

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARLA LİNYİT KÖMÜRÜNDEN  
KÜKÜRT GİDERİMİ İÇİN OPTİMUM KOŞULLARIN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Pınar AYTAR**

**Balıkesir, Temmuz-2007**

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARLA LİNYİT KÖMÜRÜNDEN  
KÜKÜRT GİDERİMİ İÇİN OPTİMUM KOŞULLARIN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Pınar AYTAR**

**Balıkesir, Temmuz-2007**

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARLA LİNYİT KÖMÜRÜNDEN KÜKÜRT  
GİDERİMİ İÇİN OPTİMUM KOŞULLARIN BELİRLENMESİ


YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar AYTAR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bayram YILDIZ

Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇABUK

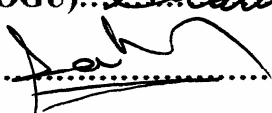
Sınav Tarihi: 24. 07 2007

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Bayram YILDIZ (Danışman-BAÜ).....

Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN (BAÜ).....

Doç. Dr. A. Dilek AZAZ (BAÜ).....

Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇABUK (Danışman-ESOGÜ).....

Yrd. Doç. Dr. Şahin SAVAŞCI (BAÜ).....

Balıkesir, Temmuz-2007

## ÖZET

# BEYAZ ÇÜRÜKÇÜL FUNGUSLARLA LİNYİT KÖMÜRÜNDEN KÜKÜRT GİDERİMİ İÇİN OPTİMUM KOŞULLARIN BELİRLENMESİ

Pınar AYTAR

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek lisans Tezi / Tez Danışmanları:  
Prof. Dr. Bayram YILDIZ – Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇABUK)

Balıkesir, 2007

Gelecek yıllarda dünyadaki birçok ülkede kömürün kullanımının artacağı düşünülmektedir. Ancak kömürde bulunan kükürt, hava kirliliğinin önemli sebeplerinden biridir. Bu çalışmada, laboratuvar ölçeğinde *Trametes versicolor* ve *Phanerochaete chrysosporium* türleri ile linyitteki kükürt giderimi değerlendirilmiş ve optimizasyonu yapılmıştır. Biyokütle çalışmalarının yanı sıra *T. versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi ile de kükürt giderimi çalışılmıştır.

Biyokütle çalışmalarında *Trametes versicolor* ve *Phanerochaete chrysosporium* için desülfürizasyon sonuçlarına göre uygun reaksiyon pH'ı 6, uygun sıcaklık 35 °C, kömür miktarı % 5 w/v olarak optimize edilmiştir. *Trametes versicolor* için 6, *Phanerochaete chrysosporium* için de 4 günlük inkübasyon süresi sonunda kükürt giderimi açısından yüksek verim alınmıştır. Serbest lakkaz kullanılarak gerçekleştirilen desülfürizasyon deneyleri sonucunda uygun reaksiyon pH'ı 3.3, uygun enzim miktarı 1 ml ve uygun sıcaklık 25 °C olarak belirlenmiştir. Biyokütle çalışmalarında kükürt gideriminin % 40'a ulaştığı belirlenirken, enzim çalışmalarında bu giderimin % 30-35 olduğu tespit edilmiştir. Kimyasal analizler sonucunda fungal uygulamadan sonra kömürdeki kalori değeri değişmemiş, kül miktarının ise azaldığı belirlenmiştir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Beyaz çürükçül mantarlar (funguslar), linyit kömürü, biyodesülfürizasyon

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF OPTIMUM CONDITIONS FOR SULPHUR REMOVAL FROM LIGNITE COAL WITH WHITE ROT FUNGI

Pınar AYTAR

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology

(M. Sc. Thesis / Supervisor: Prof. Dr. Bayram YILDIZ  
Cosupervisor: Asist. Prof. Dr. Ahmet ÇABUK)

Balıkesir-Turkey, 2007

Use of coal is expected to increase in many countries of the world during next decades. However sulphur in coal a major problem for air pollution. In this study, desulphurization of lignite with *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium* species was investigated and made optimization in laboratory scale. In addition to these biomass studies, enzymatic studies with laccase produced from *Trametes versicolor* also were studied sulphur removal.

At biomass studies, optimum desulphurization results for *T. versicolor* and *P. chrysosporium* are found pH 6, 35 °C, for pulp density 5% w/v. After incubation 6 days for *T. versicolor* and 4 days for *P. chrysosporium* in terms of removal sulphur was exhibited high performance. By using free laccase performed desulphurization experiments showed convenient pH of reaction, enzyme amount and temperature 3.3, 1 ml and 25 °C, respectively. While at biomass studies sulphur removal reached 40%, at enzyme studies this rate reached 30-35%. As a result of the chemical analyses of coal, calorific value of coal was stable and ash content was reduced after fungal treatment.

**KEYWORDS:** White rot fungi, lignite coal, biodesulphurization

## İÇİNDEKİLER

ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORD	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Kömürün Yapısı	4
1.2 Kömürde Bulunan Kükürt Tipleri	5
1.3 Kükürt Giderim Teknolojileri	5
1.3.1 Kükürt Gideriminde Fiziksel Yöntemler	6
1.3.2 Kükürt Gideriminde Kimyasal Yöntemler	6
1.3.3 Kükürt Gideriminde Biyolojik Yöntemler	7
1.3.3.1 İnorganik Kükürdü Biyolojik Yolla Uzaklaştırma Mekanizması	7
1.3.3.2 Organik Kükürdü Biyolojik Yolla Uzaklaştırma Mekanizması	9
1.3.3.3 Kömürün Biyolojik Kükürt Gideriminde Kullanılan Mikroorganizmalar	10
1.4 Kömürün Sıvılaştırılması (Solubilizasyonu)	12
1.5 Kömürde Bulunan Kükürt Bileşiklerini Tanımlamada ve Ölçmede Kullanılan Yöntemler	13
1.6 Kömürde Biyodesülfürizasyon Potansiyeli ve Önerilen Biyoreaktörler	15
1.7 Beyaz Çürükçül Funguslar	17
1.7.1 <i>Trametes versicolor</i>	18
1.7.1.1 Sinonimleri	18
1.7.1.2 Sistematik Yeri	19
1.7.1.3 Özellikleri	19
1.7.1.4 Ekolojisi	20
1.7.1.5 Enzimleri ve Etkileri	20
1.7.2. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	21
1.7.2.1 Sinonimleri	21
1.7.2.2 Sistematik Yeri	21
1.7.2.3 Özellikleri	21
1.7.2.4 Ekolojisi	22

1.7.2.5 Enzimleri ve Etkileri	22
1.8 Fungal Enzimler	23
1.8.1 Fenol Oksidazlar ve Peroksidazlar	27
1.8.1.1 Lakkaz (EC 1.10.3.2 para-difenol: oksijen oksidoredüktaz)	29
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	32
2.1 Çalışmalarda Kullanılan Funguslar	32
2.2 Kömür Örneklerinin Temini ve Numune Hazırlanması	32
2.3 Kömürden Beyaz Çürükçül Fungusların Biyokütleleri ile Kükürt Gideriminin Optimizasyonu	33
2.3.1 Ortam pH'sının Desülfürizasyona Etkisi	34
2.3.2 Ortam Sıcaklığının Desülfürizasyona Etkisi	35
2.3.3 Kömür Miktarının Desülfürizasyona Etkisi	35
2.3.4 İnkübasyon Süresinin Desülfürizasyona Etkisi	35
2.3.5 Kömür Partikül Boyutunun Desülfürizasyona Etkisi	36
2.3.6 Sterilizasyonun Kükürt Giderimi Üzerindeki Rolü	36
2.3.7 Kimyasal Ön Uygulamanın Desülfürizasyona Etkisi	36
2.4 İşlem Gören Kömürde Kükürt Gideriminde Lakkazın Kullanılabilirliği	37
2.4.1 Lakkaz Üretim Ortamının Hazırlanması	38
2.4.2 Besiyerlerine Ekim ve Üretim	38
2.4.3 Lakkaz Aktivitesinin Ölçümü	38
2.4.4 Lakkaz Enzimi ile Optimum Desülfürizasyon Koşullarının Belirlenmesi	39
2.4.4.1 Sıcaklığın Etkisi	39
2.4.4.2 Enzim Miktarının Etkisi	39
2.4.4.3 Ortam pH'sının Etkisi	39
2.4.4.4 Kömürün Yıkanması	40
2.5 Kükürt Analizleri	40
2.6 Kömürün Kimyasal Analizleri	41
3. BULGULAR	44
3.1 Biyokütle Çalışmalarında Elde Edilen Sonuçlar	44
3.1.1 Ortam pH'ının Kükürt Giderimi Üzerine Etkisi	44
3.1.2 Ortam Sıcaklığının Kükürt Giderimi Üzerine Etkisi	45
3.1.3 Kömür Miktarının Kükürt Giderimi Üzerine Etkisi	45
3.1.4 İnkübasyon Süresinin Kükürt Giderimi Üzerine Etkisi	46
3.1.5 Kömür Partikül Boyutunun Kükürt Giderimi Üzerine Etkisi	47
3.1.6 Sterilizasyonun Kükürt Giderimi Üzerindeki Rolü	48
3.1.7 Kimyasal Ön Uygulamanın Desülfürizasyona Etkisi	49
3.2 Enzim Çalışmaları	49
3.2.1 Serbest Lakkaz Enziminin Kükürt Giderimi Üzerine Etkisi	49
3.2.1.1 Sıcaklığın lakkaz enzimi ile desülfürizasyon üzerine etkisi	50
3.2.1.2 Enzim Miktarının Desülfürizasyon Üzerine Etkisi	50
3.2.1.3 Ortam pH'sının lakkaz enzimi ile desülfürizasyon üzerine etkisi	51
3.3 Kömürün Kimyasal Analizleri	52
3.4 Kükürt Emisyon Değerleri	52
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
KAYNAKÇA	64

## KISALTMALAR

<b><u>Kısaltma</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
ATCC	American Type Culture Collection, U.S.A
°C	Santigrat Derece
wt	weight (ağırlık)
ml	Mililitre ( $10^{-3}$ litre)
nm	Nanometre ( $10^{-9}$ m)
$\mu$ l	Mikrolitre ( $10^{-6}$ litre)
ASTM	American Society of Testing Materials
$\mu$ m	Mikrometre
kDa	Kilodalton
mM	Milimolar
U/ml	Ünite/mililitre
cal/g	Kalori/gram
°K	Kelvin
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektrometre
IR	İnfrared



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Doğrudan bakteriyel mekanizmada mineral yüzeyine tutunmuş bakterilerin şematik görünümü	8
Şekil 1.2	Dolaylı bakteriyel mekanizmanın şematik görünümü	9
Şekil 1.3	<i>T. versicolor</i> lakkazının X ışını kristallografisi	30
Şekil 1.4	<i>T. versicolor</i> 'dan elde edilen lakkazın kristal yapısı	30
Şekil 2.1	Numune hazırlama esnasında kullanılan kömür öğütme cihaz	33
Şekil 2.2	İnkübasyon için kullanılan çalkalamalı inkübatör	34
Şekil 2.3	İnfrared metodun mekanizması	41
Şekil 2.4	Kömür kükürt ölçüm cihazı	42
Şekil 2.5	Kömürün uçucu madde ve kül/nem miktarı ölçüm cihazı	43
Şekil 2.6	Kömür kalori ölçüm cihazı	43
Şekil 3.1	Farklı pH değerlerinde <i>T. versicolor</i> ve <i>P. chrysosporium</i> ile kükürt giderimi	44
Şekil 3.2	Farklı sıcaklık değerlerinde <i>T. versicolor</i> ve <i>P. chrysosporium</i> ile kükürt giderimi	45
Şekil 3.3	Farklı kömür miktarları ile işlem görmüş <i>T. versicolor</i> ve <i>P. chrysosporium</i> 'un desülfürizasyon potansiyeli	46
Şekil 3.4	<i>T. versicolor</i> ve <i>P. chrysosporium</i> ile kükürt gideriminde inkübasyon süresinin etkisi	47
Şekil 3.5	Partikül boyutunun desülfürizasyon üzerine etkisi	48
Şekil 3.6	Sterilizasyonun kükürt giderimi üzerindeki rolü	48
Şekil 3.7	Kimyasal ön uygulamanın desülfürizasyona etkisi	49
Şekil 3.8	Farklı sıcaklıklarda inkübasyona bırakılan lakkazın desülfürizasyondaki rolü	50
Şekil 3.9	Enzim miktarının lakkaz enzimi ile desülfürizasyon üzerine etkisi	50
Şekil 3.10	Farklı pH ortamlarında lakkazın desülfürizasyondaki rolü	51

## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1. Endüstriyel ve çevresel proseslerde enzim uygulamaları	24
Çizelge 1.2. Funguslardan elde edilen endüstriyel enzim örnekleri	26
Çizelge 3.1 Kömürün kalori ve kül analizleri	51
Çizelge 3.2 İşlem görmemiş ve mikrobiyal işlem görmüş kömürün kükürt emisyon değerlerinin karşılaştırılması	53

## ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimimin ilk gününden itibaren tecrübe ve bilgisiyle beni her zaman destekleyen ve yönlendiren çok değerli Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Bayram YILDIZ'a, bu çalışmanın planlanması ve gerçekleştirilmesinde yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tez çalışmam boyunca her türlü öneri, eleştiri ve rehberlikleriyle bugüne gelmemi sağlayan değerli Danışman Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇABUK'a ve Sayın Dr. Mesut ŞAM'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Kömür analizlerinin yapılması sırasında destek olan Garp Linyit İşletmeleri Kömür Kalite Kontrol Laboratuvarı sorumlularından Emir BARUT ve Ayfer PARLAK'a ve diğer tüm çalışanlarına sağladıkları laboratuvar olanakları için teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Serap GEDİKLİ, Özge TABAK, Yasemin ÖZEL, Gamze GÖKTAN ve destek olan tüm arkadaşlarıma minnettarım.

Tez çalışmam sırasında bana burs desteği sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tezim süresince her türlü fedakarlığı gösteren, ilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, benim için her zaman moral kaynağı olan sevgili aileme teşekkür ederim.

Balıkesir, 2007

Pınar AYTAR

## 1. GİRİŞ

Kömür, geri dönüşümü olmayan fosil bir yakıttır ve yüzyıllardır başlıca enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır [1]. Fosil yakıtlar sadece enerji hammaddesi değildir. Boya, plastik, eczacılık, kozmetik, demir-çelik, alüminyum gibi birçok endüstrinin ana girdilerinin üretildiği hammaddelerdendir [2]. Fosil yakıtlar arasında kömür % 75’lik pay ile ilk sırada yer almaktadır. Avrupa Birliği’nin 2020 yılı enerji talep projeksiyonunda; enerji kaynakları paylarındaki en büyük artış da kömürde görülmektedir [3]. Bugünkü tüketim seviyeleri ile dünya petrol rezervlerinin 40 yıl, doğalgaz rezervlerinin 60 yıl ve linyit rezervlerinin ise 156 yılda tükeneceği tahmin edilmektedir. Kömür, rezerv miktarının fazla olmasının yanında yaygın ve güvenilir olması ile de dünyanın en önemli enerji kaynaklarından biri olmaya devam edecektir. Fosil kaynaklardan petrol ve doğalgaz rezervlerinin ülkemizde az olması, gelecekte kömürün bugünkünden daha fazla ön planda tutulacağını göstermektedir. Linyit üretimimiz 2 milyon tonla Dünya linyit üretiminin %8,4’ünü oluşturmaktadır. Bu rakamlar dünya genelinde “bilinen birincil enerji kaynakları içinde en uzun ömürlü olanı kömürdür” şeklindeki saptamanın Türkiye için de geçerli olduğunu göstermektedir [2]. Çıkarılan linyitler genel olarak ya ısınma amaçlı ya da termik santrallerde ve çimento fabrikaları gibi kuruluşlarda endüstriyel amaçlı kullanılmaktadırlar [4]. 2006 yılı istatistik verilerine göre ülkemizde, linyitle çalışan termik santrallerden elde edilen elektrik enerjisi, elde edilen toplam elektrik enerjisinin % 18.37’sini oluşturmaktadır [5]. Bu da linyitin ülkemiz için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Üstelik temiz üretim teknolojileri ile daha kaliteli linyitler üretilirse yerli kaynağımız olan bu yakıtın kullanım oranının daha da artacağı düşünülmektedir. Bu kaynağımızın etkin kullanımının sağlanmasına yönelik bugüne kadar ulusal bir enerji politikası ise oluşturulamamıştır [2].

Anadolu genç bir kara kütlesi olduğu için çıkarılan kömür de kömürleşme sürecini tamamlamamış olan linyittir. Bu linyitlerin özelliği ısı değerinin düşük, kül, nem ve kükürt oranlarının yüksek olmasıdır. Bunun için kömürlerimizin

zenginleştirilmesi, değerlendirilemeyen kayıp rezervlerimizin işlenmesi ve çevreye daha az zarar vermesinin sağlanması gerekmektedir. İthal kömürlerle rekabet koşullarının oluşturulması amacıyla temiz kömür teknoloji tesisleri yaygınlaştırılmalıdır [2].

Global olarak kömürler % 1–3 wt kükürt içerirler [6]. Bu yakıtlardan gelen kükürt emisyonu (kimyasal reaksiyonlar ve yakma süreçleri esnasında ortam havasına karışan tüm gaz ve partiküller) evrensel bir problemdir. Kömür yandığı zaman bünyesinde bulunan kükürt, oksijen ile birleşerek SO<sub>2</sub> ve SO<sub>3</sub> formuna dönüşür. Bu bileşikler de havanın nemi ile birleşerek H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'e dönüşüp asit yağmurları şeklinde yeryüzüne düşer. Asit yağmurları, hem canlılar açısından hem de çevreye verdiği zarar açısından önem taşır. Asit yağmurları ilk etkisini bitkiler üzerinde göstermektedir. Yaprak lekeleri, yaprak kurumaları, yaprak ve meyve dökülmeleri, bitkilerin büyümesinin durması ve bitkilerin ölümü dolayısıyla ormanların ve tarım ürünlerinin zarar görmesi asit yağmurlarının sonuçlarındandır. Bunun yanı sıra SO<sub>2</sub> emisyonunun artması ile insanlarda solunum ve cilt hastalıklarının artması da paralellik göstermektedir [7].

Kömürde kükürdün yüksek olması endüstride özellikle işleme ve bakım esnasındaki maliyeti artırmaktadır. Yüksek kükürt, tüketicilerin işleme ve bakım maliyetini de artırmaktadır, çelik üretiminde ve termik santrallerde korozyona ve SO<sub>2</sub> emisyonuna neden olmaktadır [8]. Bu nedenle hem çevre ve insan sağlığı açısından hem de endüstriyel açıdan maliyeti düşürmek için SO<sub>2</sub> gibi gazların konsantrasyonlarının azaltılması gerekmektedir. Bazı ülkeler bu problemi fark etmişler, SO<sub>2</sub>'nin emisyonunu azaltmayı önemsemişler ve bu konuda yaptırımlar uygulamaya başlamışlardır [1].

Günümüzde, doğal kaynakların çevreyi kirletmeden en etkili biçimde kullanılması önem kazanmıştır. Ülkelerin enerji politikası; verimlilik, güvenilirlik, süreklilik ilkelerini uygulayarak ve çevre üzerindeki olumsuz etkileri en aza indirgeyerek enerji planlamasına dayalı ekonomik ve sosyal kalkınmayı da destekleyebilecek ölçüde olmalıdır. Enerji politikası kapsamında, yerli kaynakların bu ilkelere uyularak mümkün olduğunca hızlı bir şekilde devreye girmesi gerekir.

Bunlar ülkenin gelişmişlik düzeyini belirleyen göstergelerdir. Bu bağlamda sürdürülebilir enerji politikası benimsenmelidir. Sürdürülebilir enerji kavramı, tüm birincil enerji kaynaklarından yapılan enerji üretiminin yüksek verimle ve temiz teknolojilerle gerçekleştirilmesini, fosil yakıtların çevre dostu yeni teknolojilerle değerlendirilmesini, bir çevrimde atık biçimde ortaya çıkan enerjinin, bir başka çevrimde girdi olarak kullanılmasını kapsayan ve bunu ekonomik büyüme ile bütünleştiren bir kavramdır [9].

Dünyada uluslararası anlaşmalarla denetim altına alınmaya çalışılan çevre sağlığı konusunda, kimyasal süreçlere alternatif olarak biyolojik işlemlerin uygulanması da giderek ivme kazanmaktadır. Temiz enerji üretimiyle temiz bir çevre elde edilmek istenmesinin yanı sıra aynı zamanda var olan teknolojilere yapılan harcamaları azaltmak, zaman ve verim açısından kazanç sağlamak biyolojik tekniklerin amaçları arasında sıralanabilir. Bu tekniklere verilebilecek örneklerden biri biyolojik iyileştirme (biyoremediasyon). Biyo-iyileştirme, çevrede bulunan kirleticileri yok etmek ya da toksinlerinden arındırmak için organizma ya da ürünlerinin kullanılmasıdır. Atıkların biyolojik yolla parçalanması yüzyıllardır bilinen bir olgudur. Ancak etkili, düşük maliyetli çevresel iyileştirme ve büyük ölçekli teknolojik uygulamalar açısından bu işlemlerin kullanılması konusunda son zamanlarda ciddi girişimlerde bulunmaktadır [10]. Endüstriyel mikrobiyolojinin gelişmesine koşut olarak biyoteknoloji gelişme göstermiştir. Böylece çeşitli alanlarda mikroorganizmalar ya da onların enzimleri kullanılarak ekonomik ve etkili bir yaklaşım sunulmaktadır. Bu durumun sağladığı olanakları sosyo-ekonomik hayatta her geçen gün hem nitel hem de nicel örnekleri ile görmekteyiz [11, 12].

Funguslar geniş metabolik aktiviteleri ve üretimlerinin kolay olması sebebi ile biyoyiyeleştirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle beyaz çürükçül funguslar gerek biyolojik parçalanmada gerekse biyolojik giderimde önemli rol oynamaktadırlar. Bu funguslar, organik moleküllere etkili özgül olmayan çeşitli enzimleri üretebilmektedir. Bu yüzden beyaz çürükçül funguslar, diğer mikroorganizmalardan farklı bir şekilde parçalanmaya karşı dirençli kirleticilerin yıkımında etkin olarak kullanılabilirler [12].

Bu tez çalışmasında, *Trametes versicolor* ve *Phanerochaete chrysosporium* biyokütlelerinin linyit kömüründeki kükürdün giderilmesinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Söz konusu biyokütleler ile linyit kömüründen kükürt uzaklaştırılması için gereken uygun koşullar deneme grupları ile kıyaslamalı olarak optimize edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca, *T. versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi ile de kükürt giderimi çalışmaları yapılmıştır. Kükürt giderimi konusunda alanda biyolojik iyileştirme teknolojisinin (ex-sitü) geliştirilmesi ve çalışmanın uygulamaya aktarılması beklenen yararlar arasındadır.

