayini İçin Hücre Kalıntısının Uzaklaştırılması

Hücre kalıntıları, 9000 devir/dakika'da 30 dakika soğutmalı olarak (+4 °C de) santrifüjlenerek ayrılmıştır. Üstte kalan berrak sıvı ise enzim aktivite tayinine dek buz banyosunda tutulmuştur.

3.2.5 Filtre Edilmiş Kültür Ortamında Yapılan Analizler

Filtre edilen kültür ortamı, 9000 devir/dakika'da 15 dakika soğutmalı olarak (+4 °C de) santrifüjlenmiştir. Enzim aktivite tayini aynı gün içinde yapılmıştır ve tayini yapılana dek örnekler buz banyosunda tutulmuştur. Diğer analizler için ise +4°C' de saklanmıştır.

3.2.5.1 Toplam Şeker Tayini

Yarı asetal veya yarı ketal formundaki monosakkaritler indirgen özellik gösterirler. Bu karbohidratlar birçok yükseltgen tarafından oksitlenirken sakkaroz trehaloz tipi disakkaritler etkilenmezler. Karbohidrat tayininde yaygın olarak kullanılan Fenol-Sülfürik asit yöntemidir. Bu yöntemde, derişik mineral asitler karbohidratlardan su çekerek furan aldehitleri açığa çıkarırlar. Furan aldehitleri de fenoller ile karakteristik boyar maddeler oluştururlar (Öztürk-Ürek, 2003). Toplam şeker tayini için Fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır Standart olarak

glukoz çözeltisi kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Yöntem Çizelge 3.5'te verildiği gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.4 Toplam şeker tayin yöntemi standart derişimleri

	%0.01 lik glukoz (ml)	Distile su (ml)	Glukoz Derişimi (mg/ml)
Std 1	0	1.0	0
Std 2	0.2	0.8	20
Std 3	0.4	0.6	40
Std 4	0.6	0.4	60
Std 5	0.8	0.2	80
Std 6	1.0	0	100

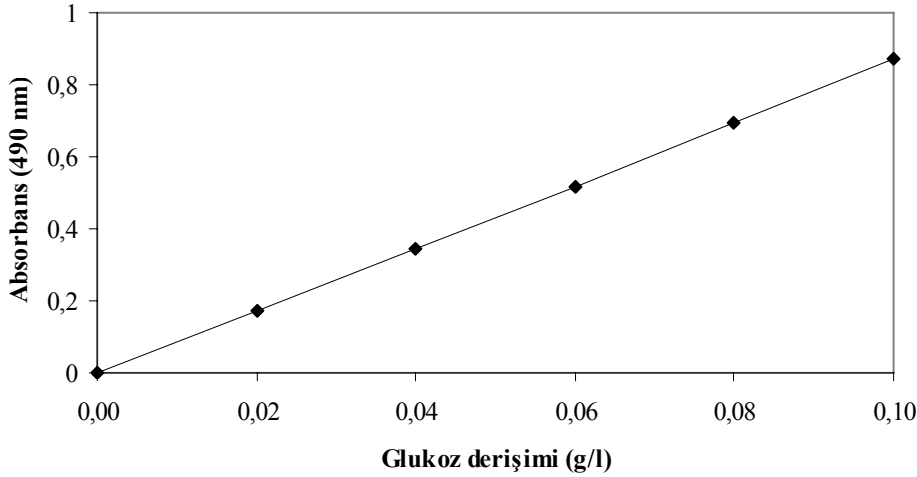
Çizelge 3.5 Fenol-Sülfürik Asit tayin yöntemi

(ml)	Kör	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Örnek
Tüplerde	1	1	1	1	1	1	1	1
Fenol	1	1	1	1	1	1	1	1
Derişik H₂SO₄	5	5	5	5	5	5	5	5

Vorteksle karıştırılır.10 dak. oda sıcaklığında bekletilir. Tekrar vorteksle karıştırılır 20 dk. 25-30°C su banyosunda bekletilir.

✓ Heksozlar için 490 nm'de, Pentozlar ve Üronik Asitler için 480 nm'de köre karşı absorbens değerleri okunur.

Toplam şeker analizlerine (Fenol-Sülfürik asit) ait veriler Şekil 3.2'de verilen glukoz standart grafiğinden yararlanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.2 Toplam şeker tayini standart eğrisi grafiği

3.2.5.2 Toplam Fenolik Bileşik Tayini

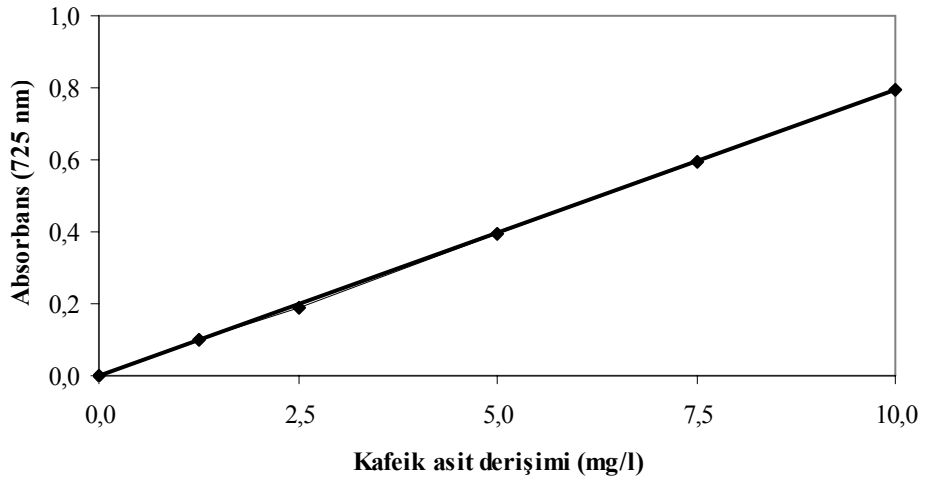
Folin reaktifi ile fenolik asitlerin tayini sıkça kullanılan yöntemlerden birisidir. Fosfomolibdik-fosfstungstik asit, Folin tarafından indirgenerek alkali çözeltilerde mavi renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleks uygun absorbans değerinde kolaylık ile dedekte edilebilmektedir (Yeşil Çeliksaş, 2005). Örneklerin toplam fenolik bileşik tayini Folin-Ciocalteau yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntem monomerler, dimerler ve büyük fenolik bileşikleri ayırt etmeyen ve tüm fenolik bileşikleri ölçebilen kolorimetrik yükseltgenme/indirgenme yöntemidir (www.activin.com). Toplam fenolik bileşik tayininde standart olarak kafeik asit ve gallik asit kullanılmıştır.

Standart olarak kafeik asit standart eğrisi kullanıldığında, değerler kafeik asit eşdeğeri olarak tespit edilmiştir (Ergül Ergun, 2004). (Çizelge 3.6)

Çizelge 3.6 Folin-Ciocalteu yöntemi (Box, 1983).

	Kör	Std 1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Örnek
Kafeik asit	-	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	-
Örnek	-	-	-	-	-	-	-	0,1
Distile su	4.00	3.95	3.90	3.80	3.70	3.60	3.50	3.90
Vorteks ile karıştırma								
Folin Reaktifi	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vorteks ile karıştırma ve 5 dakika bekleme								
Na₂CO₃	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vorteks ile karıştırma ve 30 dakika bekleme ve 725 nm’de absorbans değerlerinin köre karşı okunması								

Toplam fenolik madde miktarı, Şekil 3.3’teki kafeik asit standart grafiğinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

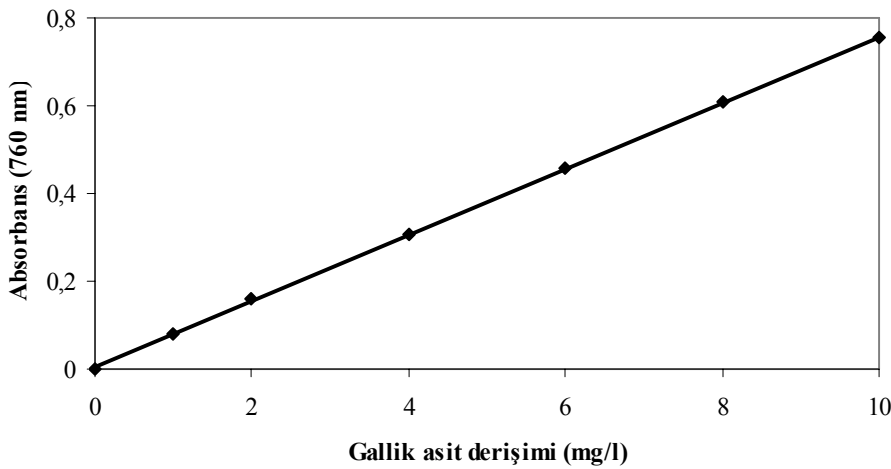
**Şekil 3.3** Toplam fenolik bileşik tayini kafeik asit standart eğrisi grafiği

Standart olarak gallik asit standart eğrisi kullanıldığında, değerler gallik asit eşdeğeri olarak tespit edilmiştir (Dorman et al., 2003) (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7 Toplam fenolik bileşik tayini analiz yöntemi

	Kör	Std 1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Örnek
Gallik Asit	-	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	-
Örnek	-	-	-	-	-	-	-	0.10
Distile su	10.00	9.95	9.90	9.80	9.70	9.60	9.50	9.90
Vorteks ile karıştırma								
Folin Reaktifi	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vorteks ile karıştırma ve 5 dakika bekleme								
Na₂CO₃	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Vorteks ile karıştırma ve 1 saat bekleme 760 nm’ de absorbans değerlerinin köre karşı okunması								

Toplam fenolik madde miktarı, Şekil 3.4’teki gallik asit standart grafiğinden yararlanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.4 Toplam fenolik bileşik tayini gallik asit standart eğrisi grafiği

3.2.5.3 Renk Ölçümü

Santrifüjlenmiş örneklerin, 395 nm’de absorbans değerleri ölçülerek renk değerleri absorbans cinsinden tespit edilmiştir (Sayadi and Ellouz, 1995).

3.2.5.4 Toplam Tanen Tayini

Tanen miktarının belirlenmesi için, “**Protein Çöktürme Metodu**” (Hagerman and Butler, 1978) kullanılmıştır. Yönteme göre; incelenen numuneye standart protein çözeltisi eklenir. Oluşan çözünmeyen tanen-protein kompleksi, alkali çözeltide çözündürülür ve ferrik klorid eklenmesinden sonra, süre sonunda 510 nm’de absorbans ölçümüne göre tanen miktarı tayin edilmiştir.

Ticari TA’in miktarının, 510 nm’deki absorbansa karşı çizilen grafiği 0.2–1.0 aralığında doğrusaldır. Spektrofotometrenin kalibrasyonu, havaya karşı yapılmıştır. (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8 Toplam tanen yöntemi standart eğrinin derişimleri

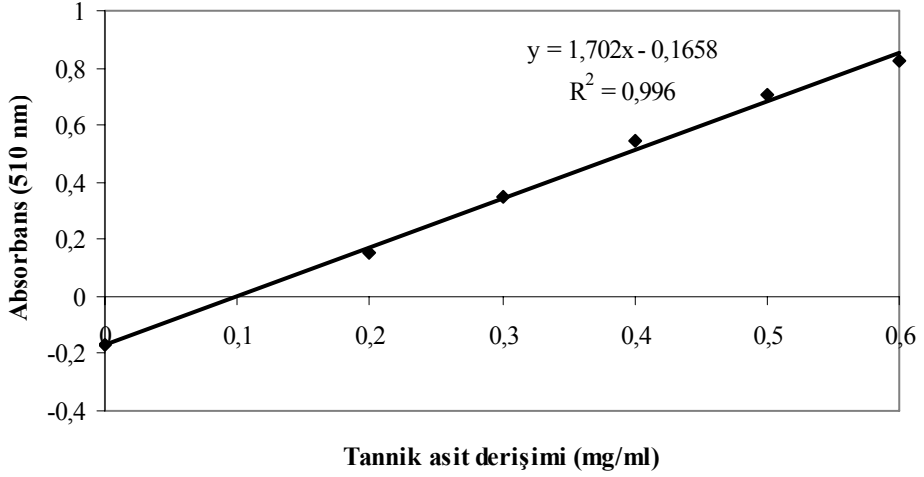
	% 0,1 TA çözeltisi (ml)	0,2 M pH 5 Asetat Tamponu (ml)	TA Derişimi (mg/ml)
Standart 1	0.2	0.8	0.2
Standart 2	0.3	0.7	0.3
Standart 3	0.4	0.6	0.4
Standart 4	0.5	0.5	0.5
Standart 5	0.6	0.4	0.6
Standart 6	0.7	0.3	0.7
Standart 7	0.8	0.2	0.8
Standart 8	0.9	0.1	0.9
Standart 9	1.0	0	1.0

Tanen içeriği belirlenecek örnek katı halde ise su veya metanolde 1.0 mg/mL derişimde çözeltisi hazırlanır. ZKS sıvı halde bulunduğundan doğrudan alınarak kullanılmıştır. Toplam 1.0 ml hacme sahip yukarıda belirtilen şekilde hazırlanmış standartlar (Çizelge 3.9) ve 1.0 ml ZKS örneği plastik santrifüj tüplerine alınmıştır (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9 Toplam tanen yöntemi

(ml)	Kör	Std 1	Std 2	Std 3	Std4	Std5	Std6	Std7	Std8	Std9	Örnek
Tüplerde	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BSA	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
✓ Vorteks ile karıştırılır ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. ✓ Süre sonunda tanenlerin çökmesi için, 9000 devir/dakika'da, 30 dakika soğutmalı olarak (+4 °C) santrifüjlenmiştir. ✓ Üstteki duru faz atıldıktan sonra, pellet yüzeyi ve tüpün çeperleri, tampon çözeltisiyle pellete zarar vermeden yıkanır.											
SDS- trietanolamin	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
✓ Pelletler, vorteks edilerek çözündürülür.											
FeCl₃	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
✓ Vortekslenir ve oda sıcaklığında 15–30 dakika kadar renk kararlılığı için bekletilir. ✓ Süre sonunda 510 nm'de absorbans değerleri okunur. ✓ 4 ml SDS- trietanolamin çözeltisine, 1 ml FeCl₃ eklenmiş üç paralel tüpün 510 nm'deki absorbans değerlerinin ortalaması, her tüpün absorbans değerinden çıkartılır.											

Toplam tanen miktarı, Şekil 3.5'teki TA standart grafiğinden yararlanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.5 Toplam tanen tayini tannik asit standart eğrisi grafiğı

3.2.5.5 Lakkaz (Fenol Oksidaz) Enzimi Kinetik Aktivite Tayini

Lakkaz (fenoloksidaz) aktivite tayini, 25 °C’de ABTS’in oksidasyon hızının saptanması ile ölçölmüştür. 420 nm’de absorbanstaki lineer artışın 1 dakika boyunca izlenmesi ile incelenmiştir. Tayin karışımında 1mM ABTS ve pH 5.0’e ayarlı 0.1 M sodyum sitrat tamponu vardır. (Çizelge 3.10) Enzim aktivitesi (U/ml) ABTS’nin ekstinksiyon katsayısı ile hesaplanmıştır (Palmieri et al., 1997).

Çizelge 3.10 Lakkaz aktivitesi tayin yöntemi

	Kör (µl)	Örnek (µl)
Örnek	-	20
Sitrat tamponu (0,1 M pH 5.0)	900	880
1 mM ABTS	100	100
✓ 420 nm’de 1 dakika süresince enzim aktivitesindeki artış izlenir.		

- ✓ **1 Unit (U)** enzim, 1 dakika boyunca 1µmol ABTS'yi dönüşüme uğratan lakkaz miktarı olarak belirlenmiştir
 - ✓ DA: Absorbans değerindeki artış
 - ✓ V: toplam reaksiyon hacmi (ml) $\Rightarrow$ 1ml
 - ✓ DT: reaksiyon süresi (saniye)
 - ✓ DA/ DT: 1 dakikanın sonunda spektrofotometrenin kinetik kısmından alınan absorbans değeri.
 - ✓ V: Enzim örneğinin hacmi (ml) $\Rightarrow$ $20 \cdot 10^{-3}$ ml
 - ✓ ES: Substratın molar absorpsiyon katsayısı
- $(U/ml) = (DA \cdot V \cdot 10^6) / (ES \cdot Dt \cdot v)$

3.2.5.6 Tannaz Enzimi Spektrofotometrik Aktivite Tayini

Spektrofotometrik tannaz aktivite tayini, 40 °C' de tannazın metil gallat üzerine etkisi ile oluşan gallik asit ile rodanin arasındaki kromojen (renkli öncül madde) oluşumuna dayanmaktadır (Sharma et al., 2000). Yöntem çizelge 3.11'de sunulmuştur.

Çizelge 3.11 Spektrofotometrik tannaz aktivite tayin yöntemi

	Kör	Örnek
Metil gallat (µl)	-	250
Enzim (üretim ortamı) (µl)	-	250
0.05 M Sitrat tamponu, pH 5.0 (µl)	500	-
✓ Tüpler, vorteks ile karıştırılır.		
Metanolik rodanin (µl)	300	300
✓ Tüpler, vorteks ile karıştırılıp, 30 °C’ de, 5 dakika su banyosunda tutulur.		
KOH (µl)	200	200
✓ Tüpler, vorteks ile karıştırılıp, 30 °C’ de, 5 dakika su banyosunda tutulur.		
Destile su (ml)	4.0	4.0
✓ Tüpler, vorteks ile karıştırılıp, 5-10 dakika oda şartlarında bekletilir ve süre sonunda 520 nm’ de köre karşı absorbans okunur.		

*Köre karşı okunan örnek absorbanslarının relatif aktivitesi hesaplanmıştır.

3.2.5.7 Tannaz Enzimi Kolorimetrik Aktivite Tayini

Kolorimetrik tannaz aktivite tayininde, 40 °C’ de enzimin spesifik substratı olan TA kullanılmıştır. Analizde, her örnek için bir kör ve bir de denatüre enzim tüpü vardır. Kör tüpünde sübstrat yerine aynı miktarda pH 5.0’ e ayarlı 0.2 M asetat tamponu bulunmaktadır. **Denatüre enzim tüpü** için, enzim eklendikten sonra tüp 10 dakika, 100 °C’ deki su banyosunda bekletilir. Yöntem, substratı TA’in, enzimatik reaksiyon sonrasında 530 nm’ de optik dansitede (OD) meydana gelen değişime dayanır (Mondal et al., 2001). TA, alkali ortamda FeCl₃ ile 526 nm’ de optimum absorbans gösterir.

TA, polifenolik yapısından dolayı, herhangi bir proteine mesela; BSA'ya bağlanıp, onu çöktürebilmektedir. BSA çözeltisinin tuz (NaCl) içeriği tanin- protein kompleksinin oluşmasını ilerletmektedir. SDS-trietanolamin, tanin-protein kompleksini bozan, bir alkali deterjandır. FeCl₃, tanenin fenolik gruplarıyla, nükleofilik etkileşim yoluyla reaksiyona girer ve kahverengi renk oluşmasını sağlar. Enzimatik reaksiyon süresince, zamana karşı sübstrat tüketilir. Modifiye protein prespitasyon yöntemi ile de kalan TA miktarı ölçülür (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.12 Kolorimetrik tannaz aktivite tayin yöntemi

	Kör	Örnek	Denatüre Örnek
Tannik asit (ml)	-	0.3	0.3
Enzim (Üretim Ortamı) (ml)	0.05	0.05	0.05
0,2 M Asetat Tamponu, pH 5.0 (ml)	0.3	-	-
✓ Tüpler, vorteks ile karıştırılıp, 40 °C' de, 30 dakika su banyosunda tutulur.			
BSA (ml)	0.3	0.3	0.3
✓ Tüpler, vorteks ile karıştırılıp, 5000 p (6690 devir/dakika)'da, 5 dakika soğutmalı olarak (+4 °C) santrifüjlenmiştir.			
SDS- trietanolamin (ml)	3.0	3.0	3.0
✓ Oluşan çökelek, çözünene kadar vortekslenir.			
FeCl₃ (ml)	1.0	1.0	1.0
✓ Renk kararlılığı için, 15 dakika oda şartlarında bekletilir ve süre sonunda 530 nm' de köre karşı absorpsiyon okunur.			

✓ **1 U** enzim, enzimin ml' si başına birim zamanda parçalanan µmol TA olarak tanımlanmıştır.

$$A = \epsilon \cdot C \cdot d \quad d = 1 \text{ cm}$$

✓ ϵ : 0.577 (µM)⁻¹(cm)⁻¹ (TA için 530 nm' deki ekstinksiyon katsayısı)

✓ C₁: Örnek tüpündeki tannik asidin µM cinsinden değeri,

- ✓ C₂: Denatüre enzim tüpündeki tannik asidin µM cinsinden değeri,
- ✓ A₁: Örnek tüpünün absorbans değeri,
- ✓ A₂: Denatüre enzim tüpünün absorbans değeri.

Örnek bir tannaz aktivitesi hesabı

$$(U/L) = (C_2 - C_1) \cdot 10^3 / (30 \text{ dak.} \cdot 0.05 \text{ ml})$$

$$\Rightarrow (A_2 - A_1) \cdot 10^3 / [(30 \text{ dak.} \cdot 0.05 \text{ ml}) \cdot 0.577]$$

Enzim aktivite hesaplaması için örnek bir çözüm:

$$\left. \begin{array}{l} A_1: 1.648 \\ A_2: 1.783 \end{array} \right\} \text{ Spektrofotometrede okunan örnek ve } \\ \text{denatüre tüplerine ait absorbans değerleri}$$

$$U/l = (1.783 - 1.648) \cdot 10^3 / [(30 \text{ dak.} \cdot 0.05 \text{ ml}) \cdot 0.577]$$

$$\Rightarrow 156 \text{ U/l}$$

3.2.6 Ticari enzim preparatlarının uygulanması

3.2.6.1 Tannaz Enzim Numunesinin Tannik Aside Uygulanması

TA'in 0.2 M pH 5.0 asetat tamponunda hazırlanmış, %0.5 ve %1.0 (ağırlık/hacim)'lik çözeltilerine NEOTANNASE L ticari tannaz preparatı uygulanmıştır. Toplam 10 ml hacimde, TA çözeltilerine, %1.0 (hacim/hacim) tannaz sıvı enzim numunesi eklenmiş ve tüpler su banyosunda 45 °C'de inkübe edilmiş ve 24. saatin sonundaki tannaz aktivitesi tespit edilmiştir.

3.2.6.2 EDTA Uygulanmış Zeytin Karasuyuna Tannaz enziminin uygulanması

Metal iyonlarının EDTA veya tuzları ile molar olarak 1:1 oranında birleşmesi göz önünde tutularak hesaplanan NaEDTA ($\text{NaC}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8$ -Sigma) miktarı (100 mL için 2.40g) ZKS'ye eklenmiş ve magnetik karıştırıcıda 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra toplam 10 ml hacimde, EDTA uygulanmış ve EDTA uygulanmamış %100 ve % 10 ZKS'ye, %1.0 (hacim/hacim) tannaz eklenmiş ve su banyosunda 45 °C'de inkübe edilmiştir.

3.2.6.3 Zeytin Karasuyuna Tannaz ve Lakkaz Enzimlerinin Uygulanması

Biocon firmasından temin edilen NEOTANNASE L, sıvı enzim preparatıdır. ZKS'ye 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 (hacim/hacim) derişim aralığında sıvı preparattan eklenerek gerçekleştirilen ön denemede örnekler su banyosunda 45 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sıcaklığı, enzimin optimum sıcaklık aralığı 45-50 °C olmasından dolayı seçilmiştir.

Novozyme firmasından temin edilmiş lakkaz enzimi; DeniLite® II, liyofilize preparat olup, inert bir katı üzerine tutturulmuştur. Lakkaz enziminin ZKS'ye ilk kez uygulanmasında, enzimin 0.5 M pH 5.0 sitrat tamponunda hazırlanmış çözeltisinde yapılan aktivite tayini ile 1 g'daki enzim aktivite ünitesi tespit edilmiştir. Toplam 20 ml hacimde, steril edilmiş ZKS'ye mL'de 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 ve 20000 U olacak

şekilde, toz halindeki enzimden eklenmiş ve su banyosunda 45 °C’de inkübe edilmiştir.

Mikrobiyal üretimlerden bağımsız olarak tannaz ve lakkaz enzimlerin ZKS’ye yaptıkları etkiyi ortaya koymak amacı ile iki ticari enzim preparatı ZKS’ye uygulanmıştır. Enzimler tek tek veya farklı kombinasyonlarda uygulanmaları halinde yarattıkları farklılık araştırılmıştır. Lakkaz ve tannaz tek olarak, lakkaz-tannaz veya tannaz-lakkaz sırası ile veya lakkaz-tannaz aynı anda uygulanmıştır.

İnert bir katı üzerine tutturulmuş olan lakkaz enziminin 0.1 M pH 5.0 sitrat tamponunda, % 10’luk (ağırlık/hacim) 100’er ml iki çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler, 9000 devir/dakika’da 15 dakika soğutmalı olarak (+4 °C de) santrifüjlenmiştir. İnert katılar uzaklaştırılmıştır ve çözeltiler birleştirilmiştir. Elde edilen berrak çözelti, karanlık şişede, +4 °C de muhafaza edilmiştir.

Enzimatik uygulamalar, ZKS ve eklenen enzim numunesinin toplam hacminin 100 ml olduğu, 250 ml erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Lakkaz çözeltisinden %10 (hacim/hacim), tannaz numunesinden ise %1(hacim/hacim) olacak şekilde eklenmiştir. Çalışma sıcaklığı olarak iki enzimin de çalışma aralığı göz önünde tutularak 45 °C seçilmiştir. Denemeler, seyreltmesiz ve 1:10 oranında seyreltilmiş ZKS’de (%10 ZKS), 50 çalkalama hızında ve çalkalamalı inkübatörde 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Örnek alma aralığı: 0; 0,5; 1; 2; 4; 6 ve 24 saat olarak belirlenmiş ve her seferinde 5 ml örnek alınmıştır.

3.2.7 İnce Tabaka Kromatografisi

Örnekler silika plakaya (1.05554.0001 ürün kodlu **Merck**: 20x20 cm TLC aluminum sheet, silicagel 60 F₂₅₄) kurşun kalem ile önceden belirlenmiş paralel bir çizgi veya nokta halinde pastör pipeti kullanılarak tatbik edilmiştir. Her tatbikten sonra kurutma makinesi ile yaymadan kurutulmuştur. Uygulanan örnek spotları kuruduktan sonra plaka mobil faz içeren cam ince tabaka kromatografisi tankı içine alınmıştır. İnce tabaka kromatografisi tankı, işlemden önce 15 dakika boyunca çözgen sistemi ile doyurulmuştur. Kullanılan çözgen sistemi; fenolik asitlerin ayrımını sağlayan 1 damla **formik asit** (Merck) eklenmiş, **hekzan** (Merck)-**etil asetat** (Merck)-**metanol** (Merck) **(10:10:2.5 hacim/hacim/hacim)** sistemidir. Standart (std) olarak kullanılan fenolik asitler ve numaralandırılması şöyledir:

1. Sinapinik asit	6. Ferülik asit
2. Şirinjik asit	7. Katesol
3. Metil gallat	8. p-koumarik asit
4. Trans-2-hidroksi-sinamik asit	9. Kafeik asit
5. Gallik asit (Sigma)	

Standartlar, metanolde (J.T. Baker) derişim 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. 7. ve 8. standartlar yapılan ön deneme sonucu örneklerde tayin edilmedikleri için çıkarılmıştır. Standartlar silika plakanın ortasına en polardan en apolara doğru sıralanmış şekilde tatbik edilmiştir. Standartların plakadaki sıralanışı; **std6, std1, std2, std3, std9, std5, std4** şeklindedir.

Standartlar ikişer kez, örnekler dört veya beş kez tatbik edilmiştir. Plakada bantlar oluştuktan sonra ısıtıcı üzerinde kurutulup, UV lambası altındaki görüntüleri 254 nm veya 366 nm’de incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Daha sonra %99’lık etanolde (J.T. Baker) hazırlanmış %5’lik FeCl_3 (Sigma) çözeltisine daldırılmıştır. Isıtıcı üzerinde kurutulup tekrar fotoğraf çekilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yunanistan, İtalya, Lübnan, Portekiz, İspanya, Suriye, Tunus ve Türkiye'yi de içine alan Akdeniz ülkeleri için ZKS, önemli çevre sorunlarından biridir (Erguder et al., 2000). Bu ülkelerde yıllık yaklaşık 11 milyon ton zeytin işlenip, zeytinyağı üretilmektedir (Annasini and Gironi, 1991). Ülkemizin tarıma dayalı endüstrileri arasında önemli bir yer tutan zeytinyağı işleme üniteleri, yılda yaklaşık 2–3 milyon ton ZKS oluşturmaktadır (Aybeke vd., 2000). ZKS'de biyolojik parçalanmaya karşı dirençli olan karmaşık yapıdaki organik bileşiklerden fazla miktarda bulunması ve belirgin koyu renge sahip karakteristik göstermesi çevresel problem oluşturmaktadır. ZKS, hiç önlem alınmadan alıcı ortamlara deşarj edildiğinde, alıcı ortamın renginin ciddi bir şekilde değişmesine, sucul yaşamın yok olmasına, yüzey suyu ve yeraltı suyu ile toprak kalitesinin bozulmasına ve fitotoksisiteye neden olmaktadır. Doğal su kaynaklarının renginin değişmesi, Akdeniz ülkelerinde sıklıkla karşılaşılan kirliliğin görülebilen etkisidir ve zeytinin etinde bulunup, ZKS'ye de geçen, tanenden kaynaklanmaktadır (Galli and Tomati, 2002).

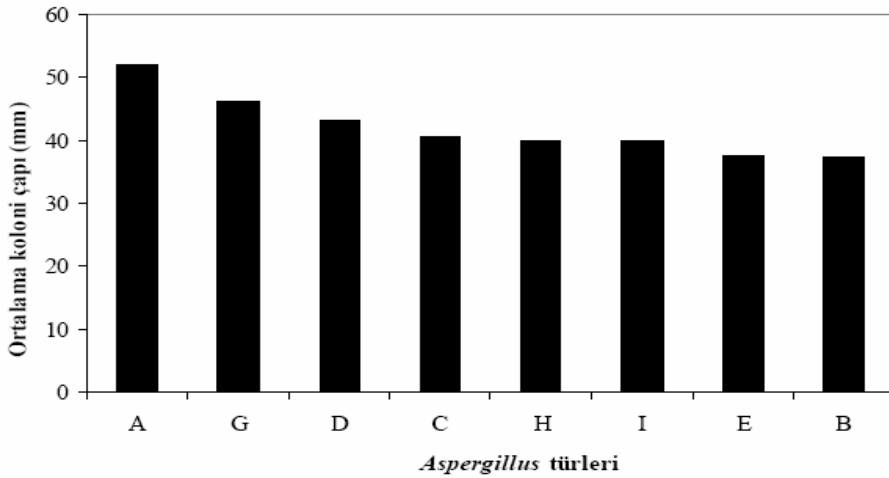
Tanenler, antimikrobiyal özellik gösterebildiğinden, biyolojik olarak parçalanmaları zor olan bir polifenolik bileşik sınıfıdır (Bkz. Bölüm 2.3.2). Ancak tanenlere karşı tolerans gösterebilen mikroorganizmalar da mevcuttur. Bu mikroorganizmalar, kendi doğal yaşam ortamlarında tanen parçalayabilmek için çeşitli mekanizmalar ve yolaklar geliştirmişlerdir. İpliksi funguslar, özellikle de *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri tanenlerin biyolojik parçalanmasına yer almaktadır (Bhat et al., 1998).

