

168409

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DÜŞÜK RANGLI KÖMÜRLERE
MİKROORGANİZMA* ve ENZİM** ETKİSİ**

* *Phanerochaete chrysosporium*

** HRP : *Horseradish peroxidase*

Kimya Yük. Müh. İffet YAKAR ELBEYLİ

FBE Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında
Hazırlanan

DOKTORA TEZİ

Tez Savunma Tarihi : 02 Haziran 2005

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sabriye PİŞKİN (YTÜ)

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Neşet ACARKAN (İTÜ)

: Prof. Dr. M. Ali GÜRKAYNAK (İÜ)

: Prof. Dr. Huriye KUZU (YTÜ)

: Prof. Dr. Ahmet EKERİM (YTÜ)

İSTANBUL, 2005

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KISALTMA LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖNSÖZ.....	xiii
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kömürün Oluşumu.....	6
2.2 Kömürün Sınıflandırılması	6
2.3 Kömürün Kimyasal ve Moleküler Yapısı	7
2.3.1 Kömürün Organik Bileşenleri.....	7
2.3.1.1 Kömürün Biyokimyasal Yapıtaşları	8
2.3.1.2 Kömürün Petrografik Bileşenleri.....	12
2.3.2 Kömürün İnorganik Bileşenleri.	13
2.3.3 Kömürde Bulunan Heteroatomlar.....	13
2.3.4 Kömür Molekülü İçin Önerilen Model Yapılar	14
3. MİKROORGANİZMA ve ENZİM ETKİSİYLE KÖMÜRÜN İŞLENMESİ	22
3.1 Mikroorganizma Etkisiyle Kömürden Kükürt Giderimi (Biyodesülfürizasyon)...	25
3.2 Mikroorganizma Etkisiyle Kömürün Gazlaştırılması (Biyogazlaştırma)	25
3.3 Mikroorganizma Etkisiyle Kömürün Sıvılaştırılması / Çözündürülmesi (Biyosıvılaştırma / Biyoçözündürme).....	26
3.3.1 Kömürün Mikroorganizmalarla Sıvılaştırılması/Çözündürülmesi Öncesinde Uygulanan Oksidasyon İşlemleri	28
3.3.2 Kömürün Sıvılaştırılmasında Etkili Olan Mikroorganizmalar, Etki Mekanizmaları ve Biyosıvılaşmayı Etkileyen Faktörler	29
3.4 Kömürden Üretilen Hümik Asidlere Mikroorganizma Etkisi	31
3.5 Kömüre Hücre dışı Peroksidaz Enzimlerinin Etkisi (Biyodepolimerizasyon)	31
3.5.1 Lignin Peroksidaz (LiP) Enzimi	32
3.5.2 Mangan Peroksidaz (MnP) Enzimi.....	33
3.5.3 Fenol Oksidaz (Lakkas) Enzimi.....	33
3.5.4 HRP (Horseradish peroxidase) Enzimi.....	34

4.	ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	36
4.1	Mikroorganizma (White-Rot Fungus) ve Kömür Etkileşimi.....	36
4.1.1	Türk Kömürleriyle Yapılan Mikrobiyal Sıvılaştırma Çalışmaları.....	38
4.2	Hücre dışı Peroksidaz Enzimlerinin Kömüre Etkisi	39
5.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	41
5.1	Kullanılan Malzemeler.....	41
5.1.1	Linyit Numuneleri.....	41
5.1.2	Mikroorganizma (<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , DSM No.6909) ve Enzim (HRP : <i>Horseradish Peroxidase</i> , EC. 1.11.1.7).....	41
5.2	Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	42
5.3	Malzeme Karakterizasyonu ve Uygulanan Yöntemler	43
5.3.1	Linyit Numunelerinin Analiz Edilmesi.....	43
5.3.2	Linyit Numunelerinin Nitrik Asitle (8 M HNO ₃) Oksidasyonu	44
5.3.3	Oksidlendirilmiş Numunelerin Analiz Edilmesi.....	44
5.3.4	Mikrobiyal Sıvılaştırma için Hazırlanan Numunelerin Tane Boyutu Ölçümleri... 44	
5.3.5	Linyitten Hümkik Asid Ekstraksiyonu	48
5.3.5.1	Oksidasyon İşlemi Uygulanmamış Linyitten Hümkik Asid Ekstraksiyonu	48
5.3.5.2	Hidrojen Peroksitle (% 4 H ₂ O ₂) Kimyasal Oksidasyona Tabi Tutulan Linyitten Hümkik Asid Ekstraksiyonu	49
5.3.5.3	Nitrik Asitle (% 30 HNO ₃) Kimyasal Oksidasyona Tabi Tutulan Linyitten Hümkik Asid Ekstraksiyonu.....	50
5.3.6	Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Hümkik Asidlerin Tane Boyutu Ölçümleri	51
5.3.7	Mikroorganizma (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>) Üretimi.....	51
5.3.7.1	Besiyerinin Hazırlanması.....	51
5.3.7.2	Ekim ve Kültivasyon.....	51
5.3.8	Mikroorganizmanın (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>) Linyit Numunelerine ve Hümkik Asidlere Etkisi.....	52
5.3.9	HRP Enziminin Hazırlanması ve Aktivite Tayini	55
5.3.9.1	HRP Enzimi Aktivitesinin 35°C Sıcaklıkta Zamana Bağlı Değişimi	55
5.3.10	HRP Enziminin Hümkik Asidle Reaksiyonu.....	56
5.3.10.1	Oksidasyon İşlemi Uygulanmamış Linyitten Ekstrakte Edilen Hümkik Asidlerle (HA-H) HRP Enziminin Reaksiyonu.....	57
5.3.10.1.1	30, 60 ve 120 µL HRP Enzimi ile Yapılan Deneyler	57
5.3.10.2	Hidrojen Peroksitle Oksidlendirilmiş Linyitten Ekstrakte Edilen Hümkik Asidlerle (HA-P) HRP Enziminin Reaksiyonu.....	58
5.3.10.2.1	30, 60 ve 120 µL HRP Enzimi ile Yapılan Deneyler	58
5.3.10.3	Nitrik Asidle Oksidlendirilmiş Linyitten Ekstrakte Edilen Hümkik Asidlerle (HA-N) HRP Enziminin Reaksiyonu.....	59
5.3.10.3.1	30, 60 ve 120 µL HRP Enzimi ile Yapılan Deneyler	59
5.4	Elde Edilen Ürünlerin, Çözelti ve Çökeltilerin Değerlendirilmesi.....	60
5.4.1	UV-Vis Spektrofotometresi ile Kömür Çözünürlüğünün Tayini.....	60
5.4.2	İnfrared (FTIR) Spektroskopisi ile Fonksiyonel Grupların Tayini.....	61
5.4.3	Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ile Kimyasal Yapı Tayini	62

6.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER	63
6.1	Mikroorganizmanın (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>) Linyit Numunelerine Etkisinin Değerlendirilmesi	63
6.1.1	UV-Vis Spektrofotometresiyle Kömür Çözünürlüğünün Tayini.....	63
6.1.2	Ham ve Oksidlendirilmiş Linyit Numunelerinin FTIR Spektrumları	64
6.1.3	Mikroorganizma Etkisiye Oluşan Sıvı Ürünlerin (Çözelti ve Çökelti) FTIR Spektrumları	72
6.1.4	Mikroorganizma Etkisiyle Oluşan Sıvı Ürünlerin GC-MS Kromatogramları	83
6.2	Mikroorganizmanın (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>) Hüyük Asid Numunelerine Etkisinin Değerlendirilmesi	99
6.2.1	Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Hüyük Asidlerin (HA-H, HA-P, HA-N) UV-Vis Spektrofotometresiyle Belirlenen Absorbans Değerleri.....	99
6.2.2	Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Hüyük Asidlerin (HA-H, HA-P, HA-N) FTIR Spektrumları	100
6.2.3	Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Hüyük Asidlere (HA-H, HA-P, HA-N) Mikroorganizma Etkisi Sonucunda Oluşan Sıvı Ürünlerin (Çözelti ve Çökelti) FTIR Spektrumları	104
6.2.4	Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Hüyük Asidlere (HA-H, HA-P, HA-N) Mikroorganizma Etkisi Sonucunda Oluşan Sıvı Ürünlerin GC-MS Kromatogramları	110
6.3	HRP (<i>Horseradish peroxidase</i>) Enziminin Hüyük Asid Numunelerine Etkisinin Değerlendirilmesi	117
6.3.1	Hüyük Asid (HA-H) ve Enzim Reaksiyonları Sonrasında Elde Edilen Çözelti ve Çökeltilerin FTIR Spektrumları	117
6.3.2	Hüyük Asid (HA-P) ve Enzim Reaksiyonları Sonrasında Elde Edilen Çözelti ve Çökeltilerin FTIR Spektrumları	143
6.3.3	Hüyük Asid (HA-N) ve Enzim Reaksiyonları Sonrasında Elde Edilen Çözelti ve Çökeltilerin FTIR Spektrumları	169
	KAYNAKLAR.....	199
	EKLER	206
Ek 1	Linyitten Hüyük Asid Ekstraksiyonunun Şematik Gösterimi	206
Ek 2	Hüyük Asid (HA-H, HA-P, HA-N) ve Enzim Reaksiyonlarında Elde Edilen Çözelti ve Çökeltilerin Şematik Gösterimi.....	207
	ÖZGEÇMİŞ	208

KISALTMA LİSTESİ

BO-Hİ	Bolu-Himmetoğlu Linyiti
BU-KE	Bursa-Kestelek Linyiti
FTIR	Fourier Transform Infrared
GC-MS	Gas Chromatograph-Mass Spectrometry
HA	Hümik Asid
HA-H	Oksidasyon İşlemi Uygulanmamış Linyitten Elde Edilen Hümik Asidler
HA-P	Hidrojen Peroksitle (% 4 H ₂ O ₂) Oksidlendirilmiş Linyitten Elde Edilen Hümik Asidler
HA-N	Nitrik Asidle (% 30 HNO ₃) Oksidlendirilmiş Linyitten Elde Edilen Hümik Asidler
HPLC	High Pressure Liquid Chromotograph
HRP	Horseradish Peroxidase
KO-IL	Konya-İlgin Linyiti
KÜ-SE	Kütahya-Seyitömer Linyiti
LC-MS	Liquid Chromotograph-Mass Spectrometry
MU-YA	Muğla-Yatağan Linyiti
SEM	Scanning Electron Microscope
UV-Vis	Ultraviolet Visible
T	Transmittance

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Kömürleşme süreci.....4
Şekil 2.2	Kömürleşme derecesi (rank) ve kimyasal yapı arasındaki ilişki..... 5
Şekil 2.3	Lignin yapısı.....9
Şekil 2.4	Ligninde bulunan monomerik üniteler 10
Şekil 2.5	Ligninde bulunan çeşitli tipteki bağlar 1. koniferli alkol, 2. sinapli alkol, 3. p-koumarli alkol 10
Şekil 2.6	Selüloz (I) ve nişastanın (II) basitleştirilmiş yapısı..... 11
Şekil 2.7	Protein (peptid) zincirinin bir bölümü..... 11
Şekil 2.8	Kömürde bulunan kükürt, oksijen ve azot bağlı fonksiyonel gruplar 13
Şekil 2.9	Hümkik asidin moleküler yapısı 14
Şekil 2.10	Given tarafından kömür için önerilen moleküler yapı 15
Şekil 2.11	Wiser tarafından kömür için önerilen moleküler yapı 15
Şekil 2.12	Shinn tarafından bitümlü kömür için önerilen moleküler yapı 16
Şekil 2.13	Wolfum tarafından düşük ranklı kömürler için önerilen moleküler yapı 16
Şekil 2.14	Kömürün XRD analizlerinden yola çıkılarak önerilen moleküler yapı 17
Şekil 2.15	% 82 C içeren vitrinit için önerilen moleküler yapı..... 17
Şekil 2.16	(a) % 80 C içeren vitrinit ve (b) % 90 C içeren vitrinit için önerilen model yapılar..... 18
Şekil 2.17	Yoğun aromatik ve hidroaromatik çekirdek ağı modelindeki kömürün moleküler yapısı..... 18
Şekil 2.18	% 68 C içeren linyitten % 91 C içeren antrasite kadar çeşitli ranktaki kömürler için önerilen moleküler yapılar..... 19
Şekil 2.19	Çeşitli oranlarda karbon içeren (% 76-90 C) kömürlerdeki kararlı yapılar 19
Şekil 2.20	Solomon tarafından önerilen moleküler yapı20
Şekil 2.21	Haenel tarafından önerilen ve kömürü iki bileşenli sistem olarak kabul eden moleküler yapı.....20
Şekil 2.22	Rheinische Braunkohle tarafından önerilen moleküler yapı21
Şekil 3.1	Linyitin alkali muamelesi ve hidrojen peroksitle oksidasyonu; A: alkali hidrolizleme, B:hidrojen peroksitle (H ₂ O ₂) oksidasyon.....29
Şekil 3.2	(a) Oksidlenmiş LiP ile lignindeki fenolik olmayan arilgliserol-β-aril eterin kopması (b) Oksidlenmiş MnP ile reaktif fenolik arilgliserol-β-aril eterin kopması30
Şekil 3.3	HRP enziminin üç boyutlu yapısı34
Şekil 3.4	HRP enziminin çalışma mekanizması.....34
Şekil 3.5	Halojen iyonları ve hidrojen peroksit varlığında heme içerikli peroksidazların katalitik çevrimi35
Şekil 5.1	Deneysel çalışmalarda kullanılan mikroorganizma suşunun (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>) görüntüsü.....41
Şekil 5.2	Deneysel çalışmalarda kullanılan mikroorganizma suşunun (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>) farklı büyütme oranlarında belirlenen SEM görüntüleri.....42
Şekil 5.3	Nitrik asitle oksidlendirilmiş Bolu-Himmetoğlu linyitinin tane boyutu ölçüm grafiği46
Şekil 5.4	Nitrik asitle oksidlendirilmiş Bursa-Kestelek linyitinin tane boyutu ölçüm grafiği46
Şekil 5.5	Nitrik asitle oksidlendirilmiş Konya-Ilgın linyitinin tane boyutu ölçüm grafiği46

Şekil 5.6	Nitrik asitle oksidlendirilmiş Kütahya-Seyitömer linyitinin tane boyutu ölçüm grafiği	47
Şekil 5.7	Nitrik asitle oksidlendirilmiş Muğla-Yatağan linyitinin tane boyutu ölçüm grafiği	47
Şekil 5.8	Nitrik asitle oksidlendirilmiş linyitlerin mikroorganizma ortamındaki görüntüleri	53
Şekil 5.9	Mikroorganizma etkisiyle sınılaşan hümik asitlerin görüntüleri.....	54
Şekil 5.10	HRP enzimi aktivitesinin zamana bağlı değişimi	56
Şekil 6.1	Mikroorganizma etkisiyle linyitlerden elde edilen sıvı ürünlerin UV-Vis spektrumları.....	63
Şekil 6.2	Bolu-Himmetoğlu linyitinin FTIR spektrumu a) Oksidasyon öncesi b) Oksidasyon sonrası	67
Şekil 6.3	Bursa-Kestelek linyitinin FTIR spektrumu a) Oksidasyon öncesi b) Oksidasyon sonrası	68
Şekil 6.4	Konya-Ilgın linyitinin FTIR spektrumu a) Oksidasyon öncesi b) Oksidasyon sonrası	69
Şekil 6.5	Kütahya-Seyitömer linyitinin FTIR spektrumu a) Oksidasyon öncesi b) Oksidasyon sonrası.....	70
Şekil 6.6	Muğla-Yatağan linyitinin FTIR spektrumu a) Oksidasyon öncesi b) Oksidasyon sonrası.....	71
Şekil 6.7	Bolu-Himmetoğlu linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çözelti) FTIR spektrumu	73
Şekil 6.8	Bursa-Kestelek linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çözelti) FTIR spektrumu.....	74
Şekil 6.9	Konya-Ilgın linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çözelti) FTIR spektrumu	75
Şekil 6.10	Kütahya-Seyitömer linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çözelti) FTIR spektrumu.....	76
Şekil 6.11	Muğla-Yatağan linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çözelti) FTIR spektrumu	77
Şekil 6.12	Bolu-Himmetoğlu linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çökelti) FTIR spektrumu.....	78
Şekil 6.13	Bursa-Kestelek linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çökelti) FTIR spektrumu.....	79
Şekil 6.14	Konya-Ilgın linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çökelti) FTIR spektrumu.....	80
Şekil 6.15	Kütahya-Seyitömer linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çökelti) FTIR spektrumu.....	81
Şekil 6.16	Muğla-Yatağan linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çökelti) FTIR spektrumu.....	82
Şekil 6.17	Farklı tipteki linyit numunelerine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünlerin (çözelti) GC-MS kromotogramları	84
Şekil 6.18	Nitrik asitle (8 M HNO ₃) oksidlendirilmiş linyit numunelerinin GC-MS kromotogramları.....	85
Şekil 6.19	Deneylerde kullanılan ham linyit numunelerinin GC-MS kromotogramları ...	86
Şekil 6.20	Tüm numunelerin GC-MS kromotogramlarında gözlenen 15.59“retention time” kalma zamanında oluşmuş temel pike ait kimyasal maddeler.	87
Şekil 6.21	Tüm numunelerin GC-MS kromotogramlarında gözlenen 19.28 “retention time” kalma zamanında oluşmuş temel pike ait kimyasal maddeler	88

Şekil 6.22	Bolu-Himmetoğlu linyitinin GC-MS kromotogramları a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün b) Oksidlendirilmiş linyit c) Ham linyit.....	89
Şekil 6.23	Bursa-Kestelek linyitinin GC-MS kromotogramları a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün b) Oksidlendirilmiş linyit c) Ham linyit.....	91
Şekil 6.24	Konya-Ilgın linyitinin GC-MS kromotogramları a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün b) Oksidlendirilmiş linyit c) Ham linyit.....	93
Şekil 6.25	Kütahya-Seyitömer linyitinin GC-MS kromotogramları a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün b) Oksidlendirilmiş linyit c) Ham linyit.....	95
Şekil 6.26	Muğla-Yatağan linyitinin GC-MS kromotogramları a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün b) Oksidlendirilmiş linyit c) Ham linyit.....	97
Şekil 6.27	Mikroorganizma etkisiyle hümik asidlerden (HA-H, HA-P, HA-N) elde edilen sıvı ürünlerin UV-Vis spektrumları.....	99
Şekil 6.28	Ham linyitten ekstrakte edilen hümik asidin (HA-H) FTIR spektrumu	101
Şekil 6.29	Hidrojen peroksitle (% 4 H ₂ O ₂) oksidlendirilmiş linyitten ekstrakte edilen hümik asidin (HA-P) FTIR spektrumu	102
Şekil 6.30	Nitrik asidle (% 30 HNO ₃) oksidlendirilmiş linyitten ekstrakte edilen hümik asidin (HA-N) FTIR spektrumu.....	103
Şekil 6.31	HA-H ve mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürünün (çözelti) FTIR spektrumları.....	105
Şekil 6.32	HA-P ve mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürünün (çözelti) FTIR spketrumları.....	106
Şekil 6.33	HA-N ve mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürünün (çözelti) FTIR spektrumları.....	107
Şekil 6.34	Mikroorganizma etkisiyle hümik asidlerden (HA-H, HA-P ve HA-N) elde edilen sıvı ürünlerin (çözelti) FTIR spektrumları	108
Şekil 6.35	Mikroorganizma etkisiyle hümik asidlerden (HA-H, HA-P ve HA-N) elde edilen sıvı ürünlerin (çökelti) FTIR spektrumları	109
Şekil 6.36	Ham linyitten ekstrakte edilen hümik asidin (HA-H) GC-MS kromotogramları a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün (çözelti) b) Hümik asid (HA-H)	111
Şekil 6.37	Hidrojen peroksitle (% 4 H ₂ O ₂) oksidasyon sonrasında ekstrakte edilen hümik asidin (HA-P) GC-MS kromotogramları a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün (çözelti) b) Hümik asid (HA-P)	113
Şekil 6.38	Nitrik Asidle (% 30 HNO ₃) oksidasyon sonrasında ekstrakte edilen hümik asidin (HA-N) GC-MS kromotogramları a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün (çözelti) b) Hümik asid (HA-N)	115
Şekil 6.39	HA-H ve HRP enziminin (30 µL) farklı sürelerde gerçekteştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları.....	118
Şekil 6.40	HA-H ve HRP enziminin (30 µL) farklı sürelerde gerçekteştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları.....	119
Şekil 6.41	HA-H'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumu	120
Şekil 6.42	HA-H'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu	121
Şekil 6.43	HA-H'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilerin hümik asidle (HA-H) karşılaştırılması	122
Şekil 6.44	HA-H'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin hümik asidle (HA-H) karşılaştırılması	123
Şekil 6.45	HA-H'in HRP enzimiyle (30 µL) gerçekteştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çökeltilerin karşılaştırılması	124

Şekil 6.46	HA-H ve HRP enziminin (60 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları.....	126
Şekil 6.47	HA-H ve HRP enziminin (60 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları.....	127
Şekil 6.48	HA-H'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumu	128
Şekil 6.49	HA-H'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumu	129
Şekil 6.50	HA-H'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilerin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması.....	130
Şekil 6.51	HA-H'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltilerin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması.....	131
Şekil 6.52	HA-H'in HRP enzimiyle (60 µL) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çökeltilerin karşılaştırılması.....	132
Şekil 6.53	HA-H ve HRP enziminin (120 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları.....	134
Şekil 6.54	HA-H ve HRP enziminin (120 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları.....	135
Şekil 6.55	HA-H'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumu	136
Şekil 6.56	HA-H'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumu	137
Şekil 6.57	HA-H'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilerin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması.....	138
Şekil 6.58	HA-H'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltilerin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması.....	139
Şekil 6.59	HA-H'in HRP enzimiyle (120 µL) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çökeltilerin karşılaştırılması.....	140
Şekil 6.60	HA-H'in HRP enzimiyle (120 µL) 4 saat sürede gerçekleştirilen reaksiyondan elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumu.....	141
Şekil 6.61	HA-H'in HRP enzimiyle (120 µL) 4 saat sürede gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumu.....	142
Şekil 6.62	HA-P ve HRP enziminin (30 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları.....	144
Şekil 6.63	HA-P ve HRP enziminin (30 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları.....	145
Şekil 6.64	HA-P'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumu	146
Şekil 6.65	HA-P'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumu	147
Şekil 6.66	HA-P'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilerin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması.....	148
Şekil 6.67	HA-P'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltilerin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması.....	149
Şekil 6.68	HA-P'in HRP enzimiyle (30 µL) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çökeltilerin karşılaştırılması.....	150
Şekil 6.69	HA-P ve HRP enziminin (60 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları.....	152
Şekil 6.70	HA-P ve HRP enziminin (60 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları.....	153

Şekil 6.71	HA-P'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilisinin FTIR spektrumu	154
Şekil 6.72	HA-P'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu	155
Şekil 6.73	HA-P'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilisinin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması	156
Şekil 6.74	HA-P'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması	157
Şekil 6.75	HA-P'in HRP enzimiyle (60 µL) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çökeltilerin karşılaştırılması	158
Şekil 6.76	HA-P ve HRP enziminin (120 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları	160
Şekil 6.77	HA-P ve HRP enziminin (120 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları	161
Şekil 6.78	HA-P'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilisinin FTIR spektrumu	162
Şekil 6.79	HA-P'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu	163
Şekil 6.80	HA-P'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilisinin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması	164
Şekil 6.81	HA-P'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması	165
Şekil 6.82	HA-P'in HRP enzimiyle (120 µL) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çökeltilerin karşılaştırılması	166
Şekil 6.83	HA-P'in HRP enzimiyle (120 µL) 4 saat sürede gerçekleştirilen reaksiyondan elde edilen çözeltilisinin FTIR spektrumu	167
Şekil 6.84	HA-P'in HRP enzimiyle (120 µL) 4 saat sürede gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu	168
Şekil 6.85	HA-N ve HRP enziminin (30 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları	170
Şekil 6.86	HA-N ve HRP enziminin (30 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları	171
Şekil 6.87	HA-N'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilisinin FTIR spektrumu	172
Şekil 6.88	HA-N'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu	173
Şekil 6.89	HA-N'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilisinin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması	174
Şekil 6.90	HA-N'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması	175
Şekil 6.91	HA-N'in HRP enzimiyle (30 µL) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çökeltilerin karşılaştırılması	176
Şekil 6.92	HA-N ve HRP enziminin (60 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları	178
Şekil 6.93	HA-N ve HRP enziminin (60 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları	179
Şekil 6.94	HA-N'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilisinin FTIR spektrumu	180
Şekil 6.95	HA-N'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu	181

Şekil 6.96	HA-N'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilisinin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması	182
Şekil 6.97	HA-N'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması	183
Şekil 6.98	HA-N'in HRP enzimiyle (60 µL) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözeltili ve çökeltilerin karşılaştırılması	184
Şekil 6.99	HA-N ve HRP enziminin (120 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları	186
Şekil 6.100	HA-N ve HRP enziminin (120 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları	187
Şekil 6.101	HA-N'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilisinin FTIR spektrumu	188
Şekil 6.102	HA-N'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu	189
Şekil 6.103	HA-N'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilisinin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması	190
Şekil 6.104	HA-N'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması	191
Şekil 6.105	HA-N'in HRP enzimiyle (120 µL) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözeltili ve çökeltilerin karşılaştırılması	192
Şekil 6.106	HA-N'in HRP enzimiyle (120 µL) 4 saat sürede gerçekleştirilen reaksiyondan elde edilen çözeltilisinin FTIR spektrumu	193
Şekil 6.107	HA-N'in HRP enzimiyle (120 µL) 4 saat sürede gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu	194

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1	Çeşitli ranktaki kömürlerin bazı özellikleri.....6
Çizelge 2.2	Çeşitli ranktaki kömürlerin yapısal özellikleri 7
Çizelge 2.3	Bitkilerde bulunan polimer tipleri (protein haricinde bulunan makromoleküller)8
Çizelge 3.1	Kömürün sıvılaştırılması/çözünürleştirilmesinde kullanılan mikroorganizmalardan bazıları24
Çizelge 5.1	Deneyisel çalışmalarda kullanılan linyit numunelerine ait analiz sonuçları45
Çizelge 5.2	Nitrik Asidle (8 M HNO ₃) oksidasyon sonrasında elde edilen numunelerin analiz sonuçları.....45
Çizelge 5.3	Mikrobiyal sıvılaştırmada kullanılan numunelerin tane boyutu ölçüm sonuçları47
Çizelge 5.4	Hüyük asid ekstraksiyonunda kullanılan deneyisel koşullar48
Çizelge 6.1	Linyitlerden elde edilen sıvı ürünlerin 450 nm'deki çözünürlük değerleri63
Çizelge 6.2	FTIR spektrumlarında oluşan bandlar ve gösterdikleri fonksiyonel gruplar ...65
Çizelge 6.3	Bolu-Himmetoğlu linyitinin GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar90
Çizelge 6.4	Bursa-Kestelek linyitinin GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar92
Çizelge 6.5	Konya-Ilgın linyitinin GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar94
Çizelge 6.6	Kütahya-Seyitömer linyitinin GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar96
Çizelge 6.7	Muğla-Yatağan linyitinin GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar98
Çizelge 6.8	Hüyük asidlerden elde edilen sıvı ürünlerin 450 nm'deki aborbans değerleri.....99
Çizelge 6.9	Ham linyitten ekstrakte edilen hüyük asidin (HA-H) GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar 112
Çizelge 6.10	Hidrojen peroksitle (% 4 H ₂ O ₂) oksidasyon sonrasında ekstrakte edilen hüyük asidin (HA-P) GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar 114
Çizelge 6.11	Nitrik asidle (% 30 HNO ₃) oksidasyon sonrasında ekstrakte edilen hüyük asidin (HA-N) GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar 116

ÖNSÖZ

Türkiye düşük ranklı kömür rezervleri bakımından oldukça büyük bir potansiyele sahiptir. Ancak kömür kalitesinin düşük olması, bu kömürlerin yakılarak kullanılmasının dışında kimyasal madde üretiminde de değerlendirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Kömür işleminde kullanılan kimyasal teknolojilere alternatif olarak sunulan ve 1980'li yılların başında geliştirilen biyoteknolojik yöntemler kömür biyoteknolojisi adı altında yeni bir çalışma alanının doğmasına yol açmıştır. Mikroorganizma ve enzimlerle kömürden çeşitli kimyasalların ılımlı koşullar altında üretilebilmesi, düşük ranklı kömürlerin değerlendirilmesi açısından umut verici görülmektedir.

“Düşük Ranklı Kömürlere Mikroorganizma (*Phanerochaete chrysosporium*) ve Enzim (HRP : *Horseradish Peroxidase*) Etkisi“ başlıklı doktora tezimin danışmanlığını yapan değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Sabriye Pişkin'e, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösterdiği ve beni sürekli desteklediği için, ayrıca sunmuş olduğu araştırma-geliştirme olanaklarından faydalanma fırsatını tanıdığı için sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Doktora tezimin deneysel kısımlarında çalışmalarına yön vererek, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve destek olan değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Huriye Kuzu'ya sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Deneysel çalışmalarımın mikroorganizma üretim bölümünde bana yardımcı olan, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayşegül Peksel'e çok teşekkür ederim. Numunelerimin GC-MS analizlerini yapan Kimya Yük. Müh. Arzu Palantöken'e, tane boyutu dağılım analizlerini yapan Sayın Dr. Mustafa Kara'ya, elementel analizlerinin yapılmasında yardımcı olan ERDEMİR çalışanlarına, SEM analizlerini yapan Uzm. Polat Topuz'a, kömür numunelerinin deneysel çalışmalara hazırlanmasında yardımcı olan Kimya Müh. Ü. Banu Sarıalioğlu'na ve tezimin hazırlanması aşamasında yardımcı olan Dr. Müh. Özlem Çelik'e çok teşekkür ederim.

Desteği ve ilgisiyle hep yanımda olan değerli eşim Mak. Müh. Memduh Mekin Elbeyli'ye, hayatımın her döneminde bana destek olan sevgili annem Asuman Yakar, babam Maden Yük. Müh. Süleyman Yakar ve kardeşim Mak. Müh. Bünyamin Yakar'a sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Kömürün biyolojik kökenli olması, yapısının parçalanması ya da depolimerize edilmesinde mikroorganizma ve enzimlerin kullanıldığı mikrobiyal yöntemlerin faydalı olacağını düşündürmektedir. Mikrobiyolojik yöntemlerle kömür işleme, daha az enerji gereksinimi, yüksek verimle çalışma, biyolojik reaksiyonların düşük sıcaklıkta (25-75°C) ve atmosfer basıncında yürütülmesi açısından oldukça avantajlı görülmektedir.

Bu çalışmada, düşük ranklı kömürlerin mikroorganizma (*Phanerochaete chrysosporium*) etkisiyle sıvılaştırılması ve elde edilen ürünlerin kimyasal yapılarının aydınlatılması amaçlanmıştır. Ayrıca linyitten ekstrakte edilen hümik asitlerin HRP (*Horseradish peroxidase*) enzimiyle depolimerizasyonu ve enzimatik etkinin yapıda meydana getirdiği değişimler incelenmiştir.

Bu amaçla, Türkiye'nin farklı kömür bölgelerinden (Bolu-Himmetoğlu, Bursa-Kestelek, Konya-İlgin, Kütahya-Seyitömer ve Muğla-Yatağan) alınan linyit numuneleri nitrik asitle (8 M HNO₃) kimyasal oksidasyon tabii tutulmuştur. Oksidlendirilmiş numuneler, petri kaplarında üretilen mikroorganizma ortamına konularak sıvılaştırılmıştır. Elde edilen sıvı ürünler santrüfüjlenerek çözelti ve çökelti kısımlarına ayrılmış ve kimyasal özellikleri UV-Vis, FTIR ve GC-MS teknikleriyle incelenmiştir. İkinci bölümde, Bolu-Himmetoğlu linyiti hidrojen peroksit (% 4 H₂O₂) ve nitrik asitle (% 30 HNO₃) ayrı ayrı oksidlendirilmiş, oksidli numunelerden hümik asit ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstrakte edilen hümik asitler mikroorganizma etkisiyle sıvılaştırılmış ve ürünler UV-Vis, FTIR ve GC-MS teknikleriyle analiz edilmiştir. Üçüncü bölümde ise hümik asit numuneleri substrat olarak kullanılmış ve HRP enzimiyle reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon bitiminde çözeltiler santrüfüjlenerek çözelti ve çökelti fraksiyonlarına ayrılmış ve her bir fraksiyon FTIR spektroskopisiyle incelenmiştir.

Mikroorganizmanın oksidlendirilmiş kömür numunesinde azot ve karbonil/karboksil gruplarına etki ettiği, oluşan sıvı ürünlerin suda tamamen çözünen aromatik yapıli bileşiklerin bir karışımı olduğu ve polar özellik taşıdığı tespit edilmiştir. Enzimle yapılan denemelerde ise enzimin yapıda depolimerizasyona yol açtığı en fazla etkinin ham linyitten ekstrakte edilen hümik asitlerde olduğu sonucuna varılmıştır. HRP enziminin hümik asit moleküllerinin oksidasyonuna ve yapıda çeşitli grupların oluşumuna yol açtığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikroorganizma, enzim, linyit, hümik asit, sıvılaştırma, depolimerizasyon.

ABSTRACT

The biological origin of the coal indicates that microbial methods including microorganisms or enzymes may be beneficial in the degradation or depolymerization of its structure. It has been observed that processing of coal by microbial methods is more advantageous because it requires low energy, high yield and because biological reactions occur at a low temperature (25-75°C) and atmospheric pressure.

The aim of this study is the liquefaction of low-rank coals by microorganism (*Phanerochaete chrysosporium*) and the investigation of the chemical structure of the obtained products. Besides, depolymerization of humic acids extracted from lignite by HRP enzyme (*Horseradish peroxidase*) and the changes occurred by enzymatic effects in structure are investigated.

For this purpose, low rank coals taken from coal regions (Bolu-Himmetoğlu, Bursa-Kestelek, Konya-İlgin, Kütahya-Seyitömer ve Muğla-Yatağan) were oxidized by nitric acid (8 M HNO₃). Oxidized lignite samples were liquefied by putting on microorganisms grown on petri dishes. The obtained liquid products were separated as supernatant and precipitated via centrifugation and their chemical properties were determined by UV-Vis, FTIR and GC-MS techniques. In the second part, Bolu-Himmetoğlu lignite was oxidized separately by hydrogen peroxide (% 4 H₂O₂) and nitric acid (% 30 HNO₃) solutions and then extraction of humic acids were carried out from the oxidized samples. Extracted humic acids were liquefied by microbial effects and the liquid products were analyzed by UV-Vis, FTIR and GC-MS techniques. In the third part, extracted humic acids were used as substrate and were reacted with HRP enzyme. At the end of the reactions, solutions were separated as supernatant and precipitate via centrifugation and each of fractions were analyzed by FTIR spectroscopy.

It was determined that microorganism effected on the nitro and carbonyl/carboxyl groups in oxidized coal, that liquid products have same properties and are completely soluble in water as a mixture of aromatic compounds and have polar properties. The experiments carried out with enzymes were demonstrated that the most effect is found in humic acids extracted from raw lignite. It was determined that HRP enzyme was brought about the oxidation of humic acid molecules and that some various groups in humic acids also occurred.

Keywords: Microorganism, enzyme, lignite, humic acid, liquefaction, depolymerization.

1. GİRİŞ

Dünya nüfusundaki hızlı artışa ve endüstriyel kalkınmaya bağlı olarak ortaya çıkan enerji gereksinimi, yeni kaynakların araştırılmasını ya da var olan kaynakların daha verimli kullanılmasını zorunlu hale getirmiştir. Günümüzde, dünya enerji gereksiniminin % 80'i kömür, petrol ve doğalgaz gibi fosil yakıtlardan karşılanmakta, kömür birincil enerji kaynağı olarak yerini korumaktadır (Yıldırım ve Göllü, 1998).

Türk linyitlerinin % 68'i düşük ısı değere sahip olup, nem, kül ve kükürt içerikleri yüksektir. Kırılgan bir karaktere sahip olduklarından üretim, hazırlama, taşıma ve depolama esnasında tozlaşma oranları % 30-40'lara ulaşmakta, bu oran uzun süreli depolamada, nem kaybı ve oksidasyonunda etkisiyle, % 60'a kadar çıkmaktadır. Toz-parça kömür karışımının klasik ızgaralı yakma sistemlerinde yakılması halinde, toz kömürün tam bir yanmaya uğramadan hava ile sürüklenerek bacadan çıkması, çevre kirliliği yaratmanın yanı sıra yenilenemeyen bir enerji kaynağının da kaybına yol açmaktadır. Nem içeriklerinin % 50'ye varması, taşımacılıkta yüksek maliyete yol açmakta, buhar haline geçen nem, yakma sistemlerinde önemli ölçüde enerji kaybına neden olmaktadır. Ayrıca, Türk linyitlerinin toplam kükürt içerikleri dünya ortalamasının çok üzerindedir. Bilindiği gibi linyit yakılması sonucu oluşan kükürt dioksit, atmosferdeki en önemli kirleticilerden biridir (Beker vd., 1998).

Kömür kullanımı, taşınım, yanma ve çevre kirliliği açısından birtakım problemleri beraberinde getirdiğinden, kömürün gaz ve sıvı yakıtlara dönüştürülerek kullanılması, önem ve gereklilik kazanmıştır. Kömürün kok, gaz ve sıvı ürünlere dönüştürülmesi, elde edilen ürünlerden daha fazla yararlanılması, dönüşüm veriminin artırılması ve çevre etkilerinin azaltılması için birçok bilimsel ve teknolojik çalışma yapılmaktadır.

Kömürün sıvılaştırılması ve gazlaştırılmasında kullanılan klasik yöntemler, genellikle kömürün temizlenmesini takip eden, yüksek sıcaklık ve yüksek basıncın kullanıldığı bir seri kimyasal prosesi ve ayırma işlemini içermektedir. Bu aşamalar, sürekli reaksiyon kontrolünü gerektirdiğinden, yüksek sermaye ve operasyon maliyetine sahip olduklarından, prosesleri ekonomik olmayan bir hale sokmaktadır (Klein, 1999).

Maliyet artışı ve çevre sorunları kömür dönüşüm proseslerinde yeni teknolojilerin gelişimini gerekli kılmıştır. 1980'li yılların başında, biyolojik temelli sistemlerin, fosil yakıtların işlenmesinde kullanılması, kömür üzerine yapılan bilimsel çalışmaların önemli bir kısmını oluşturmuş ve kömür işlemede biyoteknolojik yöntemlerin kullanımı, alternatif bir yol olarak seçilmiştir (Catcheside ve Ralph, 1999).

Kömürün biyolojik kökenli olması yapısının mikrobiyolojik yöntemle parçalanabileceğini düşündürmüştür. Mikrobiyolojik yöntemlerle kömür dönüşümü, enerji kaybının azlığı ve biyolojik reaksiyonların düşük sıcaklık (25-75 °C) ve atmosfer basıncında yürütülebilir olması bakımından oldukça avantajlı görülmektedir (Başaran, 2001).

Kömür biyoteknolojisi, kömürden kükürtün ve bazı metallerin uzaklaştırılmasına yönelik biyodesülfürizasyon ve biyoliçleme, düşük molekül ağırlıklı organik madde üretimine yönelik biyosivileştirme / biyoçözündürme, biyodepolimerizasyon, metan eldesine yönelik biyogazlaştırma gibi çeşitli alanları kapsamaktadır (Srivastava vd., 1989).

Mikroorganizma ve enzimler aracılığıyla kömürün işlenmesi üzerine yapılan son çalışmalar, daha az enerji gerektiren biyosivileştirme, biyoçözündürme ve biyodepolimerizasyon üzerinde yoğunlaşmıştır (Başaran, 2001).

Biyosivileştirme çalışmalarında ele alınan mekanizma, fungusların ürettiği enzim ve kelatların, kömür makromolekülündeki aromatik yapılar arasında bulunan alifatik ve eter bağlarına etki ederek, onları koparmalarına dayanır (Fakoussa ve Hofrichter, 1999). Biyosivileştirme, kömürün mikroorganizma vasıtasıyla katı halden sıvı hale getirilmesi yani fiziksel bir hal değişimi olarak tanımlanırken, biyodepolimerizasyon ise enzimler vasıtasıyla gerçekleşen ve katalitik reaksiyonların söz konusu olduğu reaksiyon olarak tanımlanmaktadır. Biyodepolimerizasyon, kömürden elde edilen, heterojen yapıda olan ve polimerik özellik taşıyan kömür türevli hümitik asitlerin, *in vitro* (mikroorganizma aracılığıyla) ve *in vivo* (enzim aracılığıyla) koşullarda parçalanmasına dayanır (Klein, 1999).

Biyoçözündürme, biyosivileştirme ve biyodepolimerizasyona ilişkin çalışmaların birçoğunda kömürün alkalide çözünür kısmına etkiden söz edilir. Alkalide çözünmeyen matris, yüksek molekül ağırlıklı aromatik yapıların birbirine bağlanması ile oluştuğundan biyolojik etkinin zor olacağı düşünülmüştür (Fakoussa ve Hofrichter, 1999).

“Filamentous” funguslar tarafından katı kömür parçacıklarının siyah renkli damlacıklar haline dönüşmesi ilk kez 1981’de Dr. Fakoussa tarafından çalışılmıştır (Fakoussa, 1981). Çözündürme olarak adlandırılan bu çalışma, alkalik maddeler (NH₃, biyolojik türevli aminler) ve kelatların üretimi nedeniyle enzimatik olmayan bir proses olarak tanımlanmıştır. Oksidatif enzimlerin (fenoloksidaz, lakkas, peroksidaz) çözündürme proseslerinde etkin olmadığı buna karşın, hidrolitik enzimlerin (esteraz, sellülaz) linyitlerin biyolojik çözündürülmesinde etkin oldukları ileri sürülmüştür (Klein, 1999).

Phanerochaete chrysosporium, *Trametes versicolor*, *Penicillium*, *Trichoderma atroviride*, *Fusarium oxysporium*, *Nematoloma frowardii*, *Clitocybula dussenii* ve *Trametes versicolor* gibi lignin bozucu funguslar, kömürü çözüdürmekte ve ürettikleri bazı enzimler vasıtasıyla da makromolekülleri depolimerize etmektedirler. Önceki paragrafta verilen görüşün aksine *Phanerochaete chrysosporium*'dan elde edilen mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz enzimlerinin, kovalent bağlara etki ettiği ve depolimerizasyonda önemli rol oynadığı iddia edilmiştir. Lignin bozucu diğer bir fungus olan *Trametes versicolor*'dan üretilen peroksidaz ve lakkas enzimleri ile yapılan çalışmalarda, bu enzimin kömür türevli hümik asitleri parçalayarak fülvik asitlere dönüştürdüğü belirlenmiştir (Klein, 1999).

Bu çalışmada, düşük ranklı kömürlere mikroorganizma (*Phanerochaete chrysosporium*, DSM No. 6909) ve enzim (*Horseradish peroxidase*, EC. 1 11 1 7) etkisi araştırılmıştır.

Çalışmanın birinci bölümünde, Bolu-Himmetoğlu (BO-Hİ), Bursa-Kestelek (BU-KE), Konya-Ilgın (KO-IL), Kütahya-Seyitömer (KÜ-SE) ve Muğla-Yatağan (MU-YA) linyit numuneleri, nitrik asitle oksidlendirilmiş ardından mikroorganizma etkisiyle sıvılaştırılmıştır. Elde edilen sıvı ürünler santrüfujleme yoluyla çözelti ve çökelti kısımlarına ayrılmış, kimyasal yapıları, FTIR ve GC-MS teknikleriyle incelenmiştir. Kömür çözünürlüğü UV-Vis spektrofotometresiyle belirlenmiştir.

İkinci bölümde Bolu-Himmetoğlu (BO-Hİ) linyiti hidrojen peroksit (% 4 H₂O₂) ve nitrik asitle (% 30 HNO₃) ayrı ayrı oksidlendirilmiş ardından alkali muamele yapılarak hümik asitler ekstrakte edilmiştir. Ham ve oksidlendirilmiş numunelerden elde edilen hümik asit numuneleri (HA-H, HA-P, HA-N) mikroorganizma etkisiyle sıvılaştırılmıştır. Elde edilen sıvı ürünler santrüfujleme yoluyla çözelti ve çökelti kısımlarına ayrılmış, kimyasal yapıları, FTIR ve GC-MS teknikleriyle incelenmiştir. Çözünürlükleri UV-Vis spektrofotometresiyle belirlenmiştir.

Üçüncü bölümde ise hümik asit numuneleri (HA-H, HA-P, HA-N) HRP enzimiyle (30, 60, 120 µL) farklı sürelerde reaksiyona sokulmuş, reaksiyon bitiminde çözeltiler santrüfujlenerek çözelti ve çökelti kısımlarına ayrılmış, yapıda meydana gelen değişimler FTIR spektroskopisiyle incelenmiştir.

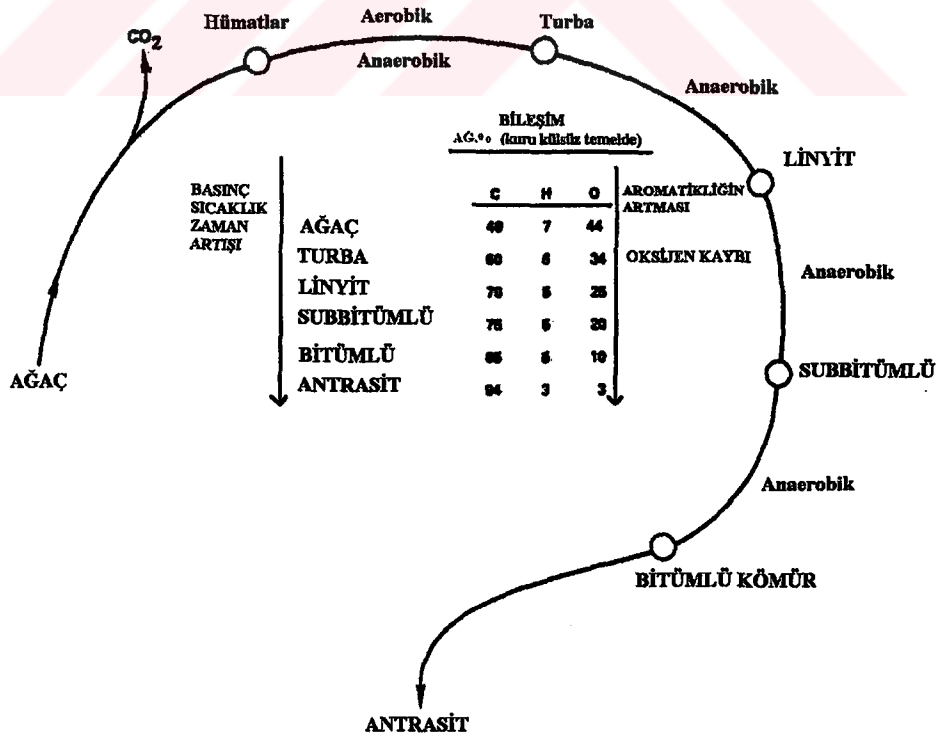
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kömürün Oluşumu

Kömür, bitki kalıntılarının, milyonlarca yılı kapsayan bir süreçte ve değişik jeolojik koşullar altında, fiziksel ve kimyasal etkilerle değişime uğraması sonucu oluşmuş, organik (maseral) ve inorganik (mineral) maddeleri içeren, yanabilir organik bir kayadır (Van Krevelen, 1961; Bend, 1992).

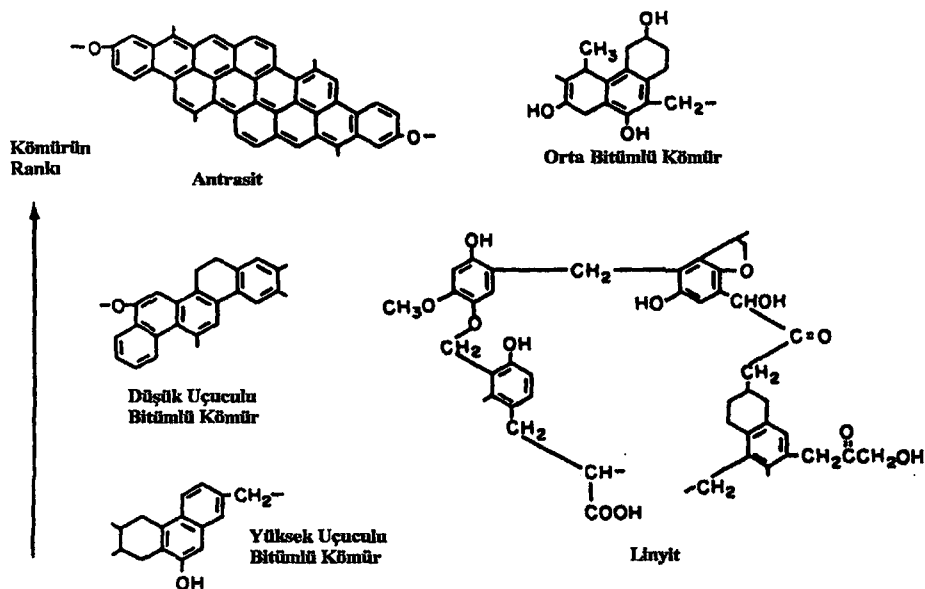
Kömür oluşumu, biyokimyasal ve jeokimyasal olmak üzere iki evreyi kapsar. Birinci evre, fungus ve bakteri faaliyetlerinin fazla olduğu biyokimyasal evre, ikinci evre ise biyokimyasal aşamanın bitişinden itibaren başlayan, sıcaklık, basınç, zaman gibi parametrelerin önem kazandığı jeokimyasal diyajenez evresidir. İkinci evrede, organik yapıda, oksijen, azot ve hidrojen azalırken, kömür bileşiminde metan, karbondioksit ve su açığa çıkar. Kömürün organik yapısını oluşturan maseraller en çok bu evrede etkilenir (Kavuşan, 1998).

Turbanın, linyit, altbitümlü (subbitümlü) kömür ve bitümlü kömür aşamalarından geçerek antrasite ve metaantrasite dönüşmesi kömürleşme olarak ifade edilmektedir (Şekil 2.1) (Speight, 1994).



Şekil 2.1 Kömürleşme süreci (Speight, 1994)

Turba, bir kömür olmamakla birlikte kömür oluşumunun (kömürleşmenin) ilk evresini oluşturur. Turba oluşumu sırasında, bitki kalıntıları, havanın oksijeni ile temas etmeyecek şekilde, kil vb. inorganik madde birikimleriyle kaplanır. Tabakalar halindeki bu kaplanma, bitkisel materyalin, havanın serbest oksijeni ile parçalanmasını, dolayısıyla, CO₂ ve H₂O oluşumunu engeller. Turbalıkta çökelen organik maddelerin, bakteri faaliyetleri sonucunda, hidroliz, oksitlenme ve indirgenme süreçlerini içeren biyokimyasal değişimlere uğraması, turba oluşumunu başlatır. Oluşum sırasında, önce organik maddelerden hümik asitler meydana gelir. Hümik asitlerin asidik karakterlerini kaybetmesi sonucu hüminler oluşur. Hümin ve bozunmakta olan organik madde (odun), turba olarak isimlendirilir. Turbadan, yumuşak kahverengi kömüre veya linyite, dereceli bir geçiş bulunmaktadır. Turbayı diğer kömürlerden ayırmak için nem, karbon, serbest selüloz içeriği, kesilebilme gibi bazı parametreler kullanılır. Altbitümlü kömür aşamasının başlangıcından sonra organik maddenin değişimi çok hızlı olur ve bu proses metamorfizma olarak ifade edilir. Bu olay, karbon içeriğindeki artış, fonksiyonel grupların değişimi, çeşitli moleküler yapıların değişimi, hidrojen ve oksijenin kombinasyonundan kaynaklanan suyun kaybı gibi etkenleri beraberinde getirir ve kalıntıların bileşimlerinde değişimlere yol açar. Bu aşamada, oksidasyon reaksiyonlarının oluşumu tamamen zayıf kalmaktadır. Belirli bir jeolojik zaman içerisinde, artan sıcaklık ve basınç etkisiyle oluşan bir dizi fiziksel ve kimyasal değişimler sonucu, kömürleşme derecesi (rank) artar ve turba sırasıyla linyit, altbitümlü kömür, bitümlü kömür ve en son aşamada antrasit ve metaantrasite dönüşür (Karayığit ve Köksoy, 1998) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Kömürleşme derecesi (rank) ve kimyasal yapı arasındaki ilişki

(Herbert vd., 1990)

Kömürleşme derecesi (rank), çoğunlukla, kimyasal parametreler (karbon, oksijen, hidrojen, ve uçucu madde) ve ısı değer ile optik özellikler (örneğin, vitrinitin yansıtılması) kullanılarak belirlenir. Nem içeriği, kömürleşmenin başlangıç aşamasında hızlıca azalır ve azaldıkça ısı değer aynı oranda artar. Nem içeriğindeki azalma, büyük oranda gözenekliliğin azalışıyla ve daha az oranda hidroksil gruplarının bozunmasıyla ilişkilidir (Karayığit ve Köksoy, 1998). Kömürlerde zamanla oksijen azalması ve hidrojen miktarının nispeten sabit kalması, oksijenin kömür bünyesinden karbondioksit olarak atıldığını gösterir. Kömürleşme ilerledikçe karbondioksit ile beraber, hidrojenin azalmasına neden olan hidrokarbonlar da oluşur. Kömürleşme derecesi arttıkça sübstitue gruplar (OH, COOH, CH₃) uzaklaşır, aromatik çekirdek büyür (Stach vd., 1975).

2.2 Kömürlerin Sınıflandırılması

Kömürün fiziksel ve kimyasal özellikleri, kömürlerin sınıflandırılmasında, kömür kalitesinin ve potansiyel kullanım alanlarının belirlenmesinde kullanılır. Bilimsel sınıflamalarda, kömürlerin daha çok elementel özellikleri (karbon, oksijen ve hidrojen içerikleri) göz önünde tutulur (Çizelge 2.1). Ülkemizde kömürler; turba, linyit, taşkömürü ve antrasit olarak sınıflandırılmaktadır (Çizelge 2.2). Ticari kömür sınıflamasında ise en çok kullanılan, ASTM kömür sınıflamasıdır (Karayığit ve Köksoy, 1998).

Çizelge 2.1 Çeşitli ranktaki kömürlerin bazı özellikleri (Herbert vd., 1990)

Komponent	Linyit	Altbitümlü	Bitümlü	Antrasit
Karbon (mineral madde yok)	67-72	72-76	76-90	93
Oksijen	20	18	3-13	2
-COOH şeklinde oksijen	13-10	57	0	0
-OH şeklinde oksijen	15-10	12-10	1-9	0
Aromatik karbon atomları (Toplam C'nun % si)	50	65	70-90	90-95
Her katmanda bulunan ortalama				
benzen halkası	1-2	?	2-5	25
Uçucu Madde	40-50	35-50	10-46	10
Reflektans (vitrinit)	0.2-0.3	0.3-0.4	0.5-1.8	4

Çizelge 2.2 Çeşitli ranktaki kömürlerin yapısal özellikleri (Couch, 1990).