Avrupa Birliği'ne girme aşamasında alınması gereken önlemlerden biri olan "Temiz Enerji-Temiz Çevre-Temiz Teknoloji bütünlüğünü gerçekleştirebilmek için çok sayıda araştırma yapılan Çevre Biyoteknolojisi; gelişmiş ülkelerde son yıllarda yatırım sektörü haline gelmiştir. Bilimin ancak teknolojiye kazandırıldığı ölçüde anlam kazanabileceği ve bu sayede kendi teknolojimizi kendimiz üretebildiğimiz zaman bağımsız bir ekonomiye sahip olabileceğimiz, böyle bir vizyonun da ülkemizin bilim politikasında rol oynaması gerektiği kabul gören bir gerçektir. Beyaz çürükçül funguslarla kükürt giderimi üzerine yapılan bu araştırmanın özellikle Çevre Biyoteknolojisi konusunda biyoteknoloji bilimine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

## 1.1 Kömürün Yapısı

Kömür günümüz turbalıklarına benzer bataklık kökenli fosil bir yakıttır. Kömür, bataklık şartlarının değişmesi ve buralarda biriken organik maddelerin değişime uğraması ile oluşan organik bir kayaç olarak tanımlanabilir. Kömür üç boyutlu kompleks polimerik bir sistemdir [8]. Kömürün, petrol ve doğalgaz gibi diğer fosil yakıtlarla karşılaştırıldığında porlu makromoleküler bir ağ yapısına sahip olduğu görülmektedir. Kömürdeki bu porlar, organik maddenin girişi için yüzey alanının artmasını sağlamaktadır. Kömürde bulunan aromatik ve naftenik halkalar bir diğer halkaya alifatik zincir veya heteroatomlarla bağlanırlar. Bu kovalent köprülere ilaveten elektrostatik bağ ile kömüre entegre olan hidroksil gibi polar

gruplar da vardır. Oksijen de bu yapının içinde farklı kimyasal formlarda yer alır [13].

## 1.2 Kömürde Bulunan Kükürt Tipleri

Kükürt, kömürde hem organik formda (özellikle dibenzotiyofen ve benzotiyofen gibi halkalı yapılar) hem de inorganik formda ( $\text{FeS}_2$  gibi) bulunur. Kömürdeki inorganik kükürt baskın olarak sülfid ve sülfatlardan oluşur. Sülfid mineralleri pirit ( $\text{FeS}_2$ ), sfalerit ( $\text{ZnS}$ ), galen ( $\text{PbS}$ ), arsenopirit ( $\text{FeAsS}$ ) gibi bileşiklerdir. Sülfat mineraller ise barit ( $\text{BaSO}_4$ ), jips ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), anhidrit kalsiyum sülfat ( $\text{CaSO}_4$ ) ve birçok demir sülfat bileşikleridir [14]. Pirit genel olarak kömürdeki baskın inorganik kükürt bileşiğidir. Pirit parçaları tüm kömürde kristal formda rasgele dağılmıştır, fakat kömüre bağlı değildir. Organik kükürt kovalent olarak kömürün kompleks yapısına bağlanmıştır. Pirit ve inorganik kükürt bileşiklerinin aksine organik kükürdün fiziksel ve kimyasal işlemlerle uzaklaştırılması zordur [15]. Kömürdeki organik kükürt, hem alifatik hem de aromatik veya heterosiklik bileşikler şeklindedir ve genel olarak 4 grupta sınıflandırılabilir:

- 1) Alifatik veya aromatik tiyoller (merkaptanlar, tiyofenoller)
- 2) Alifatik, aromatik veya karışık sülfidler (tiyoeterler)
- 3) Alifatik, aromatik veya karışık disülfidler (ditioeterler)
- 4) Heterosiklik bileşikler veya tiyofen tip (dibenzotiyofenler) [16].

## 1.3 Kükürt Giderim Teknolojileri

Hava kirliliğinin önemli sebeplerinden olan kükürt kaynaklarından biri, yakıt olarak kullanılan kömürlerdir. Atmosfere karışan  $\text{SO}_2$  miktarının azaltılması için en iyi yöntemin kömürü yakmadan önce kükürdün giderilmesi olduğuna inanılmaktadır. Yüksek kükürtlü kömürlerde, kükürt giderimi daha yararlı olmaktadır [17]. Kükürt giderim teknikleri fiziksel, kimyasal ve biyolojik olabilir.



### 1.3.1 Kükürt Gideriminde Fiziksel Yöntemler

Kükürdü uzaklaştırmak amacıyla uygulanan fiziksel işlemlerde kömür parçalanır, öğütülür ve yıkanır. Kömürün yıkanmasının kükürt emisyon değerlerinin azaltılmasında olumlu bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Gelenekselleşmiş olan fiziksel yöntemde inorganik kükürt giderilmekte ve kükürt emisyon değerinin % 20-30'a kadar azaltıldığı bilinmektedir. Ancak fiziksel yöntemin kömürdeki organik kükürt üzerinde etkisi yoktur [18].

### 1.3.2 Kükürt Gideriminde Kimyasal Yöntemler

Yukarıda da belirtildiği gibi fiziksel yöntemler, kömürdeki inorganik kükürdü bile uzaklaştırmada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle kimyasal yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemler, farklı ortamlarda karbonizasyon, hava oksidasyonu, nem oksidasyonu, Meyers prosesi, klorlama ve sodyum hidroksit, bakır klorit ve etanol solusyonları ile ekstraksiyondur [19]. Bunun yanı sıra piritik ve arseno piritik gibi inatçı sülfidik minerallerin, bazlarla ön uygulamasının, liçing (süzmek suretiyle çözünebilen bileşikleri ortamdan uzaklaştırma süreci) için oldukça etkili olduğu bulunmuştur [6]. Pysh'yev ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada, kükürt açısından zengin kömürlerin oksidatif desülfürizasyonu, akışkan yatak reaktörde hava/ buhar karışımı ile 623–723 °K sıcaklık aralığında çalışılmıştır [20].

Diğer bir kimyasal yöntem de gama ışınları ile uyarılan klorlamadır. Bu yöntemle Tripathi ve arkadaşları tarafından kükürdün hem organik hem de inorganik formunun uzaklaştırılabildiği gösterilmiştir. Klorlama için  $CCl_4$ ,  $CCl_4/H_2O$  ve  $CCl_4/CH_3OH$  kullanmışlar ve kömürde bulunan toplam kükürdü % 37'ye kadar uzaklaştırabilmişlerdir [21].

Fizikokimyasal bir yöntem olan su ile kükürt giderimi (hidrodesülfürizasyon) kükürdü uzaklaştırmada kullanılan alternatif yöntemlerden biri olarak bilinmektedir. Hidrodesülfürizasyon, kükürdün hidrojen sülfide çevrildiği yüksek basınçta (10–17 atm) ve yüksek sıcaklıkta (200-415 °C) gerçekleşen bir işlemdir. Kimyasal işlemler

veya hidrodesülfürizasyon işlemi kullanıldığı zaman yüksek reaksiyon oranları gerçekleşmektedir (% 90 inorganik ve % 10 organik kükürt uzaklaştırma). Ancak bu işlemlerle maliyet yükselir, tehlikeli ürünlerin oluşma riski vardır ve kömürün yapısal bütünlüğü etkilenir. Ayrıca kömürün yanabilir kısmı azalmaktadır. Bu tip yöntemler, organik kükürt bileşiklerinde, özellikle heterosiklik poliaromatik kükürt bileşiklerinde çalışmazlar [1].

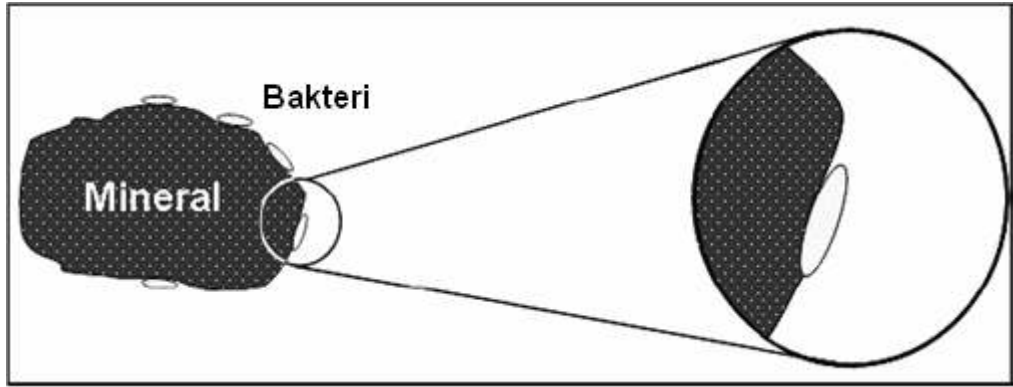
### **1.3.3 Kükürt Gideriminde Biyolojik Yöntemler**

Fiziksel ve kimyasal yöntemlerden doğan handikaplar, araştırmacıları daha avantajlı olan biyolojik yöntemlere yönlendirmiştir. Biyolojik yöntemler zararsız reaksiyon ürünlerin oluşumunu sağlar, ılımlı şartlar altında gerçekleşir ve kömürün değerini etkilemez. Biyodesülfürizasyon, bir diğer ifade ile mikrobiyal kükürt giderimi; kömürdeki kükürdün sülfat gibi suda kolay çözünen bir bileşiğe dönüştürülmesidir. Bu da bir oksidasyon olayıdır. Biyodesülfürizasyon aerobik mikroorganizmalar tarafından katalizlenen biyokimyasal bir reaksiyondur. Biyolojik yöntemler, hem organik kükürdün bir kısmını hem de karbonlu matrikste yayılan piritik kükürdü elimine eder. Bu yöntem düşük enerji tüketimi ile basit uygulamalı kullanım süreçlerini içerir [22, 23].

#### **1.3.3.1 İnorganik Kükürdü Biyolojik Yolla Uzaklaştırma Mekanizması**

Kömürden inorganik kükürdün mikrobiyal yolla uzaklaştırılabileceği son 30 yılda çalışılmış ve birçok laboratuvarında kanıtlanmıştır [16]. Uygun inorganik tuz solusyonlarında iyice öğütülmüş piritin sulu süspansiyonlarında termofilik veya mezofilik mikroorganizmaların varlığı, minerallerin ayrılma kinetiklerini artırır. Mikroorganizmalar ile piritin biyolojik olarak katalizlenmiş oksidasyonu için 2 mekanizma önerilmiştir: doğrudan mekanizma ve dolaylı mekanizma. 1967'de Silverman tarafından yapılan bir çalışmada, doğrudan bakteriyel mekanizmada bakteri ve kükürtlü mineral arasında fiziksel bir temas olduğu ve metal sülfata oksitlemenin çeşitli aşamalarla tamamen biyolojik tepkimelerle meydana geldiği

belirtilmiştir [24]. Doğrudan mekanizmada, kükürtlü mineral olan pirit, herhangi bir ara ürün oluşmaksızın biyolojik olarak oksitlenmektedir. Burada mikroorganizma ile pirit partikülleri arasında fiziksel bir temas meydana gelir [18]. Bu mekanizma, bakteri hücrelerinin sülfid kristal yüzeye saldırması ve bakteriyel dış zar ile sülfid yüzeyi arasında yerleşmiş ince filmde korozyonun meydana gelmesi ile oluşan heterojen bir işlem olarak düşünülmektedir (Şekil 1.1).

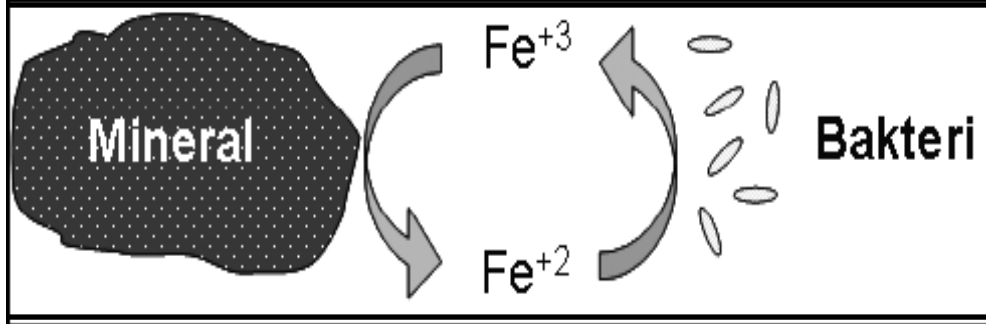


Şekil 1.1 Doğrudan bakteriyel mekanizmada mineral yüzeyine tutunmuş bakterilerin şematik görünümü [25].

Bazı kömür porlarına girebilmesi açısından mikroorganizmaların büyük olması sebebiyle belli kömürlerde pirit oksidasyonunun doğrudan mekanizması sınırlanabilir. Bu; kömürdeki pirit oksidasyonunda dolaylı mekanizmanın daha avantajlı olduğunu göstermektedir (Şekil 1.2). Dolaylı mekanizma, sadece mikroorganizmalar tarafından üretilen liçing reaktiflerinin rol oynadığı işlemleri kapsamaktadır (Şekil 1.2). Dolaylı işlemde, her zaman kükürtlü mineraller ile birlikte bulunan piritin bakteriyel oksidasyonu ile elde edilen  $Fe^{+3}$  iyonları oksitleyici olarak görev almaktadır [25]. Bu mekanizmada, mikroorganizmalar, ferro demiri ( $Fe^{+2}$ ) ferrik demire ( $Fe^{+3}$ ) okside eder; bu  $Fe^{+3}$  iyonu da daha sonra piritin kimyasal oksidasyonu için kullanılır [1].

Jarosit gibi demir çökeltilerinin oluşumu pirit oksidasyonunda önemli bir problemdir. Termofilik bakterilerin kullanıldığı yüksek sıcaklıklarda kimyasal reaksiyonlar daha hızlıdır. Pirit oksidasyonu da, mezofilik bakterilerin geliştiği

sıcaklıklarda meydana gelmektedir. Fakat yüksek sıcaklıklar, yıkama basamağından sonra bile kömüre yapışan tortu olarak, desülfürizasyonu önleyen, etkisiz hale getiren jarosit oluşumunu arttırır. Aynı zamanda çözülebilir ferrik iyonun konsantrasyonu da azalır. Bu şartlar, dolaylı mekanizmada rol oynayan kimyasal reaksiyonlar üzerinde büyük bir öneme sahiptir [1].



Şekil 1.2 Dolaylı bakteriyel mekanizmanın şematik görünümü [25].

### 1.3.3.2 Organik Kükürdü Biyolojik Yolla Uzaklaştırma Mekanizması

Mikrobiyal kültürleri kullanarak inorganik kükürt % 80-90 oranında kolayca uzaklaştırılabilir. Fakat organik kükürdün uzaklaştırılması daha zordur. Dibenzotiyofen (DBT), fosil yakıtlarda tipik inatçı bir organik kükürt bileşimidir. Bu nedenle DBT'nin desülfürizasyonu, kükürt bileşiklerinin ıslahında model reaksiyon olmuştur. DBT'yi yararlı bir bileşik haline getirebilen mikroorganizmalar mevcuttur. *Brevibacterium* ve *Pseudomonas* türleri, karbon, kükürt ve enerji kaynağı olarak DBT'yi kullanarak yararlı bir form haline getirirler [26].

Organik kükürdün biyodesülfürizasyonu hakkındaki ilk çalışmalar; izole edilen bakterilerin özgül olarak kükürdü uzaklaştırıpmediği ve kömürün yakıt değerini azalttığı için başarısızlık olarak değerlendirilmektedir. DBT, yakıtların çoğunda bulunan tiyofenik kükürdün önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu yüzden organik kükürt giderimi konusundaki ilk çalışmalar DBT'den gelen kükürdün biyolojik olarak elimine edilmesine odaklanmıştır. *Rhodococcus erythropolis* ATCC 53968 izolasyonu ve karakterizasyonu, DBT biyodesülfürizasyonunun

değerlendirilmesinde önemli gelişmelere öncülük etmiştir. Bunun için 4S yolu olarak da adlandırılan kükürt spesifik metabolik yolu tasarlanmıştır [27]. Bu yol, DBT'nin DBT-sulfoksid, DBT-sulfon, DBT-sulfinat, hidroksibifenil (HBP) ve sülfide sıralı metabolizmasını temsil eder. 4S yoluna göre, bakteriler C-C bağlarını ayırmadan kükürt atomunu seçici olarak okside eder böylece yakıtın kalori değeri korunur [1]. Bu bakterilerden başka dibenzotiyofen sulfon üzerinde büyütülen bir *Arthrobacter* türünün de kükürt giderimi yapabildiği ortaya çıkmıştır [28].

### **1.3.3.3 Kömürden Biyolojik Kükürt Gideriminde Kullanılan Mikroorganizmalar**

Kömürdeki kükürdün biyolojik gideriminde farklı mikroorganizmalar rol oynamaktadırlar. Bu amaçla ilk kullanılan mikroorganizmalar; *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans* [24], *Sulfolobus acidocaldarius* [29] ve *Acidianus brierleyi*'nin [30, 31] kültürleridir. *Thiobacillus ferrooxidans*; kömür biyodesülfürizasyonunda en yaygın kullanılan mikroorganizmadır. Bu tür, piritin indirgenmiş demir ve kükürt bileşenlerinin oksidasyonundan metabolik enerjisini karşılayan aerobik kemototrofik bir bakteridir [32].

Aller ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kömür yıkanmasının drenajından gelen karışık bakteri kültürlerinin, kömürdeki piritik formu parçalamada oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Bilinen bu gerçek ışığında, simbiyotik ve kommensal ilişkide bulunan türler arasından mikrobiyal ekosistemler aracılığıyla oluşturulan biyoliçing doğal sistemini kurmak mümkündür. *Leptospirillum ferrooxidans*, *Thiobacillus organoparus*, *T. thiooxidans* ve *T. acidophilus*'un kükürt giderimi konusunda yaptıkları birliktelik bir simbiyozis örneğidir. Bunlardan her biri bireysel olarak bir şey yapamazken *L. ferrooxidans* diğer 3 türden herhangi biri ile bir birliktelik oluşturduğu zaman piriti parçalayabilir. Kömürün kendisinden izole edilen ve zenginleştirilen karışık kültürler kullanılarak yapılan bu çalışmada yüksek oranda piritik kükürt giderimi olmuştur [33].

Mezoasidofilik bakteriler, kömürden inorganik kükürdü uzaklaştırmada önemli mikroorganizmalar olmasına rağmen organik kükürdü elimine etmede fazla etkili değildir. *Pseudomonas* ve *Sulfolobus* gibi bakteri türleri, organik kükürdü yok etmede kullanım potansiyellerinin ortaya konması açısından büyük ilgi görmüştür. Bundan başka hem organik hem de inorganik kükürdü uzaklaştırma yeteneği *Rhodococcus* türlerinde bulunmuştur. Bu olayda rol oynayan *Rhodococcus* türleri, *R. erythropolis* ATCC 53968 [34], *R. erythropolis* D-1 [35], *R. erythropolis* H-2 [36] ve *Rhodococcus* sp ECRD-1'dir [37]. Bunların arasında da en çok çalışılanı, *R. erythropolis* ATCC 53968'dir. Mohebalı ve arkadaşlarının izole ettiği *Gordonia alkanivorans* bakterisi ile de hem bir organik kükürt bileşiği olan DBT hem de DBT içeren hegzadekanlar desülfürize edilmiştir [38]. Kömürden kükürdün biyolojik yolla uzaklaştırılmasında, *Thiobacillus* türlerinden daha etkili biyokatalistlerin tanımlanması ilgi çekmiştir. Peeples ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada termoasidofil bir tür olan *Metallosphaera sedula* kullanılmıştır. Bu bakteri metal sülfidleri çözebilir dolayısıyla kullanım açısından geçerli biyokatalitik bir alternatiftir [39].

Piritik ve arsenopiritik inatçı sülfidik minerallerin bazlarla ön uygulaması, liçing için oldukça etkilidir. Tripathy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kömür önce kimyasal olarak ön işleme, daha sonra da bakteriyel işleme tabi tutulmuştur. Kömür amonyum hidroksit ve sodyum karbonat ile muamele edilerek yüzey aktifliği sağlanıp sonra da mikrobiyal desülfürizasyonla yapılan çalışmada kimyasal ön uygulamaya tabi tutulmayan kömüre göre % 11 daha fazla verim alınmıştır [6].

Farklı kömürlerin kükürt giderim oranları da farklıdır. Kükürt giderimine en yatkın kömür tipi linyittir. Bu, linyitin genç bir kömür olmasından kaynaklanır. Aynı zamanda linyitteki piritin morfolojisi diğer kömürlere göre farklıdır bu da ona mikrobiyolojik muamelede avantaj sağlar. Linyit, kömüre gevşek şekilde bağlı pirit kristallerini içinde barındıran bir kömürdür ve bu mikrobiyal atağı daha kolay hale getirir. Pirit-kömür bağlantısı güçlü ise desülfürizasyonun her tipi zayıf sonuçlar verecektir. Acharya ve arkadaşlarının yaptığı araştırma sonucu farklı kömürlerle *Thiobacillus ferrooxidans*'ın izole kültürleri kullanılarak yaptıkları deneyde piritteki giderim açısından bakıldığında en fazla verim linyit kömüründe alınmıştır [40].

Kömürden organik kükürt uzaklaştırılması üzerine yapılan çalışmaların çoğunlukla bakterilerle yapıldığı bununla birlikte funguslarla daha az sayıda çalışmanın yapıldığı bilinmektedir. Funguslar; sitokrom P-450 olayı ve hücre dışı enzimler aracılığıyla antropojenik kimyasallar ve hidrokarbonları metabolize edebilme özelliğine sahiptirler [41]. Funguslar tarafından üretilen hücre dışı enzimler, geniş substrat özgüllüğüne sahiptirler. Bu nedenle yüksek molekül ağırlığına sahip substratlara atak yaparak yararlı bir biyokatalist olma potansiyeli sergilerler. Mikroorganizmalar, tüm molekülün yıkılması veya C-S bağlarının seçici olarak yıkılması gibi özellikle organik kükürtlü bileşiklerden kükürt atomunu uzaklaştırmada ya da kullanmada çeşitli mekanizmalara sahiptirler. Acharya ve arkadaşlarının yaptığı karşılaştırmalı deneyler sonucunda, *Acidithiobacillus* gibi kükürt okside eden asidofilik bakterilerle çalışırken kükürt giderimini önleyen ve giderim işleminde istenmeyen ferik demir ve sülfatlar olan jarosit gibi çökeltiler oluşmuştur fakat *Aspergillus* gibi fungal bir cinsle çalışıldığında böyle problemlerle karşılaşmadığı bildirilmiştir [42].