4.1 Sentetik Ortamdaki Mikrobiyal Üretimler

4.1.1 Tannik Asit Agar Ortamına Nokta Ekim

Aspergillus türleri, en iyi tannaz üreticileri olarak nitelendirilmektedirler (Bhat, et al., 1998). Denemelerde kullanılan *Aspergillus* suşları, ZKS'nin biyolojik arıtım denemelerinde daha önce kullanılmış, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu'nda bulunan türlerdir (Güngör, 2004).

Tannaz üreticisi olan *Aspergillus* suşlarını (Çizelge 3.2) belirlemek için tannazın birincil substratı olan TA'in tek karbon kaynağı olduğu, TAA ortamına nokta ekimler yapılmıştır. Fungusların substratı parçalama yetenekleri 28 °C sıcaklıkta, 4 günlük inkübasyon sonrası incelenmiştir. Her fungusun oluşturduğu koloni çapı ölçülmüş ve ortalama değeri alınmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 *Aspergillus* suşlarının TAA ortamında oluşturdukları ortalama koloni çapları, 28 °C, 4. gün. *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258 (A), *Aspergillus carbinorus* Ege-K (B), *Aspergillus foeditus var.pallidus* Ege-K 156 (C), *Aspergillus niger* Ege-K 1 (D), *Aspergillus niger* Ege-K 2 (E), *Aspergillus niger* Ege-K 3 (F), *Aspergillus niger* Ege-K 4 (G), *Aspergillus niger* Ege-K 5 (H), *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 (I).

Şekil 4.1’de sunulan sonuçlar ve Güngör, (2004)’te ZKS’deki toplam fenolik bileşik giderimi ve renk açılımının incelendiği aynı funguslar ile yapılan çalışmanın sonuçları birlikte değerlendirerek (Çizelge 4.1), TA’i metabolize edebildikleri saptanan funguslardan literatürde de tannaz üreticisi oldukları bildirilmiş olan *Aspergillus aculeatus* (Banerjee et al., 2001), *Aspergillus foetidus* (Mukherjee and Banerjee, 2004; Van Diepeningen et al., 2004) ve *Aspergillus tubingensis*’in (Van Diepeningen et al., 2004) ZKS’nin biyolojik olarak iyileştirilmesinde tannaz enziminin etkisinin incelenmesinde kullanılmalarına karar verilmiştir.

Çizelge 4.1 %50 ZKS’deki üretim ortamlarında, *Aspergillus* section Nigri suşları ile verim (g giderilen fenolik bileşikler g⁻¹ biyokütle), toplam fenolik bileşik giderimi (%) ve renk açılımı (%), 200 devir /dakika, 28 °C, 48 saat (Güngör, 2004).

Mikroorganizma		Ortam 1	Ortam 2	Ortam 3	Ortam 4
<i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258	Verim	0.000	0.002	0.013	0.119
	Toplam fenolik bileşik giderimi (%)	12.03	1.73	4.94	33.33
	Renk açılımı (%)	0	23.32	26.89	80.54
<i>Aspergillus foetidus</i> var. <i>pallidus</i> Ege-K 156	Verim	0.022	0.001	0.013	0.039
	Toplam fenolik bileşik giderimi (%)	28.51	8.84	6.83	25.08
	Renk açılımı (%)	6.45	31.10	31.62	78.33
<i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265	Verim	0.018	0.002	0.006	0.179
	Toplam fenolik bileşik giderimi (%)	34.59	24.38	3.43	26.35
	Renk açılımı (%)	7.21	21.42	26.89	80.54

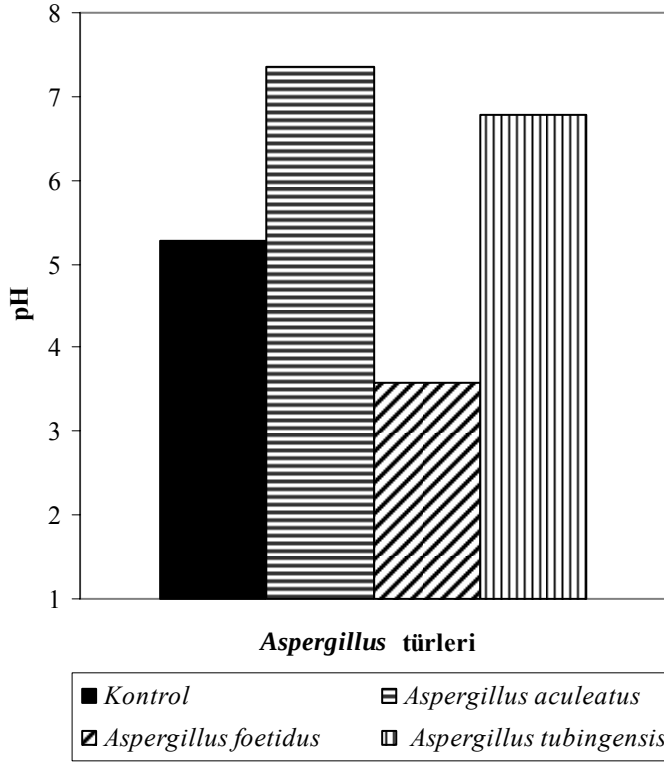
* Ortam 1: %50 ZKS (C/N 33.24); Ortam 2: %0.005 (ağırlık/hacim) (NH₄)₂SO₄ ve 0.05% (ağırlık/hacim) (NH₄)₂HPO₄ eklenmiş %50 ZKS (C/N 11.43); Ortam 3: %0.25 (ağırlık/hacim) (NH₄)₂SO₄ ve 0.25 (ağırlık/hacim) (NH₄)₂HPO₄ eklenmiş %50 ZKS (C/N 27.32); Ortam 4: %0.1 (ağırlık/hacim) maya özütü eklenmiş %50 ZKS (C/N 33.08).

4.1.2 Derin Kültürdeki Üretimler

ZKS’nin biyolojik arıtımında tannaz enziminin etkisinin incelenmesinde kullanılacak olan *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258,

Aspergillus foetidus var.pallidus Ege-K 156 ve *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265, tannaz üretme yeteneklerinin belirlenmesi amacı ile sentetik üretim ortamında üretilmiş ve tannaz enzim aktivitesinin saptanması amaçlanmıştır. Zira bira endüstri atıksuyunun arıtımında kullanılan *Coriolopsis gallica* fungusunun, tannaz aktivitesi göstermemesine rağmen TA'in tek karbon kaynağı olduğu, petri denemesinde, TA'i metabolize edebildiği bildirilmiştir (Yagüe et al., 2000). Funguslardan hazırlanan spor süspansiyonu, %2.0 (hacim/hacim) olacak şekilde (spor sayısı 5.6×10^7 adet/ml), % 1.0 TA eklenmiş Czapek-Dox minimal ortamına (sentetik üretim ortamı) inoküle edilmiştir, 200 devir/dakika ve 28 °C'de, 48 saat boyunca çalkalamalı kültür denemeleri gerçekleştirilmiş, 48 saat sonunda pH, kuru ağırlık, toplam fenolik bileşik miktarı, renk ve hücre içi tannaz aktivite tayini için analizler yapılmıştır.

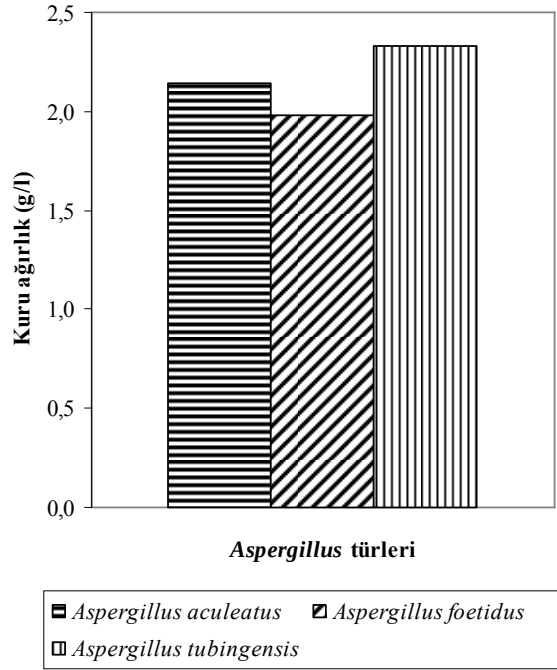
Asidik bir protein olan tannaz enziminin üretiminde üretim ortamı başlangıç pH değeri en çok pH 5.0 olarak tercih edilmiştir (Bkz. Bölüm 2.7.1.1). Fungus üremesi gerçekleşmemiş sentetik ortamının (kontrol), pH değeri 5.28 olarak ölçülmüştür ve bu ortam pH ayarlaması yapılmadan kullanılmıştır. Üç fungustan, *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258 ve *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 üretim sonunda üretim ortamı pH değerini sırası ile pH 7.35 ve pH 6.79'a çıkarırken, *Aspergillus foetidus* var.pallidus Ege-K 156, aksine pH'yı 3.58'e düşürmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Sentetik üretim ortamındaki pH değişimi, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat.

Kuru ağırlık, mikrobiyal üremenin ölçüsü olduğu için önemli proses parametrelerinden biridir. Primer metabolitler, büyümenin ilk evrelerinde sentezlendikleri için, kuru ağırlıktaki artış metabolitin sentezlendiğinin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Tannaz büyümenin ilk evrelerinde sentezlenerek en yüksek aktivite değerine ulaşmakta ve ardından aktivitede düşüş meydana gelmektedir (Bradoo et al., 1997; Mondal and Pati, 2000). *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258, *Aspergillus foetidus* var. *pallidus* Ege-K 156 ve *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265, 48 saatlik üretimleri sonunda sırası ile 2.14, 1.98, ve 2.33 g kuru ağırlık/l değerleri elde edilmiştir (Şekil

4.6). Bu değerler, *Aspergillus aculeatus* DBF 9'ın çalkalmalı kültürde hücre içi ve hücre dışı tannaz enzim üretiminin 200 devir/dakika çalkalama hızında, 30 °C'de ve %1.0 TA derişiminde incelendiği çalışmada elde edilen 2.18 g kuru ağırlık/l değeri ile de uyumludur (Banerjee et al., 2001).



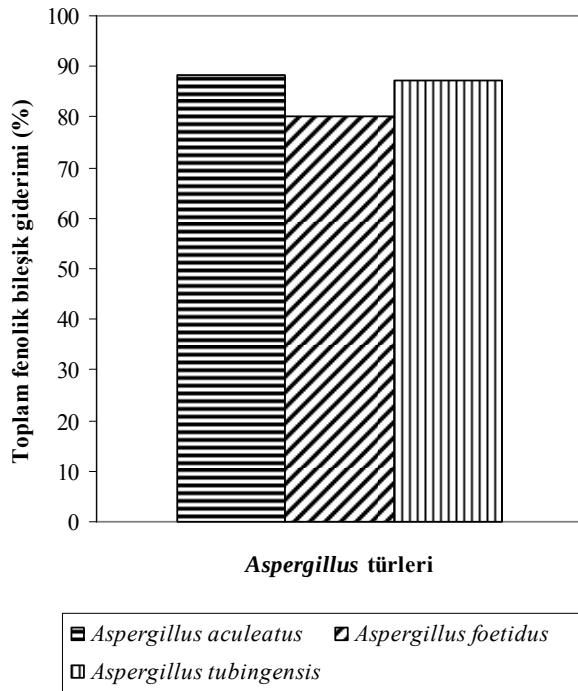
Şekil 4.6 Sentetik üretim ortamındaki kuru ağırlık (g/l) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat.

Üç fungus da sentetik üretim ortamında toplam fenolik bileşik miktarını azaltarak, %90 seviyesinde giderimler sağlamıştır (Şekil 4.7), 8.60 g/l (gallik asit eşdeğeri) olan ilk toplam fenolik bileşik miktarını *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258 1.02 g/l'ye, *Aspergillus foetidus* var.*pallidus* Ege-K 156 1.70 g/l'ye, *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ise 1.10 g/l'ye düşürmüştür (Çizelge 4.2). Tannaz sentezleyerek üretim ortamındaki TA'ı metabolize eden ve gallik asit oluşturan bu fungusların, oluşan gallik asidi başka metabolik yollara sokarak, sonraki

basamaklarda parçalaması mümkündür ve toplam fenolik bileşik miktarındaki bu önemli derecedeki azalma buna bağlanabilir. Benzer şekilde, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus janthinellum* ve *Aspergillus frequentans* 'un gallotanenleri oksalik asitlere kadar hidroliz ettiklerini tespit etmiştir (Lewis and Starkey, 1969).

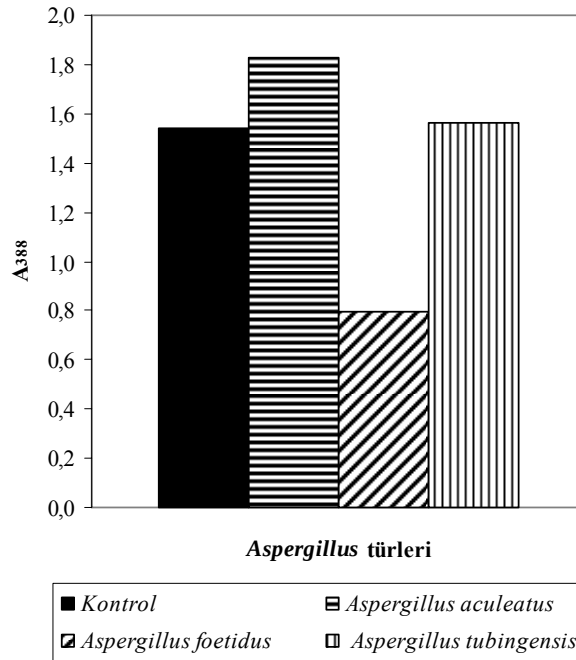
Çizelge 4.2 Sentetik üretim ortamında toplam fenolik bileşik miktarındaki değişim

Ortam	Toplam fenolik bileşik miktarı (g/l)
Kontrol	8.60
<i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258	1.02
<i>Aspergillus foetidus</i> var. <i>pallidus</i> Ege-K 156	1.70
<i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265	1.10



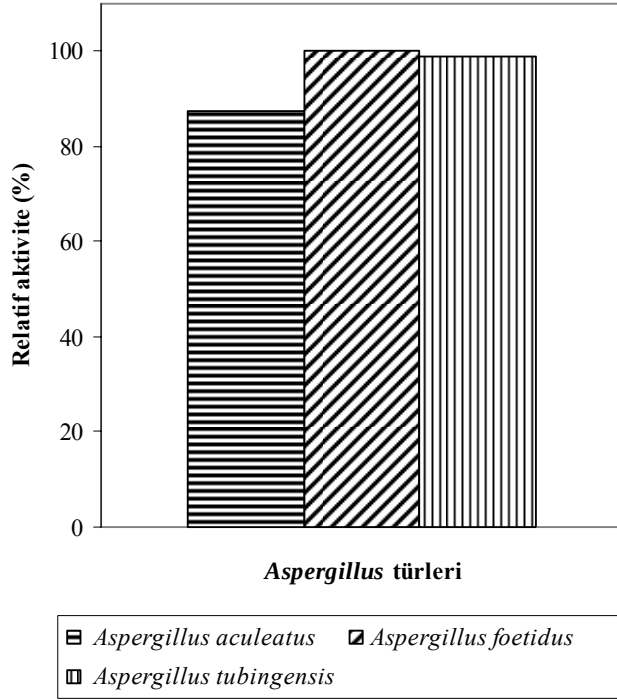
Şekil 4.7 Sentetik üretim ortamındaki toplam fenolik bileşik giderimi (%) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat.

İnokülasyon yapılmamış üretim ortamı (kontrol) ile birlikte fungus üremesi gerçekleşmiş üretim ortamlarının, 388 nm'deki absorbans değerleri (A_{388}) renk açılımının saptanabilmesi amacı ile ölçülmüştür. *Aspergillus foetidus* var. *pallidus* Ege-K 156, üretim ortamında % 48.31 renk açılımı sağlarken, *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258 ve *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ise sırası ile % 18.61 ve % 1.23 renk koyulaşmasına sebep olmuştur (Şekil 4.8). Şekil 4.2'deki petri fotoğrafında *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258, TAA ortamının açık kahverengi olan rengini sarıya döndürmüş, derin kültürdeki sentetik ortamda ise rengin koyulaşmasına yol açmıştır. Elde edilen bu sonuçlar mikroorganizmaların agarlı besi ortamında gösterdikleri davranışı, derin kültürde daima tekrarlayamayabildiklerini göstermektedir.



Şekil 4.8 Sentetik üretim ortamında 388 nm'deki absorbans değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat.

Enzim üretkenliğinin en açık göstergesi olan enzim aktivite değeri, prosesin başarısı açısından önemlidir. Tannaz aktivite tayini için literatürde çok sayıda tayin yöntemi mevcuttur. Yeni geliştirilen yöntemlerde, diğer yöntemlerin dezavantajını ortadan kaldırmak hedeflenmiştir. 2000 yılı sonrası iki yeni yöntem geliştirilmiştir. Bunlar spektrofotometrik aktivite tayini (Sharma et al., 2000) ve kolorimetrik aktivite tayini (Mondal et al., 2001)'dir. Sentetik üretim ortamındaki üretimlerin enzim aktivite tayini, tannazın ikincil substratı metil gallatın kullanıldığı spektrofotometrik aktivite tayin yöntemi ile yapılmıştır. Funguslarca sentezlenen tannaz, daha çok hücre içi salgılanan bir enzim olduğundan ve bir miktar da hücre dışına salgılandığı bilindiğinden, üretim sonrası hücre içi tannaz enzim aktivitesinin varlığı, bu çalışmada kullanılan fungusların derin kültürde tannaz üretebildiklerinin bir ölçüsü olarak kabul edilmiştir. Filtrasyon ile kültür ortamından ayrılan yaş biyokütle, sitrat tamponunda süspanse edilip, 12 saat, -20 C'de dondurulduktan sonra homojenizatörle mekanik hücre parçalama işlemi uygulanmış ve hücre kalıntıları santrifügasyon ile ayrılmış, üste kalan berrak sıvıda hücre içi tannaz aktivite tayini yapılmıştır. *Aspergillus foetidus* var. *pallidus* Ege-K 156, 0.474 optik dansite değeri ile en yüksek relatif aktiviteyi, *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265, 0.468 optik dansite değeri ile % 98.73, *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258, 0.415 optik dansite değeri ile % 87.55 relatif aktiviteyi vermiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Sentetik üretim ortamında spektrofotometrik tannaz aktivite tayin metodu (Sharma et al., 2000) ile hücre içi relatif tannaz aktivite değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C ve 48 saat.

Aspergillus aculeatus Ege-K 258, en büyük koloni çapını (52 mm) oluşturan *Aspergillus* suşu olmuşken (Şekil 4.1), derin kültürde en düşük relatif aktivite değerini vermiştir.

Hücre içi tannazın proste hücre parçalama basamağı gerektirmesi farklı hücre parçalama yöntemlerinin de denenmesini gerekli kılmıştır. Bu amaç ile mekanik hücre parçalama yöntemi (Bhardwaj et al., 2003) ile sıvı azot kullanarak hücre parçalama yöntemi (Aguilar et al., 2001a, b) karşılaştırılmıştır. Spektrofotometrik enzim aktivite tayin yöntemi (Sharma et al., 2000) de bazı dezavantajlara sahiptir. Substrat olarak kullanılan metil gallat, tannazın ikincil substratı olup, TA'nin yüzde spesifikliği %100 iken,

metil gallatın %20'dir (www.kikkoman.co.jp). Ayrıca kültür ortamında bulunan TA'nın varlığının renk oluşumunda girişim yaptığı bildirilmiştir (Mondal et al., 2001). Bu sebepten dolayı enzim aktivite tayin yönteminde, TA'nın substrat olduğu, kolorimetrik aktivite tayin yönteminin (Mondal et al., 2001) kullanılması kararlaştırılmıştır ve sentetik üretim ortamında, *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile yapılan üretimde, sıvı azot ile hücre parçalamadan sonra yapılan kolorimetrik aktivite tayin yöntemi ile hücre içi tannaz aktivite değeri 420 U/l olarak bulunmuştur ve çalışmaya sıvı azot ile hücre parçalama ve kolorimetrik tannaz aktivite tayin yöntemi kullanılarak devam edilmiştir.

Sentetik ortam sonuçları Çizelge 4.3'te özetlenmiştir. *Aspergillus foetidus* var. *pallidus* Ege-K 156, en yüksek relatif aktiviteyi veren suş olması ile birlikte renk açılımı sağlayan tek suştur. Birim biyokütle başına giderilen fenolik bileşik verim değerleri ise 3.22 ile 3.54 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.3 Sentetik üretim ortamının genel sonuçları

Mikroorganizma	Toplam fenolik bileşik giderimi (%)	Renk açılımı (%)	Relatif tannaz aktivitesi (%) (Hücre içi)	g giderilen fenolik bileşikler g ⁻¹ biyokütle
<i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258	88.14	0	87.55	3.54
<i>Aspergillus foetidus</i> var. <i>pallidus</i> Ege-K 156	80.53	48.31	100.00	3.48
<i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265	87.21	0	98.73	3.22

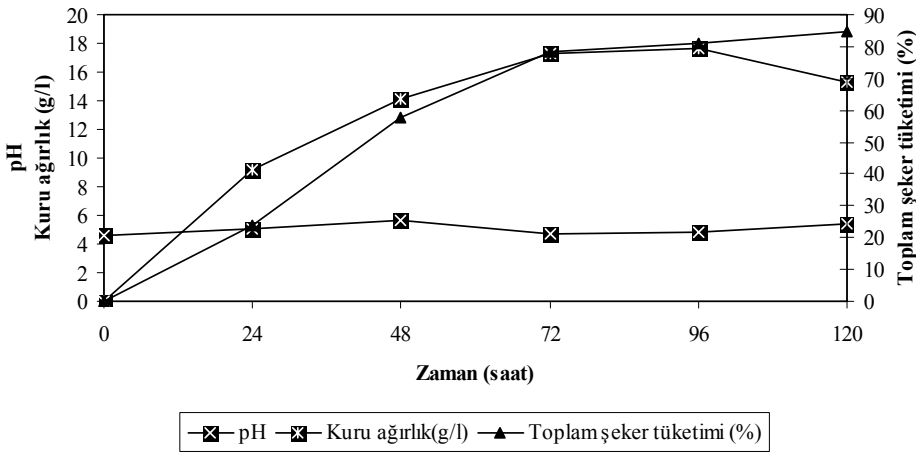
4.2 Zeytin Karasuyu Ortamındaki Mikrobiyal Üretimler

Sentetik üretim ortamında, tannaz sentezleyerek, tanenleri parçalayabildiği tayin edilmiş olan üç *Aspergillus* suşunun ZKS'deki tannaz sentezleme kapasiteleri, zamana karşı üretimlerle ortaya konulmuştur. Fungusların metabolizmasını, tannaz sentezine yönlendirmesi için, 28 °C'de, 7 gün boyunca TA eğik agarda inkübe edilmiş ve hazırlanan spor süspansiyonu inokulum olarak kullanılmıştır. ZKS'de mikrobiyal üremenin kısıtlanmasına sebep olan, fenolik bileşiklerin yüksek derişiminin (1.5 – 8.0 g/l) etkisini azaltmak amacı ile ZKS'deki üretimlerde seyreltilmiş ZKS (%50 ZKS) üretim ortamı olarak belirlenmiştir. Literatürde tannaz üretimi sıklıkla % 1.0 TA eklenmiş Czapek-Dox minimal ortamında gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.22). Bu üretim ortamının C/N oranı 10.94'tür. Çalışmada kullanılan ZKS'nin C/N oranı ise 33.24 olarak hesaplanmıştır. Bundan dolayı, azot kaynağı olarak NaNO₃ kullanılarak, %50 ZKS'nin C/N oranı, C/N 10 olacak şekilde ayarlanmıştır ve mineral tuzları ise litredeki derişimlerine bağlı kalınarak eklenmiştir (Çizelge 2.22). pH, kuru ağırlık, toplam fenolik bileşik, toplam şeker, renk, hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivitesi analizleri yapılmıştır.

4.2.1 *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258 ile %50 ZKS'de Zamana Karşı Üretim

Aspergillus aculeatus Ege-K 258 (spor sayısı 2.7×10^7 adet/ml) ile % 50 ZKS'de, (başlangıç pH değeri 4.60, fenolik bileşiklerinin değeri 3.54 g/l, toplam şeker miktarı 16.84 g/l) zamana karşı üretim yapılmıştır.

pH, kuru ağırlık ve toplam şeker tüketimindeki değişim Şekil 4.10'da verilmiştir *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258 ile üretim ortamı pH değeri üretimin ilk iki gününde pH 4.6'dan 5.63'e yükselmiş ve ardından 3.günde pH 4.67'ye inmiştir. Üretimin sonunda pH 5.40 değerini almıştır. Kuru ağırlık değeri 4. güne kadar sürekli artmış ve 4. günde pik yaparak 17.62 g/l'ye ulaşmış ve ardından inişe geçerek 5. günde 15.33 g/l değerini almıştır. Toplam şeker tüketimi üretimin ilk üç gününde doğrusal bir artışla, %78.09 değerine ulaşmıştır. 3. gün ile 5. gün arasında %6.83 artış ile % 84.92 olmuştur.



Şekil 4.10 *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki pH, kuru ağırlık (g/l) ve şeker tüketimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C.

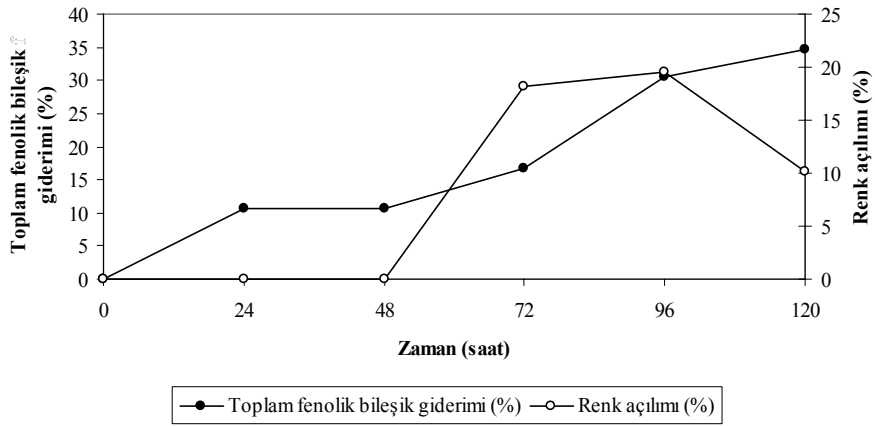
Üretim ortamının pH'sı 4.60 ile 5.40 arasında değişerek, asidik aralıkta kalmıştır. *Aspergillus japonicus*'un tannaz sentezine, pH'nın etkisinin incelenmesinde, pH 2.0 ile 8.4 arasında değişen pH değerleri denenmiştir. pH'nın asidik veya bazik aralıkta olmasının biyokütleyi etkilemediği, ancak enzim sentezinin pH 6.0 ile 7.0 arasında teşvik edildiği ve pH 4.0 ile 7.0 arasında optimum olduğu bildirilmiştir (Bradoo et al., 1997). *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258'un üretim boyunca pH aralığının tannaz sentezini teşvik eden asidik aralıkta kaldığı anlaşılmaktadır. Üretim sonrası pH değeri belirtilmemek ile beraber *Aspergillus aculeatus* DBF 9'un tannaz üretim ortamının başlangıç pH değeri de asidik bir değer olan pH 5.5'tur (Banerjee et al., 2001). *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258'un biyokütlesinin ilk dört günde sürekli artarak en yüksek değeri aldıktan sonra düşmesi, 4. günden sonra suşun duraklama fazına geçtiğini göstermektedir. Tannaz büyümenin ilk evrelerinde (gecikme ve logaritmik fazlar) sentezlenmektedir ve primer metabolit olarak sınıflandırılmaktadır (Aguilar and Sanchez, 2001). Nitekim Şekil 4.12'de sunulan hücre içi ve hücre dışı tannaz enzimi aktivite değerleri biyokütlenin 17.29 g/l olduğu 3. günde sırası ile 59 U/l ve 28 U/l değerlerini almıştır. Birim biyokütle başına giderilen fenolik bileşik ve hücre içi tannaz aktivitesi verimleri ise sırası ile 0.034 ve 3.41 değerlerini almıştır (Çizelge 4.5). Sentetik üretim ortamında hesaplanan birim biyokütle başına giderilen fenolik bileşik miktarı ise 48. saatin sonunda 3.54 olarak hesaplanmıştır. Fenolik bileşik giderim verimleri arasındaki mertebe farkı, sentetik ortamda tek karbon kaynağı olarak fenolik bir bileşik ile karşılaşan fungusun ZKS'de fenolik bileşiklerden daha kolay kullanabileceği karbon kaynaklarına öncelik

vermesine bağlanabilmektedir. ZKS'deki toplam şeker tüketimi ise 120 saate kadar sürekli artmış ve başlangıçta 16.84 g/l olan toplam şeker miktarı, 120. saatin sonunda 2.29 g/l'ye düşmüştür.

ZKS başlangıç toplam fenolik bileşik derişimi olan 3.54 g/l, sadece 1. gün ve 2. günde değişmemiştir ve diğer aralıklarda sürekli bir düşüş içinde olmuştur (Çizelge 4.4). Toplam fenolik bileşik giderimi renk açılımı arasındaki ilişki ise şekil 4.11'de sunulmuştur. Toplam fenolik bileşik giderimi 3. gün ile 4. gün arasında %16.67'den %30.51'e çıkarak en yüksek artışını göstermiştir. 5. günün sonundaki toplam fenolik bileşik giderimi ise % 34.75 olarak gerçekleşmiştir. Renk açılımı değeri ise üretimin ilk iki gününde artmıştır, örneklerin absorbans değerleri başlangıç absorbans değerinden yüksek bulunmuştur ve renk giderimi %0 olarak değerlendirilmiştir. En çarpıcı renk açılımı 2. gün ile 3. gün arasında gözlenmiştir ve renk açılımı %18.15'e çıkmıştır. 3. gün ile 4. gün arasında %1.32 artışla, en yüksek değeri olan %19.47'ye ulaşmış ve 4. gün ile 5. gün arasında absorbansın tekrar yükselmesi ile %10.11'e gerilemiştir (Şekil 4.11).

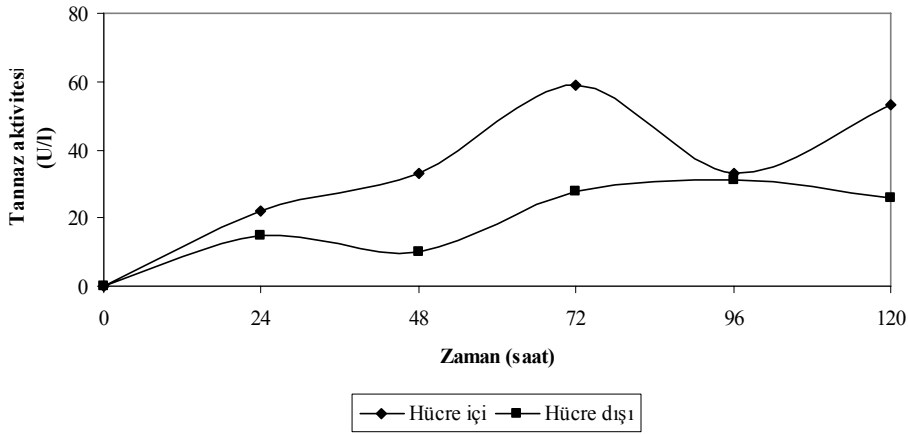
Çizelge 4.4 *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik değerleri (g/l)

Saat	Toplam fenolik bileşik miktarı (g/l)
0	3.54
24	3.16
48	3.16
72	2.95
96	2.46
120	2.31



Şekil 4.11 *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik giderimi (%) ve renk açılımı (%), 200 devir/dakika, 28 °C.