Kömür Sınıfı	Aromatik Karbon (%)	Monomer Yapıları	Çapraz Bağların Özellikleri
Linyit	30-50	Küçük, çoğunluk O-içeren tek halkalaradan meydana gelmiş (-COOH, -OH, -OCH ₃), yaklaşık her 3-4 karbona 1 oksijen.	Çoğunlukla H-bağları, bazı COO-Ca-OOC'de olduğu gibi iyonik bağlar, az miktarda alifatik bağ, jele benzer yapı.
Alt Bitümlü	60	Çoğunlukla tekli halkalar, halka önlerinde O-grupları (-COOH, -OH), 5-6 karbona 1 oksijen.	Hidrojen bağları ve muhtemelen eter bağlarının karışımı; bazı alifatik bağlar.
Bitümlü A	70	Yoğun halkalı sistemlerin karışımı, tekli halkalar çok sık; 9 karbona 1 oksijen atomu, özellikle -OH grubu.	Çapraz bağlı alifatik ve eter bağlarının karışımı.
Bitümlü B	75-80	Büyük halkaların miktarında artış. 12 karbona 1 oksijen atomu, özellikle -OH grubu.	Çoğunlukla alifatik tip, bazen bifenil türü bağlar Reaktif olmayan alifatik köprüler, bifenil türü bağlar.
Bitümlü C		Aromatik halkaların yoğunluğu daha sık, nadir O-grupları; 20 karbona 1 oksijen.	
Antrasit	95	Grafitte olduğu gibi aşırı şekilde yoğun haldeki aromatik halkalar, O-fonksiyonallitesi çok az, 100 karbona 1 oksijen.	Hemen hemen hepsi iç içe girmiş halde aromatik bağlar.

2.3 Kömürün Kimyasal ve Moleküler Yapısı

2.3.1 Kömürün Organik Bileşenleri

Organik tortul bir kayaç olan kömür, hem organik hem de inorganik bileşenleri içerir. Bu nedenle değişken özelliklere sahip heterojen bir madde özelliği taşımaktadır. Kömürlerin başlangıç maddesi olan bitki kalıntılarının oluştukları jeolojik dönemler arasındaki iklimsel farklılıklar, dolayısıyla ortamların asitlik, alkalinite ve oksijen içeriklerindeki farklılıklar, sıcaklık ve basınç değişimleri, mikrobiyal koşullar, kömür bileşenlerinin kimyasal yapılarının oluşumlarında önemli bir rol oynamaktadır (Speight, 1994).

2.3.1.1 Kömürün Biyokimyasal Yapıtaşları

Kömür oluşumunun temel maddesi olan bitkiler, lignin, karbohidrat, protein, lipit, vaks, reçine, hidrokarbon ve Çizelge 2.3'de belirtilen çeşitli polimerleri içerir (Speight, 1994). Genel formülü, $C_n(H_2O)_n$ olarak gösterilen karbohidratların başında, früktoz, nişasta, hemiselüloz ve selüloz gelmektedir (Kavuşan, 1998).

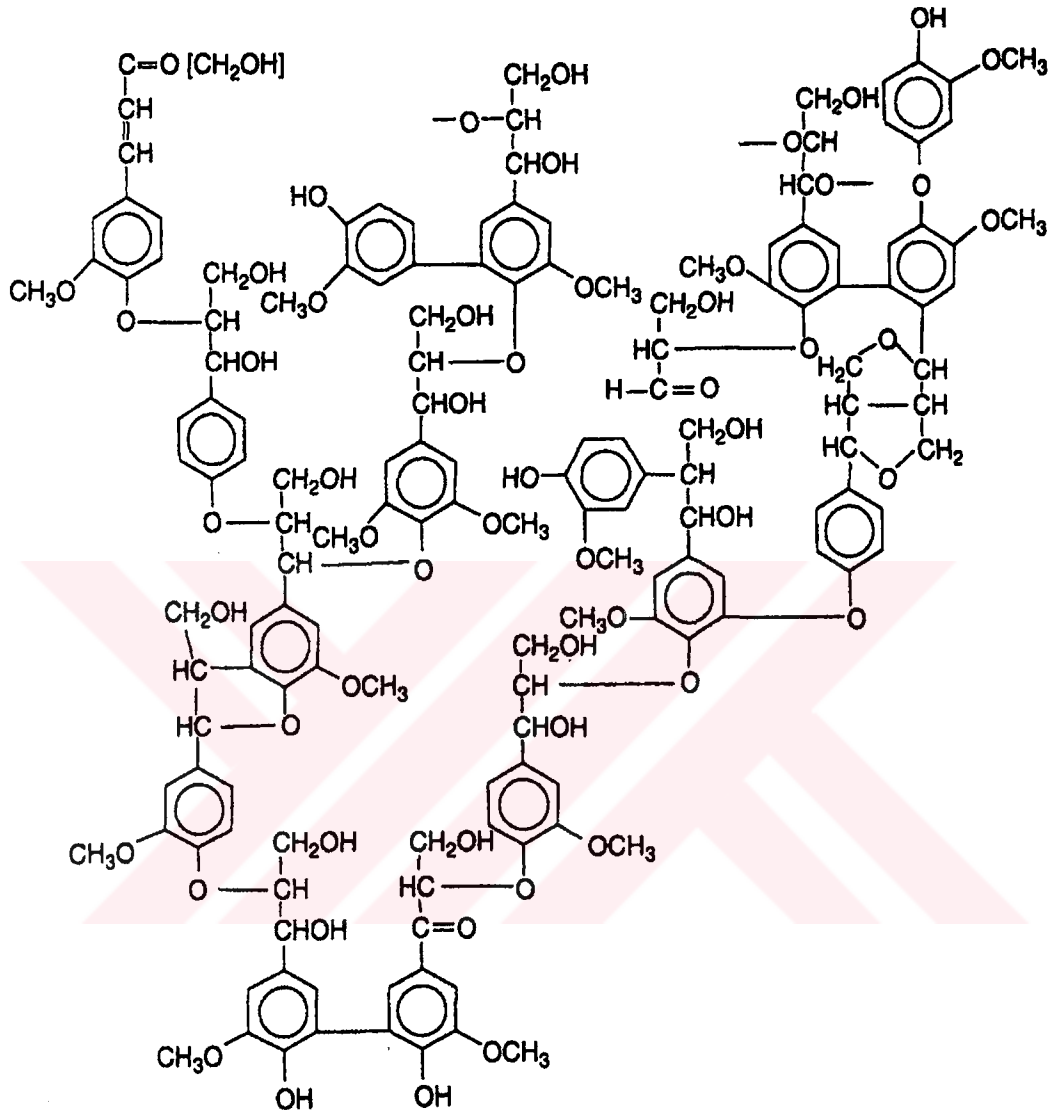
Çizelge 2.3 Bitkilerde bulunan polimer tipleri (protein haricinde bulunan makromoleküller)

(Speight, 1994)

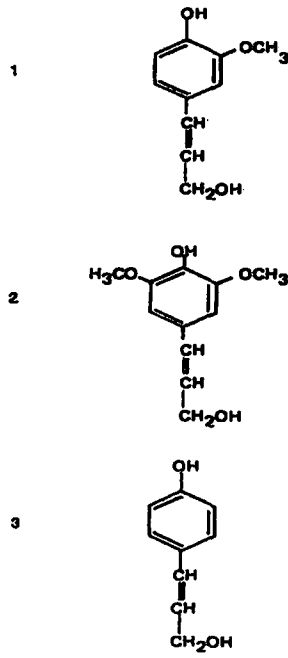
Polimer	Yapısal Karakter	Bitki Dokusu
Lignin	Amorf üç boyutlu alkil-fenolik	Ağaç
α -Selüloz	Bölgesel kristalin β -1 4 glukan	Birçok dokuda
Hemiselüloz	Çeşitli şeker polimerlerin karışımında; monomerler uronik asit içermekte	Ağaç
Suberin	Fenolik asit ile uzun zincirli fatty asitlerinin kopolimeri	Ağaç kabuğu ve ağaç kökleri
Kitin	ω -hidroksi fatty asitlerinin polimerleri	Yaprak sap veya gövdede bulunan üst zar
Sporopollenin	Karotenoidler ve fatty asitlerin kopolimeri	Spor ve polenler
Flavolans	Kondense tannins, polifenoliklerin çözünmeyen polimerleri	Yaprak hücrelerinde ve bazı kök hücrelerinde

Lignin, yüksek molekül ağırlığına sahip heterojen yapılı aromatik bir polimerdir (Haddock ve Ferry, 1990). Lignin, tannin ve benzeri bileşikler, fenolik yapılarıyla, özellikle yüksek bitkilerin önemli biyokimyasal yapıtaşlarından olup, turbalardaki aromatik bileşiklerin başlangıç maddesi olarak kabul edilir (Şekil 2.3) (Kavuşan, 1998; Speight, 1994; Gold vd., 1989).

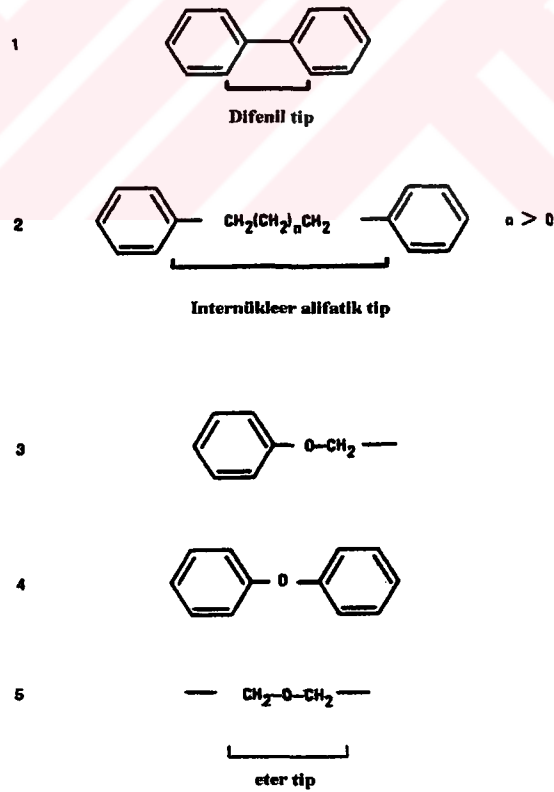
Lignin hümitik asitlerdeki aromatik bileşiklerin başlangıç maddesi olarak kabul edilir. Lignini oluşturan monomerik yapılar ve ligninde yer alan çeşitli tipteki bağlar Şekil 2.4 ve 2.5'de gösterilmektedir (Masuka, 1992).



Şekil 2.3 Lignin yapısı (Gold vd., 1989)



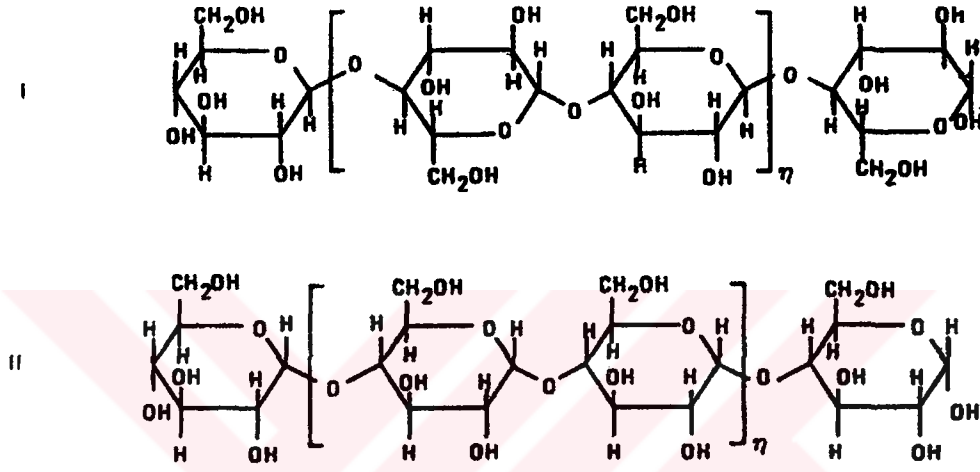
Şekil 2.4 Ligninde bulunan monomerik üniteler (Masuka, 1992)



Şekil 2.5 Ligninde bulunan çeşitli tipteki bağlar 1. koniferli alkol, 2. sinapli alkol, 3. p-koumarli alkol (Masuka, 1992)

Bitkilerin kısa süreli enerji ihtiyacını karşılayan früktoz ve amilopektin ile amiloz karışımı olan nişasta, bitkilerin ölümleri sonrasında, ortamdaki suyun etkisiyle kolay hidrolize olan bileşiklerdir (Şekil 2.6).

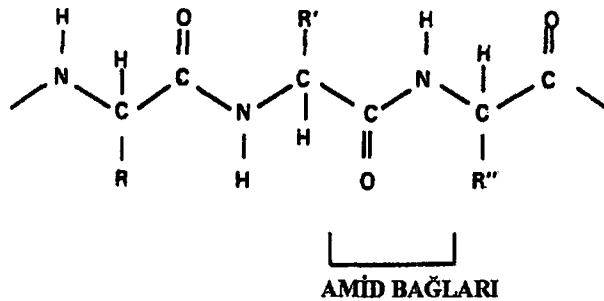
Hemiselüloz ve selülozlar, değişik miktarlardaki monosakkarit ünitelerinin birleşmesi sonrasında ortaya çıkan homo veya heteropolisakkaritler halindedirler ve bunların büyük bir kısmı hücre duvarlarında yer alır.



Şekil 2.6 Selüloz (I) ve nişastanın (II) basitleştirilmiş yapısı (Speight, 1994)

Selülozun, turbalarda, serbest halde bulunmaları, turba ve linyitin ayrılmasında tanımlayıcı parametre olarak kullanılır. Yapılardaki oksijen köprüleri nedeniyle, moleküler yapının dayanıklılığı artmakta, bu yapılardan dolayı, bitkiler ölümleri sonrasında da uzun süre ayrışmadan kalabilmektedir (Kavuşan, 1998).

Proteinler, organizmalarda azot içeren bileşiklerdir. Yapılarında, α -amino asitler, geniş bir spektrumda gözlenir ve polipeptitler şeklinde olduğu gibi asiklik bileşikler şeklinde görülür. Proteinlerde şekerler gibi kolaylıkla hidrolize olan bileşiklerdir (Şekil 2.7) (Kavuşan, 1998).



Şekil 2.7 Protein (peptid) zincirinin bir bölümü (Speight, 1994)

Lipitler, organizmanın ürettiği organik bileşikler olup, suda çözünmeyen ancak, değişik çözücülerde çözünebilen bileşiklerdir. Trigliserid olan yağlar, alifatik karboksilik asitler şeklinde, alkol ve yağ asitlerinin reaksiyonları sonucu oluşurlar. Genel olarak, (C₁₂-C₃₆) arasında olanları, yağ asitleri ve hayvansal hücrelerde doymuş (alkanoik asitler) hidrokarbonlar; (C₁₆-C₁₈) arasında olanlar ise bitkisel organizmalarda doymamış (alkenoik asitler) hidrokarbonlar şeklindedir. Çoğunluğu ise 18 karbonlu alifatik hidrokarbon yapısındadır. Fosfolipitler, fosforik asit ve yağ asidi ihtiva eden bileşikler halinde tüm organizmalarda bulunurlar (Kavuşan, 1998).

Mumlar ve benzeri bileşikler, yağ asitlerinin, enzim etkisi ile biyokimyasal sentezlenmesi sonucu oluşan ve bitkilerde uzun zincirli n-alkanlar şeklinde gözlenen bileşiklerdir. Kütin, hidroksi yağ asidi olup genellikle, bitkilerin yaprak ve köklerindeki koruyucu dokularda çok sayıda görülmektedir (Speight, 1994; Kavuşan, 1998).

2.3.1.2 Kömürün Petrografik Bileşenleri

Petrografik incelemeler, kömürlerin, farklı kökenli bitkisel maddelerden meydana gelmiş olan organik maddelerin (maserallerin), giderek artan kömürleşme sürecinde, homojenleşerek değişime uğradıkları sonucunu ortaya koymuştur. Kömürlerin mikroskopla görülebilen vitrinit, liptinit ve inertinit olmak üzere üç ayrı maseral grubu vardır.

Vitrinit grubu, lignoselülozik dokuları içerir ve bunlar kömürün oluştuğu dönemdeki bitki kökleri, dallar ve gövdelerden kaynaklanır. Vitrinit grubu maseraller için en önemli tanımlayıcı optik özellik, renklerinin gri olmasıdır. Vitrinit, alifatik gruplar tarafından çevrelenmiş aromatik çekirdeklerden oluşan çeşitli hüminlerin bileşimidir. Bu grup % 81.5-91.2 C, % 5.15 - 4.55 H ve % 2 - 11 O içerir.

Liptinit grubu, temelde, bitkilerin yağ, mum, reçine ve sporlarından oluşur. Bu grup maseraller, optik olarak, düşük yansıtma, yansıyan ışıpta siyah ve siyah-gri, floresans ışıpta ise yeşil-sarı ve kahverengi-kırmızı rengiyle karakteristik özellik taşır. Liptinit grubu, sporinit, kütinit, rezinit ve alginit maserallerini içerir. Sporinit maserali, % 60 - 80 C, % 5.0 - 7.5 H ve % 6 - 8 O vardır. Rezinitlerin kimyasal yapılarında ise % 77 - 85 C, % 8.2 - 11.0 H ve % 2.7-13.0 O vardır.




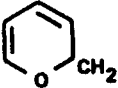

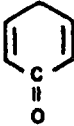
İnertinit grubu, vitrinit grubunda olduğu gibi çok ince veya daha az öğütülmüş dokuları içerir. Bu parçacıklar, depolanmalarının ilk yıllarında oksijen, mantar, ve aerob bakteriler tarafından etkilenmişlerdir. Yansıyan ışıkta beyaz renklidir. Bu grupta, fusinit, makrinit, mikrinit, sklerotinit ve semifusinit maseralleri yer alır (Vayısoğlu, 1993).

2.3.2 Kömürün İnorganik Bileşenleri

Kömürler, organik kayalar ve organik bileşiklerin yanında inorganik bileşiklerde içerirler. İnorganik bileşikler, kömürler yakıldıktan sonra arta kalan ve kül olarak adlandırılan bileşiklerdir. Kül ile kömürün içerisinde yer alan inorganik bileşikler arasında, kimyasal ve mineralojik açıdan farklılıklar vardır. Kömürdeki inorganik bileşikler, genel olarak oksitli, sülfürlü, sülfatlı, karbonatlı, fosfatlı ve elementel bileşikler şeklinde gruplandırılır. Kömür içerisinde bulunan inorganik mineraller, kimyasal bileşime bağlı olarak mineral grupları şeklinde genelleştirilmiştir (Kavuşan, 1998).

2.3.3 Kömürde Bulunan Heteroatomlar

Azot, oksijen, kükürt gibi heteroatomlar, kömür yapısının aydınlatılması kadar kömürün dönüşüm proseslerinde de oldukça önem taşır. Kömürde bulunan heteroatomlar, fonksiyonel gruplar şeklinde sergilenmektedir (Şekil 2.8) (Speight, 1994).

Oksijen	Azot	Kükürt
ArOH		
$\text{ArC} \begin{array}{l} \text{O} \\ \text{---} \\ \text{OH} \end{array}$	ArCN	
ArOR		ArSR
-C-O-C-		-C-S-C-
		
		
		

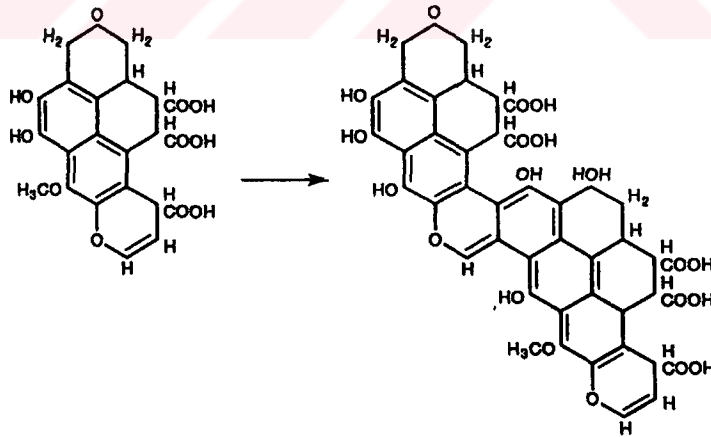
Şekil 2.8 Kömürde bulunan kükürt, oksijen ve azot bağlı fonksiyonel gruplar (Speight, 1994)

Karbon ve hidrojen, kömürde hem organik hem de inorganik yapıda bulunmaktadır. Azotun, genellikle bitkisel veya hayvansal proteinler, azotça zengin bitkiler, bitki alkolleri ve klorofilden kaynaklandığı kabul edilir. Kömürün içerdiği kükürt türleri, organik ve inorganik kükürttür. Hidrokarbon yapısına bağlı olarak bulunan tüm kükürde organik kükürt denir. İnorganik kükürt ise, sülfat, disülfür ve elementel kükürt şeklinde bulunmaktadır. Kömürde oksijen içeren fonksiyonel gruplar, hidroksitler (ağırlıklı olarak fenoller), eterler, karboksilik asitler, karboniller, furanlar, pıranlar ve esterlerdir (Meriçboyu vd., 1998).

2.3.4 Kömür Molekülü İçin Önerilen Model Yapılar

Kömürün makromoleküllerin birleşmesiyle oluşmuş organik yapısı için çok sayıda moleküler model önerilmiştir. Yapılan çalışmalarda, kömürün çok heterojen olması ve yapısının yer yer değişmesi nedeniyle gerçek yapısının hiçbir zaman bulunmayacağı sonucuna varılmıştır (Thomas, 1985).

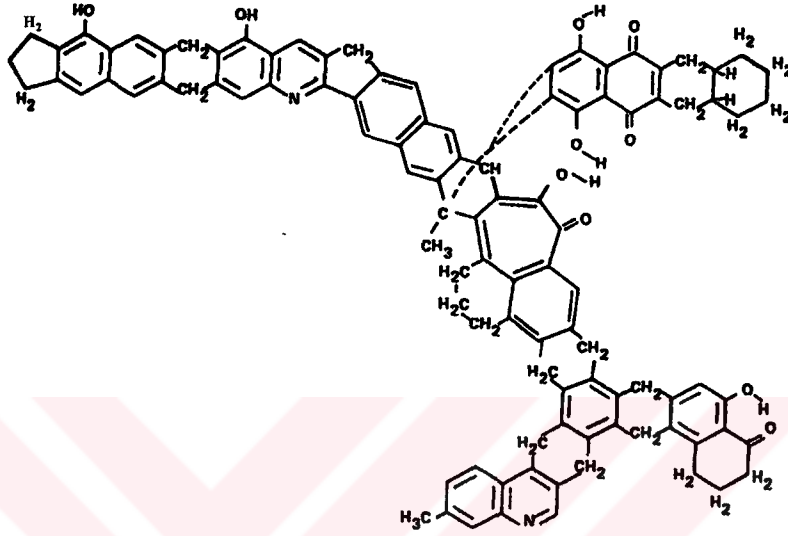
Kömür yapısından bahsedilirken, kömür oluşumu süresince çözünebilir molekül yapısı nedeniyle hümik asitler göz önünde tutulmuştur. Ancak yoğun ve heterojen bir yapıya sahip olmaları nedeniyle hümik asitlerin de yapıları tam olarak belirlenememiştir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Hümik asidin moleküler yapısı (Speight, 1994)

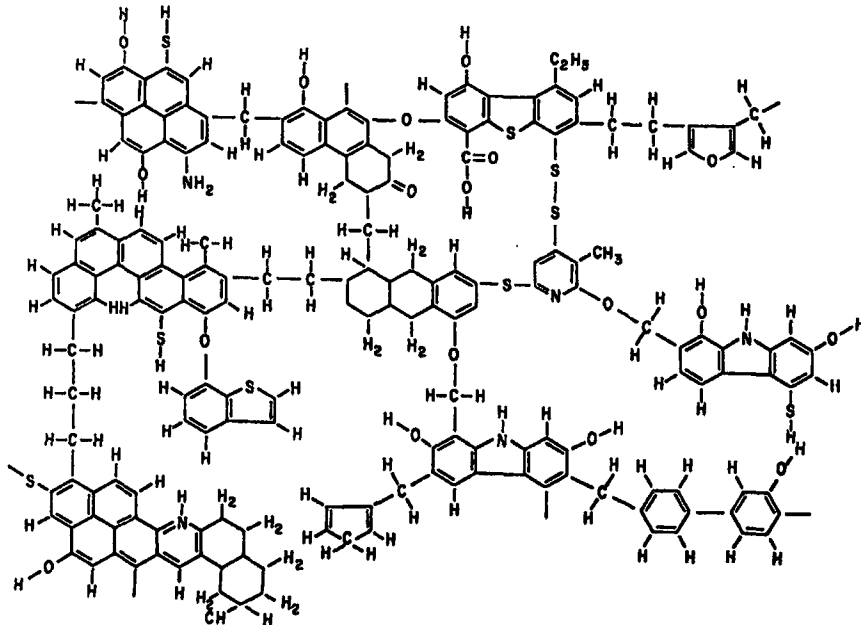
Yapılan çalışmalarda, kömürde aromatik yapıların bulunduğunu ancak sadece polisiklik/polinükleer aromatik tip yapılardan meydana gelmediği belirlenmiştir. Aromatiklik değerleri rank artışıyla beraber belirlenebilmektedir. Düşük ranklı kömürler ve albitümlü kömürlerde aromatiklik % 40 - 50 iken antrasitte % 100'e yaklaşmaktadır.

FTIR ve XRD teknikleri ile yapılan çalışmalar sonucunda, Given (1960) tarafından önerilen kömür yapısı, 9,10-dihidroantrasen temelindeki monomerlerin olduğu polimerik yapıları kapsayan bir modele dayanmaktadır (Şekil 2.10). Bu yapıda, birbirine di-hidroaromatik, kinon, hidroksil, karbonil grupları ve piridin tipi halkalarla bağlanmış bir veya iki halka içeren gruplar yer almaktadır.



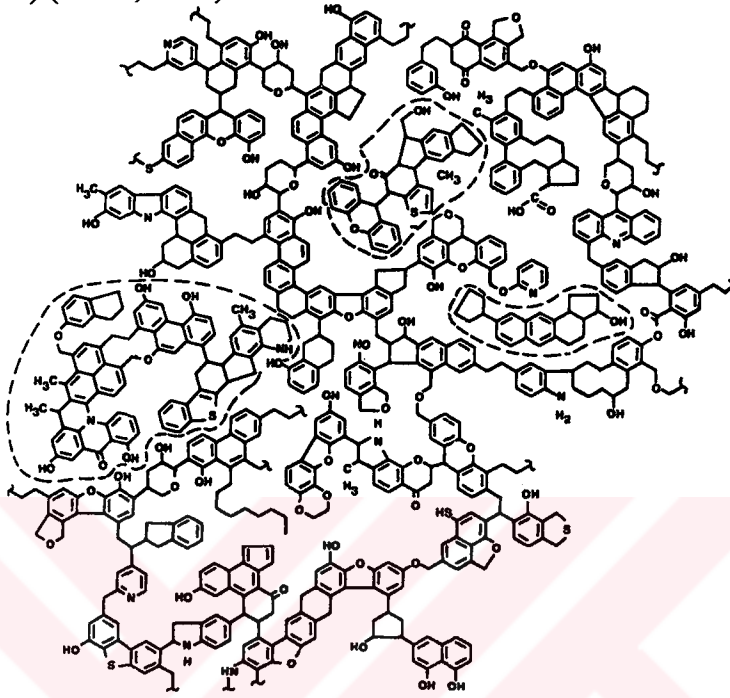
Şekil 2.10 Given tarafından kömür için önerilen moleküler yapı (Given, 1960)

Wiser (1975) tarafından ileri sürülen modelde kömür, eter ve metilen gibi çeşitli bağlarla bağlanmış küçük aromatik halkalar içermektedir (Şekil 2.11). Bu model, zayıf bağların kırılması sonucunda yoğun aromatik sistemleri içeren küçük birimlerin nasıl oluştuğu konusunda yardımcı olmuştur (Wiser, 1973).



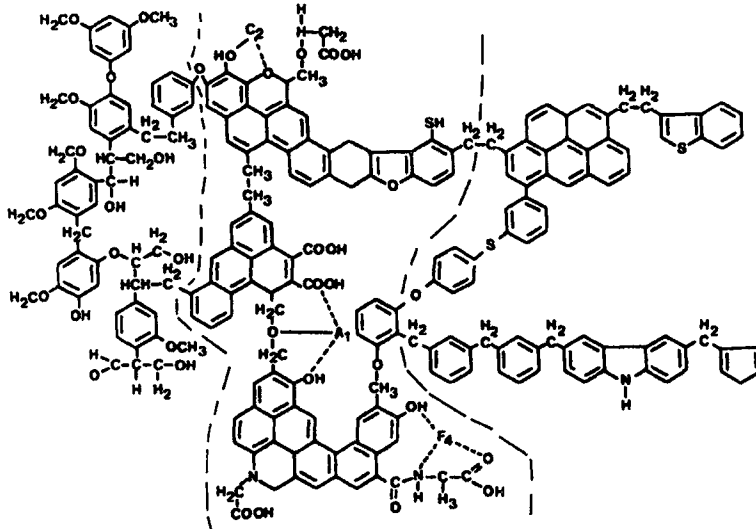
Şekil 2.11 Wiser tarafından kömür için önerilen moleküler yapı (Wiser, 1975)

Shinn (1985) tarafından önerilen modele göre kömür, polisiklik kümeler yada salkımlar halinde oluşmuş aromatik halkaların, alifatik yapılarla birbirine bağlanması sonucu oluşmuştur. Fenolik, hidroksil, kinin ve metil gruplar aromatik halkalara tutunmuş vaziyettedir (Şekil 2.12) (Shinn, 1985).



Şekil 2.12 Shinn tarafından bitümlü kömür için önerilen moleküler yapı (Shinn, 1985)

Kömürleşme prosesinin başlangıç adımı olan ligninin, hümik asidlere parçalanması, linyit ve kahverengi kömür gibi daha genç kömürlerin yapısının tanımlanmasında esas olarak alınmıştır (Şekil 2.13) (Wolfrum, 1983).



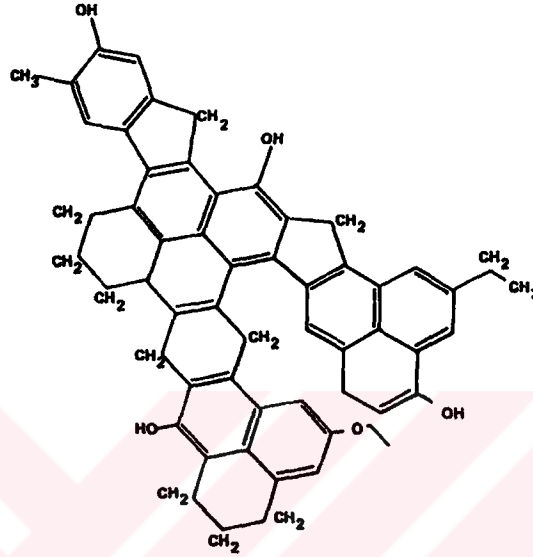
lignin

hümik asitler

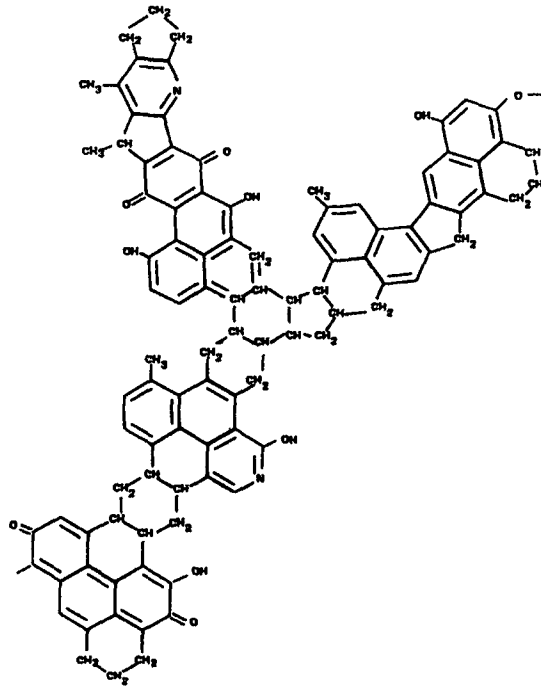
yapısal aromatik elementler

Şekil 2.13 Wolfrum tarafından düşük ranklı kömürler için önerilen moleküler yapı (Wolfrum, 1983)

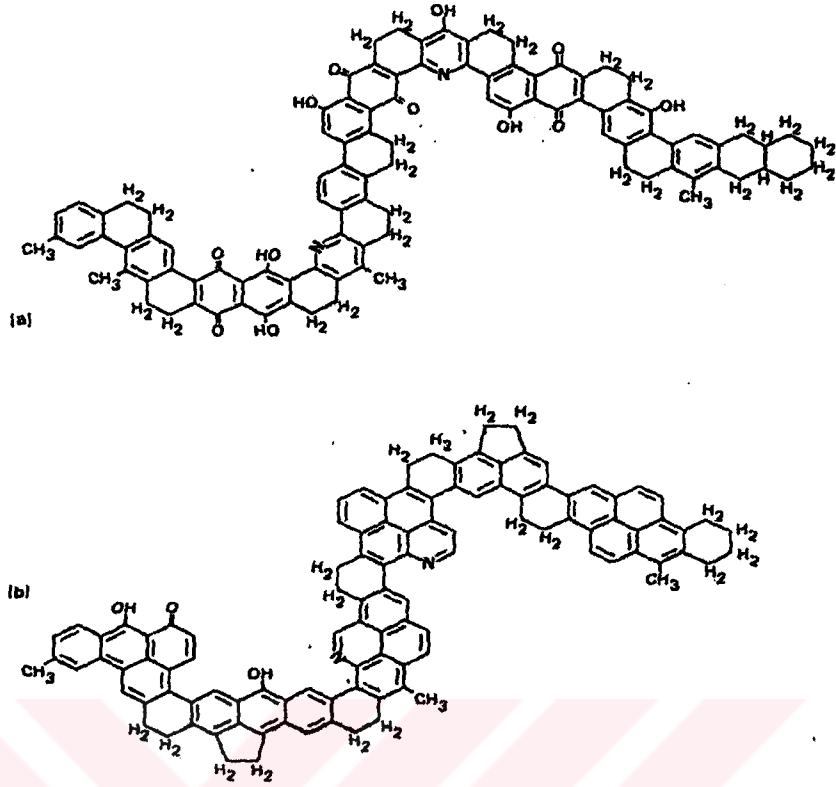
X-ray çalışmaları, kömür molekülünün, metil ve etil gibi kısa alkil sübstituentlerin oluşumuna yol açan yoğun hidroaromatik ve aromatik halkalı yapıda olduğunu ve metilen gibi bağlarla bağlanmış aromatik halkaları içerdiğini göstermiştir (Şekil 2.14) (Cartz ve Hirsch, 1960). Benzer formülasyon, Şekil 2.15’de görüldüğü gibi vitrinit için, Şekil 2.16’de görüldüğü gibi farklı karbon içeriklerine sahip vitrinit için de önerilmiştir (Gibson, 1978; Pitt,1979).



Şekil 2.14 Kömürün XRD analizlerinden yola çıkılarak önerilen moleküler yapı
(Cartz ve Hirsch, 1960)

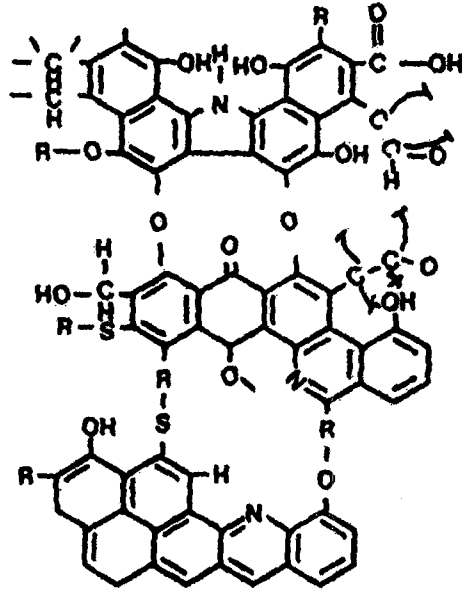


Şekil 2.15 % 82 C içeren vitrinit için önerilen moleküler yapı (Gibson, 1978)



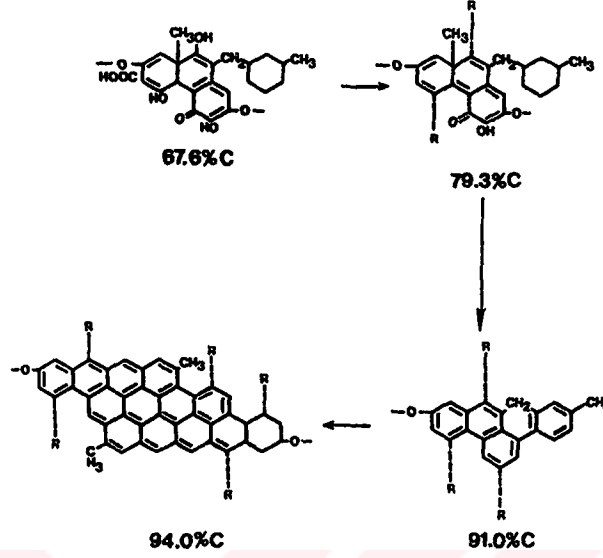
Şekil 2.16 (a) % 80 C içeren vitrinit ve (b) % 90 C içeren vitrinit için önerilen model yapılar (Pitt, 1979)

Kimyasal ve spektroskopik yaklaşımlar, alkil ve heteroatom süstituentlerini oluşturan yoğun aromatik ve heteroaromatik çekirdekleri işaret etmektedir. Heteroatomları içeren aromatik yapılar, ikiden dokuz halkalıya kadar değişmektedir (Şekil 2.17) (Hill ve Lyon, 1962).



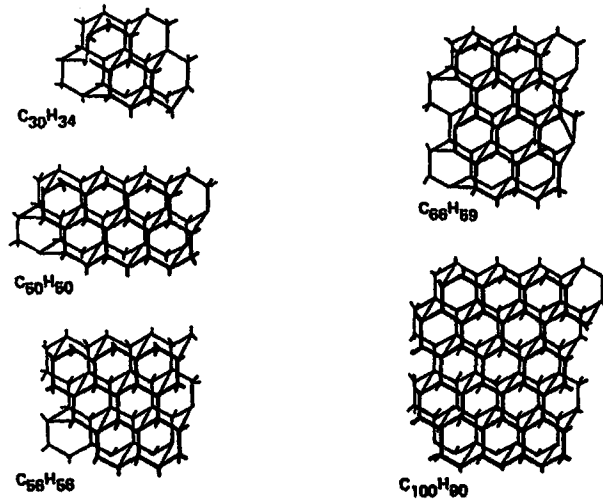
Şekil 2.17 Yoğun aromatik ve hidroaromatik çekirdek ağı modelindeki kömürün moleküler yapısı (Hill ve Lyon, 1962)

Heterojen ve yoğun aromatik halkalı sistemlere dayalı kömür yapısı göz önüne alındığında linyitten, yüksek ranklı bitümlü kömürlere kadar değişen çeşitli yapılar için, toplam aromatikliğe dayalı moleküler yapılar önerilmiştir (Şekil 2.18) (Mazumdar, 1962).



Şekil 2.18 % 68 C içeren linyitten % 91 C içeren antrasite kadar çeşitli ranktaki kömürler için önerilen moleküler yapılar (Mazumdar, 1962)

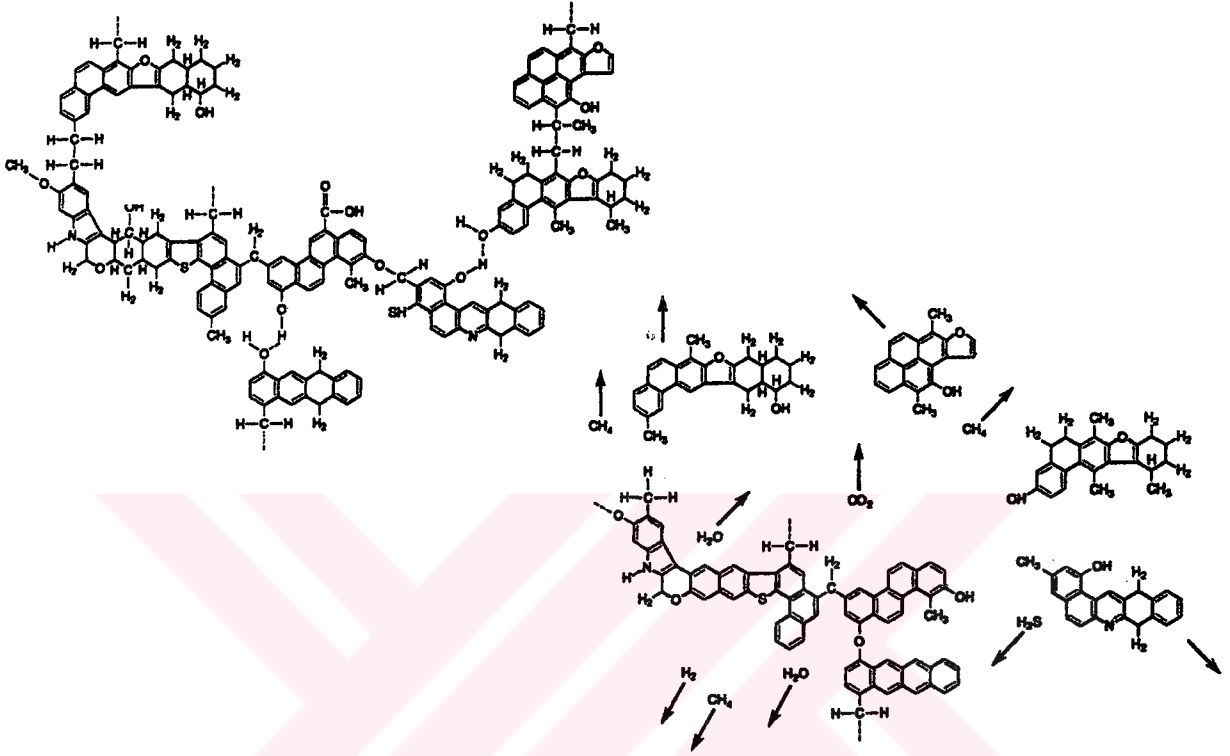
Kömür yapısındaki aromatik merkezlere ilişkin yapılan XRD çalışmaları, tetrahedral olarak bağlanmış karbon atomlarının x-ray difraksiyon bantları verdiğini ve bu bölgede grafit benzeri tabaklara işaret eden yansımaların oluştuğunu göstermiştir. Bu nedenle kömürün önemli bir kısmının son derece kararlı bir yapıdaki trisikloalkan köprülerinden meydana gelmiş salkımlı yapılardan oluştuğu sonucuna varılmıştır (Şekil 2.19) (Chakrabartty ve Berkowitz, 1976).



Şekil 2.19 Çeşitli oranlarda karbon içeren (% 76-90 C) kömürlerdeki kararlı yapılar

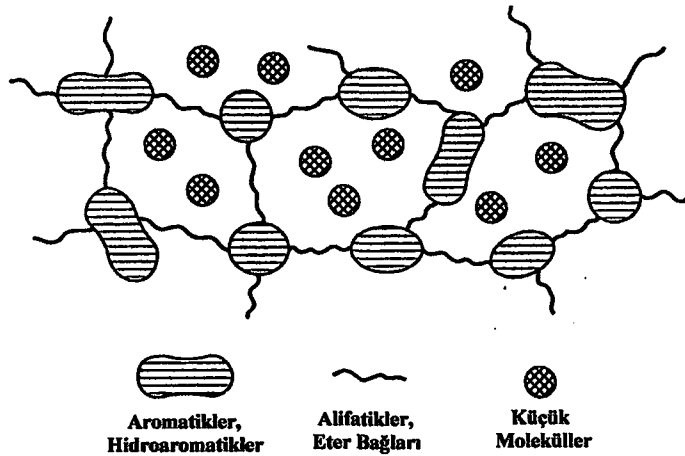
(Chakrabartty ve Berkowitz, 1976)

Solomon (1981), ısıl bozunma kimyasından yola çıkarak kömürün zayıf alifatik ve eter bağlarıyla bağlanmış ve iç içe girmiş haldeki aromatik ve hidroaromatik halkalı sistemlerden oluştuğunu belirtmiştir (Şekil 2.20) (Solomon, 1981).



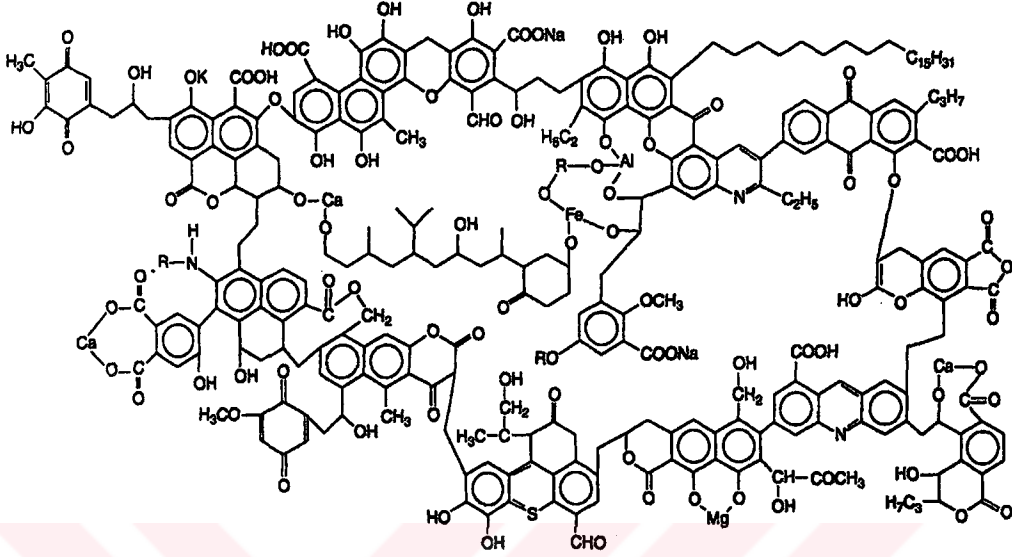
Şekil 2.20 Solomon tarafından önerilen moleküler yapı (Solomon, 1981)

Haenel (1992), kömürü iki bileşenli bir sistem olarak kabul etmiş ve küçük moleküllerin içinde dağıldığı üç boyutlu çapraz bağlı ağ yapıdan meydana geldiğini öne sürerek kömür yapısına alternatif bir yaklaşım getirmiştir (Şekil 2.21) (Haenel, 1992).



Şekil 2.21 Haenel tarafından önerilen ve kömürü iki bileşenli sistem olarak kabul eden moleküler yapı (Haenel, 1992)

Rheinische Braunkohle, kömürde bulunan Fe^{+3} , Mg^{+2} ve Ca^{+2} gibi metal iyonlarının kömür hümatlarına iyonik olarak bağlandığını öne sürmüştür (Hüttinger ve Michenfelder, 1987) (Şekil 2.22).



Şekil 2.22 Rheinische Braunkohle tarafından önerilen moleküler yapı
(Hüttinger ve Michenfelder, 1987)

Çeşitli araştırmacıların kömür yapısı için önerdiği model yapılar göz önüne alındığında aşağıda belirtilen yapıların kömürü oluşturduğu söylenebilir.

Kömürde bulunan fonksiyonel gruplar;

-OH, -COOH, -C=O, -O-, -N -NH, -SH, -NH₂, -NH, -S, -SH, -R-S

Köprüler;

-R-S, -O-, -(CH₂)_n-, -C-O-, -S-, -S-S-, -O...H-O, -CH-, -NH-.

Heteroaromatik yapılar;

Kinon, piridin, tropolen, pirol, tiyofen, furan, pirol

Aromatik halka sayısı;

1-2, 1-3, 1-5, 1-4, 2-6 gibi değerler arasında.

Temel hidroaromatik yapıların tipi;

dihidroantrasen, 9,10 dihidrofenantrenflore, dihidroantrasen.

3. MİKROORGANİZMA ve ENZİM ETKİSİYLE KÖMÜRÜN İŞLENMESİ

Kömür, ham petrolden sonra en büyük enerji kaynağı olmasına rağmen, yanma sonucu oluşan yan ürünlerin atmosfere, toprağa ve suya karışması çevre açısından bir tehlike oluşturmaktadır. Kömürün, özellikle de yakılmaya uygun olmayan düşük ranklı kömürlerin daha verimli bir enerji kaynağına dönüştürülmesinde kullanılması planlanan biyoteknolojik yöntemler, yanma sonucu oluşan kükürt oksitler (SO_2 ve SO_3), azot oksitler (NO , NO_x), karbon monoksit (CO) ve hidrokarbon oluşumunun önlenmesi açısından önem taşımaktadır.

1947 yılında *Thiobacillus ferroxidans*'ın kömür yataklarından izole edilmesi ile kömür üzerinde mikrobiyal yaşamın mümkün olduğu ispatlanmıştır. 1960'lı yılların ortalarından itibaren bakteri liçlemesi ile metallerin uzaklaştırılabildiği belirlenmiştir. 1970'li yıllarda ise enerji krizinin ortaya çıkması, çalışmaları enerji üretimi için mikroorganizma kullanmaya yönlendirmiştir. 1960 ve 1970'li yıllarda, kömürü gazlaştırarak ya da sıvılaştırarak temiz yakıt eldesine yönelik birçok çalışma yapılmıştır.

Kömürün gaz ve sıvı ürünlere dönüştürülmesinde kullanılan klasik yöntemler, yüksek sıcaklık ve yüksek basınçta çalışan pahalı ekipmanlar gerektirdiğinden, yüksek sermaye ve yatırım maliyeti gerektirmektedir. Kömürün dönüştürülmesinde kullanılan klasik yöntemlerin pahalı oluşu, biyolojik proseslere ilgiyi arttırmaktadır.

Kömürün biyolojik kökenli olması, yapısının mikroorganizma ve enzim sistemleriyle parçalanabileceği ya da depolimerize edilebileceğini düşündürmektedir. Mikrobiyolojik yöntemlerle kömürün işlenmesi, düşük sıcaklıkta ($25-75^{\circ}C$) ve atmosfer basıncında gerçekleştirilmesi nedeniyle de oldukça avantajlı görülmektedir (Başaran, 2001).

1980'li yılların başlarından itibaren, fosil yakıtların mikroorganizma ve enzim vasıtasıyla işlenmesine yönelik çalışmalar giderek artmıştır. Kömürden faydalı kimyasalların biyoteknolojik uygulamalarla üretimi, düşük ranklı kömürlerin yanma dışında da değerlendirilmesi yönünden oldukça fayda sağlayacaktır (Wang vd., 1990; Reed, 1990).

Biyoteknolojik açıdan bakıldığında kömür kararlı, heterojen ve karmaşık yapısı nedeniyle mikroorganizma aracılığıyla bozundurma için pek uygun olmayan bir substrat özelliği taşımaktadır (Couch, 1990). Porozitenin az olduğu kimyasal yapısı ve sınırlı sayıdaki fonksiyonel grupları biyobozunma açısından zorluk çıkarmaktadır.

Bu nedenle biyolojik etkinin bozunmayı sağlaması ya da hızlandırması için oksidasyon gibi çeşitli ön işlemlerin ve kimyasal yöntemlerin kömüre uygulanması zorunlu hale gelmiştir.

En basit ototropik bakterilerden “filamentous” funguslara kadar çok çeşitli türde mikroorganizmalar bu amaca yönelik kullanılmıştır. Ototropik bakterilerin, kömürün mineral madde ve kükürt içeriğinin azaltılmasında etkin olduğu, bazı bakteri ve fungusların ise kömürün sıvılaştırılması ve gazlaştırılmasında etkin olduğu belirlenmiştir (Reed, 1990).

Kömürün çözündürülmesinde kullanılan mikroorganizmalardan bazıları Çizelge 3.1’de gösterilmektedir.

Kömür biyoteknolojisindeki başlıca çalışma alanları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Mikroorganizma kullanarak kömürde kükürt içeriğinin azaltılması,
- Kömürden elde edilen sentez gazının, sıvı ve gaz ürünlere dönüştürülmesi,
- Kömürün sıvılaştırılması, çözündürülmesi ve çözünen ürünlerin sıvı ve gaz ürünlere dönüştürülmesi.

Çizelge 3.1 Kömürün sıvılaştırılması/çözünürleştirilmesinde kullanılan mikroorganizmalardan bazıları (Hölker, 1997)

Bacteria			<i>Pseudomonas putida</i>
			<i>P. stutzeri</i>
			<i>P. cepacia</i>
			<i>Streptomyces setonii</i>
			<i>S. viridoporus</i>
			<i>S. chromofusus</i>
			<i>Arthrobacter sp.</i>
			<i>Shigella flexneri</i>
Fungi			
	Basidiomycotina		
		Basidiomycetes	
			Poriales
			<i>Trametes versicolor</i>
			<i>Fomes annosus</i>
			<i>Bjerkandera adusta</i>
			<i>Poria monticola</i>
			<i>P. weirii</i>
			<i>Pleurotus eryngii</i>
			<i>P. florida</i>
			<i>Lentius edodes</i>
			* <i>Phanerochaete chrysosporium</i>
	Ascomycotina		
		Ascomycetes	
			Sterales
			<i>Neurospora crassa</i>
			<i>Chaetomium thermophile</i>
			<i>Podospora anserina</i>
	Deuteromycotina		
		Hyphomycetes	
			<i>Candida sp.</i>
			<i>Acremonium sp.</i>
			<i>Aspergillus nidulans</i>
			<i>Botrytis cinera</i>
			<i>Paecilomyces sp.</i>
			<i>Rhizocotina praticola</i>
			<i>Trichoderma sp.</i>
			<i>Fusarium oxysporum</i>
	Zygomycotina		
		Zygomycetes	
			Mucorales
			<i>Cunninghamella</i>
			<i>Mucor lausennensis</i>

*Deneylerde kullanılan mikroorganizma

3.1 Mikroorganizma Etkisiyle Kömürden Kükürt Giderimi (Biyodesülfürizasyon)

Kükürt kömürde inorganik ve organik yapıda olmak üzere iki ayrı türde bulunmaktadır. İnorganik kükürdü, sülfat ve piritik kükürt; organik kükürdü ise kömürün hidrokarbon yapısıyla bağ yapmış kükürt bileşikleri oluşturmaktadır (Yaman vd., 1998). Yanma sonucu oluşan kükürt emisyonlarının çevreye verdiği zararlar, kükürdün fiziksel ve kimyasal tekniklerle uzaklaştırılmasıyla önlenmektedir. Kullanılan teknikler kükürt gidermede yeterli olmasına karşın pahalıdır.

Kemolitotropik mikroorganizmaların indirgenmiş kükürt bileşikleri üzerinde üreyebilme yeteneklerinin keşfedilmesi, kömüründen kükürdün uzaklaştırılmasında mikrobiyolojik yöntemlerin uygulanmasını sağlamıştır (Gomez, 1999).

Mikroorganizma kullanarak, kömürden inorganik ve organik kükürt giderimi yapılabilmektedir. Kömürün kükürt içeriğini giderebilen iki grup mikroorganizma türü bulunmaktadır. Birinci gruba giren mikroorganizmalar oda sıcaklığında aktiftir ve en bilinenleri *Thiobacillus ferrooxidans* ve *Thiobacillus thiooxidans*'tir. İkinci gruptaki mikroorganizmalar, yüksek sıcaklıklarda aktif olup başlıcaları, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Sulfolobus brierleyi* ve *Sulfolobus sulfataricus*'tur (Eligwe, 1988).

Kükürt gidermede kullanılan biyolojik yöntemler, genellikle iki aşamalı uygulanmaktadır. Birinci aşamada, bakteri liçi ile kıvamlandırma ve ikinci aşamada flotasyon uygulanır. İkinci aşamanın uygulanması hem kıvamlandırma süresinin hemde piritik kükürdün ve mineral maddenin daha etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlar. *Sulfolobus* türü termofilik mikroorganizmaların karıştırılmalı reaktörde ve akışkan yatakta inorganik kükürdün yanı sıra organik kükürdün de % 60-65'ini uzaklaştırabildiği saptanmıştır. *T.ferrooxidans*, kömür desülfürizasyonunun dışında, çözünmeyen metal sülfitlerden biyoliçleme yöntemiyle Be, Ga, Co, Ni ve V gibi bazı metallerin geri kazanımı için de kullanılmıştır. Biyodesülfürizasyonun başarılı bir şekilde uygulanabilmesi için bekleme süresindeki uzunluk, asidik ve korozif ekstraksiyon çözeltisi oluşturma gibi problemlerin aşılması gerekmektedir.