#### 1.4 Kömürün Sıvılaştırılması (Solubilizasyonu)

Kükürt gideriminden başka, kömür üzerine uygulanan mikrobiyolojik işlemlerden biri de sıvılaştırma'dır. Kömürlerin mikrobiyal solubilizasyonu, sıvı yakıtların üretimi ve bu yakıtın yararlı hale getirilmesi için alternatif bir yöntemdir [43]. Mikrobiyal uygulama kömür makromoleküler ağırlığının daha basit, daha düşük moleküler ağırlıklı ürünlere parçalanması ile ilerleyen bir olgudur. Bu uygulamanın çevresel açıdan güvenli, ekonomik açıdan da cazip olduğu düşünülmektedir. Kömürün çok kompleks ve heterojen organik bileşimi mikroorganizmalar tarafından parçalanmaya dirençlidir. Fakat bazı mikroorganizmalar tarafından kömür parçalanmış ve sıvılaştırılmıştır [44]. Düşük kaliteli kömürlerin solubilizasyonu 1981'de Fakoussa, daha sonra da Cohen ve Gabrielle tarafından kanıtlanmıştır. Kömürün funguslar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesi tespit edilmiştir [45]. Hölker ve arkadaşları kömür solubilizasyonu ile ilişkili karmaşık fungal fizyolojiyi analiz etmek için *Fusarium oxysporum* ve *Trichoderma atroviride* türleri ile çalışmışlardır. Bunun için türler farklı büyüme ortamlarında

büyütülmüş ve kömürün sıvılaştırılması üzerine etkileri incelenmiştir [46]. Ayrıca Hofrichter ve arkadaşları filamentli fungusları, azot açısından sınırlandırılmış ortamda büyüterek solubilizasyon etkinliklerine bakmışlar ve bu süreçte hem lignini parçalayan hem de selülozu parçalayan hücre dışı oksidaz ve peroksidazların rol oynadığı kanısına varmışlardır [47]. Willmann ve arkadaşları da linyit parçalarını ortama ekleyerek fungusların yüzey kültürlerinde gutasyon gözlemlemiş, bu olayın hücre dışı enzimler açısından rolü araştırmışlardır. Sonuçta bu hücre dışı enzimlerin yanı sıra fungusta kometabolik olayların da eş zamanlı çalışarak kömür makromoleküllerini metabolize ettiği sonucuna varmışlardır [43]. Beyaz çürükçül funguslar ve onların salgıladığı oksidazlar, düşük kaliteli kömürden gelen büyük molekülleri solubilize, polimerize, depolimerize ve dekolorize edebilir. Beyaz çürükçül funguslarla genç kömürlerden olan linyitin sıvılaştırılması, diğer süreçlere göre daha ılımlı şartlarda gerçekleştiği için ilgi çeken bir konu olmuştur [48].

### **1.5 Kömürde Bulunan Kükürt Bileşiklerini Tanımlamada ve Ölçmede Kullanılan Yöntemler**

Kükürt giderimine gereksinim duyulduğu zaman kömürdeki kükürt bileşiklerini tanımlama ve miktarını belirleme teknikleri de gerekli görülmüştür. Alışlagelmiş kullanılan yöntemler, American Society of Testing Materials (ASTM)'nin standart yöntemleridir. Bu yöntemler; kömür, toprak ya da taşlı maddenin kükürt içeriklerini oksijen akışı altında yakarak ölçerler. Böylece herhangi bir kükürt bileşiği (organik, sülfid veya sülfat)  $SO_2$ 'ye dönüştürülmüş olur. ASTM D 3177, kömürdeki toplam kükürdü ölçmek için standart ESCHKA yöntemini tanımlar [49]. Eschka yöntemi (ASTM D 3177 Yöntem A) baryum klorid presipitasyonu kullanarak yapılan gravimetrik bir yöntemdir. Örnek, ortamdaki tüm kükürdü sülfata dönüştürmek için Eschka karışımı ile ısıtılır. Sülfat daha sonra sıcak su ile çözülür ve baryum klorid ile çöktürülür. Toplam kükürt içeriği baryum sülfatın ağırlığından hesaplanır. Kömürdeki toplam kükürdü belirlemek için yapılan ESCHKA yöntemi analizleri, LECO S fırını ile yapılan analizlerle uygunluk gösterir. Fakat kömür numunesinin karışık mineralojisi tekniği güçleştirir ve hata oluşumuna açıktır. ASTM 4239, toplam kükürdü belirlemek için kömürü yüksek sıcaklıkta yakma



yöntemlerini kullanır. Yakma süresince açığa çıkan SO<sub>2</sub> tutulur ve birkaç yolla ölçülür. ASTM 4239'daki Yöntem A; açığa çıkan SO<sub>2</sub>'nin miktarını belirlemek için asit-baz titrasyonunu kullanır. Yöntem B ise; yanma ürünlerini toplamak için iyot içeren bir solusyon kullanır ve açığa çıkan SO<sub>2</sub> miktarını belirlemek için solusyon titre edilir. ASTM 4239'daki C yöntemi ise açığa çıkan SO<sub>2</sub>'yi belirlemek için mikrobilgisayar yetisiyle infrared absorpsiyon detektörünü kullanır [50].

Asit-baz titrasyonu ile kükürt belirleme yönteminde örnek, oksijen akışı altında 1350 °C'de yakılır. Yanma süresince örnekte bulunan kükürdün tamamı kükürt dioksit ve kükürt trioksite dönüştürülür, örnekte bulunan klor da Cl<sub>2</sub> olarak açığa çıkar. Bu ürünler daha sonra, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyona sokulur, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve HCl oluşur. Ortaya çıkan her iki asidin miktarı da orijinal kömür örneğinde bulunan kükürt ve klor miktarına bağlıdır. Mevcut her asidin miktarı belirlendiğinde kömürün içerdiği kükürt yüzdesi de hesaplanabilir [49].

Infrared absorpsiyon yöntemi ile kükürt tayini yönteminde ise, aynı şekilde oksijen akışı altında örnek 1350 °C'de yakılır. Nem ve partüküller, magnezyum perklorat ile doldurulmuş tuzaklar aracılığıyla uzaklaştırılır. SO<sub>2</sub>'nin bulunduğu bir hücreden geçirilen gaz akışı infrared (IR) absorpsiyon belirleyicisi ile ölçülür. SO<sub>2</sub> olarak toplam kükürt belirlenmiş olur. Bu yöntem deneysel bir yöntemdir o nedenle cihaz, sertifikalı referans maddeleri ile kalibre edilmelidir. Bu yöntemin standart sapması kömür tipine ve kükürt miktarına bağlı olarak değişebilir. Bu sapma linyit için % 0.08, bitumine kömür içinse % 0.05 olarak hesaplanmıştır [49].

Toplam kükürt, ESCHKA ya da ASTM 4239 yöntemlerinden birisi ile belirlendikten sonra sülfatık kükürdü belirlemek için kömür örneği kimyasal olarak analiz edilir; piritik kükürt de piritik demirden hesaplanır [42]. Organik kükürt ise toplam kükürt içeriğinden sülfat ve piritik kükürt içeriğinin çıkarılması ile bulunur. Bu tekniklerle zaman harcanmış olur. Analizin her basamağında hata ile karşı karşıya kalmak söz konusudur. Bu yüzden, farklı kükürt giderim işlemlerinin etkinliğini doğru bir biçimde göstermek zordur [1].

Son zamanlarda, kömürdeki sülfat, piritik ve organik kükürt konsantrasyonlarını direkt belirlemek için seri ısı ile yumuşatma yöntemi rapor edilmiştir [51]. Bu yöntem mikrodalga fırında asit kullanarak 3 basamaklı ekstraksiyon şeklinde geliştirilmiştir. Laban ve arkadaşları çalışmanın ilk basamağında, kömürdeki sülfat fazını çözmek için 5M HCl kullanmışlar, daha sonra piriti 2M HNO<sub>3</sub> kullanarak ekstrakte etmişlerdir. Son basamakta, organik kükürdü belirlemek için konsantre HNO<sub>3</sub>, HCl, HF ve 2. basamak sonundaki kalıntıların (rezidü) yapılarını bozmak için de borik asit kullanmışlardır. Bu araştırmacılar her bir basamaktan gelen ekstrakt solusyonları, indüksiyonlu plazma atomik emisyon spektrometre (ICP-AES) ile analiz etmişlerdir [51]. Bu teknik güvenilirlik açısından tercih edilebilmesine rağmen HF'nin kullanımı, sakınılması gereken potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır [1].

Yukarıda belirtilenlerin dışında kükürdün belirlenmesi için başka yöntemler de vardır. Kömürdeki kükürdün ölçülmesinde kullanılan başlıca enstrümental teknikler; X ışını fotoelektron spektroskopisi ve X ışını absorpsiyonu gibi elektron mikroskopuna dayanan tekniklerdir [52]. Bu yöntemler diğer kükürt ölçüm yöntemlerine göre daha güvenilir yöntemlerdir. Fakat bu teknikler yetersiz rezolasyona (çözülüm, ayrışma) sahiptirler ve oldukça uzmanlık istemektedirler. Kömürdeki kükürdün belirlenmesinde daha fazla çalışma yapılması ve bunların geliştirilmesi gerekmektedir [1].

### **1.6 Kömürde Biyodesülfürizasyon Potansiyeli ve Önerilen Biyoreaktörler**

Bakteri hücrelerinin polimerik maddelere girmesi zor olduğu için petrolle karşılaştırıldığında kömürün biyodesülfürizasyonu daha zordur. Piritin mikrobiyal oksidasyonunun başarısı, toz haline getirilmiş kömürün partikül boyutu, besin ortamı kompozisyonu, pH, sıcaklık, havalandırma ve reaktör tasarımı gibi birçok parametreye bağlıdır. Büyük ölçekli uygulamalar için farklı reaktör sistemleri geliştirilmiş ve önerilmiştir. Süzüntü liçing ve çamurlu liçing bu sistemlere örnek olarak verilebilir. Piritin biyolojik olmayan oksidasyonu, yüksek sıcaklıklarda daha

fazla olduğu için bu konuda termofilik bakteriler, mezofilik bakterilerden daha verimlidir [53].

Biyolojik madencilikte uygun reaktörün seçimi ve tasarımı sistemin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine dayanır. Çok büyük hacimli maddelerle çalışıldığı için biyoliçing ve biyooksidasyonun en iyi performansı sürekli sistemlerde görülmektedir [54]. Uygun reaktör seçiminde önemli olan nokta, mikrobiyal büyümenin otokatalitik doğasıdır. Laboratuvar sonuçlarına dayalı olarak, endüstriyel ölçekte kömür ıslahı için büyük Pachuca tank reaktörleri önerilmiştir. Bunlar 3 fazlı, konik tabanlı silindirik reaktörlerdir. Bu reaktörlerin başlıca görevi, pirit okside eden mikroorganizmalar için kütle transferi, pH değeri, sıcaklık koşulları gibi uygun büyüme şartlarını sürdürmektir. Kömürden piritinin uzaklaştırılması oldukça iyi bilinen bir işlemdir. Fakat geleneksel kükürt uzaklaştırma yöntemleri ile yarışabilirliği veya teknik ve ekonomik açıdan tercih edilebilirliği halen tartışmalıdır. Kömür depiritizasyonu konusunda, endüstriyel ölçekli ticari bir operasyon henüz gerçekleştirilmemiştir [1].

İnorganik kükürdü yok etmede fiziksel ve kimyasal yöntemler daha hızlı ve maliyeti düşük olduğu için şimdiye kadar endüstriyel biyodepinitizasyon yapılmamıştır. Günümüzde pirit giderimi üzerindeki çalışmalar, liçing oranının artırılması ve biyoreaktör tasarımına yoğunlaşmıştır. Uygulanan işlemin sadece inorganik kükürdü değil aynı zamanda organik kükürdü de uzaklaştırması gerekir. Aksi takdirde ticari olarak uygulanamaz. Organik kükürdün uzaklaştırılması daha zordur. Organik kükürdü uzaklaştırabileceği düşünülen birçok bakteri kültürü vardır. Ancak bu bakteri kültürlerinin yetenekleri sabit değildir ve sonuçların yeniden üretilebilirliği düşüktür [1].

Bozdemir ve arkadaşları tarafından kömürden hem organik hem de inorganik kükürdü uzaklaştırmak amacıyla uygulanan deneylerden en etkin mikroorganizmanın *Rhodococcus erythropolis* ATCC 53968 olduğu belirlenmiştir [55]. Bu araştırmacılar, *Rhodococcus erythropolis* ATCC 53968'in büyüme kinetikleri üzerinde kömür partikül boyutu, kömür tipi, ilk substrat konsantrasyonu, substrat tipi, çalkalama hızı, büyüme sıcaklığı, başlangıç pH değeri ve inokulum yüzdesi gibi

farklı parametrelerin etkisini incelemişlerdir [56, 57]. Ancak bu deneylerden sağlanan büyüme verileri pek güvenilir değildir. Kömür partikülleri üzerindeki bakteriyel büyüme 550 nm'de absorbans ölçümü ile görülmüştür. Kömür örneklerinden bakteri hücrelerinin nasıl ayrıldığı hakkında bilgi sağlanamamıştır. Bu deneylerden sağlanan kükürt uzaklaştırma oranı ticari uygulama için düşüktür. Endüstriyel ölçekte bu bakterileri kullanabilmek için kükürt uzaklaştırma etkinliğinin artırılması gerekir [1].

Biyoteknolojide kullanılan reaktörler; bir defalık ve sürekli reaktörler olmak üzere ikiye ayrılabilir. Mikrobiyal kükürt uzaklaştırma için de durum aynıdır. Bir defalık reaktör ve beslemeli operasyonlarla yapılan bir çalışmada biyolojik kükürt giderimi en fazla giderek artan besleme ile sürekli biyoreaktörlerde olmuştur [32]. Cara ve arkadaşları yaptıkları çalışmalar sonucunda piritin sülfata dönüşümünün 6 tona kadar bir hacim büyütmesi ile yapılan paket kolon desülfürizasyon çalışmasında toplam kükürtte %24 azalma, piritik kükürtte de %43 giderim sağlamışlardır [58].

### 1.7 Beyaz Çürükçül Funguslar

Saprofit funguslar, doğal olarak meydana gelmiş lignin gibi bitkisel kökenli büyük moleküllerin neredeyse tümünü parçalayabilen çok sayıda hücre dışı enzim üretirler. Bu özelliklerinden dolayı, biyojeokimyasal döngülerin gerçekleşmesinde önemli rol oynarlar [59]. Az da olsa bu tip enzimleri oluşturan bakteriler de vardır.

Odunun yapısında bulunan maddeleri parçalama özelliğine göre funguslar ikiye ayrılır. Kahverengi çürükçüller, selüloz ve hemiselülozu parçalarken lignine dokunmazlar, böylelikle odun daha koyu bir renk alır. Kahverengi çürükçüllere *Serpula lacrymans*, *Laetiporus portentosus* ve *Fomitopsis lilacino-gilva* örnek olarak verilebilir. Beyaz çürükçüller ise hücre çeperini oluşturan selüloz ve hemiselüloz gibi polisakkaritlerin yanında lignini de parçalarlar. Lignin uzaklaştırıldığı için odun daha açık bir renk alır [59]. Beyaz çürükçül funguslara *Chrysosporium lignorum*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Stereum hirsutum*, *Pleurotus ostreatus*, *Hebeloma crustuliniform*, ve *Armillaria luteobubalina*, *Schizophyllum*

*commune* ve *Daldinia concentrica* örnek olarak verilebilir. Özellikle *T. versicolor* ve *P. chrysosporium*'un kullanımı çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için, özellikle çevresel açıdan, yaygındır [60]. Beyaz çürükçül funguslar, organik moleküller üzerinde rol oynayan çeşitli enzimleri üretirler. Özgül olmayan bu enzimler parçalanmaya karşı dirençli olan kirleticilerin yıkımında etkin olarak kullanılabilirler. Lignin, kağıt endüstrisinde de istenmeyen bir bileşiktir. Lignin bu endüstride pahalı ve çevreye zarar veren kimyasal bir işleme uzaklaştırılmaktadır [61]. Bu nedenle beyaz çürükçül funguslar kağıt endüstrisinde kullanım alanı bulmaktadırlar. Beyaz çürükçül funguslar, biyoteknolojide pestisit, trinitrotoluen (TNT) içeren atık su boşaltımları ve kağıt endüstrisi tarafından üretilen klorlanmış lignin atıkları gibi çeşitli kompleks fenol içeren bileşikler parçalamakta da kullanılır [60]. Bu fungusların lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz gibi sekonder metabolitleri, polisiklik aromatikleri, poliklorlanmış bifenil ve dioksinleri, DDT'yi ve birçok klorlu fenolik bileşikler parçalayabilir [62], tekstil boyalarının renk gideriminde kullanılabilir [63].

Beyaz çürükçül funguslar, fenol oksidazlar ve peroksidazlar dışında başka enzimler de salgırlar. Bu fungusların sahip olduğu enzimleri üçe ayırmak mümkündür. İlki oduna atak yapan enzimlerdir. Bunlar hem karbonhidrat bileşenlerinin (selüloz, hemiselüloz) üzerinde hem de lignin üzerinde rol oynarlar. İkinci grup, süperoksit dismutaz ve glioksal oksidazı içerir. Bunlar birinci gruptaki enzimlerle birlikte çalışır ancak tek başına odunu etkilemezler. Üçüncü grup ise glukoz 1-oksidad, aril alkol oksidad, piranoz 2-oksidad, sellobioz dehidrogenazı kapsar. Bu enzimlerin hepsi lignin degradasyonunda rol oynar [64].

### **1.7.1 *Trametes versicolor* (L) C.G. Lloyd**

#### **1.7.1.1 Sinonimleri**

*Boletus versicolor* L.

*Agarico -suber versicolor* (L.) J.J. Paulet

*Agaricus versicolor* (L.) J.B. de Lamarck

*Bjerkandera versicolor* (L.) P.A. Karsten  
*Coriolus versicolor* (L.) L. Quélet  
*Hansenia versicolor* (L.) P.A. Karsten  
*Microporus versicolor* (L.) K.E.O. Kuntze  
*Polyporus versicolor* (L.) E.M. Fries  
*Polystictus versicolor* (L.) E.M. Fries  
*Poria versicolor* (L.) G.A. Scopoli  
*Sistotrema versicolor* (L.) L. Trattinnick  
*Trametes versicolor* (L.) A. Pilát [65].

### 1.7.1.2 Sistemantik Yeri

Şube: Mycophyta

Sınıf: Basidiomycetes

Alt sınıf: Holobasidiomycetidae (Homobasidiomycetidae, Hymenomycetidae)

Takım: Poriales (Aphyllophorales)

Familya: Polyporaceae

Cins: *Trametes*

Tür: *Trametes versicolor* [66].

### 1.7.1.3 Özellikleri

Fruktifikasyon organı çoğunlukla bantlı yapılardan oluştuğu için hindi kuyruğu fungusu olarak bilinen bu tür bir basidiyomiset üyesidir [67]. Bantlar genellikle açık-koyu kahverenkli. Ancak beyazdan sarımsı kahverengiye hatta mavi, turuncu, kestane rengine kadar değişebilir. Bu değişiklik genetik polimorfizmden kaynaklanır. Ancak güneş ışığı gibi çevresel faktörlerden de etkilenebilir. Yelpaze şeklinde olan basidiyokarp, 10 cm çap, 0.5 cm kalınlığa kadar ulaşabilir ve üst üste binmiş raf şeklinde büyür. Basidiyokarpın yüzeyi açık ve koyu konsantrik bantlar şeklindedir, yüzeyi düzden kadifemsiye kadar değişir. Basidiyokarpın yüzeyinde küçük, dairesel ya da köşeli biçimde olan, mm'de 3–5 adet

spor tübü bulunmaktadır. Olgun basidiyosporlar zarsı ve 2x6 µm kadardır. *T. versicolor*, trimitik hif sistemine sahiptir. Vegetatif hif aralığı 3–10 µm uzunluğundadır. Türün anamorfik evresi oodiyosporlardan ve klamidiosporlardan oluşur [65].

#### 1.7.1.4 Ekolojisi

*T. versicolor*, tropik ve subtropik ormanlarda çok yaygın bir türdür. Sert odunlu ağaçlarda lignini parçalayan (delignifikasyon) önemli bir fungus türüdür. Bu nedenle beyaz çürükçül funguslar arasında sınıflandırılır. Bazen canlı ağaçlarda da odunun çürümesine neden olabilir [65].

#### 1.7.1.5 Enzimleri ve Etkileri

*T. versicolor*, odun lignoselülozunun parçalanmasında rol oynayan birçok enzimi sentezlemektedir. Bunlar lignin peroksidazın (LiP) 16 izoformu, mangan peroksidazın (MnP) 5 izoformu, lakkaz, karboksimetil sellülaz, aviselaz ve sellobiyoz dehidrogenazdır. *T. versicolor*'un lignini parçalayan enzimlerinin ekspresyonunu düzenleyen mekanizmaları yaygın bir şekilde çalışılmıştır. LiP ve MnP'nin izozimlerini kodlayan genler tek bir gen grubu olarak toplanmıştır. Hücre içi ve hücre dışı proteazlar, lakkaz ve peroksidaz aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar. Bakır alışverişi enzimleri *tahA* ve *CtaA*, protein katlanması sırasında bu kofaktörün hücre içi varlığını kontrol ederek lakkazın üretimini düzenlerler. *T. versicolor* potansiyel olarak toksik metalleri şelatlamak için oksalik asit salgılar ve MnP ile Mn(III)'ü stabilize eder. *T. versicolor*'un ürettiği lakkaz poliklorinlenmiş bifeniller (PCB), tekstil boya ve poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi biyolojik yıkıma dirençli birçok yeni sentez kimyasalı (ksenobiyotikleri) parçalamada kullanılabilir. Ayrıca *T. versicolor*'un enzimleri kağıt endüstrisinde de kendine yer bulmaktadır. Kağıt hamurunu biyolojik olarak beyazlatmak için *T.versicolor* kullanılmaktadır. Bu türün kültürleri, antibiyotikleri sentezleyebilir ya

da parçalayabilir, karoten türevli aroma bileşiklerini üretebilir veya petrolün yüksek moleküler ağırlıklı asfalt bileşenlerini biyolojik olarak parçalayabilir [65].

### **1.7.2. *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall**

#### **1.7.2.1 Sinonimleri**

*Phanerochaete macrocystidiata* Hallenb

*Sporotrichum pulverulentum* Novobranova

*Chrysosporium lignorum* Bergman & Nilsson [68].

#### **1.7.2.2 Sistematik Yeri**

Şube: Mycophyta

Sınıf: Basidiomycetes

Alt sınıf: Holobasidiomycetidae (Homobasidiomycetidae, Hymenomycetidae)

Takım: Poriales (Aphyllophorales)

Familya: Corticiaceae

Cins: *Phanerochaete*

Tür: *Phanerochaete chrysosporium* [66].