Halen ZKS’nin renk giderimine etki eden metabolik yollar aydınlatılmamıştır. ZKS’nin koyu kahverengi renginden sadece fenolik bileşiklerin sorumlu olmadığı anlaşılmaktadır. ZKS’nin rengine sebep olan pigmentin araştırıldığı bir çalışmada, koyu polimerik pigment izole edilerek kromatografik yöntemlerle kimyasal karakterizasyonu yapılmış, koyu rengi veren pigmentin yapısının % 58.2 sinin karbonhidratlardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Capasso and De Martino, 1998).



Şekil 4.12 *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C.

Aspergillus aculeatus Ege-K 258’in birim biyokütle başına giderilen fenolik bileşik değerleri, 0.027 ile 0.080 arasında değerler alırken; birim biyokütle başına hücre içi tannaz aktivitesi değerleri 1.87 ile 3.46 arasında değişmiştir. Hücre dışı tannaz aktiviteleri ise 10 ile 31 U/l arasında seyrederken, renk açılımı 48. saatten sonra başlamıştır (Çizelge 4.5).

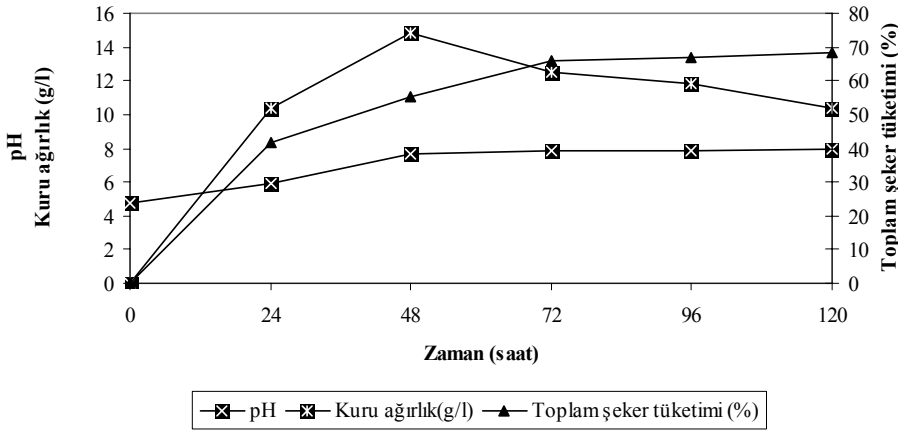
Çizelge 4.5 *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimin genel sonuçları

Zaman (saat)	g giderilen fenolik bileşikler g ⁻¹ biyokütle	Renk açılımı (%)	Hücre dışı tannaz aktivitesi (U/l)	U hücre içi tannaz aktivite ünitesi g ⁻¹ biyokütle
24	0.041	0.00	15	2.39
48	0.027	0.00	10	2.34
72	0.034	18.15	28	3.41
96	0.061	19.47	31	1.87
120	0.080	10.11	26	3.46

4.2.2 *Aspergillus foetidus var.pallidus* Ege-K 156 ile %50 ZKS'de Zamana Karşı Üretim

Aspergillus foetidus var.pallidus Ege-K 156 (spor sayısı 1.9×10^7 adet/ml) ile % 50 ZKS'de, (başlangıç pH değeri 4.71, fenolik bileşiklerinin değeri 3.12 g/l, toplam şeker miktarı 18.22 g/l) zamana karşı üretim yapılmıştır.

pH, kuru ağırlık ve toplam şeker tüketimindeki değişim Şekil 4.13'te verilmiştir. *Aspergillus foetidus var.pallidus* Ege-K 156 başlangıçta pH 4.71 olan üretim ortamı pH'sı 1. günün sonunda pH 5.9'dan 2. günün sonunda pH 7.68'e çıkarak asidik aralıktan bazik aralığa kaymıştır. Kuru ağırlık ilk iki gün sürekli olarak artarak, en yüksek değeri olan 14.84 g/l'ye ulaşmış, 5. günün sonunda, kuru ağırlık %30.0 azalarak, 10.39 g/l'ye kadar düşmüştür. Toplam şeker tüketimi, üretimin ilk 3 gününde azalan yüzde artışlar ile artmıştır ve 3. günden sonra duraksamaya geçmiştir. 3. günde toplam şeker tüketimi %65.79 iken, 5. günün sonunda sadece % 2.57 artış ile %68.36'e ulaşmıştır.



Şekil 4.13 *Aspergillus foetidus var. pallidus* Ege-K 156 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki pH, kuru ağırlık (g/l) ve toplam şeker tüketimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C.

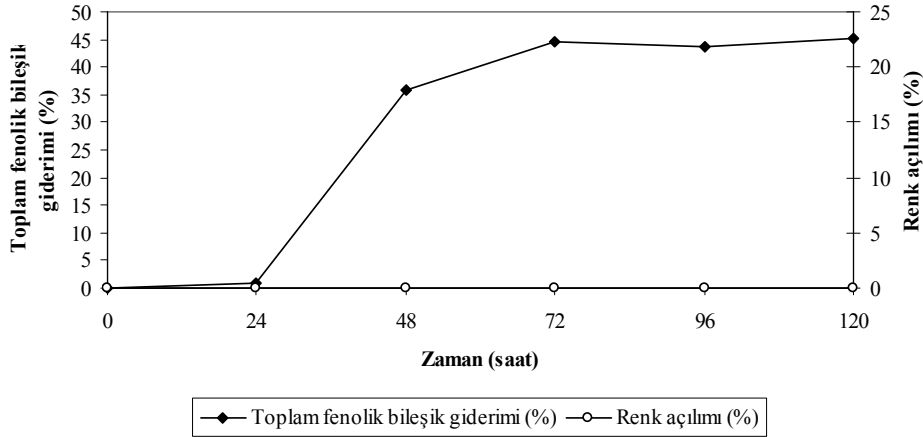
Üretimin ilk iki gününde asidik olan üretim ortamı, 2. günden sonra bazik aralığa kayarak, bazik aralıkta pH 7.48 ile 7.92 arasında değerler almıştır. Mikrobiyal tannazın pH kararlılık aralığının, pH 3.5 ile 8.0 arasında olduğu bildirilmiştir (Aguilar and Sanchez, 2001). *Aspergillus foetidus* GMRB013 MTCC 3557 şusu ile MKKF'de gerçekleştirilen tannaz üretimde (Bkz. Bölüm 2.7.1.2) tannaz aktivitesi ve yüzde gallik asit verimi açısından optimum pH değeri pH 5.0 olarak tespit edilmiştir (Mukherjee and Banerjee, 2004). *Aspergillus foetidus var. pallidus* Ege-K 156, en yüksek biyokütle değerine 2. günde (14.84 g/l) ulaşmıştır. 2. günden sonra biyokütlenin düştüğü görülmektedir (Şekil 4.13).

ZKS başlangıç toplam fenolik bileşik derişimi olan 3.12 g/l, üretimin sonunda 1.71 g/l değerine düşmüştür (Çizelge 4.6). Toplam fenolik bileşik giderimi ile renk açılımı arasındaki ilişki ise şekil 4.14'te sunulmuştur. Toplam fenolik bileşik giderimindeki en çarpıcı değere 1. gün ile 2. gün arasında ulaşılmıştır. 1. günün sonunda % 0.96 olan giderim, 2. günün sonunda % 35.9'a yükselmiştir. Toplam fenolik bileşik giderimindeki artış

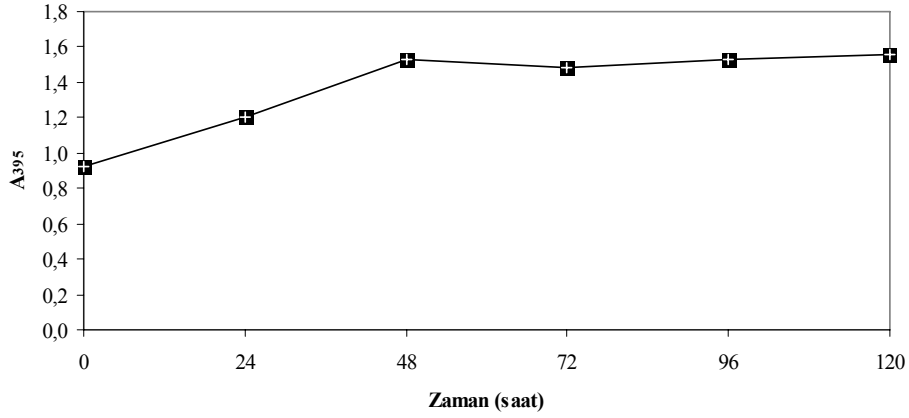
3. güne kadar devam etmiş, daha sonra değerler 5. günün sonunda %46.79'a ulaşmıştır (Şekil 4.14). Toplam fenolik bileşik miktarındaki bu değişime rağmen üretim ortamının 395 nm'deki absorbans değerleri 0.927 olan başlangıç değerinden 48 saatin sonunda 1.526'ya yükselmiş ve daha sonra zaman zaman inişe geçerek 1.482 ve 1.560 arasında değerler almıştır. Renk açılımı ilk absorbans değerine göre hesaplandığından, üretim boyunca %0 olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).

Çizelge 4.6 *Aspergillus foetidus var.pallidus* Ege-K % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik değerleri (g/l).

Saat	Toplam fenolik bileşik miktarı (g/l)
0	3.12
24	3.09
48	2.00
72	1.73
96	1.76
120	1.71



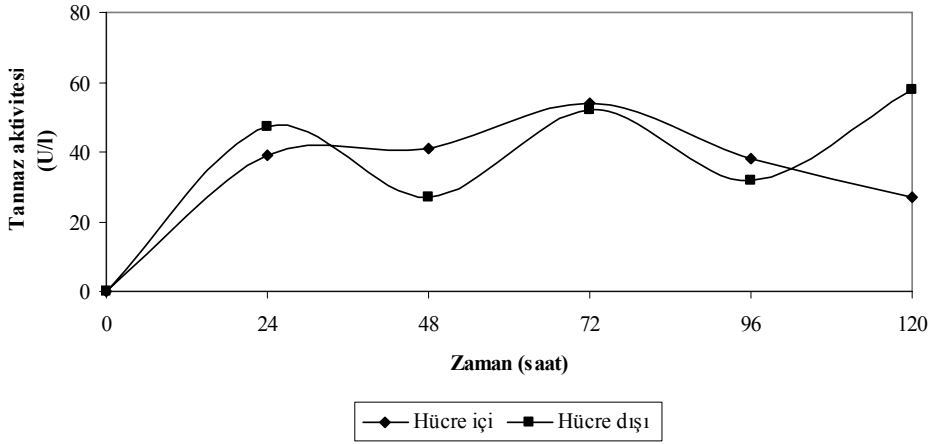
Şekil 4.14 *Aspergillus foetidus var.pallidus* Ege-K 156 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik giderimi (%) ve renk açılımı (%), 200 devir/dakika, 28 °C.



Şekil 4.15 *Aspergillus foetidus* var. *pallidus* Ege-K 156 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki 395 nm’deki absorbans değerleri (A_{395}), 200 devir/dakika, 28 °C.

Aspergillus foetidus var. *pallidus* Ege-K 156 ’un zamana karşı üretiminde, *Aspergillus foetidus* var. *pallidus* Ege-K 156 ’un, ZKS’de %47.6 fenolik bileşik giderimi sağlamasına rağmen, rengi hiç açmayıp, sürekli koyulaştırması fungusların ZKS’deki metabolizmalarının farklı olması ile açıklanabilir.

Aspergillus foetidus’un hücre içi ve hücre dışı aktivite değişimi Şekil 4.16’da verilmiştir. Hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivitesindeki dalgalanmaya bir yorum getirilememiştir.



Şekil 4.16 *Aspergillus foetidus* var. *pallidus* Ege-K 156 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C.

Aspergillus foetidus var. *pallidus* Ege-K 156’in birim biyokütle başına giderilen fenolik bileşik değerleri, 0.003 ile 0.135 arasında değerler alırken; birim biyokütle başına hücre içi tannaz aktivitesi değerleri 2.60 ile 4.33 arasında değişmiştir. Hücre dışı tannaz aktiviteleri ise 27 ile 58 U/l arasında seyrederken, renk açılımı üretim boyunca sıfır olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

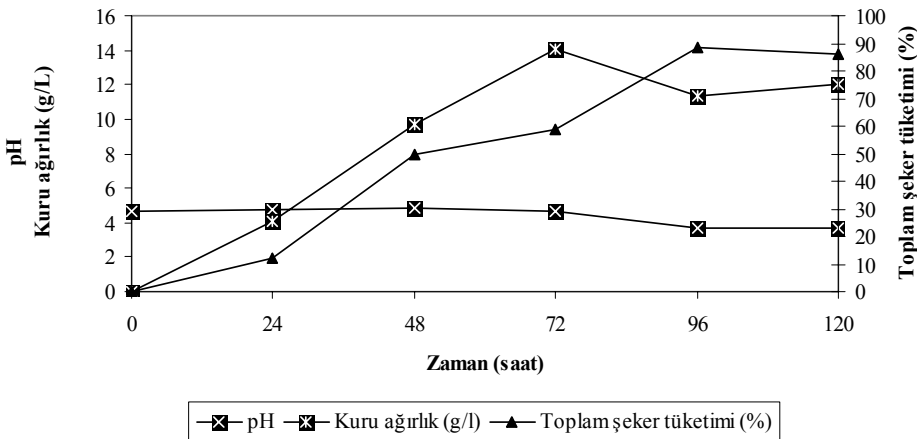
Çizelge 4.7 *Aspergillus foetidus* var. *pallidus* Ege-K 156 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimin genel sonuçları

Zaman (saat)	g giderilen fenolik bileşikler g ⁻¹ biyokütle	Renk açılımı (%)	Hücre dışı tannaz aktivitesi (U/l)	U hücre içi tannaz aktivite ünitesi g ⁻¹ biyokütle
24	0.003	0	47	3.75
48	0.075	0	27	2.76
72	0.111	0	52	4.33
96	0.115	0	32	3.22
120	0.135	0	58	2.60

4.2.3 *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile %50 ZKS'de Zamana Karşı Üretim

Aspergillus tubingensis Ege-K 265 (spor sayısı 9.0×10^7 adet/ml) ile % 50 ZKS'de, (başlangıç pH değeri 4.66, fenolik bileşiklerinin değeri 3.36 g/l, toplam şeker miktarı 16.48 g/l) zamana karşı üretim yapılmıştır.

Şekil 4.17'de zamana karşı pH, kuru ağırlık ve toplam şeker tüketimi sunulmuştur. Üretim ortamının pH'sı, 0.saat ile 72. saat arasında pH 4.66-4.67 değerlerini almış ve 72. saatten sonra pH 3.67'ye inmiştir. 96. saat ve 120. saat arasında ise pH 3.67 ve pH 3.73 değerlerini alarak değişim göstermemiştir. Kuru ağırlık değeri ise 72. saate kadar sürekli artarak, 72. saatte en yüksek değeri olan 14.08 g/l'ye ulaşmıştır. 72. saatten sonra 11.32 g/l'ye düşmüştür. 120 saat boyunca fungusun üretim ortamındaki toplam şekeri sürekli olarak metabolize ettiği görülmektedir. İlk 24 saatte % 11.89 ile başlayan toplam şeker tüketimi değerleri, 96. saatte %88.77 değerini almış ve 120 saatin sonunda % 86.10 toplam şeker tüketimi ile şeker derişimi 2.29 g/l olmuştur.



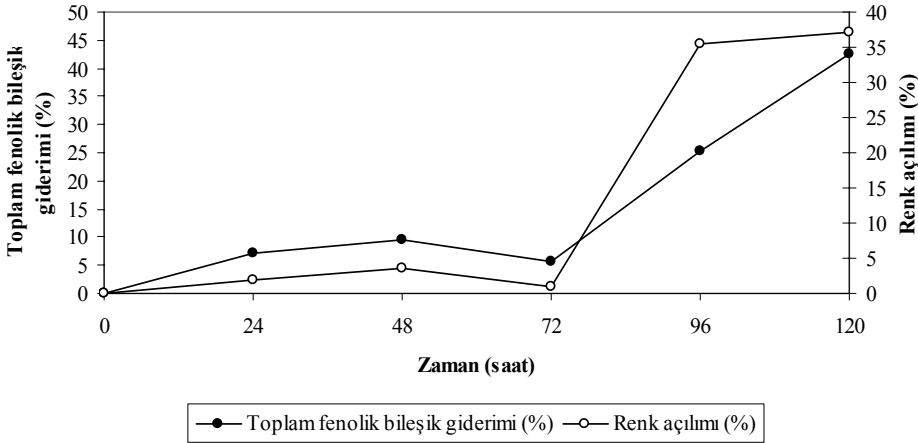
Şekil 4.17 *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki pH, kuru ağırlık (g/l) ve toplam şeker tüketimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C.

5 günlük üretim boyunca pH değerleri; pH 4.66'dan pH 3.73'e düşerek asidik aralıkta kalmıştır. Bu aralık, tannazın pH kararlılık aralığı içinde bulunmaktadır. Biyokütle ise en yüksek değerine 3. günde ulaşmıştır. 3. günden sonra, kademeli olarak azalmıştır. Büyüme ile ilişkili bir enzim olarak sınıflandırılan tannaz ise, sentetik ortamda gösterdiği biyokütle ile doğru orantılı davranışını, ZKS'de iki fungusta olduğu gibi tekrar göstermeyip, en yüksek hücre içi aktivite değeri olan 94 U/l değerine 4. günde ulaşmıştır.

Başlangıç toplam fenolik bileşik derişimi olan 3.36 g/l, üretim boyunca değişen oranlarda azalarak, 5. günün sonunda 1.93 g/l'ye inmiştir (Çizelge 4.8). Toplam fenolik bileşik giderimi renk açılımı arasındaki ilişki Şekil 4.18'de sunulmuştur. Toplam fenolik bileşik giderimindeki en çarpıcı artış, 3. gün ile 5. gün arasında kaydedilmiştir. 3. güne kadar toplam fenol giderimi %10'un altında gerçekleşmiştir ve 3. gün ile 5. gün arasında doğrusal bir artışla % 42.56'ya ulaşmıştır. Bununla paralel olarak renk açılımı, 3. günün sonuna kadar en yüksek %3.61 seviyesindeyken, 4. günde %35.53'e sıçramıştır. 5. gündeki renk açılımı ise %37.06 olup, 4. günden 5. güne değişmediği anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.8 *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile % 50 ZKS'de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik miktarı değerleri (g/l)

Saat	Toplam fenolik bileşik miktarı (g/l)
0	3.36
24	3.12
48	3.04
72	3.17
96	2.01
120	1.93



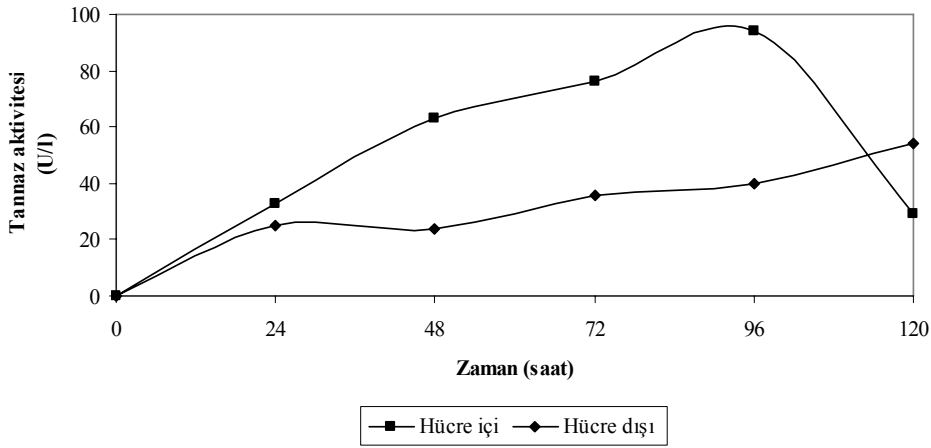
Şekil 4.18 *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki toplam fenolik bileşik giderimi (%) ve renk açılımı (%), 200 devir/dakika, 28 °C.

Aspergillus tubingensis Ege-K 265 için *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258 ve *Aspergillus foetidus* var.pallidus Ege-K 156’dan farklı olarak, toplam fenolik bileşik giderimi ve renk açılımı birbiri ile paralellik göstermiştir. Her iki parametre için de dönüm noktası 3. gün olmuştur. 3. saatten sonra, toplam fenolik bileşik giderimi ve renk açılımında ciddi artışlar kaydedilmiştir. Üretimin aynı döneminde sentezlenen tannaz aktiviteleri de 96. saatte hücre içi, 120. saatte de hücre dışı olarak maksimum değerlerine ulaşmıştır. Bu üç *Aspergillus* suşunun, ZKS’deki etkilerinin ortaya çıkardığı sonuçlar, genetik farklılıklarından dolayı kullandıkları metabolik yollara bağlanabilmektedir.

ZKS’de tannaz enziminin incelendiği iki çalışma mevcuttur. *Aspergillus niger* HA37’in kullanıldığı çalışmada toplam fenolik bileşik içeriğinin düşürülmesi ve ZKS’deki tannaz üretiminin sentetik ortam ile karşılaştırılması yapılmışken, *Aspergillus flavus* F2’in kullanıldığı

çalışmada ZKS'nin arıtılması hedeflenerek renk açılımı üzerinde durulmuştur. *Aspergillus niger* HA37, %25 ZKS'de tanenleri içeren fenolik bileşikler parçalamaya, spor oluşumu için geçen süreyi içeren gecikme fazından (24. saatten) sonra başlamıştır. Bu adaptasyon fazından sonra, 72 saatin sonunda fenolik bileşik içeriği 0.9 g/l'den 0.26'ya düşerek %71.11 giderim sağlamıştır ve 96 saate kadar aynı düzeyde kalmıştır (Aissam et al., 2005). Görüldüğü gibi suş *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265'ten daha yüksek bir toplam fenolik bileşik giderimi sağlamıştır. Buradan seyreltme seviyesinin artırılması ile toplam fenolik bileşik giderim yüzdesinin arttığı sonucu çıkarılmaktadır. *Aspergillus flavus* F2, %10 ZKS'de, 3. günün sonunda % 33 ve 6. günün sonunda %58 renk açılımı sağlamıştır (Kachouri et al, 2005). Yine bu suş da renk açılımında *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265'ten daha başarılı olmuştur. Buradan seyreltme seviyesinin artırılmasının, renk açılımını da teşvik ettiği sonucu çıkarılmaktadır. Seyreltmenin toplam fenolik bileşik giderimi ve renk açılımı üzerine ilerletici etkisi olmasına rağmen, atıksu hacmini artırdığı için, özellikle büyük ölçekteki uygulamalar için uygun değildir.

Hücre dışı tannaz aktivite değerleri, 1. gün ile 2. gün arasında 25 U/l ile 24 U/l arasında değişmemesi dışında sürekli olarak artmıştır. 3 günde 36 U/l, 4. günde 40 U/l ve 5. günde 54 U/l olmuştur. Hücre içi tannaz aktivitesi daima hücre dışı aktivite değerlerinden yüksek olmuş ve maksimum değerine 96. saatte (94 U/l) ulaşmıştır (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimdeki hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C.

Aspergillus suşlarının, ZKS ortamındaki tannaz sentezleme karakteristikleri spesifik olmaktadır. *Aspergillus niger* HA37 ve *Aspergillus flavus* F2’nin fiziksel ve kimyasal içeriği, seyreltme seviyesi ve besin elementleri farklı olan ZKS ortamlarındaki, tannaz üretim davranışı birbirinden farklı olmuştur. *Aspergillus niger* HA37’in, 120 devir/dakika ve 30°C koşullarında, ilk toplam fenolik bileşik derişimi; 3.2 g/l olan, ağırlıkça %0.35 (NH₄)₂SO₄ ve %0.065 K₂HPO₄ eklenmiş, %25 ZKS’deki 3 saatlik periyotlarda yapılan tayinlere göre; tannaz sentezine bağlı olarak tannaz aktivitesi (Bajpai and Patil, 1996) tespit edilmiştir. En yüksek tannaz aktivite değerine üretimin 27. saatte ulaşmış, 54 ile 60. saat arasındaki tayin edilebilen aktivite, 370 ile 650 U/l arasında değerler almıştır (Aissam et al., 2005). *Aspergillus flavus* F2’in, oda şartlarında ağız açık tutularak yükseltgenmesi sağlanan ve pirogallol eşdeğeri cinsinden ilk toplam fenolik bileşik derişimi; 15.89g/l olan ZKS’de optimize edilmiş üretim ortamı koşulları olan; 1g/l (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/l maya özütü ve 1g/l

glukoz eklenmiş, %10 ZKS’de, 120 devir/dakika ve 30°C’de tannaz aktivitesi (Sharma et al., 2000) ilk olarak üretimin 2. gününde tayin edilmiştir ve 3. günde en yüksek değeri olan 8000 U/l ‘ye ulaşarak, 6 gün boyunca 890 ile 8000 U/l arasında aktivite değerleri almıştır (Kachouri et al, 2005). Benzer şekilde, *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258, *Aspergillus foetidus var.pallidus* Ege-K 156 ve *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265’in hem hücre içi hem hücre dışı tannaz sentezleme davranışları farklılık arz etmiştir.

Aspergillus tubingensis Ege-K 265’in birim biyokütle başına giderilen fenolik bileşik değerleri, 0.013 ile 0.119 arasında değerler alırken; birim biyokütle başına hücre içi tannaz aktivitesi değerleri 2.41 ile 8.30 arasında değişmiştir. Hücre dışı tannaz aktiviteleri ise 25 ile 54 U/l arasında seyrederken, renk açılımı üretim sonunda %37.06’ya ulaşmıştır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile % 50 ZKS’de zamana karşı üretimin genel sonuçlar

Zaman (saat)	g giderilen fenolik bileşikler g ⁻¹ biyokütle	Renk açılımı (%)	Hücre dışı tannaz aktivitesi (U/l)	U hücre içi tannaz aktivite ünitesi g ⁻¹ biyokütle
24	0.060	1.86	25	8.19
48	0.033	3.61	24	6.52
72	0.013	0.99	36	5.40
96	0.119	35.53	40	8.30
120	0.118	37.06	54	2.41

Üç *Aspergillus* suşunun, ZKS’deki mikrobiyal üretimlerindeki farklılığının açıklanması adına, ince tabaka kromatografisine başvurulmuştur. Zamana karşı üretimlerin, hekzan/etil asetat /metanol (10.0:10.0:2.5, hacim/hacim/hacim) çözgen sistemindeki ince tabaka

Çizelge 4.10 *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258, *Aspergillus foetidus* var.*pallidus* Ege-K 156 ve *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile % 50 ZKS’de 5. günün sonundaki toplam fenolik bileşik giderimi (%), renk açılımı (%), maksimum hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerlerinin (U/l) karşılaştırılması

Mikroorganizma	Toplam fenolik bileşik giderimi (%)	Renk açılımı (%)	Tannaz aktivitesi (U/l)	
			Hücre içi	Hücre dışı
<i>Aspergillus aculeatus</i> Ege-K 258	34.75	10.11	59 (72. saat)	31 (96. saat)
<i>Aspergillus foetidus</i> var. <i>pallidus</i> Ege-K 156	45.19	0	54 (72. saat)	58 (120. saat)
<i>Aspergillus tubingensis</i> Ege-K 265	42.56	37.06	94 (96. saat)	54 (120. saat)

Çizelge 4.10’daki sonuçlar ile Çizelge 4.3’teki sonuçlar karşılaştırıldığında, ZKS’deki sonuçların aksine *Aspergillus foetidus* var.*pallidus* Ege-K 156, üretim ortamında % 48.31 renk açılımı sağlamışken, *Aspergillus aculeatus* Ege-K 258 ve *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ise sırası ile % 18.61 ve % 1.23 renk koyulaşmasına sebep olmuştur. Sentetik ortamda funguslar, %90 seviyelerinde toplam fenolik bileşik giderimi sağlamışken, ZKS’deki toplam fenolik bileşik giderimleri %45 seviyelerinde gerçekleşmiştir.

Aspergillus tubingensis Ege-K 265 ile tannaz enziminin ZKS’nin arıtımına olan etkisinin daha net ortaya konulabilmesi için tannaz üretimdeki kritik parametreler ZKS ortamında denenmiştir.

4.3 *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile Proses Parametrelerinin Tannaz Sentezine Etkisinin İncelenmesi

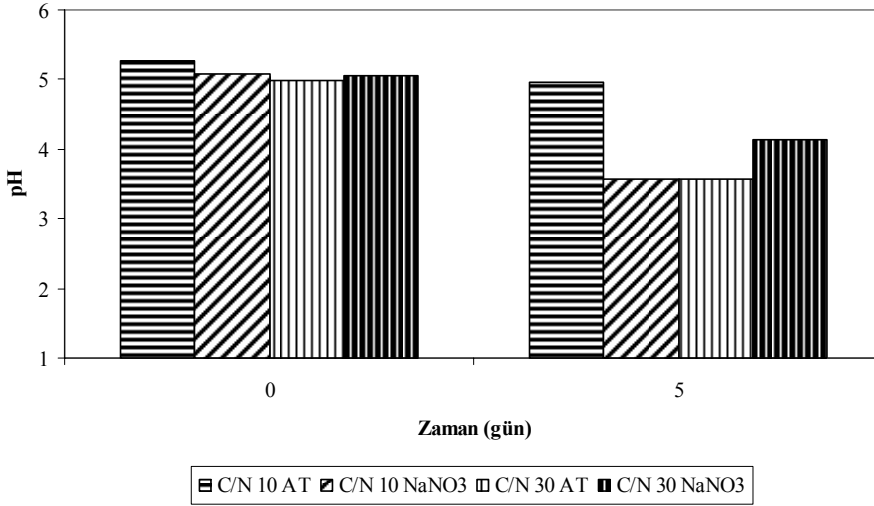
ZKS azotça fakir bir atıksudur ve yüksek C/N değerine sahiptir. Belirlenen C/N oranı 33.24’tür. ZKS’de etkili bir biyolojik arıtım sağlamak için, organik veya inorganik azot kaynakları ilave edildikten sonra, eklenen

azot kaynağının miktarına göre ZKS'nin C/N değeri azalmaktadır. Ancak ZKS'nin arıtımında C/N değerinin etkisi, diğer parametrelere göre üzerinde fazla durulmamış bir noktadır. Literatürde C/N değerinin etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, her mikroorganizma için, hedeflenen metabolite göre değişen bir optimum C/N değeri ve bu C/N değerinde en iyi sonucu veren azot ve karbon kaynakları olduğu görülmektedir (Casas López et al., 2003; Dharani Aiyer, 2004; Santa Anna et al., 2002). ZKS'de farklı C/N oranlarının ve azot kaynaklarının denenmesindeki amaç, renk açılımı, fenolik bileşik giderimi ve tannaz aktivitesine olan etkinin ortaya konmasıdır.