3.2 Mikroorganizma Etkisiyle Kömürün Gazlaştırılması (Biyogazlaştırma)

1920'li yıllarda turbadan mikrobiyal yöntemle biyogazlaştırma yapılarak metan üretimi gerçekleştirilmiştir. Kömürden metan üretimi için iki yöntem geliştirilmiştir. Birincisi klasik kömür gazlaştırma yöntemiyle elde edilen gazın anaerobik fermentasyon yoluyla

saflaştırılması, ikincisi ise kömürün kimyasal yöntemle işlenmesi ve daha sonra fermente edilmesi şeklindedir. Birinci yöntemde, karbon monoksit ve hidrojen den oluşan sentez gazı (H_2+CO), bakteriler vasıtasıyla metana dönüştürülmektedir. Bu amaca yönelik kullanılan mikroorganizmalar, *Peptostreptococcus Productus* ve *Methanothrix*'tir. *Peptostreptococcus Productus* asetat üretiminde, *Methanothrix* ise asetatın metana dönüştürülmesinde kullanılır. İkinci yöntemde, polimerik yapıdaki kömür daha küçük organik bileşiklere parçalanmaktadır ve ardından bu bileşikler fermente edilerek asetat, karbon dioksit ve metana dönüştürülmektedir. Kömürden kimyasal prosesle elde edilen sentez gazı, mikroorganizmalar aracılığıyla, düşük molekül ağırlıklı alkol ve aldehitlere dönüştürülebilmektedir. Saf kültüre (*Clostridium*) karbon kaynağı olarak CO beslendiğinde, düşük molekül ağırlıklı organik asitler ve etil alkol üretildiği belirlenmiştir (Srivastava vd., 1989). Biyolojik yöntemle gazlaştırmada, temel mekanizmalar, metabolik yollar, reaktör tasarımı ve proses sonunda karşılaşılabilecek diğer faktörlerin araştırılması zorunlu olduğu için bu tip bir proses ticari düzeyde işletilememiştir.

3.3 Mikroorganizma Etkisiyle Kömürün Sıvılaştırılması / Çözündürülmesi

(Biyosıvılaştırma / Biyoçözündürme)

Mikroorganizma ve enzimler aracılığıyla kömürün işlenmesi üzerine yapılan son çalışmalar, daha az enerji gerektiren biyolojik çözündürme ve mikrobiyal sıvılaştırma üzerinde yoğunlaşmıştır (Başaran, 2001). Biyosıvılaştırma, kömürün mikroorganizmalar vasıtasıyla katı halden sıvı hale dönüşmesini, biyoçözündürme ise sıvılaştıran kömürün alkali ya da organik çözücülerde çözünebilir form almasını ifade etmektedir.

Biyolojik sıvılaştırma olarak tanımlanan işlemin, kömür karbonunun sıvı hidrokarbonlara dönüşümünü içeren kimyasal sıvılaştırma prosesi ile paralellik göstermediği ifade edilmiştir (Başaran, 2001).

Kömürün sıvılaştırılması için iki temel aşamanın gerçekleştirilmesi gerekir:

- I) Dayanıklı üç boyutlu bir yapıya sahip olan katı matriks içindeki kimyasal bağların kırılması.
- II) Kömürün farklı birimleri veya kömür ile reaksiyon ortamı arasındaki hidrojen ve oksijen transferinin olması.

Kömür içerisindeki çeşitli kimyasal bağların (ester, eter, alifatik) kopmasını hızlandıran ya da hidrojen ve oksijen katılması veya ayrılmasını etkileyen biyokatalizörler, kömürün sıvı ürüne dönüşümünü etkiler. Kömürün aerobik koşullarda sıvılaştırılmasına ilişkin yapılan bir çok çalışmada yüksek molekül ağırlığına sahip sulu ürünler ortaya çıkmıştır. Bu durum kimyasal bağların sınırlı bir şekilde parçalanmasını göstermektedir (Scott ve Lewis, 1988).

Birçok mikroorganizma ve enzim sistemlerinin düşük ranklı kömürlere etki ederek onları sıvılaştırdığı, çözüldürdüğü ya da depolimerize ederek düşük molekül ağırlıklı organik bileşiklere dönüştürdüğü saptanmıştır.

Son 20 yıldır kömürün biyolojik yöntemlerle dönüştürülmesinde ele alınan konular şöyle özetlenebilir:

- Mikroorganizmaların sert kömürler üzerine etkisi,
- Linyitlerin agar besiyeri üzerinde çözüldürülmesi,
- Kömürün ön işleme tabi tutulmasının biyobozundurmadaki hızlandırıcı etkisi,
- Çözüldürme mekanizmasının açıklanması
 - Mikroorganizmalar tarafından üretilen alkalik maddeler,
 - Mikroorganizmalar tarafından üretilen kelatlar,
 - Mikroorganizma tarafından üretilen oksidatif enzimler
- Linyitlerin enzimatik etkiyle renksizleştirilmesi,
- Hümik asitlerin in vivo sistemlerle çözüldürülmesi,
- Hümik asitlerin in vitro sistemlerle polimerizasyonu,
- In vitro sistemlerin kömürün hümik asit ve matriksine olan etkileri (Klein, 1999).

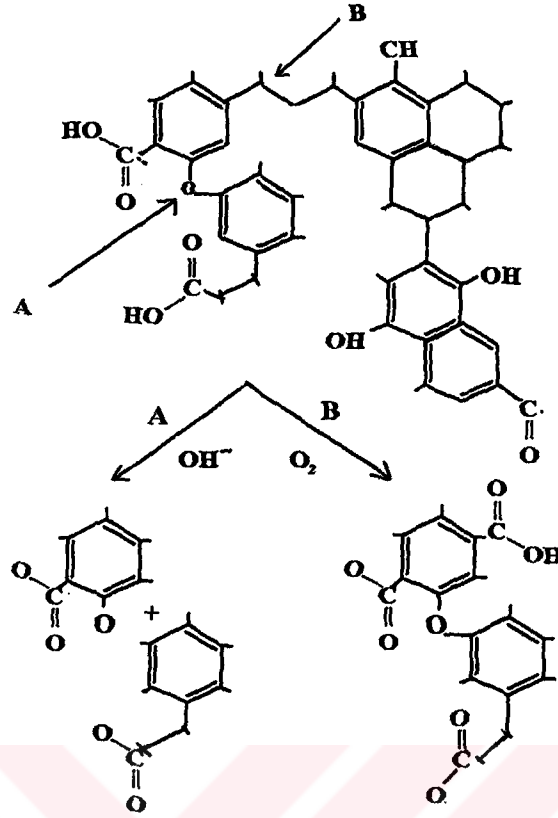
3.3.1 Kömürün Mikroorganizmalarla Sıvılaştırılması/Çözündürülmesi Öncesinde Uygulanan Oksidasyon İşlemleri

Kömür makromoleküllü suda ve nötral pH'da çözünmediğinden, biyoçözünürlüğün artırılması için kimyasal, fiziksel ya da biyolojik muamele gerektiren oksidasyon işleminin uygulanması gerekir. Bu nedenle kömür, biyolojik etkileşim öncesinde, nitrik asit, hidrojen peroksit gibi çözeltilerle oksitlendirilerek ön işleme tabi tutulur.

Linyit düşük ranklı bir kömürdür ve başlıca hidrofobik bitümen, alkali çözünür hümik asid ve fülvik asid, çözünmez kalıntı diye tanımlanan matriks ya da hümin kısımlarından oluşur. Büyük bir bölümü tek halkalı aromatik bileşiklerin bir ağ içinde birleşmesiyle oluşmuş kömür matriksi, mikroorganizma ya da enzim girişine izin vermediğinden biyobozunum kolay olmamaktadır (Lapin ve Matson, 1990). Enzimatik etkinin var olabilmesi için kömürün kimyasal ön işleme tabi tutulması ya da ekstrakte edilebilen alifatik bileşikler gibi fraksiyonlara ayrılması gerekmektedir. Ön işlem, C-C ve C-O gibi bağların kırılarak tek halkalı aromatik bileşiklerin üretilmesini sağlamaktadır (Leuschner, 1990).

Linyitin alkali ile yapılan oksidasyonu, kimyasal yapısını bozarak yüksek molekül ağırlıklı organik asitlere dönüşümünü sağlamaktadır. Bu asitler, daha ileri bir oksidasyona uğratılırlarsa düşük molekül ağırlıklı organik asitler ve CO₂ oluşumu gerçekleşir. Yapılan oksidasyon çalışmalarında, sodyum hipoklorit ve sodyum permanganat çözeltilerinin uygun oksitleyici olmadıkları, aşırı oksidlemeye yol açarak linyitteki karbon yapılarının yaklaşık % 43'nünün CO₂'e dönüşüme yol açtıkları belirlenmiştir. Yüksek CO₂ oluşumu, biyolojik aktivitenin sürdürülmesini sağlayan substratın kütle kaybına yol açacağından istenmeyen bir olaydır. Bu iki çözeltiliyle yapılan oksidasyon sonucunda karboksilli asitler gaz kromatografisi yöntemiyle belirlenmiştir. Oksidasyon ürünlerinde karboksilli asit varlığı biyobozunumun mümkün olabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, alkalide çözünen fraksiyonun, linyit matriksinin biyodegradasyona uğrayabilen fraksiyonu olduğu sonucuna varılmıştır.

Şekil 3.1'de linyit gibi düşük ranklı kömürlerin alkali oksidasyonu ve hidrojen peroksitle oksidasyonu sonrasında meydana gelen bağ kopmaları gösterilmektedir. Kömüre uygulanan alkali muamele matriks içinde C-O bağlarının, H₂O₂ oksidasyonu ise C-C bağlarının koparılmasını sağlayarak tek halkalı bileşiklerin oluşumuna yol açar.



Şekil 3.1 Linyitin alkali muamelesi ve hidrojen peroksitle oksidasyonu;

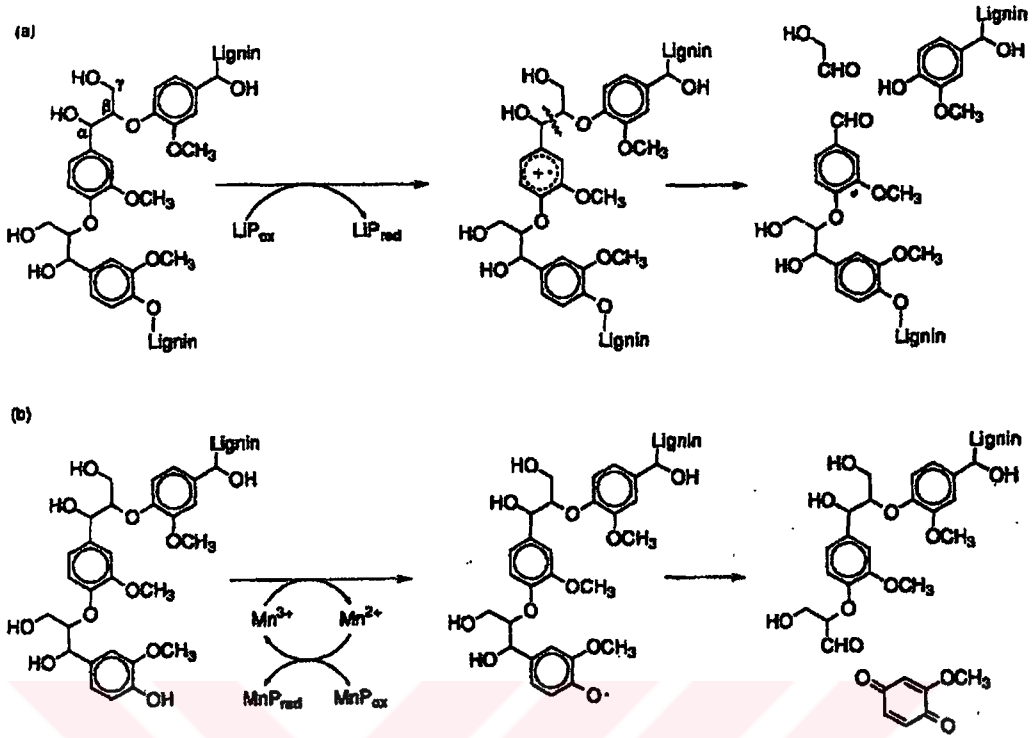
A: alkali hidrolizleme, B: hidrojen peroksitle (H_2O_2) oksidasyon

(Leuschner, 1990)

3.3.2 Kömürün Sıvılaştırılmasında Etkili Olan Mikroorganizmalar, Etki Mekanizmaları ve Biyosıvılaşmayı Etkileyen Faktörler

Mikroorganizmalar arasında geniş bir sınıfa dahil olan beyaz çürükçül funguslar “white-rot fungus” linyit gibi düşük ranklı kömürleri bozundurmada oldukça etkindirler. Odunun lignin bileşenlerini bozundurabilme yeteneğine sahip olduklarından, lignin benzeri bileşikler içeren düşük ranklı kömürlere de etkide bulunabilmeleri oldukça açıktır.

Katı kömür parçacıklarının funguslar tarafından sıvı damlacıklarına dönüşmesi olarak tanımlanan sıvılaştırma ya da çözündürmede iki mekanizmadan söz edilmektedir. I) Funguslar, ürettikleri LiP, MnP ve lakkas gibi çoklu izoenzimler aracılığıyla etki etmektedirler. Lignin üzerinde gerçekleşen bu etki sonucunda C-O, C-C gibi kovalent bağlar kopmakta ve buna bağlı olarak meydana gelen radikaller sıvılaştırmada rol oynamaktadır. Sonuçta, kömür molekülünün polimerizasyonu, depolimerizasyonu ya da renksizleşmesi “bleaching” gerçekleşir (Gold ve Alic, 1993) (Şekil 3.2 a; b).



Şekil 3.2 (a) Oksidlenmiş LiP ile lignindeki fenolik olmayan arilgliserol-β-aril eterin kopması
 (b) Oksidlenmiş MnP ile reaktif fenolik arilgliserol-β-aril eterin kopması
 (Hammel, 1997)

II) Fungusların kömürle etkileşmesi sonucu ürettikleri alkali maddeler (NH_3 , biyolojik türevli aminler) ve çelatlar kömür makromoleküllerini çözünür hale getirmektedirler. Alkaliler ve çelatlarla yapılan etki, çözündürmeden çok sıvılaştırma yani makromoleküllerin sulu çözeltide yer alması şeklinde tanımlanmıştır. Agar katı besiyerinde üretilen fungusların ortamın yüksek pH'sı nedeniyle oksidatif enzim (fenoloksidazlar, peroksidazlar, lakkas) üretmedikleri dolayısıyla bu enzimlerin çözündürme proseslerinde yer almadıkları öne sürülmüştür. Bazı lignin bozucular (basidiomycete) pH 6'nın üzerinde ve yüksek azot içeren ortamlarda kömür partiküllerini çözündürme yeteneğine sahiptir. Bu ortamlarda ligninolitik enzimlerin (peroksidazların) sentezlendiği ancak bu enzimlerin çözündürme proseslerinde rol almadığı ileri sürülmektedir.

Linyitlerin fungus aracılığıyla mikrobiyal sıvılaştırılmasına etki eden faktörler, kapsamlı olarak araştırılmıştır. İri taneli kömürler, ince taneli kömürlere oranla daha güç ve daha uzun sürede sıvılaşmaktadır. Kömür sınıflandırılmasında en düşük sırada olan turba ve linyit

mikrobiyal olarak sıvılaşılabildiği halde, bitümlü kömürler sıvılaşmamaktadır. Linyitlerde oksijen içeriği arttıkça mikrobiyal sıvılaştırma oranıda artar. Porozitesi yüksek olan linyitlerde biyolojik aktivitenin fazla olduğu belirlenmiştir. Mikrobiyal çözündürme hızının belirlenmesinde kömür rankı en önemli faktördür. Leonardit ve linyit gibi düşük ranklı kömürler, yüksek ranklı subbitümlü ve bitümlü kömürlere göre biyoçözündürme açısından daha uygundur. Kömürün oksijen içeriği oksijen içeren bağlar, porozite ve su içeriğindeki farklılıklar biyoçözündürmeye etki etmektedir (Cohen, 1990).

3.4 Kömürden Üretilen Hümik Asidlere Mikroorganizma Etkisi

Kömürün funguslar ile çözündürülmesi, hümik asidler başta olmak üzere kömür makromoleküllerinin bir çözeltisinin üretilmesi şeklinde gerçekleşmektedir. Yapılan son çalışmalar beyaz çürükçül fungusların kömür hümik asitlerini depolimerize ettiğini göstermiştir. Bu işlem, kömürden, düşük molekül ağırlıklı spesifik organik bileşiklerin ılımlı koşullar altında üretilmesine yönelik biyoproseslerin kullanılması yönünde umut vericidir (Catcheside vd., 1999). "Ligninolytic basidiomycete" türünde fungusların kömür makromolekülünde bulunan kovalent bağları kopararak depolimerize ettiği, ilk olarak *Phanerochaete chrysosporium* ile yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Fungustan üretilen lignin peroksidaz (LiP) ve mangan peroksidaz (MnP) enzimlerinin kömür makromolekülünü depolimerize ederek fülvik asit oluşumuna yol açtıkları görülmüştür.

3.5 Kömüre Hücre dışı Peroksidaz Enzimlerinin Etkisi (Biyodepolimerizasyon)

Enzimler biyolojik katalizörlerdir ve katalizledikleri reaksiyonun türüne göre altı temel gruba ayrılmaktadır:

Oksido-redüktazlar; substratların indirgenmesi veya yükseltgenmesini katalizlemektedirler.

Transferazlar; grup transferini katalizlemektedirler.

Hidrolazlar; kimyasal bağların hidrolizini katalizler, su eklenmesi ile birlikte bağların kırılmasını sağlamaktadırlar.

Liyazlar; substratlardan bazı grupları uzaklaştırmaktadırlar.

İzomerazlar; molekül içi düzenlenmeleri katalizlemektedirler.

Ligazlar: kimyasal enerji harcanması ile iki molekülün birbirine bağlanmasını katalizlemektedirler.

Hücre dışı peroksidaz enzimleri, oksidoredüktaz grubunda yer alırlar. En çok bilinen bitki peroksidazları, LiP, MnP, fenoloksidaz (lakkas) ve HRP'dir.

Ligninin bozucu olarak bilinen bazı funguslar LiP, MnP, lakkas ve diğer peroksidaz enzimlerini üretmektedirler. Lignin yapısının bu hücre dışı enzimler ile bozunabilir olması, ligninolitik mikroorganizmaların bozunma/depolimerizasyon için potansiyel oluşturduğunu düşündürmektedir. Bu mikroorganizmaların enzim sistemleri, başlıca peroksidazları (MnP, LiP ve peroksidazlar), fenoloksidazları (lakkas), destekleyici enzimleri (örneğin O₂ oluşturan oksidazlar) içermektedir.

Bitki kalıntılarının fiziksel ve kimyasal özellikleri kömür oluşumu süresince değişmesine karşın orjinal lignin yapısı değişmemektedir. Birkaç grup mikroorganizma ürettikleri enzimler vasıtasıyla lignini, dolayısıyla kömürü bozundurma yeteneğine sahiptir (Hatakka, 1994). Enzim aracılığıyla gerçekleşen kömür moleküllerinin oksidatif sınıvlaştırılmasında ya da depolimerizasyonunda iki mekanizma söz konusudur:

I) Çeşitli oksidazların kullanılması ile moleküler oksijenin transferi:

Kömür+O₂+(Oksidaz) → oksidlenmiş kömür alt birimleri

II) Peroksidaz enzimlerinin kullanılması ile oksitlenmiş maddelerden oksijen transferinin gerçekleşmesi:

Kömür+H₂O₂+(Peroksidaz) → oksidlenmiş kömür alt birimleri

Oksidleme ajanı olarak H₂O₂ kullanılmasının kimyasal olarak moleküler oksijen kullanılmasından daha etkin olduğu belirlenmiştir (Başaran, 2001).

3.5.1 Lignin Peroksidaz (LiP) Enzimi

Ligninolitik enzimler içinde en çok araştırılanıdır ve ilk kez *Phanerochaete chrysosporium* beyaz çürükçül fungusunda keşfedilmiştir (Tien ve Kirk, 1983). LiP aromatik bileşikler için spesifikliği geniş bir substrattır ve hem fenolik, hem de fenolik olmayan yapıları oksidler. Kültürden izole edilmiş LiP, yüksek molekül ağırlığına sahip kömür partiküllerini bozundurma yeteneğine sahiptir. *Phanerochaete chrysosporium*' dan elde edilmiş LiP'nin nitrik asit ile muamelesi yapılmış Kuzey Dakota linyitini ve subbitümlü Alman kömürlerinin

bir bölümünü depolimerize ettiği saptanmıştır (Wondrack vd., 1989). Suda ve organik solventte (DMF) çözünen kömür makromolekülleri daha küçük suda çözünebilen fraksiyonlara depolimerize olmaktadır (Ralph ve Catchside 1994, 1997a, 1997b). Hücre dışı enzim olan LiP'in düşük ranklı kömürlerden metillenen hümatları MA 350 Da'nun altında olan ürünlere dönüştürebildiği tespit edildi (Klein, 1999). LiP'in katalitik çevrimi HRP'ye benzemektedir. Katalitik dönüşümde Fe(III) enzimi H₂O₂ ile LiP Bileşik I'e oksitlenir ve sonra bir aromatik bileşikle (veratril alkol) Bileşik I'in bir elektronunun redüksiyonu meydana gelir ve Bileşik II ile birlikte bir aromatik radikalın oluşumuyla sonuçlanır. Daha sonra bir aromatik substrat ile Bileşik II'nin redüksiyonu enzimin doğal forma geri dönmesini sağlar (Tien, 1986; Warishii, 1991).

3.5.2 Mangan Peroksidaz (MnP) Enzimi

Mangan peroksidaz (MnP) *Phanerochaete chrysosporium*'da keşfedilmiştir (Kuwahara vd., 1984). Hofrichter (1999), *N.Frowardii* ve *Clitocybula duseinii*'den elde edilen MnP'nin kahverenkli kömürleri çözündürmesini ve düşük molekül ağırlıklı fülvik asitlere dönüşümünü araştırmıştır (Hofrichter, 1999). *Nematoloma frowardii*'den elde edilen mangan peroksidazın (MnP) kömür ve alkalide çözünmez kısma etki ederek kömürü depolimerize ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, *P.chrysosporium*'un Avusturalya kahverengi kömürlerinin alkalide çözünür kısmına bozundurucu etkide bulunduğu saptanmıştır. Ancak ortamda düşük molekül ağırlıklı ürünlere rastlanılmamıştır. *Nematoloma frowardii* ve *C.duseinii*'den üretilen MnP'in fenolik ve fenolik olmayan aromatik halkalar arasındaki eter bağlarını (-C-O-C-) kopardığı, aromatik halkaların fisyonunu gerçekleştirdiği ve ardından bozunarak, karboksilli gruplar, CO₂, polisiklik hidrokarbonlar, nitrotoluenler, klorofenoller vb. bileşiklerin oluşumuna yol açtığı (-C-C-), oksalat ve gloksalatın CO₂ ve (-C-COOH) gruplarına parçaladığı belirlenmiştir (Cohen vd., 1990).

3.5.3 Fenol Oksidaz (Lakkas) Enzimi

Lakkas, bakır içerikli polifenol oksidaz olup hemen hemen tüm ligninolitik funguslar tarafından üretilir (*Trametes (Polyporus, Coriolus)*, *Versicolor*, *Nematoloma frowardii*). Lakkas fenolik aromatlara etki ederek fenoksi radikallerinin oluşumunu sağlar. *T. versicolor* ile yapılan kömür çözündürme deneylerinde sıvı damlacıkların oluşumunda lakkasın etkin olduğu düşünülmüştür (Cohen vd.,1987). Lakkasda bulunan iki proteinden biri çözündürmede

yüksek aktivite gösterirken diğeri oldukça az etkiye bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, lakkas enziminin kömürü depolimerize etme yeteneğinin az olduğu sonucuna varılmıştır.

3.5.4 HRP (Horseradish peroxidase) Enzimi

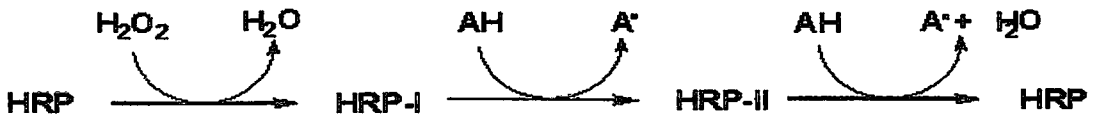
HRP enzimi yaklaşık yüzyıldır üzerinde çalışılan heme içerikli bir peroksidaz enzimidir. Yeni kimyasal maddelerin sentezlenmesinde, medikal teşhiste, biyotemizleme gibi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Veitch, 2004). Şekil 3.3’de HRP enziminin üç boyutlu yapısı gösterilmektedir.

Heme içerikli peroksidazlar, H_2O_2 ya da diğerk organik peroksidazları elektron alıcı olarak kullanırlar ve çok çeşitli substratların oksidasyonunu katalizlerler. *Caldariomyces fumago* ’dan üretilen kloro peroksidaz (CPO), *Phanerochaete chrysosporium*’dan üretilen lignin peroksidaz (LiP), *Corioloipsis gallica*’dan üretilen mangan peroksidaz (MnP) ve horseradish peroksidaz (HRP) en çok bilinen peroksidaz enzimleri arasındadır.



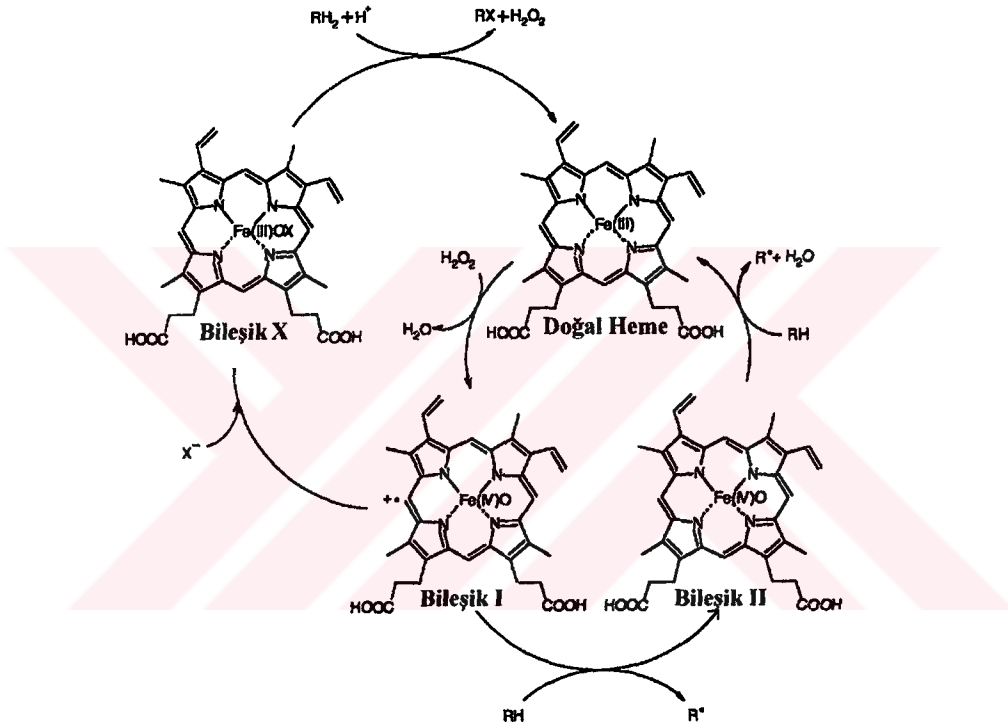
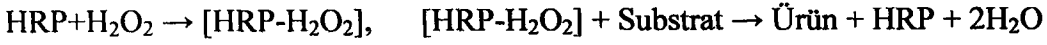
Şekil 3.3 HRP enziminin üç boyutlu yapısı [1]

Peroksidazlar, H_2O_2 ile Bileşik I, II ve III olmak üzere üç farklı yapı oluştururlar. HRP’nin genel mekanizması aşağıdaki gibidir. HRP-I ve HRP-II, sırasıyla Bileşik I ve Bileşik II’yi, AH ise indirgenen substratı göstermektedir [1].



Şekil 3.4 HRP enziminin çalışma mekanizması [1]

HRP'nin enzimatik aktivitesi, heme grubunda bulunan demir atomunun oksidasyon ve redüksiyonundan ileri gelmektedir. Uygun ortamda HRP, H_2O_2 ile birleşerek $[HRP-H_2O_2]$ kompleksini oluşturur. Oluşan kompleks çeşitli elektron vericiler ile oksidlenir. Organik bileşiklerin H_2O_2 varlığında peroksidaz oksidasyonu atık su işlenmesinde kullanılmıştır. Son zamanlarda aromatik hidrokarbonların oksidasyonunda kullanıldığı bilinmektedir (Fang ve Barcelona, 2003). Hidrojen peroksit varlığında perokidazların katalitik çevrimi Şekil 3.5'de gösterilmektedir.



Şekil 3.5 Halojen iyonları ve hidrojen peroksit varlığında heme içerikli perokidazların katalitik çevrimi (Torres vd., 2003)

Enzimatik reaksiyonun ilk adımında, enzimin heme grubu H_2O_2 'nin bir molekülü ile reaksiyona girer ve Bileşik I oluşur. Bu bileşik, oxoiron (IV)-porfirin radikali ya da oxoiron (IV)-protein radikalidir. Bu reaksiyon adımı süresince enzim oksidlenirken H_2O_2 suya indirgenir. Bileşik I bir substrat radikali (R^\bullet) vererek indirgenmiş substratı (RH) oksidler ve Bileşik II'ye indirgenir. Bileşik II bir porfirin halkası ile düzenlenmiş oksiferil merkezi içermektedir. Bileşik I ve II, RH ile benzer şekilde reaksiyona girer. Bu nedenle önce Bileşik I ile RH arasında reaksiyon başlar. Bileşik II üretilir ve devamlı olarak RH'ın ikinci molekülü ile reaksiyona girer. Sonuç olarak, Bileşik II, su üretimi ve substratın ikinci molekülünün oksidasyonu ile tekrar "ferric" haline geri döner ki bu hal doğal form, enzimin kendisidir.

4. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

4.1 Mikroorganizma (White-Rot Fungus) ve Kömür Etkileşimi

Kömürün mikrobiyal işlenmesi üzerine yapılan ilk çalışmalarda, kömürden bakteriyel yöntemle sülfürik asit üretilmiştir. Bu alanda yapılan son çalışmalar, mikroorganizma ve enzim kullanılarak çözünmeyen kömür partiküllerinden suda çözünebilir polimerlerin üretimini kapsamaktadır.

Fakoussa (1981), bazı Alman linyitleri ile yaptığı çalışmalarda, bakteri ve fungusların kömürü suda-çözünebilir forma dönüştürebildiğini, kömürün dönüştürülmesinde kullanılan kimyasal yöntemlerin aksine ılımlı koşullarda gerçekleşen biyolojik yöntemlerin kullanılmasının avantajlı olacağını ileri sürülmüştür.

Cohen ve Gabriele (1982), yaptıkları çalışmada “basidiomycetes” *Polyporus versicolor* ve *Poria monticola* fungusları vasıtasıyla linyitleri sıvılaştırmışlardır. Bu çalışmada, agar besiyeri üzerinde üretilen yüzey kültürlerine kömür konulmuş ve birkaç gün içinde kömürün sıvı damlacıklara dönüştüğü tespit edilmiştir. *Polyporus versicolor* tür fungusun ürettiği, polifenol oksidaz, perokidaz ve lakkas enzimlerinin lignininde bulunan aromatik yapıyı bozundurduğu sonucuna varılmış, lakkas enziminin ise fenolik bileşiklerinin oksidasyonunu sağlamadığı belirtilmiştir.

Olson ve Brinckman (1986), *Polyporus versicolor* ve *Poria monticola* fungusları ile linyit numunelerini biyolojik olarak sıvılaştırmışlardır. Kültürler üzerine konan katı kömürlerin, siyah renkli, vizkozitesi yüksek olan sıvı damlacıklarına dönüştüğü gözlenmiştir. Biyolojik olarak sıvılaştıran üründe yüksek oranda karboksilik aside rastlanılmış, ürünün başlangıçtaki kömüre göre daha düşük karbon ve daha yüksek oksijen içerdiği gözlenmiştir. Ayrıca sıvı ürünün başlangıçtaki haline göre daha fazla azot ve daha az hidrojen içerdiği belirlenmiştir.

Quigley vd., (1987), kömürün biyoçözündürülmesinde zengin üreme ortamındaki alkalın metabolik ürünlerin, düşük ranklı kömürlerdeki asidik grupları iyonize ettiğini ve suda çözünür kömür hümatları haline getirdiğini ileri sürmüşlerdir.

Srivastava vd., (1989) hidrofob özellik taşıyan linyit ve bitümlü kömürlerin, *Polyporus*, *Poria*, *Phanerochaete* ve *Pseudomonas* gibi funguslar vasıtasıyla ılımlı koşullar altında suda-çözünebilir forma dönüşebildiğini göstermişlerdir.

Quigley vd., (1989, a, b) amonyak, biyojen aminler ve benzeri bileşiklerin mikrobiyal sıvılaştırmada rol oynadığını göstermiştir.

Cohen vd., (1990), *C. versicolor*'un kömür çözündürme aktivitesi üzerine yaptığı çalışmalarda zengin ortamda üretilen mikroorganizmaların ürettikleri oksalat ve çelatların kömürde bulunan Fe^{+3} , Mg^{+2} , ve Ca^{+2} gibi polivalent metal iyonlarını bağladığını öne sürmüştür ve bu metal iyonlarının yapıdan çıkarılmasının çok sayıdaki asidik gruba dolayısıyla çözünürlüğünde arttırdığını göstermiştir.

John ve Dahlberg (1990), yüksek oksijen içeren kömürlerde mikrobiyal etkinin daha fazla olabileceğinden bahsetmiş ve kömür bozunumunda başlıca olayın yüzeyde oluştuğu ve enzimatik etki için yüzey alanının oksidasyonla artırılması gerektiğini buna ek olarak oksidasyon süresince oluşan hidroksil ve karboksil grupların mikrobiyal etkinin sağlanmasında önemli rol oynadığını belirtmişlerdir.

Catcheside ve Mallet (1991), Loy Yang kömür yataklarından aldıkları oksidasyona uğramış kömürleri mikroorganizma vasıtasıyla % 70 oranında çözündürmüş, ön oksidleme yapılmamış Morwell maden kömürlerinin ise çözünmediğini gözlemişlerdir. Bu nedenle HNO_3 ve H_2O_2 ile oda koşullarında oksidleme yaparak sıvılaşmayı sağlamışlardır.

Hofrichter vd., (1997), Alman sert kömürleri üzerine etkide bulunabilecek fungus türlerini belirleyebilmek için 750 fungus türünü incelemişlerdir. Bu fungus türlerinden, kömürün fizikokimyasal yapısını modifiye edebile özelliğine sahip altı tanesini seçerek petri kabı üzerinde üretmişlerdir. Bu türlerden *Coprinus sclerotigenis C142-1* türünün, sert kömürlerden 2-hidroksibifenil, alkillenmiş benzenler ve poliaromatik hidrokarbonları (PAH) ayırdığını belirlemişlerdir. Bu bileşiklerin birçoğunun sert kömür makromolekülündeki mikroporlar ya da gözenekler içerisinde serbest bulunduğu varsayılmıştır. Hidroksilatlanmış bifenillerin fungus aracılığıyla kömürden ayrılmasının kimyasal bağ kopmalarına dayandığını ileri sürmüşlerdir.

Hölker vd., (1997), funguslar tarafından kömür çözündürülmesinde yer alan farklı mekanizmalar incelemişlerdir. Yapılan çalışmada, alkalın maddelerin üretimi, çelatların çıkarılması, enzim etkisi, glutamat içerikli ortamda (enzim etkisi yok) üreme süresi ve oluşan çelatların kömür çözündürmedeki etkisi araştırılmışlardır. *T. atroviridenin* kullanıldığı ortam için yüksek pH'da ve yüksek kelat aktivitesinde kömürün sıvılaştığını tespit etmişlerdir.

Hofrichter vd., (1997, II) düşük ranklı kömürlerin fungus ile çözündürülmesinin, depolimerizasyon ile aynı mekanizma olmadığını ileri sürmüşlerdir. 728 fungus türü düşük ranklı Alman linyitlerini çözündürmede test edilmiştir. Kömür, hem % 3 H₂O₂ ile oksidlendirilmiş hem de ön işleme tabi tutulmaksızın ham halde kullanılmıştır. Azotça zengin ortamlarda “basidiomycete” türü fungusların kömürü çözündürdüğünü ancak ligninolitik enzimleri inhibe ettiği tespit edilmiştir. Katı kömür partiküllerinden siyah damlacıkların oluştuğu tipik çözündürme işleminin, ortamın azot içeriğine, kömürün oksidasyon derecesine bağlı olduğunu ve yüksek pH’da gerçekleştiği sonucuna varmışlardır. Yüksek pH (6-9) ve yüksek azot konsantrasyonu, hümitik asitlerin kömür makromolekülünden ayrılmasına neden olmakta ve enzimatik olmayan alkalın çözündürmeye yol açmaktadır. Düşük pH’da (3-6) ve düşük azot içerikli ortamda ise ligninolitik enzimler tarafından kömür hümitik maddelerini depolimerize ederek olarak sarımsı renkteki düşük moleküler birimlere dönüştürmektedir.

Fakoussa (1999), kömürün mikrobiyal sıvılaştırılmasında oksidatif enzimler (peroksidazlar, lakkas), hidrolitik enzimler (esterazlar), alkalın metabolitler ve doğal çelatların etkin olduğunu ileri sürmüştür.

Machnikowska (2002), *Pseudomonasputida*’nın linyit ve alt bitümlü kömürlerin organik bileşenlerini bozundurma yeteneğini test etmiştir. Nitrik asitle ön oksitleme işleminin, linyitte % 90, bitümlü kömürlerde ise % 40 çözündürme verimi sağladığını belirlemişlerdir. Elde edilen biyoekstratlarda, azot ve oksijen içeriklerinin arttığı belirlenmiştir.

4.1.1 Türk Kömürleriyle Yapılan Mikrobiyal Sıvılaştırma Çalışmaları

Gökçay (2001), yüksek kükürt ve düşük ısıl değere sahip linyit numunelerini, biyolojik olarak çözündürmüş ve ardından gazlaştırmıştır. Çalışmalarda, birkaç tür beyaz çürükçül fungus (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pl.sapidus*, *Pl.ostreatus*, *Pl.florida*, *Coriolus versicolor*) kullanılmıştır. *Phanerochaete chrysosporium*’un Elbistan linyitini % 60 verimle depolimerize ettiği belirlenmiştir. Çan linyiti 8 M HNO₃ ile muamele sonrasında fungus vasıtasıyla depolimerize edilmiş ancak Beypazarı linyitinde ise biyolojik etki gözlenmemiştir. Çözünen maddelerin gazlaştırma testinde ise metan üretimi süresince % 21’lik enerji dönüşümü sağlanmıştır.

Başaran (2001), *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Coriolus versicolor* suşlarını Elbistan ve Beypazarı linyitlerinin sıvılaştırılmasında kullanmıştır. Malt ekstre agar besiyerlerinde yapılan

denemeler sonucuna, altı çürükçül fungus grubundan *Coriolus versicolor*'ın Elbistan linyiti için etkin olduğu belirlenmiştir. Beypazarı linyiti için ise etkili fungus saptanamamıştır. Denemelerde, linyit numuneleri, 8 N HNO₃ ile 48 saat süresince oksidasyon işlemine tabi tutulmuş, 24 saat kurutulduktan sonra besiyerinde üreyen fungus üzerine konulmuştur. Ortama kömür ilavesinden itibaren sıvılaşmanın, 9. günden itibaren başladığı ve 15. günde maksimum değerine ulaştığı gözlenmiştir.

Gökhan (1990), bazı Türk linyitlerinin *Streptomyces setonii* 75 Vi2 tarafından sıvılaştırılmasını araştırmıştır. Kömür türünün, kömür tanecik boyutunun, üreme ortamının niteliklerinin ve üreme ortamının pH değerinin bu çözünme sürecine etkilerini incelemiştir. Orijinal kömür örnekleri öncelikle 8 M HNO₃ ile ön oksidleme işlemine tabi tutulmuş ve bunu takiben mikroorganizma ile işleme konulmuştur. Mikroorganizmalar saboraud sıvı ortamı (SMB) ve maya özütü sıvı ortamında (YEB) üretilmiştir. SMB ortamında daha yaygın bir üreme görülmüş ve daha yüksek dönüşüm sağlanmıştır. En yüksek lignin içeren Beypazarı linyiti ile en yüksek sıvı verimi elde edilmiştir. Mengen linyiti en az çözünürlük değeri vermiş ve bu tür bir işlem için uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Orta dereceli lignin içeren Eskişehir linyitinin ise bütün çalışmalarda orta dereceli sıvı verimine sahip olduğu görülmüştür. Küçük tanecikli kömürlerin büyük taneciklere oranla daha fazla dönüşüme uğradığı belirlenmiştir. Elde edilen sıvı ürünün polar bir karışım olduğu gözlenmiştir.

4.2 Hücre dışı Peroksidaz Enzimlerinin Kömüre Etkisi

Düşük sıcaklık depolimerizasyonu, basit aromatik halkalı sistemleri içeren, fenol, benzoik asit, ftalik asit ve diğer karboksilli asitleri içeren düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin eldesinde önemlidir. Kömürden yüksek molekül ağırlığına sahip bileşiklerin üretimi, kok fırınlarında by-pass üretim yöntemiyle gerçekleşir. Yüksek sıcaklık nedeniyle düşük molekül ağırlıklı bileşikler üretilmemektedir. Toluen, ksilen gibi bazı aromatik hidrokarbonların üretimi yaygın bir şekilde petrol rafinerilerinden karşılanmasına rağmen başlıca üretim kaynağı kok fırınlarıdır. Kömürün rafineri ve kok fırınlarında yapılan depolimerizasyonunda önemli ürünler üretilmesine rağmen fazla miktarlarda kontrol edilemeyen tehlikeli atıkların oluşumu önlenememektedir. Düşük sıcaklık depolimerizasyonu bu açıdan oldukça avantajlı görülmektedir.

Enzimlerin çeşitli biyopolimerlerin depolimerizasyonunu katalizlediği bilinmektedir. Enzim katalizli kömür depolimerizasyonunda kömürün hidrofobik olması yüksek molekül ağırlıklı ve porozitesinin düşük olması nedeniyle pek de mümkün görülmemiştir. Enzimatik etki için

yüksek molekül ağırlığına sahip kömür moleküllerinin suda çözünebilen forma getirilmesi gerekmektedir.

Wood ve Wondrack (1990, 1991), suda çözünebilir yapıdaki kömür polimerlerini substrat olarak seçmişler ve LiP enzimi vasıtasıyla depolimerizasyonunu incelemişlerdir. Kömür, 15°C ve 70°C arasında değişen sıcaklıklarda nitrik asitle oksidasyon işlemine tabi tutulmuş ve ardından NaOH ile alkali muamelesi ve asidlendirme yapılarak kömürden suda çözünebilir polimerik yapıdaki kömür substratları elde edilmiştir. LiP enzimi ile yapılan denemeler göstermiştir ki reaksiyon karışımına H₂O₂ ve O₂ ilavesi, enzimin kömür moleküllerinin depolimerizasyonunu katalizlemesine yol açmaktadır. Sonuçta, suda-çözünebilir polimerik yapılı kömür substratlarının LiP katalizli depolimerizasyon için uygun olduğu saptanmıştır.

Ralph ve Catcheside (1997), LiP enzimini düşük ranklı kömürlerin oksidatif depolimerizasyonu ve renksizleştirme “bleaching” reaksiyonları için kullanmışlardır. Bu çalışmada LiP'nin lignini, fenolik olmayan aromatik halkaların aril katyon radikallerine oksidlemesi yoluyla C-C ve C-O bağlarını fisyonu uğrattığı gözlenmiştir. Fenolik bileşiklerin oksidasyonu ile oluşan fenoksi radikalleri kuvvetli bir şekilde polimerize olma eğilimi göstermektedir.

Crawford ve Gupta (1990), hücre dışı bakteriyel enzimlerin suda çözünebilir polimerik kömür fraksiyonlarına etkilerini incelemişlerdir. Enzimatik etki sonucunda, HPLC kromatografisi yöntemiyle, molekül ağırlığının 174000'den 113000'e düştüğünü tespit etmişlerdir. Bakteriyel enzimlerin oksidatif olmayan enzimatik depolimerizasyonunun kömür için mümkün olduğunu ileri sürmüşlerdir.

5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

5.1 Kullanılan Malzemeler

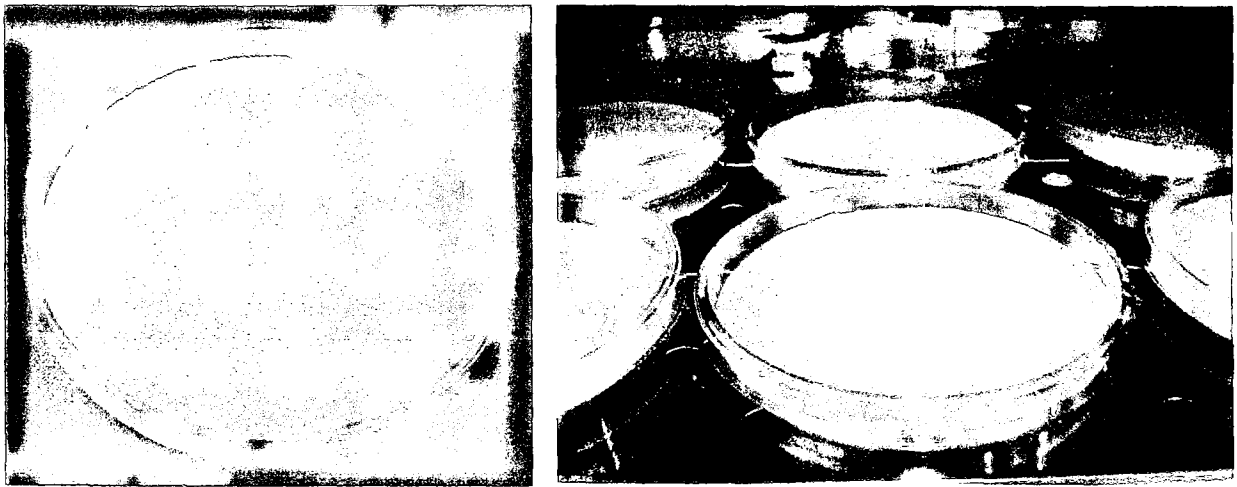
5.1.1 Linyit Numuneleri

Bu çalışmada, Türkiye Kömür İşletmeleri'ne bağlı üretim birimlerinden temin edilen, Bolu, Bursa, Konya, Kütahya ve Muğla yörelerine ait linyit numuneleri, kırıcıda kırıldı, öğütücüde öğütüldü, elekten elenerek -0.2 mm tane boyutuna sahip olacak şekilde hazırlandı.

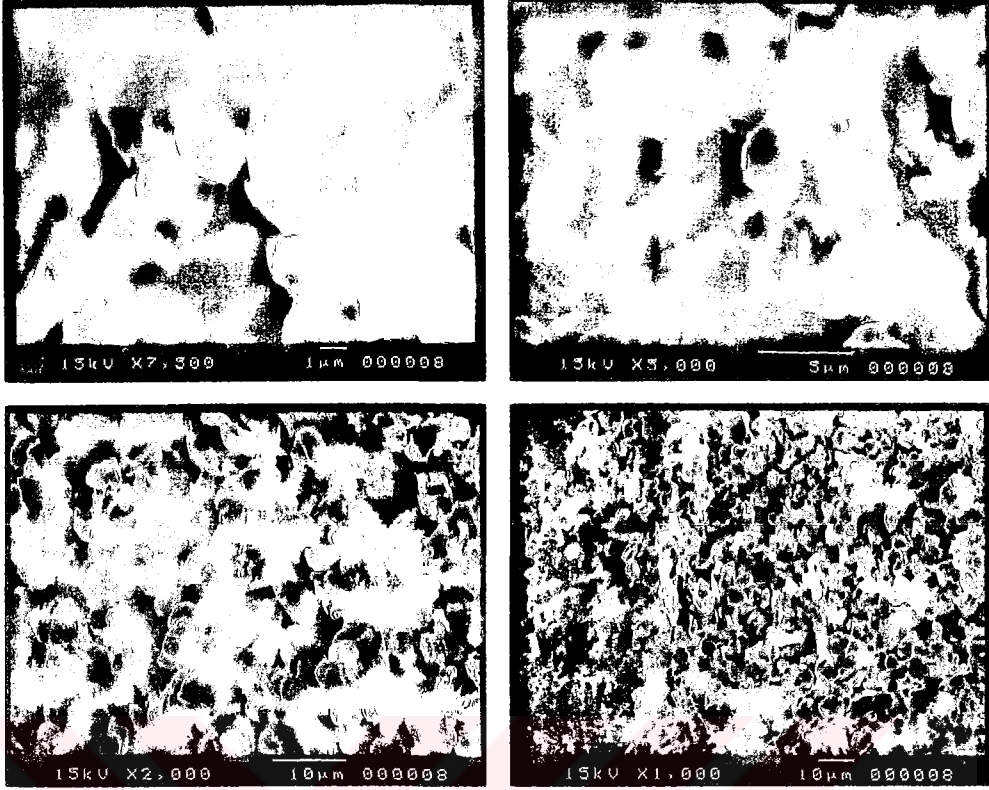
5.1.2 Mikroorganizma (*Phanerochaete chrysosporium* DSM No. 6909) ve Enzim

(HRP:*Horseradish peroxidase* EC. 1.11.1.7)

Linyit numuneleri ve linyitten ekstrakte edilen hümik asidlere mikrobiyal etkinin araştırılması için beyaz çürükçül fungus (white-rot fungus) kullanıldı. Bu fungusu ait suş (*Phanerochaete chrysosporium*) Almanya'da bulunan DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) kültür koleksiyonundan, yatık malt ekstrat peptone agar üzerinde, aktif kültür olarak temin edildi. Petri kaplarında ve malt ekstrat pepton agar üzerinde üretilmiş mikroorganizma suşunun görüntüleri Şekil 5.1(a) ve (b)'de, SEM vasıtasıyla farklı büyütme oranlarında belirlenen mikro yapı görüntüleri ise Şekil 5.2'de verilmektedir. Linyitten üretilen hümik asidlerin enzimatik reaksiyonlarında kullanılan enzim (HRP: EC. 1.11.1.7) Sigma firmasından temin edildi.



Şekil 5.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan mikroorganizma suşunun (*Phanerochaete chrysosporium*) görüntüsü



Şekil 5.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan mikroorganizma suşunun (*Phanerochaete chrysosporium*) farklı büyütme oranlarında belirlenen SEM görüntüleri

5.2 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar;

“Mermert” marka inkübatör

“Mermert” marka çalkalamalı su banyosu

“Mettler” marka analitik terazi

“IKA Labortechnik” marka mekanik karıştırıcı

“Hanna Microprocessor PH211” pH metre

“Telstar Cryodos” marka liyofilizatör

“Heidolph Reaxtop” marka vorteks

“Müve NF 615” marka santrifüj

“Micro 20 Hettich” marka mikrosantrifüj

- “Nüve EV 018” marka vakum etüvü
- “Human Power Scholar Pure Water System Innovation Ultrapur” milipor saf su cihazı
- “IKA-Calorimeter C4000 adiabatic” marka bomba kalorimetresi
- “Nüve” marka kül fırını
- “RETSCH” marka agat öğütücü
- “LECO CHN-600” marka karbon-hidrojen-azot cihazı
- “LECO SC-132” marka kükürt cihazı
- “Perkin Elmer Spectrum One” marka FTIR cihazı
- “Jasco V-530” marka UV/VIS Spektrofotometre
- “Perkin Elmer Clarus 500” marka Gaz Kromatograf- Kütle Spektrometrisi (GC-MS)
- “JEOL JSM-5410” model taramalı elektron mikroskobu (SEM)
- “Malvern 3000” marka zetametre cihazı
- “Malvern Mastersizer-X” marka tane boyutu ölçüm cihazı

Deneysel çalışmalarda analitik saflıkta kimyasal maddeler kullanılmıştır.

Malt-ekstrat, soya peptone, agar, fosfat tamponu (pH:7, PBS), o-dianisidin, H₂O₂, H₂SO₄, NaOH, KBr, aseton, azot gazı (% 99.9).

5.3 Malzeme Karakterizasyonu ve Uygulanan Yöntemler

5.3.1 Linyit Numunelerinin Analiz Edilmesi

Yaklaşık 1 g numune 105°C sıcaklıktaki etüvde 2 saat bekletilerek ağırlık kaybından nem miktarı hesaplandı. Uçucu madde ve kül miktarı gravimetrik yöntemle belirlendi. Sabit karbon miktarı ise daha önce bulunan değerlerden yararlanarak hesaplandı. Numunelerin elementel analizi, karbon-hidrojen-azot cihazıyla, toplam kükürt miktarı ise kükürt cihazıyla belirlendi. Numunelerin ısı değerleri bomba kalorimetresi ile tayin edildi (Çizelge 5.1).

5.3.2 Linyit Numunelerinin Nitrik Asitle (8 M HNO₃) Oksidasyonu

Mikroorganizma ortamına konulmadan önce linyit numuneleri, nitrik asit oksidasyonuna tabi tutuldu. Kırma, eleme ve öğütme işlemlerinden geçirilen ve yaklaşık -2 mm tane boyutuna sahip numuneler, kuru bazda 80 g olacak şekilde tartıldı ve 400 ml 8 M HNO₃ çözeltisinde 48 saat süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Oksidasyon süresinin bitiminde katı ve sıvı kısımlar vakum-filtrasyon sistemiyle birbirlerinden ayrıldı ve filtre keki filtrat çözeltisinin pH'sı 5 olana kadar saf suyla yıkandı ve 40°C sıcaklıkta etüvde kurutuldu. Kuruyan numuneler agat öğütücüde öğütüldü, elekten elendi ve tane boyutunun -0.2 mm altına inmesi sağlandı. Oksidasyon işlemi sonrasında deneyler için hazır hale getirilen numunelerin nem içerikleri belirlendi.

5.3.3 Oksidlendirilmiş Numunelerin Analiz Edilmesi

Nitrik asit oksidasyonu sonrasında elde edilen numunelerin kısa ve elementel analizleri, ısıl değerleri daha önce bahsedilen standartlara uyularak tayin edildi. Sonuçlar Çizelge 5.2'de verilmektedir.

5.3.4 Mikrobiyal Sıvılaştırma için Hazırlanan Numunelerin Tane Boyutu Ölçümleri

Nitrik asit oksidasyonu sonrasında hazırlanan numunelerin tane boyutu, lazer tekniği ile çalışan Malvern Mastersizer-X cihazı kullanılarak ölçüldü. Analiz öncesinde numuneler, % 0.2'lik kalsiyum klorür çözeltisi içerisinde 5 dakika karıştırılarak homojen haline getirildi. Ölçüm sonrasında tane boyut dağılımları grafikler halinde elde edildi (Şekil 5.3-5.7). Grafiklerden elde edilen sonuçlar Çizelge 5.3'de gösterilmektedir.