#### **1.7.2.3 Özellikleri**

*Corticiaceae* familyasına ait basidiyomisetler çok düz fruktifikasyon organları oluştururlar. *P. chrysosporium*'da kabuk, beyaz monomitik hifin ince altlığının üzerine serpiştirilmiş, kalınlığı 0.25 mm'den daha az beyaz ile somon rengi aralığında basidiyokarplardan oluşur. Bu kabuğun örümcek ağına benzer oluşumu türün doğal habitatında ayırt edilmeyi zor hale getirir. *P. chrysosporium* hem homotallik hem de heterotallik bipolar seksualite gösterir. İki haftalık misel yığınlarının mikroskopik değerlendirmesinde, 50–60 µm çapında ince duvarlı



terminal veya interkalar klamidosporelerin varlığında olduğu gibi seyrekten ortaya kadar olan aralıktaki dallanma ile 3–9 µm çapında basit bölmeli hifler görülmektedir [65].

#### 1.7.2.4 Ekolojisi

*P. chrysosporium*, hem sert odun hem de yumuşak odun dallarını, kütüklerini parçalayanlar arasında önemli bir yere sahip olup, tüm Kuzey Amerika, Avrupa ve İran'da ılıman iklimin görüldüğü ormanlarda bulunur. Odunda lignin bileşenlerini parçalama yetenekleri açısından beyaz çürükçül fungusları en iyi temsil eden örneklerden biridir. Bu yetenekleri, kağıt hamurunun kimyasal yolla beyazlatılmasına alternatif, çevreye faydalı bir işlem olarak kağıt endüstrisinde büyük ilgi görmüştür. *P. chrysosporium*'un peroksidaz bazlı ligninolitik sisteminin substrat spesifikliğinin az olması, biyolojik yıkıma dirençli birçok organik atığın yan ürünlerinin biyolojik iyileştirmede kullanılmasına olanak vermiştir [65].

#### 1.7.2.5 Enzimleri ve Etkileri

*P. chrysosporium*'un hücre dışı ligninolitik sistemi, çok sayıda enzimden ve biyokimyasal ürünlerden oluşur. Bunlar, lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP), sellobiyohidrolaz, endoglukanaz, β-glukozidaz, glioksal oksidaz, ksilanaz, ksilosidaz, α-galaktozidaz, piranoz 2-oksidad, süperoksit dismutaz ve mannoz-6-fosfatazdır. *P. chrysosporium*'dan izole edilen LiP ve MnP enzimleri; tekstil boyaları, polietilen, pestisidler, dinamit, poliaromatik hidrokarbonlar (PAH), dioksinler ve petrole kontamine olmuş toprakları içeren birçok organik atık yan ürünlerin biyolojik yolla ıslahında kullanılırlar [65].

## 1.8 Fungal Enzimler

Enzimler, organizmadaki tüm biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen makromoleküllerdir. Bazı enzimler hücrenin içinde bulunurken bazıları da zarlara bağlıdır. Bir kısmı da hücre dışına salgılanır. Hücre tarafından dışarıya salgılanan hücre dışı enzimlerin izolasyon ve saflaştırılması diğerlerine kıyasla nispeten daha kolaydır. Hücre dışına salgılanan enzimlerde, enzimin büyük kısmı filtratta bulunur ve biyokütle atılır. Hücre içi enzimlerde ise biyokütle alınıp kültür filtratı atılır. Özellikle teknolojide kullanılan enzimlerin üretiminde pratik açıdan yalnız bakteri ve funguslar kullanılır. Enzim üretimi için seçilecek mikroorganizmanın söz konusu enzimi bol miktarda ürettiği olması aranan özelliktir. Ayrıca kullanılan mikroorganizma tür seçimini başka parametreler de etkiler [69].

Funguslardan elde edilen enzimler intrasellüler (hücre içi) ya da ekstrasellüler (hücre dışı) enzimlerdir (Çizelge 1.1). Fungal enzimlerden, fungal kaynaklı amilaz,  $\beta$ -1,3-glukonaz, laktaz, sellülaz, çeşitli proteazlar, nükleaz, lipaz, fitaz, invertaz, pektinaz, penisilin açılazın en önemli kullanım alanları gıda sektörü ve medikal alanlarıdır [60]. Fungal enzimler aynı zamanda endüstriyel ve çevresel süreçlerde de önemli bir yer tutmaktadırlar (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.1. Endüstriyel ve çevresel süreçlerde enzim uygulamaları [65].

Endüstriyel/çevresel süreç	Enzimler	Uygulamalar/substratlar
Kağıt üretimi	Lignin peroksidaz, mangan peroksidaz, lakkaz, sellülaz, pektinaz, ksilanaz, mannaz, esteraz, lipaz	Lignin, hemiselüloz, selüloz, zift
Atık ıslahı ve dekontaminasyon	Lignin peroksidaz, mangan peroksidaz, lakkaz, sitokrom P-450, monoksijenaz, esteraz, lipaz	Kloroanilin, lindan, kloro-dibenzo- <i>p</i> -dioksin, klorobifenil, klorofenol, DDT, poliaromatik hidrokarbonlar (antrasen, floroantren, benzopiren), azo ve heterosiklik boya, tropalin, azur B, nitrotoluen, kreozot, dizel yağ, plastik
Kömür sıvılaştırılması	Peroksidaz, lakkaz, esteraz	Kömür
Ekotoksikoloji değerlendirmesi	Lignin peroksidaz, mangan peroksidaz, sitokrom P-450 monoksijenaz, glutatyon transferaz	Biyosensörler, biyomarkırlar, memeli ksenobiyotik metabolizma modeli
Endüstriyel ve evsel deterjanlar	Proteaz, lipaz, amilaz, sellülaz	Çok geniş yelpazedeki sıcaklıkta çamaşır ve bulaşık temizliği
Etil alkol	Sellülaz, amilaz, pektinaz, glukoamilaz, ksilanaz, proteaz	Ham bitkisel maddelere dayalı şeker veya nişasta
Gıda süreçleri ve uygulamaları	Proteaz, invertaz, alfa-amilaz, pektinaz, glukoamilaz, sellülaz, ksilanaz, laktaz, glukoz izomeraz	Meyve suyunun berraklaştırılması ve ekstraksiyonu, aroma arttırıcı, laktoz modifikasyonu, et ekstraksiyonu, aroma üretimi, şeker, şurup, alkol üretimi, hamur işlerinin sertlik derecelerinde
Tekstil	Sellülaz, proteaz, amilaz, katalaz	Boya giderimi, hidrojen peroksidin parçalanması, renk parlaklığını arttırmak

Çizelge 1.1'in devamı [65].

Endüstriyel/çevresel süreç	Enzimler	Uygulamalar/substratlar
Fırıncılık sektörü	Alfa-amilaz, glukoz oksidaz, lipaz, lipoksijenaz, ksilanaz, proteaz	Fermantasyonu arttırmak, sülfidril gruplarını okside etmek, hamur beyazlaştırılması ve sertlik ayarında
Bira yapımı	Alfa-asetolaktat dekarboksilaz, beta-glukanaz, sellülaz, ksilanaz, proteaz	Bira olgunlaşma zamanını azaltmak, ürün miktarını ve filtre edilebilirliğini arttırmak, arzu edilen azot seviyesini sağlamak için protein ekstraksiyonu
Şarap yapımı	Pektinaz, glukosidaz, sellülaz	Renk ve aroma bileşiklerini açığa çıkarmak, berraklaştırma, şarap stabilizasyonu ve filtrasyonunun arttırılması
Hayvan yemi	Fitaz, ksilanaz, beta-glukanaz, alfa-amilaz, proteaz, endo-ksilanaz	Sindirebilirliği arttırmak; fitat, glukan, nişasta, ksilan, raffinöz, stakioz, pektin benzeri polisakkaritleri içeren substratlar
Farmasötik ve kimyasallar	Sitokrom P-450 oksijenaz, glutasyon transferaz, laktaz, alfa-galaktozidaz	Antibiyotik, antitümöraller, steroidlerin biyotransformasyonu, tedavide enzimlerin kullanımı
Dericilik sektörü	Proteaz ve lipaz	Posttan ve deriden kılları ve yağları gidermek
Kişisel bakım	Proteaz, glukoamilaz, glukoz oksidaz, katalaz	Diş macunu, kontakt lensin temizleme solusyonlarında.

Çizelge.1.2. Funguslardan elde edilen endüstriyel enzim örnekleri [60].

Enzimler	Uygulama	Üretim türleri
Alfa-amilaz	Ekmek yapımı	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A.oryzae</i> , <i>A. awamori</i>
Glukoamilaz	Malt yapımı	<i>A.niger</i> , <i>A.foetidus</i> , <i>Rhizopus foetidus</i>
Laktaz	Gıda katkı maddesi, sindirim kolaylaştırıcı, peyniraltı suyu süreci	<i>A.oryzae</i> , <i>A.niger</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>K.fragilis</i> , <i>Torula cremoris</i>
İnvertaz	Sükroz dönüşümü (şekerleme ya da reçel endüstrisi)	<i>A.oryzae</i> , <i>A.niger</i> , <i>Sacchoromyces cerevisiae</i>
Pektinaz	Meyve suyu endüstrisi	<i>A.niger</i> , <i>A.wentii</i> , <i>Rhizopus sp.</i>
Lipaz	Pankreatik lipaz için destekleyici	<i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Rhizopus delmar</i> ,
Penisilin açılaz	Semisentetik penisilin	<i>Penicillium .chryosogenum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ve diğerleri
Asit proteaz	Ekmek yapımı	<i>Aspergillussaitoi</i> , <i>A. niger</i> , <i>A.oryzae</i> , <i>Trametes sanguineara</i> , <i>Mucor pusillus</i>
Mikrobiyal renin	Peynir yapımı	<i>Endothia parasitica</i> , <i>Mucor meihei</i> , <i>M.pusillus</i>
Sellülaz	Araştırma	<i>Trichoderma viride</i> , <i>A.niger</i>
Pullunaz	Dallanmayan nişasta yapımı	<i>Aureobasidium pullulans</i>
β-glukanaz	Bira mayalama ve gıda süreci	<i>Penicillium emersonii</i>
Antosiyanz	Üzüm rengini giderme işlemi	<i>Aspergillus niger</i>
Hemisellülaz	Fırıncılık sektörü, meyveler, zamlar	<i>Aspergillus niger</i>

Funguslar başka organizmaların yaşayamadığı çok zor çevre şartlarında bile gelişebilir ve değişken yaşam şartlarını kullanabilirler. Çünkü kimyasal açıdan zor reaksiyonları gerçekleştirebilme yeteneğine sahip ender enzimleri sentezlerler. Fungal enzimlerin çoğu, dirençli kirleticilerin yok edilmesi için onları potansiyel olarak faydalı hale getirme ve birçok kompleks bileşiği parçalama yeteneğine sahiptir (biyolojik iyileştirme ve biyolojik parçalama) [65]. Bu fungal enzimler;

odun, plastik, boya, jet yakıtı ve diğer maddeleri besinlere dönüştürebilirler. Bu enzimlerin bazılarında uzun zamandır kağıt ve kağıt endüstrisinde (biyopulping ve biyolojik beyazlatma) ve kimyasalların sentezinde (biyokataliz) yararlanılmaktadır. Enzimatik işlem, parçalanmaya dirençli kirleticilerin uzaklaştırılmasında, kullanılan geleneksel süreçlerin yetersiz kaldığı durumlarda daha ucuz, daha hızlı, daha spesifik bir uygulama olurken aynı zamanda daha az toksik yan ürün oluşumuna olanak verir. Daha ılımlı şartlarda gerçekleşebilen, oldukça güvenilir ve basit uygulamalı, çok geniş pH, sıcaklık ve tuzluluk aralığında çalışabilen bir alternatif süreç olarak ortaya çıkan enzim uygulamaları endüstriyel işlemler için de uygundur. Son yıllarda biyoteknolojide yaşanan gelişmelere bağlı olarak giderek önem kazanmaktadır [12].

### **1.8.1 Fenol Oksidazlar ve Peroksidazlar**

Fenoloksidazlar ve peroksidazlar, birçok canlı (mikroorganizma, bitki ve hayvan) tarafından üretilen 2 grup oksidoredüktazlardır. Ancak her iki grubun da ana üreticileri beyaz çürükçül funguslardır. Bu enzimler bazen oksijenazların içinde düşünülürse de kendine has özelliklerinden dolayı genellikle ayrı sınıflandırılırlar [70].

Tirozinaz ve lakkazları içeren fenol oksidazlar aktivite için moleküler oksijene gereksinim duyarlar. Bazılarında (örneğin mangan peroksidazda) reaksiyon, divalent mangan ve belli tipteki tamponlar gibi diğer bileşenlerin varlığına bağlıdır. Her iki grup enzim de oksidatif reaksiyon gibi farklı mekanizmalarla polimerik ürünlerin oluşumuyla sonuçlanan fenolik ve fenolik olmayan aromatik bileşiklerin oksidasyonunu katalizler. Polifenoloksidazlar, tirozinazlar ve lakkazlar olarak 2 alt sınıfa ayrılırlar. Tirozinazlar; polifenoloksidazlar, fenolazlar veya katekolazlar olarak isimlendirilen bakır içeren monoksijenazlardır. Tirozinazlar 2 reaksiyon tipini katalizlerler. 1. reaksiyon, katekol üretmek için moleküler oksijenle fenollerin o-hidroksilasyonudur (kresolaz aktivitesi), 2. reaksiyon ise o-quinonları oluşturmak için oksijenle katekollerin oksidasyonudur [70].

Lakkazlar funguslar tarafından üretilen çok bakırlı proteinlerdir. Bu enzimler bakteri ve bitkiler tarafından da sentezlenirler. Bitki lakkazları lignin polimer oluşumunun radikal bazlı mekanizmalarında rol oynarken, fungal lakkazlar morfogenez, fungal patojen/konakçı bitki etkileşimleri, stres mekanizması ve lignin parçalanması gibi olaylarda rol oynamaktadırlar [71]. Lakkaz enzimi, fenol oksidazların içinde en dikkat çeken enzimlerden birisidir. İlk olarak Schoenbein tarafından 1856 yılında *Boletus luciferus* türünün ekstraktında mavi bir pigment tespit edilmiştir. 1886 yılında Yoshida ağaçlardan elde edilen bir latekste (lak) lakkazın varlığını göstermiştir. Aynı enzim 1896 yılında Bertrand tarafından da bazı fungus türlerinde tanımlanmıştır. Aynı yıllarda Bourqualet ve Bertrand, *Russula fortens* ve *R. nigricans*'tan elde edilen ekstraktların renginin oksidasyon sürecinden önce kırmızıya daha sonra koyu kahverengi ve siyaha dönüştüğünü gözlemlemişlerdir. Bu araştırmacılar, daha sonra yaptıkları araştırmalarda *R. nigricans*'tan elde ettikleri ekstraktlarda, oksidasyon sisteminin varlığında melanin benzeri ürünler oluşturan bir maddeyi kristalize etmişlerdir. Bu madde tirozin aminoasidi olarak tanımlanmıştır. Bertrand daha sonra tirozinaz olarak adlandırılan ve *p*-hidroksifenil amin, *p*-hidroksifenil metil amin, *p*-kresol ve fenolü de içeren çeşitli monohidroksifenolik bileşiklerin aerobik oksidasyonlarını katalizleyen yeni bir oksidaz sistemi keşfettiğini bildirmiştir [12]. 1938'de Kubowitz, Klein ve Mann yaptıkları çalışmada hem lakkazın hem de tirozinazın bakır içerdiğini göstermişlerdir. Her iki enzim grubu da aktiviteleri için moleküler oksijene gereksinim duyarlar. Buna karşılık, stearik etkiden dolayı tirozinaz *p*-fenollere karşı aktifken, lakkaz, *o*-fenollere karşı daha aktiftir. Lakkaz enzimi fenolik bileşikleri polimerize ederek toksisitelerini azaltabilme özelliğine sahiptir. Bundan başka fenolik bileşikleri oldukça reaktif olan serbest anyonik radikallerine oksitler [12].

Oksidoredüktaz sınıfından bir diğer enzim grubu olan peroksidazların katalizlediği reaksiyonlar lakkazın gerçekleştirdiği reaksiyonlara çok benzemektedir. Her iki enzim de radikaller üreten bir elektron oksidasyonu ile fenolik bileşikleri ve aromatik aminleri okside eder [72].

Oksidasyon reaksiyonları birçok endüstri dalında kullanılan önemli reaksiyonlardır. Geleneksel oksidasyon teknolojileri, spesifik olmayan ve arzu

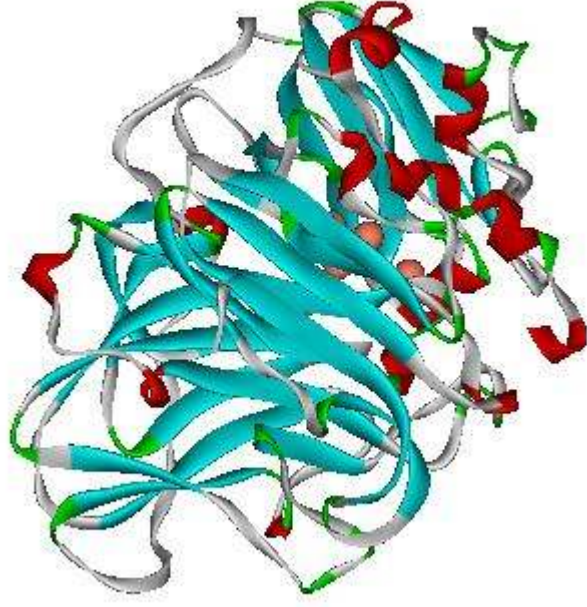
edilmeyen yan reaksiyonlara neden olabilirler. Ayrıca kullanılan kimyasalların çevreye zarar vermesi gibi dezavantajları vardır. Bu da araştırmacıları enzimatik oksidasyon gibi biyolojik sistemlere dayalı yeni oksidasyon teknolojilerine yöneltmiştir. Bu sistemlerin kimyasal oksidasyonlara göre avantajları ise enzimlerin spesifik ve biyolojik olarak parçalanabilen katalizörler olmasıdır. Bunun dışında enzim reaksiyonları ılımlı şartlar altında gerçekleştirilebilir. Bu yöntem çeşitli endüstriyel alanlarda potansiyele sahiptir [73].

#### **1.8.1.1 Lakkaz (EC 1.10.3.2 para-difenol: oksijen oksidoredüktaz)**

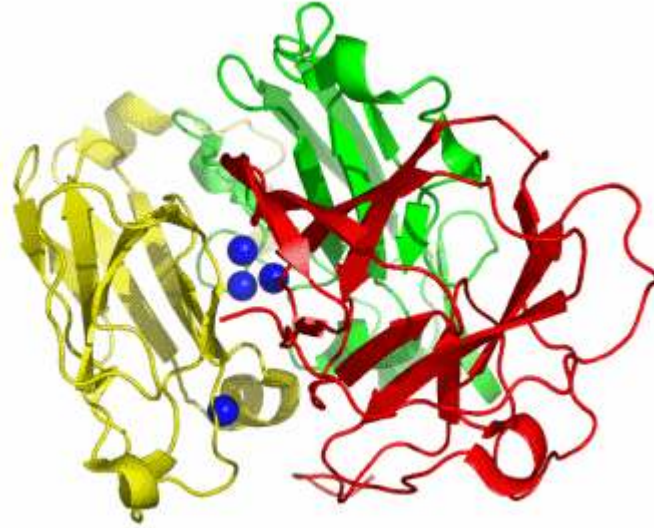
Lakkaz molekülü, üç redoks yerinde dağıtılmış olan her bir monomer başına 4 bakır atomu içeren dimerik veya tetramerik glikoproteindir (Şekil 1.3, Şekil 1.4). Daha çok funguslar tarafından sentezlenen lakkaz, bakteri ve bitkiler tarafından da üretilir. Bakteriyel lakkazlar genellikle intrasellüler veya periplazmik proteinler iken fungal lakkazlar daha çok ekstrasellülerdir. Lakkaz orto ve parafenoller, aminofenoller, polifenoller, poliaminler, lignin ve aril diaminlerin oksidasyonunu katalizlerler. Genel olarak *p*-difenol ile benzer özellikler gösteren substratlar lakkazlar tarafından oksitlenirler [73]. Lakkazların fenol oksidasyonuna ilaveten şelatlayıcıların varlığında Mn<sup>+2</sup>'nin oksidasyonunu da katalizlediği kanıtlanmıştır [71]. Lakkaz molekül ağırlığı 60–90 kDa kadardır. Lakkaz enziminin moleküler yapısı bir glikoprotein şeklindedir. Enzimin karbonhidrat kısmı, enzimin ağırlıkça % 15-30'unu oluşturur. Enzimin içerdiği karbonhidratlar, heksozamin, glikoz, mannoz, galaktoz, fruktoz ve arabinozdur. Lakkaz genellikle asidik izoelektrik noktasına sahiptir [74].

Çeşitli basidiyomiset, askomiset ve deuteromiset grubu funguslar oldukça yüksek miktarda lakkaz enzimi üretme yeteneğine sahiptirler. Fungal lakkazların arasında; indüksiyon mekanizmasında, polimorfizm derecesinde, fizikokimyasal (moleküler ağırlık, izoelektrik noktası, karbonhidrat içeriği) ve kinetik özelliklerinde büyük farklılıklar gözlenir [75].





Şekil 1.3 *T. versicolor* lakkazının X ışını kristallografisi [76].



Şekil 1.4 *T. versicolor*'dan elde edilen lakkazın kristal yapısı (Mavi küreler katalitik reaksiyonda rol oynayan 4 bakır iyonunu göstermektedir. 3 domain de farklı renklerle gösterilmiştir) [77].

Lakkaz, endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar açısından çok kullanılan bir enzimdir. Bu enzim tekstil, kağıt endüstrisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Lakkaz biyoremediasyonda, meşrubat ve içki (şarap, meyve suyu, bira) süreçlerinde, askorbik asit belirlenmesinde, şeker pancarında pektinin ayrılmasında, nanobiyoteknolojide biyosensör olarak kullanılabilir. Lakkaz, gıda ürünlerinin kalitesini ve üretimini arttırabilir [78]. Biyoelektrokimyadaki gelişmeler, klinik ve çevresel analizlerde detektör olarak iş gören biyosensörlerde olduğu gibi analitik uygulamalarla bütünleştirilmiştir. Lakkazlar, kofaktör eklemeksizin elektron transfer reaksiyonlarını katalizleyebildiği için çeşitli fenolik bileşikler, oksijen veya azidler belirlenmede biyosensör olarak büyük bir potansiyele sahiptir [79]. Bununla birlikte katekolamin [80] ve bitki flavonoidlerinin [81] belirlenmesi için de lakkazdan biyosensörler geliştirilmiştir.

Mikroorganizmal kaynaklı lakkazların uygulama alanlarına verilebilecek örnekler:

- Biyopulp üretimi [82].
- Analitik biyosensör olarak kullanımı [83, 84].
- Kömür sıvılaştırılması (solubilizasyonu) [43].
- Fenolik bileşiklerin toksinlerinden arındırılması (detoksifikasyonu) [85].
- Benzopirenlerin parçalanması (degradasyonu) [86].
- Toksik klorofenolik bileşiklerin degradasyonu [87].
- Polisiklik aromatik hidrokarbon bileşiklerinin degradasyonu [88].
- 1-naftol'ün polimerizasyonu [89].
- Klorlu hidroksibifenillerin dehalojenasyonu [90].
- Yağ fabrikası atık suyundan fenol giderimi [91].
- Sentetik tekstil atık sularının rengini giderme (dekolorizasyonu) [92].

## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1 Çalışmalarda Kullanılan Funguslar

Deneyleerde beyaz çürükçül funguslardan *T. versicolor* ve *P. chrysosporium* suşları kullanılmıştır. *T. versicolor* ATCC 200801 ve *P. chrysosporium* ME 446 (ATCC 34541) suşları Hacettepe Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nazif Kolankaya'dan temin edilmiştir. Mikroorganizmaların stok kültürlerinin sürekliliğini sağlamak amacıyla; fungus üretimi için uygun olan Malt-Ekstrakt Agar (Fluka) katı besi ortamı kullanılmıştır. Stok fungus kültürleri haftada bir yatık malt-ekstrakt agarlara transfer edilmiş, 30 °C'de 10 günlük inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen fungus kültürleri çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

### 2.2 Kömür Örneklerinin Temini ve Numune Hazırlanması

Desülfürizasyon çalışmalarında kullanılan ve % 2–2.5 wt arasında değişebilen oranda kükürt içeren linyit kömürü Kütahya-Tunçbilek (Garp Linyit İşletmesi)'ten temin edilmiştir. Elde edilen kömür American Society for Testing and Materials (ASTM) 2013 numune hazırlama yöntemine göre öğütülerek 200 µm boyutuna getirilmiştir. Kömür öğütme işlemi Retsch SK100 vurucu çapraz değirmen ile yapılarak (Şekil 2.1) öğütülen bu kömürler homojenize edilerek, birbirinden bağımsız deneysel çalışmalarda farklılık oluşması için standardize edilmiştir.



Şekil 2.1 Numune hazırlama esnasında kullanılan kömür öğütme cihazı

### **2.3 Kömürden Beyaz Çürükçül Fungusların Biyokütleleri ile Kükürt Gideriminin Optimizasyonu**

Kükürt giderimi optimizasyon koşullarının belirlenmesi amacıyla ortam pH'ı, ortam sıcaklığı, inkübasyon süresi, kömür miktarı 250 ml'lik erlenlerde denenmiştir. Bunun için önce fungus miselleri elde edilmiştir. Misel üretimi için malt broth besiyerleri kullanılmıştır. Tüm deneysel çalışmalarda besiyeri miktarı 100 ml olarak sabit tutulmuştur. Yatık-agar stok kültürlerinde bulunan miseller 1 ml distile su ile süspanse edilerek steril koşullarda 100 ml besiyeri içeren 250 ml'lik erlenlere transfer edilmiştir. İnkübasyon için Edmund Bühler-Labortechnik-Materialtechnik Johanna Otto GmbH marka çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır (Şekil 2.2). Biyokütle çalışmaları çalkalamalı inkübatörde 125 r.p.m'de gerçekleştirilmiştir. Tüm parametrelerin standardizasyonunda çalışma bu şekilde yapılmıştır.



Şekil 2.2 İnkübasyon için kullanılan çalkalamalı inkübatör

### 2.3.1 Ortam pH'sının Desülfürizasyona Etkisi

pH değerinin desülfürizasyon üzerine etkisini belirlemek amacı ile pH-metre (WTW pH-ion meter) ile 4 farklı pH değerinde (3, 4, 5, 6) hazırlanan malt broth besiyerine yukarıda açıklandığı şekilde her iki fungus için ayrı ayrı inokulasyonlar gerçekleştirilmiştir. Asidik ortam elde etmek için HCl, bazik ortam elde etmek için NaOH kullanılmıştır. 100 ml besiyeri içeren erlenlere (250 ml'lik) 200 µm boyutunda öğütülmüş 4 g kömür ilave edilerek 6 gün süre ile  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  çalkalamalı (125 rpm) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kaba filtrasyon işlemi ile kömürler alınarak distile su ile yıkanıp  $45^{\circ}\text{C}$ 'de kurumaya bırakılmıştır.

### **2.3.2 Ortam Sıcaklığının Desülfürizasyona Etkisi**

Ortam sıcaklığının desülfürizasyona etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda inkübasyon sıcaklığı 25, 30, 35, 40±1°C olmak üzere dört farklı değerde ayarlanarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sırasında da erlendeki besiyeri hacmi 100 ml, kömür miktarı 4 g, kömür partikül boyutu 200 µm, desülfürizasyon süresi 6 gün, ortam pH'ı 6.0 olarak sabit tutulmuştur. Bundan sonra erlenler çalkalamalı inkübatöre konulmuştur. İnkübasyon sonunda kömürler kurutma kağıdı ile süzölmüş ve biyokötle ortamdan alınmıştır. Kömürler distile su ile yıkanarak 45°C'de kurutulmuştur.

### **2.3.3 Kömür Miktarının Desülfürizasyona Etkisi**

Pulp yoğunluğunun desülfürizasyon üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile besiyerine eklenen kömür miktarları 2-3-4-5-6 g olacak şekilde değiştirilmiştir. Bu çalışma esnasında erlendeki besiyeri hacmi 100 ml, ortam sıcaklığı 35±1°C, ortam pH'sı 6.0, kömür partikül boyutu 200 µm, desülfürizasyon süresi 6 gün olacak şekilde sabit tutulmuştur. Mikroorganizmaları inkübasyona bırakmak amacıyla erlenler çalkalamalı inkübatöre konulmuştur. İnkübasyon sonunda kömürler ortamdan alınmış, distile su ile yıkanıp 45 °C'de kurutulmuştur.

### **2.3.4 İnkübasyon Süresinin Desülfürizasyona Etkisi**

İnkübasyon süresinin desülfürizasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla kömürün biyokötlelerle etkileşim süresi 2, 4, 6, 8, 10 gün şeklinde değiştirilmiştir. Sürenin etkisinin belirlenmesi sırasında erlendeki besiyeri hacmi 100 ml, kömür miktarı 5 g, kömür partikül boyutu 200 µm, ortam sıcaklığı 35±1°C, ortam pH'sı 6.0 olarak sabit tutulmuştur. Erlenler, çalkalamalı inkübatörde 125 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kömürler ortamdan kurutma kağıdı ile filtre edilerek ayrılarak distile su ile yıkanıp 45 °C'de kurutulmuştur.

### 2.3.5 Kömür Partikül Boyutunun Desülfürizasyona Etkisi

Kömür partikül boyutunun kükürt giderimi üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla farklı büyüklükte porlara sahip elekler kullanılarak <5 mm (2.8–5.0), <2.0 mm (2.0–2.8), <1.68 mm (1.68–2.0), <1.19mm (1.19–1.68) boyutlarında kömürler elde edilmiştir. Partikül boyutunun kükürt giderimi üzerine bir etkisi olup olmadığını değerlendirmek ve bu açıdan endüstriyel uygulamada kullanılabilirliğini göstermek amacıyla farklı boyutlarda kömür sağlandıktan sonra ortama eklenmiştir. Bu sırada erlendeki besiyeri hacmi 100 ml, kömür miktarı 5 g, ortam sıcaklığı  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ , ortam pH'sı 6.0 olacak şekilde sabit tutulmuştur. İnkübasyon çalkalamalı koşullarda (125 rpm) gerçekleştirilmiştir. *T. versicolor*'la işleme tabi tutulan kömür 6 günlük, *P. chrysosporium*'la da 4 günlük inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kömürler ortamdaki kurutma kağıdı ile filtre edilerek alınmış, distile su ile yıkanarak  $45^{\circ}\text{C}$ 'de kurutulmuştur.

### 2.3.6 Sterilizasyonun Kükürt Giderimi Üzerindeki Rolü

Kükürt gideriminden sadece çalışılan mikroorganizmaların sorumlu olduğunu göstermek amacı ile besiyeri hazırlık aşamasında kömür, besiyerine eklenmiş ve bu şekilde besiyeri ile birlikte sterilize edilmiştir. Erlendeki besiyeri hacmi 100 ml, kömür miktarı 5 g, ortam sıcaklığı  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ , ortam pH'sı 6.0, partikül boyutu 200  $\mu\text{m}$  olarak sabit tutulmuştur. Mikroorganizmaları inkübe etmek amacı ile erlenler, çalkalamalı inkübatöre konulmuştur. *T. versicolor*'la işleme tabi tutulan kömür 6 günlük, *P. chrysosporium*'la da 4 günlük inkübasyonun sonunda ortamdaki izole edilmiş ve distile su ile yıkanarak  $45^{\circ}\text{C}$ 'de kurutulmuştur.

### 2.3.7 Kimyasal Ön İşlemin Desülfürizasyona Etkisi

Piritik ve arsenopiritik sülfidik minerallerin alkali maddelerle ön işleme tabi tutulmasının desülfürizasyon üzerine olumlu etki yaptığı bilinmektedir. Bu ön işleminde  $\text{NH}_4\text{OH}$ , önemli bir kükürt giderimine neden olmamakla birlikte yüzey

aktifliği sağlamaktadır. Daha sonra da oksidasyona uğramış olan kükürdü hidroliz etmek için sodyum karbonat solüsyonu ile parçalanmıştır [6]. Bu çalışma baz alınarak; 200 µm boyutunda 50 g kömür, 100 ml %25'lik NH<sub>4</sub>OH ile 10 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, filtre edilmiş, 3 kez su ile yıkanarak kurutulmuştur. Kurutulmuş olan kömürün 25 gramı 2. kimyasal işleme tabi tutulmuştur. Buna göre kömüre 50 ml 1 N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltilisi eklenerek 85 °C'de 5 dakika ısıtılmıştır. Filtrasyonu takiben su ile yıkanarak kurutulmuştur. NH<sub>4</sub>OH ve NH<sub>4</sub>OH + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile muamele edilen 25 g'lık kömür ile çalışılmıştır. Kimyasal ön uygulamadan geçirilen kömür, mikrobiyolojik işleme tabi tutulmuştur. Bunun için daha önce optimize edilen koşullar olan; erlendeki besiyeri hacmi 100 ml, kömür miktarı 5 g, ortam sıcaklığı 35±1°C, ortam pH'sı 6.0 olarak sabit tutulmuştur. Mikroorganizmaları inkübe etmek amacı ile erlenler, çalkalamalı inkübatöre konulmuştur. Kömürler, *T. versicolor*'la 6 gün, *P. chrysosporium*'la 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kömürler ortandan alınarak distile su ile yıkanıp 45 °C'de kurutulmuştur.

## **2.4 İşlem Gören Kömürde Kükürt Gideriminde Lakkazın Kullanılabilirliği**

### **2.4.1 Lakkaz Üretim Ortamının Hazırlanması**

Çalışmada kullanılan enzimin üretimi için, lakkaz açısından yüksek aktivite gösteren *T. versicolor* kullanılmıştır. Enzim aktivitesi açısından enzimin üretildiği fungus türü kadar fungusun üretildiği besiyeri de önemlidir. Bu amaçla *T. versicolor*, modifiye Vogel ortamında üretilmiştir. Karbon ve vitamin kaynakları değiştirilerek elde edilen modifiye-Vogel sıvı besiyeri ise řu şekilde hazırlanmıştır: Besiyerinde kullanılan iz element stok çözeltilisi (g/100 ml): Sitrikasit.H<sub>2</sub>O: 2.5 g, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 2.5 g, Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O: 0.5 g, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O: 0.125 g, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O: 0.025 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 0.025 g, H<sub>3</sub>P(Mo<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O: 0.0025 g) olacak şekilde hazırlanmıştır. Vogel ana stok çözeltilisi ise (g/100 ml olarak; sodyum sitrat: 15 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 25 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 1 g, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: 0.2 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 0.8 g) olacak şekilde hazırlanmıştır. Modifiye Vogel besiyerini hazırlamak için Vogel Ana Stok



çözeltisine %1 oranında stok iz-element çözeltisi ve % 2 oranında glukoz (Merck) eklenmiş ve 1N HCl ile pH'sı 4.7'ye ayarlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan glukoz-mineral tuz çözeltisi 1000 ml'lik erlenlere 500 ml hacminde dağıtılıp daha sonra otoklavda (1.5 atmosfer basınç altında 110°C' de 25 dakika süreyle) sterilize edilmiştir. Otoklavda sterilizasyon sonrası bu çözeltiliye milipor filtrasyonu ile sterilize edilen thiamin-HCl çözeltisinden % 0.1 oranında (v/v) eklenmiştir. Sonuçta elde edilen modifiye Vogel sıvı besiyerleri mikroorganizma kültürasyonu ve enzim çalışmalarında kullanılmıştır.

#### **2.4.2 Besiyerlerine Ekim ve Üretim**

Yatık-agar stok kültürlerinde bulunan miseller 1 ml steril distile su içinde süspanse edilmiştir. Hazırlanan misel süspanasyonu steril koşullarda 100 ml besiyeri içeren 250 ml'lik erlenlere ekilmiştir. 30 °C'de, 150 r.p.m'de 10 günlük inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda kültürler süzülerek biyokütle sıvı fazdan ayrılmıştır. Elde edilen süzöntü Whatman no: 1 kağıdından tekrar süzölmüştür. Filtrat aktivite ölçümlerinde ve çalışma süresince ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

#### **2.4.3 Lakkaz Aktivitesinin Ölçümü**

Lakkaz aktivitesi ölçümü için tepkime tüplerinde toplam hacim 5 ml olacak şekilde substrat olarak 1 mM Guaikol içeren 50 mM Sodyum-Asetat tamponundan (pH 4.5) 4.9 ml alınmıştır. Enzim kaynağı olarak 0.1 ml kültür süpernatantı kullanılarak 37 °C'de 15 dakika su banyosunda (Memmert) inkübe edilmiştir. Kör olarak denatüre enzim kullanılmıştır. 465 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Jasco V-530 UV/VIS spectrophotometer) absorbans ölçülmüştür. Çalışmada; 37 °C, 1 dakika, 465 nm dalga boyunda absorbansı 0.1 birim arttıran enzim aktivitesi 1 Unit aktivite olarak tanımlanmıştır.

#### **2.4.4 Lakkaz Enzimi ile Optimum Desülfürizasyon Koşullarının Belirlenmesi**

Lakkaz enzimi ile optimum desülfürizasyon koşullarının belirlenmesi için, enzim miktarı ve ortam pH değeri, inkübasyon sıcaklığı parametreleri incelenmiştir.

##### **2.4.4.1 Sıcaklığın Etkisi**

12.67 U/ml enzim aktivitesine sahip lakkaz enzimi ile farklı sıcaklıklarda çalışılmıştır. Erlenlere 100 ml sodyum asetat tamponu konulmuştur. Tamponun pH'ı 5'e ayarlanarak 0.1, 0.2, 0.5, 1 ml enzim eklenmiştir. Partikül çapı 200 µm olan kömürden de 5 g ilave edilmiştir. Erlenler çalkalamalı su banyosunda (Memmert) 25 °C'de ve 35 °C'de 30 dakika bekletilmiştir.

##### **2.4.4.2 Enzim Miktarının Etkisi**

*T. versicolor*'dan elde edilen lakkazdan (13.98 U/ml) 0.1, 0.2, 0.5 ve 1 ml alınarak enzim miktarının kükürt giderimine etkisi araştırılmıştır. Bu esnada erlendeki tampon miktarı 100 ml, kömür miktarı 5 g, ortam pH'sı 6.0, kömür partikül boyutu 200 µm olarak sabit tutulmuştur. 25 °C'de 30 dakika süresince çalkalamalı su banyosunda (Memmert) bekletilmiştir.

##### **2.4.4.3 Ortam pH'sının Etkisi**

13.98 U/ml enzim aktivitesine sahip lakkaz enzimi ile farklı pH'larda çalışılmıştır. Asetik asitle pH 3.3, 5 ve 6'ya ayarlanan sodyum asetat tamponundan 100 ml konulmuştur. Enzimden de 1 ml alarak erlenlere eklenmiştir. 200 µm boyutunda 5 g kömür de aynı ortama eklenmiştir. İnkübasyon için 25 °C'de 30 dakika süresince çalkalamalı su banyosunda (Memmert) bekletilmiştir.

#### 2.4.4.4 Kömürün Yıkanması

Yapılan tüm enzim denemelerinde inkübasyon süresi 30 dakika olarak uygulanmış ve 30 dakika sonunda erlenler su banyosundan çıkarılmıştır. Erlenin içeriği kurutma kağıdı ile süzölmüş, buradan elde edilen kömür de % 10'luk HCl ile yıkanmıştır. Bu işlem, piritin oksidasyon süresince oluşabilecek ve kükürt ölçümünde yanlış sonuçlara neden olabilecek jarositleri ortamdaki elemine etmek amacıyla yapılmıştır. Asitle yıkama ile kömürdeki jarosit benzeri bileşikler uzaklaştırmanın yanı sıra Vogel besi ortamında bulunan kükürt bileşiklerinin de elimine edilmesi sağlanmıştır. HCl'yi ortamdaki uzaklaştırmak için kömür bol miktarda distile su ile yıkanmıştır. Sonra da kömür 45 °C'de kurutularak kükürt ölçümleri yapılmıştır.

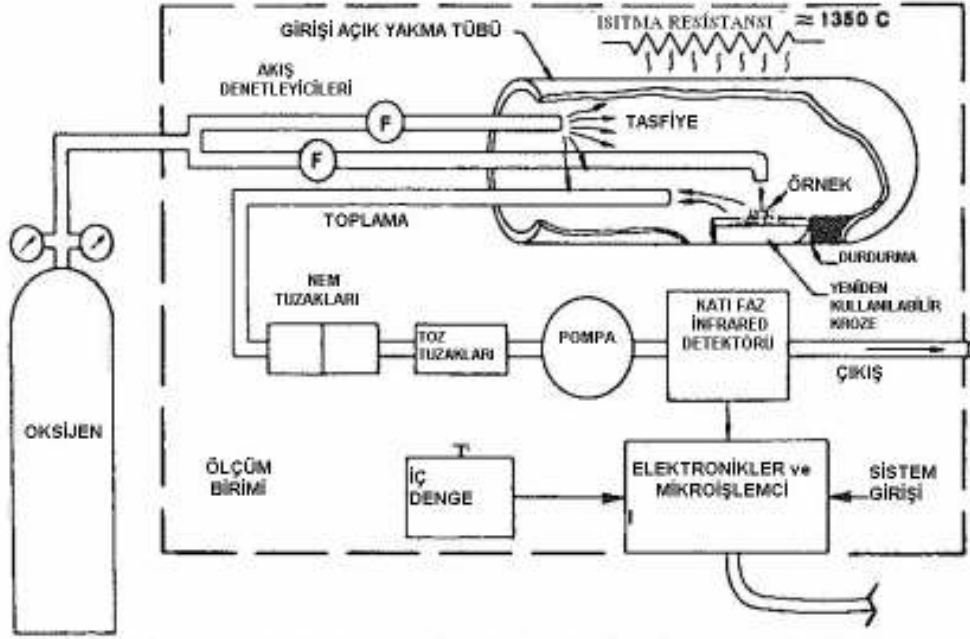
Biyokütle çalışmalarında kullanılan besiyeri bileşiminde kükürt ya da kükürtlü bileşik bulunmadığı için kömürleri distile su ile yıkamak yeterli görülmüştür.

#### 2.5 Kükürt Analizleri

Biyokütle ve enzimle yapılan deneylerden sonra kömürlerin toplam kükürt oranları, LECO SC-144DR marka kükürt analizörü ile ölçülmüştür. İnfrared yöntemin mekanizması Şekil 2.3'de ve bu cihazın genel görünümü de Şekil 2.4'te verilmiştir. ASTM 4239 standardı dikkate alınarak infrared absorpsiyon belirleme prosedürleri ile yüksek sıcaklıkta yakma yöntemine göre toplam kükürt oranları belirlenmiştir. Bu sonuçlar, çalışılan fungus biyokütleleri ve enzimi ile muamele edilmemiş olan kömürün kükürt oranı baz alınarak karşılaştırılmış ve kükürt giderimi saptanmıştır. Kükürt ölçümü yapılmadan önce cihaz sertifikalı referans maddelerle kalibre edilmiştir. Bu yöntemde kömür oksijen altında 1350 °C'de yakılmış ve kömürdeki kükürt SO<sub>2</sub>'ye dönüştürülmüştür. Nem ve partiküller, magnezyum perklorat ile doldurulmuş tuzaklar aracılığıyla uzaklaştırılmıştır. SO<sub>2</sub>'nin bulunduğu bir hücreden geçirilen gaz akışı IR absorpsiyon belirleyicisi ile ölçülmüştür. Belirlenen SO<sub>2</sub>'den de toplam kükürt tespit edilmiştir [49].

## 2.6 Kömürün Kimyasal Analizleri

Bu amaçla kömürün kül ve kalori değeri ölçülmüştür. Kül oranı LECO TGA701 (ASTM D 5142) marka termogravimetrik analizörü (Şekil 2.5) ile kalori değeri LECO AC-350 (ASTM D 5865) marka (Şekil 2.6) ile ölçülmüştür.



Şekil 2.3 İnfrared yöntemin mekanizması [49].



Şekil 2.4 Kömür kükürt ölçüm cihazı



Şekil 2.5 Kömürün uçucu madde ve kül/nem miktarı ölçüm cihazı



Şekil 2.6 Kömür kalori ölçüm cihazı

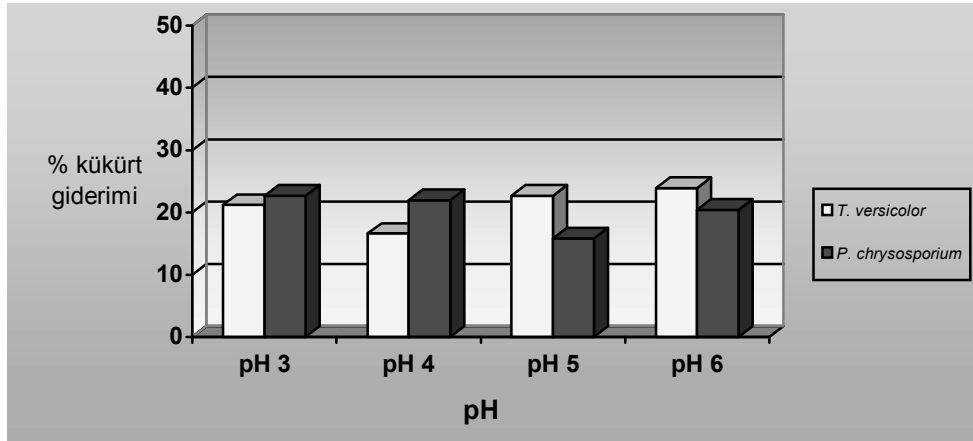
### 3. BULGULAR

#### 3.1 Biyokütle Çalışmalarında Elde Edilen Sonuçlar

Bu çalışmada yüksek oranda kükürt içeren linyit kömürlerinin desülfürizasyonunda beyaz çürükçül funguslar olan *T. versicolor* ve *P. chrysosporium*'un biyokütlelerinin rolleri değerlendirilmiştir. Funguslar üzerinde farklı parametreler denenerek kükürt miktarının değişimi incelenmiştir.