4.3.1 *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile Farklı C/N Oranlarında Tannaz Aktivitesine Azot Kaynaklarının Etkisinin Karşılaştırılması

Daha önce de bahsedildiği gibi NaNO_3 , tannaz üretimi için en çok tercih edilen azot kaynağıdır (Çizelge 2.17) ve *Aspergillus japonicus* ile gerçekleştirilen tannaz üretiminde diğer azot kaynaklarına göre daha yüksek tannaz aktivitesini veren azot kaynağı olduğu bildirilmiştir (Bradoo et al., 1997). Güngör, (2004)'te sunulan çalışmanın sonuçlarında ise 1:1 oranındaki amonyum tuzları karışımının $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, üretim ortamında bulunmasının, biyokütle miktarı ve toplam fenolik bileşik giderimine etkisi ortaya konulduğundan, NaNO_3 ve AT azot kaynağı olarak kullanılarak farklı C/N değerlerinin tannaz enzimi üretimi üzerine etkisi araştırılmış ve toplam fenolik bileşik giderimi ve renk açılımı ile olan ilişkinin aydınlatılması hedeflenmiştir. Üç *Aspergillus* suşu arasından seçilen *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265'in (spor sayısı 4.0×10^7 adet/ml) % 50 ZKS'deki üretimlerde C/N 10 ve C/N 30 kullanılmıştır.

Üretim ortamı pH değeri tannaz üretimi için kullanılmış olan pH değer aralığına düştüğü için, zamana karşı üretimlerde olduğu gibi pH ayarlaması yapma gereği duyulmamıştır.



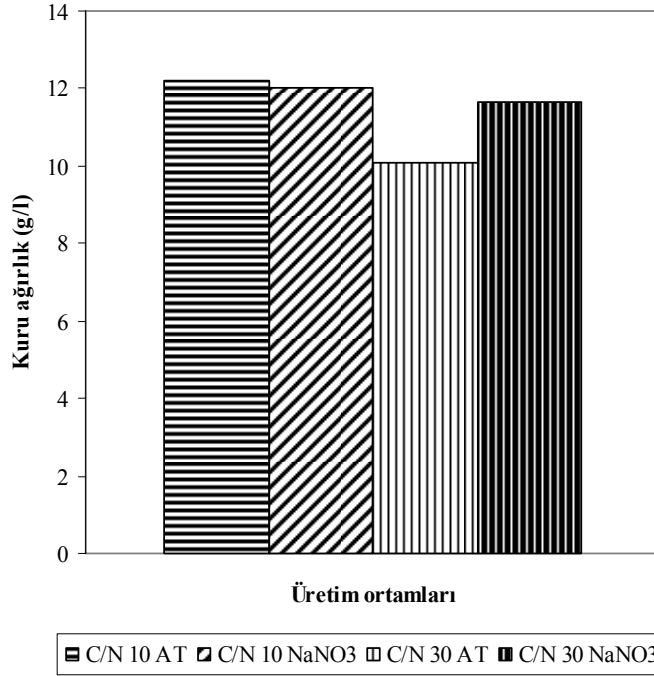
Şekil 4.23 Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde pH değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C

* AT: Amonyum tuzları.

Üretim ortamlarının 5. gün sonundaki pH değerleri; 3.56 ile 4.99 arasında değişmiştir (Şekil 4.23). AT tuzlarının eklendiği ortamların ilk ve son pH değerlerinin NaNO₃ eklenen ortamlara göre daha yüksek olmuştur. Bunun sebebi, AT'nin yapılarında bulunan (NH₄)⁺ katyonunun, bazik karakterde olmasına bağlanmaktadır.

Üretim sonunda (5. gün) sonundaki kuru ağırlık değerleri Şekil 4.24'te verilmiştir. *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile yapılan zamana karşı üretimde, 5. günün sonunda kuru ağırlık değeri 12.05 g/l iken, benzer şekilde C/N 10'da NaNO₃'nın eklenen ortamda 12.03 g/l olmuştur. En

yüksek kuru ağırlık değeri (12.21 g/l) AT'nın eklendiği C/N 10 olduğu ortamda ve en düşük kuru ağırlık değeri (10.07 g/l) ise AT'nın eklendiği C/N 30 olduğu ortamda elde edilmiştir. NaNO_3 'nın eklendiği C/N 30 olduğu ortamdaki kuru ağırlık değeri ise 11.64 g/l olmuştur.

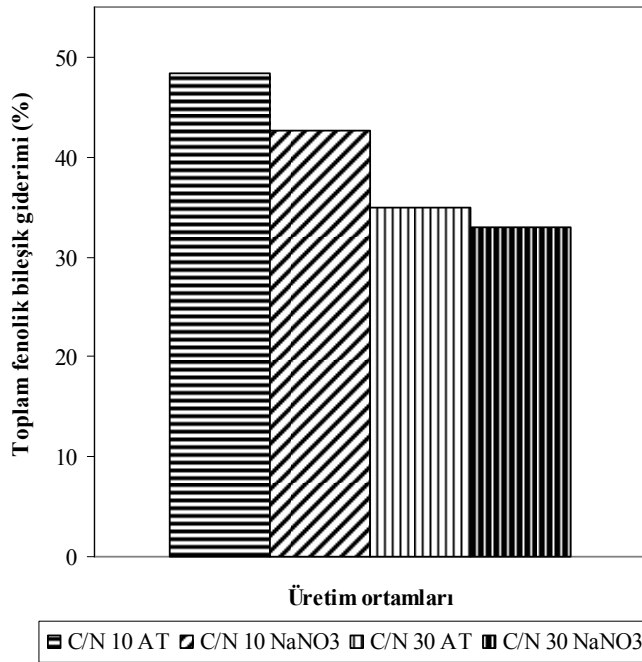


Şekil 4.24 Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde kuru ağırlık değerleri (g/l), 200 devir/dakika, 28 °C.

Biyokütlenin kabul edilmiş kimyasal formülü $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2\text{P}_{0.074}$ 'tür (Droste, 1997). Biyokütlenin genel formülünde, karbon, azot ve oksijenin yanında fosfat da yer almaktadır ve C/N 10 olduğu, AT eklenen ortamda biyokütlenin teşvik edilmesinin sebebi buna bağlanabilir.

Aspergillus tubingensis Ege-K 265 ile yapılan zamana karşı üretimde, toplam fenolik bileşik derişimi 5. günün sonunda 3.36 g/l'den 1.93 g/l'ye

düşerek % 42.56 toplam fenolik bileşik giderimi sağlamıştır. C/N oranının etkisinin incelendiği üretim ortamlarının başlangıç toplam fenol derişimi 3.28 g/l'dir. Benzer şekilde NaNO_3 'nın eklendiği C/N 10 olduğu ortamda, 1.88 g/l'ye düşerek fenolik bileşik giderimi % 42.68 olmuştur. 5. günün sonunda AT'nın eklendiği, C/N 10 olduğu ortamda, 1.66 g/l'ye düşerek %48.39; C/N 30 olduğu ortamda, 2.14 g/l'ye düşerek % 34.87; NaNO_3 'nın eklendiği C/N 30 olduğu ortamda, 2.20 g/l'ye düşerek % 32.93 toplam fenolik bileşik giderimi gerçekleşmiştir (Şekil 4.25).

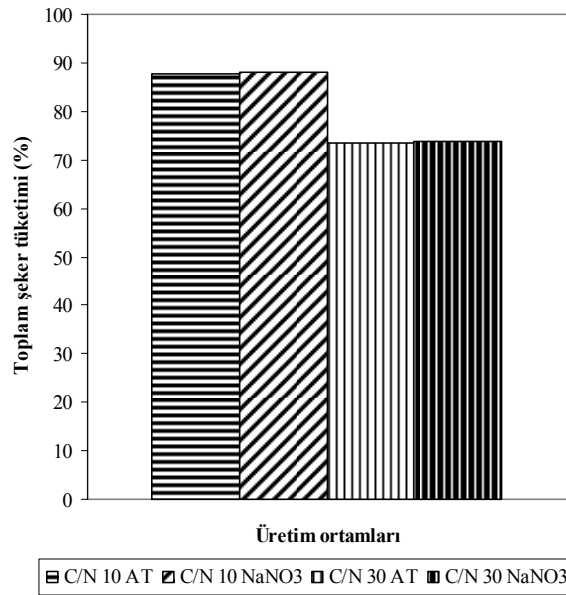


Şekil 4.25 Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde toplam fenolik bileşik giderimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C.

C/N değerinin 10 olduğu üretim ortamları C/N 30 olan üretim ortamlarından yüksek toplam fenolik bileşik giderim değerleri vermiştir. *Aspergillus niger* A10 suşu, C/N 6.67 olduğu, ilk fenol içeriği 18.20 g/l

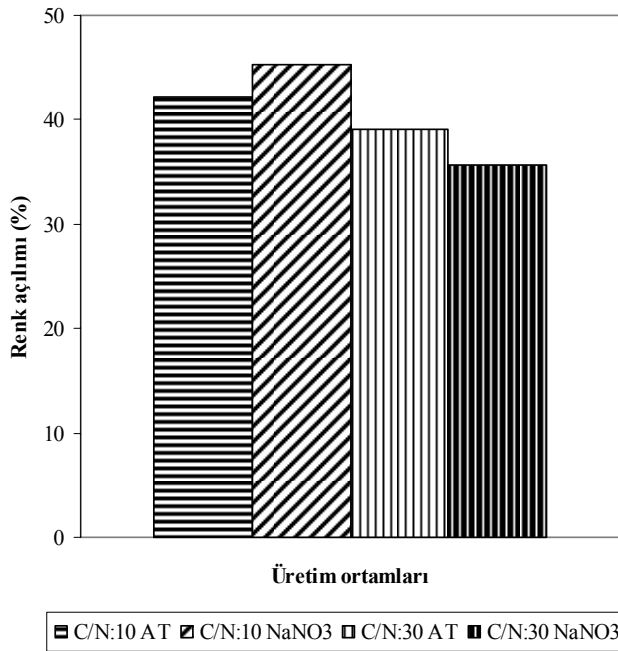
olan %100 ZKS’de steril edilmemiş durumda % 57.80 fenolik bileşik giderimi sağlamıştır. Seyreltilmemiş koşullarda, toplam fenolik bileşik gideriminin daha düşük olması beklenirken, daha yüksek olmasının sebebi suşun genetik özelliklerinden ve ZKS’nin içeriğinden kaynaklanabilmektedir (Hamdi et al., 1991).

Aspergillus tubingensis Ege-K 265’in üretim ortamında toplam şeker tüketimi, üretim ortamının C/N değerinin 10 olduğu koşullarda azot kaynağının farkından önemli ölçüde etkilenmemiş ve AT eklenen ortamda % 86.10 ve NaNO_3 ’nin eklendiği ortamda % 88.13 oranında gerçekleşmiştir. Benzer sonuçlar C/N 30 olan üretim ortamlarında da elde edilmiş, ancak toplam şeker tüketimi AT kullanıldığında % 73.39, NaNO_3 kullanıldığında ise % 73.70 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde toplam şeker tüketimi (%), 200 devir/dakika, 28 °C.

Aspergillus tubingensis Ege-K 265 ile yapılan zamana karşı üretimde, 5. günün sonundaki renk açılımı, %37.06 olmuştur. C/N oranının etkisinin incelendiği üretim ortamlarının renk açılımı değerleri, AT'nın eklenen ortamlarda, C/N 10'da % 42.15, C/N 30'da %39.15; NaNO₃'nın eklenen ortamlarda, C/N 10'da %45.21, C/N 30'da %35.62 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.27).

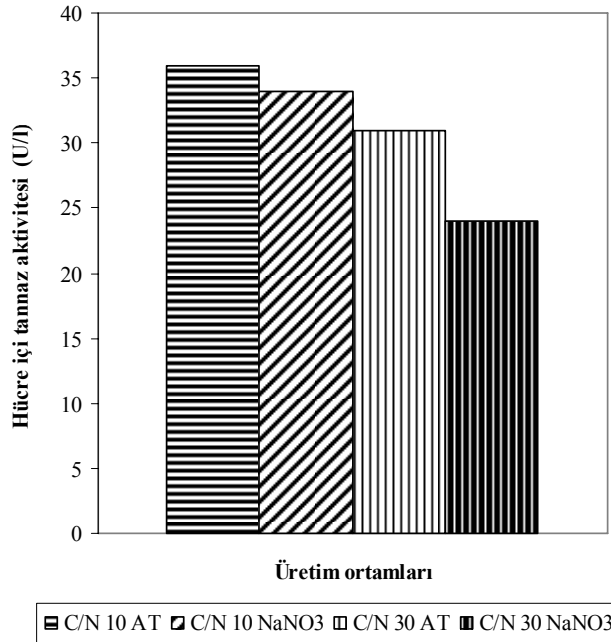


Şekil 4.27 Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde renk açılımı (%), 200 devir/dakika, 28 °C.

Aspergillus tubingensis Ege-K 265 ile %50 ZKS'deki renk açılımı 5. günün sonunda en fazla %45.21 iken, *Aspergillus flavus* F2 ile optimizasyonu yapılmış üretim ortamında, azot kaynağı olarak ağırlıkça %0.1 (NH₄)₂SO₄ ve %0.05 maya özütü eklenmiş, C/N 5.28 olan %10 ZKS'de, 6.günün sonunda %58 olduğu bildirilmiştir (Kachouri et al,

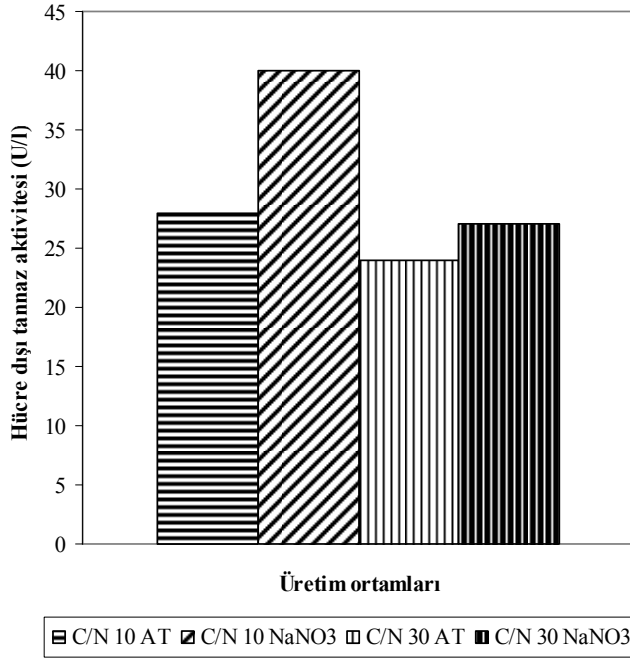
2005). Bu değer, üretim süresinin 1 gün ve seyreltme seviyesinin 5 kat arttığı düşünöldüğünde *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265'in ön arıtım işleminde etkin olarak kullanılabilcek bir suş olduğunu göstermektedir.

Aspergillus tubingensis Ege-K 265 ile yapılan zamana karşı üretimde, 5. günün sonunda hücre içi tannaz aktivite değeri; 29 U/l olarak bulunmuştur. Benzer şekilde NaNO_3 'nın eklendiğı C/N10 olduğı ortamda 34 U/l olmuştur. Diğer hücre içi tannaz aktivite değeri, AT'nin eklenen ortamlarda, C/N:10'da 36 U/l, C/N:30'da 31 U/l; NaNO_3 'nın eklenen C/N:30 olduğı ortamda, 24 U/l olarak belirlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28 Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde hücre içi tannaz aktivite değeri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C.

Aspergillus tubingensis Ege-K 265 ile yapılan zamana karşı üretimde, 5. günün sonunda hücre dışı tannaz aktivite değerleri Şekil 4.29'da verilmiştir.



Şekil 4.29 Farklı azot kaynaklarının ve C/N oranının etkisinin incelenmesinde hücre dışı tannaz aktivite değerleri (U/l), 200 devir/dakika, 28 °C.

Şekil 4.28'de görüldüğü gibi, NaNO₃'nin eklendiği C/N 10 olduğu ortamdaki hücre dışı tannaz aktivite değeri en yüksek değere sahiptir.

C/N 10 olduğu üretim ortamları, toplam fenolik bileşik giderimi ve renk açılımı açısından, C/N 30 olduğu ortamlarına göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerleri 5. günün sonunda 24 U/l ile 40 U/l arasında değişmektedir (Çizelge 4.11). Bu sebeple bir sonraki basamakta, için C/N 10 olduğu ortamlar seçilmiştir. Aynı zamanda C/N 10 tannaz üretimi için sıklık ile kullanılan üretim ortamının C/N oranıdır.

Çizelge 4.11 *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265'in 5. gün sonundaki toplam fenolik bileşik giderimi (%), renk açılımı (%), hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerlerinin (U/l) karşılaştırılması.

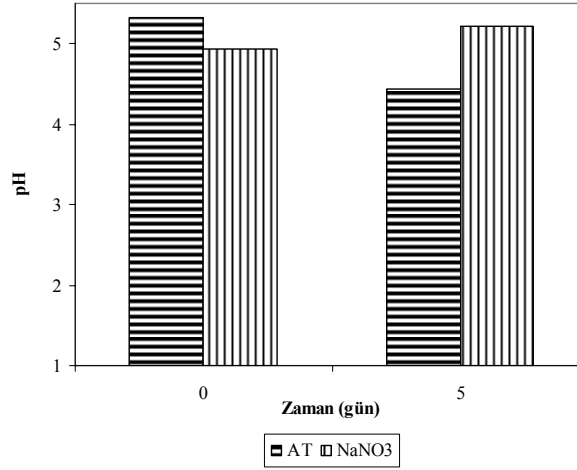
		C/N 10		C/N 30	
		AT	NaNO ₃	AT	NaNO ₃
Toplam fenol bileşik giderimi (%)		48.39	42.68	34.87	32.93
Renk açılımı (%)		42.15	45.21	39.15	35.62
Tannaz aktivitesi (U/l)	Hücre içi	36	34	31	24
	Hücre dışı	28	40	24	27

C/N oranının ve azot kaynaklarının etkisinin incelendiği örneklerle ait ince tabaka Kromotografisi fotoğrafları, Şekil 4.30, ve 4.31'de verilmiştir. Buna göre; gallik asit tatbiki yapılan bütün örneklerde bulunmaktadır. Kafeik asit ise, NaNO₃'nin eklendiği C/N 10 olduğu ortam 0. saat örneğinde daha yoğun miktarda bulunmaktadır. Bunun sebebi tatbik sırasında o örneğin daha yoğun tatbit edilmesinden kaynaklanmaktadır. NaNO₃'nin eklendiği ortamlarda 5 günlük üretimler sonunda gallik asit yoğunluğu azalmıştır. AT'nin eklendiği C/N 10 olduğu ortam 5. gün örneğinde, metil galatlin metabolize edildiği anlaşılmaktadır. AT'nin eklendiği C/N 30 olduğu ortam 5. gün örneğinde, gallik asit ve metil gallat yoğunluğu artmıştır.

belirlemiştir. Bu çalışmanın bu bölümünde üretim ortamına TA eklenerek tannaz enziminin sentezinin artırılması ve bu sayede ZKS'nin toplam fenolik bileşik içeriğine ve renk açılımı üzerine olan etkisi incelenmiştir.

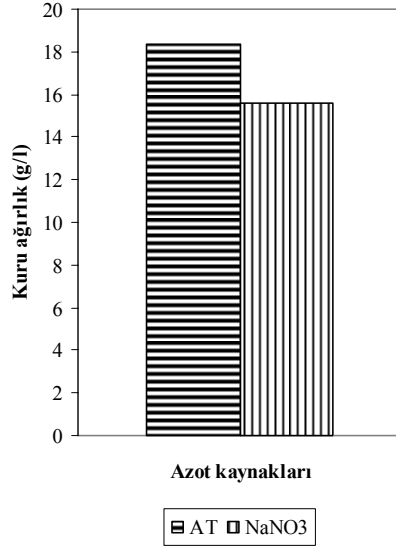
Bu amaç ile ZKS'nin tanen derişimi ihmal edilerek, derişik TA çözeltisinden, toplam 50 ml hacimde %1.0 TA içerecek şekilde, steril edilmiş erlenlere, aseptik koşullarda derişik TA çözeltisinden eklenmiştir. TA'in üretim ortamına eklenmesi ile ZKS'nin renginde gözle görülür bir renk açılması olmuştur. Bunun nedeni, tanenlerin proteinleri çöktürme ve bazı karbonhidratlar ile bağ oluşturma yeteneğine bağlanabilmektedir (www.ansci.cornell.edu). ZKS'nin %1.0 TA içermesinin, tannaz aktivitesine yaptığı etkiyi ve dolayısı ile renk açılması ve toplam fenolik bileşik giderimindeki etkisini tayin etmek amacı ile *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 ile (spor sayısı 2.8×10^7 adet/ml) C/N 10 olduğu, AT veya NaNO_3 'nın eklenmiş ortamlarda 5 gün boyunca, 200 devir/dakika ve 28 °C'de üretimler gerçekleştirilmiştir. 5 günün sonunda, pH, kuru ağırlık, toplam fenolik bileşik miktarı, renk, toplam şeker, hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivitesi analizleri yapılmıştır.

Üretim ortamlarının 5. gün sonundaki pH değişimi, Şekil 4.32'de verilmiştir. AT'nin eklendiği ortamda pH değerleri; pH 5.33'den 4.43'ya inmişken, NaNO_3 'nın eklendiği ortamdaki pH değerleri; pH 4.93'dan 5.21'ye çıkmıştır.



Şekil 4.32 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması pH değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C.

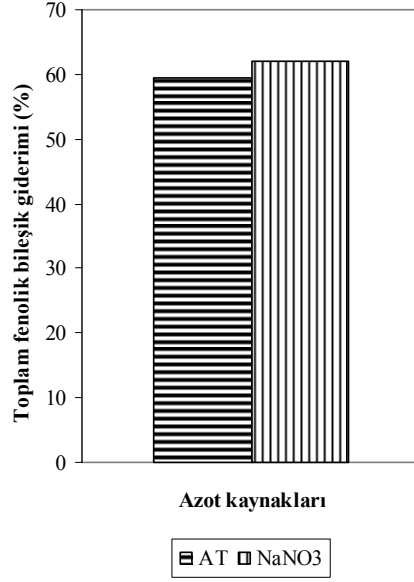
C/N 10 olduğu üretim ortamlarındaki kuru ağırlık değerleri AT'nın eklendiğinde 12.21 g/l ve NaNO₃'nın eklendiğinde 12.03 g/l ve olmuştur. %1.0 TA içeren ZKS ortamlarındaki 5. günün sonundaki kuru ağırlık değerleri ise AT'nın eklendiği ortamda; 18.35 g/l; NaNO₃'nın eklendiği ortamda; 15.61 g/l olarak bulunmuştur (Şekil 4.33).



Şekil 4.33 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması kuru ağırlık değerleri (g/l), değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C.

ZKS'ye TA eklenmesi, aynı C/N oranında AT'nın eklendiği ortamda biyokütleyi, NaNO₃'nin eklendiği ortamdakine göre daha fazla teşvik etmiştir.

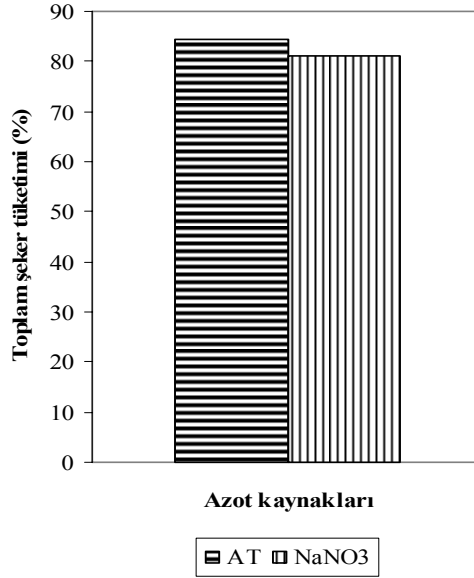
Toplam fenolik bileşik değerleri; AT'nın eklendiği ortamda 5.06 g/l'den 2.01 g/l'ye düşerek %60.28; NaNO₃'nin eklendiği ortamda ise 5.06 g/l'den 1.96 g/l'ye düşerek % 61.26 toplam fenolik bileşik giderimi elde edilmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.34 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'nın indüktör etkisinin karşılaştırılması toplam fenolik bileşik giderimi (%) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C.

TA'nın ortama eklenmesi ile birlikte ZKS'nin toplam fenolik bileşik içeriğinde doğal olarak bir artış meydana gelmiştir. C/N 10 olduğu NaNO₃'nin eklendiği ortamda % 42.68 ve AT'nin eklendiği ortamda %48.39 olan fenolik bileşik giderimi, sırası ile %62.09'a ve %59.39'a yükselmiştir.

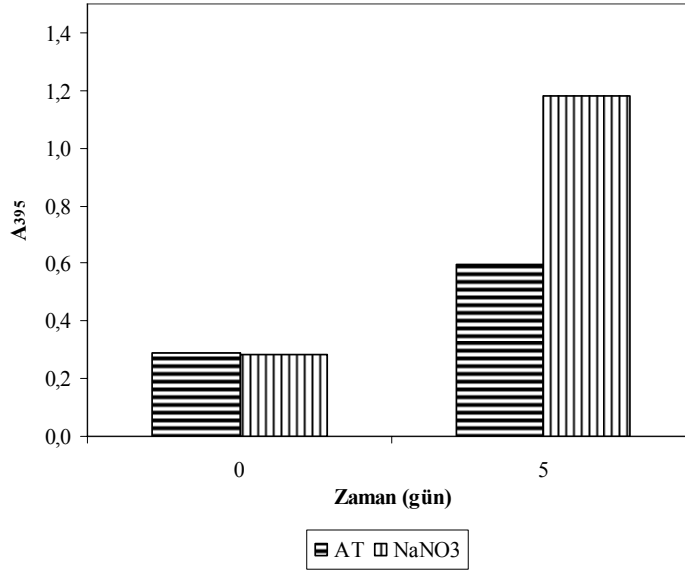
AT'nin eklendiği ortamda toplam şeker değerleri; 16.82 g/l'den 2.65 g/l'ye düşerek %84.46; NaNO₃'nin eklendiği ortamdaki toplam şeker değerleri; 16.82 g/l'den 3.18 g/l'ye düşerek % 81.09 toplam şeker tüketimi elde edilmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması toplam şeker tüketimi (%) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C.

C/N 10 olduğu NaNO₃'nin eklendiği ortamda % 88.13 ve AT'nin eklendiği ortamda % 87.76 olan toplam şeker tüketimi benzer değerler vererek sırası ile % 81.09 ve %84.46 olarak aynı aralıkta kalmıştır.

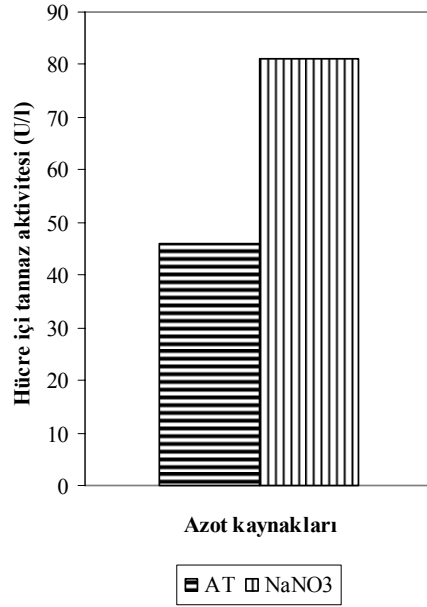
%1.0 TA içeren, %50 ZKS'nin 395 nm'deki başlangıç absorbans değerleri AT'nin eklendiği ortamda; 0.289 ve NaNO₃'nin eklendiği ortamda; 0.282 olmuştur. 5 günlük üretim sonunda, renk açılması sağlanamamıştır ve absorbans değerleri AT'nin eklendiği ortamda; 0.598'e ve NaNO₃'nin eklendiği ortamda; 1.182'ye yükselmiştir (Şekil 4.36).



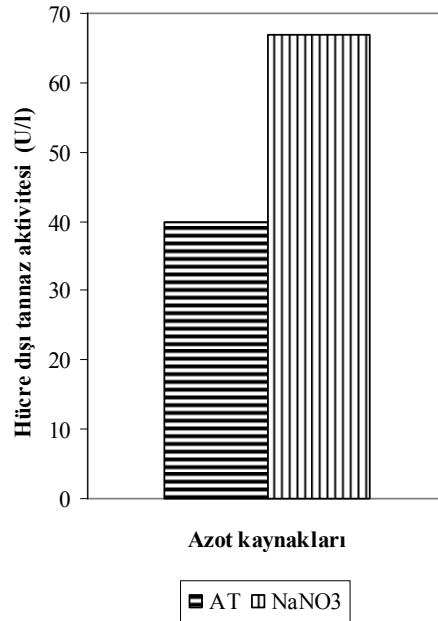
Şekil 4.36 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'nın indüktör etkisinin karşılaştırılması A₃₉₅ değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C.

Absorbanstaki artış, başlangıçta TA eklenmesi ile kompleks oluşturan karbonhidrat ve çökelen proteinlerin metabolize edilmesi ile oluşan ürünlerinin çözünabilen renk koyulaştırıcı bileşikler olmasından kaynaklanabilmektedir.

Hücre içi ve hücre dışı tannaz aktivite değerleri sırası ile AT'nin eklenen ortamda, 46 U/l ve 40 U/l; NaNO₃'nin eklenen ortamda, 81 U/l ve 67 U/l olmuştur (Şekil 4.37 ve Şekil 4.38).



Şekil 4.37 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması hücre içi tannaz aktivitesi değerleri (U/l), 200 çalkalama hızı, 28 °C.



Şekil 4.38 C/N 10 oranında azot kaynakları ile %1.0 TA'in indüktör etkisinin karşılaştırılması hücre dışı tannaz aktivitesi değerleri (U/l), 200 çalkalama hızı, 28 °C.

ZKS'nin %1.0 TA içermesi ile hücre içi tannaz aktivite değerleri, NaNO_3 'nın eklendiği ortamda 40 U/l'den 81 U/l'ye yükselerek 2.02 kat, AT'nin eklendiği ortamda 28 U/L'den 46 U/l'ye yükselerek 1.64 kat artmışken, hücre dışı tannaz aktivite değerleri, NaNO_3 'nın eklendiği ortamda 40 U/l'den 67 U/l'ye yükselerek 1.68 kat, AT'nin eklendiği ortamda 28 U/l'den 40 U/l'ye yükselerek 1.43 kat artmıştır.

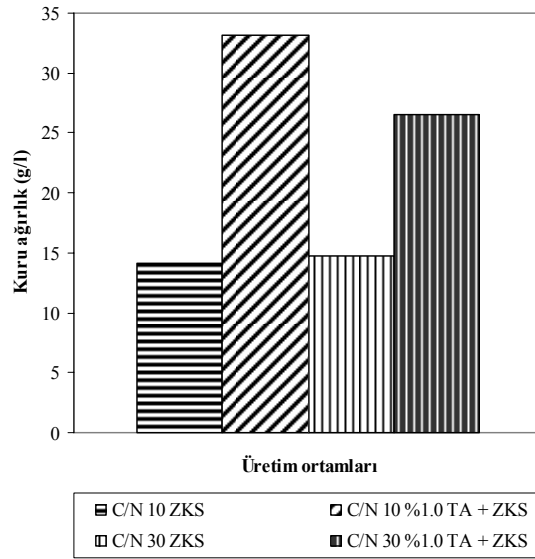
C/N oranının ve %. TA'in etkisinin karşılaştırıldığı verim sonuçları Çizelge 4.12'de verilmiştir. g biyokütle başına hesaplanan verim sonuçlarına göre, Ortam 6, giderilen fenolik bileşikler ve hücre içi tannaz aktivitesi olarak en iyi verim sonuçlarına sahiptir. g biyokütle başına tüketilen toplam şeker miktarı ise 0.772 ile 1.173 arasında değişmektedir.