Çizelge 5.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan linyit numunelerine ait analiz sonuçları

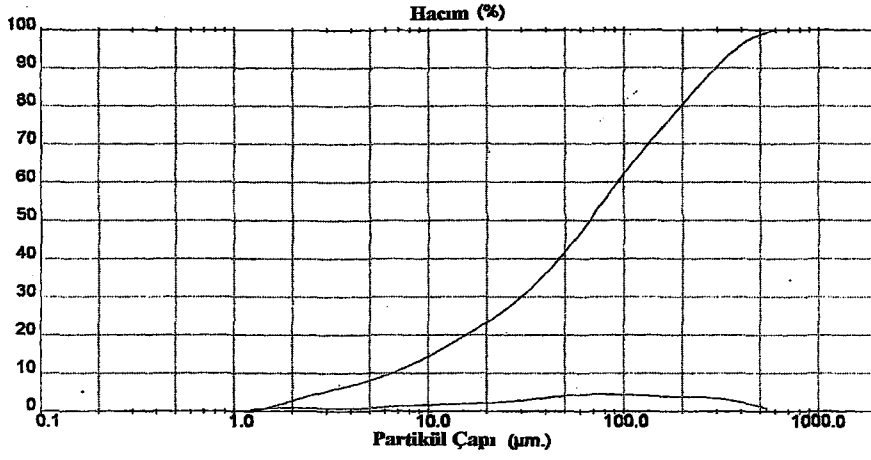
Linyit	NEM	KÜL (%kt)	UM (%kt)	SC (%kt)	C (%kt)	H (%kt)	N (%kt)	O (%kt)	S (%kt)	ÜİD (cal/g)
Bolu- Himmetoğlu	19	46	40	14	50.97	4.03	1.64	46.46	2.78	2480
Bursa-Kestelek	26	10	39	51	57.43	4.52	0.90	37.15	3.08	4500
Konya-İlgin	42	13	59	28	52.27	4.16	1.00	42.57	3.09	4500
Kütahya-Seyitömer	29	35	44	21	47.32	4.12	1.46	47.10	1.97	3450
Muğla-Yatağan	30	24	51	25	44.58	4.20	1.78	49.44	3.54	3980

*, O=100-(C+H+N+S)

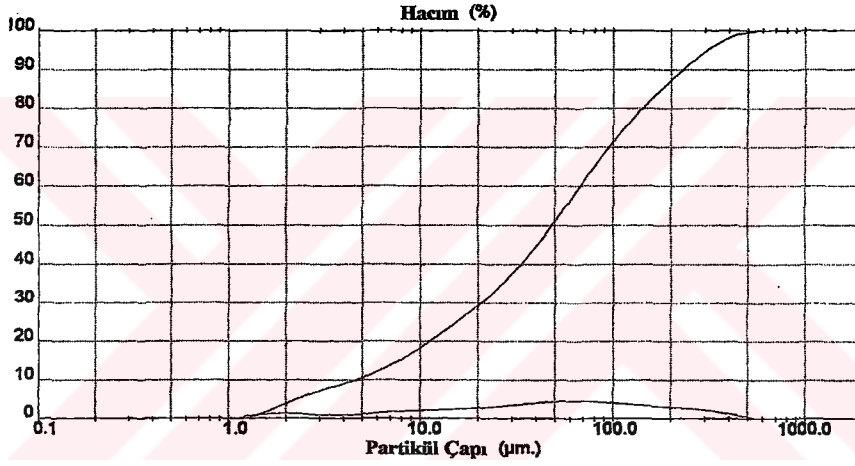
Çizelge 5.2 Nitrik Asitle (8 M HNO₃) oksidasyon sonrasında elde edilen numunelerin analiz sonuçları

Linyit	NEM	KÜL (%kt)	UM (%kt)	SC (%kt)	C (%kt)	H (%kt)	N (%kt)	O (%kt)	S (%kt)	ÜİD (cal/g)
Bolu- Himmetoğlu	4	31	37	32	37.40	2.87	4.73	55.00	0.90	2860
Bursa-Kestelek	6	6	51	43	48.48	3.89	5.38	42.25	1.09	4620
Konya-İlgin	6	4	50	46	38.59	3.39	5.86	52.16	1.26	4630
Kütahya-Seyitömer	7	25	41	34	48.59	3.82	4.45	43.14	0.54	3450
Muğla-Yatağan	4	29	42	29	35.71	3.67	5.55	55.07	0.88	3480

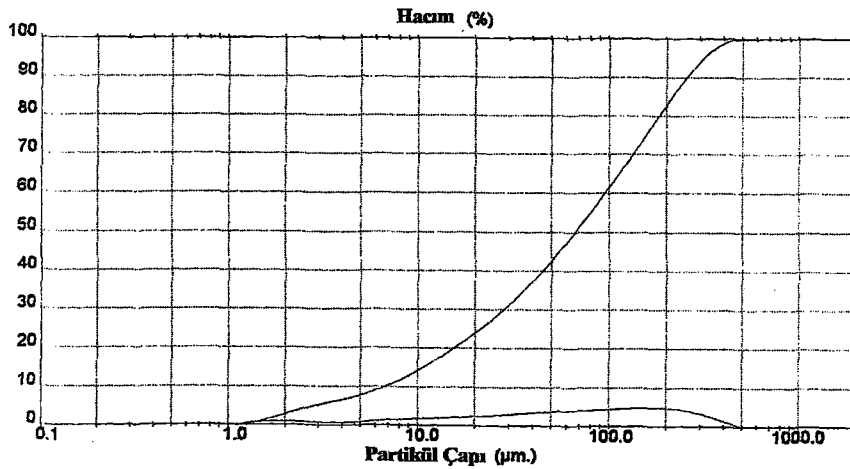
*, O=100-(C+H+N+S)



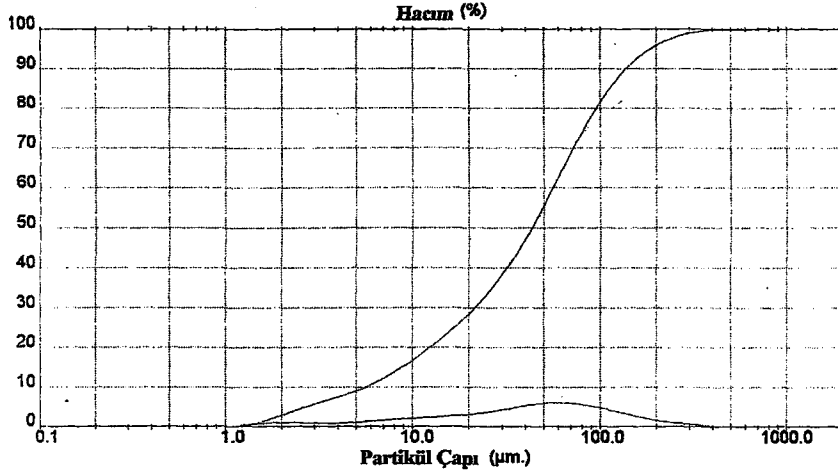
Şekil 5.3 Nitrik asitle oksidlendirilmiş Bolu-Himmetoğlu linyitinin tane boyutu ölçüm grafiği



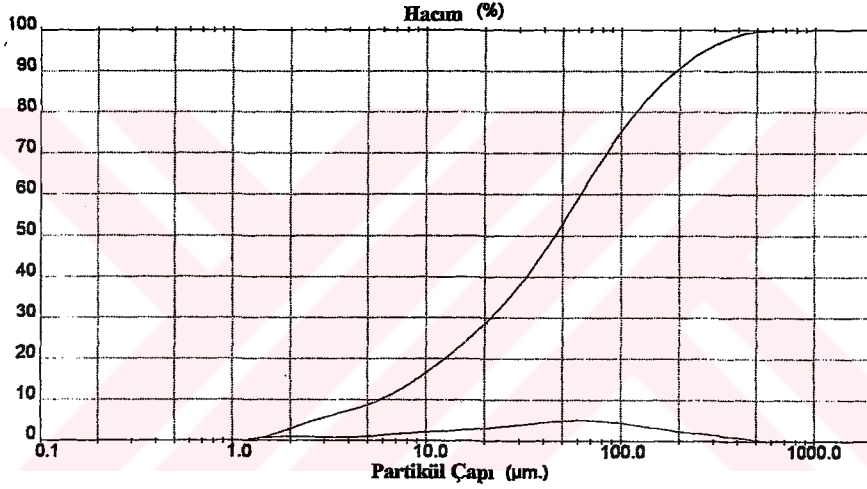
Şekil 5.4 Nitrik asitle oksidlendirilmiş Bursa-Kestelek linyitinin tane boyutu ölçüm grafiği



Şekil 5.5 Nitrik asitle oksidlendirilmiş Konya-Ilgın linyitinin tane boyutu ölçüm grafiği



Şekil 5.6 Nitrik asitle oksidlendirilmiş Kütahya-Seyitömer linyitinin tane boyutu ölçüm grafiği



Şekil 5.7 Nitrik asitle oksidlendirilmiş Muğla-Yatağan linyitinin tane boyutu ölçüm grafiği

Çizelge 5.3 Mikrobiyal sıvılaştırmada kullanılan numunelerin tane boyutu ölçüm sonuçları

Numune Adı	d(0.10)	d(0.50)	d(0.90)
Bolu-Himmetoğlu	6.55	66.63	294.85
Bursa-Kestelek	4.65	48.32	229.07
Konya-İlgın	6.79	66.42	254.27
Kütahya-Seyitömer	5.85	45.66	190.44
Muğla-Yatağan	5.65	43.21	137.67

d(0.10) : numunenin %10'unun geçtiği boyut

d(0.50) : numunenin %50'sinin geçtiği boyut

d(0.90) : numunenin %90'nının geçtiği boyut

5.3.5 Linyitten Hümik Asid Ekstraksiyonu

Mikroorganizma etkisiyle sıvılaştırma ve enzimatik reaksiyonlarda kullanılan hümik asidler, Bolu-Himmetoğlu linyitinden üç farklı yöntemle elde edildi. Birinci yöntemde, ham linyit numunesi, ön oksidasyon işlemi uygulanmaksızın alkali muamelesine tabi tutularak hümik asidler (HA-H) ekstrakte edildi. İkinci ve üçüncü yöntemde, ham linyit numunesi hidrojen peroksit (% 4 H₂O₂) ve nitrik asid (% 30 HNO₃) ile ayrı ayrı oksidasyona uğratıldı ve ardından alkali muamelesi yapılarak hümik asidler (HA-P, HA-N) ekstrakte edildi.

5.3.5.1 Oksidasyon İşlemi Uygulanmamış Linyitten Hümik Asid Ekstraksiyonu

Hümik asid eldesinde kullanılan Bolu-Himmetoğlu linyiti, kırıcıda kırıldı, agat öğütücüde öğütüldü ve elekten elenerek -0.2 mm tane boyutuna getirildi. Numune 105°C sıcaklıkta 2 saat kurutularak nem tayini yapıldı. % 17.49 nem içeriği tespit edildi. Sabit sıcaklıktaki su banyosuna yerleştirilen 1 litre hacme sahip karıştırılmalı cam reaktörde Çizelge 5.4'de belirtilen şartlarda alkali reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon süresince saf azot (% 99.9) gazı ortalama 1.5 lt / dak debiyle reaktöre sürekli olarak verildi (Hofrichter ve Fritsche, 1996).

Çizelge 5.4 Hümik asid ekstraksiyonunda kullanılan deneysel koşullar

Numune Miktarı	96.958 g (kuru bazda 80 g)
Numunenin Tane Boyutu	-0.2 mm
Çözelti Tipi	0.1 N NaOH
Çözelti Miktarı	800 ml
Katı/Sıvı Oranı	1/10
Reaksiyon Süresi	24 saat
Reaksiyon Atmosferi	Saf Azot (% 99.9), 1.5 lt /dak debi
Reaksiyon Sıcaklığı	Oda sıcaklığı
Karıştırma Hızı	250 devir /dak

Süre bitiminde alınan çözelti, 5000 rpm'de 20 dakika süreyle santrüflüenerek çözelti ve çökelti kısımları ayrıldı. Supernatantın pH değeri 8.65, hacmi yaklaşık 620 ml olarak ölçüldü. Bitüm + Matriks olarak tanımlanan çökelti yaklaşık 2.5 litre saf su ile yıkandı ve sulu kısım dekante edildi. Elde edilen çökelti 40°C sıcaklığa ayarlı etüvde kurutuldu ve miktarının 72.95 g olduğu belirlendi. Çözeltiden 50 ml alınıp, üzerine 4 N HCl eklendi ve çözeltinin pH'sı 1'e getirilerek hümik asidlerin çöktürülmesi sağlandı. 5000 rpm'de 20 dakika süreyle santrüflüleme işlemi ile hümik ve fülvik asidler ayrıldı. Santrüflüleme sonrasında ele geçen çözeltinin yeşilimsi renkte (fülvik asit) ve çöken kısmın koyu kahverenkli (hümik asit) olduğu gözlemlendi. Hümik asit olarak adlandırılan çökelti üzerine pH:7 tampon çözeltisinin eklenmesiyle çözündürüldü. Bu çözeltiye 0.5 M NaOH eklenerek pH değerinin 7 olması sağlandı ve hacmi balonjojede 100 ml'ye tamamlandı. Çözünmüş haldeki hümik asidler, enzim reaksiyonları için buzdolabında saklandı.

5.3.5.2 Hidrojen Peroksitle (% 4 H₂O₂) Kimyasal Oksidasyona Tabi Tutulan

Linyitten Hümik Asit Ekstraksiyonu

- 2 mm tane boyutunda, % 20.6 nem içeren BO-Hİ linyitinden tartılan 100.76 g örnek (80 g kuru baz), 400 ml hidrojen peroksitle (% 4 H₂O₂) 4 saat oda sıcaklığında muamele edildi (Klein vd.,1999). Reaksiyon sonrasında ele geçen çözeltinin katı ve sıvı fazları, vakum-filtrasyon sistemiyle ayrıldı. Filtrasyon keki olarak elde edilen katı faz üzerine 0.1 N NaOH çözeltisinden eklendi ve pH değeri ölçüldü (pH 11.80). Bu çözeltinin pH değeri 0.5 N NaOH ile 12.20'ye getirildi. Hümik asit ekstraksiyonu için, pH değeri 12.20'ye getirilen çözelti, sabit sıcaklıktaki su banyosuna yerleştirilen, 1 litre hacme sahip karıştırmalı cam reaktöre konuldu ve Çizelge 5.4'de belirtilen şartlarda alkali reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon süresince reaktöre ortalama 1.5 lt /dak debide saf azot (% 99.9) gazı sürekli olarak verildi (Hofrichter ve Fritsche,1996). Süre bitiminde reaktörden alınan çözelti 5000 rpm'de 20 dakika süreyle santrüflüenerek çözelti ve çökelti kısımları ayrıldı. Çözeltinin pH değeri 6.67, hacmi yaklaşık 680 ml olarak ölçüldü. Bitüm+Matriks olarak tanımlanan çökelti saf su ile yıkandı ve sulu kısım dekante edildi. Elde edilen çökelti 40°C sıcaklıktaki etüvde kurutuldu ve miktarının 68.54 g olduğu belirlendi. 680 ml çözeltiden 50 ml alınarak, üzerine 4 N HCl çözeltisi eklendi ve çözeltinin pH değeri 1'e getirilerek hümik asidlerin çöktürülmesi sağlandı. 5000 rpm'de 20 dakika süreyle santrüflüleme sonrasında hümik ve fülvik asidler ayrıldı. Santrüflü sonrasında ele geçen çözeltinin yeşilimsi renkte (fülvik asit) ve çöken kısmın koyu kahverenkli (hümik asit) olduğu gözlemlendi. Hümik asit olarak adlandırılan çökelti

üzerine pH:7 tampon çözeltisinin eklenmesiyle çözündürüldü. Bu çözeltiye 0.5 M NaOH çözeltisi eklenerek pH değerinin 7 olması sağlandı ve hacmi balonjojede 250 ml'ye tamamlandı. Çözünmüş halde elde edilen hümik asitler, enzim reaksiyonları için buzdolabında saklandı.

5.3.5.3 Nitrik Asitle (% 30 HNO₃) Kimyasal Oksidasyona Tabi Tutulan Linyitten

Hümik Asit Ekstraksiyonu

-2 mm tane boyutuna sahip, % 20.6 nem içeren Bolu-Himmetoğlu linyiti 100.76 g tartılarak (80 g kuru baz), 160 ml nitrik asitle (% 30 HNO₃) 2 saat süreyle oda sıcaklığında muamele edildi. Reaksiyon sonrasında ele geçen çözeltinin katı ve sıvı fazları, vakum-filtrasyon sistemiyle ayrıldı. Filtrasyon keki olarak elde edilen katı faz üzerine 500 ml 0.1 N NaOH çözeltisinden eklendi ve pH değeri ölçüldü (pH 1.15). Bu çözeltinin pH değeri derişik NaOH çözeltisiyle 12.15'e getirildi. Hümik asit ekstraksiyonu için, pH değeri 12.15'e getirilen çözelti, sabit sıcaklıktaki su banyosuna yerleştirilen 1 litre hacme sahip karıştırılmalı cam reaktöre konuldu ve Çizelge 5.4'de belirtilen şartlarda alkali reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon süresince reaktöre ortalama 1.5 lt / dak debide saf azot (% 99.9) gazı sürekli olarak verildi (Hofrichter ve Fritsche,1996). Süre bitiminde reaktörde alınan çözelti 5000 rpm'de 20 dakika süreyle santrüflenerek çökelti ve supernatant kısımları ayrıldı. Supernatantın pH'sı 8.72, hacmi yaklaşık 600 ml olarak ölçüldü. Bitüm+Matriks olarak tanımlanan çökelti saf su ile yıkandı ve sulu kısım dekante edildi. Elde edilen çökelti 40°C deki etüvde kurutuldu ve miktarının 38.68 g olduğu belirlendi. 600 ml çözeltiden 50 ml alınarak, üzerine 4N HCl çözeltisi eklendi ve çözeltinin pH'sı 1'e getirilerek hümik asitlerin çöktürülmesi sağlandı. 5000 rpm'de 20 dakika süreyle santrüflleme işlemi ile hümik ve fülvik asitler ayrıldı. Santrüflüj sonrasında ele geçen çözeltinin yeşilimsi renkte (fülvik asit) ve çökelen kısmın koyu kahverenkli (hümik asit) olduğu gözlemlendi. Hümik asit olarak adlandırılan çökelti üzerine pH:7 tampon çözeltisinin eklenmesiyle çözündürüldü. Bu çözeltiye 0.5 M NaOH çözeltisinin eklenmesiyle pH değerinin 7 olması sağlandı ve hacim 325 ml olarak ölçüldü. Elde edilen çözünmüş haldeki hümik asitler, enzim reaksiyonları için buzdolabında saklandı.

Nitrik asit oksidasyonu sonrasında elde edilen hümik asit miktarının, işlem görmemiş kömürden elde edilen hümik asit miktarına göre yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu tespit edildi.

5.3.6 Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Hümik Asidlerin Tane Boyutu Ölçümleri

Bolu-Himmetoğlu linyitinden farklı yöntemlerle elde edilen hümik asidlerin tane boyut ölçümleri Malvern Zetasizer 3000 cihazı kullanılarak ölçüldü. Ölçümlerde, hümik maddelerin çözünmüş olduğu pH:7 tampon çözeltileri kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre, ham linyitten elde edilen hümik asidlerin (HA-H) ortalama tane boyutunun 763 nm, linyite % 4 H₂O₂ uygulaması sonrasında elde edilen hümik asidlerin (HA-P) ortalama tane boyutunun 540 nm, linyite % 30 HNO₃ uygulaması sonrasında elde edilen hümik asidlerin (HA-N) ortalama tane boyutunun 273 nm olduğu belirlendi.

5.3.7 Mikroorganizma (*Phanerochaete chrysosporium*) Üretimi

5.3.7.1 Besiyerinin Hazırlanması

Mikroorganizmanın linyitler üzerindeki etkisinin araştırılması için *Phanerochaete chrysosporium* suşu tercih edildi ve üretimi için malt ekstrat pepton agar besiyeri kullanıldı. Besiyerlerin hazırlanmasında 1000 ml destile su içine 30 g malt ekstrat, 3 g soya pepton, 15 g agar eklenerek, oda sıcaklığında homojen bir hale gelene kadar karıştırıldı. Elde edilen çözeltinin pH'sı 0.5 N HCl ile 5.6 değerine getirildi. Bu karışım, otoklavda (120°C'de 1 atm basınç) 10 dakika süreyle steril edildi ve steril şartlar altında petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakıldı. Katılaşan besi ortamları, ekim ve kültürasyon için 1 gün süreyle bekletildi.

5.3.7.2 Ekim ve Kültürasyon

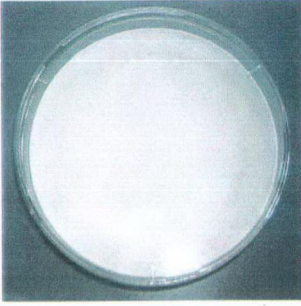
DSMZ kültür koleksiyonundan getirilmiş olan aktif suş kültürü, steril şartlar altında, petri kaplarına dökülerek katılaşırılmış malt ekstrat peptone agar besiyerine, öze teli kullanarak aşılandı. 7 gün süreyle üretilerek elde edilen stok kültür, çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı. Petri kaplarında üretilen stok kültürden, öze teli kullanarak alınan bir miktar mikroorganizma, diğer petrilerdeki besiyerlerine ekildi ve 30°C sıcaklıkta sabit tutulan inkübatörde üremeye bırakıldı. Üreme sonucunda oluşan hiflerin, yedinci günde maksimum erginliğe ulaştığı gözlemlendi.

5.3.8 Mikroorganizmanın (*Phanerochaete chrysosporium*) Linyit Numunelerine ve Hümik Asidlere Etkisi

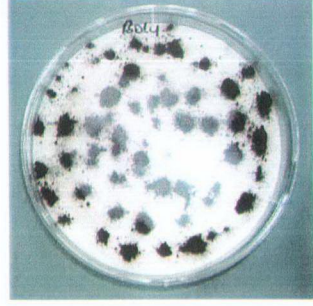
Petri kaplarında üretilen mikroorganizma suşu üzerine, nitrik asitle (8 M HNO₃) oksidlendirilmiş ve 40°C'de kurutulmuş olan beş adet linyit numunesi serpilerek konuldu (Şekil 5.8 b-f).

Petri kaplarına konulmasından itibaren 2. günde sıvılaştıran numuneler, enjektör vasıtasıyla toplandı ve ependorf tüplerine aktarıldı. Elde edilen sıvı ürünler, 13.000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjlenerek süspansiyon halinde kalan katı partiküller çöktürüldü. Santrifüjleme işleminden sonra çözelti olarak ele geçen sıvı ürün ve çökelti olarak elde edilen sıvılaştıran kısım ayrıldı.

Linyit numuneleri için yapılmış olan işlemler, BO-Hİ linyitinden farklı yöntemlerle elde edilen hümik asitler (HA-H, HA-P, HA-N) için de uygulandı. Suş üzerine konan hümik asitlerin yarım saat içinde sıvılaştığı görüldü (Şekil 5.9). Sıvı ürünler enjektörle alınarak santrifüjlendi, santrifüj çözeltisi, liyofilizatörde, katı çöken kısım ise etüvde 40°C'de kurutuldu ve analizleri yapıldı.



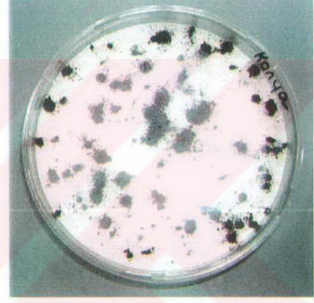
a) *Phanerochaete chrysosporium*
suşunun görüntüsü



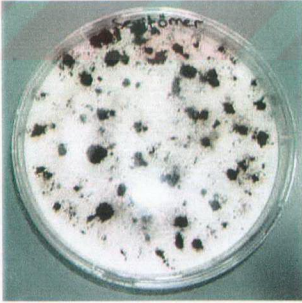
b) Bolu (BO-Hİ) linyiti



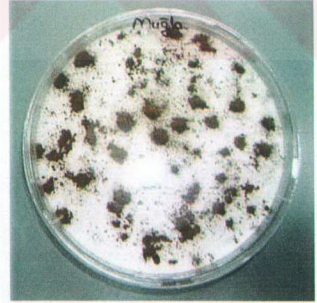
c) Bursa (BU-KE) linyiti



d) Konya (KO-IL) linyiti



e) Kütahya (KÜ-SE) linyiti



f) Muğla (MU-YA) linyiti

Şekil 5.8 Nitrik asitle oksidlendirilmiş linyitlerin mikroorganizma ortamındaki görüntüleri



(a)



(b)

Şekil 5.9 Mikroorganizma etkisiyle sıvılaştıran hümik asitlerin görüntüleri

5.3.9 HRP Enziminin Hazırlanması ve Aktivite Tayini

Deneylerde kullanılan HRP enzimi (HRP : *Horseradish peroxidase* EC. 1.11.1.7) (250 U) 60 µL saf su içine aktararak çözündürüldü. Stok çözelti olarak adlandırılan bu çözeltilerden 10 µL alınarak, saf suyla 1 ml'ye tamamlandı ve bu çözeltinin 280 ve 400 nm'de absorbanans değerleri UV-Vis spektrofotometresiyle ölçüldü.

$$(A_{400}=0.07884 \times 100=7.8840, A_{280}=0.04064 \times 100=4.0464)$$

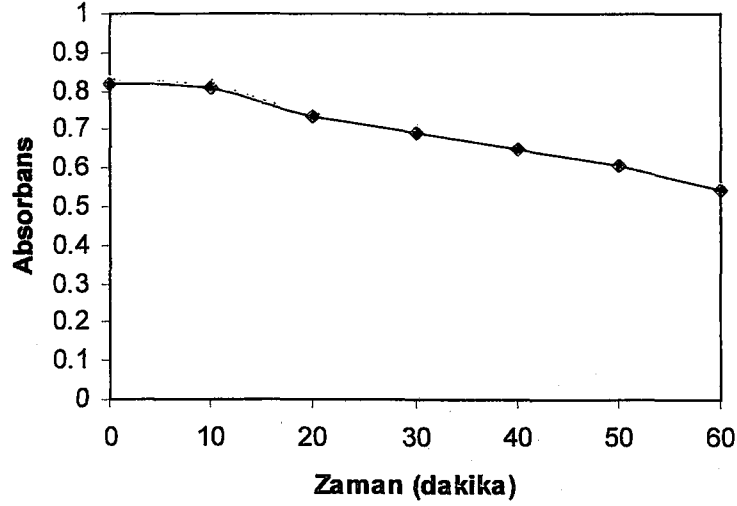
Deneyisel çalışmalarda kullanılmak üzere, hazırlanan stok çözeltilerden 6 µL alınıp 5 ml destile suya eklendi ve kullanılan enzim Unite olarak hesaplandı;

$$\frac{250 \text{ Unite}}{60 \text{ µL saf su}} \times \frac{6 \text{ µL}}{5000 \text{ µL}} = \frac{1 \text{ Unite}}{200 \text{ µL}}$$

5.3.9.1 HRP Enzimi Aktivitesinin 35°C Sıcaklıkta Zamana Bağlı Değişimi

HRP enziminin 35°C sıcaklık ve pH 7'de en yüksek aktiviteye sahip olduğu yapılan ön denemelerle tespit edildi. Bu koşullar göz önünde tutularak zamana bağlı aktivite değişimi incelendi. Bu amaçla, 35°C sıcaklıkta sabit tutulan çalkalamalı su banyosu içerisine, 6 adet numune ve 6 adet şahit olmak üzere toplam 12 adet tüp yerleştirildi. Reaksiyon çözeltisi 3000 µL olacak şekilde ayarlandı.

Numune tüplerine, 2840 µL fosfat tamponu (pH:7) ve 30 µL HRP enzimi eklendi, ardından 30 µL o-dianisidin (10 mM) ve 30 µL hidrojen peroksit (% 3 H₂O₂) eklenerek reaksiyon başlatıldı. 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakikalık sürelerde reaksiyonlar denendi ve süre bitimlerinde enzim reaksiyonları tüplere 70 µL 2 M H₂SO₄ eklenmesiyle durduruldu. Elde edilen çözeltilerin absorbanans değerleri 400 nm'de UV-Vis spektrofotometresiyle ölçüldü. Şahit numune tüplerine ise enzim katılmaksızın, 2870 µL fosfat tamponu (pH:7) eklendi, ardından 30 µL o-dianisidin (10 mM) ve 30 µL hidrojen peroksit (% 3 H₂O₂) konuldu. Aynı sürelerde yapılan denemeler sonucunda reaksiyon tüplerine 70 µL 2 M H₂SO₄ eklendi. Sonuçlar, Şekil 5.10'da verilmektedir.



Şekil 5.10 HRP enzimi aktivitesinin zamana bağlı değişimi

5.3.10 HRP Enziminin Hümkik Asitle Reaksiyonu

Enzimle yapılan deneylerde, ön oksidasyon işlemi uygulanmamış (ham) linyitten ekstrakte edilen hümkik asitler (HA-H), hidrojen peroksitle (% 4 H_2O_2) oksidasyon sonrasında linyitten ekstrakte edilen hümkik asitler (HA-P), nitrik asitle (% 30 HNO_3) oksidasyon sonrasında linyitten ekstrakte edilen hümkik asitler (HA-N) substrat olarak kullanılmıştır.

Enzimle yapılan reaksiyonlarında, enzim miktarındaki değişimin hümkik asitlerin yapısına olan etkileri araştırıldı. 3000 μL hacme sahip reaksiyon çözeltisinde ham, % 4 H_2O_2 ile oksidlendirilmiş ve % 30 HNO_3 ile oksidlendirilmiş linyitten elde edilen hümkik asitler (HA-H, HA-P, HA-N) aynı miktarda alındı (4.3 mg). Reaksiyon ortamına eklenecek enzim miktarı sırasıyla 30, 60 ve 120 μL olacak şekilde seçildi. Kullanılan hümkik asit miktarları, HA-H'nin substrat olduğu denemelerde 300 μL , HA-P'nin substrat olduğu denemelerde, 350 μL , HA-N'nin substrat olduğu denemelerde 160 μL olarak hesaplandı ve bu miktarlarda kullanıldı.

5.3.10.1 Oksidasyon İşlemi Uygulanmamış Linyitten Ekstrakte Edilen Hümik Asitlerle (HA-H) HRP Enzimin Reaksiyonu

5.3.10.1.1 30, 60 ve 120 µL HRP Enzimi ile Yapılan Deneyler

35°C sabit sıcaklığa getirilmiş çalkalamalı su banyosu içerisine 6 adet tüp yerleştirildi. Her bir tüp içine gerekli miktar fosfat tamponu (pH:7) ve 300 µL hümik asit çözeltisi (pH:7) eklendi. Enzimatik reaksiyon, 30 µL HRP enzim çözeltisi ile beraber 30 µL H₂O₂ (% 3'lük) eklenmesiyle başlatıldı. Toplam reaksiyon çözeltisi 3000 µL olarak seçildi. Enzimatik reaksiyonlar, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakikalık sürelerde gerçekleştirildi. Reaksiyonlar, 70 µL 2 M H₂SO₄ çözeltisinin eklenmesiyle durduruldu.

Reaksiyon süresi tamamlandığında çözeltiler, 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrüflüjlendi, çözelti ve çökelti kısımları ayrıldı. Ayırma sonrasında tüm numuneler vakum etüvünde 40°C sıcaklık ve 400 mmHg vakum altında kurutuldu. Kurutulan numunelerin fonksiyonel grup analizleri FTIR spektroskopisi ile incelendi.

Şahit deneme için 35°C sabit sıcaklığa getirilmiş çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiş tüp içerisine 2600 µL fosfat tamponu (pH:7), 300 µL hümik asit çözeltisi (pH:7), 30 µL hidrojen peroksit (% 3 H₂O₂) eklendi. Enzim reaksiyonları için belirlenen süreler sonunda, 70 µL 2 M H₂SO₄ eklenerek hacim 3000 µL'ye tamamlandı. Elde edilen çözelti, 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrüflüjlenerek çözelti ve çökelti kısımları ayrıldı. Ayırma sonrasında tüm numuneler vakum etüvünde 40°C sıcaklıkta ve 400 mmHg vakum altında kurutuldu. Kurutulan numunelerin fonksiyonel grup analizleri FTIR spektroskopisi ile incelendi.

Reaksiyon süresinin ve enzim miktarındaki artışın yapı üzerindeki etkisini araştırmak için, 35°C sabit sıcaklığa getirilen su banyosu içerisine yerleştirilen 1 adet tüp içerisine, 2700 µL fosfat tamponu (pH:7, PBS), 300 µL hümik asit çözeltisi (pH:7), 30 µL hidrojen peroksit (% 3 H₂O₂) aktarıldı. 30 dakika arayla toplam 4 saat süresince tüplere 120 µL HRP enzimi eklendi. 8 defa enzim eklemesi ardından, reaksiyon 70 µL 2 M H₂SO₄ çözeltisinin eklenmesiyle durduruldu. Elde edilen çözelti, 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrüflüjlendi, çözelti ve çökelti kısımları ayrıldı. Ayırma sonrasında tüm numuneler vakum etüvünde 40°C sıcaklık ve 400 mmHg vakum altında kurutuldu. Kurutulan numunelerin fonksiyonel grup analizleri FTIR spektroskopisi ile incelendi.

Şahit deneme için 35°C sabit sıcaklığa getirilmiş çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiş tüp içerisine 2700 µL fosfat tamponu (pH:7, PBS), 300 µL hümik asit çözeltisi (pH:7), 30 µL

hidrojen peroksit (% 3 H₂O₂) çözeltisi aktarıldı. 30 dakika arayla, toplam 4 saat süresince tüplere 120 µL PBS tamponu eklendi, ardından reaksiyon 70 µL 2 M H₂SO₄ eklenerek durduruldu. Elde edilen çözelti, 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüjlendi, çözelti ve çökelti kısımlar ayrıldı. Ayırma sonrasında tüm numuneler vakum etüvünde 40°C sıcaklık ve 400 mmHg vakum altında kurutuldu. Kurutulan numunelerin fonksiyonel grup analizleri FTIR spektroskopisi ile incelendi.

5.3.10.2 Hidrojen Peroksitle Oksidlendirilmiş Linyitten Ekstrakte Edilen

Hümik Asidlerle (HA-P) HRP Enziminin Reaksiyonu

5.3.10.2.1 30, 60 ve 120 µL HRP Enzimi ile Yapılan Deneyler

35°C sabit sıcaklığa getirilmiş çalkalamalı su banyosu içerisine 6 adet tüp yerleştirildi. Her bir tüp içine gerekli miktar fosfat tamponu (pH 7) ve 350 µL hümik asit çözeltisi (pH:7) eklendi. Enzimatik reaksiyon, 30 µL HRP enzim çözeltisi ile beraber 30 µL H₂O₂ (% 3 lük) eklenmesiyle başlatıldı. Toplam reaksiyon çözeltisi 3000 µL olarak seçildi. Enzimatik reaksiyonlar, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakikalık sürelerde gerçekleştirildi. Reaksiyonlar, 70 µL 2 M H₂SO₄ çözeltisinin eklenmesiyle durduruldu.

Reaksiyon süresi tamamlandığında çözeltiler, 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüjlendi, çözelti ve çökelti kısımları ayrıldı. Ayırma sonrasında tüm numuneler vakum etüvünde 40°C sıcaklık ve 400 mmHg vakum altında kurutuldu. Kurutulan numunelerin fonksiyonel grup analizleri FTIR spektroskopisi ile incelendi.

Şahit deneme için 35°C sabit sıcaklığa getirilmiş çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiş tüp içerisine 2550 µL fosfat tamponu (pH:7), 350 µL hümik asit çözeltisi (pH:7), 30 µL hidrojen peroksit (% 3 H₂O₂) eklendi. Enzim reaksiyonları için alınan süreler sonunda 70 µL 2 M H₂SO₄ çözeltisinden eklenerek hacim 3000 µL'ye tamamlandı. Elde edilen çözelti, 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüjlenerek çözelti ve çökelti kısımları ayrıldı. Ayırma sonrasında tüm numuneler vakum etüvünde 40°C sıcaklık ve 400 mmHg vakum altında kurutuldu. Kurutulan numunelerin fonksiyonel grup analizleri FTIR spektroskopisi ile incelendi.

Reaksiyon süresinin ve enzim miktarındaki artışın yapı üzerindeki etkisini araştırmak için, 35°C sabit sıcaklığa getirilen su banyosu içerisine yerleştirilen 1 adet tp içerisine, 2650 µL fosfat tamponu (pH:7, PBS) ve 350 µL hümik asit çözeltisi (pH :7), 30 µL hidrojen peroksit (% 3 H₂O₂) aktarıldı. 30 dakika arayla, toplam 4 saat süresince tüplere 120 µL HRP enzimi eklendi. 8 defa enzim eklemesi ardından, reaksiyon 70 µL 2 M H₂SO₄ eklenerek durduruldu. Elde edilen çözelti, 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüjlendi, çözelti ve çökelti kısımları ayrıldı. Ayırma sonrasında tüm numuneler vakum etüvünde 40°C sıcaklık ve 400 mmHg vakum altında kurutuldu. Kurutulan numunelerin fonksiyonel grup analizleri FTIR spektroskopisi ile incelendi.

şahit deneme için 35°C sabit sıcaklığa getirilmiş çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiş tp içerisine 2650 µL fosfat tamponu (pH:7, PBS), 350 µL hümik asit çözeltisi (pH 7), 30 µL hidrojen peroksit (% 3 H₂O₂) özeltisi aktarıldı. 30 dakika arayla, toplam 4 saat süresince tüplere 120 µL PBS tamponu eklendi, ardından reaksiyon 70 µL 2 M H₂SO₄ eklenerek durduruldu. Elde edilen çözelti, 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüjlendi, çözelti ve çökelti kısımları ayrıldı. Ayırma sonrasında tüm numuneler vakum etüvünde 40°C sıcaklık ve 400 mmHg vakum altında kurutuldu. Kurutulan numunelerin fonksiyonel grup analizleri FTIR spektroskopisi ile incelendi.

5.3.10.3 Nitrik Asidle Oksidlendirilmiş Linyitten Ekstrakte Edilen Hümik Asidlerle

(HA-N) HRP Enziminin Reaksiyonu

5.3.10.3.1 30, 60 ve 120 µL HRP Enzimi ile Yapılan Deneyle

35°C sabit sıcaklığa getirilmiş çalkalamalı su banyosu içerisine 6 adet tp yerleştirildi. Her bir tp içine, gerekli miktar fosfat tamponu (pH:7) ve 160 µL hümik asit çözeltisi (pH:7) eklendi. Enzimatik reaksiyon, 30 µL HRP enzim çözeltisi ile beraber 30 µL hidrojen peroksit (% 3 H₂O₂) özeltisi eklenmesiyle başlatıldı. Enzimatik reaksiyon, 30 µL HRP enzimi ile beraber hidrojen peroksit eklenmesiyle başlatıldı. Toplam reaksiyon özeltisi 3000 µL olarak seçildi. Enzimatik reaksiyonlar, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakikalık reaksiyon sürelerde gerçekleştirildi. Reaksiyonlar, 70 µL 2 M H₂SO₄ özeltisinin eklenmesiyle durduruldu. Reaksiyon süresi tamamlandığında elde edilen çözelti, 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüjlendi, çözelti ve çökelti kısımları ayrıldı. Ayırma sonrasında tüm numuneler vakum etüvünde 40°C sıcaklık

ve 400 mmHg vakum altında kurutuldu. Kurutulan numunelerin fonksiyonel grup analizleri FTIR spektroskopisi ile incelendi.

Şahit deneme için 35°C sabit sıcaklığa getirilmiş çalkalamalı su banyosu içerisine yerleştirilmiş tüp içerisine 2740 µL fosfat tamponu (pH:7), 160 µL hümik asit çözeltisi (pH:7), 30 µL hidrojen peroksit (% 3 H₂O₂) eklendi. Enzim reaksiyonları için alınan süreler sonunda 2 M H₂SO₄ çözeltisinden 70 µL eklenerek hacim 3000 µL'ye tamamlandı. Elde edilen çözelti, 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrüfüjlenerek çözelti ve çökelti kısımları ayrıldı. Ayırma sonrasında tüm numuneler vakum etüvünde 40°C sıcaklık ve 400 mmHg vakum altında kurutuldu ve tartımları alındı. Kurutulan numunelerin fonksiyonel grup analizleri FTIR spektroskopisi ile incelendi.

Reaksiyon süresinin ve enzim miktarındaki artışın yapı üzerindeki etkisini araştırmak için, 35°C sabit sıcaklığa getirilen su banyosu içerisine yerleştirilen 1 adet tüp içerisine, 2840 µL fosfat tamponu (pH:7, PBS) ve 160 µL hümik asit çözeltisi (pH:7), 30 µL hidrojen peroksit (% 3 H₂O₂) aktarıldı. 30 dakika arayla, toplam 4 saat süresince tüplere 120 µL HRP enzimi eklendi. 8 defa enzim eklemesi ardından, reaksiyon 70 µL 2 M H₂SO₄ eklenerek durduruldu. Elde edilen çözelti, 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrüfüjlendi, çözelti ve çökelti kısımları ayrıldı. Ayırma sonrasında tüm numuneler vakum etüvünde 40°C sıcaklık ve 400 mmHg vakum altında kurutuldu ve tartımları alındı. Kurutulan numunelerin fonksiyonel grup analizleri FTIR spektroskopisi ile incelendi. Şahit deneme için 35°C sabit sıcaklığa getirilmiş çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiş tüp içerisine 2840 µL fosfat tamponu (pH:7, PBS), 160 µL hümik asit çözeltisi (pH 7), 30 µL hidrojen peroksit (% 3 H₂O₂) çözeltisi aktarıldı. 30 dakika arayla, toplam 4 saat süresince tüplere 120 µL PBS tamponu eklendi, ardından reaksiyon 70 µL 2 M H₂SO₄ eklenerek durduruldu. Elde edilen çözelti, 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrüfüjlendi, çözelti ve çökelti kısımları ayrıldı. Ayırma sonrasında tüm numuneler vakum etüvünde 40°C sıcaklık ve 400 mmHg vakum altında kurutuldu. Kurutulan numunelerin fonksiyonel grup analizleri FTIR spektroskopisi ile incelendi.

5.4 Elde Edilen Ürünlerin, Çözelti ve Çökeltilerin Değerlendirilmesi

5.4.1 UV-Vis Spektrofotometresi ile Kömür Çözünürlüğünün Tayini

Mikroorganizmanın linyitlere ve farklı yöntemlerle elde edilen hümik asitlere etkisi sonucu oluşan sıvı ürünlerin çözünürlükleri absorban değerlerini ölçerek UV-Vis spektrofotometresiyle tayin edildi (Fakoussa, 1994). UV-Vis ile ölçüm öncesinde petri

kabından alınan sıvı ürünler, 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrüfjüjlendi ve süspansiyon halinde kalan katı partiküllerin uzaklaştırılması sağlandı. Sıvı ürünlerin çözelti kısımlarından 2 µL alındı ve 1 ml saf suda çözündürülerek 450 nm'de absorbanları ölçüldü.

5.4.2 İnfrared (FTIR) Spektroskopisi ile Fonksiyonel Grupların Tayini

Deneysel çalışmalarda kullanılan numuneler ve reaksiyonlar sonunda elde edilen ürünler kurutma sonrasında, 1/100 oranında KBr ile karıştırıldı ve 10 kg/cm² basınç altında presleme makinasında pelet haline getirildi. 4000-400 cm⁻¹ aralığında Perkin Elmer marka FTIR cihazında spektrumları alındı. Numunelerin FTIR analizine hazırlanmasında katı numuneler 0.001 g tartıldı, sıvı numuneler ise 5 µL alınarak liyofilizatörde kurutuldu ve KBr ile homojen hale getirildi. Spektrumları alınan numuneler aşağıda verilmiştir:

- a) Ham linyit numuneleri
- b) Nitrik asitle (8 M HNO₃) oksidlendirilmiş numuneler
- c) Oksidlendirilmiş numunelere mikroorganizma etkisi sonucunda oluşan sıvı ürünlerin çözelti ve çökelti kısımları
- d) Ham linyitten ekstrakte edilen hümkik asidler (HA-H),
- e) Hidrojen peroksitle (% 4 H₂O₂) oksidasyon sonrasında ekstrakte edilen hümkik asidler (HA-P),
- f) Nitrik asitle (% 30 HNO₃) oksidasyon sonrasında ekstrakte edilen hümkik asidler (HA-N)
- g) Hümkik asidlere (HA-H, HA-P ve HA-N) mikroorganizma etkisi sonucunda oluşan sıvı ürünlerin çözelti ve çökelti kısımları
- h) Hümkik asidler (HA-H, HA-P ve HA-N) ve enzim reaksiyonu sonrasında elde edilen çözelti ve çökelti kısımları

5.4.3 Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ile Kimyasal Yapı Tayini

Numunelerin GC-MS analizine hazırlanması aşamasında, sıvı numunelerden 5 μL , katı numunelerden ise 0.01 g tartım alınarak asetonda (1 ml) çözündürüldü. 1 dakika süreyle vortekslendi ve ardından 13.000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüjlenerek süspansiyon halinde kalan katı partiküller çöktürüldü. Analize hazır hale getirilen numunelerden 0.5 μL alınıp GC-MS cihaz kolonuna enjekte edildi. Analizlerde, 30 m uzunlukta, 0.25 mm iç çapında, BPX5 tip kapiler kolon kullanıldı. Taşıyıcı gaz olarak kullanılan He gazı 1 ml / dak debiyle sistemden sürekli geçirildi.

Analiz sırasında uygulanan fırın sıcaklık programı şöyledir:

Başlangıç sıcaklığı : 50°C

1. adım : Isıtma hızı : 10°C / dak

Son sıcaklık : 220 °C, bu sıcaklıkta 2 dakika beklendi

2. adım : Isıtma hızı : 20°C / dak

Son sıcaklık : 330°C, bu sıcaklıkta 10 dakika beklendi

Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrometrisi (GC-MS) tekniği ile incelenen numuneler aşağıda verilmektedir:

- a) Ham linyit numuneleri
- b) Nitrik asitle (8 M HNO_3) oksidlendirilmiş numuneler
- c) Oksidlendirilmiş numunelere mikroorganizma etkisi sonucunda oluşan sıvı ürünlerin çözelti kısımları
- d) Ham linyitten ekstrakte edilen hümik asitler (HA-H),
- e) Hidrojen peroksitle (% 4 H_2O_2) oksidasyon sonrasında ekstrakte edilen hümik asitler (HA-P),
- f) Nitrik asitle (% 30 HNO_3) oksidasyon sonrasında ekstrakte edilen hümik asitler (HA-N)
- g) Hümik asitlere (HA-H, HA-P ve HA-N) mikroorganizma etkisi sonucunda oluşan sıvı ürünlerin çözelti kısımları

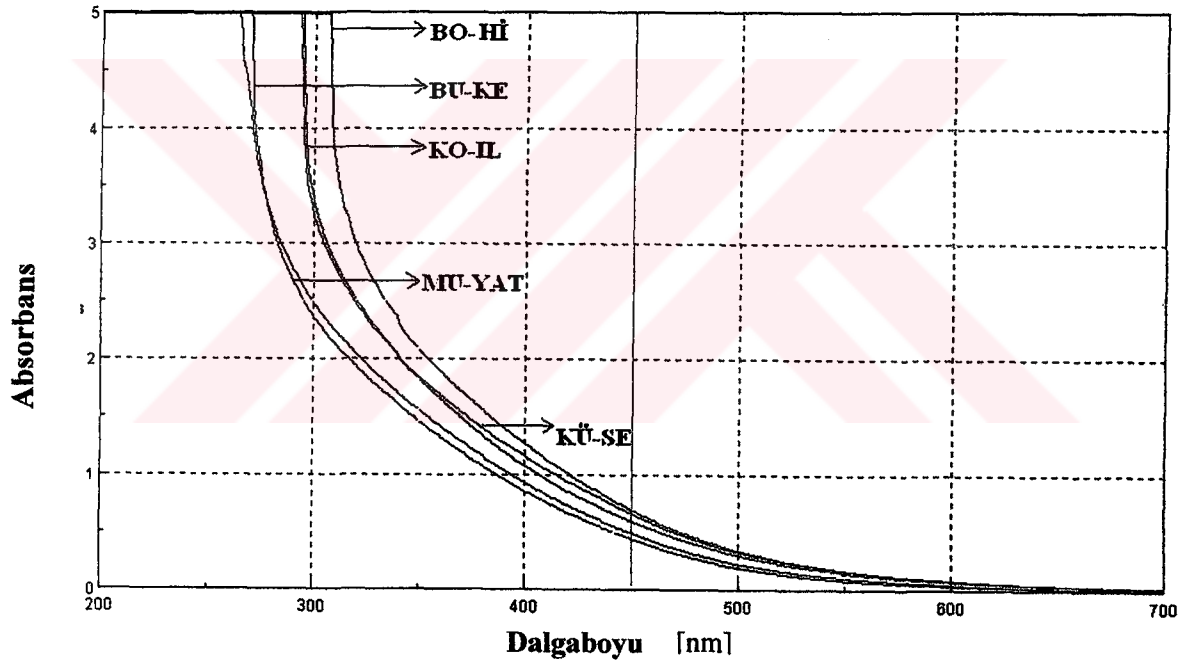
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

6.1 Mikroorganizmanın (*Phanerochaete chrysosporium*) Linyit Numunelerine

Etkisinin Değerlendirilmesi

6.1.1 UV-Vis Spektrofotometresiyle Kömür Çözünürlüğünün Tayini

Linyit numunelerinden ve hümik asidlerden elde edilen sıvı ürünlerin absorbands grafikleri sırasıyla Şekil 6.1'de, 450 nm'de belirlenen absorbands değerleri ise Çizelge 6.1'de verilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, Bolu-Himmetoğlu linyitinin mikroorganizma etkisi sonucunda en yüksek sıvılaştırma verimi gösterdiği tespit edildi. Kullanılan linyit numunelerinin biyosıvılaştırma verimleri sırasıyla Bolu-Himmetoğlu, Kütahya-Seyitömer, Konya-Ilgın, Muğla-Yatağan ve Bursa-Kestelek olarak belirlendi.



Şekil 6.1 Mikroorganizma etkisiyle linyitlerden elde edilen sıvı ürünlerin UV-Vis spektrumları

Çizelge 6.1 Linyitlerden elde edilen sıvı ürünlerin 450 nm'deki çözünürlük değerleri

Numuneler	Absorbans Değerleri
Bolu-Himmetoğlu linyiti	0.70006
Bursa-Kestelek linyiti	0.45023
Kütahya-Seyitömer linyiti	0.66867
Konya-Ilgın linyiti	0.60292
Muğla-Yatağan linyiti	0.50006

6.1.2 Ham ve Oksidlendirilmiş Linyit Numunelerinin FTIR Spektrumları

Deneyleerde kullanılan ham linyit numuneleri ve bu numunelerin nitrik asitle (8 M HNO₃) oksidasyonu sonrasında elde edilen oksidlendirilmiş numunelerin FTIR analizleri yapılmış ve sonuçlar kıyaslanmıştır. Bu spektrumlar, Şekil 6.2-6.6'de verilmektedir.

Ham linyitler incelendiğinde 3620, 3699, 3697, 3620, 3851, 3901 cm⁻¹'de bandların oluştuğu gözlenmiştir. Bu bandlar yapıda kaolinit gibi minerallerden kaynaklanan kil safsızlıklarının bulunduğunu göstermektedir.

3420, 3401, 3436, 3429, 3401 cm⁻¹'de oluşan bandlar nem ya da kristal bağlı sudan kaynaklanan hidroksil veya fenolik bileşiklerden kaynaklanan -OH gerilmesini göstermektedir.

2924, 2923, 2921, 2923, 2852 cm⁻¹'de oluşan bandlar alifatik hidrokarbon ve doymuş alifatik siklik hidrokarbonlardan kaynaklanan -CH₂ grubuna bağlı simetrik ve asimetrik C-H gerilme titreşimini göstermektedir (alifatik yapılar).

Bazı linyitlerde görülen 2345 ve 2346 cm⁻¹'de oluşan bandlar ortamdaki CO₂'den ileri gelmektedir.

1615, 1614, 1618, 1621 ve 1625 cm⁻¹'de meydana gelen bandlar aromatik halkalı yapıya bağlı C=C gerilme titreşimlerini göstermektedir (aromatik yapılar).

Muğla ve Bursa linyitlerinde görülen 1416 ve 1436 cm⁻¹'de görülen bandlar aromatik C=C halka gerilmelerini göstermektedir. 1430 - 1420 cm⁻¹'de oluşan bandlar ise ligninde bulunan aromatiklerin absorblanmasından kaynaklanmaktadır (Guo ve Bustin, 1998).

Bolu, Bursa, Seyitömer ve Konya linyitlerinde görülen ve 1384 cm⁻¹'de oluşan band, yapıda simetrik deformasyonu şeklindeki metilen gruplarının (-CH₃) bulunduğunu göstermektedir.

1035, 1041, 1033, 1038, 1032, 1034 cm⁻¹'de görülen bandlar, alifatik eter (-C-O-) ya da alifatik alkollerden kaynaklanan C-O titreşimini gösterir ki bu bandlar yapıda alifatik yapıların bulunduğuna işaret etmektedir. Ayrıca bu bantların kil safsızlıklarından kaynaklanan Si-O titreşimlerine de işaret ettiği belirtilmektedir.

3696, 3620, 1094, 1011, 915, 540 cm⁻¹'de oluşan bandlar mineral madde özellikle kaolinitten kaynaklanan Si-O bükülme ve gerilme titreşimlerini, 470 cm⁻¹ civarında oluşan band ise yapıda pirit varlığını göstermektedir. 1153, 660, 600 cm⁻¹'de oluşan bandlar ise kalsiyum sülfattan kaynaklanmaktadır.

700-900 cm^{-1} 'de oluşan bandlar aromatik ve yoğun aromatik sistemlerdeki aromatik C-H bükülme titreşimlerine işaret etmektedir. 750-700 cm^{-1} 'de oluşan band her bir halkada yer alan 4 komşu aromatik hidrojenin varlığını göstermektedir (aromatik yapıların varlığı) (Berkowitz, 1985; Guo ve Bustin, 1998; Butuzova vd., 1998; Alvarez vd., 2003; Martyniuk vd., 2003; Li vd., 2004; Perez vd., 2004; Kurkova vd., 2004).