##### 3.1.1 Ortam pH'nın Kükürt Giderimi Üzerine Etkisi

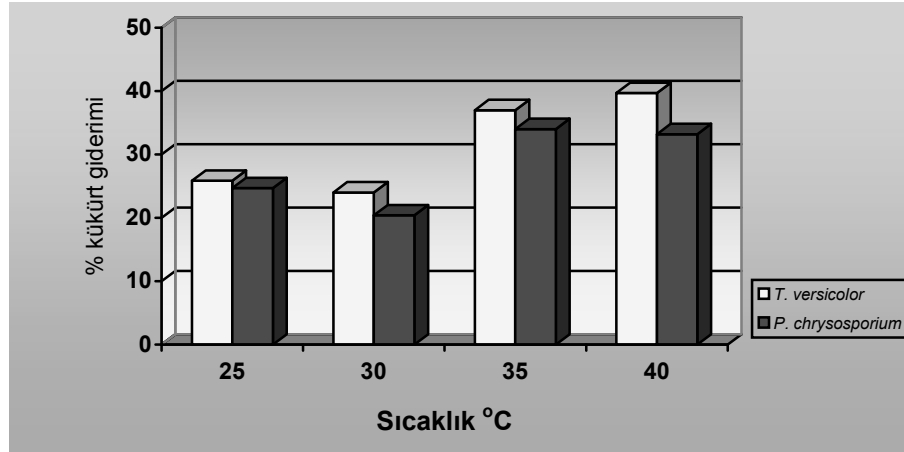
Farklı pH değerlerinde hazırlanan sıvı besiyeri ortamında inkübe edilen *T. versicolor* ve *P. chrysosporium* türlerinin her ikisi için de uygun pH değeri 6 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1). pH 6'da *T. versicolor* için kükürt giderimi % 23.93 iken *P. chrysosporium* için % 20.4 bulunmuştur.



Şekil 3.1. Farklı pH değerlerinde *T. versicolor* ve *P. chrysosporium* ile kükürt giderimi (Deneyler, Laboratuvar Çalışmaları ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır).

### 3.1.2 Ortam Sıcaklığının Kükürt Giderimi Üzerine Etkisi

pH 6'da farklı sıcaklıklarda inkübasyona bırakılan *T. versicolor* ve *P. chrysosporium*'un kükürt miktarı üzerine etkisi incelenmiştir (Şekil 3.2). Şekilde de görüldüğü gibi 35 °C ile 40 °C arasında verim açısından çok büyük fark görülmemiştir. Ancak çalışma sıcaklığı olarak 40 °C yüksek bir sıcaklıktır. 35 hem çalışma sıcaklığı için uygun hem de iki türde eşit verim alınması ve deneylerin paralel yürütülmesi açısından uygun sıcaklık olarak tercih edilmiştir. Buna göre 35 °C'de *T.versicolor* biyokütlesi ile gerçekleştirilen kükürt giderimi % 37 iken aynı sıcaklıkta *P.chrysosporium*'daki kükürt giderimi ise % 34 olarak saptanmıştır.

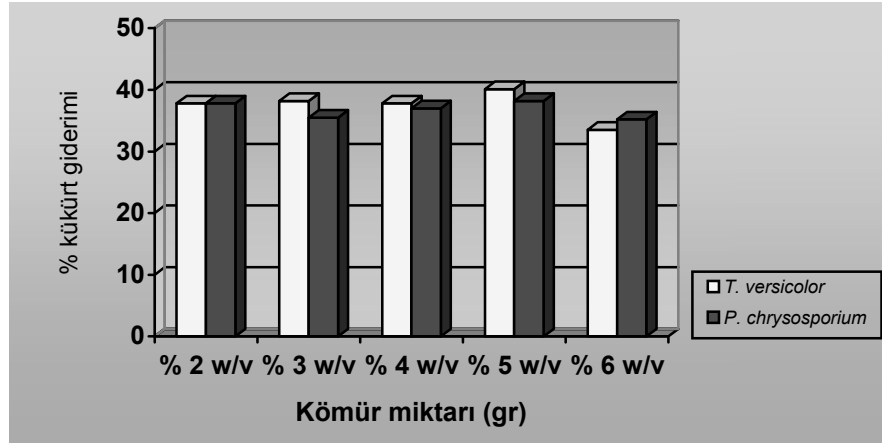


Şekil 3.2 Farklı sıcaklık değerlerinde *T. versicolor* ve *P. chrysosporium* ile kükürt giderimi (Deneyler, Laboratuvar Çalışmaları ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır).

### 3.1.3 Kömür Miktarının Kükürt Giderimi Üzerine Etkisi

Funguslarla işleme girecek kömür miktarlarını değiştirerek kükürt giderimi gözlenmiştir (Şekil 3.3). Deneyde 100 ml besiyerine konulacak optimum kömür miktarı % 5 w/v olarak belirlenmiştir. Buna göre % 5 w/v (5 g) kömürle çalışılan ortamlarda *T. versicolor*'un biyokütlesi ile gerçekleştirilen kükürt giderimi % 40.1 iken *P. chrysosporium* için ise bu değer % 38.2 olarak belirlenmiştir.

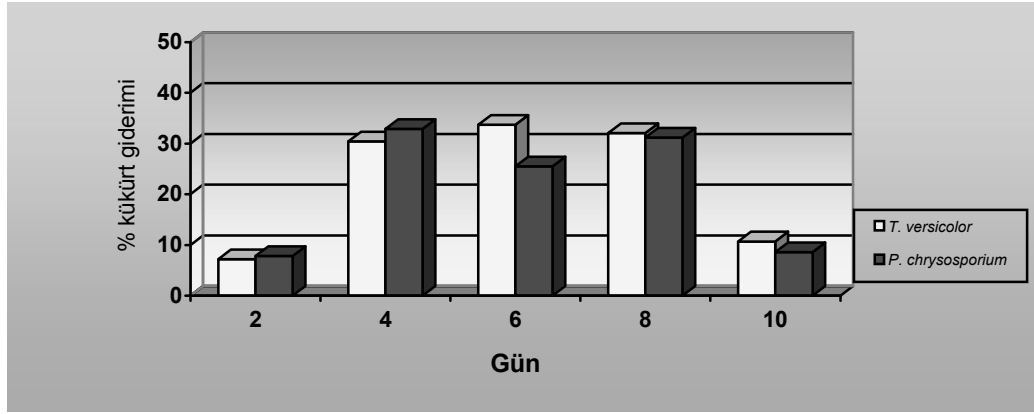




Şekil 3.3 Farklı kömür miktarları ile işlem görmüş *T. versicolor* ve *P. chrysosporium*'un desülfürizasyon potansiyeli (Deneyler, Laboratuvar Çalışmaları ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır).

### 3.1.4 İnkübasyon Süresinin Kükürt Giderimi Üzerine Etkisi

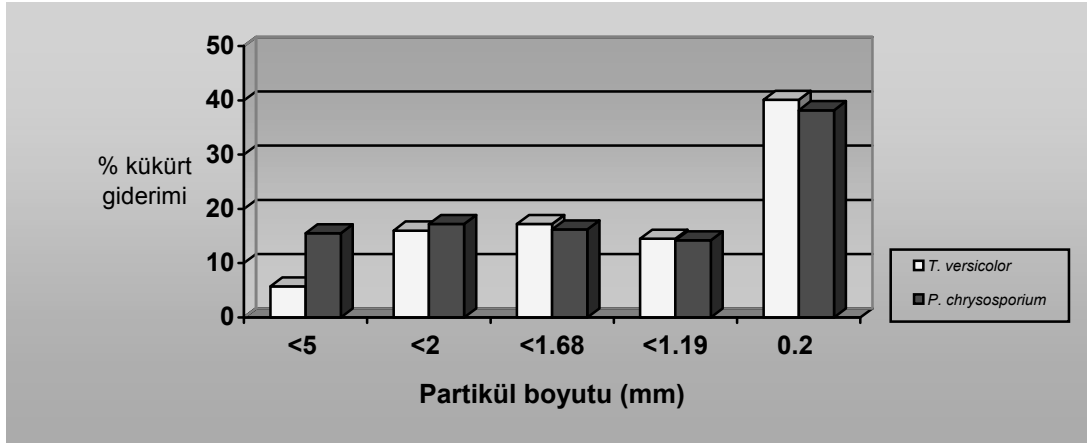
İnkübasyon süresinin kükürt giderimindeki etkisini belirlemek amacıyla kömürün *T. versicolor* ve *P. chrysosporium* biyokütleleleri ile işlem süresi 2–10 gün arasında değiştirilmiş ve inkübasyon süreleri sonunda kömürlerin kükürt miktarları ölçülmüştür (Şekil 3.4). Kükürt giderimi açısından, *P. chrysosporium* için uygun inkübasyon süresi 4 gün olarak belirlenmiştir. Dördüncü gündeki kükürt giderimi % 32.9 olarak saptanmıştır. *T. versicolor*'un da inkübasyonunun altıncı gününde % 33.7 kükürt giderimi gözlenmiştir.



Şekil 3.4 *T. versicolor* ve *P. chrysosporium* ile kükürt gideriminde inkübasyon süresinin etkisi (Deneyler, Laboratuvar Çalışmaları ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır).

### 3.1.5 Kömür Partikül Boyutunun Kükürt Giderimi Üzerine Etkisi

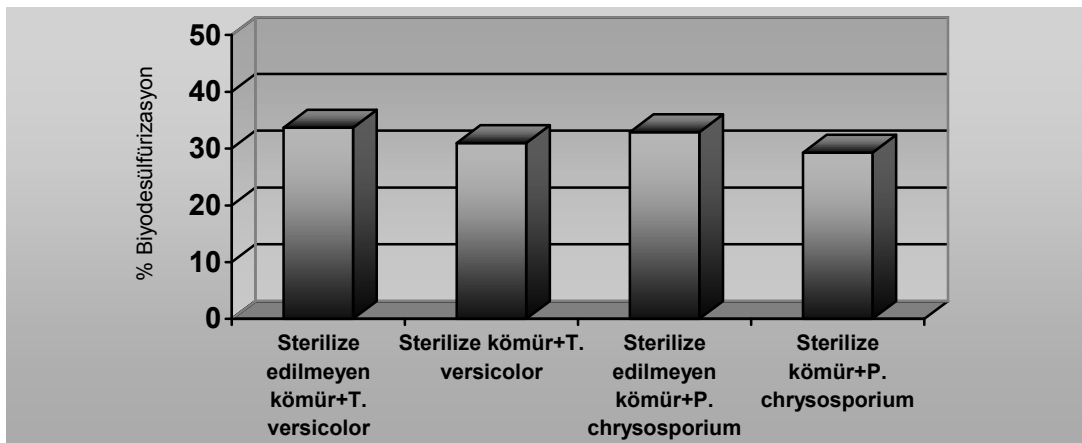
Kömür partikül boyutunun kükürt giderimi üzerine etkisini değerlendirmek ve işlemin endüstriyel açıdan uygulanabilirliğini incelemek amacıyla farklı elekler kullanılarak <5, <2.0, <1.68 ve <1.19 mm boyutlarında elek altı kömürler elde edilmiştir. Bu kömürlerle biyokütle çalışmaları yapılarak kükürt giderim oranlarına bakılmıştır. Yapılan kükürt analizleri sonucu, çalışmanın başından beri deneylerde kullanılan 0.2 mm boyutundaki kömürle yapılan mikrobiyal işlemde sonraki kükürt ölçümleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 3.5). Buna göre büyük partikül boyutuna sahip olan kömürlerde gözlenen kükürt giderim oranı, 0.2 mm boyutuna sahip kömürlerdeki giderim oranına göre düşük olduğu gözlenmiştir. Kömürü desülfürize etmede partikül boyutunun önemli bir faktör olduğu sonucuna varılmıştır. Partikül boyutunun, mikroorganizmanın piritte girebilirliği açısından dolayısıyla kükürt uzaklaştırma ve piritin oksidasyon oranı üzerinde rol oynadığı gösterilmiştir.



Şekil 3.5 Partikül boyutunun desülfürizasyon üzerine etkisi (Deneyler, Laboratuvar Çalışmaları ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır).

### 3.1.6 Sterilizasyonun Kükürt Giderimi Üzerindeki Rolü

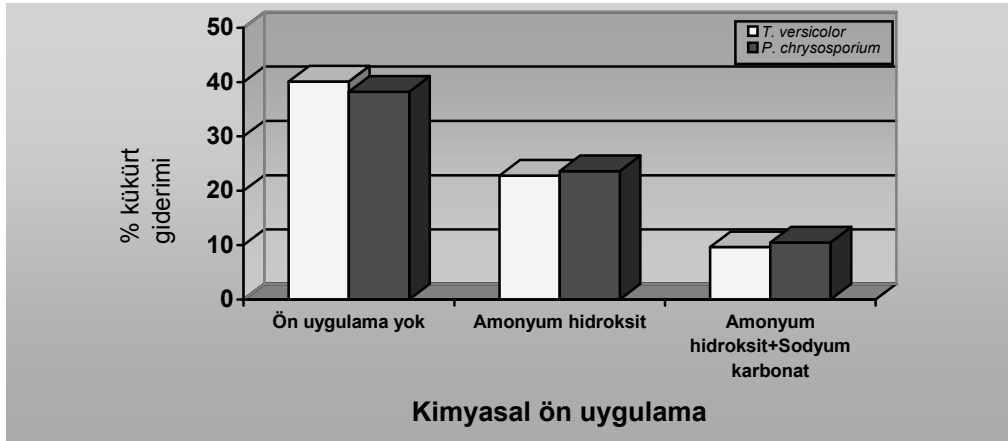
Sterilize edilmiş ve mikroorganizmalarla işlem görmüş kömürdeki kükürt giderimi ile sterilize edilmemiş ve mikroorganizmalarla işleme tabi tutulmuş kömürün kükürt giderimleri arasında ciddi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3.6). Böylelikle büyük olasılıkla kükürt gideriminden sadece deneylerde kullanılan mikroorganizmaların sorumlu olduğu gösterilmiştir.



Şekil 3.6 Sterilizasyonun kükürt giderimi üzerindeki rolü (Deneyler, Laboratuvar Çalışmaları ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır).

### 3.1.7 Kimyasal Ön Uygulamanın Desülfürizasyona Etkisi

Fungal işlemden önce 25 gr'lık kömürler kimyasal ön işleme tabi tutulmak amacıyla  $\text{NH}_4\text{OH}$  ve  $\text{NH}_4\text{OH} + \text{Na}_2\text{CO}_3$  ile muamele edilmiştir. Her iki kimyasal ön uygulamadan elde edilen kömürler ile fungus biyokütle çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kimyasal işlem sonrasında beyaz çürükçül funguslarla yaptığımız çalışmada olumlu yönde bir artış gözlemlenmemiştir (Şekil 3.7). Yapılan bu çalışmada yalnız  $\text{NH}_4\text{OH}$  ile muamele edilen kömürde kükürt giderimi *T. versicolor* için % 22.8 iken *P. chrysosporium* için % 23.6 olarak tespit edilmiştir.  $\text{NH}_4\text{OH}$  ve  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ile muamele edilen kömürdeki kükürt giderimi ise *T. versicolor* için % 9.64 iken *P. chrysosporium* için % 10.5 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak beyaz çürükçül funguslarla yapılan kükürt gideriminde kimyasal ön uygulamanın desülfürizasyonu indüklediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 3.7 Kimyasal ön uygulamanın desülfürizasyona etkisi (Deneysel, Laboratuvar Çalışmaları ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır).

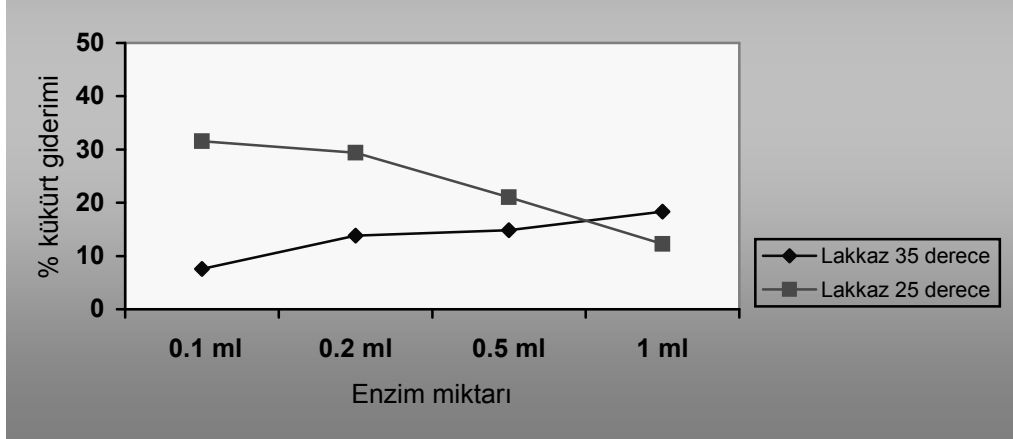
## 3.2 Enzim Çalışmaları

### 3.2.1 Serbest Lakkaz Enziminin Kükürt Giderimi Üzerine Etkisi

Önce aktivitesi ölçülen lakkaz enzimi ile kükürt giderimi, sıcaklık, enzim miktarı ve ortam pH'sı açısından değerlendirilmiştir.

### 3.2.1.1 Sıcaklığın lakkaz enzimi ile desülfürizasyon üzerine etkisi

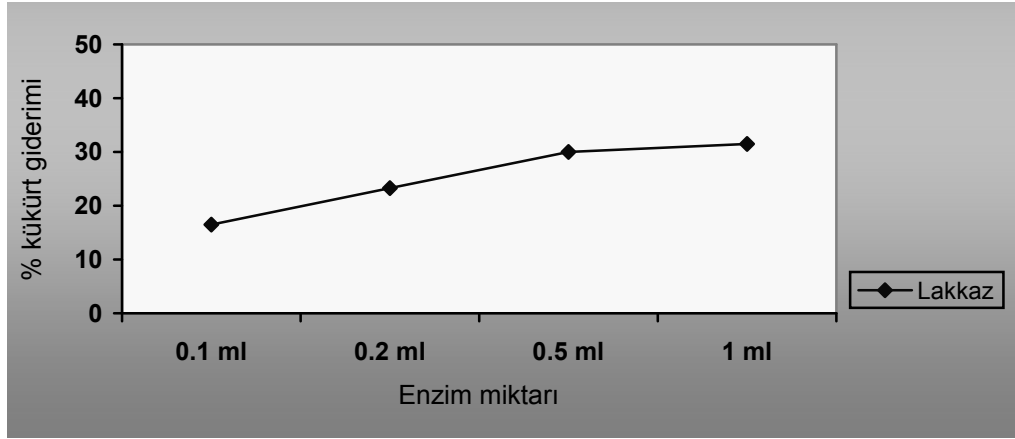
12.67 U/ml aktiviteye sahip lakkaz enziminin 25 ve 35 °C’de inkübasyonu neticesinde kükürt giderim oranının 25 °C’de daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Farklı sıcaklıklarda inkübasyona bırakılan lakkazın desülfürizasyondaki rolü (Deneyler, Laboratuvar Çalışmaları ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır).

### 3.2.1.2 Enzim Miktarının Desülfürizasyona Etkisi

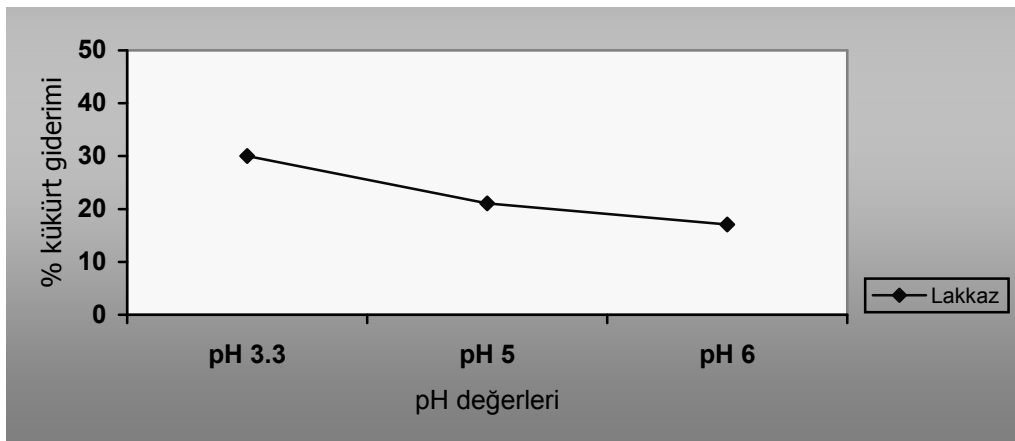
*T. versicolor*'dan elde edilen lakkazın, ortama farklı miktarlarda eklenmesi ile kükürt giderimi açısından nasıl bir etki gösterdiği değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre enzim miktarı arttıkça kükürt giderim oranı da artış göstermiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Enzim miktarının lakkaz enzimi ile desülfürizasyon üzerine etkisi (Deneyler, Laboratuvar Çalışmaları ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır).

### 3.2.1.3 Ortam pH'sının lakkaz enzimi ile desülfürizasyon üzerine etkisi

13.90 U/ml olarak ölçülmüş aktiviteye sahip lakkaz enzimi ile farklı pH ortamlarında çalışılmıştır. 25 °C'de 30 dakikalık bir inkübasyon neticesinde kükürt giderimi değerlendirilmiştir. pH 3.3'de meydana gelen desülfürizasyon oranı, pH 5 ve 6'ya göre daha yüksek gözlenmiştir. Bu nedenle pH 3.3 de çalışmanın daha uygun olacağı saptanmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Farklı pH ortamlarında lakkazın desülfürizasyondaki rolü (Deneyler, Laboratuvar Çalışmaları ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır).

### 3.3 Kömürün Kimyasal Analizleri

Kükürt giderim uygulamalarının linyitin özelliklerini etkileyip etkilemediğini belirlemek amacı ile kalori ve kül analizleri de yapılmıştır. Kömürlere uygulanan mikrobiyal işlemin kükürt giderimini sağladığı, kalori değerinde bir azalmaya sebep olmadığı, aksine az da olsa artırdığı saptanmıştır. Burada saptanan kalori değeri, kuru kömürdeki üst ısı değeridir. Yapılan çalışmada kül oranına da bakılmış ve azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 3.1). Bu da elimine edilen kül yüzdesi ve kömürün desülfürizasyonu arasında paralel bir ilişkinin varlığını ortaya koymaktadır.

Çizelge 3.1 Kömürün kalori ve kül analizleri (Analizler, Laboratuvar Çalışmaları ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır).