Çizelge 4.12 %50 ZKS'de C/N oranı ve %1.0 TA'in etkisinin incelenmesinde verim hesaplaması sonuçları

Üretim ortamları	g giderilen fenolik bileşikler g^{-1} biyokütle	Renk açılımı (%)	Hücre dışı tannaz aktivitesi (U/l)	U hücre içi tannaz aktivite ünitesi g^{-1} biyokütle
Ortam 1	0.133	42.15	28	2.94
Ortam 2	0.116	45.21	40	2.82
Ortam 3	0.113	39.15	24	3.08
Ortam 4	0.093	35.62	27	2.06
Ortam 5	0.160	0.00	40	2.51
Ortam 6	0.198	0.00	67	5.19

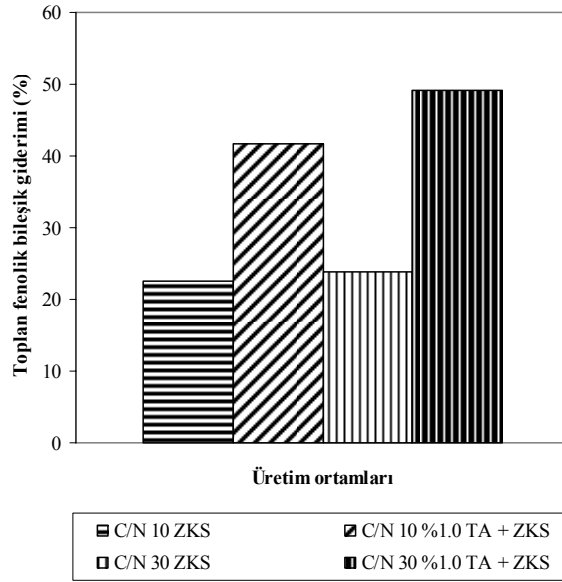
* Ortam 1: AT eklenmiş %50 ZKS (C/N: 10); Ortam 2: NaNO_3 eklenmiş %50 ZKS (C/N 10); Ortam 3: AT eklenmiş %50 ZKS (C/N: 30); Ortam 4: NaNO_3 eklenmiş %50 ZKS (C/N: 30); Ortam 5: %1.0 TA içeren AT eklenmiş %50 ZKS (C/N: 10); Ortam 6: %1.0 TA içeren NaNO_3 eklenmiş %50 ZKS (C/N 10).

Üretim ortamına indüktör olması amacı ile TA ilave edilmesi, tannaz aktivitelerinin artmasına yol açıp, başlangıç toplam fenolik bileşik miktarındaki artışa rağmen toplam fenolik bileşik gideriminin %62.09 ve



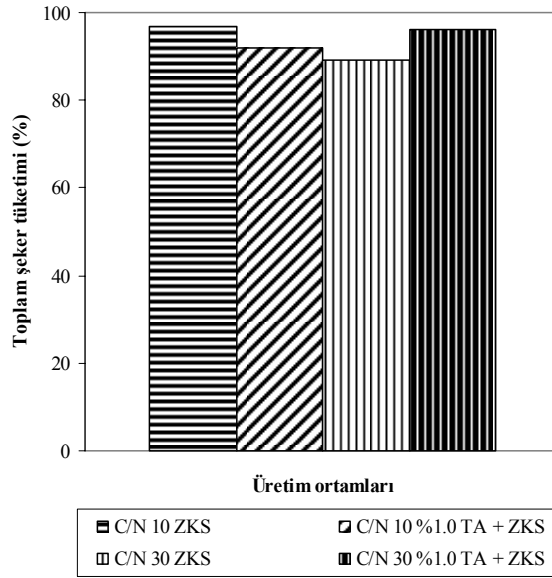
Şekil 4.42 Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki kuru ağırlık (g/l) değerleri, 200 çalkalama hızı, 28 °C.

Üretim ortamlarının başlangıç toplam fenolik bileşik derişimi ZKS için; 3.05 g/l, %1.0 TA içeren ZKS için ise 6.49 g/l'dir. 5. günün sonunda C/N 10 olduğu ZKS'de 2.36 g/l'ye düşerek %22.62; C/N 30 olduğu ZKS'de, 2.32 g/l'ye düşerek % 23.93, C/N 10 olduğu %1.0 TA içeren ZKS'de 3.78 g/l'ye düşerek % 41.75, C/N 30 olduğu %1.0 TA içeren ZKS'de 3.30 g/l'ye düşerek % 48.92 toplam fenolik bileşik giderimi sağlamıştır (Şekil 4.43).



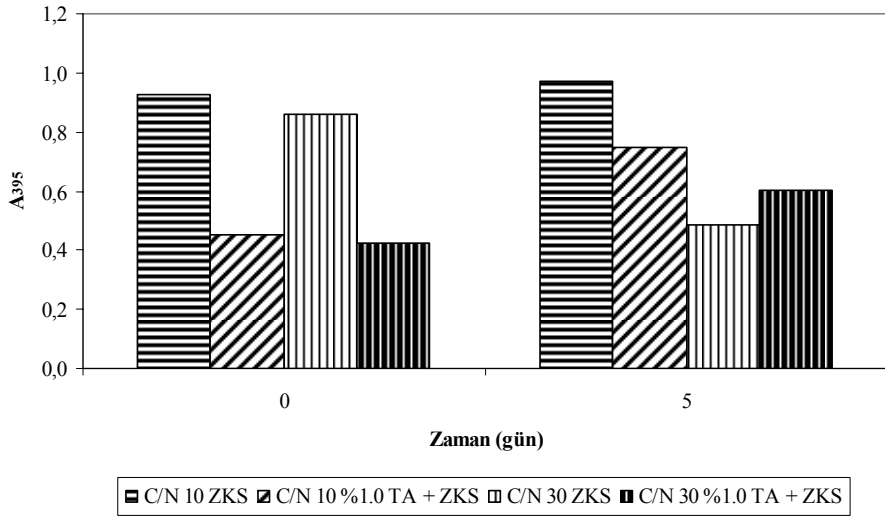
Şekil 4.43 Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki toplam fenolik bileşik giderimi (%), 200 çalkalama hızı, 28 °C.

Üretim ortamlarının başlangıç toplam şeker derişimi 16.38 g/l'dir. 5. günün sonunda C/N 10 olduğu ZKS'de 0.54 g/l'ye düşerek %96.70, C/N 30 olduğu ZKS'de, 1.77 g/l'ye düşerek % 89.19, C/N 10 olduğu %1.0 TA içeren ZKS'de 1.32 g/l'ye düşerek % 91.94, C/N 30 olduğu %1.0 TA içeren ZKS'de 0.62 g/l'ye düşerek % 96.21 toplam şeker tüketimi gerçekleşmiştir (Şekil 4.44).



Şekil 4.44 Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki toplam şeker tüketimi (%), 200 çalkalama hızı, 28 °C.

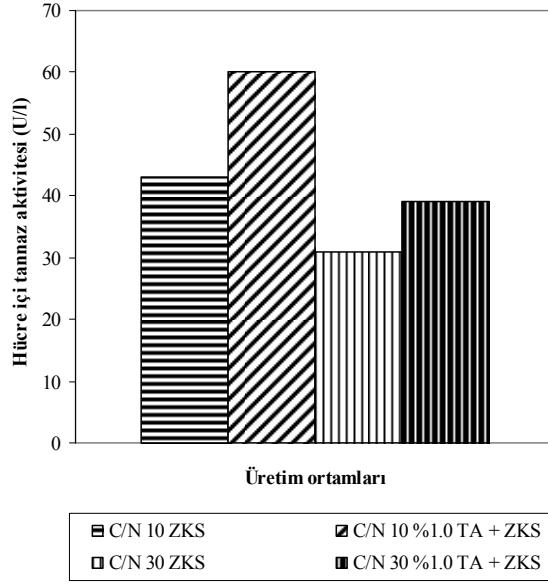
C/N 30 olduğu ZKS haricinde, diğer üretim ortamlarının 5. günün sonunda rengi koyulaşmıştır. C/N 10 olduğu ZKS'de 395 nm'deki absorbans değeri, 0.925'den 0.970'e, C/N 10 olduğu %1.0 TA içeren ZKS'de 0.454'den 0.750'ye, C/N 30 olduğu %1.0 TA içeren ZKS'de 0.424'den 0.603'e yükselmişken, C/N 30 olduğu ZKS'de 0.857'den 0.488'e düşülerek, %43.06 renk açılımı sağlamıştır (Şekil 4.45).



Şekil 4.45 Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesindeki A_{395} değerleri, 200 çalkalama hızı, 28 °C.

Yoğun spor süspansiyonunun artım verimliliğini düşürdüğü sonucu çıkarılabilmektedir. Spor süspansiyonun 10^8 adet/ml'nin üstüne çıkmaması ön artımın etkinliğini sağlayacaktır.

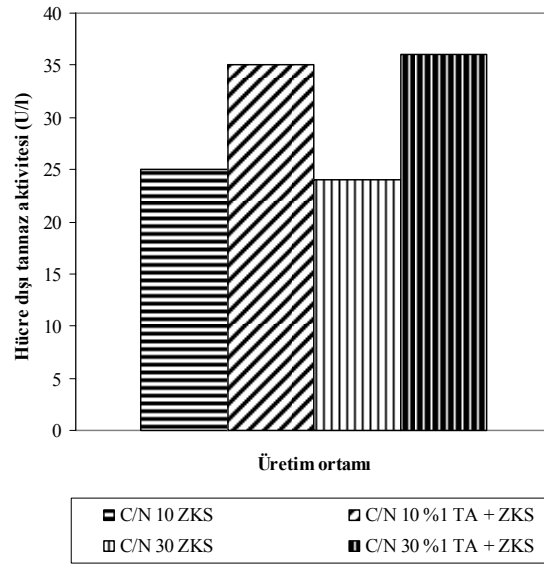
Hücre içi tannaz aktivite değerleri, C/N 10 olduğu ZKS'de 43 U/l C/N 10 olduğu ZKS'de 31 U/l, C/N 10 olduğu %1.0 TA içeren ZKS'de 60 U/l, C/N 30 olduğu %1.0 TA içeren ZKS'de 39 U/l olmuştur (Şekil 4.46).



Şekil 4.46 Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesinde hücre içi tannaz aktivitesi (U/l) değerleri, 200 çalkalama hızı, 28 °C.

TA eklenmesi hücre içi tannaz aktivitelerinde, C/N 10'da 1.39, C/N 30'da 1.26 kat artışa sebep olmuştur.

Hücre dışı tannaz aktivite değerleri, C/N 10 olduğu ZKS'de 25 U/l, C/N:30 olduğu ZKS'de 24 U/l, C/N:10 olduğu %1.0 TA içeren ZKS'de 35 U/l, C/N:30 olduğu %1.0 TA içeren ZKS'de 36 U/l olmuştur (Şekil 4.47).



Şekil 4.47 Farklı C/N oranında %1.0 TA'in ve spor süspansiyonunun etkisinin incelenmesinde hücre dışı tannaz aktivitesi (U/l) değerleri, 200 devir/dakika, 28 °C.

TA eklenmesi hücre dışı tannaz aktivitelerinde, C/N:10'da 1.39, C/N:30'da 1.50 kat artışa sebep olmuştur.

Spor süspansiyonunun ve %1.0 TA'in etkisinin incelenmesindeki verim sonuçları Çizelge 4.13'te verilmiştir. g biyokütle başına hesaplanan verim sonuçlarına göre, Ortam 1, hücre içi tannaz aktivitesi olarak en iyi verim sonucunu vermiştir. Tüketilen toplam şeker miktarı 0.453 ile 1.122 ve giderilen fenolik bileşikler 0.049 ile 0.120 arasında değişmektedir.

enzimleri ile beraber özellikle beyaz çürükçül funguslar ile yapılan çalışmalarda üzerinde en çok durulan enzimdir (Yesilada et al., 1999; Robles et al., 2000b). Bu enzimin düşük derişimlerde üretilebileceği ve hücre bağlantılı olabileceğine ilişkin bilgi de mevcuttur (Jaouani et al., 2003).

Aspergillus aculeatus Ege-K 258, *Aspergillus foetidus* var. *pallidus* Ege-K 156 ve *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265'in lignin benzeri bileşikleri parçalama yeteneklerinin değerlendirilmesi için, kağıt endüstrisinde üretilen sentetik veya endüstriyel lignin olarak bilinen Indulin AT'nin tek karbon kaynağı olduğu, ağırlıkça % 0.05 Indulin AT ve % 2.0 bakteriyolojik agar eklenmiş, Czapek-Dox minimal ortamına nokta ekimler yapılmıştır. 2. günün sonunda 28 °C'de inkübe edilen petrilere, nokta ekim yapılan bölgenin etrafında fungus gelişimi tespit edilmiştir ve 7 güne uzatılan inkübasyonda göz ile fark edilecek bir değişim olmamıştır. Ligninolitik enzimlerin çoğunlukla hücre dışı olduğu bilinmektedir. Fakat literatürde hücre içi bulunan lakkazların da var olduğuna dair bulgular mevcuttur. *Neurospora crass*'a ait olan hücre içi lakkaz ile birlikte hücre dışı lakkazın da varlığı tespit edilmiştir ve hücre içi lakkazın hücre dışı lakkaz için prekürsör fonksiyonu gösterdiği ve iki lakkaz arasında bulundukları yer dışında herhangi bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (Froehner and Eriksson, 1974; Schlosser et al., 1997; Bar, 2001). Bu sonuçlar ışığında, üç fungusun da sentetik lignini parçalama yeteneğinde olduğu ve kültür filtratında daha önce tespit edilmemiş olan ligninolitik enzim aktivitesinin (Güngör, 2004), hücre duvarı bağlantılı olarak sentezlenmiş olabileceği sonucuna varılmıştır.

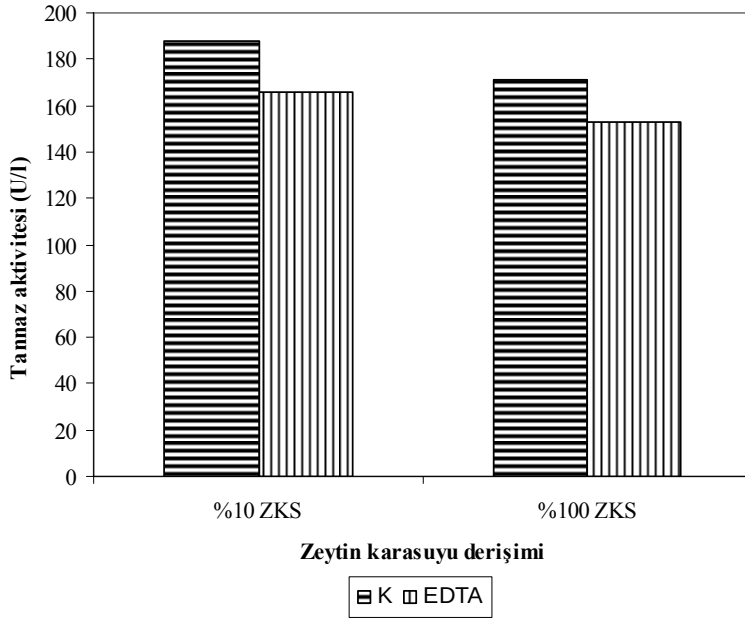
4.4 Ticari Enzim Preparatlarının Uygulanması

4.4.1 Zeytin Karasuyuna EDTA'nın Uygulanması

Selatlama, pozitif yüklü metal iyonlarının büyük bir molekülce tutulmasıdır. En yaygın kullanılan selatlama molekülü; EDTA'dır. EDTA'nın periyodik cetveldeki hemen hemen her pozitif yüklü iyon ile selat oluşturma yeteneği vardır (www.benbest.com).

ZKS'ye EDTA'nın uygulanmasında, ZKS'de özellikle tannazın aktivitesini azaltan herhangi bir inhibitörün, EDTA ile kompleks oluşturması hedeflenmiştir. ZKS'ye ticari tannaz preparatının uygulamasına geçmeden önce ZKS bünyesinde bulunan ve enzime inhibitif etki yapabilecek metal iyonlarının varlığı araştırılmış ve ZKS'nin 10 kat seyreltmesi ile oluşan etkinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. EDTA uygulanmış ve EDTA uygulanmamış, %100 ve % 10 ZKS'ye %1.0 (ağırlık/hacim) tannaz eklenip, su banyosunda 1 saat inkübe edildikten sonraki tannaz aktivite sonuçları verilmiştir.

0. saatteki tannaz aktivite değeri, 195 U/l'dir. 1. saatin sonundaki aktivite değerleri, EDTA uygulanmış %100 ve % 10 ZKS için sırası ile 153 U/l ve 166 U/l; EDTA uygulanmamış %100 ve % 10 ZKS için sırası ile 171 U/l ve 188 U/l olmuştur (Şekil 4.50).



Şekil 4.50 %10-100 ZKS'ye EDTA'nın uygulanmasında tannaz aktivitesi (U/l), 45 °C, su banyosu.

* K: Kontrol, EDTA uygulanmamış ZKS

EDTA'nın farklı mikrobiyal kaynaklardan elde edilmiş olan tannazlara olan etkisi değişken olduğu bilinmek ile beraber enzim aktivitesinde kayba sebep olabilmektedir (Çizelge 2.31). EDTA, *Aspergillus niger* kaynaklı hücre dışı bir enzim olan NEOTANNASE L'nin aktivitesinde 1. saatin sonunda artış meydana getirmediği gibi, ciddi bir aktivite kaybına da sebep olmamıştır (Şekil 4.50). Bu durumda ZKS içinde tannaz enzim aktivitesini olumsuz etkileyecek bir metal iyonu varlığının söz konusu olmadığı sonucu çıkarılmıştır.

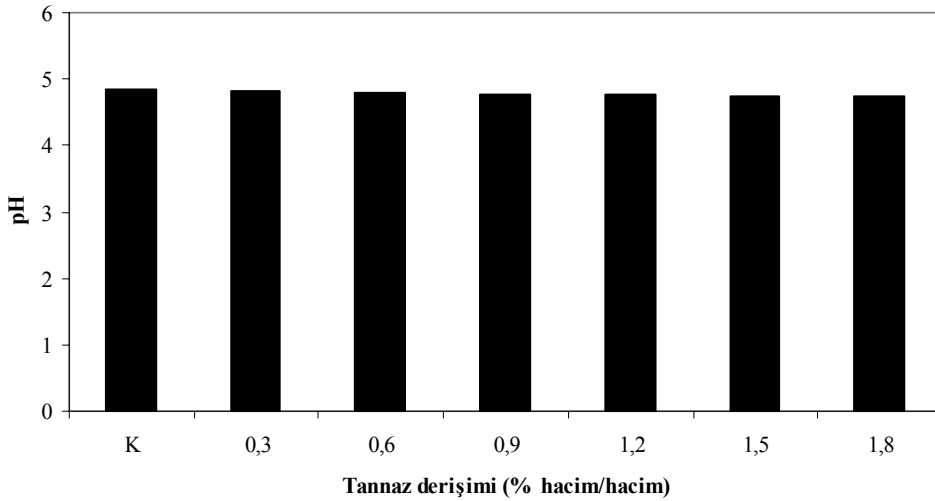
4.4.2 Zeytin Karasuyuna Tannaz Enzim Preparatının Uygulanması

NEOTANNASE L (Biocon) ticari enzim preparatı, ZKS'den önce ZKS'deki uygulaması ile karşılaştırılabilmesi için tannazın birincil substratı olan, TA'in %0.5 ve %1.0 (ağırlık/hacim)'lik derişimlerine, %1.0 (hacim/hacim) derişiminde eklenmiş ve tüpler su banyosunda 45 °C'de inkübe edilerek, 24 saatlik inkübasyon periyodu sonundaki enzimin aktivite kararlılığı tespit edilmeye çalışılmıştır. %0.5 ve %1.0 (ağırlık/hacim)'lik TA derişimleri, TA'in substrat olduğu tannaz aktivite tayininde kullanılan iki derişim değeri oldukları için kullanılmıştır (Mondal and Pati, 2000; Banerjee et al., 2001).

24 saat sonunda tannaz aktivite tayini yapılmış ve 24. saatin sonundaki tannaz aktivitesindeki kayıp, %0.5 TA çözeltisinde, %19.72; %1.0 TA çözeltisinde ise, %28.00 olmuştur. %1.0 TA derişimde daha fazla enzim aktivite kaybı olması, ara ürün olan hidrolizatların (1,2,3,4,6-pentagalloyil glukoz; 2,3,4,6-tetragalloyil glukoz; monogalloyil glukoz vb.) varlığına bağlanabilir. Bu hidrolizatlar, yüksek substrat derişimlerinde, enzimin aktif merkezine yarışmalı veya yarışmasız olarak bağlanabilmektedir. Bu ara ürün hidrolizatlar ile beraber, son ürün gallik asit de bir yarışmalı inhibitör olarak etki etmektedir. Ayrıca, gallik asidin hidroksi grupları, enzimde konformasyon değışimlerine sebep olan, aktif merkezde bulunan aminoasitlerle hidrojen bağları oluşturabilmektedir (Kar et al., 1999; Kar and Banerjee, 2000).

NEOTANNASE L ticari enzim numunesinin, çalışma pH aralığının pH 2.5–pH 5.0 ve optimum pH aralığının ise pH 3.0–pH 4.0 arasında olduğu bildirilmiştir. Ticari tannaz preparatının çalışma aralığının ZKS'nin

pH'sı ile uyumlu olmasından dolayı ZKS'ye pH ayarlaması yapma gereği duyulmamıştır. Campos et al., (2002)'in, tropical bir meyve olan mahun fıstığının tannaz ile ön uygulamasındaki inkübasyon süresi olan 1 saat kullanılmıştır. NEOTANNASE L'nin Biocon firması tarafından önerilen uygulama aralığı ise uygulanacak preparatın kuru tanen içeriğinin ağırlıkça %0.1–0.3 olarak bildirilmiştir. Sıvı tannaz enzim preparatının ZKS'ye uygulanma derişimini tespit etmek amacı 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 (hacim/hacim) derişim aralığında sıvı preparattan eklenmiş ve tannaz enziminin renk üzerine yaptığı etki incelenmiş ve pH ölçümü yapılmıştır. Tannaz eklenmemiş %100 ZKS'nin (Kontrol-K) pH değeri; 4.85'dir. Tannaz enzimi 0.3–1.8 (hacim/hacim) derişim aralığında eklendikten 1 saat sonraki pH değerleri ise pH 4.81 ile pH 4.73 arasında değerler alarak aynı aralıkta kalmıştır (Şekil 4.51).

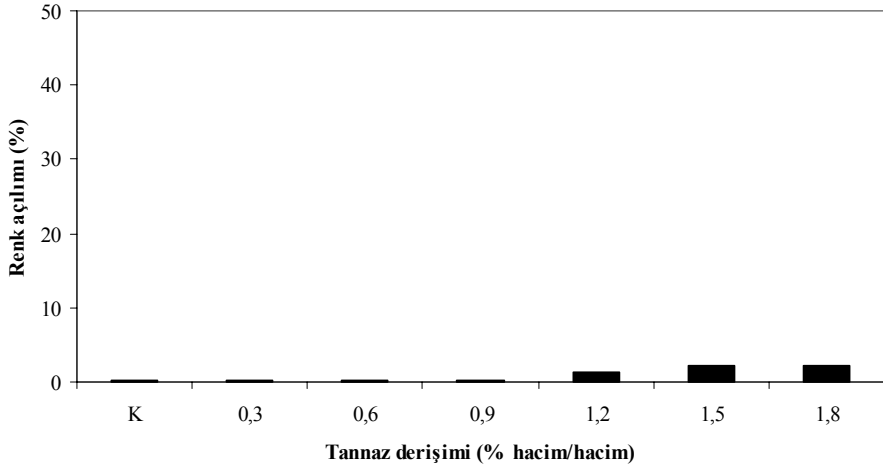


Şekil 4.51 0.3–1.8 (hacim/ hacim) aralığında tannaz eklenmiş %100 ZKS'nin pH değışimi, 1 saat, 45°C, su banyosu.

*K: Kontrol.

Sıvı haldeki ticari tannaz preparatının pH'sının pH 4.0–pH 5.0 arasında olduğu da bildirilmiştir. Bu aralık ZKS'nin pH aralığına düşmektedir. Enzimatik reaksiyon sonrasında da pH'nın hala asidik aralıkta kaldığı anlaşılmaktadır. Bunun sebebi, oluşan ürünlerden birinin tekrar bir asit (gallik asit) olmasıdır.

Sıvı enzim preparatının uygulandığı derişim aralığındaki renk açılımı ve tannaz derişimi arasındaki ilişki Şekil 4.52'de sunulmuştur.



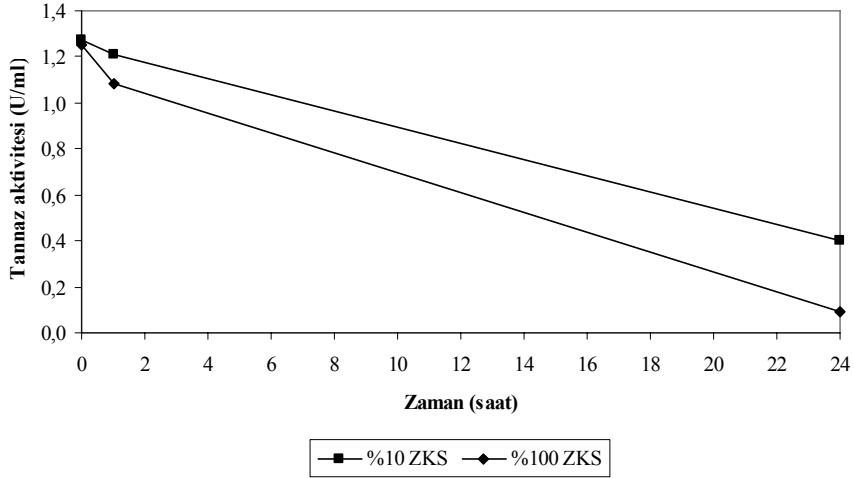
Şekil 4.52 0.3–1.8 (hacim/ hacim) aralığında tannaz eklenmiş %100 ZKS'nin renk açılımı (%), 1 saat, 45°C, su banyosu.

Ticari tannaz preparatı, ZKS'de renk açılımına, %0.9 (hacim/hacim) üzerindeki derişimlerde başlamıştır. Ancak renk açılımı, %1.8 (hacim/hacim) tannaz eklendiğinde dahi %2.22 olmuştur. ZKS organik ve inorganik bileşiklerin bir arada bulunduğu, kompleks bir ortamdır. ZKS'de tannazın enzimatik hidroliz reaksiyonu haricinde, aynı zamanda bir takım yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarının gerçekleşmesi de mümkündür ve bu reaksiyonların ürünlerinin ZKS'nin rengi üzerine olan

etkisi bilinmemektedir. Bu dönüşümlerin anlaşılması için, LC-MS ve HPLC gibi ileri ayırma tekniklerinin kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Bir önceki denemeden ZKS'ye uygulanacak olan tannazın derişiminin %0.9 (hacim/hacim)'den yüksek olması gerektiği sonucu çıkarıldığından, %1.0 (hacim/hacim) derişimindeki sıvı tannaz preparatı, 100 ml toplam hacimde, %10 ve %100 ZKS'ye uygulanmıştır. %100 ZKS ile birlikte %10 ZKS'nin de denenmesindeki amaç; ZKS'ye tannaz enziminin uygulanmasında seyreltmenin yaptığı etkinin aydınlatılmasıdır.

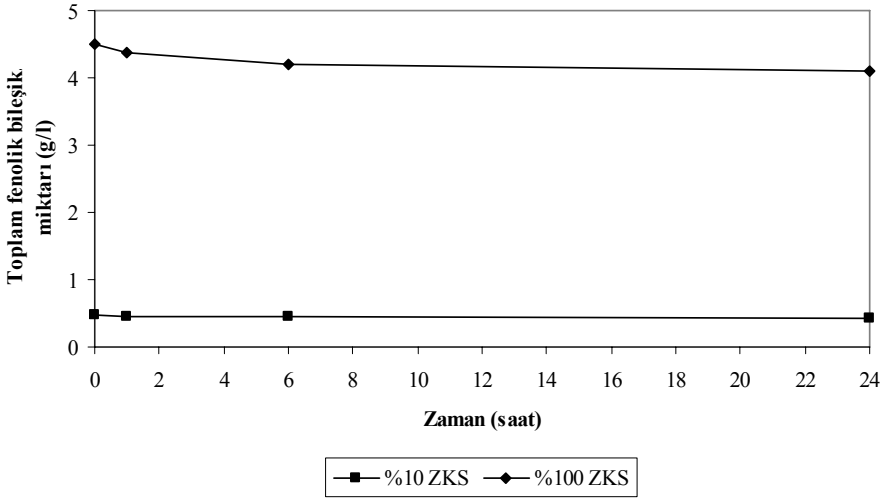
%10–100 ZKS'ye tannaz enziminin uygulanmasında tannaz aktivitesinin zamana karşı değişimi Şekil 4.53'te verilmiştir. Sıvı tannaz preparatından ml'sindeki aktivite değeri; 140.61U'dir. Seyrelmeler ile birlikte hidroliz öncesi ml'deki aktivite değeri 1.406 U'dir. %100 ZKS'de 0. saatteki aktivite değeri 1.254 U/ml olarak bulunmuş, 1. ve 24. saatlerde tannaz aktivite değeri sıra ile 1.080 ve 0.091 U/ml değerini almıştır. Benzer şekilde, %10 ZKS'de 0. saatteki aktivite değeri olan 1.275 U/ml, 1. ve 24. saatlerde sıra ile 1.210 ve 0.401 U/ml değerlerini almıştır.



Şekil 4.53 %10 ve %100 ZKS'ye tannaz enziminin uygulanmasında zamana karşı tannaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika.

24. saatin sonunda tannaz aktivitesindeki kayıp, %100 ZKS'de %92.74, %10 ZKS'de %68.55 olarak hesaplanmıştır. Enzim aktivitesindeki kayıp, %0.5 TA çözeltisinde, %19.72 ve %1.0 TA çözeltisinde ise, %28.00'tir. Buradan ZKS'de 24. saatin sonunda daha yüksek bir tannaz aktivite kaybının yaşandığı ortaya konulmaktadır.

%100 ZKS'nin 0.saatteki toplam fenolik bileşik miktarı; 4.49 g/l olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 4.38, 4.20, 4.09 g/l'ye düşmüştür. Benzer şekilde, %10 ZKS'nin 0. saatteki toplam fenolik bileşik miktarı; 0,481 g/l olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 0,462, 0,451, 0,422 g/l'ye düşmüştür (Şekil 4.54).