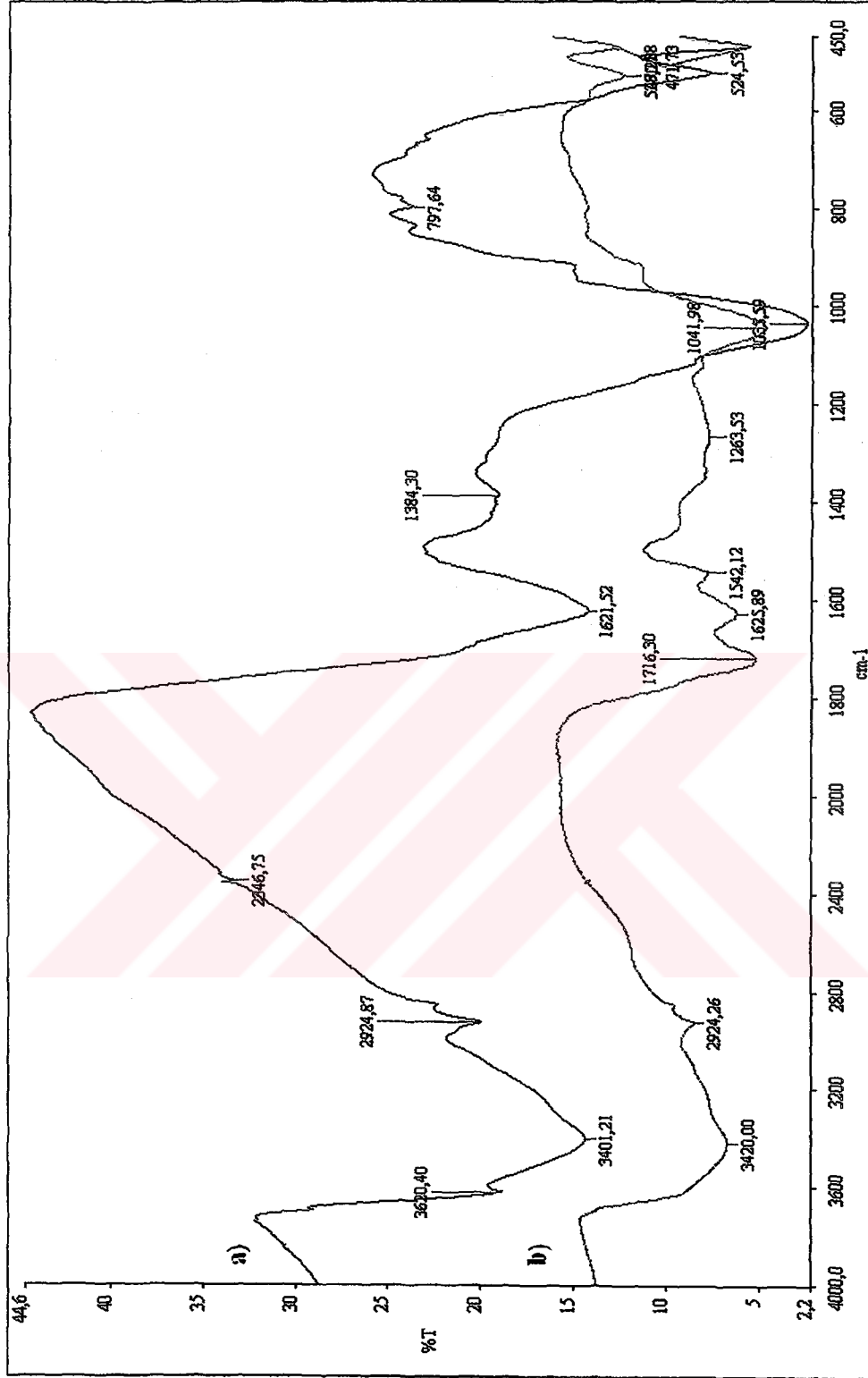
Çizelge 6.2 FTIR spektrumlarında oluşan bandlar ve gösterdikleri fonksiyonel gruplar

(Guo ve Bustin, 1998)

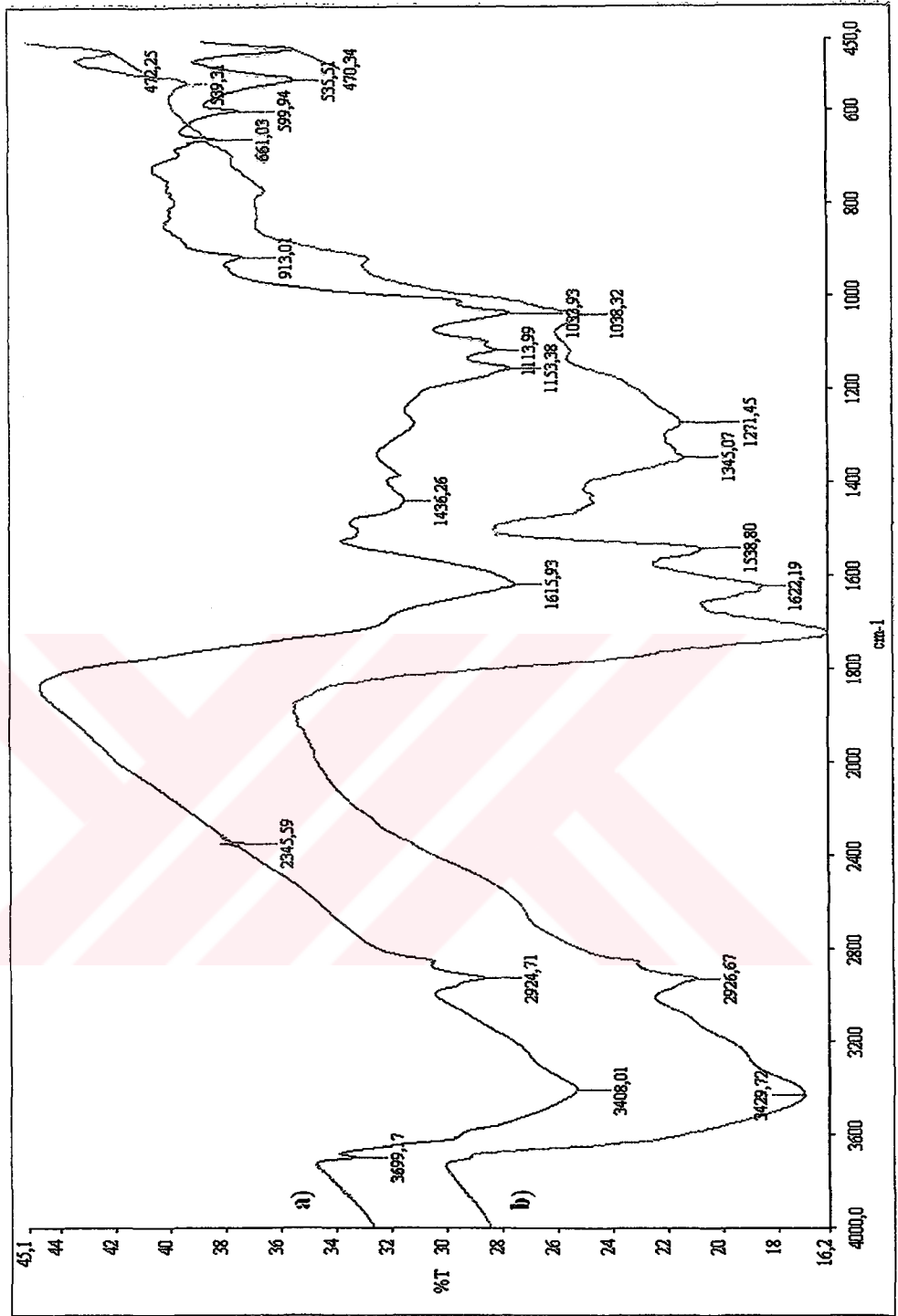
Bandlar (cm^{-1})	Fonksiyonel Gruplar
3400-3320	-OH gerilmesi
3050-3030	Aromatik CH gerilmesi
3000-2800	Alifatik CH gerilmesi
1700	Aromatik karbonil/ karboksil C=O gerilmesi
1610-1560	Aromatik C=C halka gerilmesi
1510	Aromatik C=C halka gerilmesi
1450	Alifatik CH deformasyonu
1430-1420	Aromatik C=C halka gerilmesi
1370-1360	Alifatik CH ₃ deformasyonu
1317-1315	Alifatik CH ₂ deformasyonu
1270-1250	Aromatik CO- ve fenolik -OH gerilmesi
1060-1030	Alifatik eter C-O- ve alkol C-O gerilmesi
870	1 komşu H deformasyonu / izole hidrojenli benzen halkası, aromatik halkalardaki C-H
810	2 komşu H deformasyonu / Her bir halkada yer alan 2 komşu aromatik hidrojen
780-770	3 komşu H deformasyonu / Her bir halkada yer alan 3 komşu aromatik hidrojen
750	4 komşu H deformasyonu/ Her bir halkada yer alan 4 komşu aromatik hidrojen

Nitrik asit okidasyonu ardından tüm numunelerde 1540 cm^{-1} civarında ($1540, 1542, 1538, 1549\text{ cm}^{-1}$) ve 1720 cm^{-1} civarında ($1716, 1721, 1718, 1720\text{ cm}^{-1}$) bandların oluştuğu gözlenmiştir. 1540 cm^{-1} 'de oluşan band, aromatik halkaların nitratasyonu ile oluşan $\text{N}=\text{O}$ asimetric gerilmelerden kaynaklanmaktadır. 1720 cm^{-1} 'de oluşan band ise oksidasyon sonucunda oluşan karboksil / karbonil gruplarından kaynaklanan $\text{C}=\text{O}$ gerilme titreşimlerini göstermektedir. Oksidasyon sonrasında Bolu, Bursa ve Konya linyitlerinde 1264 cm^{-1} 'de bandların oluştuğu gözlenmiştir. $1275\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ aralığı hem aromatik eterlerin (C-O-C) asimetric gerilme, hem de fenollerini içeren C-O titreşimlerinin absorpsiyonudur.



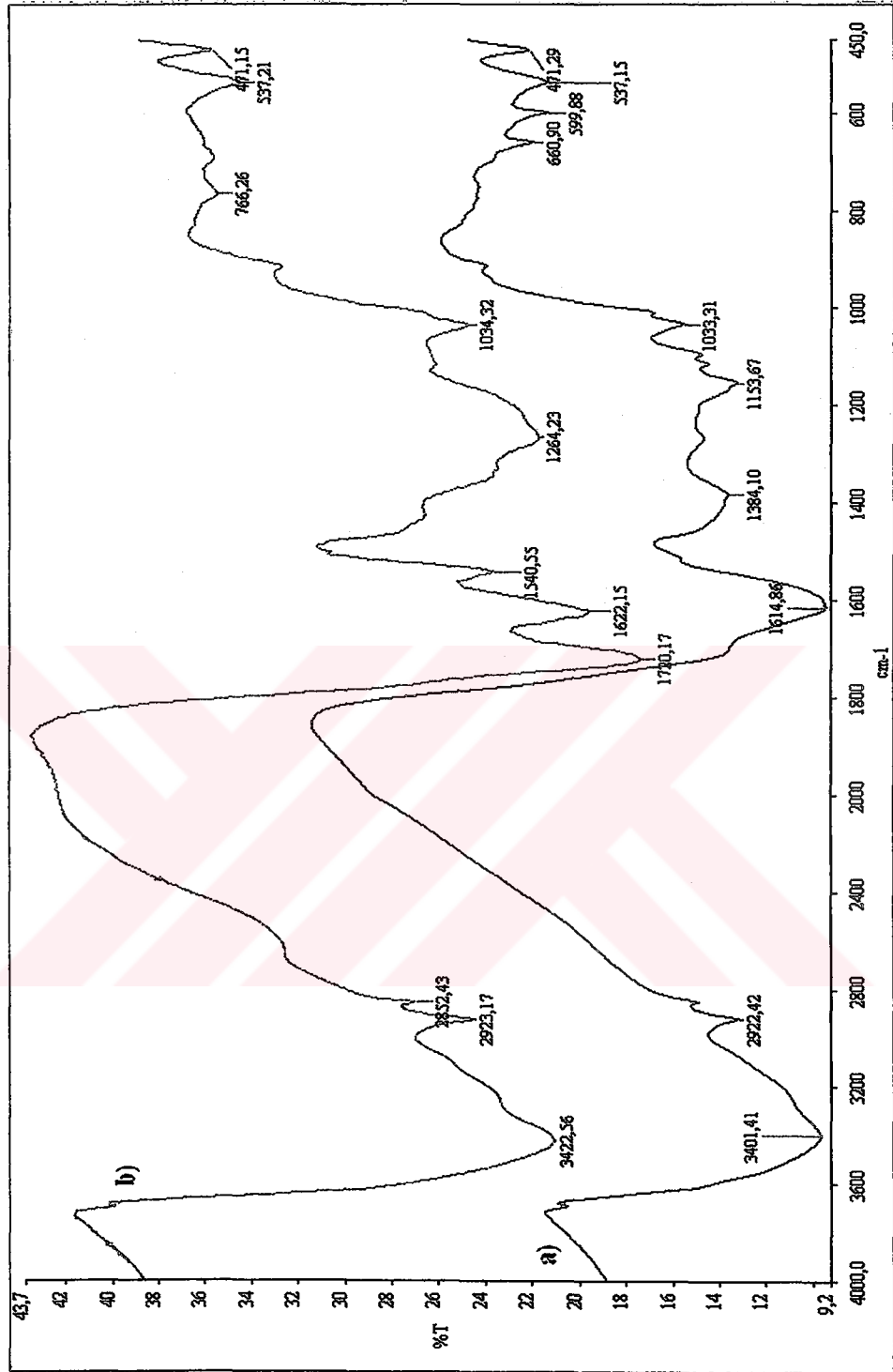


Şekil 6.2 Bolu-Himmetoğlu linyitinin FTIR spektrumu
a) Oksidasyon öncesi b) Oksidasyon sonrası



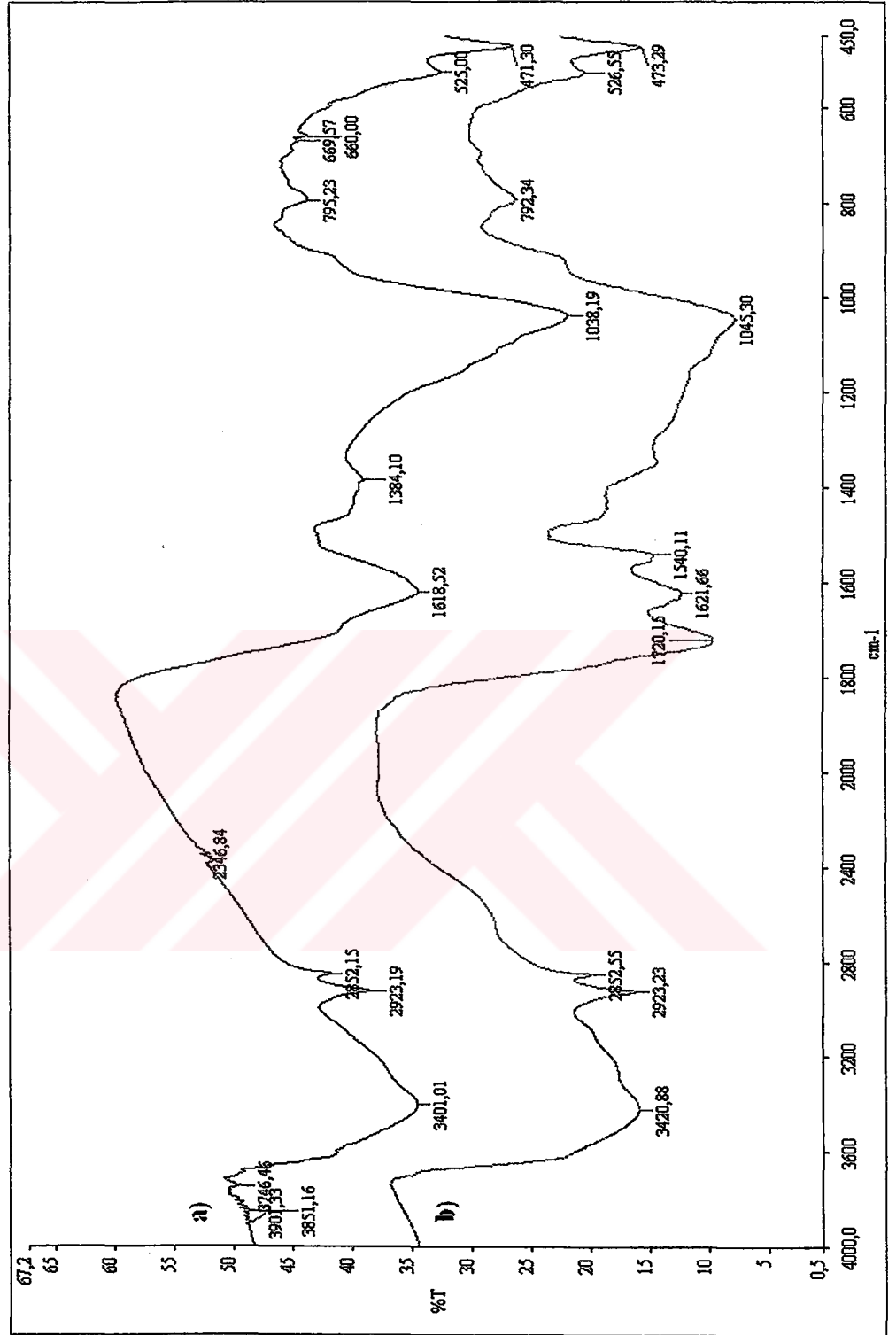
Şekil 6.3 Bursa-Kestelek linyitinin FTIR spektrumu

a) Oksidasyon öncesi b) Oksidasyon sonrası



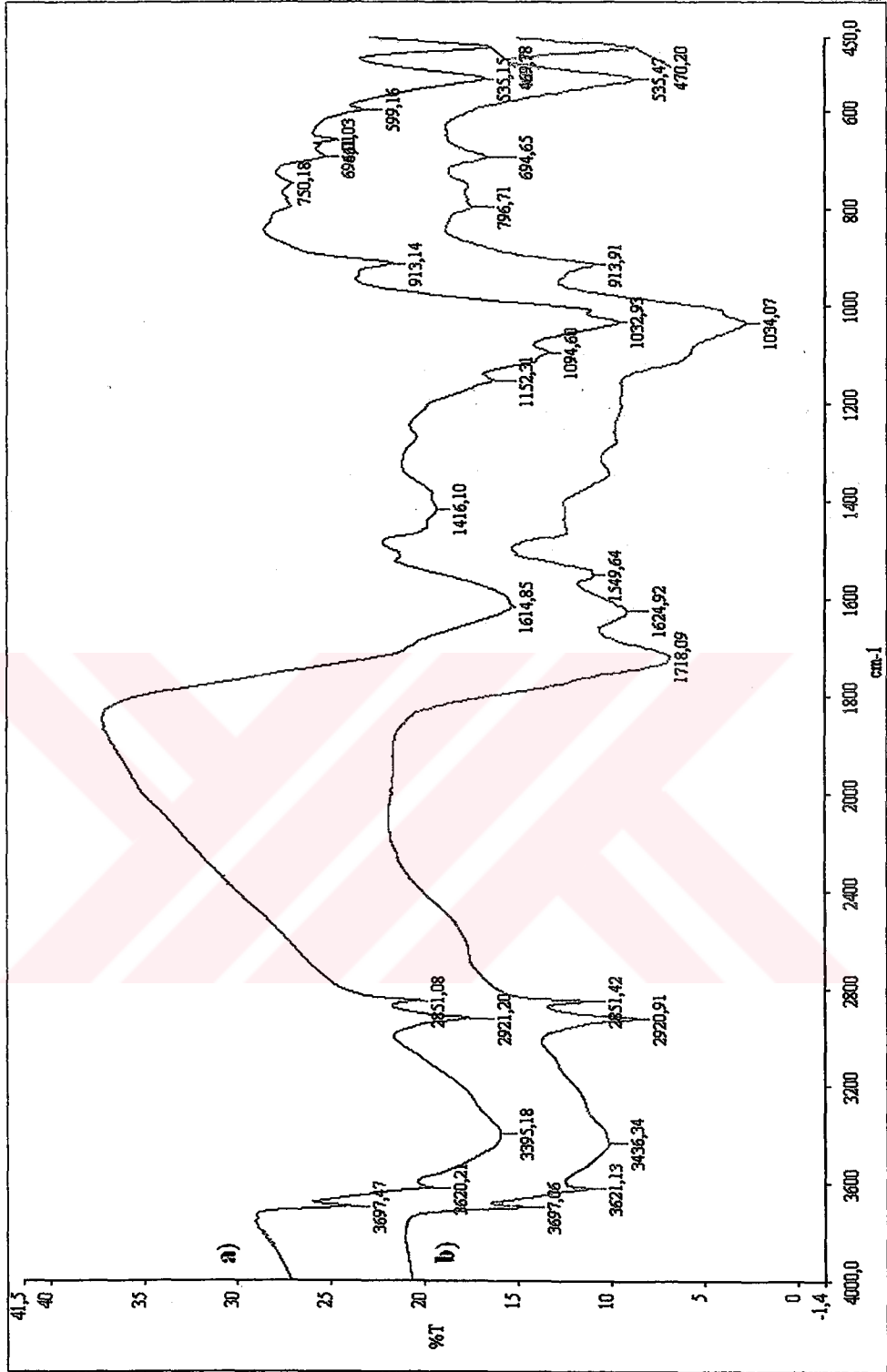
Şekil 6.4 Konya-Ilgın linyitinin FTIR spektrumu

a) Oksidasyon öncesi b) Oksidasyon sonrası



Şekil 6.5 Kütahya-Seyitömer linyitinin FTIR spektrumu

a) Oksidasyon öncesi b) Oksidasyon sonrası



Şekil 6.6 Muğla-Yatağan linyitinin FTIR spektrumu

a) Oksidasyon öncesi b) Oksidasyon sonrası

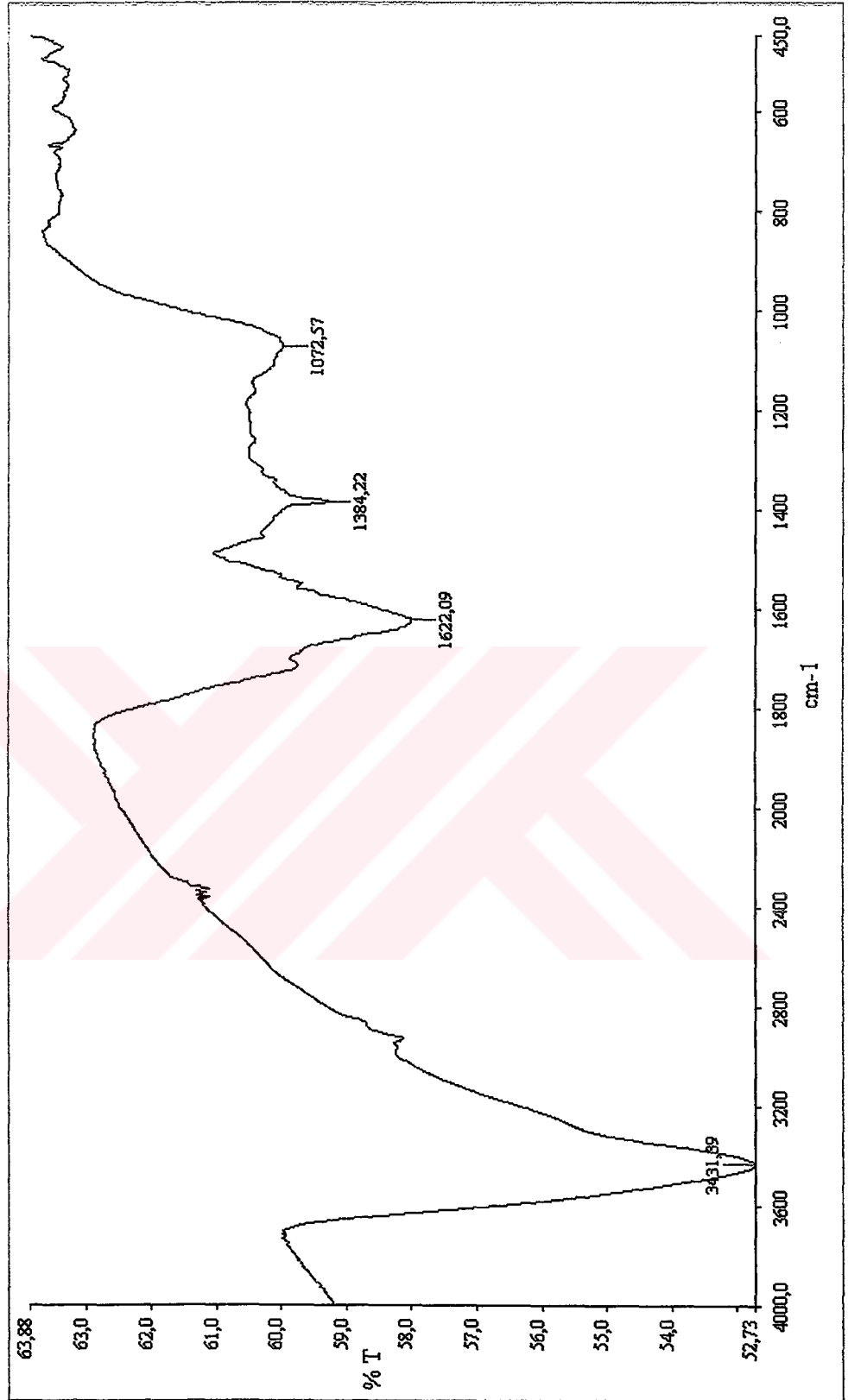
6.1.3 Mikroorganizma Etkisiye Oluşan Sıvı Ürünlerin (Çözelti ve Çökelti) FTIR

Spektrumları

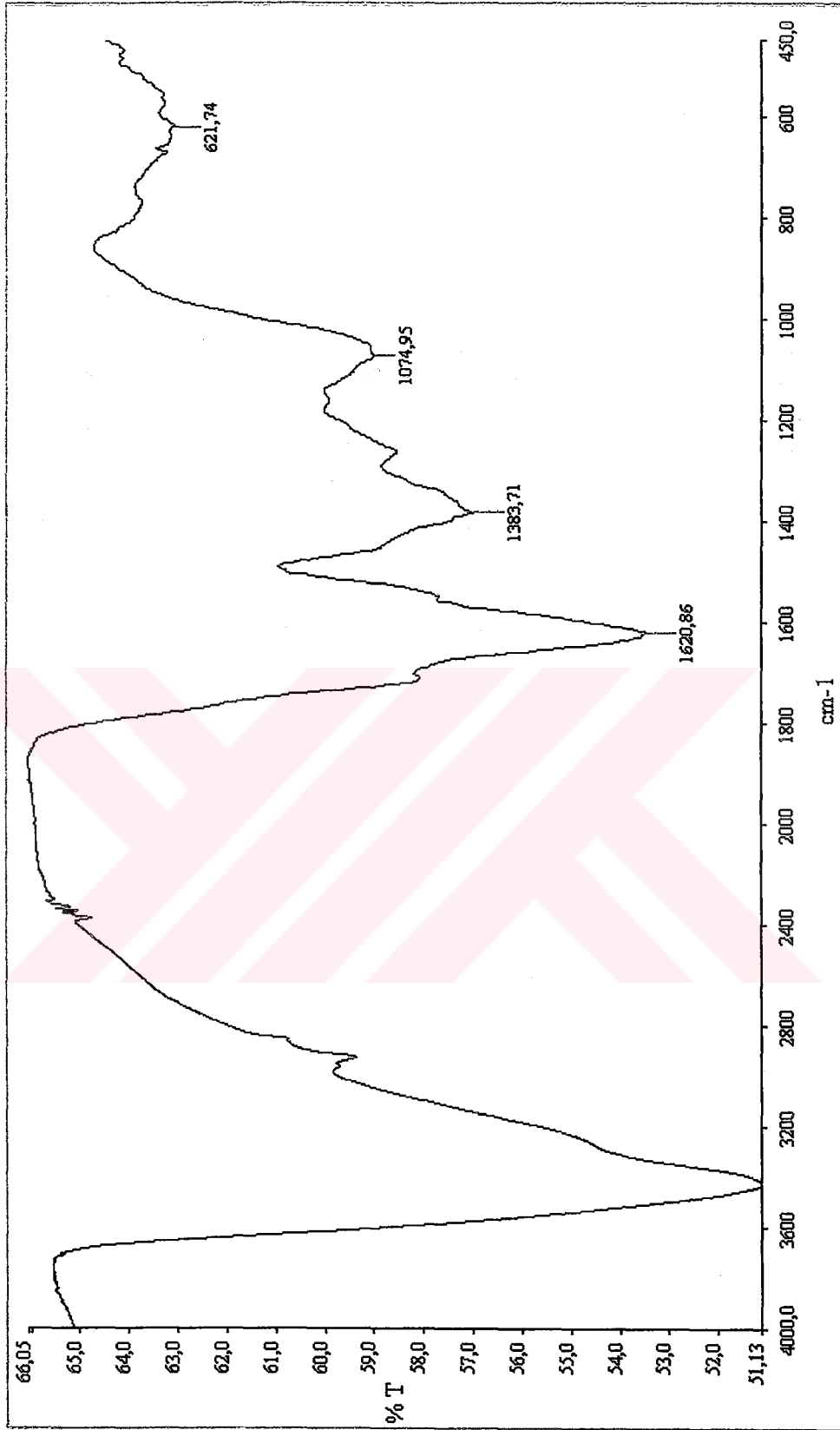
Nitrik asitle (8 M HNO₃) oksidlendirilmiş linyitlere mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünlerin santrüfüjleme sonrasında ele geçen çözelti kısımlarının FTIR spektrumları Şekil 6.7-6.11'de verilmektedir.

Tüm ürünlerde beş temel yapının mevcut olduğu gözlenmiştir. 3420 cm⁻¹'de oluşan band suya bağlı hidroksil ya da fenolik -OH gruplarının yapıda bulunduğunu göstermektedir. 2927 cm⁻¹'de oluşan band yapılarında az miktarda alifatik hidrokarbonların varlığına işaret etmektedir. 1620, 1622, 1627, 1628 cm⁻¹'de meydana gelen bandlar aromatik halkalı yapılardan kaynaklanan C=C gerilme titreşimlerini göstermektedir. 1384 cm⁻¹'de oluşan band, metilen gruplarının varlığına işaret etmektedir. 1072 cm⁻¹'de oluşan band, alifatik C-O-C gerilmelerini ya da Si-O gerilmelerine işaret etmektedir. FTIR analizlerinde oluşan sıvı ürünlerin çözelti kısımlarının hemen hemen aynı fonksiyonel grupları içerdiğini göstermektedir.

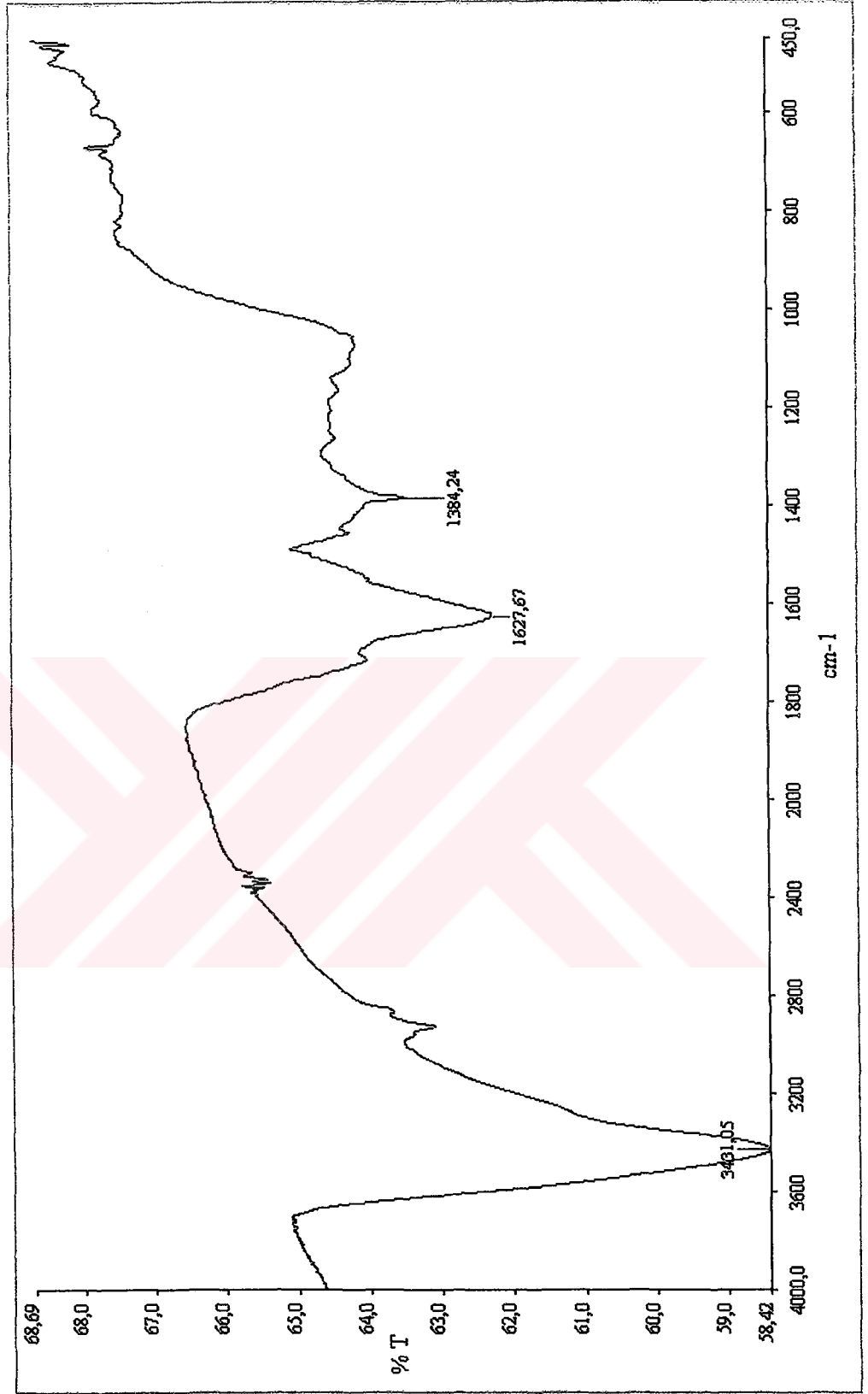
Şekil 6.12-6.16'da ise sıvı ürünlerin santrüfüjlenmesi ardından çöken kısımların FTIR spektrumları gösterilmektedir. Spektrumlar mikroorganizmanın nitrik asilde oksidlendirilmiş numunelere etkisi ardından yapıda nitro grupları (N=O, 1540 cm⁻¹) ve karbonil/karboksil gruplarının (C=O, 1720 cm⁻¹) azaldığını göstermektedir. Ayrıca aromatic C-O gruplarını temsil eden bandın mikrobiyal etki sonrasında linyit spektrumlarında kaybolduğu ve alifatik metilen gruplarının çökeltilerde oluştuğu dikkati çekmiştir.



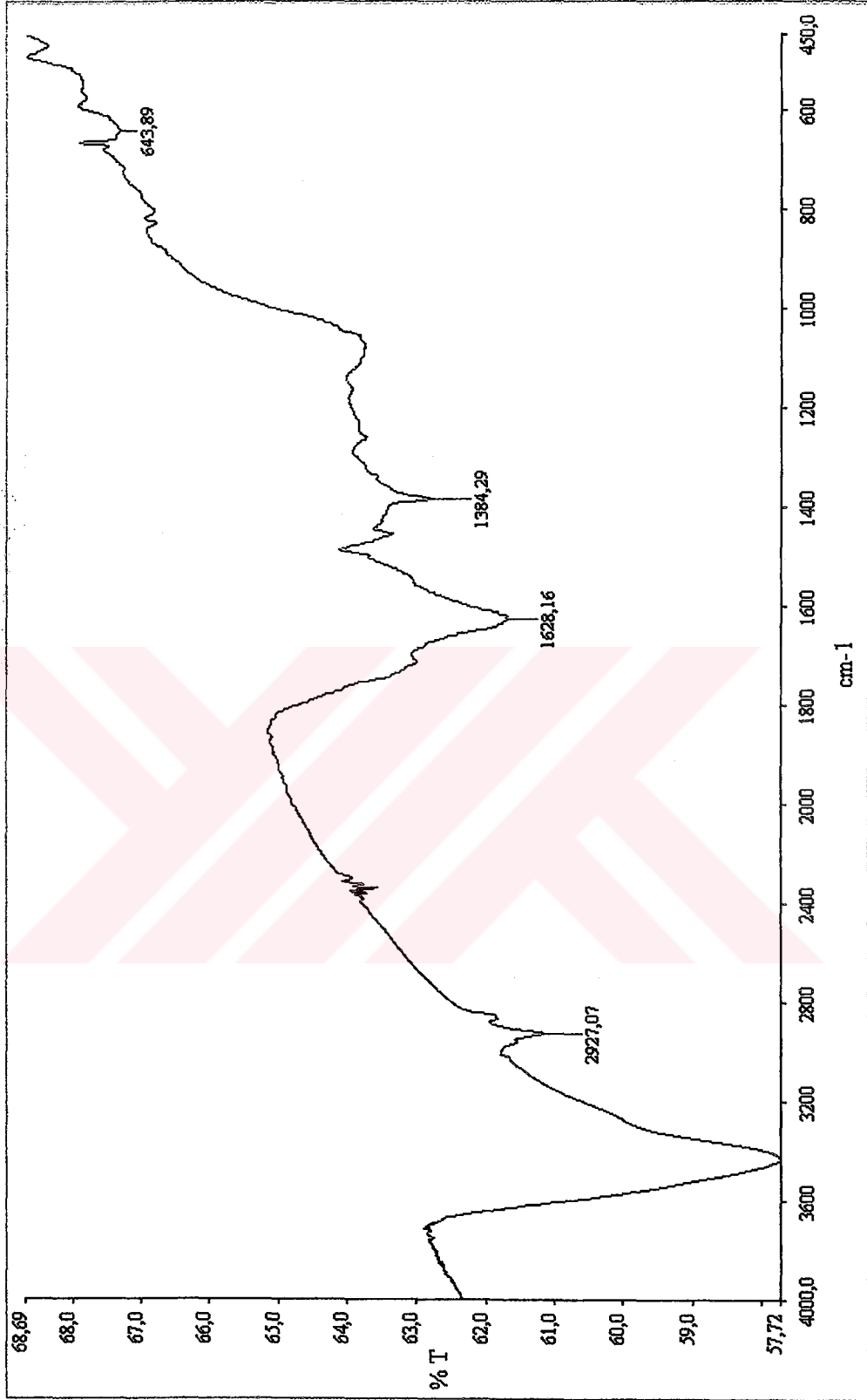
Şekil 6.7 Bolu-Himmetoğlu linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çözelti) FTIR spektrumu



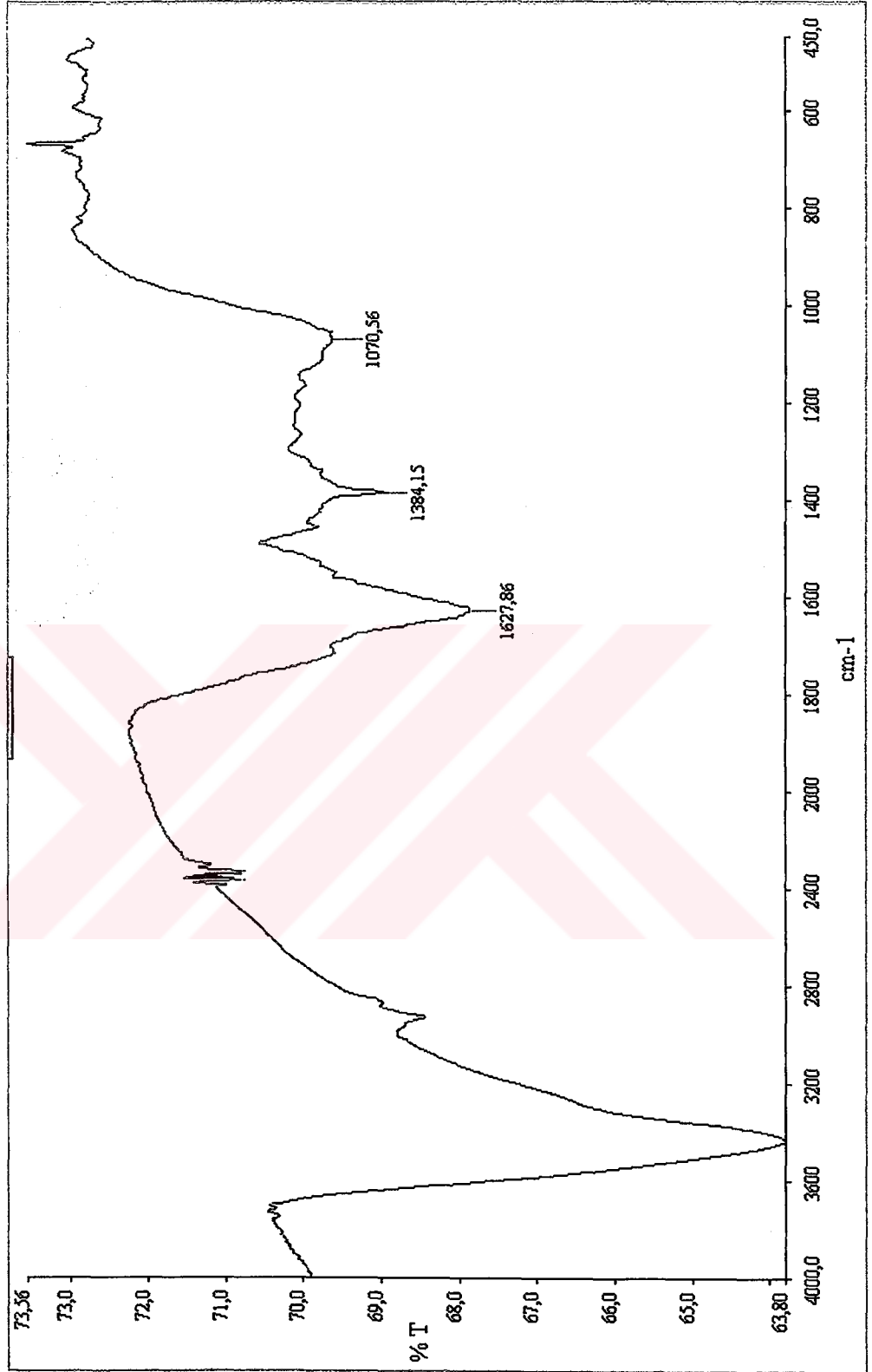
Şekil 6.8 Bursa-Kestelek linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çözelti) FTIR spektrumu



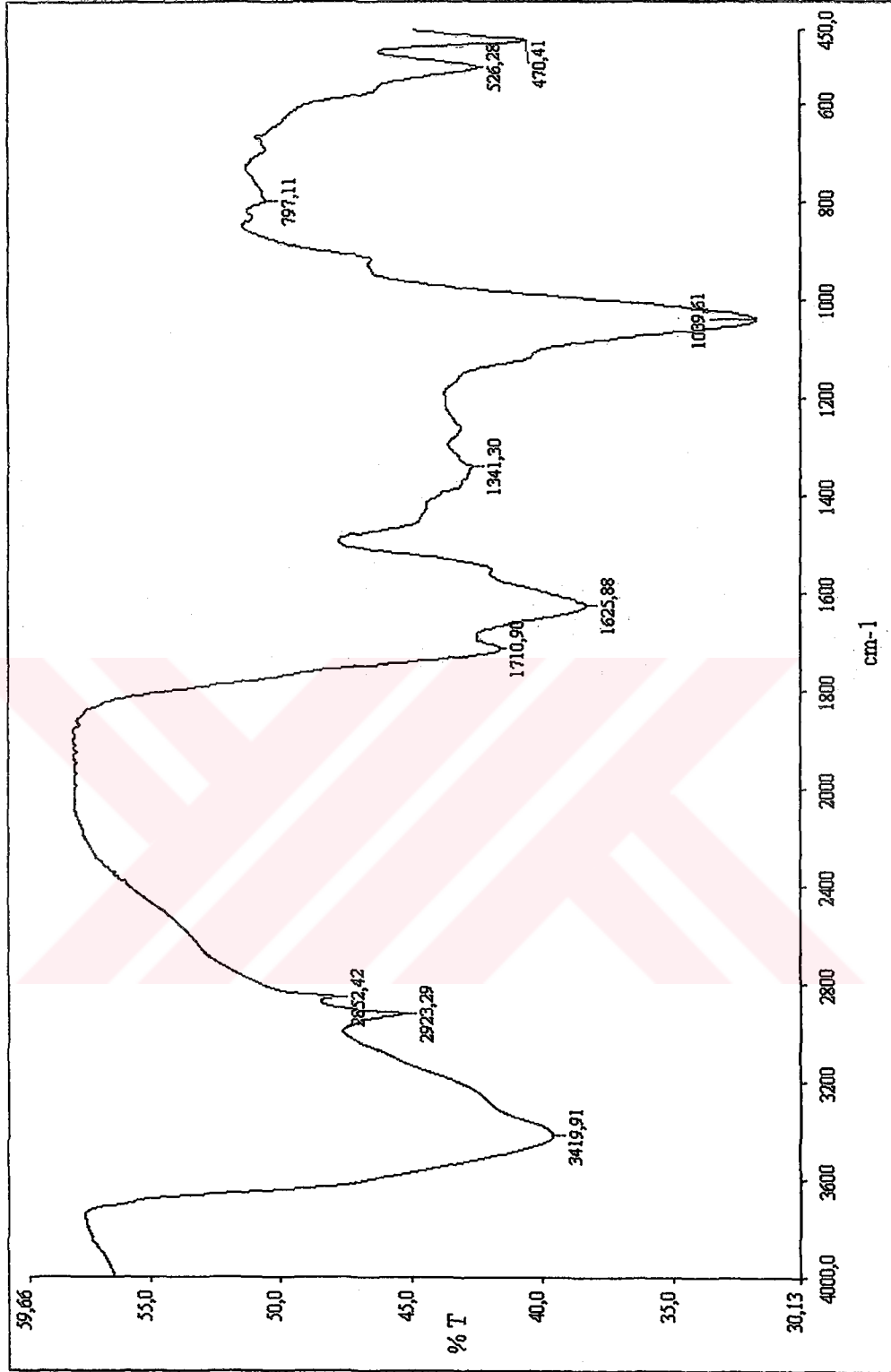
Şekil 6.9 Konya-Ilgın linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çözelti) FTIR spektrumu



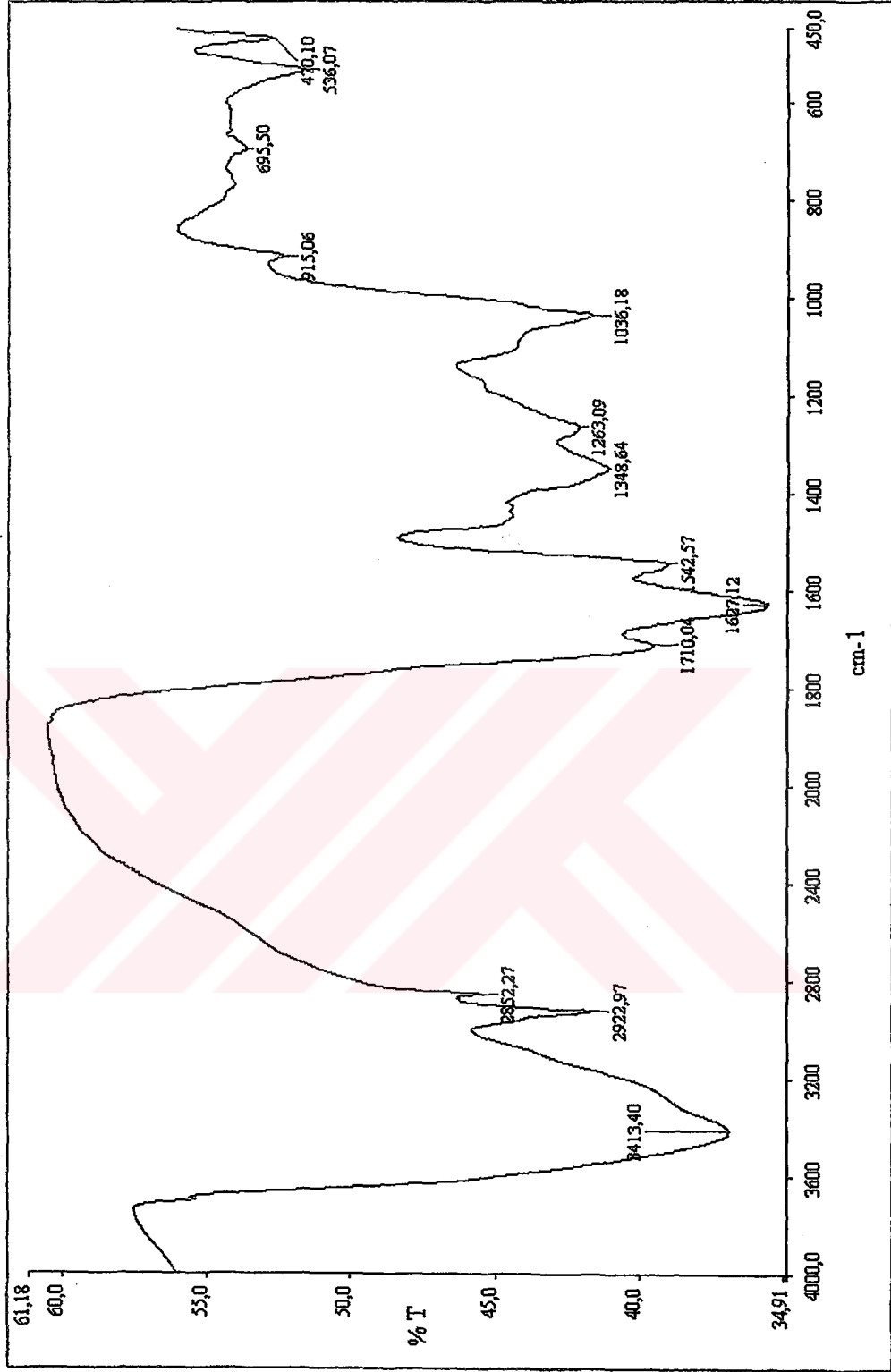
Şekil 6.10 Kütahya-Seyitömer linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çözelti) FTIR spektrumu



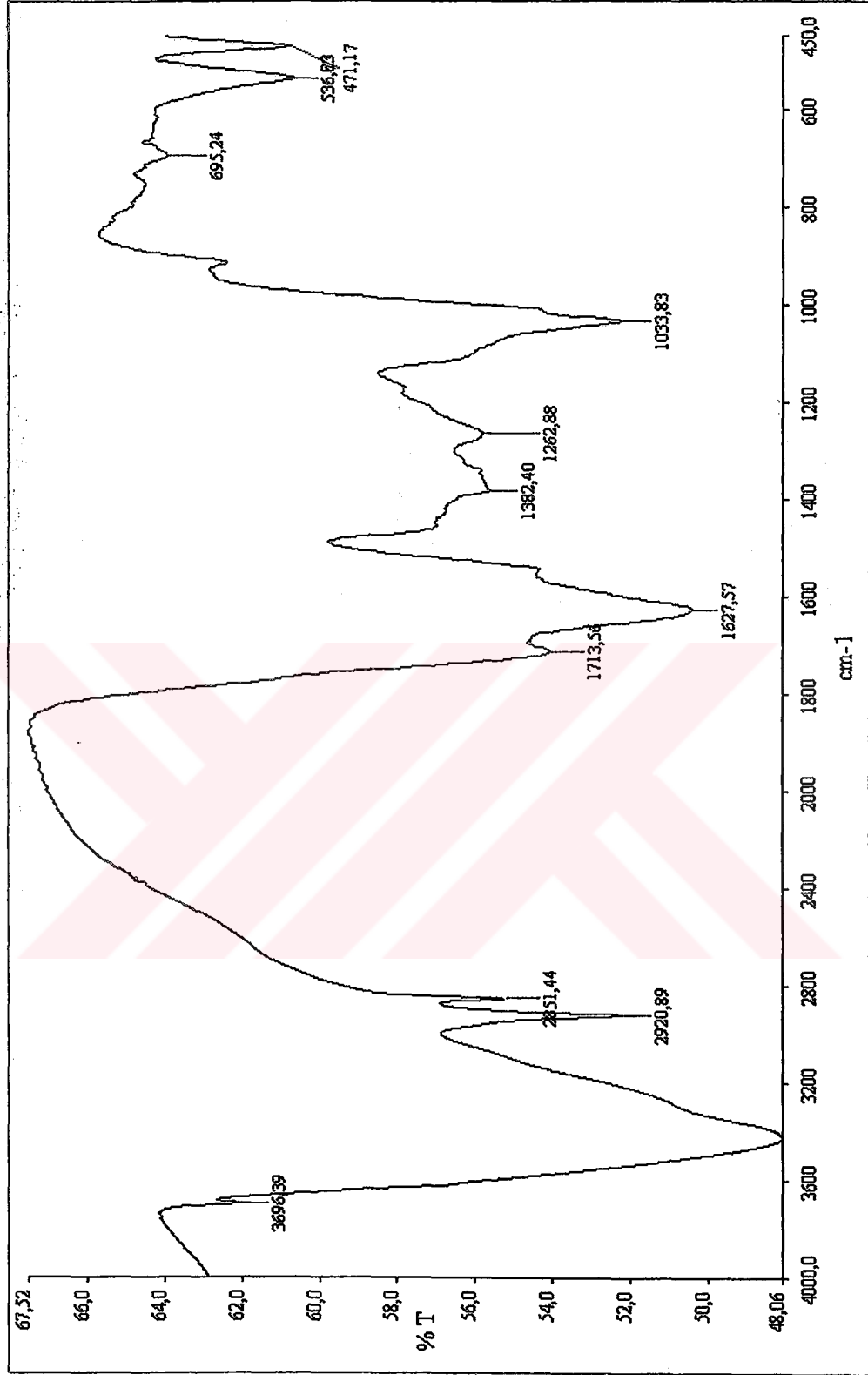
Şekil 6.11 Muğla-Yatağan linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çözelti) FTIR spektrumu



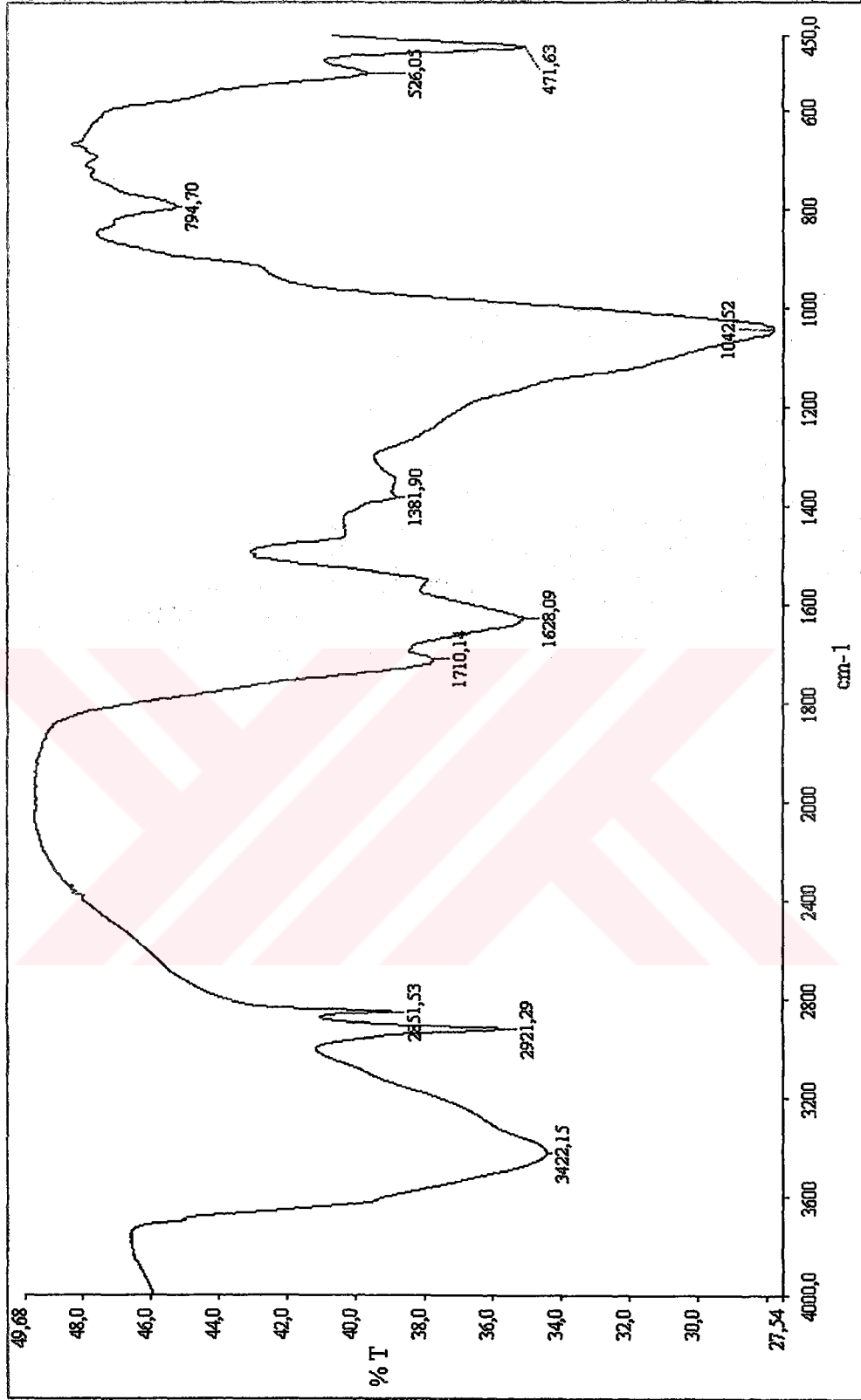
Şekil 6.12 Bolu-Himmetoğlu linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çökelti) FTIR spektrumu