	İşlem görmemiş kömür	<i>Trametes versicolor</i> 'la işlem görmüş kömür	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 'la işlem görmüş kömür	Lakkaz enzimi ile muamele edilmiş kömür
Kül (%)	20.47	15.09	15.65	16.97
Kalori(cal/g)	5182	5330	5270	5811

### 3.4 Kükürt Emisyon Değerleri

Kükürt emisyon değeri (EV); kükürt içeriğinin megajoule cinsinden kalori değerine bölünmesi ile elde edilir. EV'nin yüksek değeri, çevresel etkinin fazla olduğunu gösterir [33]. EV tespiti için % 2.96 wt kükürt değerine sahip Tunçbilek-Yörgüç panosundan sağlanan kömürün kükürt ve kalori değerleri baz alınmıştır. Beyaz çürükçül funguslarla yaptığımız deneylerin bu kömürlerin kükürt emisyon değerini düşürdüğü gösterilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 İşlem görmemiş ve mikrobiyal işlem görmüş kömürün kükürt emisyon değerlerinin karşılaştırılması (Analizler, Laboratuvar Çalışmaları ve Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır).

	<b>Fungal işleme tabi tutulmamış ham kömür</b>	<b><i>Trametes versicolor</i>'la işlem görmüş kömür</b>	<b><i>Phanerochaete chrysosporium</i>'la işlem görmüş kömür</b>	<b>Lakkaz enzimi ile işlem görmüş kömür</b>
<b>Toplam kükürt (%)</b>	% 2.96	% 1.89	% 1,92	% 2.09
<b>Kalori değeri (Megajoule)</b>	21.69	22.31	22.06	24.32
<b>Kükürt emisyon değeri (EV)</b>	<b>0.136</b>	<b>0.084</b>	<b>0.087</b>	<b>0.085</b>



#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yüksek kükürt içeren kömürlerin desülfürizasyon işlemine tabi tutulması gereklidir. Şimdiye dek önerilen fiziksel işlemlerde sadece inorganik kükürt giderilebilmiş, organik kükürt ise uzaklaştırılamamıştır [1]. Kükürt giderimi için önerilen kimyasal yöntemlerde reaksiyonların gerçekleşebilmesi için ekstrem şartlar gerekmektedir. Pysh'yev ve arkadaşları yaptıkları kimyasal bir çalışmada oksidatif desülfürizasyonu gerçekleştirebilmek için 623–723 °K aralığındaki sıcaklığa gereksinim olduğunu bildirmişlerdir [20]. Bu çalışmada kömürdeki toplam kükürtte % 76 oranında azalma olmuş ve giderimin tümünün piritik kükürtte olduğu tespit edilmiştir. Organik kükürtte ise hiçbir giderimin olmadığı, aksine kimyasal desülfürizasyondan sonra % 53 oranında bir artış olduğu saptanmıştır [20]. Üstelik böyle yüksek sıcaklıklarda çalışmak, işlem için gereken enerji tüketimini de artırmaktadır. Bu nedenle biyodesülfürizasyonun endüstri tarafından benimsenmekte ve halen kullanılmakta olan yöntemlerden daha etkili olduğu düşünülmektedir [42]. Yakmadan önce kömürden kükürdün uzaklaştırılmasında kullanılan biyolojik yöntem teknik olarak uygulanabilir bir işlemdir. Biyodesülfürizasyon konusunda çalışan araştırmacılar tarafından birçok farklı mikroorganizma önerilmiş ve bunların her biri farklı sonuçlar vermiştir [1]. Mikrobiyolojik kükürt gideriminde *Sulfolobus* gibi termoasidofilik bakteriler [29] hariç *Thiobacillus* sp, *Leptospirillum* sp [22, 58, 40], *Rhodococcus* sp [35, 36, 56, 57] gibi mezofilik bakteriler kullanıldığında işlem için 30 °C sıcaklık gerekmektedir. Bu sonuçlar biyolojik işlemlerin fiziksel ve kimyasal işlemlere göre daha ılımlı şartlarda gerçekleşebildiğini göstermektedir. Bizim yaptığımız çalışmada ise sıcaklık optimizasyonu ile beyaz çürükçül fungusların kükürt giderimi için 35 °C sıcaklığın uygun olduğu tespit edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada, önce *T. versicolor* ve *P. chrysosporium* biyokütleleri ile kükürt gideriminin pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve kömür miktarı parametreleri açısından optimizasyonu çalışılmıştır. Daha sonra da *T. versicolor*'dan elde edilen lakkaz enziminin desülfürizasyonda kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Literatüre göre mikrobiyal kükürt giderim çalışmalarında genellikle asidofilik bakteriler kullanılmakta ve bunun bir sonucu olarak pH 1.5'ta en yüksek verim elde edildiği bildirilmektedir [40]. Ancak, endüstriyel çapta yapılacak bir uygulama için kurulacak biyoreaktörde böyle kuvvetli bir asidik ortamı elde etmek hem maliyet açısından hem de uygulama açısından zor olacaktır. Fungusların birçoğu optimum olarak pH 4-6 gibi nötre yakın aralıklarda gelişebilirler [59]. Örneğin Acharya ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kömürden izole edilen bir *Aspergillus* türü ile desülfürizasyon pH 6.5'ta gerçekleştirilmiştir [42]. Yaptığımız araştırmada ise biyokütle çalışmaları aşamasında uygun pH değerleri 3 ve 6 olarak saptanmıştır. Ancak, büyük ölçekli bir desülfürizasyon süreci göz önüne alındığında pH 3'ün nispeten kuvvetli asidik bir ortam olacağı ve olası çalışma güçlükleri meydana getirebileceği düşünülerek, pH 6'da çalışmak uygun görülmüştür. pH 6'da elde edilen desülfürizasyon değerleri *T. versicolor* için % 23.93 iken, *P. chrysosporium* için % 20.4 olarak elde edilmiştir.

Bakterilerle yapılan desülfürizasyon çalışmalarını sıcaklık açısından 2 sınıfa ayırmak mümkündür. Mezofilik bakteriler 20 ile 40 °C arasında optimum gelişme gösterirken arkebakterilerden olan termoasidofilik bakteriler 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşamaktadırlar [59]. *Thiobacillus* gibi mezofilik bakteri türleri ile yapılan desülfürizasyon araştırmaları genelde 30 °C'de olurken [22] *Sulfolobus* gibi termofilik bakteri türleri ile genelde 70 °C'de olmaktadır [29]. *Aspergillus* cinsi fungusla yapılan bir desülfürizasyon çalışması 33.5 °C'de gerçekleştirilmiştir [42]. Bizim çalışmamızda 35 ile 40 °C arasında kükürt giderimi açısından çok fark olmadığı gözlenmiştir. Ancak genel olarak hem *T. versicolor* hem de *P. chrysosporium*'un hücre dışı enzimlerinin 37 °C'de yüksek aktivite gösterip uygulanan işlem açısından da yüksek verim alındığı ve 40 °C'nin de bu bakımdan yüksek olduğu bilinmektedir [93, 94]. Bu nedenle deneylerin bu aşamasında 35 °C hem çalışma sıcaklığı açısından hem de deneylerin paralel yürütülmesi açısından uygun sıcaklık olarak tercih edilmiştir.

Kömür miktarı açısından kükürt giderim süreci ekonomisini değerlendirmek amacı ile çalışılan kömür miktarı önemli bir parametredir. Ortama konulan az miktarda kömürün desülfürizasyon oranı da yüksek olmaktadır. % 20 w/v değerinde

kömür miktarının mikroorganizma büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir [40]. Maden ocağından izole edilen mikroorganizmalarla yapılan bir desülfürizasyon çalışmasında kullanılan kömürün miktarı % 5 wt olarak belirlenmiştir [33]. Yapılan bu çalışmada kömür miktarı % 2-6 arasında değiştirilerek fungal işleme tabi tutulmuş ve kükürt giderim oranına bakılmıştır. % 2 wt, % 3 wt, % 4 wt miktarlara sahip kömürlerle çalışıldığında kükürt giderim oranı açısından çok büyük farklılıklar gözükmemekle birlikte en fazla miktarda kömürle çalışmanın daha ekonomik ve avantajlı olacağı düşünülmüştür. Bu nedenle % 5 wt oranında kömürle çalışılmıştır. % 6 wt oranında kömürle çalışıldığında kükürt gideriminin düşmeye başladığı görülmüştür.

Çalışmamızın inkübasyon süresinin optimizasyonunda *P. chrysosporium* için 4 günlük, *T. versicolor* için ise 6 günlük süre sonunda kükürt gideriminin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Endüstriyel ölçekte çok büyük miktarda kömürle çalışmak istenildiğinde 4 ve 6 günlük süreçler zaman kaybına neden olabilir. Kükürt bileşiklerini kömürden ayırmak için desülfürizasyon açısından daha aktif fungal kültürler geliştirilmesine gereksinim duyulmaktadır. Genetik mühendisliğindeki gelişmeler, daha hızlı ve daha fazla kükürt uzaklaştırma aktivitesi açısından mikrobiyal kültürlerin daha donanımlı olmasını sağlayacaktır [1].

Bu araştırmada biyokütle çalışmalarının bir basamağında kullanılan <5, <2.0, <1.68 ve <1.19 mm olan farklı partikül boyutlarına sahip kömürlerde düşük oranda desülfürizasyon gözlenmiştir. Çalışılan her iki fungus türü açısından denenen farklı partikül boyutundaki kömürlerde <1.68 mm boyutundaki kömürdeki kükürt giderimi daha yüksek olmuştur. Tüm deneylerimizde kullanılan 200 µm boyutundaki kömürlerin mikrobiyal işleminden sonra ölçülen kükürt giderim oranları daha yüksek bulunmuştur. Bu da partikül boyutunun desülfürizasyon üzerindeki etkisini göstermek amacı ile daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir [40]. Kömürün toz haline getirilmeden de farklı partikül boyutlarında, verim düşük olsa bile kükürdün giderilebildiği, endüstriyel uygulamalar için geliştirilmeye çalışılan bir sistemin kullanılabilirliği gösterilmiştir. Acharya ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da 74 µm boyutundan daha küçük kömürle çalıştıklarında elde ettikleri biyodesülfürizasyon oranı % 75 iken 74 ile 105 µm arası partikül boyutuna sahip

kömürle çalıştıklarında ise bu oran % 48 olmuştur [42]. Bu sonuca göre partikül boyutu küçüldükçe kükürt giderimi artmaktadır. Fakat çalışmamızın bu aşamasında vurgulanmak istenen endüstriyel boyutta kükürt gideriminin partikül boyutu açısından değerlendirilmesidir. Endüstriyel açıdan daha büyük boyuttaki kömürlerin kükürt giderim verimliliğinin arttırılması yönünde yapılacak çalışmalar maliyeti de düşürecektir.

Çalışmamızda kömür örneklerinde bulunabilecek herhangi bir doğal mikroorganizmanın kükürt giderim işleminde rol oynayıp oynamadığını değerlendirmek amacı ile kömür sterilize edilmiştir. Bu amaçla kömürler, *T. versicolor* ve *P. chrysosporium* türleri ile muamele edilmeden önce sterilize edilmiş sonra da fungal işleme tabi tutulmuştur. Buradan elde edilen kükürt giderim oranları sterilize edilmemiş ve fungal işleme tabi tutulmuş kömürlerle kükürt giderim oranı açısından karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma esnasında ciddi bir farklılık gözlenmemiştir. Buna göre kükürt gideriminden büyük olasılıkla sadece deneylerde kullanılan mikroorganizmaların sorumlu olduğu gösterilmiştir. Sterilize edilmiş kömürlerdeki fungal işlemde sonra kükürt giderim oranının sterilize edilmeyen kömürlerin kükürt giderim oranına göre az da olsa düşük gözlenmesi sterilizasyon ile mikroorganizmalar açısından sinerjik bir etkinin ortadan kaldırılması şeklinde yorumlanabilir. Bu sonuçlar kömürün sterilizasyon aşamasının çok gerekli olmadığını göstermektedir. Kömürün sterilizasyonu maliyet açısından da külfetli olacaktır.

Tripathy ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kömür bakteriyel uygulama öncesi  $\text{NH}_4\text{OH}$  ve  $\text{CaCO}_3$  ile kimyasal ön işleme tabi tutulmuşlardır. Daha sonra da *Thiobacillus* kültürü ile muameleye sokulmuş kömürde kükürt giderimi, kimyasal işleme sokulmayan kömürdeki kükürt gideriminden % 11 daha fazla olmuştur [6]. Fakat bizim yaptığımız çalışmada kimyasal ön işlemin sonucu değiştirmedığı aksine kükürt giderim oranında bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

Baek ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kükürt gideriminde mikrobiyolojik işlemde önce kömür biyolojik yolla sıvılaştırılmış ve daha sonra da *R. rhodochrous* türü ile muamele edilmiştir. Böylelikle toplam kükürtte % 75

oranında bir azalma tespit edilmiştir [95]. Bizim yaptığımız işlemde 200 µm boyutundaki kuru kömür örneği ile çalışılmıştır ve % 40 oranında bir giderim sağlanmıştır. Sıvılaştırılan kömürde kükürt giderimi daha yüksek ise de sıvılaştırma ön işlemleri hem süreyi uzattığı hem de maliyeti artırdığı için verimli görünmemektedir. Yaptığımız araştırmada kullandığımız kömür gibi ön işleme tabi tutulmayan kömürdeki kükürt giderimi daha anlamlı olmaktadır.

Kükürdü sülfata indirgeyebilen bakterilerin çoğu asidik ortamları sevdikleri için besi ortamları da bu şekilde hazırlanmaktadır ve oldukça komplekstir. Mezofilik bakteriler için kullanılan 9K adı ile bilinen besi ortamı ile termoasidofilik bakteriler için kullanılan mineral tuz ortamı birçok bileşenden oluşmaktadır [22, 29, 58]. Ancak desülfürizasyon için endüstriyel ölçek düşünüldüğünde maliyeti düşük olan bir besiyerini kullanmak daha doğru olacaktır. Biyokütle çalışmalarında kullandığımız Malt broth besiyeri, funguslar için kullanılan genel bir besiyeri olup bileşimi oldukça basittir ve maliyeti de düşüktür. Bu da kükürt giderim işleminde hacim büyütmesine gidildiğinde mikroorganizmaların yetişebileceği bir besi ortamının kolay ve ucuz elde edilebilir olduğunu göstermektedir.

Willmann ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada fungusların hücre dışı enzimlerinin linyit degradasyonundaki rolü araştırılmıştır ve bu araştırmada ortam pH'ı 3, sıcaklık 22 °C olacak şekilde deneyler sürdürülmüştür [43]. Schreiner ve arkadaşları tarafından yapılan deneylerde *P. chrysosporium* enzimi olan ligninazla desülfürizasyon çalışması ise pH 3.5'ta gerçekleştirilmiştir [96]. Lakkaz enzimi ile yaptığımız çalışmalarda uygun sıcaklık 25 °C, uygun enzim miktarı 1 ml ve çalışılan asitlik dereceleri arasında en uygun pH 3.3 olarak belirlenmiştir. Enzim üretimi için, aktivitenin yüksek çıktığı Vogel besi ortamı kullanılmıştır. Van Hamme ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada beyaz çürükçül fungus enzimleri ile petrolde organik kükürt giderimi çalışılmıştır. Bu amaçla glukoz malt-maya ekstrakt ortamı kullanılmıştır. Bu besiyerinde üretilen fungustan elde edilen lakkazın aktivitesi 0.15 U/ml olarak belirlenmiştir. Araştırma 28 °C'de yapılmıştır [41]. Bizim yaptığımız çalışmada ise lakkaz aktivitesi 12–13 U/ml arasında değişim gösterdiği belirlenmiş ve bu enzim desülfürizasyon işleminde kullanılmıştır.

Kömürün çok kompleks ve heterojen olan yapısı lignine benzeyen alifatik ve aromatik yapılar ile humik asitten oluşur. Lignini parçalayabilen fungusların desülfürizasyon sürecinde de kullanılabileceği, araştırmamızın çıkış noktasıdır. Peroksidaz ve lakkaz gibi lignin parçalayan enzimler, düşük substrat spesifitesine sahip olduğu için, linyit yapılarını da parçalayabilmektedir [97]. Çünkü kömür, mikroorganizmalar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır [43].

Deneysel çalışmamızda kükürt ölçümünün yanı sıra kömürün kül miktarı ve kalori değeri de incelenmiştir. Kükürt gideriminin kömürün kalori değerini değiştirmedeği hatta az da olsa arttığı gözlenmesine karşın kül oranında bir azalma olduğu saptanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, daha önce yapılan araştırmaların sonuçları ile uyumludur [33]. Kül miktarındaki azalma kükürt giderimi ile kül miktarının değişimi arasında paralel bir ilişki olduğunu göstermektedir. Uygulama süresince kül seviyesinin düşmesi kömürde var olan minerallerin çözüldüğünü gösterir. Kalori miktarının değişmemesi ve kül miktarındaki azalma linyitin kalitesi açısından da olumlu bir sonuçtur. Bunun dışında kalori ve kükürt değerleri baz alınarak hesaplanan kükürt emisyon değerinin (EV) de mikrobiyal işlem sonunda azaldığı tespit edilmiştir. EV değeri hava kirliliğinin göstergelerinden biri olup bu değer azalması kömürün neden olduğu olumsuz çevresel etkinin de azaldığını göstermektedir [33].

Genç kömürlerden olan linyitin sıvılaştırılması, beyaz çürükçül funguslarla diğer süreçlere göre daha ılımlı şartlarda gerçekleştiği için ilgi çeken bir konu olmuştur. Beyaz çürükçül fungusların ve hücre dışı enzimlerinin kömür solubilizasyon çalışmalarında kullanılmış olmasına rağmen karşılaştırmalı hücre-enzim desülfürizasyon çalışmaları ve optimizasyonuna literatürde rastlanmamıştır. Van Hamme ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, petrolde bir organik kükürt bileşiği olan dibenzil sülfidin beyaz çürükçül funguslarla parçalanması, hangi bileşiklere dönüştüğü ve bu olayın mekanizması araştırılmıştır [41]. Schreiner ve arkadaşlarının yaptıkları araştırma sonucu beyaz çürükçül funguslardan olan *P. chryso sporium* ile model olarak seçilen tiantren adlı bir kükürt bileşiğinin oksidasyonu çalışılmıştır. *P. chryso sporium*'un bu bileşiği okside edebildiği sonucuna varılmıştır. Fakat kömürde toplam kükürt oranı çalışılmamıştır ve

optimizasyon yapılmamıştır. Biyolojik kükürt gideriminde *P. chryso sporium*'un ilerde kullanılabilceği ve bu yolda potansiyel bir mikroorganizma olduğu önerilmiştir [96]. Ichinose ve arkadaşları tarafından kükürt içeren heterosiklik bileşiklerin *T. versicolor*'la gerçekleştirilen dönüşüm mekanizmaları ve yolları araştırılmıştır. Bu amaçla rekalsitrant kükürt bileşikleri *T.versicolor*'la muamele edilmiştir. Bu fungusun büyümesi için bu maddeler kükürt kaynağı olarak kullanılmış ve fungus da bunları metabolize etmiştir. Bu metabolik olayların dışardan eklenen ksenobiyotiklere karşı kimyasal bir stres olarak meydana geldiği düşünülmüştür [98]. Bizim çalışmamızda ise beyaz çürükçül fungus biyokütleri ve bunlardan elde edilen lakkaz ile kömürdeki toplam kükürt giderimi sağlanmıştır.

Beyaz çürükçül fungusların enzimleri, enzim represyonundan ziyade besin azalışına cevap olarak üretilirler; sonuç olarak, beyaz çürükçül funguslar, kimyasal kirleticileri parçalamadan önce adaptasyon sürecine gereksinim duymazlar [60]. Bu fungusların lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz gibi sekonder metabolitleri birçok maddeyi parçalayabilirler [62]. Çalışmamızda kükürt gideriminin maksimum olduğu günlerin dördüncü ve altıncı günlerde meydana gelmesi, kükürt gideriminde beyaz çürükçül fungusların hücre dışı enzimlerinin yanı sıra başka faktörlerin de rol oynadığını düşündürmektedir. Biyokütle çalışmalarında kullanılan malt broth besiyeri enzim aktivitesini indükleyebilecek amaçtan ziyade endüstriyel ölçekte kullanılabilcek maliyeti düşük olan genel bir besiyeridir. Fakat fungusların üreyebileceği kültür ortamı, lakkaz aktivitesini arttıracak şekilde hazırlandığında en yüksek aktivite onuncu günde tespit edilmekle birlikte bu besiyerinin maliyeti yüksek olduğu için biyokütle çalışmalarında kullanılan malt broth besiyeri ekonomik açıdan daha avantajlı olmaktadır.

Lakkaz enziminin petrolde dibenzil sülfidin, dibenzil sülfoksida oksidasyonunu katalizlediği Van Hamme ve arkadaşları tarafından kanıtlanmıştır. Bu bilgiler ışığında; ilk oksidasyon basamağının hücre dışı enzimler ile katalizlendiğini, son metabolizmanın da P- 450 sistemi aracılığıyla meydana geldiği önerilmiştir. Funguslar; sitokrom P- 450 ve hücre dışı enzimler aracılığıyla antropojenik kimyasallar ve hidrokarbonları metabolize edebilirler [41]. Fungal sitokrom P- 450'nin hem biyosentetik hem de katabolik reaksiyonlarda önemli rol

oynadığı bilinmektedir. Beyaz çürükçül funguslardaki sitokrom P- 450 monooksijenazları ksenobiyotik transformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar [99]. Muhtemelen bizim çalışmamızda da kükürt gideriminde hücre dışı enzimlerin yanı sıra sitokrom P-450 enzimlerinin de rol oynadığı düşünülmektedir.

Uygun bir desülfürizasyon yöntemi belirlemek için kömürdeki kükürdü ölçmede doğru ve analitik yöntemler gerekir [1]. Çalışmamızda da kömürün heterojen yapısından kaynaklanan işlem öncesi veya sonrası yapılan bazı kükürt ölçümlerinin değişken olması göz ardı edilmiştir. Kullanılan kükürt ölçüm cihazının da standart sapması 0.08 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmamız çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Statik ortamda üreyen beyaz çürükçül fungusların bu üreme esnasında kömürle muamelesi sonucunda meydana gelen desülfürizasyon çok fazla tatmin edici olmamıştır. Laboratuvar ortamında istenilen verim alındığı takdirde kükürt giderimini pilot çapta, daha sonra da endüstriyel boyuta büyütmek mümkündür. Ancak süreç ticari ve çevresel açıdan uygulanabilir olmalıdır [17]. Büyük ölçekli olarak düşünüldüğünde de karıştırmalı reaktörler, daha etkili olmasına rağmen enerji tüketimini artırdığı için endüstriyel uygulama açısından zorluklar çıkartabilir. Endüstriyel uygulama için düşünülen biyolojik işlemler paket yatak sistemde işletilebilir, bu endüstri için daha kolay bir uygulama olmasına rağmen karıştırmalı reaktöre kıyasla daha uzun kalış süresi ve daha düşük verim söz konusudur [47]. Bu anlamda tasarlanacak biyoreaktörün sağlayacağı randımanının yanı sıra maliyetinin de göz önünde bulundurulması gerekir.