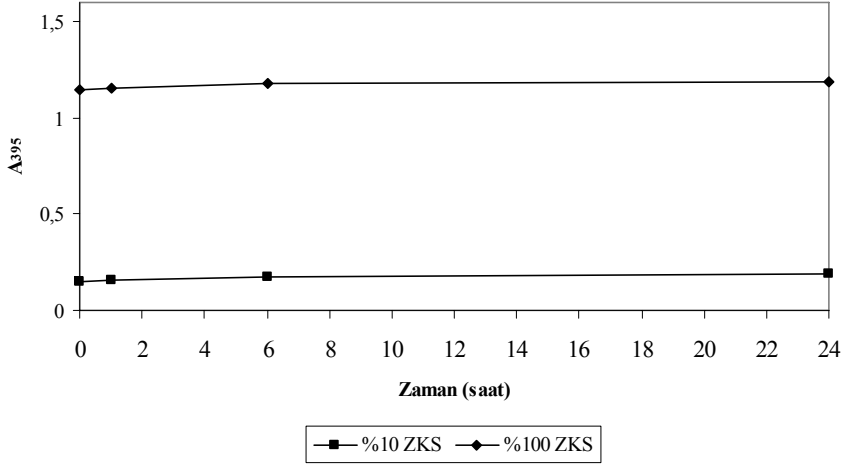
Şekil 4.54 %10 ve %100 ZKS'ye tannaz enziminin uygulanmasında zamana karşı toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika.

Tannaz enzimi uygulaması, %100 ZKS'de %8.91 ve %10 ZKS'de %12.27 toplam fenolik bileşik giderimi sağlamıştır. Tannazın ticari preparat halinde tanen içeren bir atıksuya uygulandığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tannazın doğrudan ticari preparat olarak uygulandığı iki çalışma da başlıca endüstriyel uygulamalarından olan meyve suyuna uygulanmasına dairdir.

Rout and Banerjee, (2006), kullanılan tannaz ticari preparatının kökeninden bahsetmemek ile birlikte nar suyunun acılığının giderilmesi için, nar suyuna 35.6 U/ml aktiviteye sahip olan %10'luk (hacim/hacim) tannaz enzimi ekleyerek, 37 °C'de, 2 saat boyunca inkübe etmişlerdir. Bu uygulamanın sonunda %25 tanen parçalanması sağlanmıştır. Siriwoharn et al., (2005) ise, böğürtlen suyunun elajitanen miktarını düşürmek amacı ile DP-519 kodlu Valley Research (South Bend, Ind., U.S.A.)'den temin edilmiş *Aspergillus oryzae* tannazını kullanarak, pH 5.0, 0.2 M asetat

tamponunda hazırlanmış, 7.5 U/ml aktiviteye sahip olan çözeltiden 2 ml, 0.5 ml hacmindeki farklı böğürtlen ekstrelerine eklenmiş ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe etmiştir. HPLC analizi sonuçlarına göre; tannaz uygulaması, böğürtlen suyunun elajitanen derişiminde ciddi bir azalma sağlamamıştır ve ilerde tannaz uygulama şartlarının optimize edilip de işlemin tekrarlanması gerektiği vurgulanmıştır. Bu iki uygulamadan da anlaşıldığı gibi, kullanılan tannazın kaynağı, uygulama koşulları, uygulandığı tanen içeriği gibi farklılıklar uygulamanın sonuçlarına da yansımaktadır ve tannaz her zaman hedeflenen giderimi sağlayabilmektedir. Ayrıca her iki uygulamada da optimize edilmemiş hidroliz koşulları kullanılmamıştır. Eklenen tannaz derişim aralıkları da birbirinden oldukça uzaktır. Birincisinde %10, ikincisinde ise %400 (hacim/hacim) kullanılmıştır. Bu derişimler endüstriyel uygulamalar için enzimin yüksek miktarlarını gerektirdikleri için ekonomik değildir.

%100 ZKS'nin 0.saatteki 395 nm'deki absorbans değeri; 1.150 olarak okunmuş, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 1.153, 1.181, 1.185 değerlerini alarak aynı aralıkta kalmıştır. %10 ZKS'nin 0.saatteki 395 nm'deki absorbans değeri; 0.148 olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 0.158, 0.176, 0.189 değerleri okunmuştur (Şekil 4.55).



Şekil 4.55 %10 ve %100 ZKS'ye tannaz enziminin uygulanmasında zamana karşı zamana karşı 395 nm'deki absorbans değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika.

Bu absorbans sonuçlarından %1.0 (hacim/hacim) derişiminin hala renk açılımı sağlamadığı ve Şekil 4.52'deki sonuçlara göre %1.1 veya %1.2 (hacim/hacim) derişiminin ZKS'ye tannaz uygulamasında uygun olduğu sonucu çıkarılmıştır.

4.4.3 Zeytin Karasuyuna Lakkaz Enzim Preparatının Uygulanması

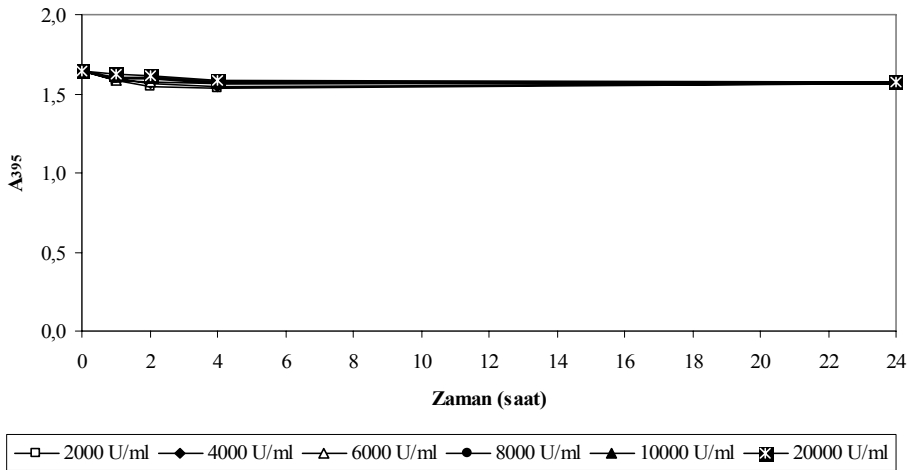
Ligninin biyolojik olarak sentezlenmesinde ve parçalanmasında yer alan bir enzim olan lakkaz, diğer peroksidazlardan substratlarını okside edebilmek için hidrojen peroksida (H_2O_2) ihtiyaç duymaması ile ayrılmaktadır (Bar, 2001; Ergun Ergül, 2004). Lakkazın uygulamaları arasında, endüstriyel atıksulardan fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasının yanı sıra, fenol içeren bazı boyaların renginin açılması da bulunmaktadır (Bar, 2001). Tannaza göre daha geniş bir substrat aralığına sahip olan lakkazın, ticari preparat halinde veya üretimi yapılarak saflaştırılmış halde,

fenolik bileşikleri içeren atıksulara uygulanmasına dair çalışmalar bulunmaktadır.

Liyofilize halde bulunan ticari lakkaz preparatı olan DeniLite® II'nin (Novozyme), optimum pH aralığı; pH 4.8–pH 5.5 olarak bildirilmiştir. Ticari tannaz preparatında olduğu gibi, lakkaz ticari preparatının da pH aralığının ZKS'nin pH'sı ile uyumlu olmasından dolayı ZKS'ye pH ayarlaması yapma gereği duyulmamıştır.

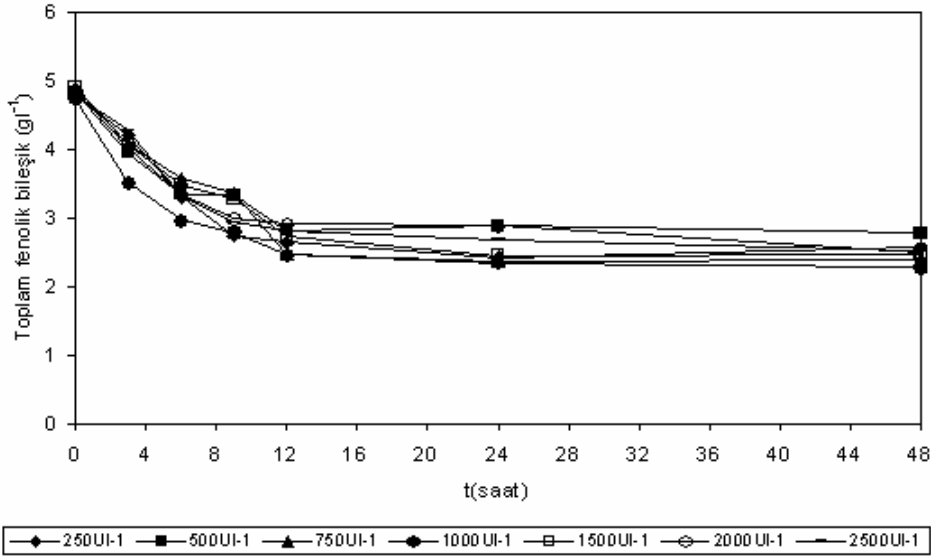
2000–20000 U/ml aktivite aralığında lakkaz eklenmiş olan %100 ZKS'de başlangıç pH'sı 4.84 olarak ölçülmüştür. 0. saat ile 24. saat arasında pH 4.91 ile pH 5.49 arasında değerler alarak optimum pH aralığında kalmıştır.

2000–20000 U/ml aktivite aralığında, 0. saat ile 24. saat arasındaki absorbans değişimi, Şekil 4.56'da verilmiştir. %100 ZKS'nin 395 nm'deki absorbansı 1.645'tir. Absorbans değerleri 0. saat ile 24. saat arasında, 1.531 ile 1.623 arasında değerler almıştır ve eklenen enzimin aktivitesi 10 kat arttırılsa dahi absorbans eğrileri çakışmıştır.



Şekil 4.56 2000–20000 U/ml aktivite aralığında lakkaz uygulanmasındaki 395 nm'deki absorbans değişimi, 45°C, su banyosu

Ergun Ergül, (2004), ise benzer bir sonucu lakkaz enzimi aktiviteleri ile toplam fenolik bileşik giderimi arasında bulmuştur. Jena-Bios Biotechnologien & Serviceleistungen'den temin edilen ürün kodu: EN-104 olan lakkaz ticari preparatından, 250–2500 U/l aktivite aralığında hazırlanmış enzim çözeltilerini ZKS 'ye uygulayarak, %42.44–51.80 arasında toplam fenolik bileşik giderimi sağlamıştır. Lakkaz enziminin artan aktivite değerlerinin, toplam fenolik bileşik gideriminde önemli düzeyde etki etmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.57).

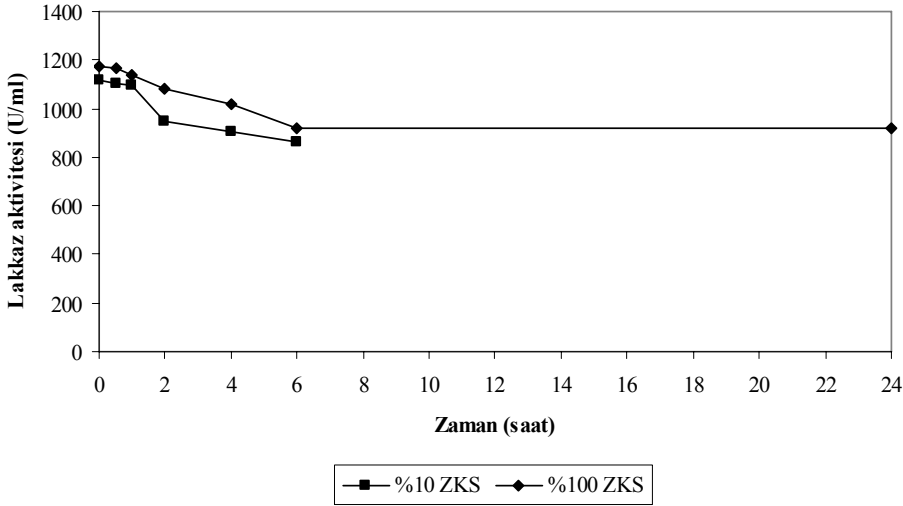


Şekil 4.57 Farklı lakkaz aktivitelerinin ZKS’de bulunan toplam fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasına ilişkin veriler (Ergun Ergül, 2004).

Artan aktivitelerde eklenen, liyofilize lakkaz preparatı, renk açılımı üzerine olumlu etki yapmadığından, absorbans değerlerini gösteren eğriler çakışmaktadır. İnert bir katı üzerine tutulmuş halde bulunan lakkazın, ZKS’de çözünme problemi yaşıyor olma olasılığını ortadan kaldırmak için,

takip eden lakkaz uygulamalarında, ZKS'ye tamponda hazırlanmış derişik çözeltisi uygulanmıştır.

Liyofilize lakkaz preparatının ağırlıkça %10'luk çözeltisinden, %10 (hacim/hacim) olacak şekilde, 100 ml toplam hacimdeki ZKS'ye eklenmiştir. Ticari tannaz enziminin ZKS'ye uygulanması ile benzer şekilde lakkaz %100 ZKS ile beraber %10 ZKS'ye de uygulanmasının sebebi seyreltmenin yaptığı etkinin ortaya konmasıdır. %10–100 ZKS'deki lakkaz aktivitesinin zamana karşı değişimi Şekil 4.58'de verilmiştir. Lakkaz çözeltisinin ml'sindeki aktivite değeri; 11810 U'dir. Bu aktivitedeki çözeltiden, 10 ml alınıp, 100 ml hacme eklenmiştir. %100 ZKS'nin 0. saatteki aktivite değeri 1171.58 U/ml olmuş, 24 saat boyunca 0.5., 1., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 1167.17, 1138.37, 1083.33, 1021.25, 921.87, 916.66 U/ml lakkaz aktivite değerlerini alarak düşmüştür. Benzer şekilde, %10 ZKS'nin 0. saatteki aktivite değeri 1120.67 U/ml olarak hesaplanmış, 24 saat boyunca 0.5., 1., 2., 4. ve 6. saatlerde sıra ile 1100.83, 1098.08, 945.66, 906.41, 864.17 U/ml lakkaz aktivite değerlerini almıştır ve 24. saatteki lakkaz aktivite değeri okunamamıştır. Bunun sebebi lakkaz aktivite tayinin yapıldığı 420 nm'deki absorbans aralığının 0.017 ile 0.070 arasında olması gerektiği için yapılan seyreltme sonucu seyreltme basamağının absorbans aralığına düşürülememesinden kaynaklanmıştır.



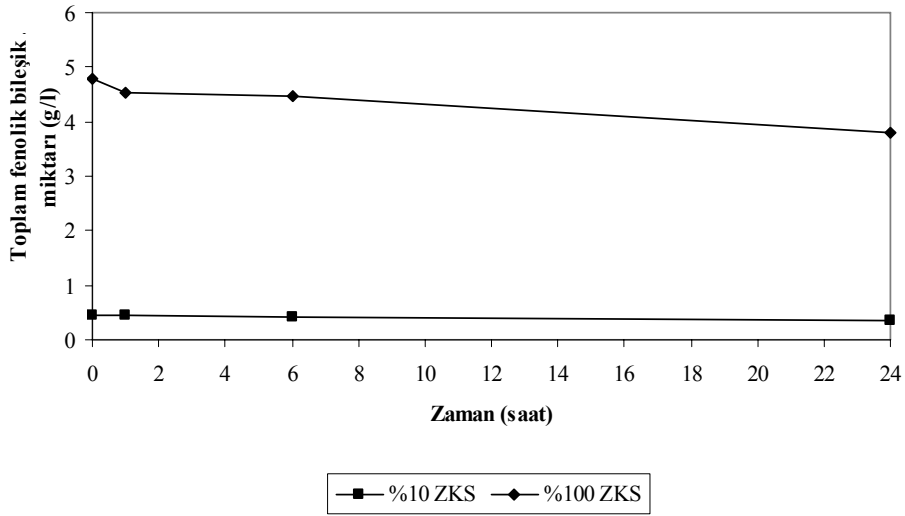
Şekil 4.58 %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz enziminin uygulanmasında zamana karşı lakkaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika.

Her iki ZKS derişiminde de lakkaz aktivite değęrlerinin ilk 6 saatte hızla düştüğü görölmektedir (Şekil 4.58). Benzer sonuçlara ticari lakkaz preparatının (Sigma–Aldrich, Almanya), 100–1000 U aktivite aralığında ZKS'ye uygulandığı başka bir çalışmada da ulaşılmıştır. Ticari enzimin sonuçlarının mikrobiyal sonuçlar ile karşılaştırılması lakkaz aktivitesinin ZKS ortamında hızla düşmesinin mikrobiyal üremeden bağımsız olarak gerçekteştiği sonucunu vermiştir. Lakkaz aktivitesindeki düşüşün sebebi lakkazın reaksiyon ürünlerinin, lakkazı inhibe etmesine bağlanmıştır. Ayrıca, yapılan tayinlerde lakkaz aktivitesindeki düşüş ile paralel olarak ZKS'nin proteinlerinin çökelmesinin de meydana geldiği anlaşılmıştır. Bu protein çökelmesinin nedeninin lakkazın reaksiyon ürünleri olan ariloksi radikallerinin, lakkaz ile suda çözünmeyen topaklar oluşturmak üzere polimerleşmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir ve lakkazın

immobilize edilmesinin bir alternatif olabileceği vurgulanmıştır (Tsioulpas et al.,2002).

24 saat sonunda %100 ZKS'deki lakkaz aktivitesindeki kayıp; %21.76 olarak hesaplanmıştır. Ticari tannaz preparatının aynı periyot sonundaki aktivite kaybı ise %92.74 olarak gerçekleşmiştir. Bu sonuçlardan, lakkazın tannaza göre ZKS ortamında daha kararlı olduğu ve aktivitesini %80 mertebesinde koruyabildiği anlaşılmaktadır.

%100 ZKS'nin 0.saatteki toplam fenolik bileşik miktarı; 4.80 g/l olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 4.52, 4.46, 3.81 g/l'ye düşmüştür. Benzer şekilde, %10 ZKS'nin 0. saatteki toplam fenolik bileşik miktarı; 0.440 g/l olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 0.439, 0.407, 0.361 g/l'ye düşmüştür (Şekil 4.59).



Şekil 4.59 %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz enziminin uygulanmasında zamana toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika.

Lakkaz, farklı ZKS derişimlerinde (%10–100 ZKS) aynı seviyelerde toplam fenolik bileşik giderimi sağlamıştır. %100 ZKS'deki fenolik bileşik

giderimi %20.63 iken, %10 ZKS'de %17.95 olmuştur. Bu değerler tannaz enzimi uygulamasında, %100 ZKS'de %8.91 ve %10 ZKS'de %12.27 olarak gerçekleşen toplam fenolik bileşik gideriminin üstündedir ve ZKS'deki fenolik bileşiklerin dönüşüme uğratılmasında lakkazın tannazdan daha etkili olduğunu açıklamaktadır. 1181 U/ml aktiviteye sahip olan lakkaz, %20 seviyelerinde fenolik bileşik giderimi sağlamaktadır. Seyreltmenin ise ZKS'deki toplam fenolik bileşik giderimi üzerine iletici bir etkisi olmadığı anlaşılmaktadır.

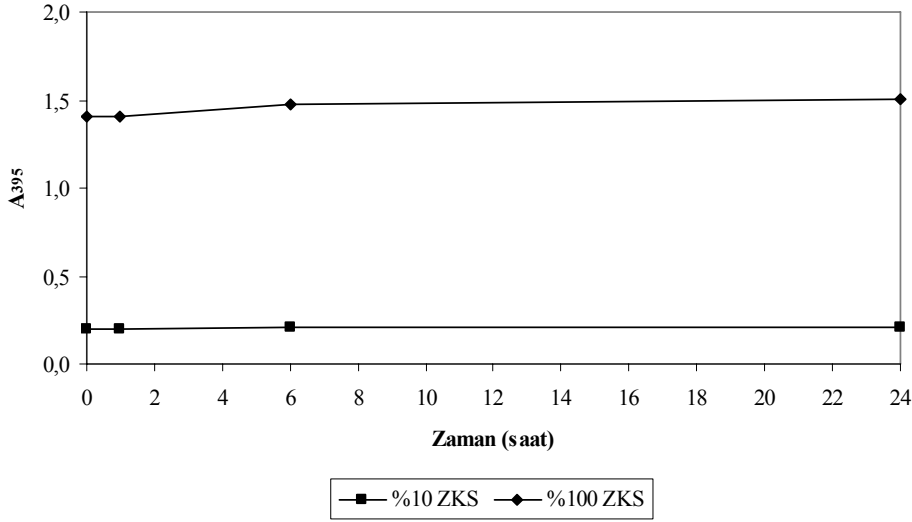
Lakkazın, ZKS'ye saflaştırılmış enzim halinde veya ticari lakkaz preparatı olarak uygulandığı çalışmalar mevcuttur. Lakkazın ZKS'deki fenolik bileşik giderimi, lakkazın elde edildiği mikrobiyal kaynağa, serbest veya immobilize olmasına, uygulanma koşullarına ve uygulandığı ZKS'nin fiziksel ve kimyasal içeriğine bağlı olarak değişmektedir.

Aynı lakkaz enziminin dört farklı uygulamasındaki toplam fenolik bileşik giderimi; %28.57 ile 69.65 gibi geniş bir aralıkta farklılık gösterebilmektedir. Katı kültür fermentasyonunda *Lentinula edodes* SC-495 ile üretilmiş olan lakkaz enzimi farklı uygulama şartlarında ZKS'ye uygulanmıştır. İlk uygulamasında toplam fenolik bileşik içeriği 3.7 g/l olan ZKS'ye, 800 IU/l aktivite değerinde, toplam fenolik bileşik miktarında %65 giderim sağlamıştır. g giderilen fenolik bileşik başına lakkaz aktivitesi 332.64 U/(g giderilen fenolik bileşik)'tir. (Casa et al., 2003). D'Annibale et al., (1999) adsorbsiyon ile kitozan üzerine immobilize edilmiş ve glutaraldehit ile çapraz bağlanmış 520 U (g destek)⁻¹ aktiviteye sahip aynı lakkaz enzimi ile akışkan yataklı reaktörde, birbirini takip eden 6 döngü boyunca, %28.57- 45.71 arasında fenolik bileşik giderimi sağlamıştır. D'Annibale et al., (2000) yine aynı lakkaz enzimini poliakrilik matriks

olan Eupergit® C'ye immobilize ederek, kesikli geri döngü modunda çalışan akışkan yatakta ZKS'ye uygulanmış, ardışık işlemler boyunca; %69.65 ile %53.79 arasında azalan ve karşılaştırma amacı ile, serbest enzimle yapılan denemelerde, 5, 10, 50 IU olarak uygulanan çözünebilen lakkaz, sırası ile %42, 65 ve 78 fenolik bileşik giderimi sağlamıştır.

Katı kültür fermentasyonunda *Lentinula edodes* SC-495 ile üretilmiş olan lakkaz enziminden farklı olarak, 180 U/mg protein aktiviteye sahip ticari lakkaz enzim preparatı (Sigma-Aldrich, Almanya), seyreltilmemiş halde toplam fenolik bileşik içeriği; 3.4 g/l olan, seyreltilmiş ZKS'lere 100-1000 U aktivitelerde eklenmiş ve %75 ZKS'de %41-44 arasında fenolik bileşik uzaklaştırarak en yüksek giderimi sağlamıştır (Tsioulpas et al., 2002). Buradan da anlaşıldığı gibi farklı mikrobiyal lakkazların, ZKS'deki toplam fenolik bileşik giderimleri birbirinden farklı olabilmektedir.

%100 ZKS'nin 0.saatteki 395 nm'deki absorbans değeri; 1.407 olarak okunmuş, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 1.409, 1.471, 1.506 değerlerini alarak aynı aralıkta kalmıştır. %10 ZKS'nin 0.saatteki 395 nm'deki absorbans değeri; 0.196 olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 0.198, 0.209, 0,210 değerlerini alarak benzer şekilde, aynı aralıkta kalmıştır (Şekil 4.60).



Şekil 4.60 %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz enziminin uygulanmasında zamana karşı 395 nm'deki absorbans değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika.

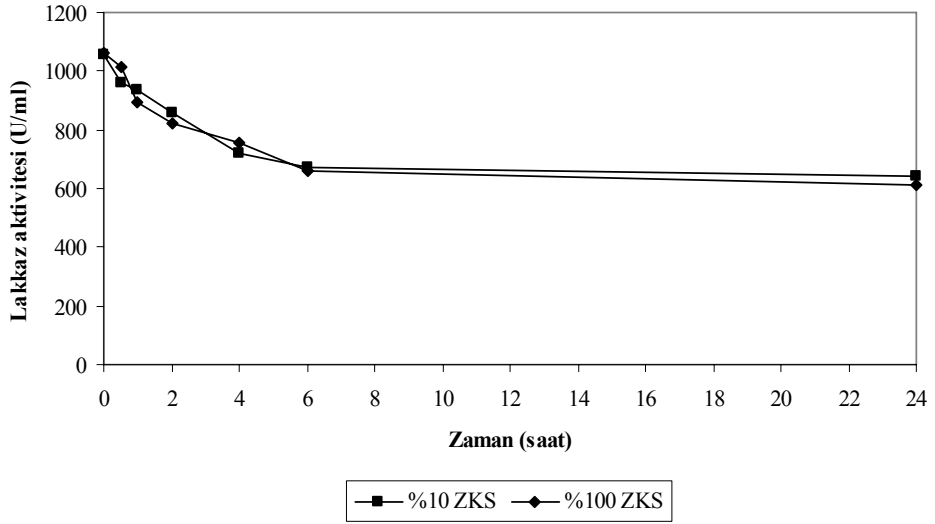
Kullanılan lakkaz enzim preparatı, tannaz enzim preparatında olduğu gibi ZKS'nin renk açılımı üzerinde etkili olamamıştır. D'Annibale et al., (2000) her işlemin sonunda az da olsa renk açılımı gözlenmiştir. Renk açılımının, hem lakkazın oluşturduğu oksidasyon ürünlerinin matrikse adsorpsiyonundan hem de renk ölçümü öncesi uygulanan santrifügasyondan ötürü olduğu bildirilmiştir. Ergun Ergül, (2004) ise tüm aktivite değerlerinde %6 seviyesinde renk açılımı elde ettiğini bildirmiştir. D'Annibale et al., (1999) akışkan yataklı reaktörde, birbirini takip eden 6 işlem boyunca, %5.71- 48.57 renk açılımı sağlamış ve ilk dört işlemten sonra renk açılımında da düşüş meydana gelmiştir. ZKS'de farklı kaynaklardan lakkazların, uygulandıkları koşullara bağlı olarak renk üzerime değişen etkileri söz konusudur. ZKS'de lakkaz ile etkin bir renk

açılımı sağlayabilmek için, immobilize lakkazın, aşamalı olarak ZKS'ye uygulanması gerektiği sonucu da çıkarılmaktadır.

Tannazın %0.5–1.0 (ağırlık/hacim) TA içeren sentetik ortama ve %100 ZKS'ye; lakkazın ise sadece %100 ZKS'ye uygulanmasına ait örneklerin ince tabaka kromatografisi fotoğrafları, Şekil 4.85, ve 4.86'da verilmiştir. Bunların yorumlanması ile lakkaz ve tannazın %100 ZKS'ye uygulanması 1. ve 24. saat örnekleri arasında profil olarak fark görülmemektedir. Örneklerde bulunan metil gallat ve gallik asidin ZKS'de de bulunması meydana gelen değişiminin yorumlanması için ince tabaka kromatografisinin yetersiz kaldığını göstermektedir. Tannazın %0.5–1.0 (ağırlık/hacim) TA içeren sentetik ortama uygulamasına ait örneklerin plakadaki davranışlarından, 1. saat ve 24. saat örneklerinde metil gallat ve gallik asidin yoğun şekilde bulunduğu anlaşılmaktadır.

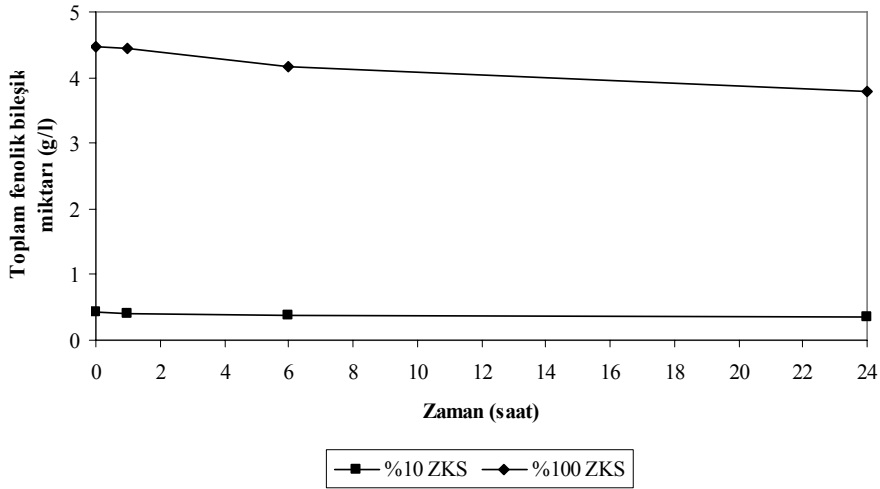
aynı anda uygulanmasına karar verilmiştir. ZKS’de bulunabilecek, ticari enzim preparatlarının, enzimatik reaksiyonlarını engelleyici herhangi bir inhibitörün etkisini azaltmak için, %100 ZKS ile beraber %10 ZKS’ye de ticari enzim preparatları uygulanmıştır.

ZKS’ye tannaz sonrası lakkaz uygulanmasının yaptığı etkiyi belirlemek amacı ile tannaz uygulanmış %100 ve %10 ZKS’nin kalan hacmine, %10 (hacim/hacim) olacak şekilde lakkaz çözeltisinin eklenmesinden sonra lakkaz aktivitesinin zamana karşı değişimi Şekil 4.63’de verilmiştir. %10 (ağırlık/hacim) liyofilize preparat olan DeniLite® II’den hazırlanmış lakkaz çözeltisinin ml’sindeki aktivite değeri; 11810 U’dur. Seyrelmelerle birlikte 1 ml’de 1181 U olması beklenmektedir. %100 ZKS’nin 0. saatteki aktivite değeri 1062.92 U/ml olmuş, 24 saat boyunca 0.5., 1., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 1016.33, 893.33, 820.25, 755.00, 658.33, 611.16 değerlerini alarak düşmüştür. Benzer şekilde, %10 ZKS’nin 0. saatteki aktivite değeri 1057.50 U/ml olmuş, 24 saat boyunca 0.5., 1., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 960.75, 935.50, 860.50, 722.50, 672.50 ve 641.67 U/ml değerlerini almıştır.



Şekil 4.63 %10 ve %100 ZKS'ye tannaz enziminin uygulanmasından sonra lakkaz uygulanmasında, zamana karşı lakkaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika

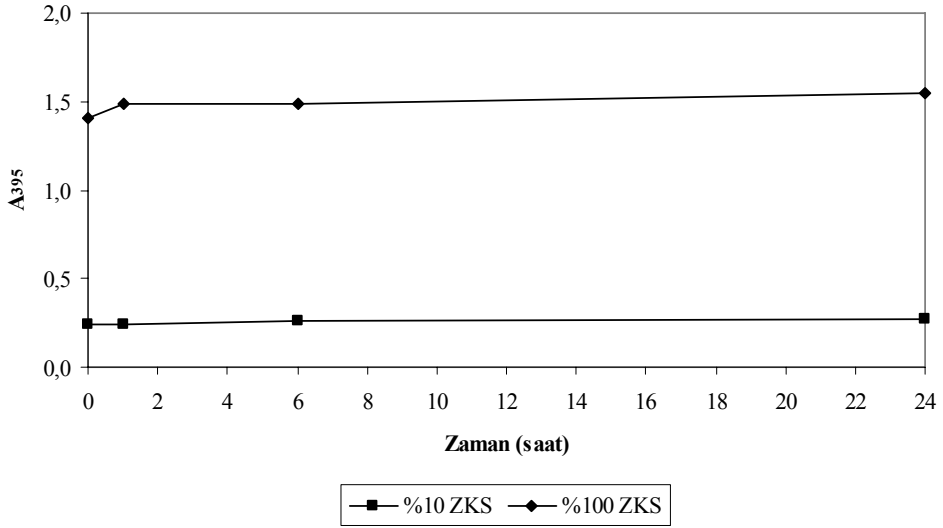
%100 ZKS'nin 0.saatteki toplam fenolik bileşik miktarı; 4.48 g/l olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 4.44, 4.17 ve 3.79 g/l'ye düşmüştür. Benzer şekilde, %10 ZKS'nin 0. saatteki toplam fenolik bileşik; 0.422 g/l olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 0.402, 0.376 ve 0.360 g/l'ye düşmüştür (Şekil 4.64).