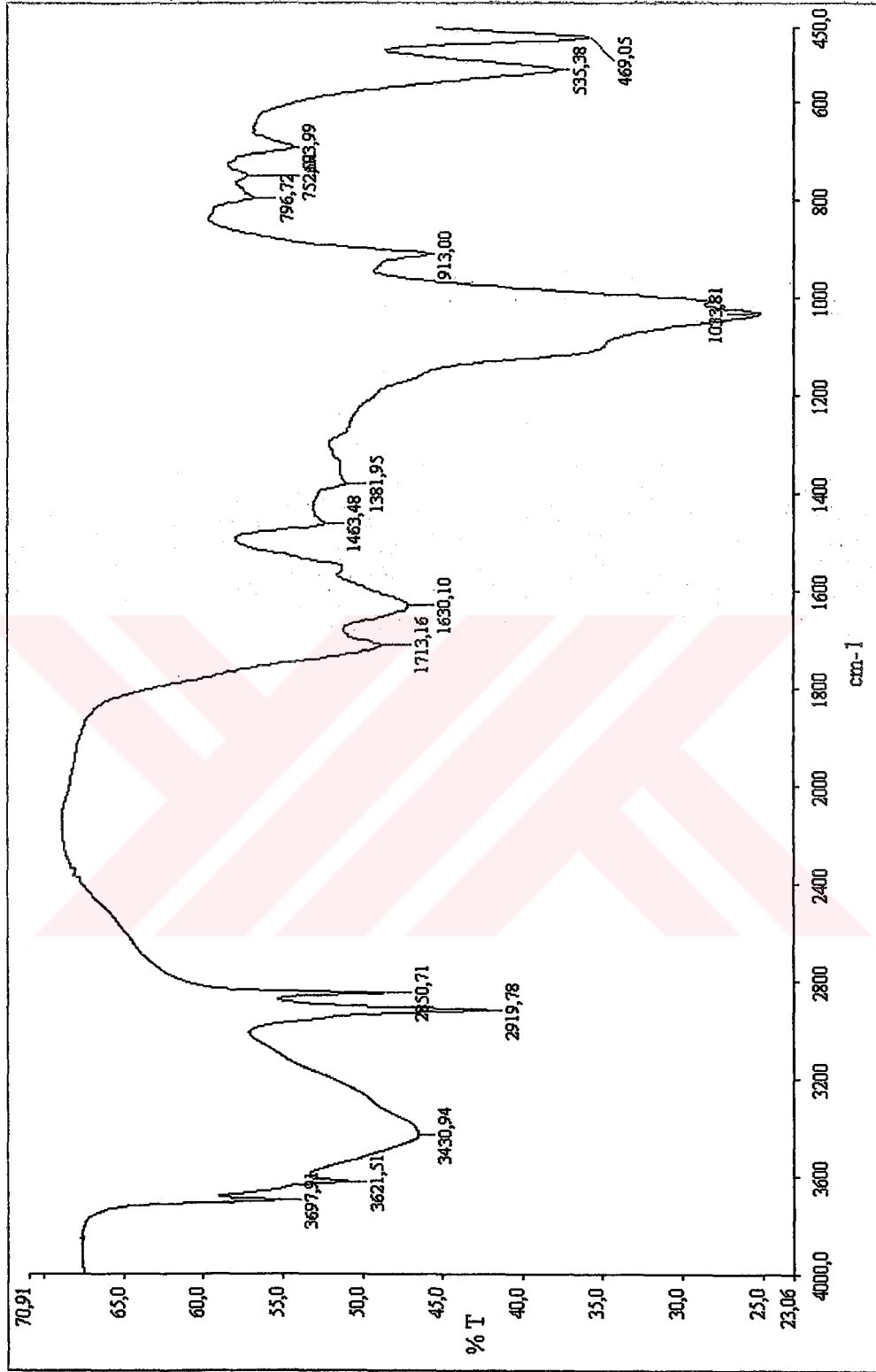
Şekil 6.13 Bursa-Kestelek linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çökelti) FTIR spektrumu



Şekil 6.14 Konya-Ilgın linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çökelti) FTIR spektrumu



Şekil 6.15 Kutahya-Seyitömer linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çökelti) FTIR spektrumu

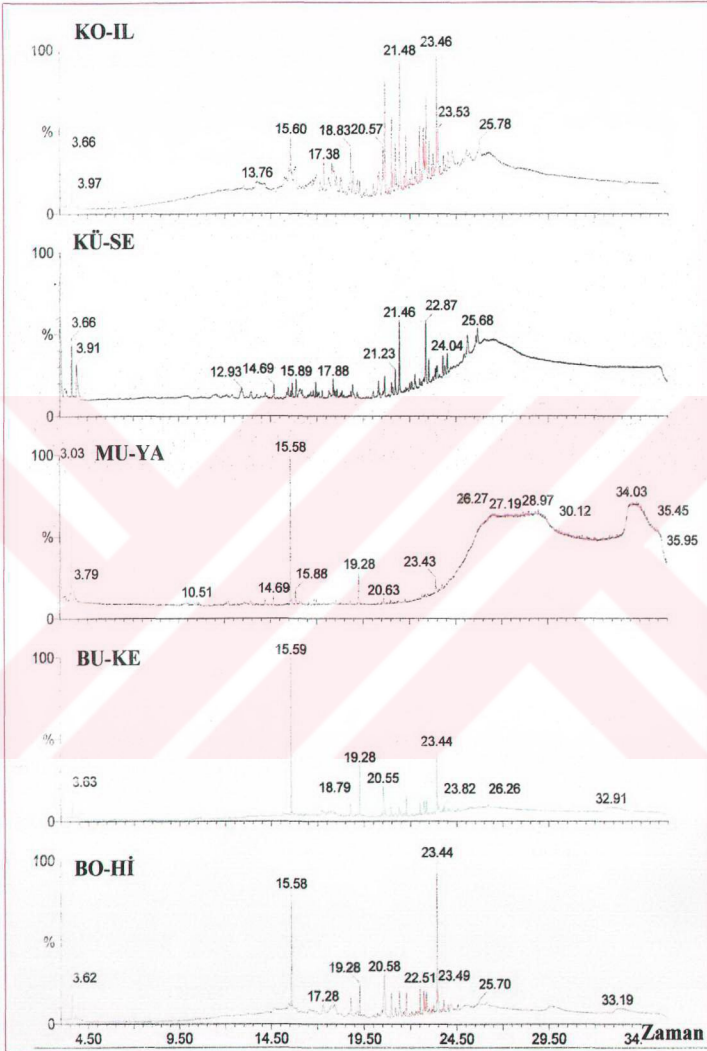


Şekil 6.16 Muğla-Yatağan linyitine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünün (çökelti) FTIR spektrumu

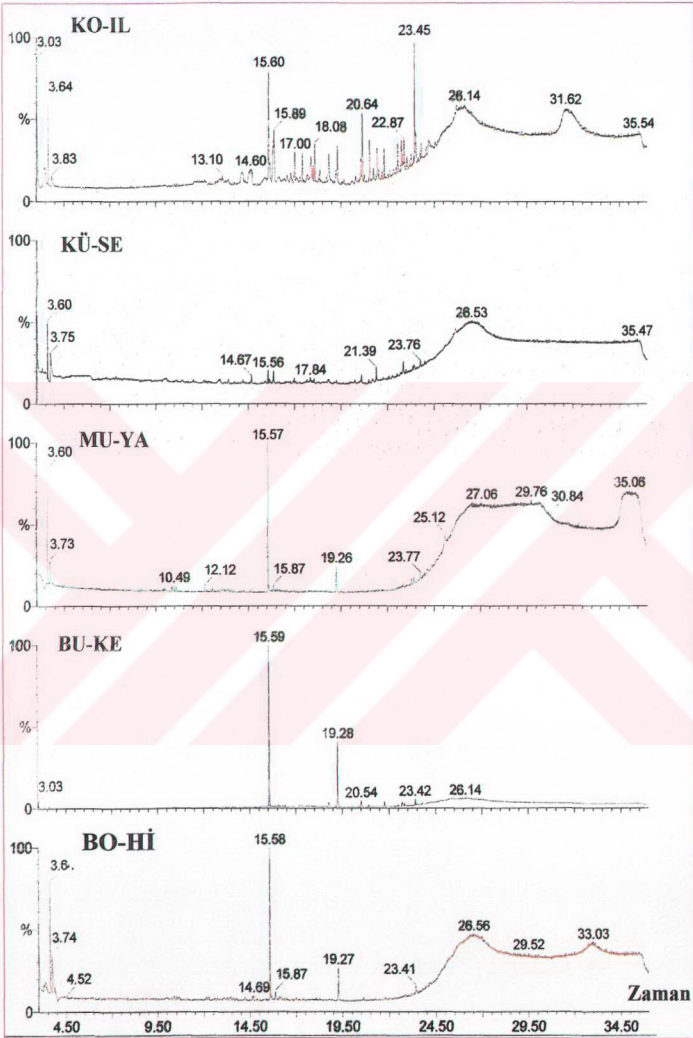
6.1.4 Mikroorganizma Etkisiyle Oluşan Sıvı Ürünlerin GC-MS Kromotogramları

Mikroorganizma etkisi sonucunda oluşan sıvı ürünlerin kimyasal yapıları GC-MS tekniği kullanılarak incelendi. Sıvı ürünlerin kimyasal yapısı, oksidlendirilmiş ve ham linyit numunelerin kimyasal yapıları ile karşılaştırıldı.

Mikrobiyal etkiyle üretilen sıvı ürünlerin GC-MS spektrumları Şekil 6.17'de verilmektedir. Spektrumlarda oluşan pik sayısı göz önünde tutulduğunda asetonda çözünebilen fraksiyonlar bakımından Konya, Bolu ve Kütahya linyitlerinden oluşan sıvılar Muğla ve Bursa linyitinden oluşanlara göre daha fazladır. Oksidlendirilmiş linyitlerin kromotogramlarında ise pik oluşumu dolayısıyla kimyasal madde oluşumu sıvı ürünlerinkine göre çok daha azdır (Şekil 6.18). Ham linyitlerin kromotogramlarında (Şekil 6.19) ise diğer tüm numunelerde görülen ve karakteristik temel pik olarak belirlenen 15.59 ve 19.28 kalma zamanında gözlenen pikler oluşmuştur (Şekil 6.20, Şekil 6.21). 15.59 numaralı pik, 2-propenoic acid, N-tridecyl ester, dodecyl acrylate ve ester türevli maddelere benzer maddelerin varlığına işaret etmektedir 19.28 numaralı pik ise propanoic acid, 3-mercato-, dodecyl ester benzeri bileşiğin yapıda varlığına işaret etmektedir. GC-MS analizleri tüm numunelerde ester yapılı bileşiklerin varlığını göstermektedir. Ham, oksidlendirilmiş ve mikrobiyal etki sonrasında oluşan sıvı ürünlerin asetonda çözünmüş fraksiyonlarının GC-MS kromotogramları her bir linyit numunesi ayrı ayrı alınmış ve incelenmiştir. Kromotogramlardan alınan sonuçlar Çizelge 6.3-6.7'de verilmektedir. Sonuçlar mikrobiyal etkiyle linyitlerden bazı kimyasal maddelerin oluştuğunu ve kömür yapısında yer alan bazı bileşiklerinde depolimerize olduğuna işaret etmektedir.

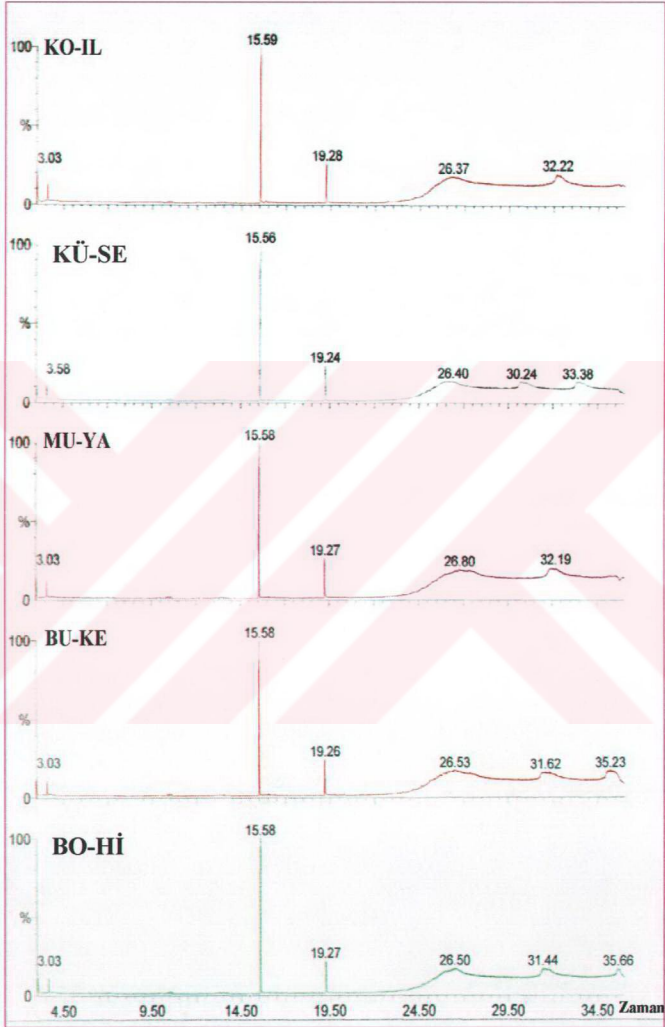


Şekil 6.17 Farklı tipteki linyit numunelerine mikroorganizma etkisi sonucu oluşan sıvı ürünlerin (çözelti) GC-MS kromotogramları

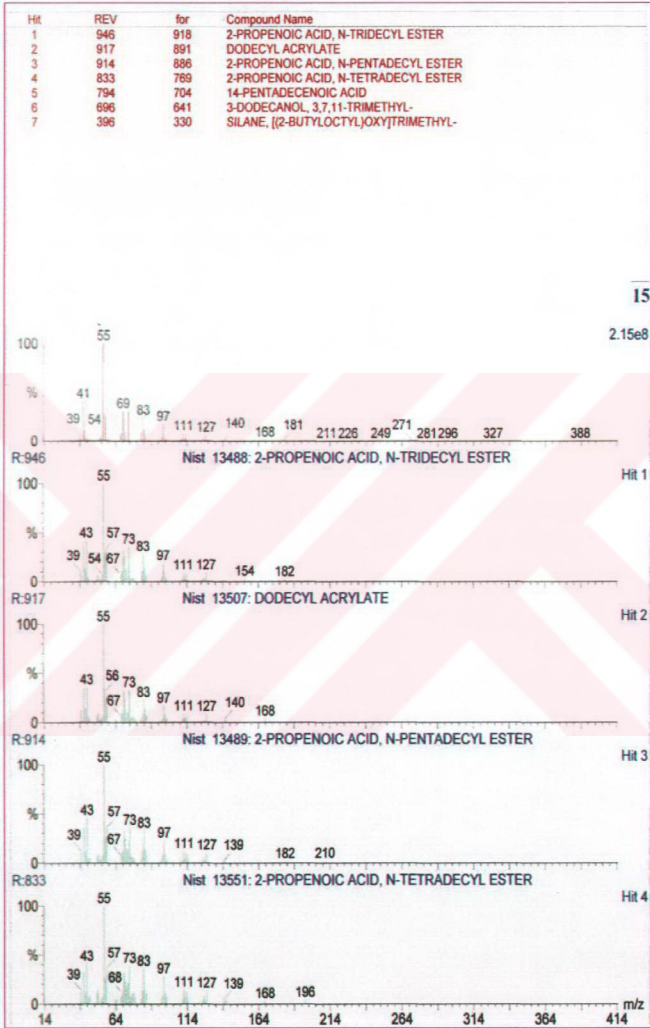


Şekil 6.18 Nitrik asitle (8 M HNO₃) oksidendirilmiş linyit numunelerinin

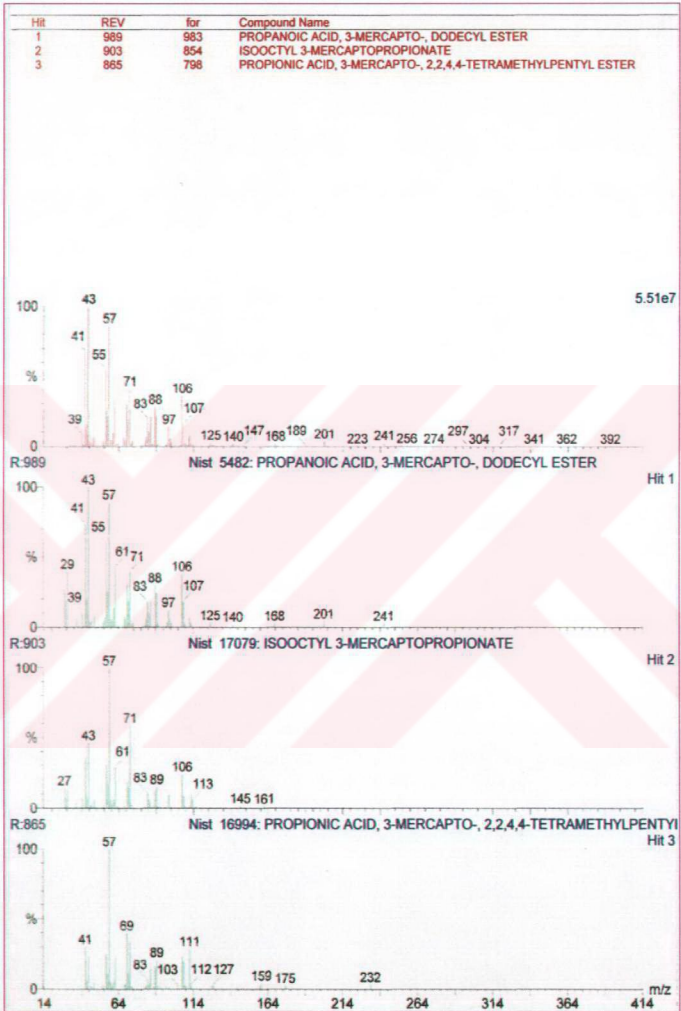
GC-MS kromotogramları



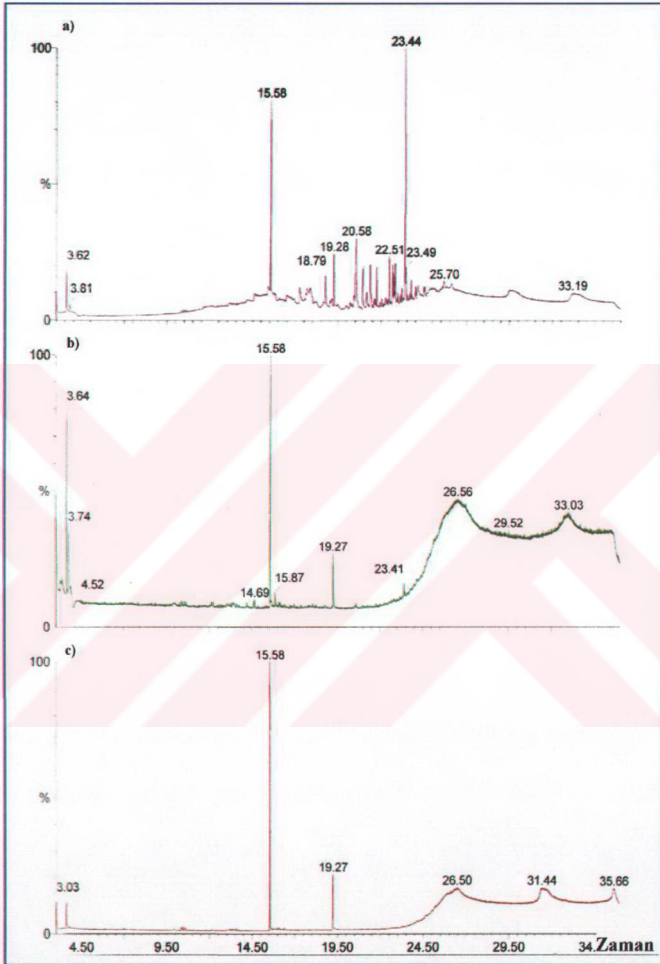
Şekil 6.19 Deneylerde kullanılan ham linyit numunelerinin GC-MS kromotogramları



Şekil 6.20 Tüm numunelerin GC-MS kromotogramlarında gözlenen ve 15.59 “retention time” kalma zamanında oluşmuş temel pike ait kimyasal maddeler



Şekil 6.21 Tüm numunelerin GC-MS kromotogramlarında gözlenen ve 19.28 “retention time” kalma zamanında oluşmuş temel pike ait kimyasal maddeler

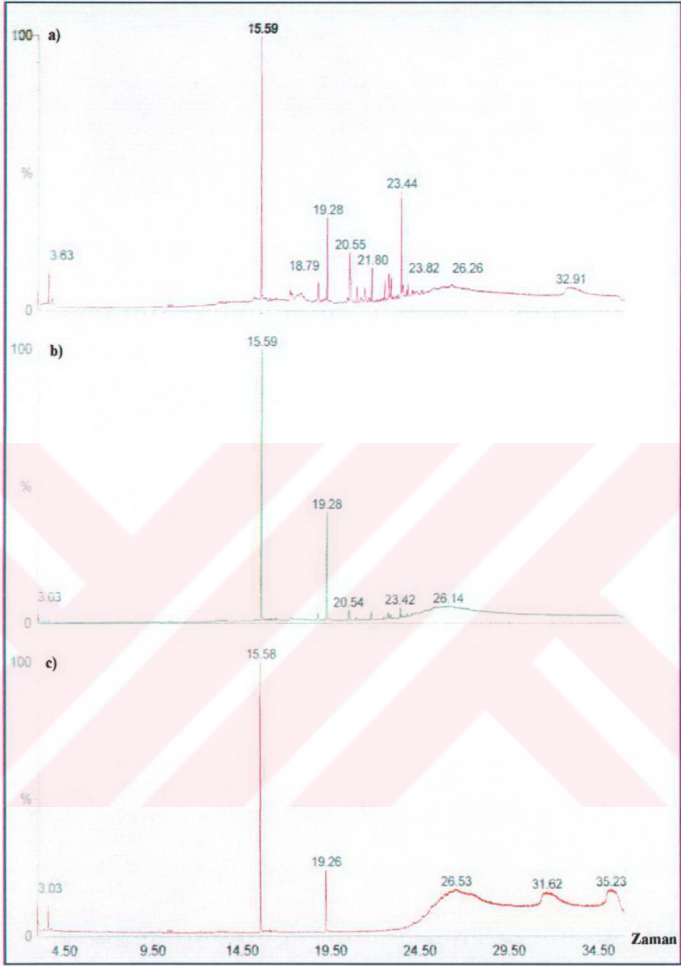


Şekil 6.22 Bolu-Himmetoğlu linyitinin (BO-Hİ) GC-MS kromatogramları

- Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün
- Oksidlendirilmiş linyit
- Ham linyit

Çizelge 6.3 Bolu-Himmetoğlu linyitinin GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar

(m/z) değerleri ve bileşikler	Bolu-Himmetoğlu linyit		
	Sıvı Ürün	Oksidlendirilmiş Numune	Ham Linyit
(43) 1- propane, 2-methoxy-2-propoxy- M_A : 132 $C_7H_{16}O_2$ 2- butanamide, 2-hydroxy-n,2,3,3-tetramethy M_A :159 $C_8H_{17}O_2N$	+	+	+
(55) 1- 2-propenoic acid, n-tridecyl ester M_A :254 $C_{16}H_{30}O_2$ 2- 2-propenoic acid, n-pentadecyl ester M_A :282 $C_{18}H_{34}O_2$ (32,57)	+	+	+
1- propanoic acid, 3-mercaptop-, dodecyl est. M_A : 274 $C_{15}H_{30}O_2S$ 2- isooctyl 3-mercaptopropionate M_A : 218 $C_{11}H_{22}O_2S$ (59)	+	+	-
1- propanedioic acid, methyl-, dimethylester M_A :146 $C_6H_{10}O_4$ 2-oxirane, 2-ethyl-3-propyl-, trans- M_A :114 $C_7H_{14}O$ (63, 78)	-	+	-
1- dimethyl sulfoxide M_A :78 C_2H_6OS (73)	+	-	-
1- octasiloxane M_A :578 $C_{16}H_{50}O_7Si_8$ (85)	-	-	-
1- 2(3H)-furanone, dihydro-5-tetradecyl- M_A :282 $C_{18}H_{34}O_2$ 2- 2(3H)-furanone, 5-dodecylidihydro- M_A :254 $C_{16}H_{30}O_2$ (91)	+	-	-
1- azetidine, 1-benzyl-3,3-dimethyl-2-phenyl M_A :251 $C_{18}H_{21}N$ 2- dibenzyl ketoxime M_A :225 $C_{15}H_{15}ON$	+	-	-

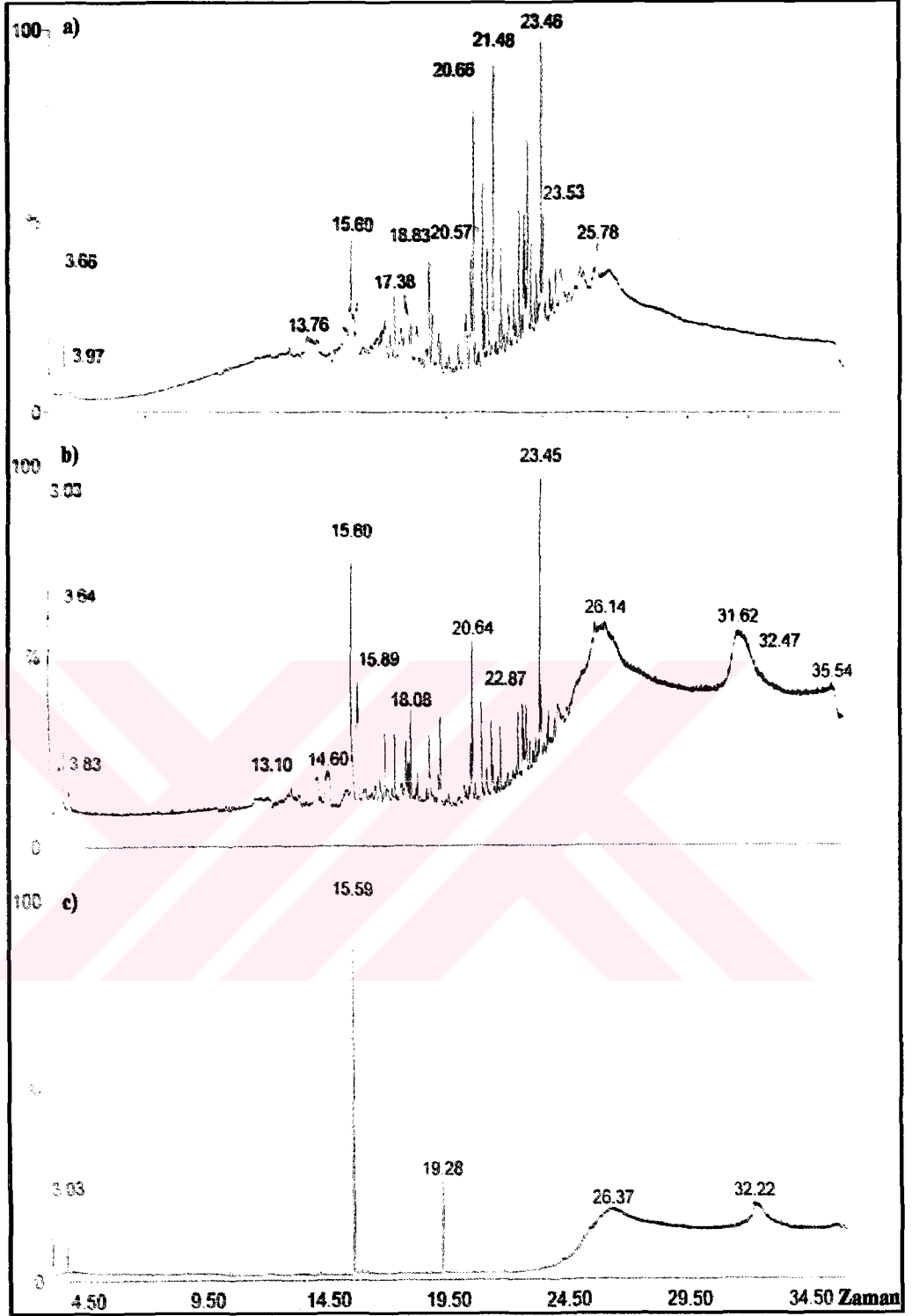


Şekil 6.23 Bursa-Kestelek linyitinin (BU-KE) GC-MS kromotogramları

- a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün
- b) Oksidlendirilmiş linyit
- c) Ham linyit

Çizelge 6.4 Bursa-Kestelek linyitinin GC-MS kromatogramlarından elde edilen sonuçlar

(m/z) değerleri ve bileşikler	Bursa-Kestelek linyiti		
	Sıvı Ürün	Oksidlendirilmiş Numune	Ham Numune
(43) 1- propane, 2-methoxy-2-propoxy- M_A : 132 $C_7H_{16}O_2$ 2- butanamide, 2-hydroxy-n,2,3,3-tetramethy M_A :159 $C_8H_{17}O_2N$	+	+	+
(55) 1- 2-propenoic acid, n-tridecyl ester M_A :254 $C_{16}H_{30}O_2$ 2- 2-propenoic acid, n-pentadecyl ester M_A :282 $C_{18}H_{34}O_2$ (32,57)	+	+	+
(59) 1- propanoic acid, 3-mercaptop-, dodecyl est. M_A : 274 $C_{15}H_{30}O_2S$ 2- isoocetyl 3-mercaptopropionate M_A : 218 $C_{11}H_{22}O_2S$	+	+	-
(63, 78) 1- propanedioic acid, methyl-,dimethylester M_A :146 $C_6H_{10}O_4$ 2-oxirane, 2-ethyl-3-propyl-, trans- M_A :114 $C_7H_{14}O$	+	-	-
(73) 1- dimethyl sulfoxide M_A :78 C_2H_6OS	-	-	-
(85) 1- octasiloxane M_A :578 $C_{16}H_{30}O_7Si_8$	+	+	-
(91) 1- 2(3H)-furanone, dihydro-5-tetradecyl- M_A :282 $C_{18}H_{34}O_2$ 2- 2(3H)-furanone, 5-dodecyl-dihydro- M_A :254 $C_{16}H_{30}O_2$	-	-	-
(129) 1- (2,3-diphenylcyclopropyl) methyl phenyl s M_A : 332 $C_{22}H_{20}OS$ 2- benzene, ethenyl-, dimer M_A : 208 $C_{16}H_{16}$	+	+	-
1-diisooctyl adipate M_A :370 $C_{22}H_{42}O_4$	+	-	-

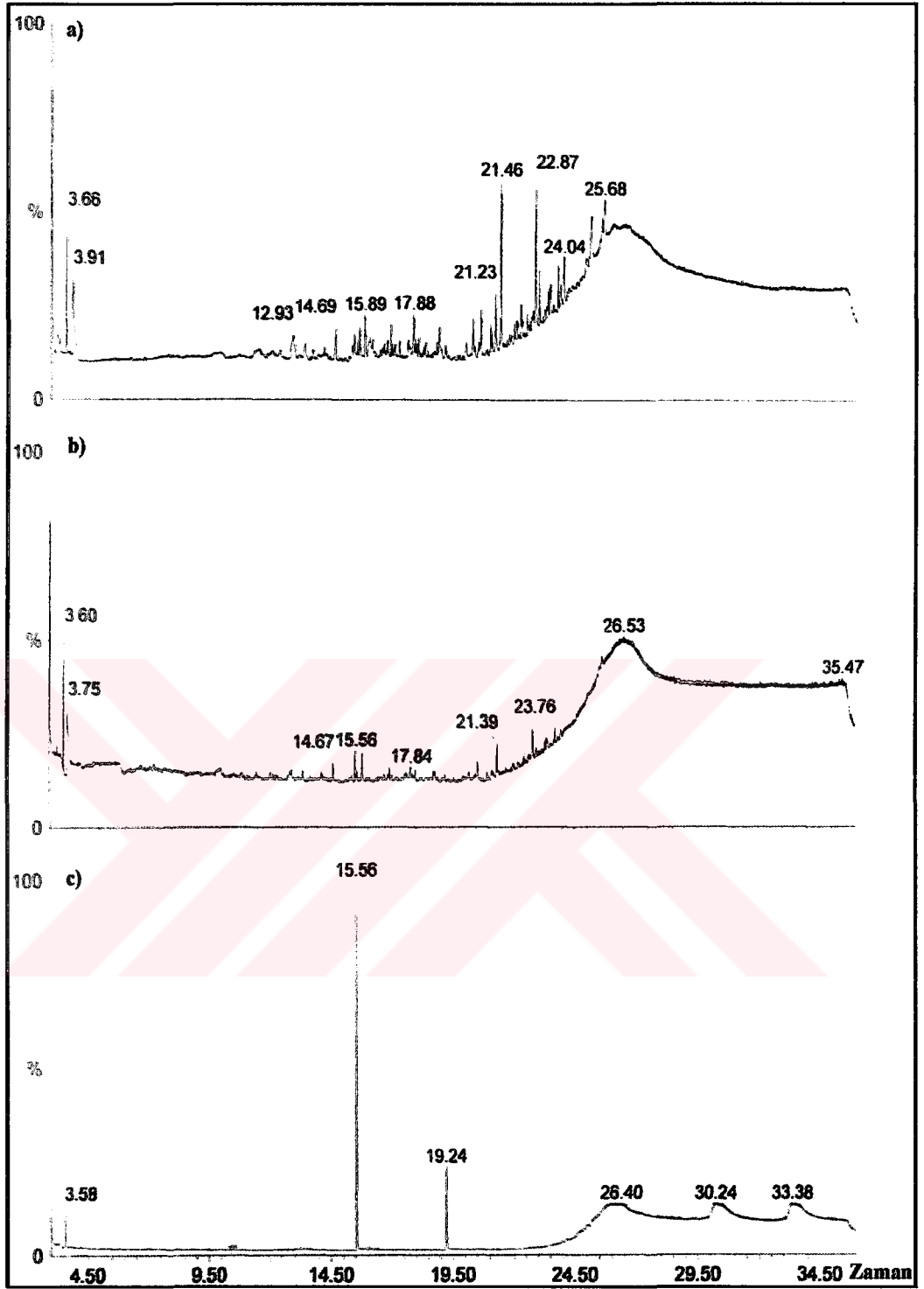


Şekil 6.24 Konya-Ilgın linyitinin (KO-IL) GC-MS kromotogramları

- a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün
- b) Oksidlendirilmiş linyit
- c) Ham linyit

Çizelge 6.5 Konya-Ilgın linyitinin GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar

(m/z) değerleri ve bileşikler	Konya-Ilgın Linyiti		Ham Linyit
	Sıvı Ürün	Oksidlendirilmiş linyit numunesi	
(43) retention time : 19.27 1- propane, 2-methoxy-2-propoxy- M_A : 132 $C_7H_{16}O_2$ 2- butanamide, 2-hydroxy-n,2,3,3-tetramethy M_A :159 $C_8H_{17}O_2N$	+	+	+
(55) retention time : 15.58 1- 2-propenoic acid, n-tridecyl ester M_A :254 $C_{16}H_{30}O_2$ 2- 2-propenoic acid, n-pentadecyl ester M_A :282 $C_{18}H_{34}O_2$	+	+	+
(59) 1- propanedioic acid, methyl-, dimethylester M_A :146 $C_6H_{10}O_4$ 2-oxirane, 2-ethyl-3-propyl-, trans- M_A :114 $C_7H_{14}O$	+	+	+
(59) 1-dodecanamide M_A :199 $C_{12}H_{25}ON$ 2-hexadecanamide M_A :255 $C_{16}H_{33}ON$	-	+	-
(73) 2- octasiloxane M_A :578 $C_{16}H_{50}O_7Si_8$	+	-	+
(85) 1- 2(3H)-furanone, dihydro-5-tetradecyl- M_A :282 $C_{18}H_{34}O_2$ 2- 2(3H)-furanone, 5-dodecylidihydro- M_A :254 $C_{16}H_{30}O_2$	-	+	+
(91) 1- azetidene, 1-benzyl-3,3-dimethyl-2-phenyl M_A :251 $C_{18}H_{21}N$ 2- dibenzyl ketoxime M_A :225 $C_{15}H_{15}ON$	+	+	+
(91) 1-(2,3-diphenylcyclopropyl) methyl phenyls M_A :332 $C_{22}H_{20}OS$ 2-benzene, ethenyl-, dimer M_A :208 $C_{16}H_{16}$	-	+	-
(99) 1- 2H-pyran-2-one, tetrahydr-6-tridecyl- M_A : 282 $C_{18}H_{34}O_2$ 2- 2H-pyran-2-one, tetrahydr-6-tridecyl- M_A : 226 $C_{14}H_{26}O_2$	+	-	+

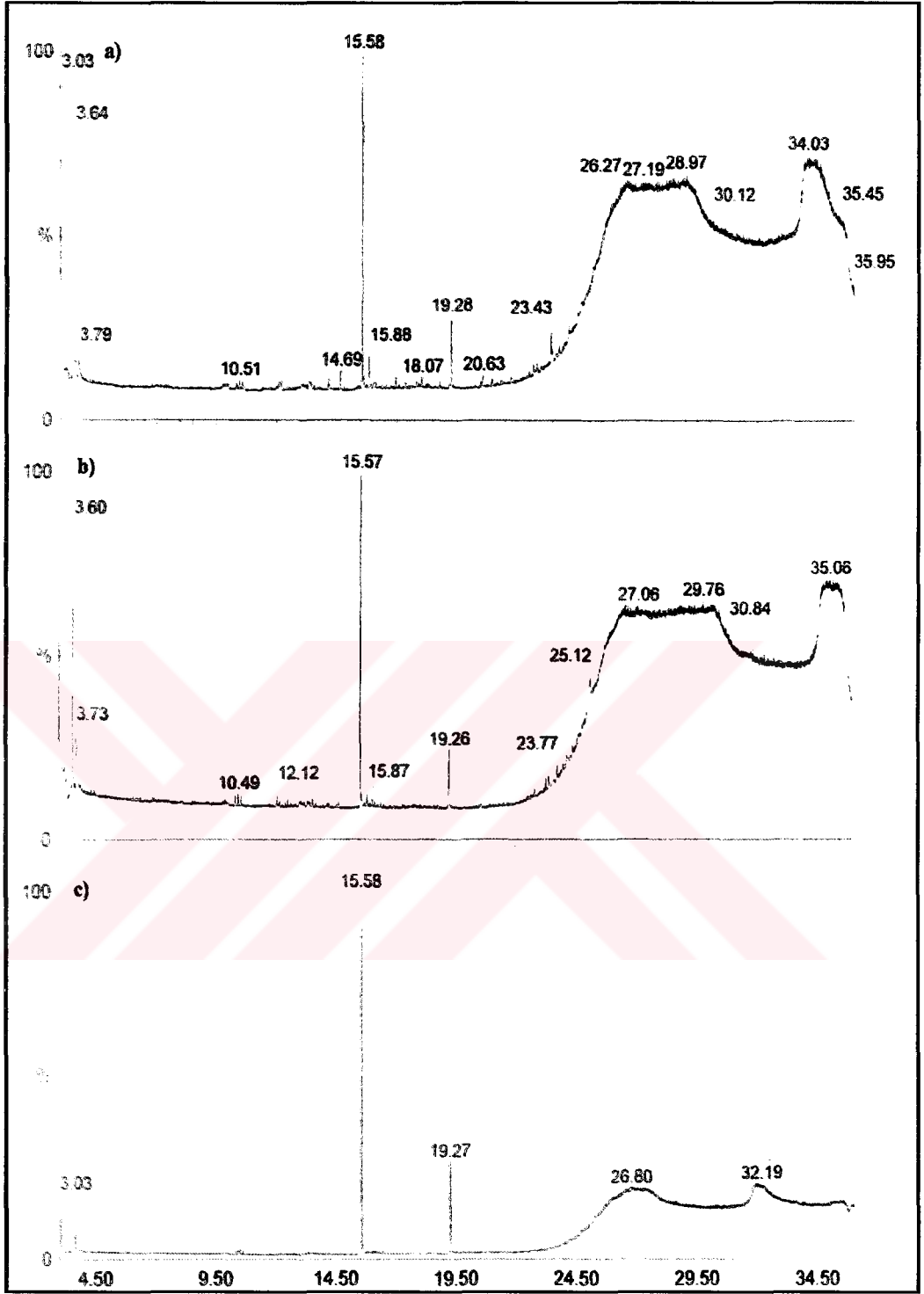


Şekil 6.25 Kütahya-Seyitömer (KÜ-SE) linyitinin GC-MS kromotogramları

- a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün
- b) Oksidlendirilmiş linyit
- c) Ham linyit

Çizelge 6.6 Kütahya-Seyitömer linyitinin GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar

(m/z) değerleri ve bileşikler	Kütahya-Seyitömer linyiti		Ham Linyit
	Sıvı Ürün	Oksidlendirilmiş numune	
(43) 1-propane, 2-methoxy-2-propoxy- M_A : 132 $C_7H_{16}O_2$ 2- butanamide, 2-hydroxy-n,2,3,3-tetramethy M_A :159 $C_8H_{17}O_2N$	+	+	+
(32,63,78) 1-1-bütanesulfinamide, 1,1,2,2,3,3,4,4,4,-N M_A :283 $C_4H_{20}NF_9S$	+	+	+
(32,58,69) 1-2-hydroxymethyl-6-methoxytetrahydropyran M_A :162 $C_7H_{14}O_4$ 2-oxirane, 2-ethyl-3-propyl-, trans- M_A :114 $C_7H_{14}O$	+	-	-
(32, 69) 1-6-ethyl-3-trimethylsilyloxydecane M_A :258 $C_{15}H_{34}OSi$	-	+	-
(59) 1- pentadecanamide, 15-bromo- M_A :162 $C_7H_{14}O_4$ 2- 9-octadecenamide, (z)- M_A :281 $C_{18}H_{35}ON$	+	-	-
(59,129) 1-4,5 decanediol, 6-ethyl- M_A :202 $C_{12}H_{26}O_2$ 2-erucylamide M_A :337 $C_{22}H_{43}ON$	+	-	-
(32,69,131) 1-2-methyloctadecadi-7, 8-ol, 7-o-trifluoro M_A :396 $C_{21}H_{39}O_3F_3$ 2-erythro-7,8-dichlorodisparlure M_A :336 $C_{19}H_{37}C_{12}$	-	+	-



Şekil 6.26 Muğla-Yatağan (MU-YA) linyitinin GC-MS kromotogramları

- a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün
- b) Oksidlendirilmiş linyit
- c) Ham linyit

Çizelge 6.7 Muğla-Yatağan linyitinin GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar

(m/z) değerleri ve bileşikler	Muğla-Yatağan linyiti	
	Sıvı Ürün	Oksidlendirilmiş Linyit
(43) 1- propane, 2-methoxy-2-propoxy- $M_A: 132 C_7H_{16}O_2$ 2- butanamide, 2-hydroxy-n,2,3,3-tetramethy $M_A:159 C_8H_{17}O_2N$	+	+
(55) 1- 2-propenoic acid, n-tridecyl ester $M_A:254 C_{16}H_{30}O_2$ 2- 2-propenoic acid, n-pentadecyl ester $M_A:282 C_{18}H_{34}O_2$	+	+

Ham Linyit

+

+

6.2 Mikroorganizmanın (*Phanerochaete chrysosporium*) Hümik Asid Numunelerine

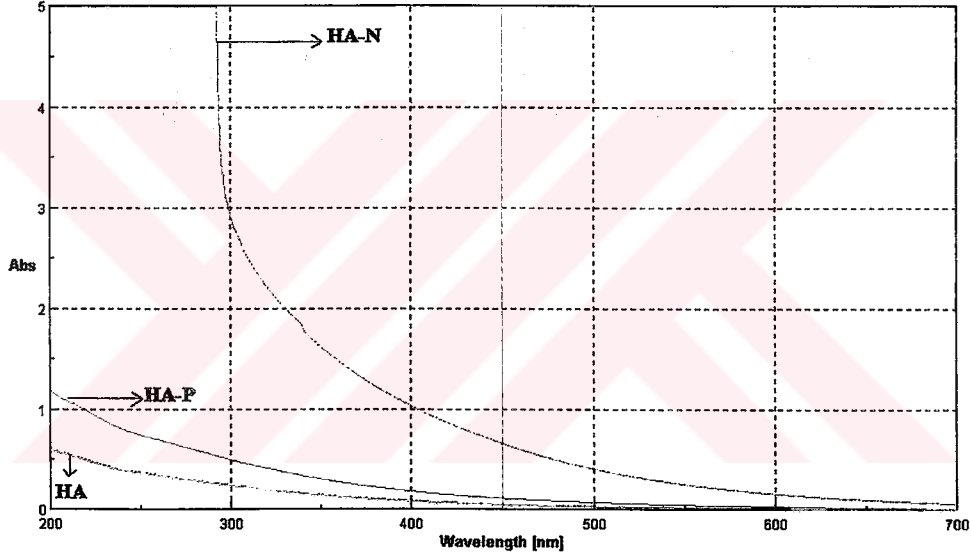
Etkisinin Değerlendirilmesi

6.2.1 Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Hümik Asidlerin (HA-H, HA-P, HA-N)

UV-Vis Spektrofotometresiyle Belirlenen Absorbans Değerleri

Mikroorganizmanın hümik asidlere etkisi sonucu elde edilen sıvı ürünlerin UV-Vis spektrofotometre ile belirlenen absorbans spektrumları Şekil 6.27’de, 450 nm’de ölçülen absorbans değerleri ise Çizelge 6.8’de verilmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre, nitrik asitle (% 30 HNO₃) oksidasyon sonrasında ekstrakte edilen hümik asidlerin (HA-N) en yüksek biyoçözünürlük değerine sahip olduğu belirlendi.



Şekil 6.27 Mikroorganizma etkisiyle hümik asidlerden (HA-H, HA-P, HA-N) elde edilen sıvı ürünlerin UV-Vis spektrumları

Çizelge 6.8 Hümik asidlerden elde edilen sıvı ürünlerin 450 nm’deki absorbans değerleri

Numuneler	Absorbans Değerleri
Ham linyitten ekstrakte edilen hümik asid (HA-H)	0.05926
Hidrojen peroksitle (% 4 H ₂ O ₂) oksidlendirilmiş linyitten ekstrakte edilen hümik asid (HA-P)	0.11997
Nitrik asilde (% 30 HNO ₃) oksidlendirilmiş linyitten ekstrakte edilen hümik asid (HA-N)	0.66445

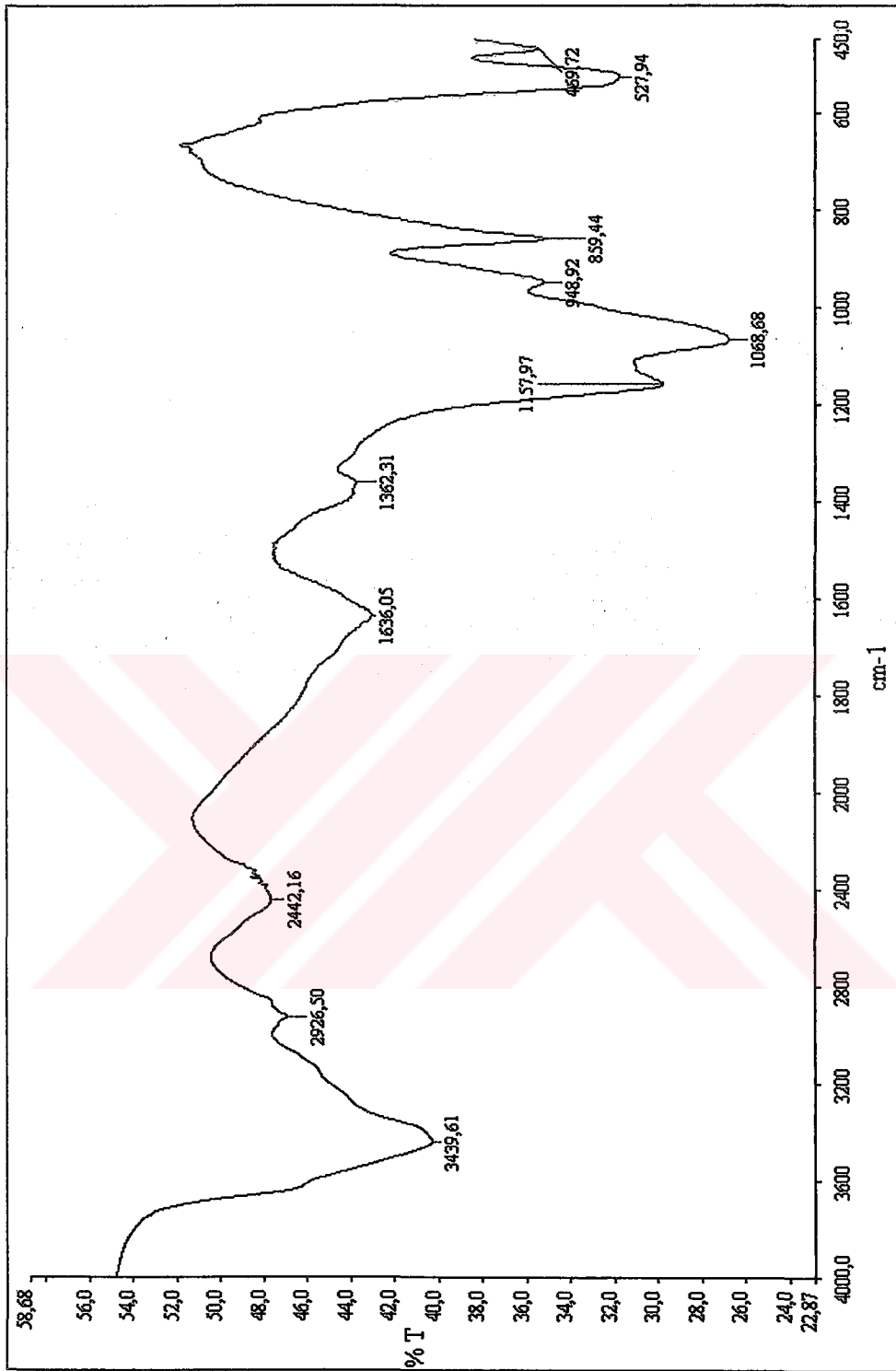
6.2.2 Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Hümik Asidlerin (HA-H, HA-P, HA-N)

FTIR Spektrumları

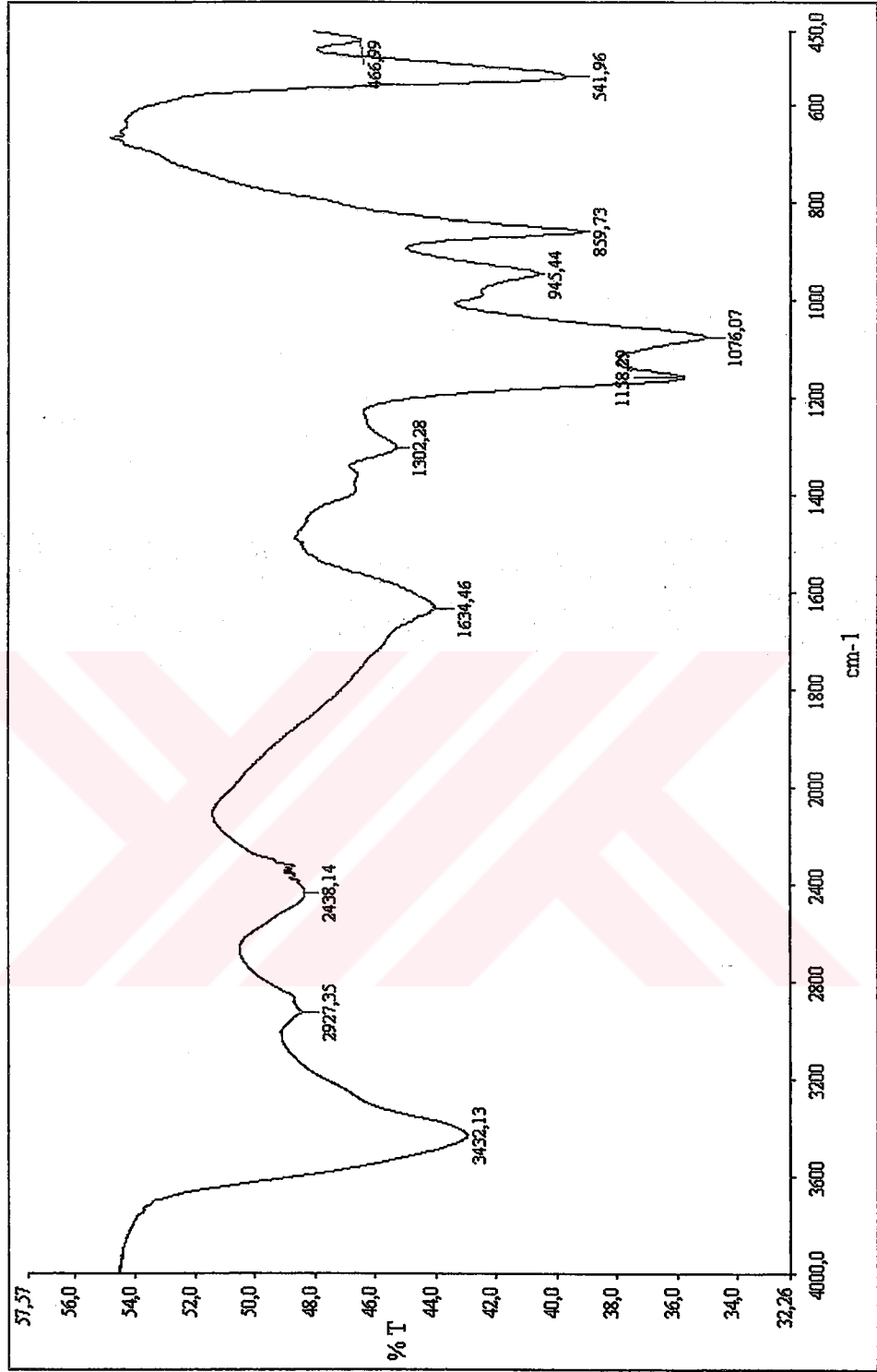
Bolu-Himmetoğlu linyitinden farklı yöntemlerle elde edilen hümik asidlerin (HA-H, HA-P, HA-N) FTIR spektrumları ayrı ayrı ölçülmüş ve kıyaslanmıştır. Bu spektrumlar, Şekil 6.28, 6.29 ve 6.30'da verilmektedir.

Üç numunede de görülen 3422, 3439, 3432 cm^{-1} 'de oluşmuş bandlar nem ya da kristal bağlı sudan ileri gelen hidroksil ve fenolik -OH gerilmesini göstermektedir. 2926 cm^{-1} 'de oluşmuş band, üç numunede de gözlenmekte ve çok küçük bir pik olduğundan yapıda az miktarda alifatik hidrokarbonların varlığına işaret etmektedir. 2446, 2438 ve 2442 cm^{-1} 'de oluşan bandlar N-H gerilme titreşimlerini göstermektedir. HA-H ve HA-P'de gözlenen ancak HA-N'de gözlenmeyen 1634 ve 1636 cm^{-1} 'de meydana gelen bandlar konjuge olmuş C=C gerilme titreşimini ya da hidrojen bağlı karbonil gruplarını göstermektedir. Sadece HA-N'de ortaya çıkan 1595 cm^{-1} 'de meydana gelen band aromatik halkaların nitrasyonu ile oluşan N=O asimetric gerilmelerden kaynaklanmaktadır. 1300-1000 cm^{-1} 'de oluşan bandlar C-O (fenoller), $\text{C}_{\text{ar}}\text{-O-C}_{\text{ar}}$, C-O (alkol), $\text{C}_{\text{ar}}\text{-O-C}_{\text{al}}$, $\text{C}_{\text{al}}\text{-O-C}_{\text{al}}$, gerilmelerinin varlığını belirtmektedir (Speight, 1994). Bu nedenle HA-P'de 1302 cm^{-1} 'de oluşan küçük bandın C-O gerilme titreşimlerinden kaynaklandığı söylenebilir. HA-H'de 1362 cm^{-1} 'de oluşan küçük band ve HA-N'de 1384 cm^{-1} 'de oluşan geniş band metilen gruplarının varlığını göstermektedir. Linyite nitrik asid uygulamasının, hümik asidlerde aşırı -CH₃ ve N=O gruplarının oluşumuna yol açtığı görülmüştür. HA-P ve HA-N'de 1157 cm^{-1} 'danda oluşan bandlar, alkol ve eterlerdeki C-O gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. HA-H'de ise bu pikde tam bir oluşum gözlenmemiştir. 1068, 1078 ve 1076 cm^{-1} 'de oluşan pikler alifatik eter ve alkollerden kaynaklı C-O gerilme titreşimlerini ya da Si-O gerilme titreşimlerini göstermektedir.