Cara ve arkadaşları tarafından desülfürizasyon çalışmalarında mikrobiyal işleme tabi tutulmuş kömürde yanmadan sonra kükürdün tamamen mi kükürt diokside dönüştüğü yoksa bir kısmının reaksiyona girmeden mineral maddede mi kaldığını belirlemek için termogravimetrik ve kütle spektrometre analizi kullanılmıştır [58]. Bunun yanı sıra kömürdeki kükürdün büyük bir bölümünü demire bağlı olan kükürt oluşturduğu için işlenmiş kömürdeki bu demir bileşiklerin kimyasal yapısındaki değişiklikleri göstermek amacıyla  $^{57}\text{Fe}$  Mössbauer spektroskopisi yapılmıştır.  $\gamma$  ışını radyasyonunun rezonant absorpsiyon kaydına



dayanan Mössbauer spektroskopisi, kompleks sistemlerde çeşitli demir bileşiklerini tanımlamada ve miktarlarını belirlemede güçlü bir deneysel tekniktir [20]. Acharya ve arkadaşları tarafından kömürdeki metal içeriklerini belirlemek amacıyla kömür örnekleri standart prosedüre göre hazırlanıp uygun seyreltmeler kullanarak solüsyondaki metaller AAS ile belirlenmiştir [40]. Biyodesülfürizasyon konusunda çalışan başka araştırmacılar tarafından mikrobiyal işleminden sonra kömür matrisinin etkilenip etkilenmediği hakkında bilgi vermesi açısından [21] ve linyitin kimyasal kompozisyonunda daha güç algılanan değişiklikleri belirlemek için uygun kalibrasyon prosedürlerinden sonra FTIR spektroskopisi yapılmıştır [61]. Bizim yaptığımız araştırma için de ileride bu tür çalışmalara yer verilecektir.

Kömür biyodesülfürizasyonu üzerine yapılan çalışmalar; kükürt uzaklaştırma mekanizmaları ve giderim oranının artırılması konusunda yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar substrat konsantrasyonu, reaktör tipi, kömür tipi, pH, büyüme sıcaklığı, inkübasyon süresi gibi parametrelerin değerlendirilmesi yönünde olmalıdır. Bununla birlikte yapılabilecek çalışmalar olan; reaktör tasarımı, ayrılma işlemleri, yan ürün durumu ve ürün kalitesi gibi parametreler de işin mühendislik boyutudur. Bu yüzden sürecin geliştirilmesi, bilim adamları ve mühendislerin birlikte çalışmasını gerektirir [1].

Bu tez çalışması ile beyaz çürükçül funguslardan *T. versicolor* ve *P. chrysosporium* ile linyitteki toplam kükürt gideriminde optimum koşulların belirlenmesi ilk kez yapılmış ve % 40 oranında bir desülfürizasyon elde edilmiştir. Genel olarak optimizasyon çalışmaları sonucunda *T. versicolor*'un linyit kömüründen kükürt gideriminde *P. chrysosporium*'a göre daha etkin olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda kullanılan fungus biyokütlesi ile kükürt gideriminde her iki tür açısından ortam pH'ı 6, ortam sıcaklığı 35 °C, kömür miktarı % 5 wt, inkübasyon süresi ise *P. chrysosporium* için 4 gün, *T. versicolor* için 6 gün olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen kükürt gideriminden de sadece çalışılan fungus türlerinin sorumlu olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra *T. versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi ile de kükürdün giderilebildiği gösterilmiştir. Yapılan enzim çalışmalarında ortam sıcaklığı 25 °C, enzim miktarı 1 ml, ortam pH'ı 3.3, olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan beyaz çürükçül fungus türlerinin ve

lakkazın kükürt giderimi konusunda bir potansiyel sergilediği gösterilmiştir. Elde edilen biyodesülfürizasyon oranının geliştirilmesi konusunda yapılacak çalışmalara katkı sağlayabileceği düşünölmektedir. Biyodesülfürizasyon konusunda gelecekte yapılabilecek alanda biyolojik iyileştirme teknolojisinin geliştirilmesi ve çalışmanın endüstriyel uygulamaya aktarılması bu çalışmadan beklenen yararlar arasındadır.

## KAYNAKÇA

- [1] Prayuenyong, P., Songklanakarın, J., “Coal biodesulphurization processes”, *Sci.Technol.* 24, 3, (2002), 493.
- [2] TMMOB Maden Mühendisleri Odası, “Linyit Raporu” , <http://www.maden.org.tr/calismalar/raporlar/linyit> (4–5–2007).
- [3] IEA, “Energy Statistics of OECD Countries”, Paris, (2006).
- [4] OECD, International Energy Agency, Eurostat, “Energy Statistics Manual”, [http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2005/statistics\\_manual.pdf](http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2005/statistics_manual.pdf) (2–4–2007).
- [5] TÜİK, “Elektrik Üretim ve Dağıtım Raporu, 2006 III. Dönem (Temmuz – Ağustos – Eylül)”, 204, Ankara, (2006).
- [6] Tripathy, S., Kar, R. N., Mishra, S., Twardowska, I., Sukla, L., “Effect of chemical pretreatment on bacterial desulphurization of Assam coal”, *Fuel*, 77, (1998), 859.
- [7] Kete, R., Acar, N., “Rüzgari Bekleyen Sehir”, *Ekoloji Çevre Magazin* ,2, (2004), 16.
- [8] Demirbilek, S., “Kömür kullanımı ve ilgili çevre kirlenmesi”, *Madencilik*, 26, 3, (1987), 33.
- [9] Tüsiad, “21. yüzyıla girerken enerji stratejisinin değerlendirilmesi”, 98–12/239, Lebib Yalkın Yayınevi, İstanbul, (1998).
- [10] Gowthaman, M.K., Krishna, C., Moo-Yong, M., “Fungal solid state fermentation- an overview”, Khachatourians, G. G., Arora, D. K. (ed), *Applied Mycology and Biotechnology Volume 1-Agriculture and Food Production*, 12, Elsevier Science, New York, (2001), 338.
- [11] Coello, N., Vidal, “Novel applications”, Durieux A., Simon J. (ed), *Applied Microbiology Focus on Biotechnology-Volume 2*, 5, Kluwer Academic Publishers, USA, (2001), 173.

- [12] Taşpınar A., Lakkaz Enzimi İle Bazı Toksik Klorofenolik Bileşiklerin Detoksifikasyonu, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, (2004).
- [13] Levine D.G., Schlosberg R.H., Silbernagel B.G., “Understanding the chemistry and physics of coal structure”, *Proc.Nati.Acad.Sci.*, 79, (1982), 3365.
- [14] Calkins, W.H., “The chemical forms of sulfur in coal: a review”, *Fuel*, 73, (1994), 475.
- [15] Konishi, J., Ishii, Y., Onaka, Y., Okumura, K., Suzuki, M., “Thermophilic carbon-sulphur-bond-targeted biodesulfurization”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 8, (1997), 3164.
- [16] Klein, J., Van Afferden, M., Pfeifer, F. and Schacht, S., “Microbial desulfurization of coal and oil”, *Fuel Processing Technology*, 40 (1994), 297.
- [17] Shah, C.L., Abbott, J.A., Miles, N.J., Xuejun, L., Jianping, X., “Sulphur reduction evaluation of selected high-sulphur Chinese coals”, *Fuel*, 81, (2002), 519.
- [18] Klein, J., “Technological and economic aspects of coal biodesulfurisation”, *Biodegradation*, 9, (1998), 293.
- [19] Yaman, S., Meriçboyu, A.E. and Küçükbayrak, S., “Chemical coal desulphurization research in Turkey”, *Fuel Science and Technology International*, 13, (1995), 49.
- [20] Pysh'yev, S.V., Gayvanovych, V.I., Pattek-Janczyk, A., Stanek, J., “Oxidative desulphurization of sulphur-rich coal”, *Fuel*, 83, (2004), 1117.
- [21] Tripathi, P., Mishra, K., Roy, R., Tewary, D.N., “Investigations on desulphurisation of some high-sulphur Indian coals by  $\gamma$ -ray-induced chlorinolysis”, *Applied Radiation and Isotopes*, 56, (2002), 975.
- [22] Moran, A., Aller, A., Cara, J., Martinez, O., Encinas, J.P., Gomez, E., “Microbiological desulfurization of column-packed coal”, *Fuel Processing Technology*, 52, (1997), 155.
- [23] Cara, J., Carbolla, M.T., Moran, A., Bonilla, D., Escolano, O., Garcia Frutos, F.J., “Biodesulphurization of high sulphur coal by heap leaching”, *Fuel*, 84, (2005), 1905.

- [24] Silverman, M., “Mechanism of bacterial pyrite oxidation”, *Journal of Bacteriology*, 94, 4, (1967), 1046.
- [25] Akçıl, A., Çiftçi, H., “Metal kazanımlarında bakteriyel liç mekanizmaları”, *Madencilik*, 45, 4, (2006), 19.
- [26] Afferden, M., Tappe, D., Beyer, M., Trüper, H.G., Klein, J., “Biochemical mechanism for the desulfurization of coal-relevant organic sulfur compounds”, *Fuel*, 72, (1993), 1635.
- [27] Kilbane, J.J., “Sulfur-specific microbial metabolism of organic compounds”, *Resource Conservation Recycling*, 3, (1990), 69.
- [28] Dahlberg, M.D., Rohrer, R.L., Fauth, D.J., Sprecher, R., Olson, G., “Biodesulphurization of dibenzothiophene sulfone by *Arthrobacter* sp. and studies with oxidized Illinois No.6 coal”, *Fuel*, 72, (1993), 1645.
- [29] Kargi, F., Robinson, J., “Removal of sulfur compounds from coal by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 4, (1985), 878.
- [30] Larsson, L., Olsson, G., Holst, O., Karlsson, H., “Pyrite oxidation by thermophilic archaeobacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3, (1990), 697.
- [31] Olsson, G., Larsson, L., Holst, O., Karlsson, H., “Desulfurization of low-sulfur coal by *Acidianus brierleyi*: Effects of microbial treatment on the properties of coal”, *Fuel processing technology*, 33, (1993), 83.
- [32] Malik, A., Dastidar, M.G., Roychoudhury, P.K., “Biodesulphurization of coal: effect of pulse feeding and leachate recycle”, *Enzyme and microbial technology*, 28, (2001), 49.
- [33] Aller, A., Martinez, O., De Linaje, A., Mendez, R., Moran, A., “Biodesulphurisation of coal by microorganisms isolated from the coal itself”, *Fuel Processing technology*, 69, (2001), 45.
- [34] Zakharyants A. A., Murygina V.P., Kalyuzhnyi S. V. “Screening of *Rhodococcus* species revealing desulfurization activity with regard to dibenzothiophene”, Zaikov, G.E (Ed). *Biocatalytic technology and nanotechnology*, 4, Nova Science Publishers, New York, (2004), 51.
- [35] Izumi, Y., Ohshiro, T., Ogino, H., Hine, Y. and Shimao, M., “Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* strain D-1”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1, (1994), 223.

- [36] Ohshiro, T., Hirata, T. and Izumi, Y., "Desulfurization of dibenzothiophene derivatives by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* H-2", *FEMS Microbiology Letters*, 142, (1996), 65.
- [37] Grossman, M.J., Lee, M.K., Prince, R.C., Garrett, K.K., George, G.N. and Pickering, I.J., "Microbial desulfurization of a crude oil middledistillate fraction: Analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur", *Appl. Environ. Microbiol*, 65, 1, (1999), 181.
- [38] Mohebali G., Ball A.S., Rasekh B., Kaytash A., "Biodesulfurization potential of a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* RIPI90A", *Enzyme and Microbial Technology*, 40, (2007), 578.
- [39] Peebles, T.L., Kelly, R.M., "Bioenergetics of the metal/sulfur-oxidizing extreme thermoacidophile, *Metallosphaera sedula*", *Fuel*, 72, (1993), 1619.
- [40] Acharya, C., Kar, R.N., Sukla, L.B., "Bacterial removal of sulphur from three different coals", *Fuel*, 80, (2001), 2207.
- [41] Van Hamme, J.D., Wong, E.T., Dettman, H., Gray, M.R., Pickard, M.A., "Dibenzyl sulfide metabolism by white rot fungi", *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2, (2003), 1320.
- [42] Acharya, C., Sukla, L.B., Mishra, V.N., "Biological elimination of sulphur from high sulphur coal by *Aspergillus*-like fungi", *Fuel*, 84, (2005), 1597.
- [43] Willmann, G., Fakoussa, R., "Extracellular oxidative enzymes of coal-attacking fungi", *Fuel Processing Technology*, 52, (1997), 27.
- [44] Machnikowska, H., Pawelec, K., Podgorska, A., "Microbial degradation of low rank coals", *Fuel Processing Technology*, 77, (2002), 17.
- [45] Cohen, M.S, Gabriele, P.D., "Degradation of coal by the fungi *Polyporus cersicolor* and *Poria monticokz*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 1, (1982), 23.
- [46] Hölker, U., Mönkemann, H., Höfer, M., "A system to analyze the complex physiological states of coal solubilizing fungi", *Fuel Processing Technology*, 52, (1997),65.
- [47] Hofrichter, M., Bublitz, F., Fritsche, W., "Fungal attack on coal II. Solubilization of low-rank coal by filamentous fungi", *Fuel Processing Technology*, 52, (1997), 55.

- [48] Ralph, J.P., Catcheside, D.E.A., “Transformation of low rank coal by *Phanerochaete chrysosporium* and other wood-rot fungi”, *Fuel processing technology*, 52, (1997), 79.
- [49] ASTM, “Standart test methods for sulfur in the analysis sample of coal and coke using high-temperature tube furnace combustion methods”, USA, (2004).
- [50] Skousen, J., Perry, E., Leavitt, B., Sames, G., Chisholm, W., Cecil, B., Hammack, R., “Static tests for coal mining acid mine drainage prediction in the eastern U.S., Kleinmann, R.L.P. (ed), Prepared by members of the prediction workgroup of the acid drainage technology initiative (ADTI), 4, The national mine land reclamation center, Virginia, (2000), 79.
- [51] Laban, K.L. and Atikin, B.P., “The direct determination of the forms of sulphur in coal using microwave digestion and i.c.p-a.e.s analysis”, *Fuel*, 79, (2000), 173.
- [52] Davidson, R.M., “Quantifying organic sulfur in coal, A review”, *Fuel*, 73, 7, (1994), 988.
- [53] Olsson, G.J., “Prospect for biodesulfurization of coal: mechanisms and related process designs”, *Fuel Processing Technology*, 40, (1994), 103.
- [54] Acevedo, F., “The use of reactors in biomining process”, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 3, 3, (2000), 184.
- [55] Bozdemir, T.O., Durusoy, T., Erincin, E., and Yürüm, Y.,” Biodesulfurization of Turkish lignites 1. Optimization of the growth parameters of *Rhodococcus rhodochrous*, a sulfur-removing bacterium”, *Fuel*, 75, 13, (1996), 1596.
- [56] Durusoy, T., Bozdemir, T.O., Erincin, E., and Yürüm, Y., “Biodesulfurization of Turkish lignites 2. Microbial desulfurization of Mengen lignite by the mesophilic microorganism *Rhodococcus rhodochrous*”, *Fuel*, 76, 4, (1997), 341.
- [57] Erincin, E., Durusoy, T., Bozdemir, T.O., and Yürüm, Y., “Biodesulphurization of Turkish lignites 3. The effect of lignite type and particle size on microbial desulphurization by *Rhodococcus rhodochrous*”, *Fuel*, 77, (1998), 1121.
- [58] Cara, J., Vargas, M., Moran, A., Gomez, E., Martinez, O., Garcia Frutos, F.J., “Biodesulphurization of coal by packed-column leaching: Simultaneous thermogravimetric and mass spectrometric analyses”, *Fuel*, 85, (2006), 1756.
- [59] Hasenekoğlu İ., Yeşilyurt S., Mikrobiyoloji, Erzurum, (2001).

[60] Wainwright, M., *An Introduction to Fungal Biotechnology*, John Wiley & Sons, New York, (1992), 86.

[61] Alain-Boudet, M., “Lignins and lignification”, *Plant Physiol. Biochem.*, 38, (2000), 81.

[62] Kirk, T.K., Lamar, T., Glaser, J.A., “The potential of white-rot fungi in bioremediation”, Mongkolsuk, S., Lovett, P.S., Trempy J.E. (ed), *Biotechnology and environmental science-molecular approaches*, Plenum Pres, New York, 1992, 131.

[63] Yeşilada, Ö., Asma, D., Cing, S., “Decolorization of textile dyes by fungal pellets”, *Process Biochemistry*, 38, (2003), 933.

[64] Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wasilewska, M., Cho, N., Hofrichter, M., Rogalski, J., “Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi”, *Fungal Genetics and Biology*, 27, (1999),175.

[65] Concordia University, Fungal Genomics Project, <https://fungalgenomics.concordia.ca/fungi/>, (4-4-2007).

[66] Esser K., *Cryptogams Cyanobacteria Algae Fungi Lichens*, Cambridge University Press, London, (1982), 486.

[67] Volk, T. J. “*Trametes versicolor*”, <http://www.tomvolkfungi.net/> (9-3-2007).

[68] Harold, H., Burdsall, J.R., *Taxonomy of industrially important white rot fungi*, Young R. A., Akhtar M. (ed), *Environmentally friendly technologies for the plup and paper industry*, 8, John Wiley & Sons, New York, (1998), 260.

[69] Telefoncu A., *Biyoteknoloji*, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, (1995).

[70] Gianfreda, L., Bollag, J., “Isolated for the transformation and detoxification of organic pollutants”, Burns, R.G., Dick, R. (ed), *Enzymes in the environment-Activity, Ecology and Applications*, 19, Marcel Dekker, New York, (2002), 495.

[71] Baldrian P., “Fungal laccases-occurrence and properties”, *FEMS Microbiol.*, 30, (2006) 215.

[72] Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P., Anke, T., “Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae)”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 5, (1998), 1601.



- [73] Couto, S:R., Herrera, J.L., “Industrial and biotechnological applications of laccases: a review”, *Biotechnology Advances*, (baskıda).
- [74] Xiao, Y., Chen, Q., Hang, J., Shi, Y., Wu, J., Hong, Y., Wang, Y., “Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28–2”, *Mycologia*, 96, 1, (2004), 26.
- [75] Duran, N., Rosa, M.A., D’Annibale, A., Giandfreda, L., “Applications of laccases tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports”, *Enzyme and microbial technology*, 31, (2002), 907.
- [76] The Armstrong Research Group, “Laccases”, <http://www.chem.ox.ac.uk/icl/faagroup/laccase.html>, (20–5–2007).
- [77] ITB Stuttgart, “Modeling and design of laccases and dirigent proteins”, [http://www.itb.unistuttgart.de/research/bioinformatics\\_project\\_description19.html](http://www.itb.unistuttgart.de/research/bioinformatics_project_description19.html), (10–5–2007).
- [78] Minussi, R.C., Pastore, G., Duran, N., “Potential applications of laccase in the food industry”, *Trends in Food Science&Technology*, 13, (2002), 205.
- [79] Haghghi, B, Gorton, L, Ruzgas, T, Jönsson, L.J. “Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis”, *Anal Chim Acta*, 487, (2003), 3.
- [80] Lisdat, F., Wollenberger, U., Makower, A., Hortnagl, H., Pfeiffer, D., Scheller, F.W., “Catecholamine detection using enzymatic amplification”, *Biosens Bioelectron*, 12, 12, (1997), 1199.
- [81] Jarosz-Wilkolazka, A., Ruzgas, T., Gorton, L., “Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids”, *Enzyme Microbial Technology*, 35, (2004) 238.
- [82] Spiridonova, B., “Enzyme-pretreated poplar pulp”, *Bioresources*, 2, 1, (2006), 34.
- [83] Odaci, D., Timur, S., Pazarlioglu, N., Montereali, M.R., Vastarella, W., Pilloton, R., Telefoncu A., “Determination of phenolic acids using *Trametes versicolor* laccase”, *Talanta*, 71, (2007), 312.
- [84] Portaccio, M., Di Martino, S., Maiuri, P., Durante, D., Luca, P., Lepore, M., Bencivenga, U., Rossi, S., De Maio, A., Mita, D.G., “Biosensors for phenolic

compounds: The catechol as a substrate model”, *J. Mol. Catal. B. Enzymatic*, 41, (2006), 97.

[85] Gianfreda, L., Sannino, F., Filazzola, M.T. and Leonowicz, A., “Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*”, *J. Mol. Catal. B. Enzymatic*, 4, (1998), 13.

[86] Verdin, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Durand, R., “Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53, (2004), 65.

[87] Roy-Arcand, L., Archibald, F. S., “Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*”, *Enzyme and Microbial Technology*, 13, 3, (1991), 194.

[88] Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R., Vazouez-Duhalt, R., “Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica*” UAMH 8260 laccase, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 9, (1999), 3805.

[89] Aktaş, N., Çiçek, H., Ünal Taşpınar, A., Kibarar, G., Kolankaya, N. and Tanyolaç, A., “Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol”, *Bioresource Technology*, 80, (2001), 29.

[90] Schultz, A., Jonas, U., Hammer, E., Schauer, F., “Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccase”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 9, (2001), 4377.

[91] Dias, A., Bezerra, R., Pereira, A.N., “Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater”, *Biosource Technology*, 92, (2004), 7.

[92] Nilsson, I., Möller, A., Mattiason, B., Rubindamayugi, M.S., Welander, U., “Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white rot fungi”, *Enzyme and Technology*, 38, (2006), 94.

[93] Birhanli, E., Yeşilada, O., “Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated-batch mode”, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, (2006), 1286.

[94] Srinivasan, C., D’Souza, M., Boominathan, K., Reddy, A., “Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*”, *App. Environ. Microbiol.*, 61, 12, (1995), 4274.

[95] Baek, K., Kim, C.S., Lee, H.H, Shin, H.J., Yang, J.W., “Microbial desulphurization of solubilized coal”, *Biotechnology letters*, 24, 5, (2002), 401.

[96] Schreiner, R., Stevens, S., Tien, M., “Oxidation of thianthrene by the ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 7, (1988), 1858.

[97] Hayatsu, R., Scott, R.G, Winans, R.E, Moore, L.P., McBeth, R.L., Studier, M.H., “Lignin-like polymers in coals”, *Nature* 278, (1979), 41.

[98] Ichinose, H., Nakamizo, M., Wariishi, H., Tanaka, H., “Metabolic response against sulfur-containing heterocyclic compounds by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 4, (2002), 517.

[99] Kullman, S., Matsumura, F., “Identification of a novel cytochrome P-450 gene from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 7, (1997), 2741.