Şekil 4.64 %10 ve %100 ZKS'ye tannaz enziminin uygulanmasından sonra lakkaz uygulanmasında, zamana karşı toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika.

Tannaz sonrası lakkaz uygulanması tannaz eklenmesi sonucu hesaplanan toplam fenolik bileşik miktarına göre, %100 ZKS'de %15.40 ve %10 ZKS'de %14.69 giderimi sağlamıştır. Bu giderimlerin, lakkazın tek başına uygulanmasından düşük olması, tannazın lakkaza ait olan bir kısım substratları da dönüşüme uğrattığı şeklinde yorumlanabilir.

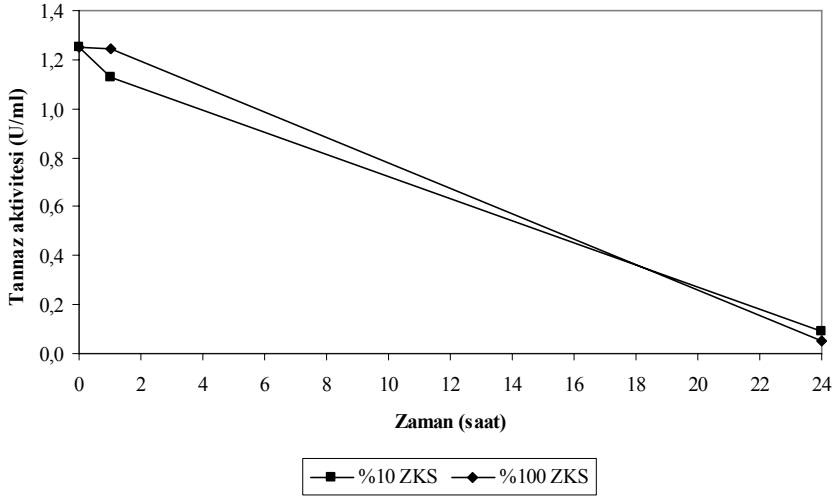
%100 ZKS'nin 0.saatteki 395 nm'deki absorbans değeri; 1.411 olarak okunmuş, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 1.486, 1.491, 1.547 değerlerini alarak aynı aralıkta kalmıştır. %10 ZKS'nin 0.saatteki 395 nm'deki absorbans değeri; 0.237 olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 0.245, 0.262 ve 0,270 değerlerini alarak benzer şekilde, aynı aralıkta kalmıştır. (Şekil 4.65)



Şekil 4.65 %10 ve %100 ZKS'ye tannaz enziminin uygulanmasından sonra lakkaz uygulanmasında, zamana karşı 395 nm'deki absorbans değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika.

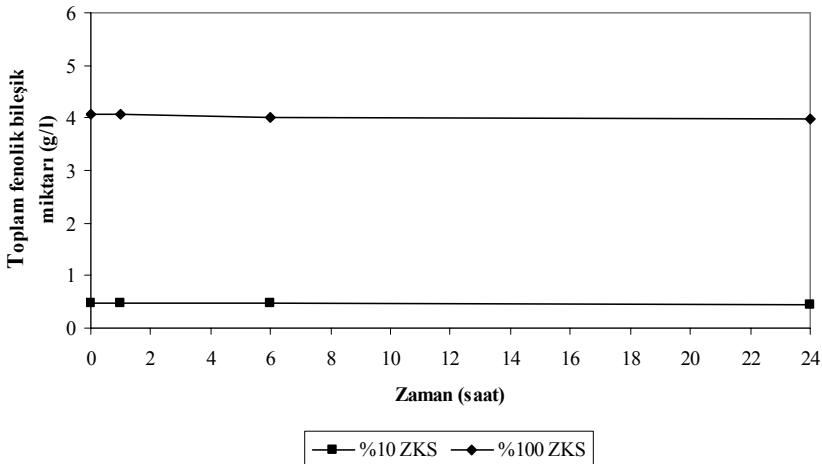
Renk açılımını gözlenmemesi, oluşması muhtemelen olan humik asidin koyu kahverengi pigment olmasına bağlanabilmektedir.

ZKS'ye lakkaz sonrası tannaz uygulanmasının yaptığı etkiyi belirlemek amacı ile lakkaz uygulanmış %100 ve %10 ZKS'nin kalan hacmine, %1.0 (hacim/hacim) olacak şekilde tannaz eklenmesinden sonra tannaz aktivitesinin zamana karşı değişimi Şekil 4.66'da verilmiştir. Tannaz sıvı preparatının ml'sindeki aktivite değeri; 140.61 U'dir. Seyrelmelerle birlikte 1 ml'de 1.406 U olması beklenmektedir. %100 ZKS'nin 0. saatteki aktivite değeri 1.254 U/ml olmuş, 1. ve 24. saatlerde sıra ile 1.245 ve 0.051 U/ml değerlerini almıştır. Benzer şekilde, %10 ZKS'nin 0. saatteki aktivite değeri 1.254 U/ml olmuş, 1. ve 24. saatlerde sıra ile 1.130 ve 0.092 U/ml değerlerini almıştır.



Şekil 4.66 %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz enziminin uygulanmasından sonra tannaz uygulanmasında, zamana karşı tannaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika.

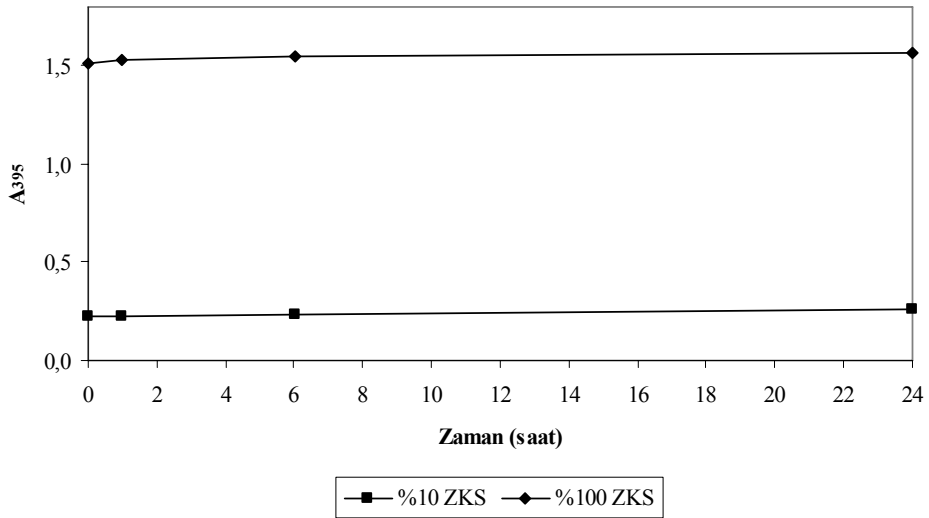
%100 ZKS'nin 0.saatteki toplam fenolik bileşik miktarı; 4.08 g/l olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 4.06, 4.00, 3.97 g/l'ye düşmüştür. Benzer şekilde, %10 ZKS'nin 0. saatteki toplam fenolik bileşik miktarı; 0.472 g/l olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 0.472, 0.462, 0.435 g/l'ye düşmüştür (Şekil 4.67).



Şekil 4.67 %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz enziminin uygulanmasından sonra tannaz uygulanmasında, zamana karşı toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika.

Lakkaz sonrası tannaz uygulanması, %100 ZKS'de %2.70 ve %10 ZKS'de %7.84 fenolik bileşik giderimi sağlamıştır. Lakkazın uygulanmasından sonra tannaz uygulanması, fenolik bileşik giderimi üzerine olan etkisi düşük olmuştur. Çünkü lakkaz daha geniş aralıktaki fenolik bileşikleri içeren substrat sınıfına sahiptir.

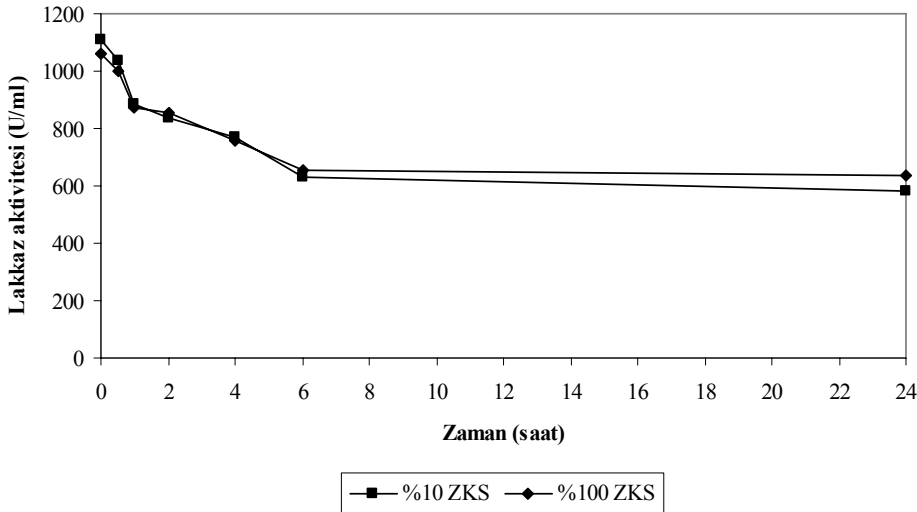
%100 ZKS'nin 0.saatteki 395 nm'deki absorbans değeri; 1.515 olarak okunmuş, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 1.532, 1.546, 1.566 değerlerini alarak aynı aralıkta kalmıştır. %10 ZKS'nin 0.saatteki 395 nm'deki absorbans değeri; 0.223 olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 0.227, 0.231, 0,258 değerlerini alarak benzer şekilde, aynı aralıkta kalmıştır (Şekil 4.68).



Şekil 4.68 %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz enziminin uygulanmasından sonra tannaz uygulanmasında, zamana karşı 395 nm'deki absorbans değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika.

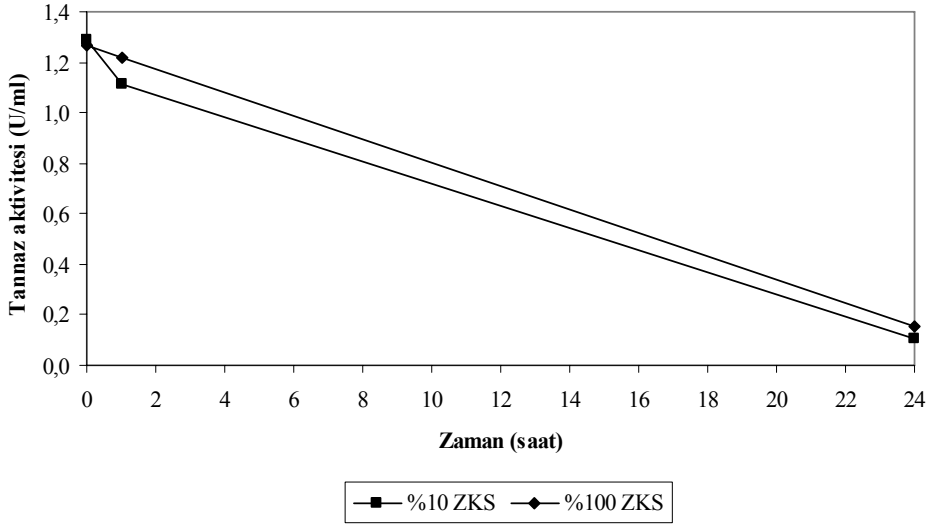
Lakkazın uygulanmasından sonra tannaz uygulanmasının, renk açılımı üzerine ilerletici bir etkisi olmamıştır.

Tannaz ve lakkazın aynı anda %100 ve %10 ZKS'ye uygulanmasında, ardışık uygulamadan farklı olarak, aynı anda eklendiklerinde yaptıkları etkinin ortaya koyulması hedeflenmiştir. Sıvı tannaz preparatından, %1.0 (hacim/ hacim) ve lakkaz çözeltisinden %10 (hacim/hacim) olacak şekilde eklenmesinden sonra, lakkaz aktivitesinin zamana karşı değişimi Şekil 4.69'da verilmiştir. %10 (ağırlık/hacim) lakkaz çözeltisinin ml'sindeki aktivite değeri, 11810 U'dir. Bu aktivitedeki çözeltiden, 10 ml alınıp, 100 ml hacme eklenmiştir ve 1 ml'de 1181 U olması beklenmektedir. %100 ZKS'nin 0. saatteki aktivite değeri 1059.38 U/ml olmuş, 24 saat boyunca 0.5., 1., 2., 4., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 998.38, 873.55, 855.42, 756.29, 655.13 ve 634.50 U/ml değerlerini alarak düşmüştür. Benzer şekilde, %10 ZKS'nin 0. saatteki aktivite değeri 1109.40 U/ml olmuş, 24 saat boyunca 0.5., 1., 2., 4., 6. ve 24.saatlerde sıra ile 1036.92, 885.00, 835.00, 770.25, 627.42 ve 579.58 U/ml değerlerini almıştır.



Şekil 4.69 %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz ve tannaz enziminin aynı anda uygulanmasında zamana karşı lakkaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika.

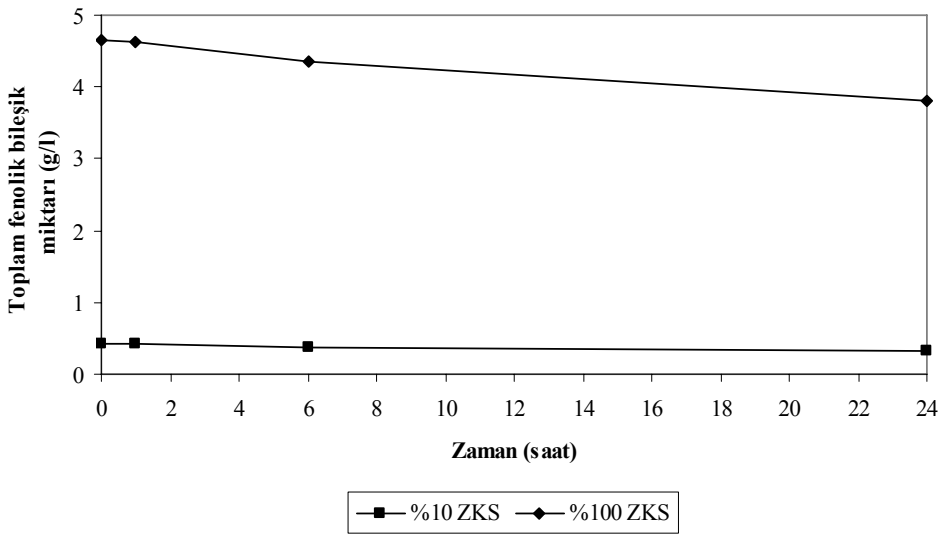
Tannaz ve lakkazın aynı anda %100 ve %10 ZKS'ye uygulanmasında, tannaz aktivitesinin zamana karşı değişimi Şekil 4.70'de verilmiştir. Sıvı tannaz preparatından ml'sindeki aktivite değeri; 140.61U'dur. Bu aktivitedeki çözeltiden, 1ml alınıp, 100 ml hacme eklenmiştir ve 1 ml'de 1.406 U olması beklenmektedir. %100 ZKS'nin 0. saatteki aktivite değeri 1.268 U/ml olmuş, 1. ve 24. saatlerde sıra ile 1.220 ve 0.156 U/ml değerlerini almıştır. Benzer şekilde, %10 ZKS'nin 0. saatteki aktivite değeri 1.291 U/ml olmuş, 1. ve 24. saatlerde sıra ile 1.110 ve 0.103 U/ml değerlerini almıştır.



Şekil 4.70 %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz ve tannaz enziminin aynı anda uygulanmasında zamana karşı tannaz aktivitesi (U/ml), 45 °C, 50 devir/dakika.

ZKS'deki tannaz aktivitelerinde lakkazdan daha keskin bir düşüş yaşanmaktadır. (Şekil 4.53, Şekil 4.66 ve Şekil 4.70) Tannaz aktivitesindeki düşüş gallik asitten kaynaklanan son ürün baskılanmasına bağlanabilmektedir.

%100 ZKS'nin 0.saatteki toplam fenolik bileşik miktarı; 4.65 g/l olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 4.62, 4.36 ve 3.81 g/l'ye düşmüştür. Benzer şekilde, %10 ZKS'nin 0. saatteki toplam fenolik bileşik miktarı; 0.419 g/l olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 0.419, 0.365 ve 0.334 g/l'ye düşmüştür (Şekil 4.71).

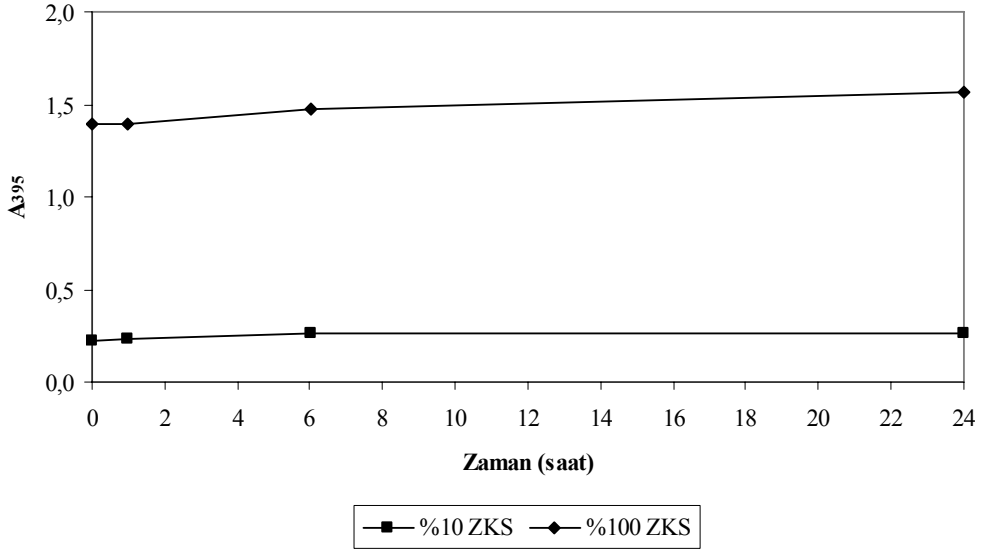


Şekil 4.71 %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz ve tannaz enziminin aynı anda uygulanmasında zamana karşı toplam fenolik bileşik miktarı (g/l), 45 °C, 50 devir/dakika.

Tannaz ve lakkazın aynı anda uygulanması, %100 ZKS'de %18.06 ve %10 ZKS'de %20.29 toplam fenolik bileşik giderimi sağlamıştır. Bu giderim değerleri lakkazın tek başına uygulanmasındaki sonuçlar ile (%100 ZKS'deki toplam fenolik bileşik giderimi %20.63 , %10 ZKS'de %17.95) benzerlik arz etmektedir. Yani lakkaz ve tannazın birlikte uygulanması, lakkazın tek başına uygulanmasından farklı bir ilerleme sağlamamıştır.

%100 ZKS'nin 0.saatteki 395 nm'deki absorban değeri; 1.396 olarak okunmuş, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 1.398, 1.471 ve 1.564 değerlerini

olarak aynı aralıkta kalmıştır. %10 ZKS'nin 0.saatteki 395 nm'deki absorbans değeri; 0.221 olup, 1., 6. ve 24. saatlerde sıra ile 0.235, 0.261 ve 0,265 değerlerini alarak benzer şekilde, aynı aralıkta kalmıştır (Şekil 4.72).



Şekil 4.72 %10 ve %100 ZKS'ye lakkaz ve tannaz enziminin aynı anda uygulanmasında zamana karşı zamana karşı 395 nm'deki absorbans değişimi, 45 °C, 50 devir/dakika.

Lakkaz ve tannazın aynı anda uygulanması, renk açılması üzerine hedeflenen ilerlemeyi sağlayamamıştır. Mikrobiyal üretimlerde meydana gelen renk açılımında, lakkaz ve tannazdan farklı mikrobiyal dönüşüm mekanizmaların yer aldığı ve bunların açığa çıkarılmasının, genetik, biyokimyasal ve ileri analitik yöntemlerin denenmesi ile mümkün olabileceği sonucu çıkarılmaktadır.

Tannaz ve lakkazın ardışık olarak ve aynı anda %100 ZKS'ye uygulanmasına ait örneklerin ince tabaka kromatografisi fotoğrafları, Şekil 4.73, ve 4.74'te verilmiştir. Bunların yorumlanması ile tatbiki yapılan

5. ÖNERİLER

ZKS'nin biyolojik yöntemler ile çevreye zararsız hale getirilmesinde ön işlem niteliği taşıyan aerobik arıtımındaki tannaz enziminin rolünün aydınlatılması amacı ile yürütülen çalışmalarda, ZKS'nin koyu renginden sadece içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerin sorumlu olmadığı sonucu çıkmıştır. Ayrıca, ZKS, organik içeriği ile pek çok enzimin substratına sahip bir atıksudur. *Aspergillus* grubu funguslar, çok çeşitli enzimleri sentezleme yeteneğindedirler. Bu sebeple tannaz ve ligninolitik enzimlerden başka arıtımda etkili olan diğer enzimlerin de araştırılması gerekmektedir.

Karışık kültürün, ZKS'nin aerobik ön arıtımında gözden geçirilmesi ile farklı mikroorganizmaların arıtım potansiyelinden yararlanılması hedeflenmelidir. Arıtımda kullanılan mikroorganizmaların ZKS'den izole edilmesi, yaşam şartları daha önceden ZKS'ye adapte olduğundan hem zaman hem arıtım verimi açısından faydalı olacaktır. *Aspergillus tubingensis* Ege-K 265 suşu da ZKS'nin ön arıtım işlemi için ümit vaad eden bir suştur.

Çalışmanın biyoteknolojik açıdan önem arz eden yanı; çevresel tehdit oluşturan bir atığın değerli bir ürüne dönüştürülebilmesidir. Bu sayede ZKS'nin tannaz enziminin derin ve katı kültür üretimlerinde kullanılarak değerlendirilmesi söz konusudur. Tannaz enzimi geniş uygulamalara sahipken, yaygın kullanım bulamamış bir endüstriyel enzimdir. Bunun başlıca sebebi olarak yüksek proses maliyetleri ve üretimde substrat başına aktivitenin düşük olması gösterilebilir. Tannaz üretimi için TA'den başka kullanılabilecek doğal substrat arayışında özellikle tanen içeren bitkisel