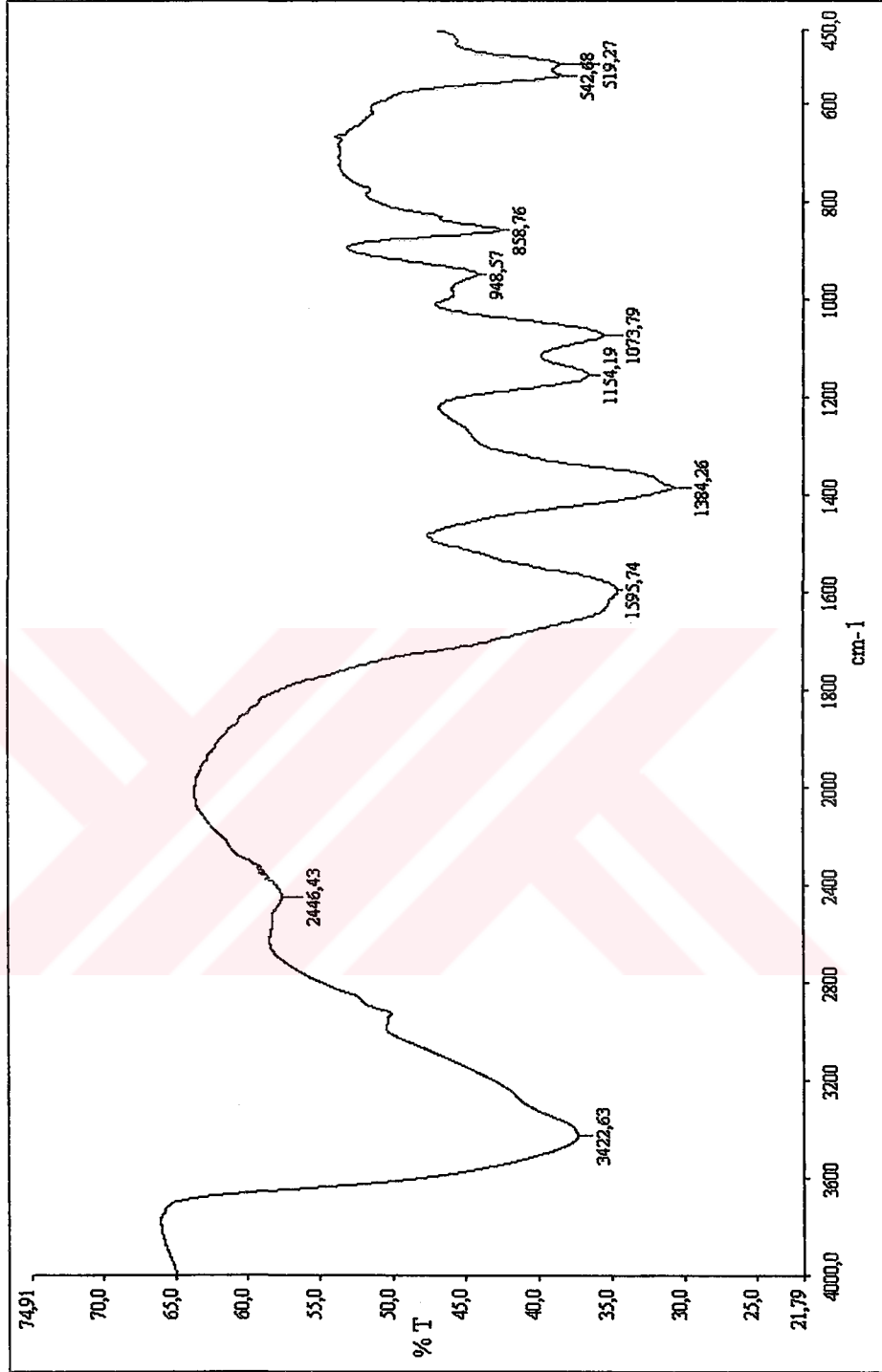
Üç hümik asid numunesinde sivri ve geniş yapıda karakteristik pik olarak ortaya çıkan ve 859 cm^{-1} 'de oluşan band, yapıda hidrojenli substitüe benzen halkalarının olduğunu göstermektedir.



Şekil 6.28 Ham linyitten ekstrakte edilen hümik asidin (HA-H) FTIR spektrumu



Şekil 6.29 Hidrojen peroksitle (% 4 H₂O₂) oksidendirilmiş linyitten ekstrakte edilen hümik asidin (HA-P) FTIR spektrumu



Şekil 6.30 Nitrik asitle (% 30 HNO₃) oksidlendirilmiş linyitten ekstrakte edilen

hümik asidin (HA-N) FTIR spektrumu

6.2.3 Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Hümik Asidlere (HA-H, HA-P, HA-N) Mikroorganizma Etkisi Sonucunda Oluşan Sıvı Ürünlerin (Çözelti ve Çökelti) FTIR Spektrumları

Bolu-Himmetoğlu linyitinden farklı yöntemlerle elde edilen hümik asidlere (HA-H, HA-P, HA-N) mikroorganizma etkisi sonucu oluşmuş sıvı ürünleri FTIR spektrumları incelenmiştir. Bu spektrumlar, Şekil 6.31, Şekil 6.32 ve Şekil 6.33'de verilmektedir.

HA-H'den elde edilen sıvı üründe (çözelti) (FA) 3432, 2380, 1638, 1156, 1079, 984, 861, 527 cm^{-1} 'de bandlar tespit edilmiştir. Bu bandların işaret ettiği fonksiyonel gruplar daha önceki bölümde açıklanmıştır.

HA-H'den elde edilen sıvı ürün (çözelti) HA-H ile kıyaslandığında 2926 cm^{-1} 'de kaybolduğu, 2442 cm^{-1} ve 859 cm^{-1} 'de bandların azaldığı dikkati çekmiştir.

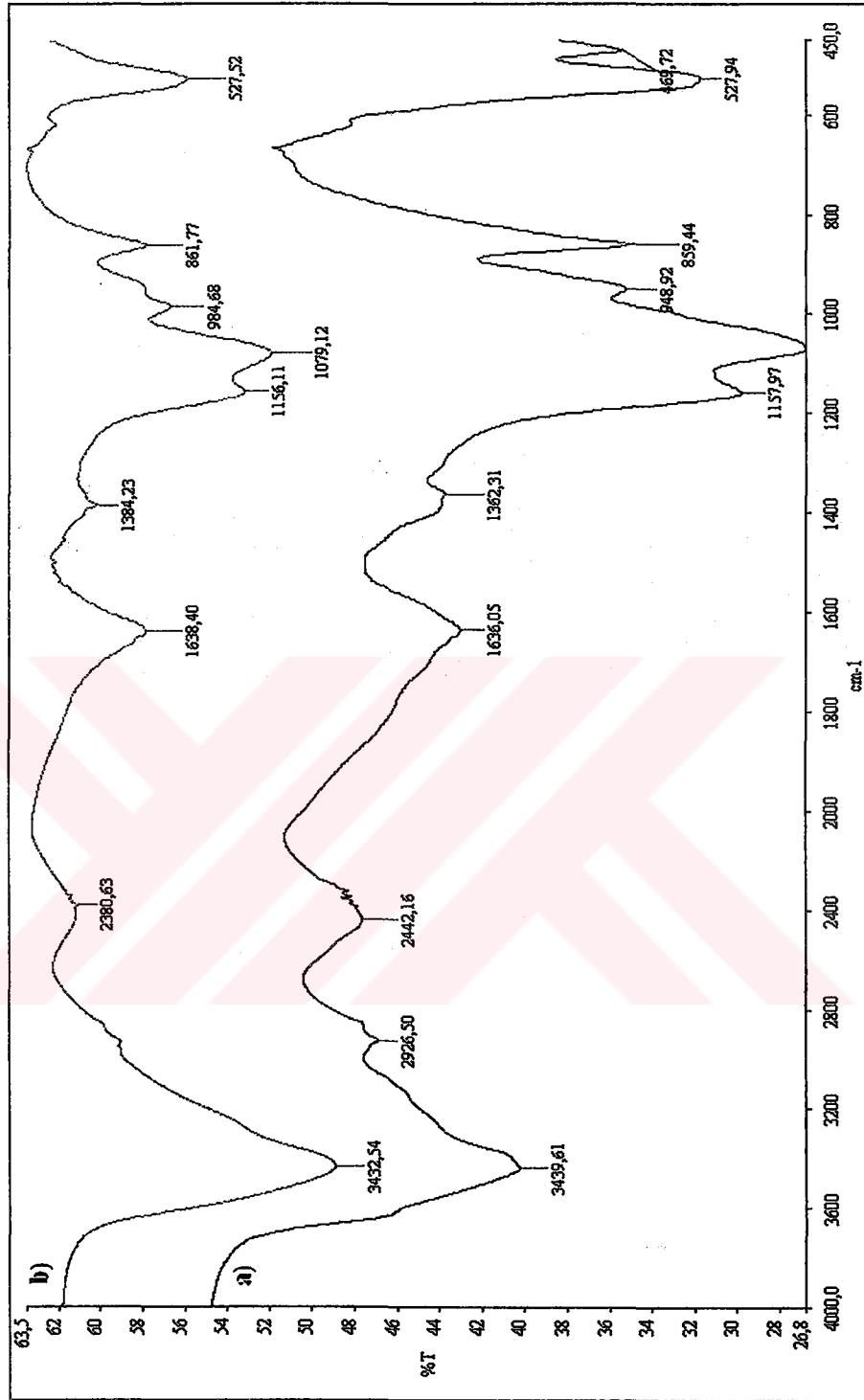
HA-P'den elde edilen sıvı üründe (çözelti) 3431, 2382, 1642, 1384, 1087, 984, 525 cm^{-1} 'de bandlar tespit edilmiştir. Bu bandların işaret ettiği fonksiyonel gruplar daha önceki bölümde açıklanmıştır.

HA-P'den elde edilen sıvı ürün (çözelti) katı HA-P ile kıyaslandığında 2927 cm^{-1} 'de ki bandın kaybolduğu, 2382 cm^{-1} 'deki bandın azaldığı, 859 cm^{-1} 'de ki bandın ise çok küçüldüğü ayrıca, 1158 ve 1078 cm^{-1} 'de ki bandların kaybolduğu ve 1087 cm^{-1} 'de geniş bir bandın oluştuğu gözlenmiştir.

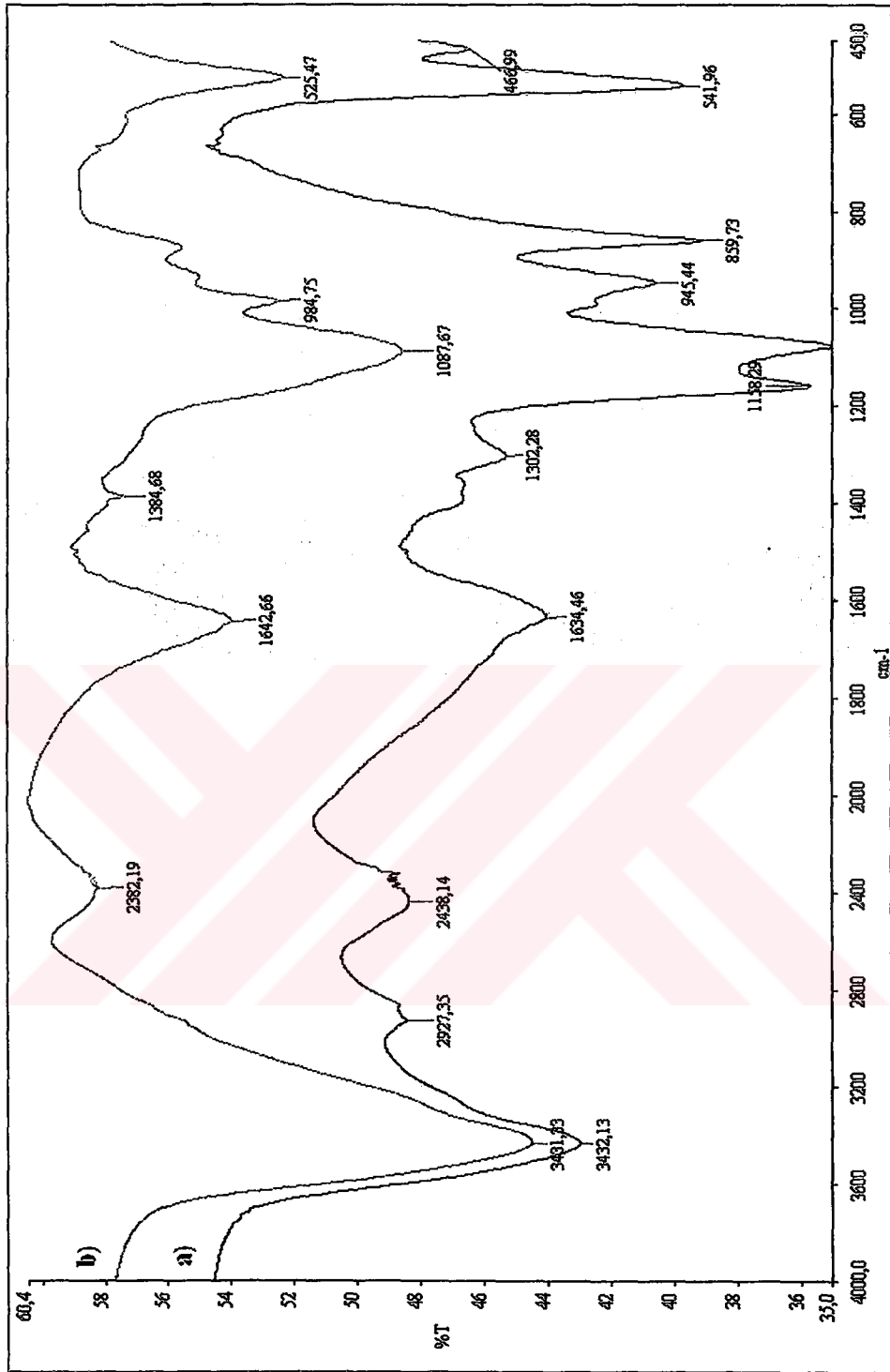
HA-N'den elde edilen sıvı üründe (çözelti) 3422, 1627, 1384, 1079, 860, 534 525 cm^{-1} 'de bandlar tespit edilmiştir. Bu bandların işaret ettiği fonksiyonel gruplar daha önceki bölümde açıklanmıştır.

HA-N'den elde edilen sıvı ürün (çözelti) katı HA-N ile kıyaslandığında 2446 cm^{-1} , 1154 ve 1073 cm^{-1} 'de ki bandın kaybolduğu 1079 cm^{-1} 'de geniş bir bandın oluştuğu ve ayrıca aromatik yapıyı gösteren (benzen halkaları) 860 cm^{-1} 'de ki bandın ise çok küçüldüğü gözlenmiştir.

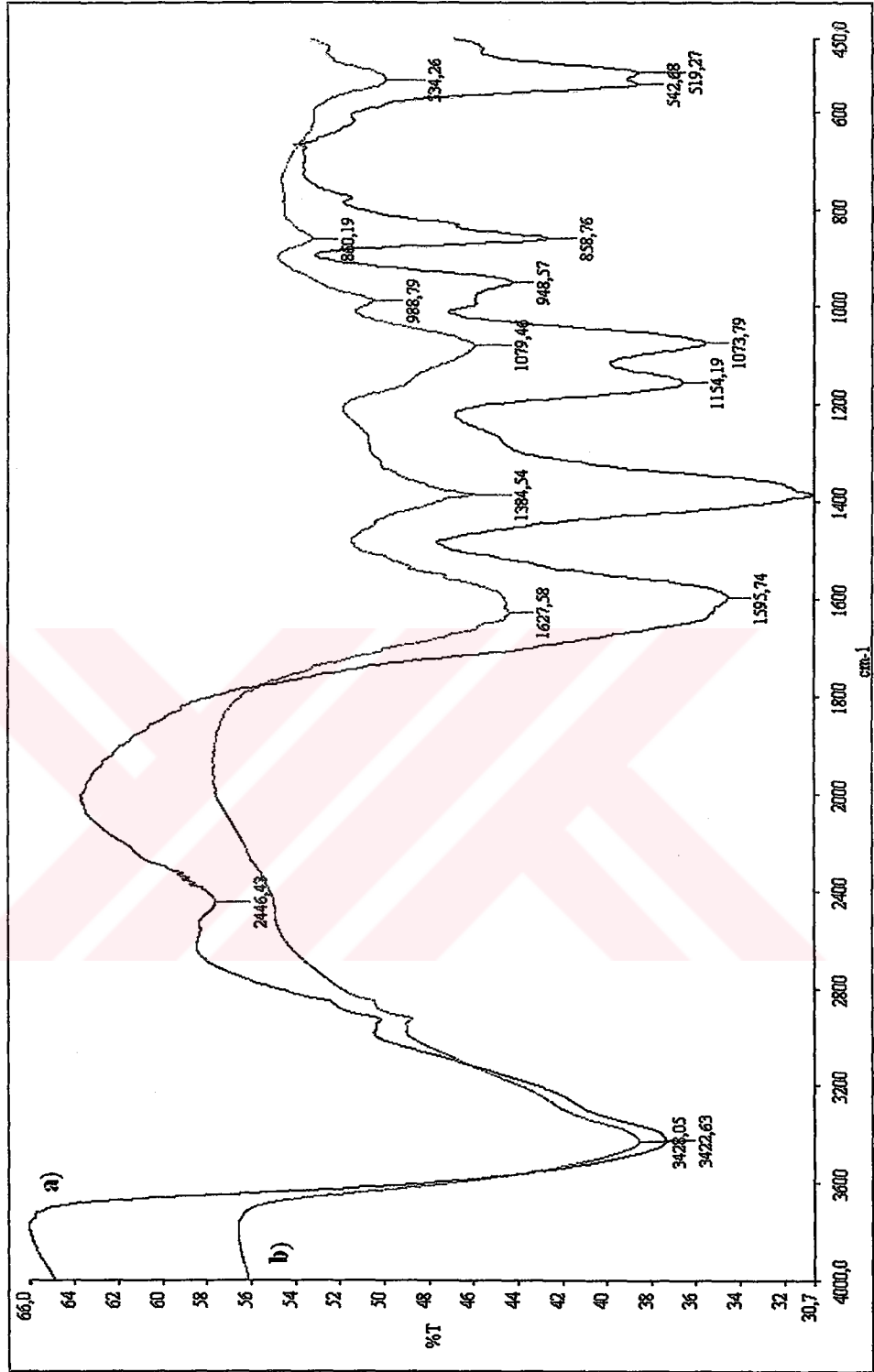
Üç farklı hümik asitten elde edilen sıvı ürünlerin çözelti ve çökeltileri ayrı ayrı incelenmiş ve katı haldeki formlarıyla karşılaştırılmıştır (Şekil 6.31-6.35). Santrifüjleme sonrasında ele geçen çökeltelerde 3436, 1641, 1384, 1054 cm^{-1} 'de bandların varlığı görülmüş HA-H'nin çökeltisinde farklı olarak alifatik hidrokarbonaları işaret eden 2926 cm^{-1} 'de ki banda rastlanılmamıştır.



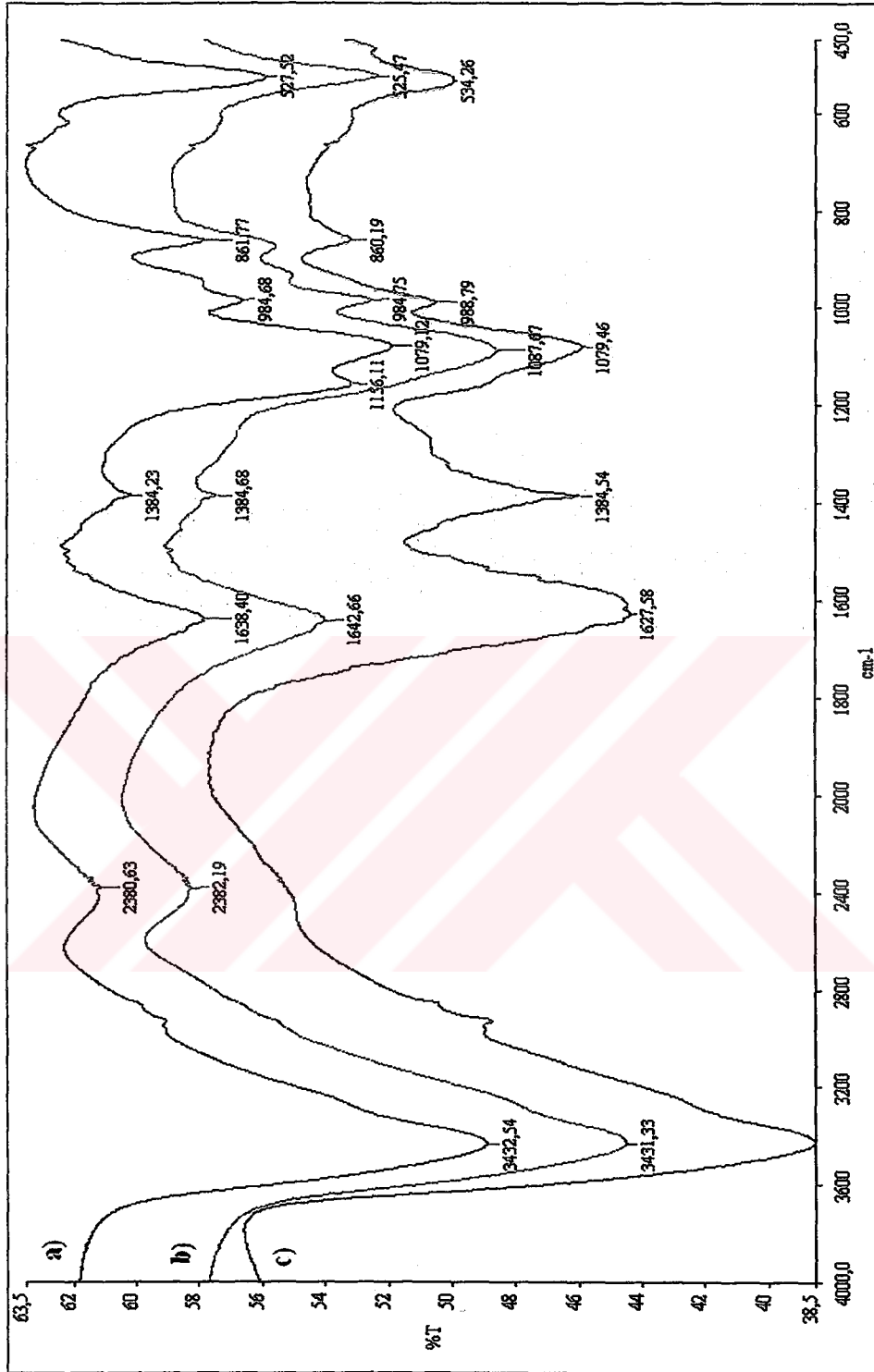
Şekil 6.31 HA-H ve mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürünün FTIR spektrumları



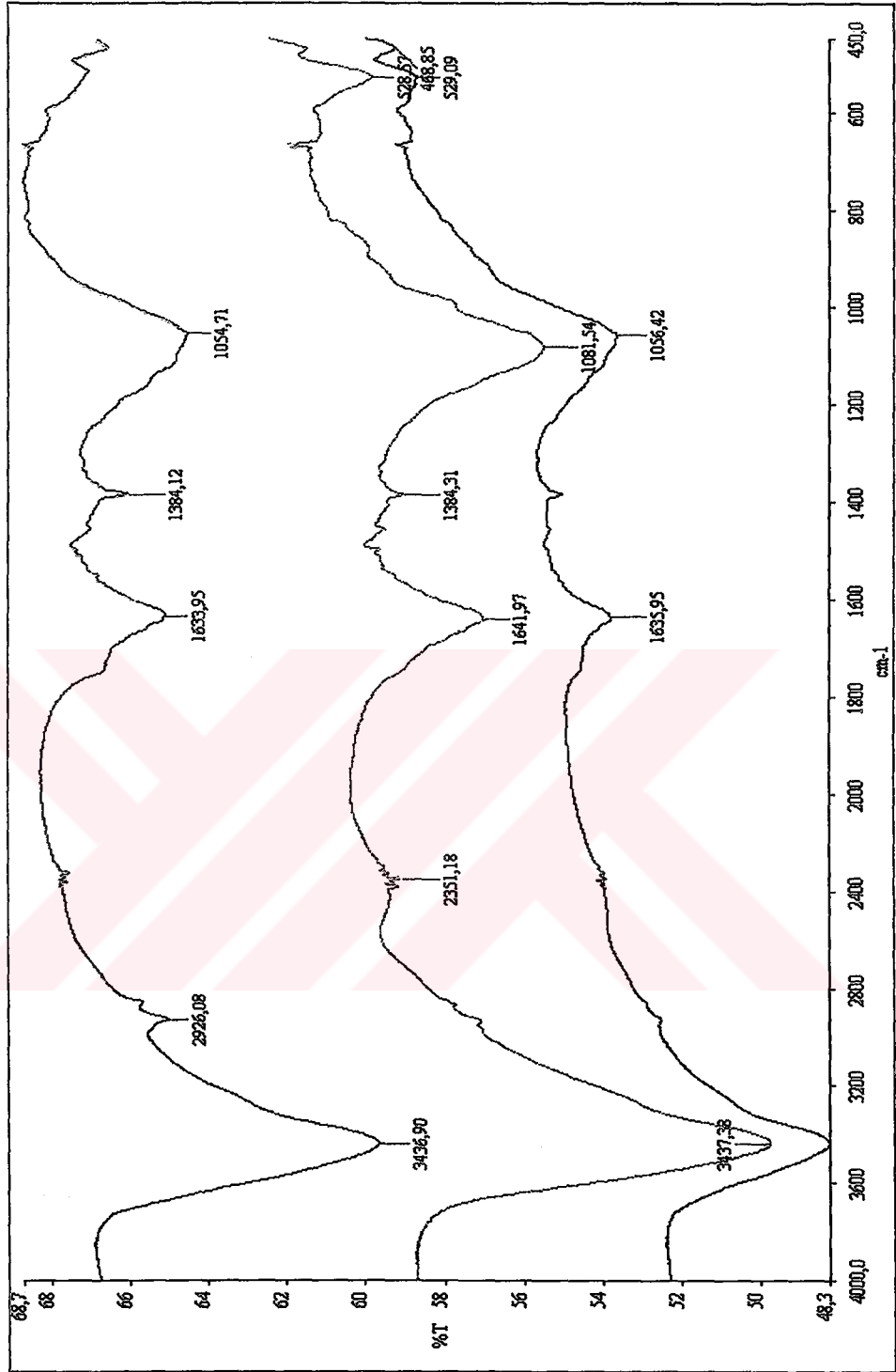
Şekil 6.32 HA-P ve mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürünün FTIR spektrumları



Şekil 6.33 HA-N ve mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürünün FTIR spektrumları



Şekil 6.34 Mikroorganizma etkisiyle hümik asitlerden (HA-H, HA-P ve HA-N) elde edilen sıvı türünlerin (çözelti) FTIR spektrumları



Şekil 6.35 Mikroorganizma etkisiyle hümik asitlerden (HA-H, HA-P ve HA-N) elde edilen sıvı ürünlerin (çökelti) FTIR spektrumları

6.2.4 Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Hümik Asidlere (HA-H, HA-P, HA-N)

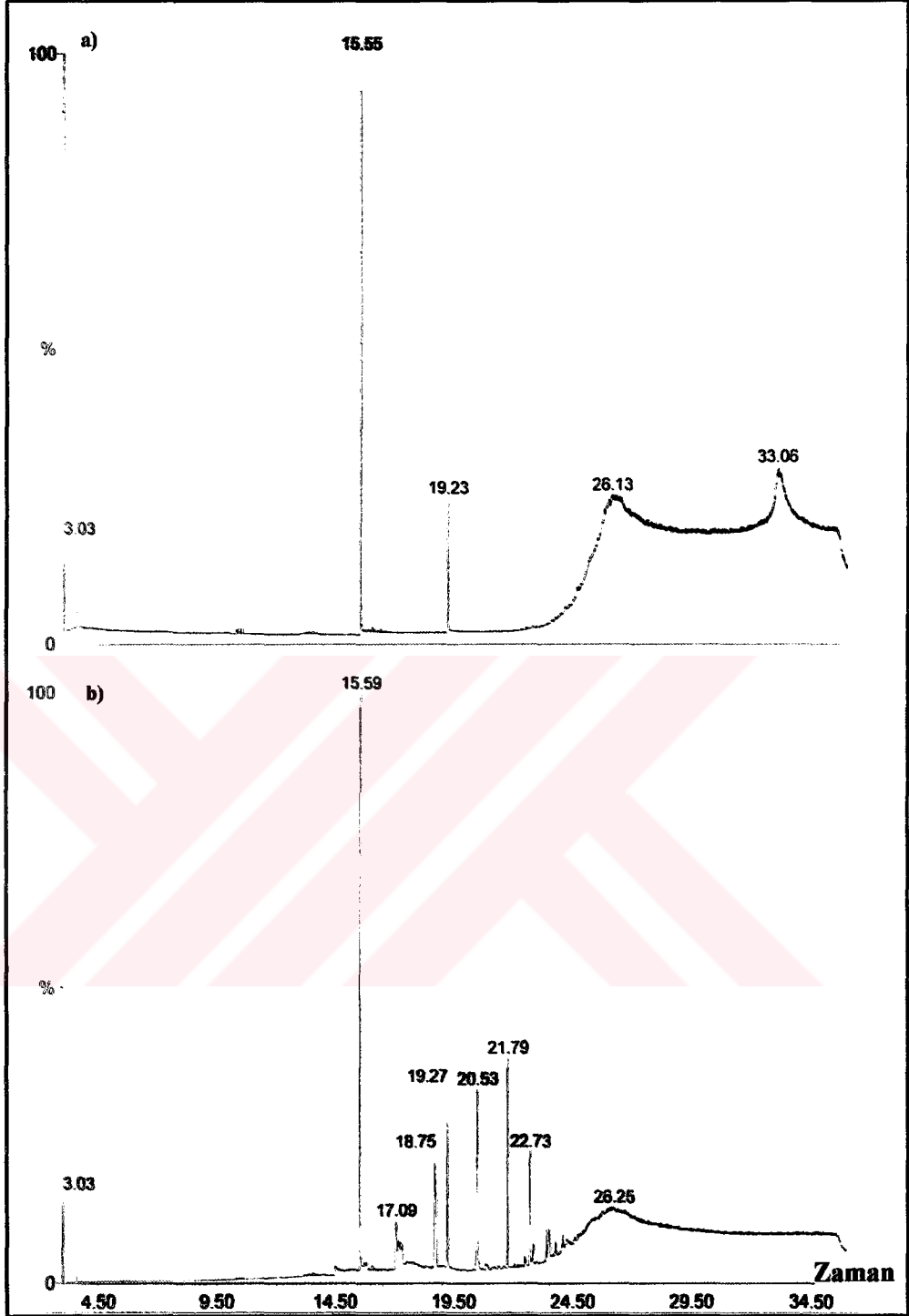
Mikroorganizma Etkisi Sonucunda Oluşan Sıvı Ürünlerin GC-MS

Kromotogramları

Mikroorganizma vasıtasıyla üretilen sıvı ürünlerin GC-MS spektrumları, orjinal hümik asidlerin (HA-H) GC-MS spektrumlarıyla karşılaştırılmıştır. HA-H'de cyclooctasiloxane-hexadecamethyl ($C_{16}H_{48}O_8Si_8$, $M_A:592$), 1,1,1,5,7,7,7 heptamethyl-3,3 bis/trimethylsiloxy tetrasiloxane ($C_{13}H_{40}O_5Si_6$, $M_A:444$), azetidine,1-benzyl-3,3dimethyl-2-phenyl, ($C_{18}H_{21}N$, $M_A:251$), heptasiloxane, hexadecamethyl ($C_{16}H_{48}O_6Si_7$) benzeri bileşikler saptanmıştır (Şekil 6.36). Çizelge 6.9 ham linyitten ekstrakte edilen hümik asidin (HA-H) GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar verilmektedir.

% 4'lük H_2O_2 ile kimyasal oksidasyon sonrasında linyitten ekstrakte edilen hümik asidlerden (HA-P) mikroorganizma vasıtasıyla üretilen sıvılarda temel iki pikde artış belirlenmiş, HA-P'den elde edilen GC-MS spektrumunda ise 2-propenoic acid,3-(methoxyphenyl)-,2-ethylhexylester ($C_{18}H_{26}O_3$, $M_A:290$), octane,2-6-dimethyl ($C_{10}H_{22}$, $M_A:142$) benzeri bileşiklerde azalma gözlenmiştir (Şekil 6.37). Çizelge 6.10'da mikrobiyal işlem öncesinde ve sonrasında yapıda meydana gelen kimyasal maddeler verilmektedir.

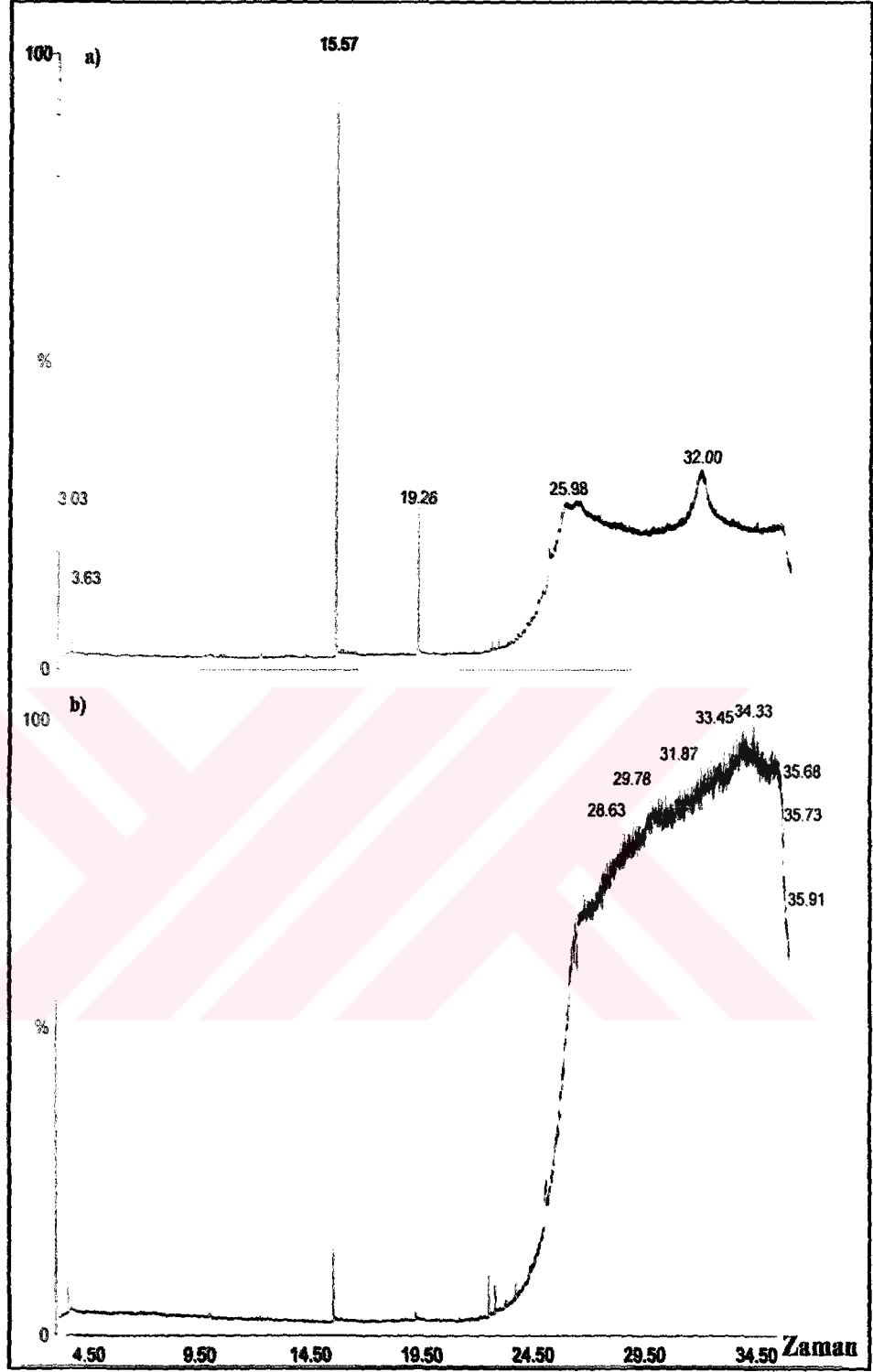
% 30'lük HNO_3 ile kimyasal oksidasyon sonrasında linyitten ekstrakte edilen hümik asidlerden (HA-N) mikroorganizma vasıtasıyla üretilen sıvılarda, HA-N'e göre çok farklı bileşiklerin oluştuğu ve bazı piklerde oldukça fazla artmalar olduğu saptanmıştır. Sıvı üründe 1,1,1,5,7,7,7 heptamethyl-3,3 bis/trimethylsiloxy tetrasiloxane ($C_{13}H_{40}O_5Si_6$, $M_A:444$), 2H,pyran-2one,tetrahydro-6-tridecyl ($C_{18}H_{34}O_2$, $M_A:282$), (2,3-diphenylcyclopropyl)methyl-phenylsulfoxidetrans ($C_{22}H_{20}O_5$, $M_A:332$) benzeri bileşiklerde gözlenmiştir. HA-N'de ise sıvı üründen farklı olarak bis(2-ethylhexyl)phatalate ($C_{24}H_{38}O_4$, $M_A:390$) (Şekil 6.38). Çizelge 6.11'de mikrobiyal etkiyle parçalanan ve oluşan bazı kimyasalların listesi verilmektedir.



Şekil 6.36 Ham linyitten ekstrakte edilen hümik asidin (HA-H) GC-MS kromotogramları
a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün (çözelti)
b) Hümik asid (HA-H)

Çizelge 6.9 Ham linyitten ekstrakte edilen hümik asidin (HA-H) GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar

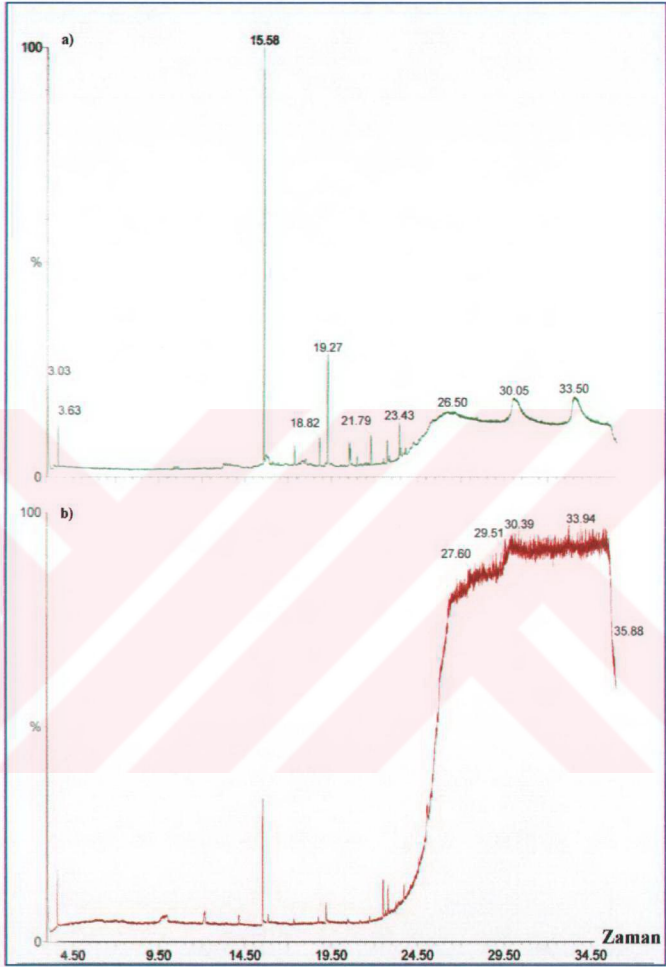
	Hümik Asid Numunesi (HA-H)	
	Mikrobiyal işlem sonrası (Sıvı ürün)	Mikrobiyal işlem öncesi (Kati numune)
(43)		
1-Propane, 2-methoxy-2-propoxy- M_A : 132 $C_7H_{16}O_2$	+	+
2- Butanamide, 2-hydroxy-n,2,3,3-tetramethy M_A :159 $C_8H_{17}O_2N$		
(43, 57)		
1- 2-propenoic acid, 3-mercaptop-, dodecyl ester M_A :274 $C_{15}H_{30}O_2S$	+	-
(73)		
1-Octasiloxane M_A :578 $C_{16}H_{50}O_7Si_8$		
2-Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl- M_A :592 $C_{16}H_{48}O_8Si_8$	-	+
(91)		
1-azetidine, 1-benzyl-3,3-dimethyl-2-pheny M_A :251 $C_{18}H_{21}N$		
2- dibenzyl ketoxime M_A :225 $C_{15}H_{15}ON$	-	+



Şekil 6.37 Hidrojen peroksitle (% 4 H₂O₂) oksidasyon sonrasında ekstrakte edilen hümik asidin (HA-P) GC-MS kromotogramları
 a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün (çözelti)
 b) Hümik asid (HA-P)

Çizelge 6.10 Hidrojen peroksitle (4% H₂O₂) oksidasyon sonrasında ekstrakte edilen hümik asidin (HA-P) GC-MS kromatogramlarından elde edilen sonuçlar

(m/z) değerleri ve bileşikler	Hümik Asid Numunesi (HA-H)	
	Mikrobiyal işlem sonrası (Sıvı ürün)	Mikrobiyal işlem öncesi (Kıta numune)
(43) 1- Propane, 2-methoxy-2-propoxy- M _A : 132 C ₇ H ₁₆ O ₂ 2- Butanamide, 2-hydroxy-n,2,3,3-tetramethy M _A :159 C ₈ H ₁₇ O ₂ N	+	+
(43,57) 1- Propanoic acid, 3-mercaptop-, dodecyl ester M _A :274 C ₁₅ H ₃₀ O ₂ S	+	+
(55) 1- 2-propenoic acid, n-tridecyl ester M _A :254 C ₁₆ H ₃₀ O ₂ 2- 2-propenoic acid, n-pentadecyl ester M _A :282 C ₁₈ H ₃₄ O ₂	+	+



Şekil 6.38 Nitrik Asitle (% 30 HNO_3) oksidasyon sonrasında ekstrakte edilen hümik asidin (HA-N) GC-MS kromotogramları
 a) Mikroorganizma etkisiyle oluşan sıvı ürün (çözelti)
 b) Hümik asit (HA-N)

Çizelge 6.11 Nitrik asitle (30% HNO₃) oksidasyon sonrasında ekstrakte edilen hüyük asidin (HA-N) GC-MS kromotogramlarından elde edilen sonuçlar

	Hüyük Asid Numunesi (HA-N)	
	Mikrobiyal işlem sonrası (Sıvı ürün)	Mikrobiyal işlem öncesi (Kati numune)
(43)		+
1- Propane, 2-methoxy-2-propoxy- M _A : 132 C ₇ H ₁₆ O ₂ 2- Butanamide, 2-hydroxy-n,2,3,3-tetramethy M _A :159 C ₈ H ₁₇ O ₂ N	+	
(55)		+
1- 2-propenoic acid, n-tridecyl ester M _A :254 C ₁₆ H ₃₀ O ₂ 2- 2-propenoic acid, n-pentadecyl ester M _A :282 C ₁₈ H ₃₄ O ₂	+	
(32, 57)		+
1-Docosanoic acid, docosyl ester M _A :648 C ₄ H ₈₈ O ₂ 2-3-Heptadecanone M _A :254 C ₁₇ H ₃₄ O	-	
(73)		-
1-Octasiloxane M _A :578 C ₁₆ H ₅₀ O ₇ Si ₈	+	
(91)		-
1-(2,3 Diphenylcyclopropyl) methyl phenyl S M _A :332 C ₂₂ H ₂₀ OS	+	

6.3 HRP (*Horseradish peroxidase*) Enziminin Hümik Asid Numunelerine Etkisinin Değerlendirilmesi

6.3.1 Hümik Asid (HA-H) ve Enzim Reaksiyonları Sonrasında Elde Edilen Çözelti ve Çökeltilerin FTIR Spektrumları

Ham Bolu-Himmetoğlu linyitinden elde edilen hümik asid (HA-H) ile HRP (*Horseradish peroxidase*) enzimi reaksiyona sokulmuş; 30, 60, 120 μL enzim miktarlarının ve 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık reaksiyon sürelerinin hümik asid yapısında meydana getirdiği değişimler, FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir.

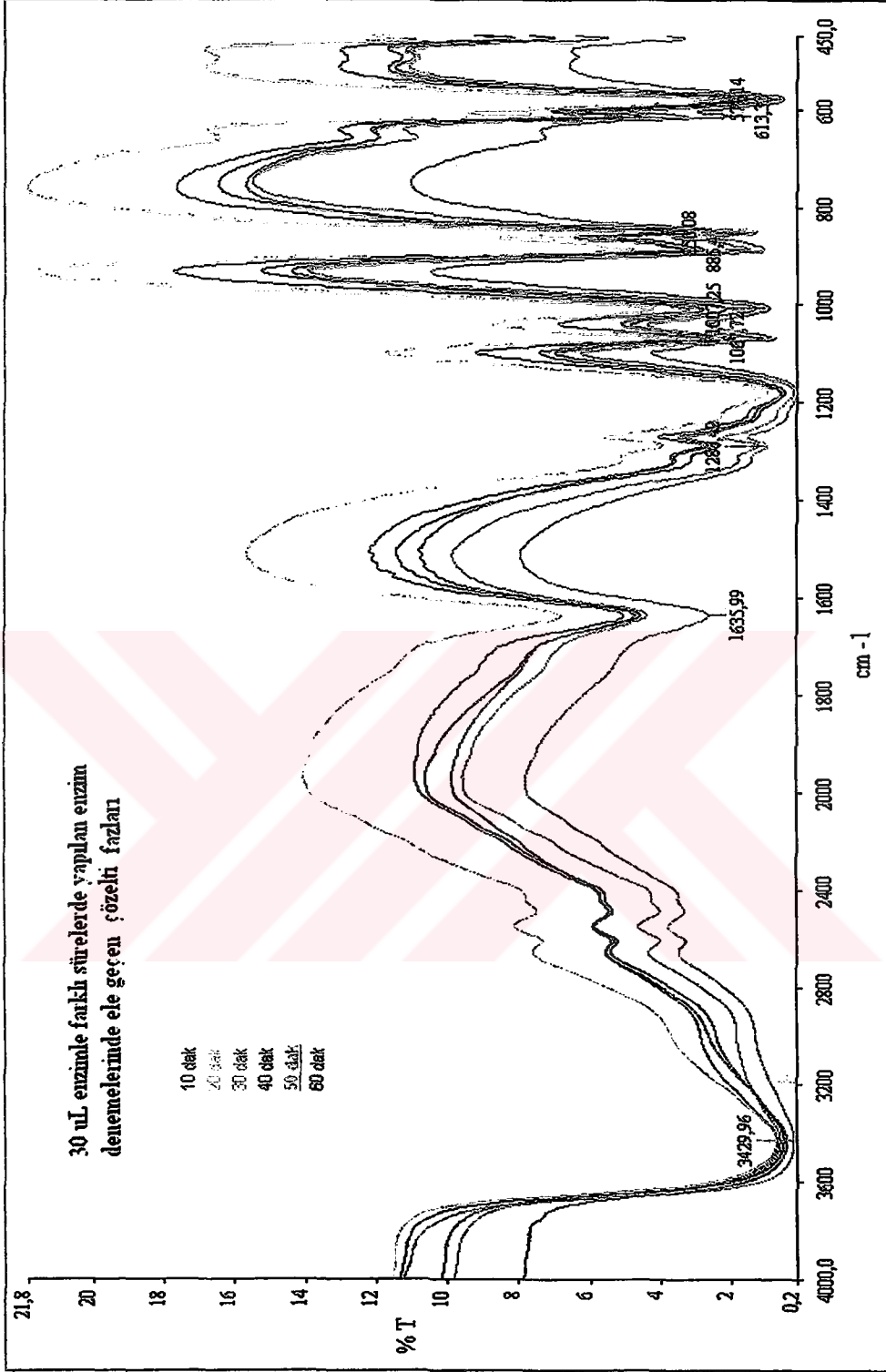
Enzim reaksiyonu sonrasında elde edilen çözeltiler santrüfüjlenerek çözelti ve çökelti olmak üzere iki fraksiyona ayrıldı ve kurutularak analiz edildi. Bu iki fraksiyonun fonksiyonel grupları ham hümik asid (HA-H) ile kıyaslanarak meydana gelen değişimler belirlendi.

30 μL enzim miktarları ile yapılan 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık reaksiyonlar sonucunda elde edilen çözelti ve çökelti fraksiyonları Şekil 6.39 ve Şekil 6.40'da verilmektedir. Çözelti fraksiyonlarının hepsinde zamana bağlı olarak değişen belirgin bir fark gözlenmemiştir. FTIR spektrumlarında 3429, 1635, 1286, 1180, 1068, 1008, 885, 850 613 ve 578 cm^{-1} 'de bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.39). Çökelti fraksiyonları incelendiğinde ise çözelti fraksiyonunda olduğu gibi fonksiyonel gruplarda zamana bağlı bir değişim gözlenmemiştir. Çökeltilerin FTIR spektrumlarında 3420, 1637, 1400, 1186, 1056, 884, 851 ve 579 cm^{-1} 'de bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.40).

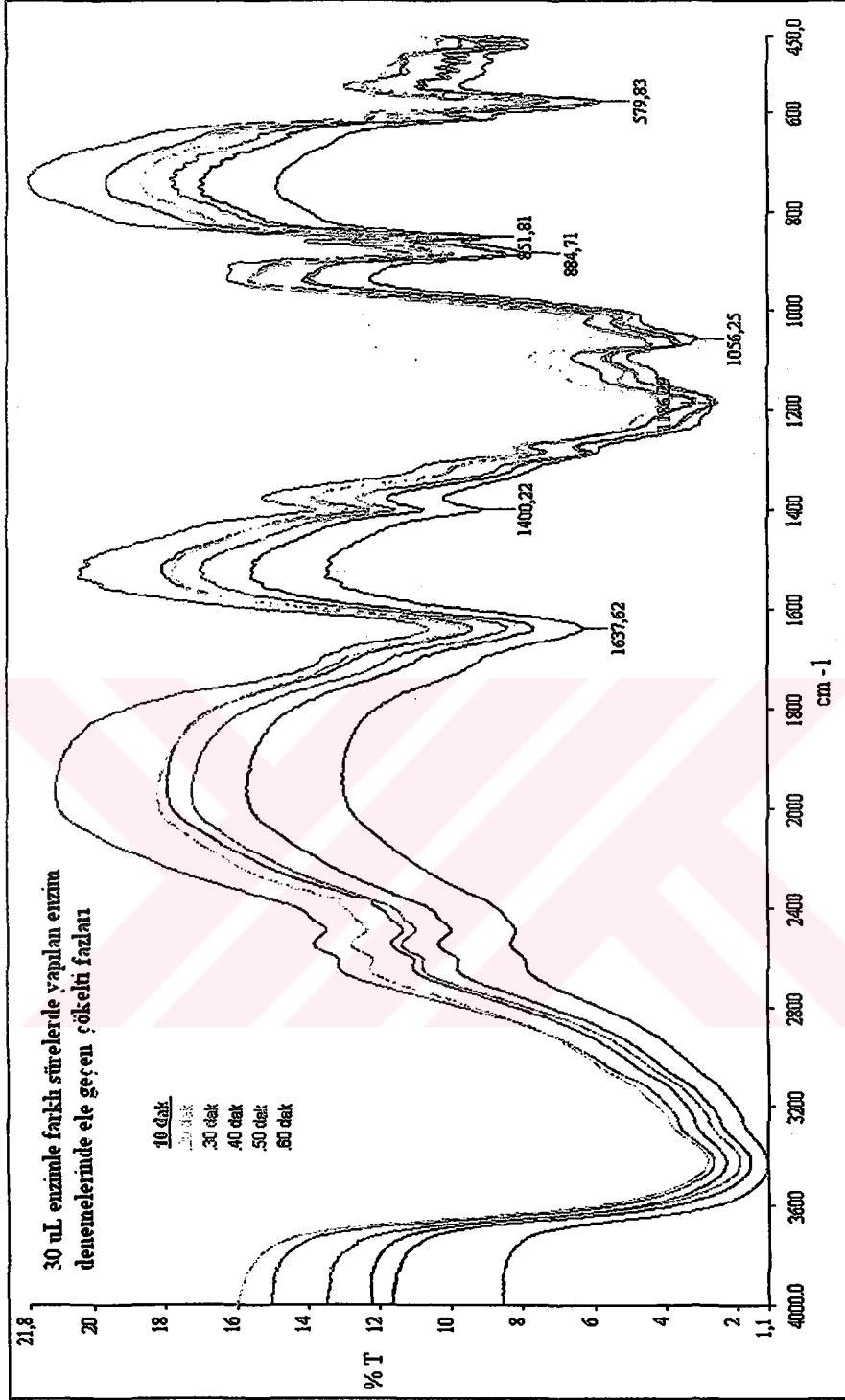
Çözelti fraksiyonları için şahit deneme, enzimli deneme ve ham linyitten ekstrakte edilen hümik asid (HA-H) kıyaslandığında enzim etkisiyle 1384 cm^{-1} 'de ki bandın kaybolduğu, 850 ve 885 cm^{-1} 'de bandların oluştuğu, 1287 ve 1068 cm^{-1} 'de bandların ortaya çıktığı görülmüştür (Şekil 6.43). HA-H ise 3429, 2426, 1643, 1384, 1073, 861 cm^{-1} 'de ki bandları içermektedir.

Çökelti fraksiyonları için şahit deneme, enzimli deneme ve ham linyitten ekstrakte edilen hümik asid (HA-H) kıyaslandığında enzim etkisiyle 1400, 1067, 886 ve 850 cm^{-1} 'de bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.44).