atıklar öne çıkmaktadır. ZKS, en iyi tannaz üreticileri oldukları bildirilmiş olan *Aspergillus* türlerinin gelişebildiği bir üretim ortamıdır. Tannaz üretimi için gerekli olan azot kaynağı ise yine endüstriyel bir atıktan temin edilebilir. Ayrıca tannaz indüksiyonunun sağlanması için tanen içeren bitkisel atıklara ZKS'nin emdirilerek katı kültür fermentasyonunda kullanılması atıkların değerlendirilmesi açısından avantaj sağlayabilir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdel-Naby, M. A., Sherif, A. A., El-Tanash, A. B. and Mankarios, A. T.,** 1999, Immobilization of *Aspergillus oryzae* tannase and properties of the immobilized enzyme, *Journal of Applied Microbiology*, 87: 108-114.
- Adachi, O., Watanabe, M., Yamada, H.,** 1968. Studies on fungal tannase Part II. Agric. Biol. Chem. 32, 1079–1085.
- Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokasa, D., Kotzailias, S., Christoua, G., Tsagoua, V. and Papanikolaou, S.,** 2003, Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process, *Water Research*, 37: 3897–3904.
- Aguilar, CN., Augur, C., Favela-Torres, E. and Viniegra- González, G.,** 2001a, Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26:296-302.
- Aguilar, CN., Augur, C., Favela-Torres, E. and Viniegra- González, G.,** 2001b, Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures, *Process Biochemistry*, 36:565-570.
- Aguilar, C.N. and Sanchez, G.,** 2001, Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase, *Food Sci. Tech. Int.*, 7 (5):373–382.
- Ahmadi, M., Vahabzadeh, F., Bonakdarpour, B. and Mehranian, M.,** 2006, Empirical modeling of olive oil mill wastewater treatment using loofa-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*, *Process Biochemistry*, 41:1148–1154.
- Aissam, H., Errachidi, F., Penninckx, M.J., Merzouki, M. and Benlemlih, M.,** 2005, Production of tannase by *Aspergillus niger* HA37 growing on tannic acid and olive mill waste waters, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21:609–614.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Aktaş, E. S., Imre, S., Ersoy, L.,** 2001, Characterization and lime treatment of olive mill waste waters, *Water Research*, 9:2336-2340.
- Albertse, E. H.,** 2002, Cloning, Expression and Characterization of Tannase from *Aspergillus* Species, PhD Thesis, University of the Free State, 122p.
- Annesini, M.C. and Gironi, F.,** 1991, Olive oil mill effluent: ageing effects on evaporation behaviour, *Wat. Res.*, 25:1157-1160.
- Aoki, K., Shinke, R. and Nishira, H.,** 1976, Chemical composition and molecular weight of yeast tannase, *Agric. Biol. Chem.*, 2:297-302.
- Aresta, M., Dibenedetto, A., Narracci, M. and Tommasi, I.,** 2003, A technology for the treatment of olive-mill waste water in a continuously fed plant. An insight into the degradation mechanism of methoxy-polyphenols, *Environ. Chem. Lett.*, 1:13-18.
- Arora, D. S. and Gill, P. K.,** 2000, Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions, *Bioresource Technology*, 73:283-285.
- Arora, D.S. and Gill, P.K.,** 2001, Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi, *Biores. Technol.*, 77:89-91.
- Assas, N., Ayed, L., Marouani, L. and Hamdi, M.,** 2002, Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*, *Process Biochemistry*, 38: 361-365.
- Aybeke, M., Olgun, G., Sıdal, U. ve Kolankaya, D.,** 2000, Zeytinyağı fabrikası atık suyunun buğday (*Triticum aestivum* L.) kök ucu hücrelerindeki mitoz bölünme ve total protein miktarı üzerine etkisi, *Turkish Journal of Biology*, 24: 127-140.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Ayed, L. and Hamdi, M.,** 2002, Culture condition of tannase production by *Lactobacillus plantarum*, *Biotechnology Letters*, 24:1763-1765.
- Ayed, L., Assas, 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*, 40:7–11.
- Azbar N.,** 2002, Önsöz, I. Zeytin Yağı Üretiminde Çevre Sorunları ve Çözümleri Uluslararası Çalıştayı Bildiriler Kitabı.
- Azbar N., Turan İ. ve Cevilan I.,** 2002, Karasuyun kentsel arıtma tesisleri üzerindeki etkisi ve ön arıtma gerekliliğinin değerlendirilmesi, I. Zeytin Yağı Üretiminde Çevre Sorunları ve Çözümleri Uluslararası Çalıştayı Bildiriler Kitabı, 1–6 s.
- Bajpai, B. and Patil, S.,** 1996, Tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity of *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium* and *Trichoderma*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 12: 217-220.
- Bajpai, B. and Patil, S.,** 1997, Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of *fungi imperti*, *Enzyme and Microbial Technology*, 20:612-614.
- Banerjee, D., Mondal, K. C. and Pati, B. R.,** 2001, Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9, *Journal of Basic Microbiology*, 41:313–318.
- Banerjee, R., Mukherjee, G. and Patra, K. C.,** 2005, Microbial transformation of tannin-rich substrate to gallic acid through co-culture method, *Bioresource Technology*, 96:949–953.
- Bar, M.,** 2001, Kinetics and Physico-chemical Properties of White-rot Fungal Laccases, Msc Thesis, University of the Free State, 108p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Barthomeuf, C., Regerat, F. and Pourrat, H.,** 1994, Production, purification and characterization of tannase from *Aspergillus niger* LCF 8, *J. Ferment. Bioengg.*, 77:320–323.
- Batra, A. and Saxena, R. K.,** 2005, Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, *Process Biochemistry*, 40:1553–1557.
- Belmares, R., Contreras-Esquivel, J.C., Rodriguez-Herrera, R., Coronel, A.R., Aguilar, C.N.,** 2004, Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 37:857-864.
- Beltran, F.J., Garcia-Araya, J.F., Frades, J., Alvarez, P. and Gimeno, O.,** 1999, Effects of single and combined ozonation with hydrogen peroxide or UV radiation on the chemical degradation and biodegradability of debittering table olive industrial wastewaters, *Water Research*, 33:723-732.
- Beverini, M. and Metche, M.,** 1990, Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*, *Sci Aliment*, 10: 807–816.
- Bhardwaj, R., Singh, B. and Bhat, T. K.,** 2003, Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* MTCC 2425, *Journal of Basic Microbiology*, 43(6):449-461.
- Bhat, T.K., Makkar, H.P.S. and Singh, B.,** 1997, Preliminary studies on tannin degradation by *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425, *Letters in Applied Microbiology*, 25:22-23.
- Bhat, T. K., Singh, B. and Sharma, O.P.,** 1998, Microbial degradation of tannins—A current perspective, *Biodegradation*, 9:343:357.
- Borja, R., Martín, A., Alonso, V., García. I. and Banks, C.J.,** 1995, Influence of different aerobic pretreatments on the kinetics of anaerobic digestion of olive mill wastewater, *Water Research*, 29(2):489–495.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Box, J.D.**, 1983, Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters, *Water. Res.*, 17(5):511-525.
- Bradoo, S., Gupta, R. and Saxena, R.K.**, 1996, Screening for extracellular tannase producing fungi: Development of a rapid and simple plate assay, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 42:325 – 329.
- Bradoo, S., Gupta, R. and Saxena, R. K.**, 1997, Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*, *Process Biochemistry*, 32(2):135-139.
- Campos, D. C. P., Santos, A. S., Wolkoff, D. B., Matta, V. M., Cabral, L. M. C. and Couri, S.**, 2002, Cashew apple juice stabilization by microfiltration, *Desalination*, 148:61–65.
- Capasso, R. and De Martino, A.**, 1998, Recovering a polymeric polyphenolglycosilated pigment from olive oil mill wastewaters, 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, September 1-30.
- Casa, R., D'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S.R., Giovannozzi Sermanni, G. and Lo Cascio, B.**, 2003, Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability, *Chemosphere*, 50:959–966.
- Casas López, J.L., Sánchez Pérez, J.A., Fernández Sevilla, J.M., Acién Fernández, F.G., Molina Grima, E. and Chisti, Y.**, 2003, Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production, *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 270–277.
- Chtourou, M., Ammar, E., Nasri, M and Medhioub, K.**, 2004, Isolation of a yeast, *Trichosporon cutaneum*, able to use low molecular weight phenolic compounds: application to olive mill waste water treatment, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79:869–878.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Ciafardini, G. and Zullo, B.A.**, 2002, Microbiological activity in stored olive oil, *International Journal of Food Microbiology*, 75:111–118.
- Crennell, S.J., Cook, D., Minns, A., Svergun, D., Andersen, R.L. and Karlsson, E.N.**, 2006, Dimerisation and an increase in active site aromatic groups as adaptations to high temperatures: X-ray solution scattering and substrate-bound crystal structures of *Rhodothermus marinus* endoglucanase Cel12A, *Journal of Molecular Biology*, 356:57-71.
- Coşkun, M. B. ve Akbaş, T.**, 2000, Zeytinyağı işletmelerindeki atıksuların işletme içerisindeki değerlendirilmesine yönelik bir uygulama örneği, Ulusal Sanayi ve Çevre Sempozyumu ve Sergisi.
- D'Annibale, A., Crestini, C., Di Mattia, E. and Giovannozzi Sermanni, G.**, 1996. Veratryl alcohol oxidation by manganese dependent peroxidase from *Lentinula edodes*, *J. Biotechnol.*, 48:231–239.
- 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.
- D'Annibale, A., Stazi, S. R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E. and Sermanni, G. G.**, 1999, Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment, *Process Biochemistry*, 34: 697–706.
- D'Annibale, A., Stazi, S. R., Vinciguerra, V. and Sermanni, G. G.**, 2000, Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater, *Journal of Biotechnology*, 77: 265–273.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- D'Annibale, A., Casa, R., Pieruccetti, F., Ricci, M. and Marabottini, R.,** 2004a, *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability, *Chemosphere*, 54: 887–894.
- D'Annibale, A., Ricci, M., Quaratino, D., Federici, F. and Fenice, M.,** 2004b, *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater, *Research in Microbiology*, 155:596-603.
- D'Annibale, A., Quaratino, D., Federici, F. and Fenice, M.,** 2006, Effect of agitation and aeration on the reduction of pollutant load of olive mill wastewater by the white-rot fungus *Panus tigrinus*, *Biochemical Engineering Journal*, 29: 243–249.
- Deschamps, A. M., Otuk, G. and Lebeault, J. M.,** 1983, Production of tannase and degradation of chestnut tannins by bacteria, *J. Ferment Technol.*, 61(1):55–59.
- Deschamps, A. M. and Lebeault, J. M.,** 1984, Production of gallic acid from tara (*Caesalpinia spinosa*) tannin by bacterial strains, *Biotechnol. Lett.*, 6: 237–242.
- Dharani Aiyer, P. V.,** 2004, Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27, *African Journal of Biotechnology*, 3(10):519-522.
- Dias, A. A., Bezerra, R. M. and Nazaré Pereira, A.,** 2004, Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater, *Bioresource Technology*, 92:7–13
- Di Gioia, D., Barberio, C., Marchetti, S. S. L. and Fava, F.,** 2002, Characterization of four olive-mill-wastewater indigenous bacterial strains capable of aerobically degrading hydroxylated and methoxylated monocyclic aromatic compounds, *Arch. Microbiol.*, 178 :208–217.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Dixon, M. and Webb, E.C.**, 1966, Enzymes, Longman Green & Co London.
- Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R. and Tikkanen, M.J.**, 2003, Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs, *Food Chemistry*, 83: 255–262.
- Droste R.L.**, 1997, Theory and Practice of Water and Wastewater treatment, John Wiley and Sons, Inc., New York, 800p.
- Duarte, E.A. and Neto I.**, 1996, Evaporation phenomenon as a waste management technology, *Wat. Sci. Tech.*, 33 (8):53-61.
- Erguder, T. H., Guven, E., Demirer, G. N.**, 2000, Anaerobic treatment of olive mill wastes in batch reactors, *Process Biochemistry*, 36:243–248.
- Ergun Ergül, F.**, 2004, Zeytin Karasuyunun Fiziksel ve Biyolojik Yöntemlerle İyileştirilmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 349s.
- Farias, G.M., Elkins, J.R. and Griffin, G.J.**, 1992, Tannase activity associated with growth of *Cryphonectria parasitica* on American and Chinese chestnut extracts and properties of the enzyme, *Eur. J. For. Path.*, 22:392–402.
- Fenice, M., Sermanni, G. G., Federici, F. and D’Annibale, A.**, 2003, Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media, *Journal of Biotechnology*, 100:77-85.
- Filibeli, A. ve Büyükkamacı, N.**, 2002, Karasuyun anaerobik biyolojik yöntemlerle arıtılabilirliğinin değerlendirilmesi, I. Zeytin Yağı Üretiminde Çevre Sorunları ve Çözümleri Uluslararası Çalıştay Bildiriler Kitabı, 67–76s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Froehner, S.C. and Eriksson, K.E.L.**, 1974, Purification and properties of *Neurosapora crassa* laccase, *Journal of Biotechnology*, 120(1): 458-465.
- Fountoulakis, M.S., Dokianakis, S.N., Kornaros, M.E., Aggelis, G.G. and Lyberatos, G.**, 2002, Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Water Research*, 36: 4735-4744.
- Galli, E. and Tomati, U.**, 2002, A common policy to face the problem of olive oil mill wastes, Proceedings of the 1st International Workshop on Environmental Problems in Olive Oil Production and Solutions Oral Presentations Text Book, 121-130 p.
- Ganga, P. S., Nandy, S. C. and Santappa, M.**, 1977, Effects of environmental factors on the production of fungal tannase, *Leather Sci.*, 24:8-16.
- García, I. G., Peña, P.R.J., Bonilla, Venceslada, J. L. B., Martín, A. M., Santos, M.A. M. and Gómez, E. R.**, 2000, Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*, *Process Biochemistry*, 35:751-758.
- Gharsallah, N., Labat, M., Aloui, F. and Sayadi, S.**, 1999, The effect of *Phanerochaete chrysosporium* pretreatment of olive mill waste waters on anaerobic digestion, *Resources Conservation and Recyclic*, 27:187-192.
- Graham, H.N.**, 1992, Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry, *Prev. Med.*, 21:334-350.
- Gupta, R., Bradoo, S. and Saxena, R. K.**, 1997, Rapid purification of extracellular tannase using polyethylene glycol-tannic acid complex, *Letters in Applied Microbiology*, 24:253-255.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Güngör, G.**, 2004, Zeytin Karasuyundan Biyokütle Elde Edilmesi ve Fenol Giderilmesine Etkisi, Yüksek lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 166s.
- Gürgün, V. ve Halkman, K.A.**, 1990, Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri, Gıda Teknolojisi Derneği, 146s.
- Hadi, T. A., Banerjee, R. and Bhattacharyya, B. C.**, 1994, Optimization of tannase biosynthesis by a newly isolated *Rhizopus oryzae*, *Bioprocess Engg.*, 11: 239–243.
- Hagerman, A. E. and Butler, L. G.**, 1978, Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins, *J. Agric. Food Chem.*, 26: 809–812.
- Hamdi, M.**, 1991, Effect of agitation and pretreatment on the batch anaerobic digestion of olive mill wastewater, *Biosource Technology*, 36:173-178.
- Hamdi, M., Khadir, A and Louis Garcia, J.**, 1991, The use of *Aspergillus niger* for the bioconversion of olive mill wastewaters, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34:828-831
- Haslam, E. and Tanner, R.J.N.**, 1970, Spectrophotometric assay of tannase, *Phytochemistry*, 9: 2305–2309.
- Huang, W., Ni, J. and Borthwick, A.G.L.**, 2005, Biosynthesis of valonia tannin hydrolase and hydrolysis of valonia tannin to ellagic acid by *Aspergillus* SHL 6, *Process Biochemistry*, 40:1245–1249.
- İkizoğlu, E. ve Haskök, S.**, 2005, Zeytin karasuyunun fiziksel kimyasal ve ileri yükseltgeme yöntemleriyle arıtımı, *Kimya Mühendisliği Dergisi*, 167: 8-12.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- İnan, H., Şimşek, H., Karpuzcu, M. ve Dimoglo, A.,** 2002, Elektrokimyasal Yöntemler ile Zeytinyağı Endüstrisi Karasuyunun Arıtılabilirliği, I. Zeytin Yağı Üretiminde Çevre Sorunları ve Çözümleri Uluslararası Çalıştayı Bildiriler Kitabı, 167–178s.
- Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthournhout, M. and Penninckx, M.J.,** 2003, Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters, *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 802–809.
- Jaouani, A., Tabka, M.G. and Penninckx, M.J.,** 2006, Lignin modifying enzymes of *Corioloopsis polyzona* and their role in olive oil mill wastewaters decolourisation, *Chemosphere*, 62:1421–1430.
- Kachouri, S., Halaouli, S., Lomascolo, A., Asther, M. and M. Hamdi,** 2005, Decolourization of black oxidized olive-mill wastewater by a new tannase-producing *Aspergillus flavus* strain isolated from soil, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21:1465–1470.
- Kar, B., Banerjee, R., and Bhattacharyya, B. C.,** 1998, Biotransformation of tannic acid to gallic acid by solid state fermentation. In: Pandey A, editor. *Advances in Biotechnology*, Educational Publishers and Distributors, New Delhi, 67–74 p.
- Kar, B., Banerjee, R. and Bhattacharyya, B. C.,** 1999, Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22:173-177.
- Kar, B. and Banerjee, R.,** 2000, Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25:29-38.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Kar, B., Banerjee, R. and Bhattacharyya, B. C.,** 2002, Optimization of physicochemical parameters for gallic acid production by evolutionary operation-factorial design technique, *Process Biochemistry*, 37:1395-1401.
- Kar, B., Banerjee, R. and Bhattacharyya, B.C.,** 2003, Effect of additives on the behavioural properties of tannin acyl hydrolase, *Process Biochemistry*, 38:1285-1293.
- Kasırğa E.,** 1988, Zeytinyağı Endüstrisi Atıksularının Anaerobik Biyolojik Stabilizasyon Yöntemi ile Arıtılması ve Kinetik Model Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 149s.
- Kerem, Z., Friesem, D. and Hadar, Y.,** 1992, Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4):1121-1127.
- Kiiskinen, L.,** 2004, Characterization and Heterologous Production of a Novel Laccase from *Melanocarpus albomyces*, PhD Thesis, Helsinki University of Technology, 94p.
- Kissi, M., Mountadar, M., Assobhei, O., Gargiulo, E., Palmieri, G. and Giardina, P., Sannia, G.,** 2001, Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water, *Appl Microbiol Biotechnol*, 57:221–226.
- Kumar, R. A., Gunasekaran, P., and Lakshmanan M.,** 1999, Biodegradation of tannic acid by *Citrobacter freundii* isolated from a tannery effluent, *Journal of Basic Microbiology*, 39:161-168.
- Kumar, R., Sharma, J. and Singh, R.,** 2006, Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves, *Microbiological Research*, (in pres).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Lacina, C., Germain, G. and Spiros, A.N.,** 2003, Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters, *African Journal of Biotechnology*, 12:620-630.
- Lagemaat, J. van de and Pyle, D. L.,** 2001, Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase, *Chemical Engineering Journal*, 84:115-123.
- Lagemaat, J. van de and Pyle, D. L.,** 2005, Modelling the uptake and growth kinetics of *Penicillium glabrum* in a tannic acid-containing solid-state fermentation for tannase production, *Process Biochemistry*, 40:1773-1782.
- Lamia, A. and Moktar, H.,** 2003, Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*, *Process Biochemistry*, 39:59- 65.
- Lekha, P.K. and Lonsane, B.K.,** 1994, Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid state, liquid surface and submerged fermentations, *Process Biochemistry*, 29:497–503.
- Lekha, P.K. and Lonsane, B.K.,** 1997, Production and application of tannin acyl hydrolase: state of art, *Adv. Appl. Microbiol.*, 44:215–240.
- Lewis, J.A. and Starkey, R.L.,** 1969, Decomposition of plant tannins by some soil microorganisms, *Soil Science.*, 107:235–241.
- Libuchi, S., Minoda, Y. and Yamada, K.,** 1966, Studies on acyl hydrolase of microorganisms. III. A new method determining the enzyme activity using the change of ultraviolet absorption, *Agric. Biol. Chem.*, 31:513-518.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Libuchi, S., Minoda, Y. and Yamada, K.,** 1967, Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms, *Agric. Biol. Chem.*, 31: 513–518.
- Libuchi, S., Minoda, Y. and Yamada, K.,** 1968, Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms. Part III. Purification of the enzyme and some properties of it, *Agric. Biol. Chem.*, 32: 803 – 809.
- Libuchi, S., Minoda, Y. and Yamada, K.,** 1972, Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase of *Aspergillus oryzae*, *Agricultural Biological Chemistry*, 31:553–1562.
- Lolos, G., Skordilis, A. and Parissakis, G.,** 1994, Polluting characteristics and lime precipitation of olive mill wastewater, *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Environmental Science and Engineering*, 29:1349-1356.
- Mahapatra, K., Nanda, R.K., Bag, S. S., Banerjee, R., Pandey, A. and Szakacs, G.,** 2005, Purification, characterization and some studies on secondary structure of tannase from *Aspergillus awamori nakazawa*, *Process Biochemistry*, 40:3251–3254.
- Mahendran, B., Raman, N. and Kim, D. J.,** 2006, Purification and characterization of tannase from *Paecilomyces variotii*: hydrolysis of tannic acid using immobilized tannase, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70:444 – 450.
- Martínez, L., Ramos-Comenzana, A., García, M. P. y Garrido, S. E.,** 1992, Biodegradación de compuestos fenólicos del alpechín con *Aspergillus terreus*, *Grasas Aceites*, 43:75–81.
- Mingshu, L., Kai Y., Qiang, H. and Dongying, J.,** 2006, Biodegradation of gallotannins and ellagitannins, *Journal of Basic Microbiology*, 46: 68–84.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Mitrakas, M., Papageorgiou, G., Docoslis, A. and Sakellaropoulos, G.,** 1996, Evaluation of various pretreatment methods for olive oil mill wastewater, *European Water Pollution Control*, 6: 10-16.
- Mondal, K.C., Banerjee, R. and Pati, B.R.,** 2000, Tannase production by *Bacillus licheniformis*, *Biotechnology Letters*, 0:767-769.
- Mondal, K. C. and Pati, B. R.,** 2000, Studies on the extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR 6, *Journal of Basic Microbiology*, 40(4): 223–232
- Mondal, K.C., Banerjee, D. and Pati, B.R.,** 2001, Colorimetric assay method for determination of the Tannin Acyl Hydrolase (EC 3.1.1.20) activity, *Analytical Biochemistry*, 295:168-171.
- Monteoliva-Sanchez, M., Incerti, C., Ramos-Cormenzana, A., Paredes, C., Roig, A. and Cegarra, J.,** 1996, The study of the aerobic bacterial microbiota and the biotoxicity in various samples of olive oil mill wastewaters (alpechin) during their composting process, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53:211-214.
- Mueller-Harvey, I.,** 2001, Analysis of hydrolysable tannins, *Animal Feed Science and Technology*, 91: 3-20.
- Mukherjee, G. and Banerjee, R.,** 2004, Biosynthesis of tannase and gallic acid from tannin rich substrates by *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus*, *Journal of Basic Microbiology*, 44(1):42-48.
- Murugan, K., Saravanababu, S. and Arunachalam, M.,** 2006, Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process, *Bioresource Technology*, 98(4):946-946.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Oktav, E., Şengül, F., Özer, A.**, 2001, Zeytinyağı endüstrisi atıksularının fizikokimyasal ve kimyasal yöntemlerle arıtımı, Ulusal Sanayi ve Çevre Sempozyumu, 19s.
- Oktav, E. ve Özer, A.**, 2002, Zeytinyağı Endüstrisi Atıksularının Özellikleri ve Arıtım Alternatifleri, I. Zeytin Yağı Üretiminde Çevre Sorunları ve Çözümleri Uluslararası Çalıştayı Bildiriler Kitabı, 51–65s.
- Oktav, E., ve Şengül, F.**, 2003, Zeytinyağı Üretimi Atıksularının Distilasyon Yöntemiyle Arıtımı, *SKKD*, 13 (3):8-17.
- Oktav, E., Çatalkaya, E. Ç. ve Şengül, F.**, 2003, Zeytinyağı Üretimi Atıksularının Kimyasal Yöntemlerle Arıtımı, *DEÜ Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5 (3):11-21.
- Oktav, E. ve Özer, A.**, 2004, Zeytinyağı Üretimi Atıksularının Fiziksel Arıtımı, Çevre 2004 I. Ulusal Çevre Kongresi, 235–240s.
- Oruç, N.**, 2002, Zeytin Karasuyunun Oluşumu ve Tarımda Kullanma Olanakları, I. Zeytin Yağı Üretiminde Çevre Sorunları ve Çözümleri Uluslararası Çalıştayı Bildiriler Kitabı, 15–23s.
- Öztürk Ürek, R.**, 2003, İmmobilize *Phanerocheate chrysosporium*'dan Mangan Peroksidaz Enziminin Üretimi, İzolasyonu ve Saflaştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 178s.
- Palmieri, G., Giardinai, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A. and Sannia, G.A.**, 1997, Novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*, *J. Biol. Chem.*, 272(50): 31301-31307.
- Palonen, H.**, 2004, Role of Lignin in the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose, PhD Thesis, Helsinki University of Technology, 80p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P.,** 1999, Solid-State fermentation for the production of industrial enzymes, *Curr. Sci.*, 77:149–162.
- Paraskeva, P. and Diamadopoulos, E.,** 2006, Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81:1475–1485.
- Pazarlıoğlu, N. K., Sarıışık, M. and Telefoncu, A.,** 2004, Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing, *Process Biochemistry*, 40:1673-1678.
- Pinto, G. A. S., Leite, S. G. F., Terzi, S. C. and Couri, S.,** 2001, Selection of tannase- producing *Aspergillus niger* strains, *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:24-26.
- Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L., Stanzione, M. and Temussi, F.,** 2003, Removal of low molecular weight phenols from olive oil mill wastewater using microalgae, *Biotechnology Letters*, 25: 1657-1659.
- Purohit, J. S., Dutta, J. R., Nanda, R. K. and Banerjee, R.,** 2006, Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*, *Bioresource Technology*, 97: 795–801.
- Pourrat, H., Regerat, F., Pourrat, A. and Jean, D.,** 1982, Production of Tannase (Tannin Acyl Hydrolase E.C. 3.1.1.20) by a strain of *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Lett.*, 4: 583– 588.
- Rajakumar, G. S. and Nandy, S.C.,** 1983, Isolation, purification and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase, *Applied and Environmental Microbiology*, 46(2):525-527.
- Ramírez-Coronel, M.A., Viniegra-González, G., Darvill, A. and Augur, C.,** 2003, A novel tannase from *Aspergillus niger* with β -glucosidase activity, *Microbiology*, 149: 2941–2946.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Rao, J.R. and Viraraghavan, T.,** 2002, Biosorption of phenol from an aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass, *Bioresource Technology*, 85:165-171.
- Robles, A., Lucas, R., Alvarez de Cienfuegos, G. and Gálvez, A.,** 2000a, Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds, *Bioresource Technology*, 74:217-221.
- Robles, A., Lucas, R., Alvarez de Cienfuegos, G. and Gálvez, A.,** 2000b, Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds, *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 484–490.
- Rout, S. and Banerjee, R.,** 2006, Production of tannase under mSSF and its application in fruit juice debittering, *Indian Journal of Biotechnology*, 5: 351-356.
- Rozzi, A. and Malpei, F.,** 1996 Treatment and disposal of olive mill effluents, *International Biodegradation & Biodegradation*, 38:135–144.
- Ruiz, J.C., Rubia, T., Pérez, J. and Lopez, J.M.,** 2002, Effect of olive oil mill wastewater on extracellular ligninolytic enzymes produced by *Phanerochaete flavidio-alba*, *FEMS Microbiology Letters*, 212:41-45.
- Sabu, A., Kiran G. S. and Pandey, A.,** 2005a, Purification and characterization of Tannin Acyl Hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620, *Food Technology Biotechnology*, 43: 133–138.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Sabu, A., Pandey, A., Jaafar Daud, M. and Szakacs, G.,** 2005b, Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620, *Bioresource Technology*, 96:1223–1228.
- Sabu, A., Augur, C., Swati, C. and Pandey, A.,** 2006, Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation, *Process Biochemistry*, 41:575-580.
- Sanderson, G.W. and Coggon, P.,** 1974, Green tea conversion using tannase and natural tea enzyme, U.S. Patent, Patent number: 3,812,266.
- Santa Anna, L.M., Sebastian, G.V., Menezes, E.P., Alves, T.L.M., Santos, A.S., Pereira Jr., N. and Freire, D.M.G.,** 2002, Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19(02):159–166.
- Sayadi, S. and Ellouz, R.,** 1995, Role of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1098–1103.
- Sayadi, S., Allouche, N., Jaoua, M. and Aloui, F.,** 2000, Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment, *Process Biochemistry*, 35:725–735.
- Saxena, S. and Saxena, R.K.,** 2004, Statistical optimization of tannase production from *Penicillium variable* using fruits (chebulic myrobalan) of *Terminalia chebula*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 39:99-106.
- Sánchez, S., Martínez, M.E., Espejo, M.T., Pacheco, R., Espinola F. and. Hodaifa, G.,** 2001, Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as the nutrient medium, *Journal of Applied Phycology*, 13:443–449.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Schlosser, D., Grey, R. and Fritsche, W.,** 1997, Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. distribution of extra and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood, *Applied Microbial Biotechnology*, 47: 412-418.
- Scherer, M. and Fischer, R.,** 2001, Molecular characterization of blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*, *FEMS Microbiology Letters*, 199:207-213.
- Seth, M. and Chand, S.,** 2000, Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori*—optimisation of process parameters, *Process Biochemistry*, 36:39-44.
- Sharma, S., Bhat, T. K. and Dawra, R. K.,** 1999, Isolation, purification and properties of tannase from *Aspergillus niger* van Tieghem, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15:673-677.
- Sharma, S., Bhat, T.K. and Dawra, R.K.,** 2000, A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine, *Analytical Biochemistry*, 279: 85-89.
- Sharma, S., Bhat, T.K. and Gupta, M.N.,** 2002, Bioaffinity immobilization of tannase from *Aspergillus niger* on concanavalin A-Sepharose CL-4B, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35:165-169.
- Shi, B., He, Q., Yao, K., Huang, W. and Qing L.,** 2005, Production of ellagic acid from degradation of valonea tannins by *Aspergillus niger* and *Candida utilis*, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80:1154–1159.
- Skene, I. K. and Brooker, J. D.,** 1995, Characterization of tannin acyl hydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*, *Anaerobe*, 1:321–327.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Siriwoharn, T., Wrolstad, R.E. and Durst, R.W.,** 2005, Identification of ellagic acid in blackberry juice sediment, *Journal of Food Science*, 70(3):189-197.
- Şengül, F.,** 1991, Endüstriyel Atıksuların Özellikleri ve Arıtılması, Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Yayınları, İzmir, 476s.
- Şengül, F., Oktav, E. ve Çokay-Çatalkaya, E.,** 2002, Zeytinyağı üretim prosesine bağlı olarak oluşan karasuyun kirlilik karakteristikleri ve arıtım teknolojileri, I. Zeytin Yağı Üretiminde Çevre Sorunları ve Çözümleri Uluslararası Çalıştayı Bildiriler Kitabı, 35-49 s.
- Treviño- Cueto, B., Luis, M., Contreras-Esquivel, J.C., Rodríguez, R., Aguilera, A and Aguilar, C.N.,** 2006, Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.), *Bioresource Technology*, 98(3):721-724.
- Tsioulpas, A.,** 2002, Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity, *Bioresource Technology*, 84: 251–257.
- Tsonis, S. P., Tsola, V. P. and Grigoropoulos, S. G.,** 1989, Systematic characterization and chemical treatment of olive oil mill wastewater, *Toxicology and Environmental Chemistry*, 20:437-457.
- Tuck, K. L. and Hayball, P. J.,** 2002, Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13:636–644.
- Wright, L. P.,** 2002, Biochemical Analysis for Identification of Quality in Black Tea (*Camellia sinensis*), PhD Thesis, University of Pretoria, 216p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Van Diepeningen, A.D., Debets, A.J.M., Varga, J. and Van Der Gaag, M.,** 2004, Efficient degradation of tannic acid by black *Aspergillus* species, *Mycol. Res.*, 108 (8): 919–925.
- Vermette, A.B.,** 2000, Removal of Cresols from Synthetic Wastewater Using Laccase, Msc Thesis, University of Windsor, 95p.
- Vinciguerra, V., D’Annibale, A., Monache, G.D. and Sermanni, G.G.,** 1995, Correlated effects during the bioconversion of waste olive waters by *Lentinus Edodes*, *Bioresource Technology*, 51:221-226.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gomez, S. J., Díaz-Godínez, G., Augur, C.,** 2003, Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems, *Biochemical Engineering Journal*, 13:157-167.
- Vitolo, S., Petarca, L. and Bresci, B.,** 1999, Treatment of olive oil industry wastes, *Bioresource Technology*, 67:129-137.
- Yamada, H., Adachi, O., Watanabe, M. and Sato, N.,** 1968, Studies on fungal tannase. Part I. formation, purification and catalytic properties of tannase of *Aspergillus flavus*, *Agric. Biol. Chem.*, 32:1070–1078.
- Yagüe, S., Terrón, M.C., González, T., Zapico, E., Bocchini, P., Galletti, G.C. and González, A.E.,** 2000, Biotreatment of tannin-rich beer-factory wastewater with white-rot basidiomycete *Coriolopsis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14:905-910.
- Yeşil Çeliktaş, Ö.,** 2005, Antioksidan Ekstrelerin Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) Bitkisinden ve Kallus Kültüründen Eldesi ve Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 184s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Yeşilada, Ö., Şık, S. and Sam, M.,**1999, Treatment of olive oil mill wastewater with fungi, *Turkish Journal of Biology*, 23:231-240.
- Yu, X., Li, Y., Wang, C., Wu, D.,** 2004, Immobilization of *Aspergillus niger* tannase by microencapsulation and its kinetic characteristics, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40:151-155.
- Zeida, M., Wieser, M., Yoshida, T., Sugio, T. and Nagasawa, T.,** 1998, Purification and characterization of gallic acid decarboxylase from *Pantoea agglomerans* T71, *Applied and Environmental Microbiology*, 64:4743-4747.
- Zhong, X., Peng, L., Zheng, S., Sun, Z., Ren, Y., Dong, M. and Xu, A.,** 2004, Secretion, purification, and characterization of a recombinant *Aspergillus oryzae* tannase in *Pichia pastoris*, *Protein Expression and Purification*, 36:165–169.

WEB Adresleri (Ağustos 2006)

<http://www.activin.com /TestingGSE.html>
<http://www.agbi.tsukuba.ac.jp/~aeng/nakagawa/English.htm>
<http://www.agro.cmu.ac.th/departement/BIOT/PROJECT/42130/4213063.pdf>
<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/biosyn.html>
<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/chemical.html>
<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/interaction.html>
<http://www.answers.com/topic/electrostatic-induction>
http://www.archwing.com/awi_news_olive_3.html
<http://www.benbest.com/nutrceut/EDTA.html>
<http://www.bentham.org/cmciema/sample/cmciema1-1/vaya/f3.gif>
http://www.biltek.tubitak.gov.tr/merak_ettikleriniz/biyogaz.doc
<http://www.biologie.uni-hamburg.de /b-online/e20/20d.html>
<http://www.biology.ualberta.ca/courses.hp/Bot250/phenylpr.pdf>
<http://www.biomatnet.org/publications/q30011a3.pdf>
http://www.cedgm.gov.tr/cevreatlasi/atlasin_metni.pdf
<http://www.fao.org/docrep/ V4510E/V4510E05.html>
<http://www.findaphd.com/search/printpage.asp?projectid=7331>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?dr+D01959
<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/armill.htm>
<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/lignin.jpg>
<http://www.istanbul.edu.tr/mbgak/bildiriler/Cevre/C1-12.pdf>
http://www.kikkoman.co.jp/bio/j/rinsyou/pdf/63_TAH.pdf
http://www.maden.org.tr/yeni3/yayinlar/raporlar/zeytincilik_madencilik.pdf
<http://www.maviegemuhendislik.com/Zeytin.htm>
<http://www.nato.int/ccms/s13/report/intrm40.html>
<http://pubs.usgs.gov/sir/2004/5121/pdf/sir2004-5121.pdf>
<http://www.staff.science.uva.nl/~knierop/research.html>
http://www.tdcolive.net/documents/booklet/biproduct_%20reusing.pdf
<http://www.tr.wikipedia.org/wiki/Tanen>
<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>
http://www.usm.maine.edu/~newton/Chy251_253/Lectures/BiopolymersI/BiopolymersI.html
http://www.usm.maine.edu/~newton/Chy251_253/Lectures/BiopolymersI/LigninAlcohols.GIF
<http://web.deu.edu.tr/cevmer/dokuman/KarasuRaporu.pdf>
http://www.webnaturel.com/index.asp?alt_cat_id=84&cat_id=17&ayrintiid=1088
http://www.webref.org/biology/c/constitutive_enzyme.htm
<http://www.zae.gov.tr/zeytinyagi/2.asp>
<http://www.zae.gov.tr/zeytinyagi/3.asp>
<http://www.zae.gov.tr/zeytinyagi/7.asp>
<http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/5tk02/44.pdf>

7. ÖZGEÇMİŞ

Bahar KANBEROĞLU

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi : 30 Kasım 1981
Doğum Yeri : MARDİN / Merkez
Medeni Hali : Bekâr

EĞİTİM

2003 – 2006 Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Bornova / İZMİR
1999 – 2003 Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (İng), Beytepe / ANKARA
1992 – 1999 Adana Seyhan Anadolu Lisesi (İng) , Seyhan / ADANA

STAJ

2001 Petkim Petrokimya, Etilen Oksit/Etilen Glikol Fabrikası (4 hafta)

PROJE

2003 MIKROBİYAL YOLLA LİPAZ ENZİMİ ÜRETİM SİSTEMLERİ
(Prof. Dr. Yeşim SAĞ denetiminde diploma projesi)
2004- 2005 ZEYTİN KARASUYUNUN BİYOLOJİK YOLLA İYİLEŞTİRİLMESİNDE TANNAZ
ENZİMİNİN ETKİSİ (Yrd. Doç. Dr. Gaye ÖNGEN denetiminde yüksek lisans tezi)

EĞİTİM VE SEMİNERLER

03-07 Mart 2003	İnsan Kaynakları ve Kişisel Gelişim Kongresi	Beytepe/ANKARA
21-24 Ekim 2003	Sürdürülebilir Kalkınma İçin Biyoteknoloji Çalıştayı	Bornova/İZMİR
08 Aralık 2003	Liderlik	Bornova/İZMİR
16 Aralık 2003	Kurum İçi İletişim	Bornova/İZMİR
17 Aralık 2003	TKY'de İnsan	Bornova/İZMİR
18 Şubat 2004	Zaman Yönetimi	Bornova/İZMİR
19 Şubat 2004	Etkin Yöneticilik	Bornova/İZMİR
20 Nisan 2004	SS	Bornova/İZMİR
26 Nisan 2004	Temel Kalibrasyon Eğitimi	Bornova/İZMİR
08-09 Mayıs 2004	TSE EN ISO: 9000- 2000 KALİTE YÖNETİM SİSTEMİ Temel Eğitimi	Bornova/İZMİR
07-08 Haziran 2004	Applied Course on Production and Monitoring of Microalgal Growth	Bornova/İZMİR

YABANCI DİL

İngilizce	Okuma: İyi Yazma: İyi	Konuşma: İyi
Almanca	Temel düzeyde	

BİLGİSAYAR

Microsoft Windows 98/2000/XP; Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint).

07 Ağustos- 26 Eylül 2004 Ege üniversitesi Bilgisayar Mühendisliği Bölümü WINDOWS 2000, Microsoft WORD-EXCEL ve İnternet Kullanımı KURS PROGRAMI