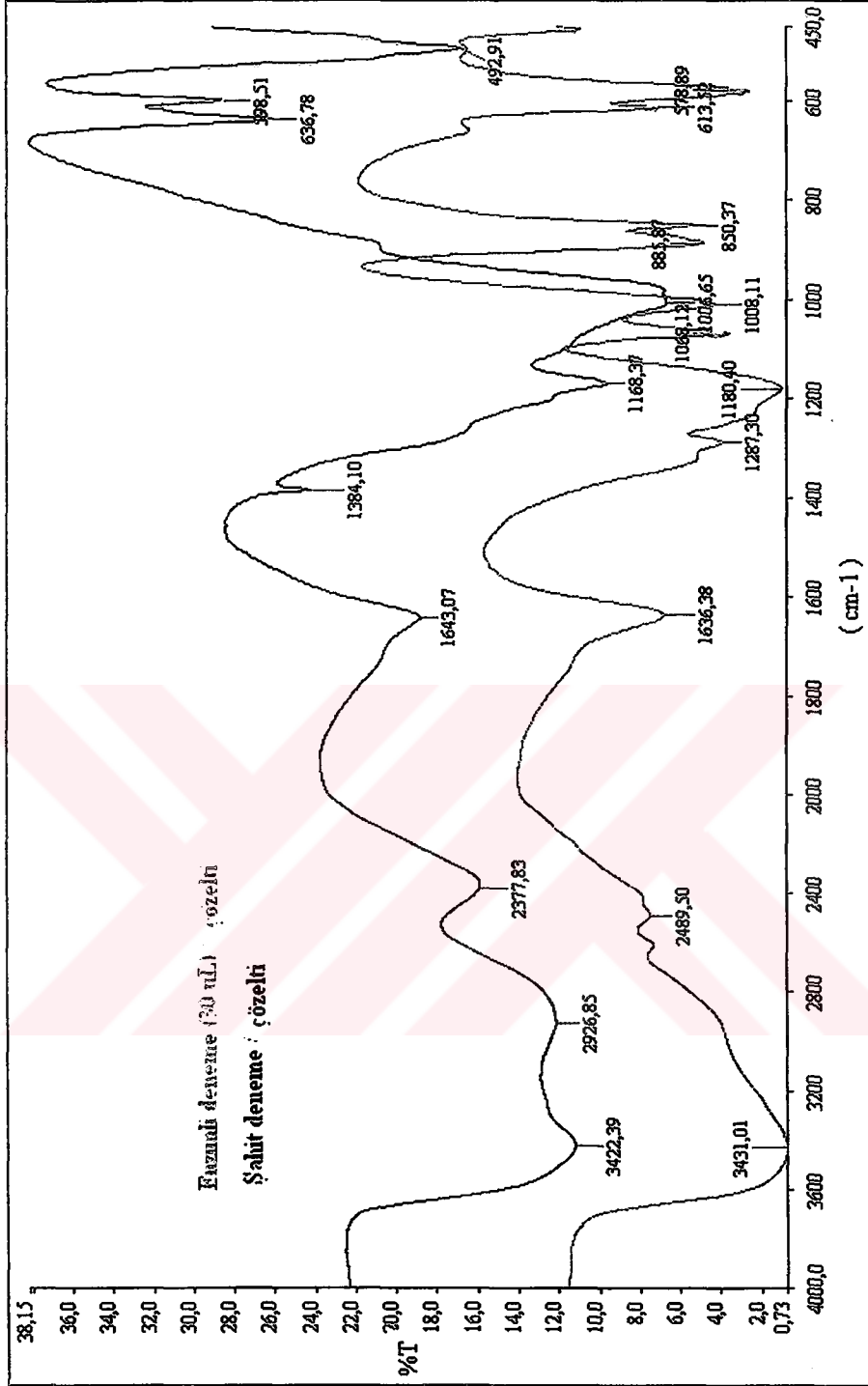
Çözelti ve çökeltiler kıyaslandığında çözelti ürünlerinde çökeltilerden farklı olarak 1286 ve 1008 cm^{-1} 'de bandların yer aldığı, çökeltilerde ise 1400 cm^{-1} 'de bandın oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.45).



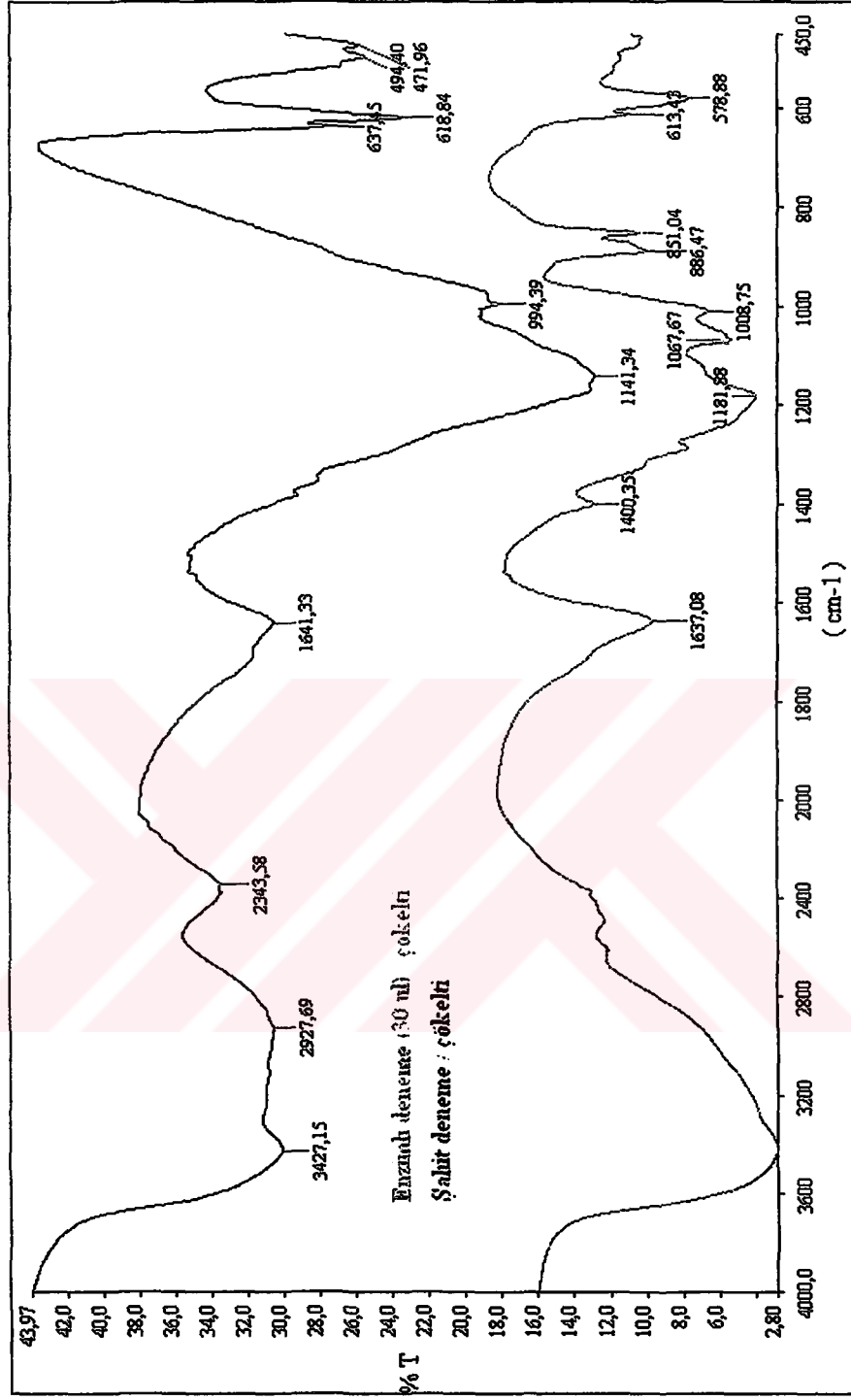
Şekil 6.39 HA-H ve HRP enziminin (30 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları



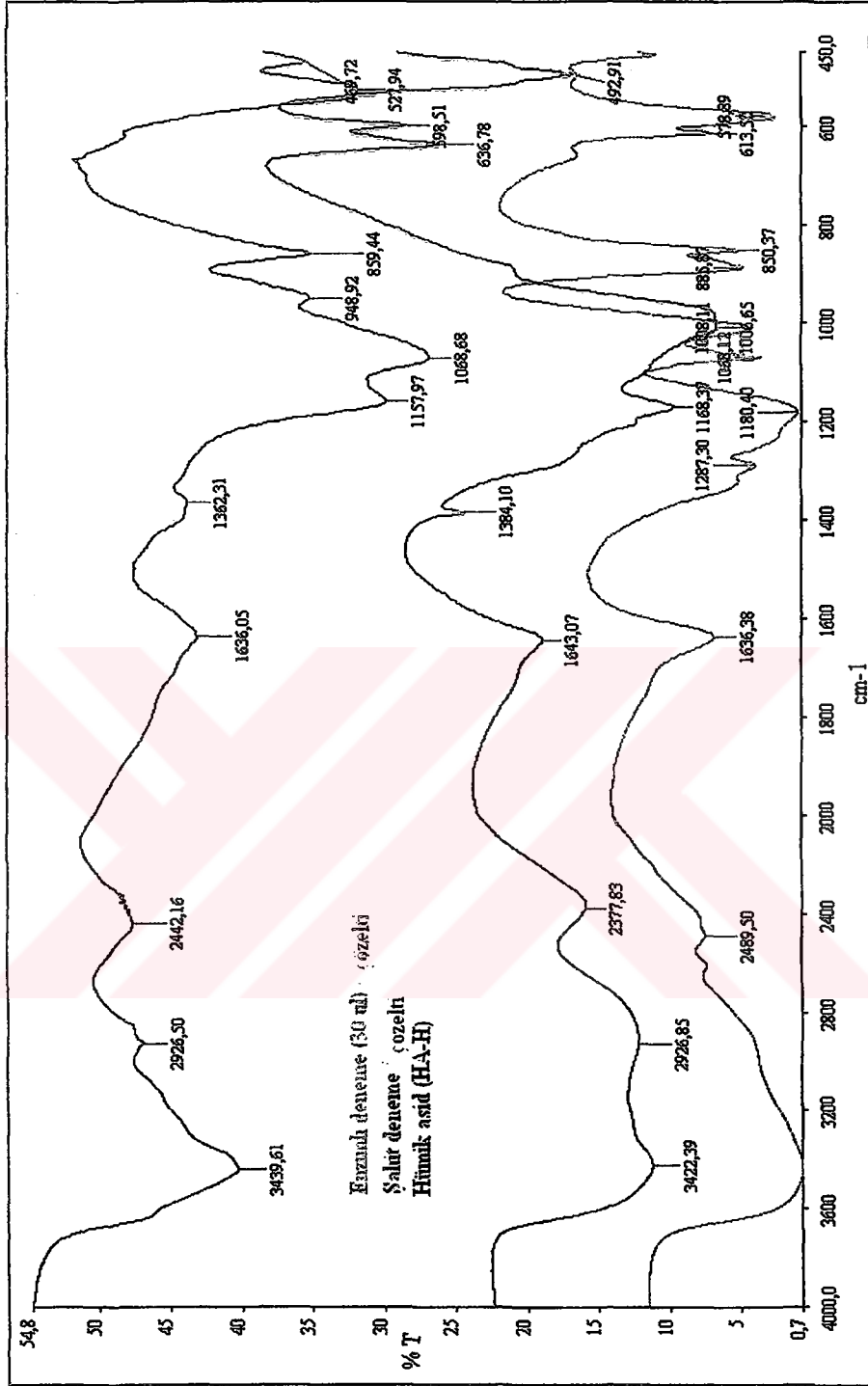
Şekil 6.40 HA-H ve HRP enziminin (30 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çöktillerin FTIR spektrumları



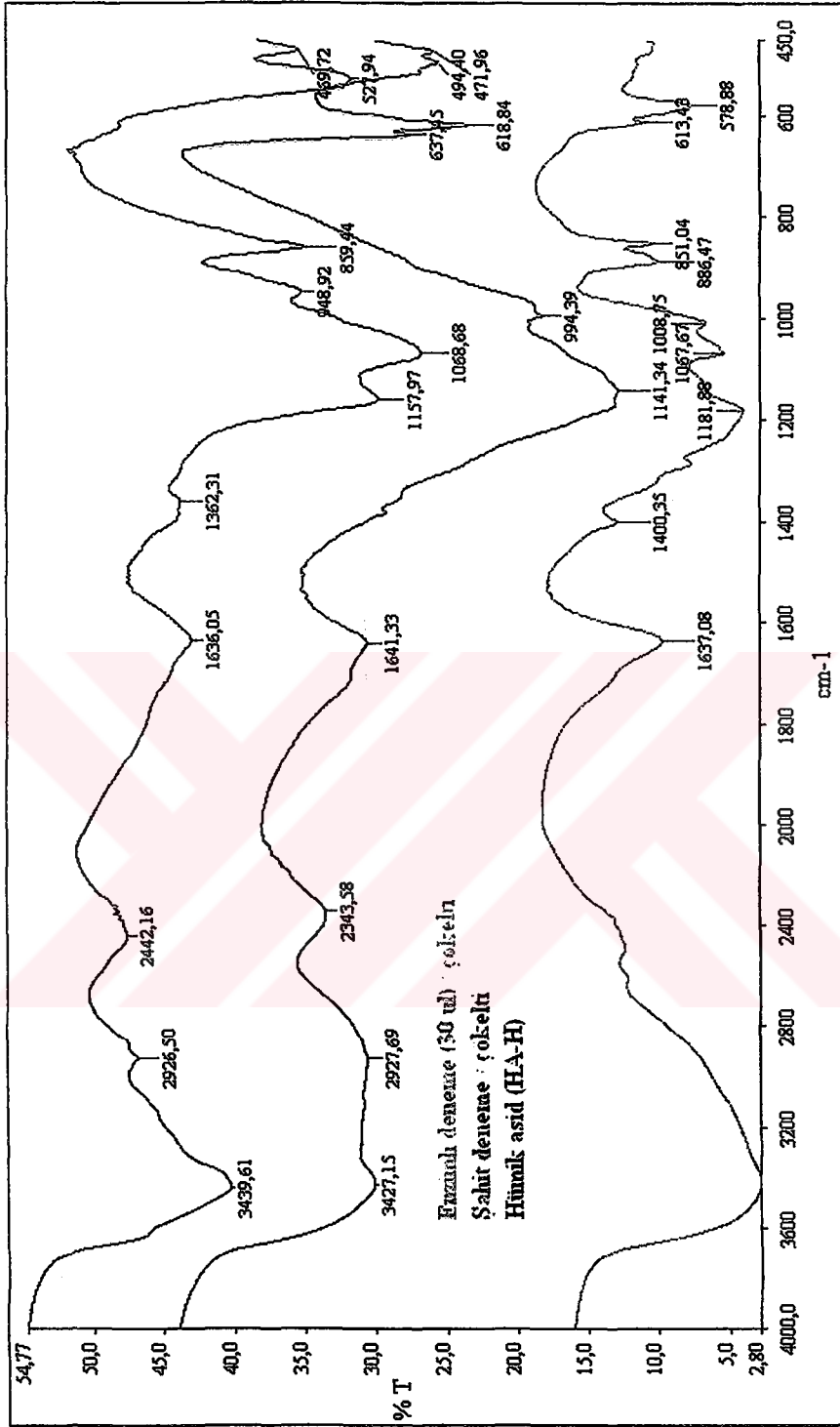
Şekil 6.41 HA-H'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin FTIR spektrumu



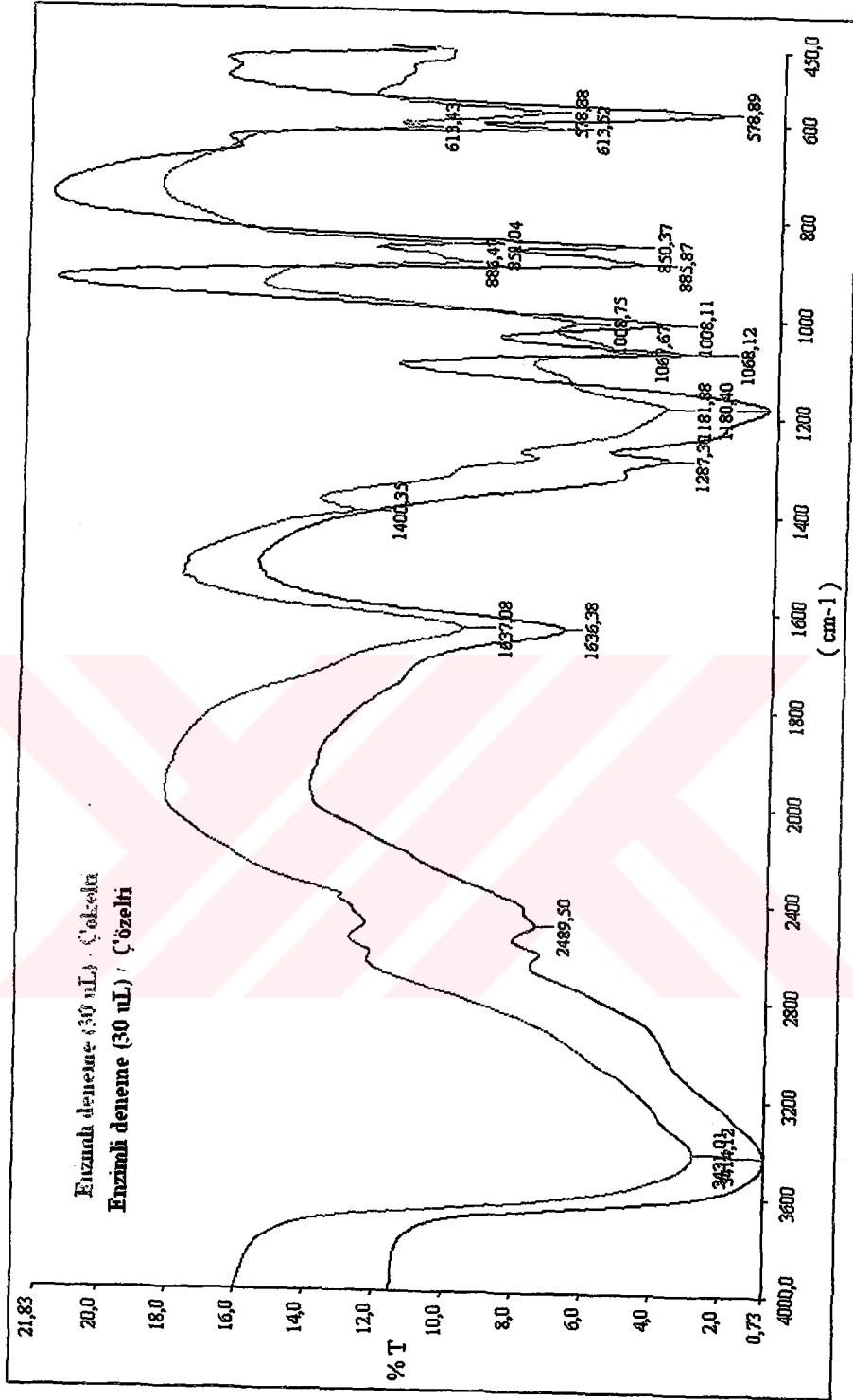
Şekil 6.42 HA-H'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu



Şekil 6.43 HA-H'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltilisinin hümmik asitle (HA-H) karşılaştırılması



Şekil 6.44 HA-H'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çöktelinin hümkik asidle (HA-H) karşılaştırılması



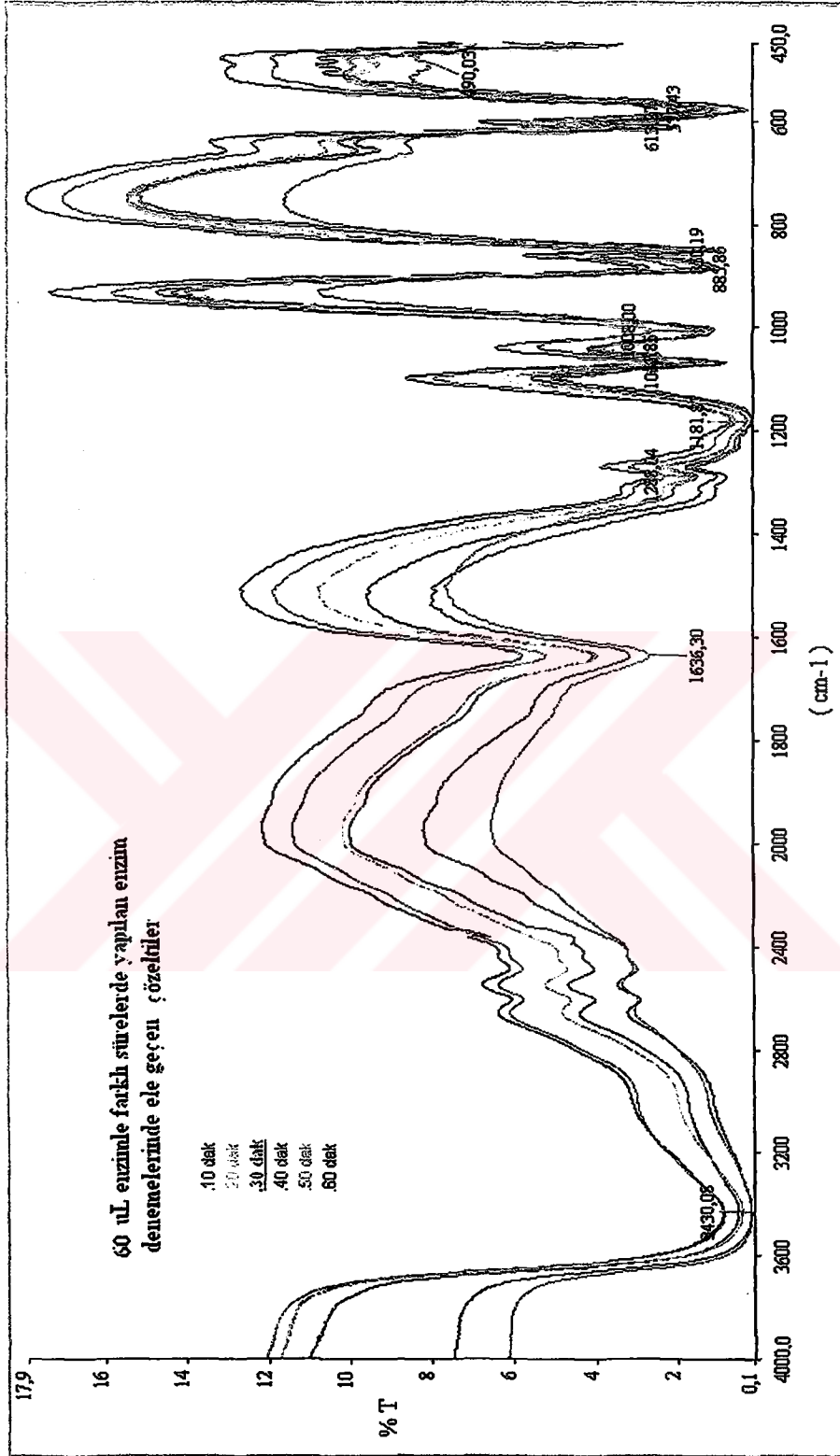
Şekil 6.45 HA-H'in HRP enzimiyle (30 μ L) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çöktellerin karşılaştırılması

60 µL enzim miktarları ile yapılan 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık reaksiyonlar sonucunda ele geçen çözelti ve çökelti fraksiyonları Şekil 6.46 ve Şekil 6.47'de verilmektedir. Çözelti fraksiyonlarının hepsinde zamana bağlı olarak değişen belirgin bir fark gözlenmemiştir. FTIR spektrumlarında 3430, 1635, 1288, 1180, 1068, 1008, 885, 850 613 ve 578 cm^{-1} 'de bandların olduğu gözlenmiştir (Şekil 6.46). Çökelti fraksiyonları incelendiğinde çözelti fraksiyonlarında olduğu gibi fonksiyonel gruplarda zamana bağlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu fraksiyonların FTIR spektrumlarında 3425, 1638, 1400, 1180, 1065, 885, 850 ve 578 cm^{-1} 'de bandların olduğu gözlenmiştir (Şekil 6.47).

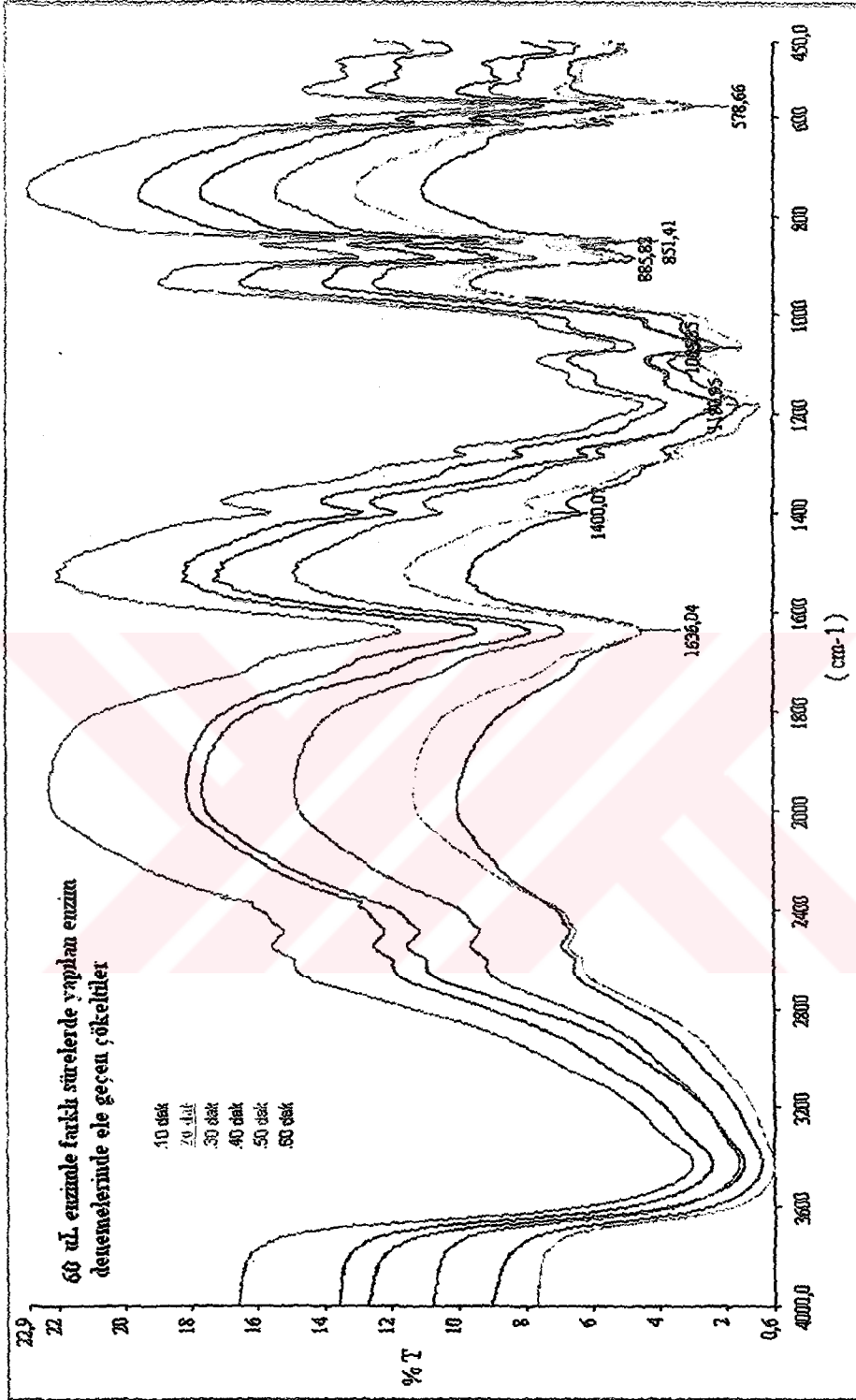
Çözelti fraksiyonları için şahit deneme, enzimli deneme ve ham linyitten ekstrakte edilen hümik asid (HA-H) kıyaslandığında enzim etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda 1384 cm^{-1} 'de ki bandın kaybolduğu, 850 ve 885 cm^{-1} 'de ki bandların olduğu, 1286 ve 1068 cm^{-1} 'de ki bandların ortaya çıktığı görülmüştür (Şekil 6.50).

Çökelti fraksiyonları için şahit deneme, enzimli deneme ve ham linyitten ekstrakte edilen hümik asid (HA-H) kıyaslandığında enzim etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda 1400, 1065, 885 ve 850 cm^{-1} 'de ki bandların olduğu gözlenmiştir (Şekil 6.51). Şahit denemedeki 2343 ve HA-H'deki 2426 cm^{-1} 'de ki bandların tamamen kaybolduğu gözlenmiştir.

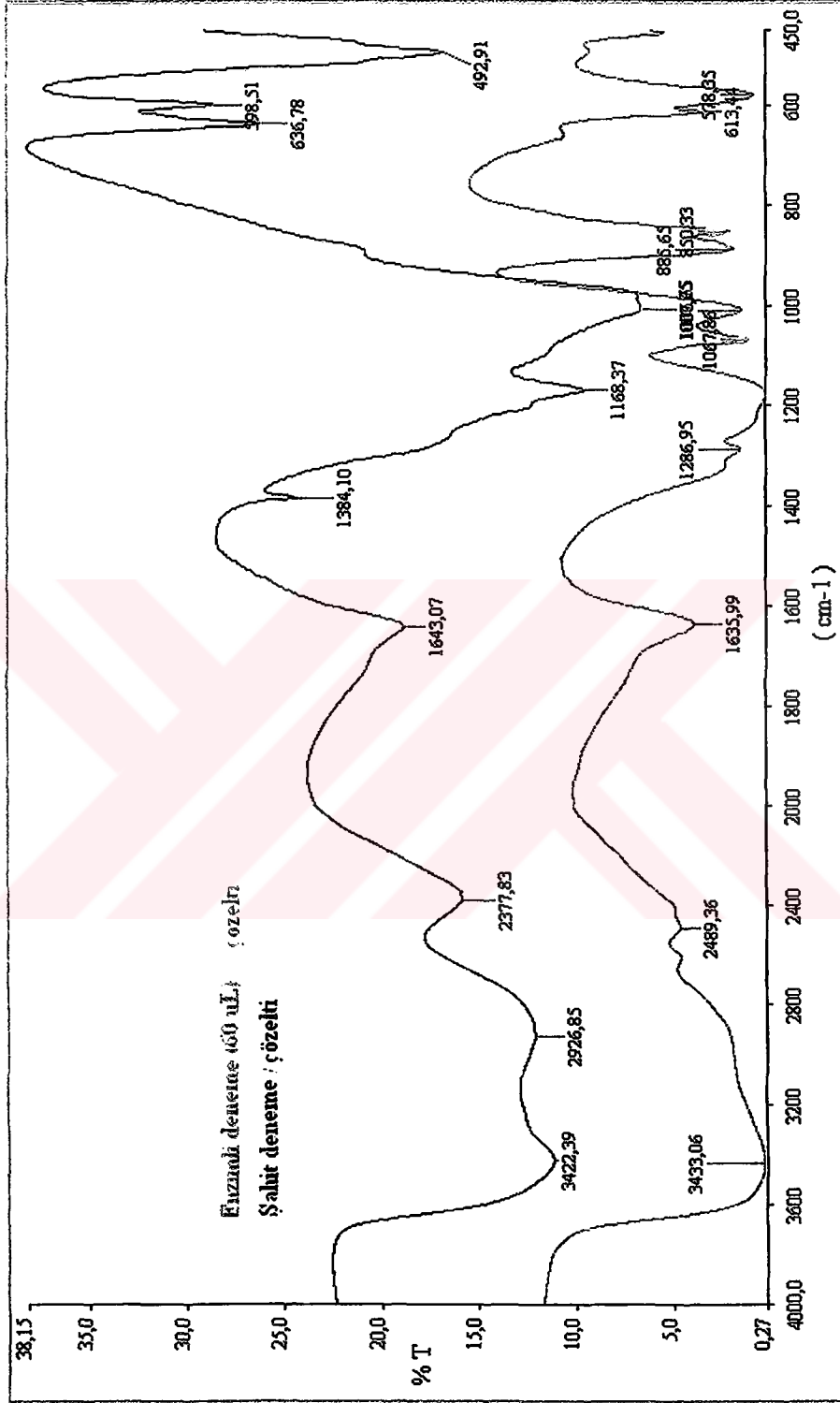
Çözelti ve çökelti fraksiyonları kıyaslandığında çözelti ürünlerinde çökeltilerden farklı olarak 1286 ve 1008 cm^{-1} 'de bandların yer aldığı, çökeltilerde ise 1400 cm^{-1} 'de ki bandın olduğu gözlenmiştir (Şekil 6.52).



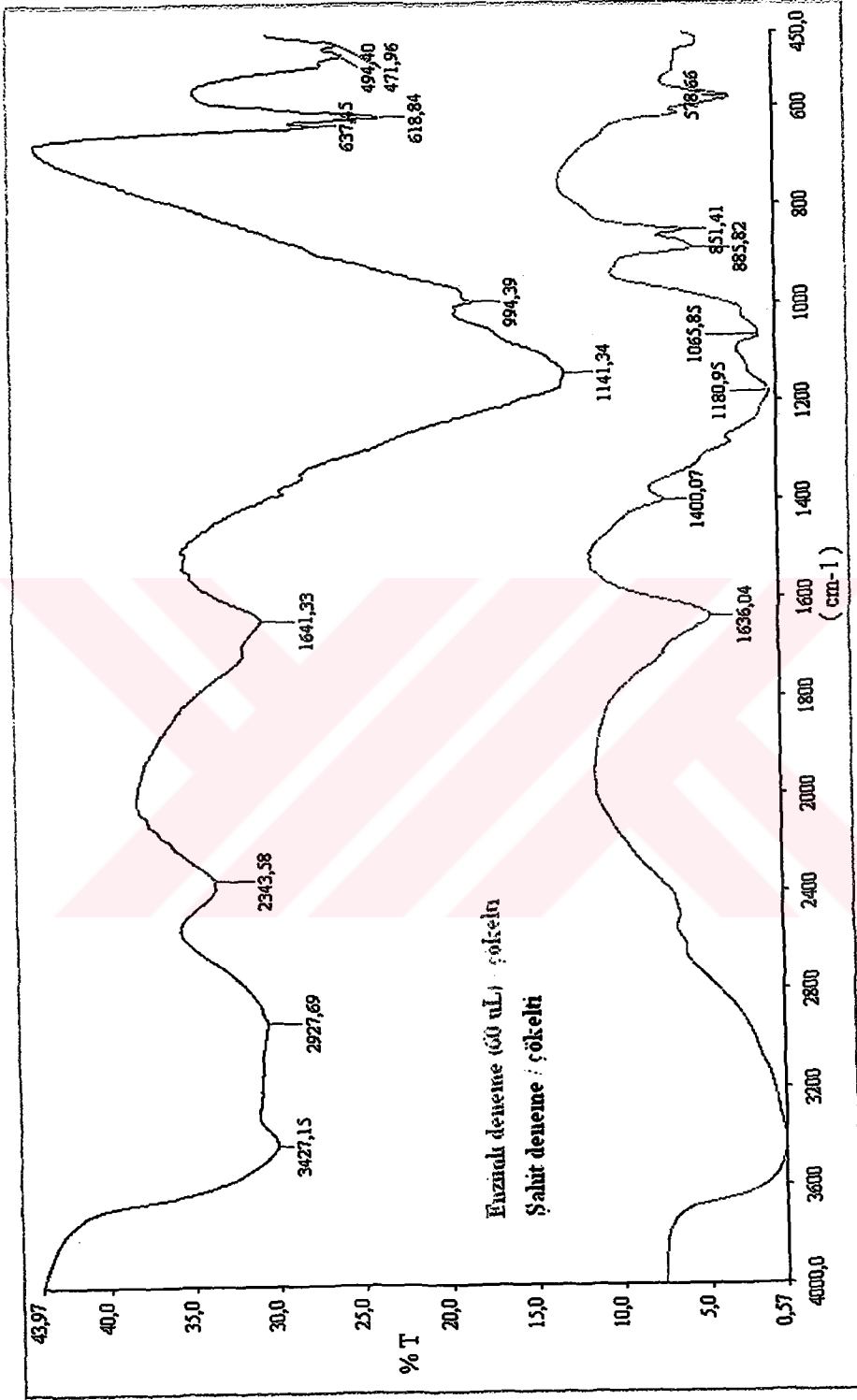
Şekil 6.46 HA-H ve HRP enziminin (60 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları



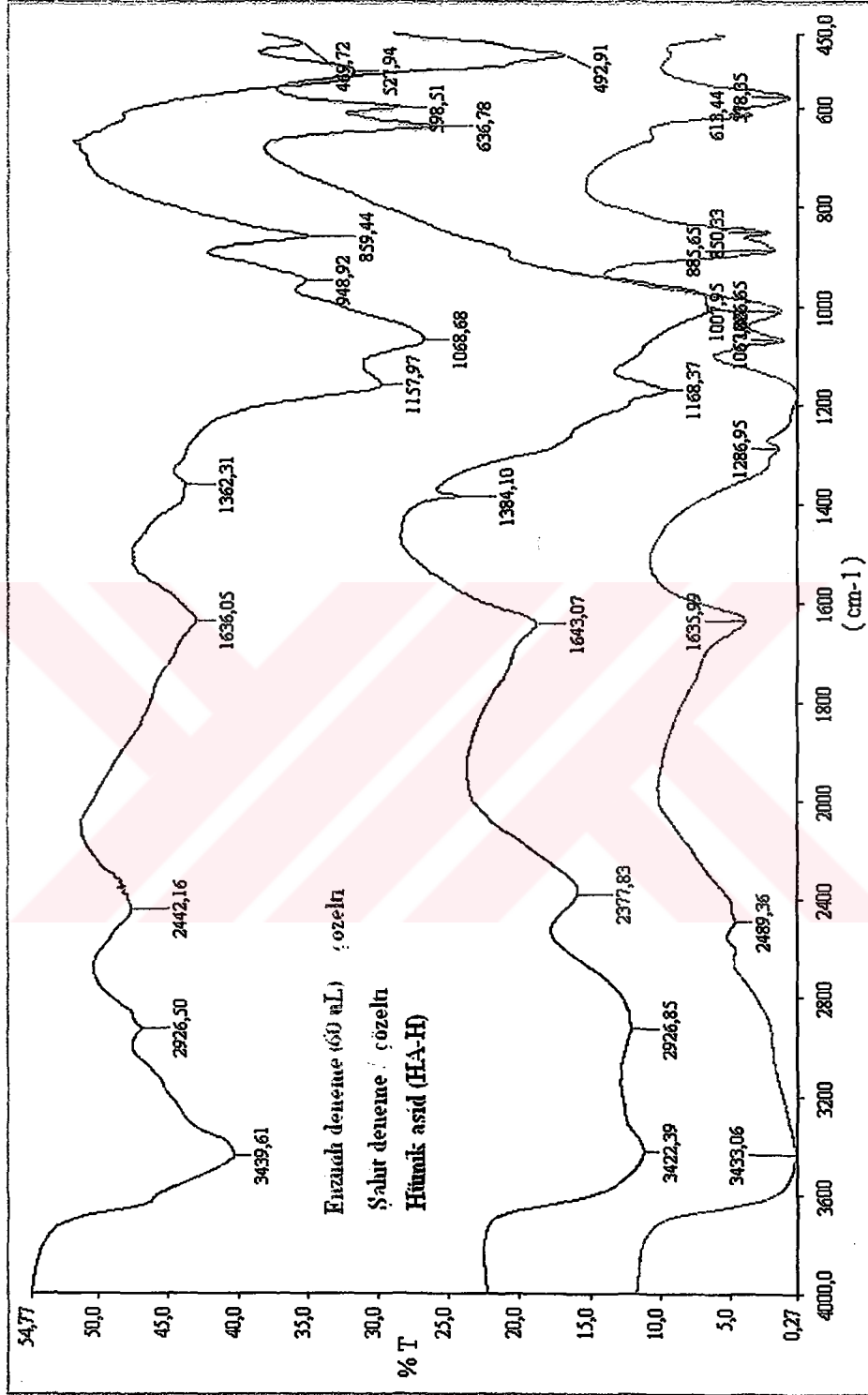
Şekil 6.47 HA-H ve HRP enziminin (60 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları



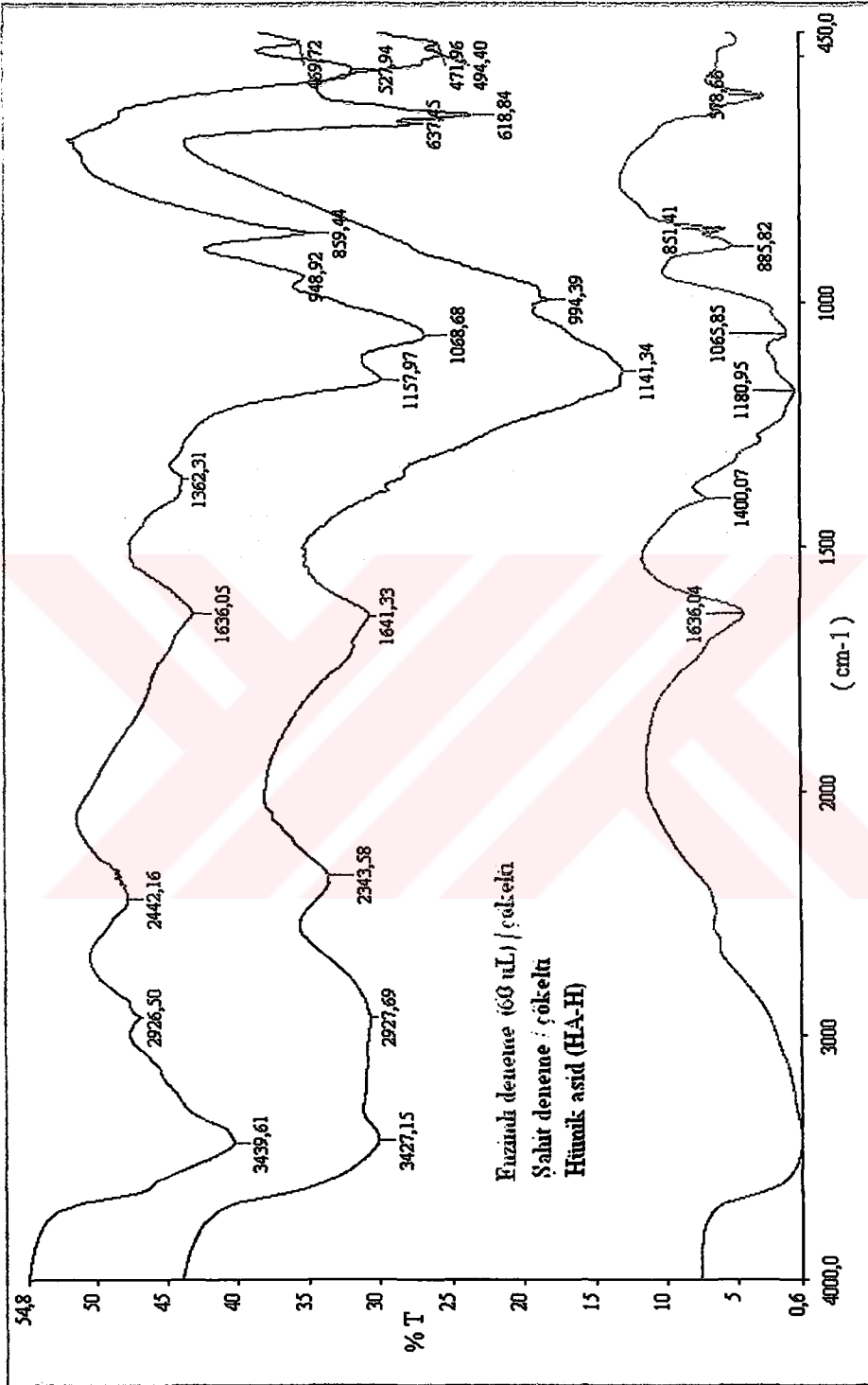
Şekil 6.48 HA-H'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin FTIR spektrumu



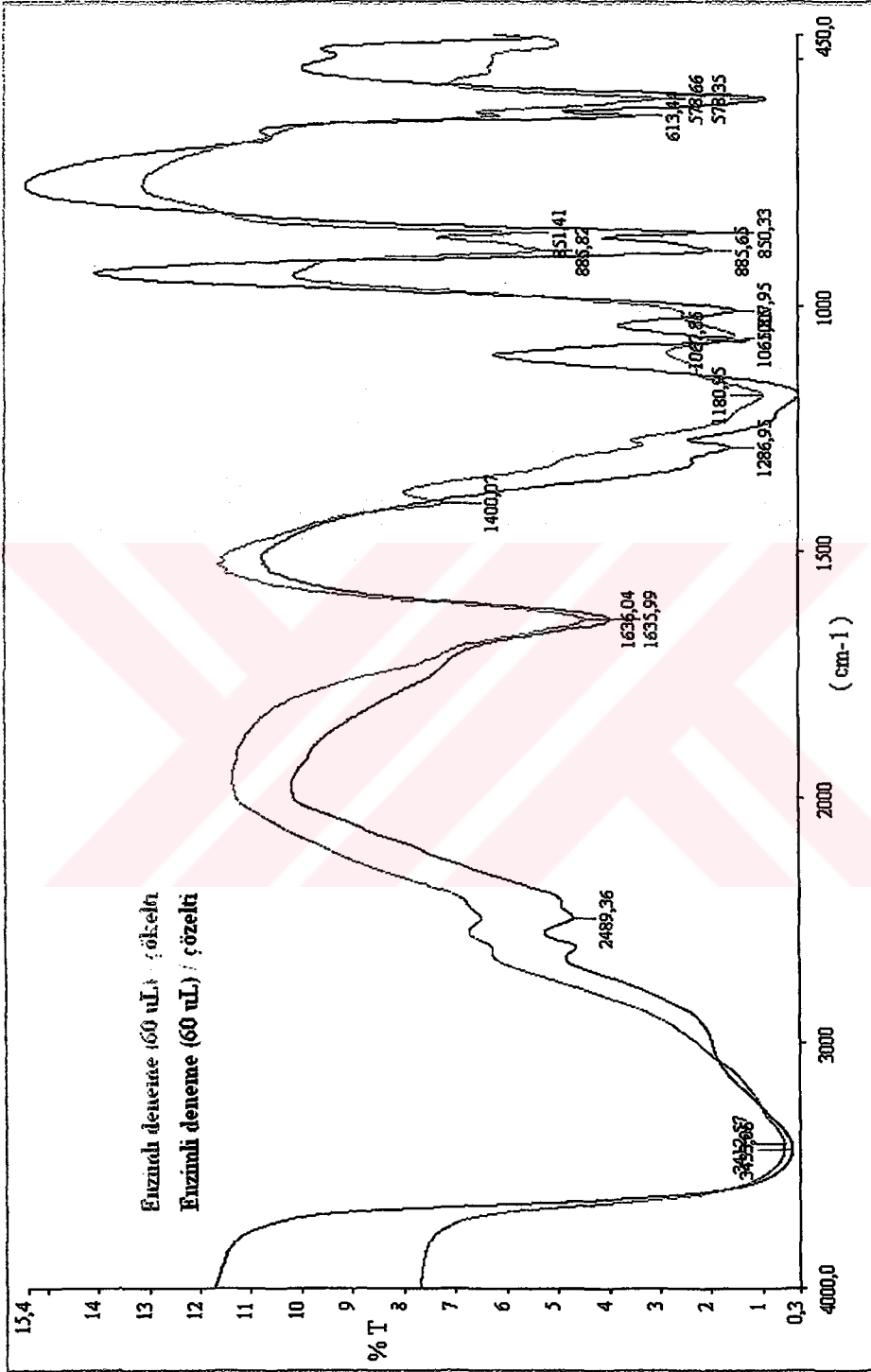
Şekil 6.49 HA-H'in HRP enzimiyle (60 μ L) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu



Şekil 6.50 HA-H'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin hüyük asitle (HA-H) karşılaştırılması



Şekil 6.51 HA-H'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin hüyük asidle (HA-H) karşılaştırılması.



Şekil 6.52 HA-H'in HRP enzimiyle (60 µL) gerçekleştirilen reaksiyondan elde edilen çözelti ve çökeltilerin karşılaştırılması

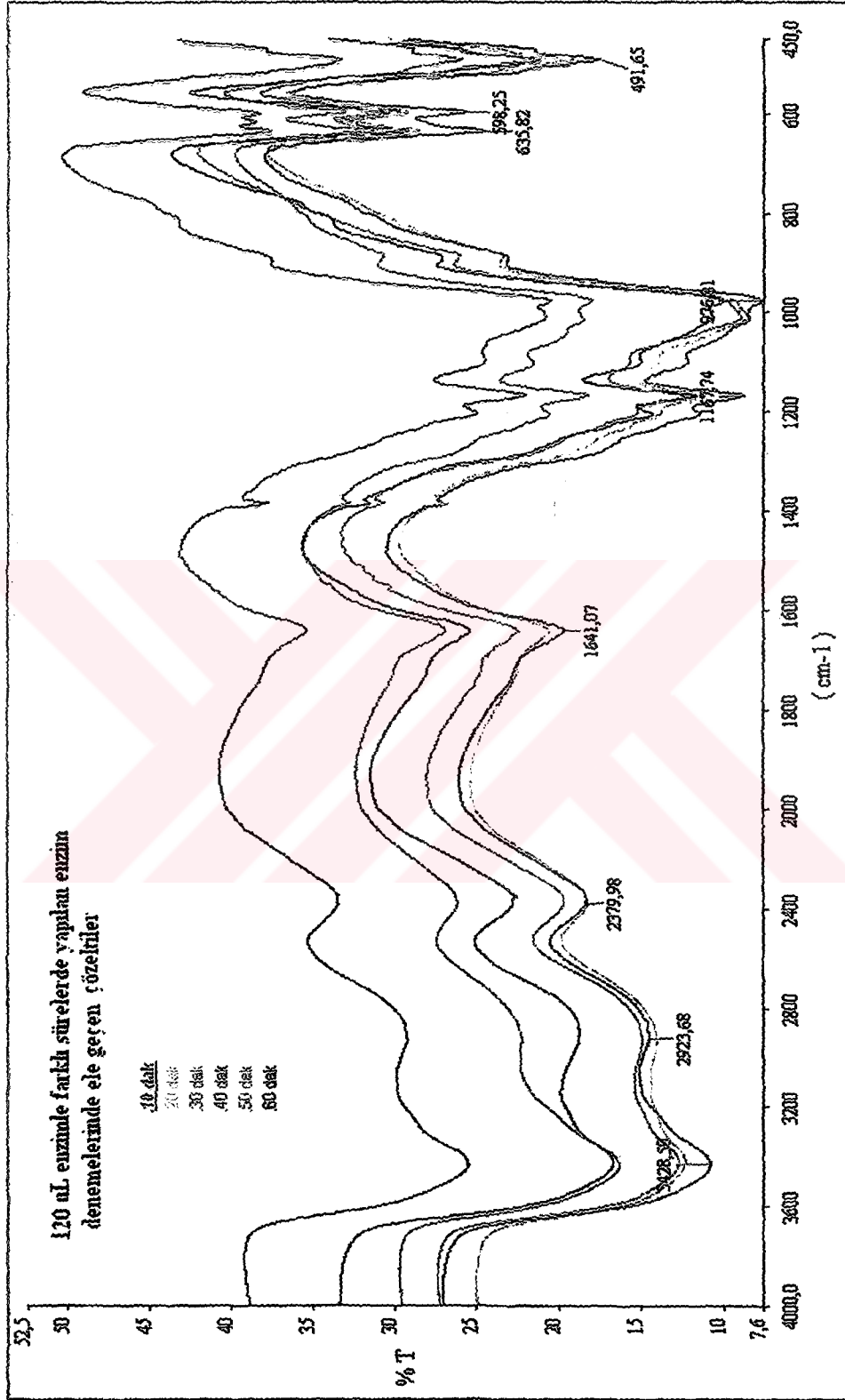
120 μL enzim miktarları ile yapılan 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık reaksiyonlar sonucunda ele geçen çözeltilerin çözelti ve çökelti fraksiyonları Şekil 6.53 ve Şekil 6.54'de verilmektedir. Çözelti fraksiyonlarında zamana bağlı yapıda fazla bir değişimin olmadığı gözlenmiştir.

Çözeltilerin FTIR spektrumlarında 3428, 2923, 2379, 1641, 1167, 976, 635, 598 ve 491 cm^{-1} 'de bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.53). Çökelti fraksiyonları incelendiğinde ise çözelti fraksiyonunda olduğu gibi fonksiyonel gruplarda zamana bağlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu ürünlerin FTIR spektrumlarında 3430, 2396, 1705, 1636, 1384, 1136, 1049, 637, 619, 517 ve 470 cm^{-1} 'de bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.54). Şahit deneme, enzimli deneme (çözelti) ve hümitik asid (HA-H) kıyaslandığında enzim etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda HA-H'de ki 861 cm^{-1} 'de ki bandın kaybolduğu, 1009 ve 1168 cm^{-1} 'deki bandların oluştuğu görülmüştür (Şekil 6.57).

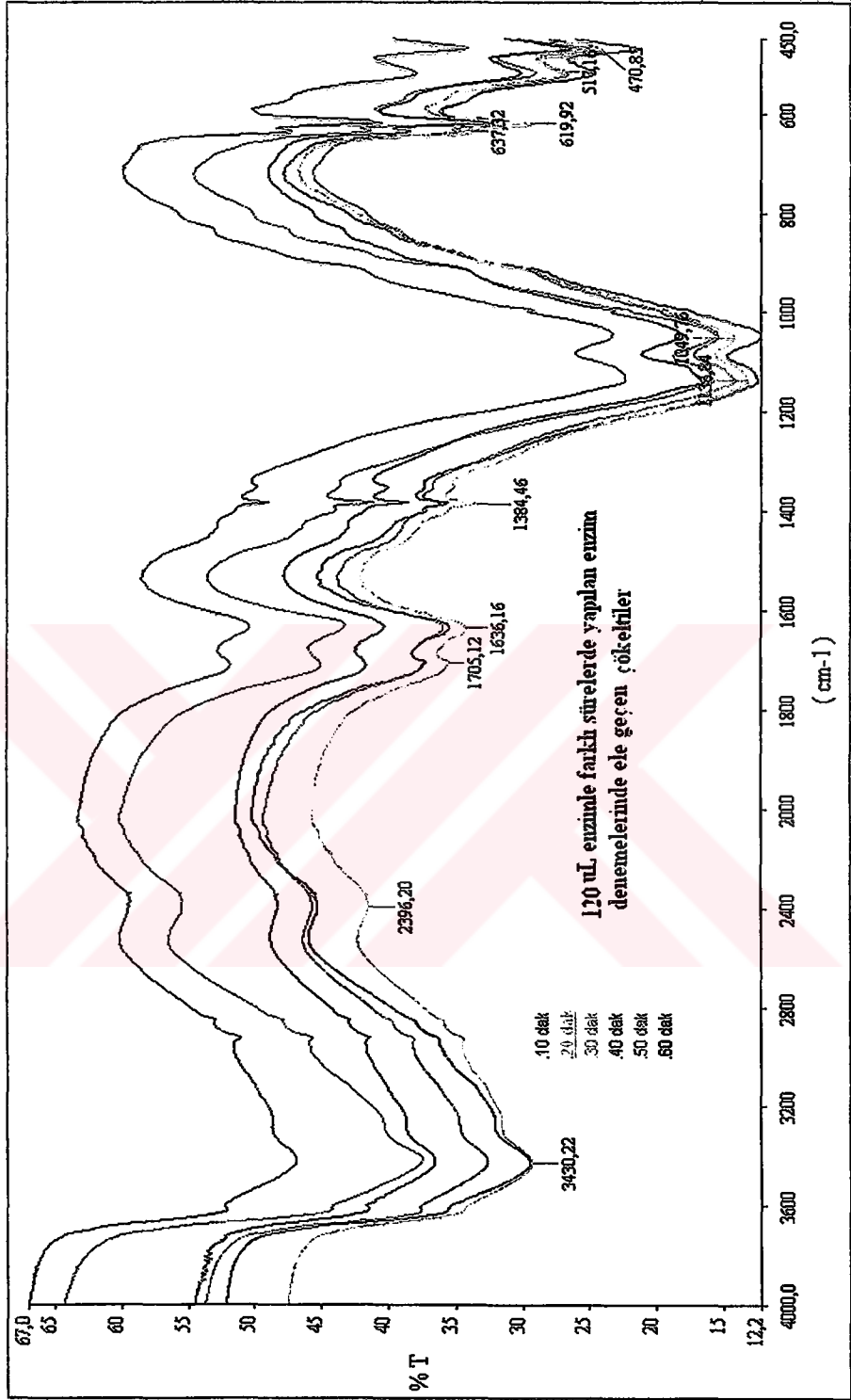
Şahit deneme, enzimli deneme (çökelti) ve HA-H kıyaslandığında enzim etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda 1705, 1136, 1049 cm^{-1} 'deki bandların şahit numuneden farklı olarak ortaya çıktığı ve HA-H'de 861 cm^{-1} 'deki bandın kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 6.58).

Çözelti ve çökelti kıyaslandığında çözelti ürünlerinde çökeltilerden farklı olarak 1705 cm^{-1} 'deki bandın oluşumunun en belirgin fark olduğu gözlenmiştir (Şekil 6.59).

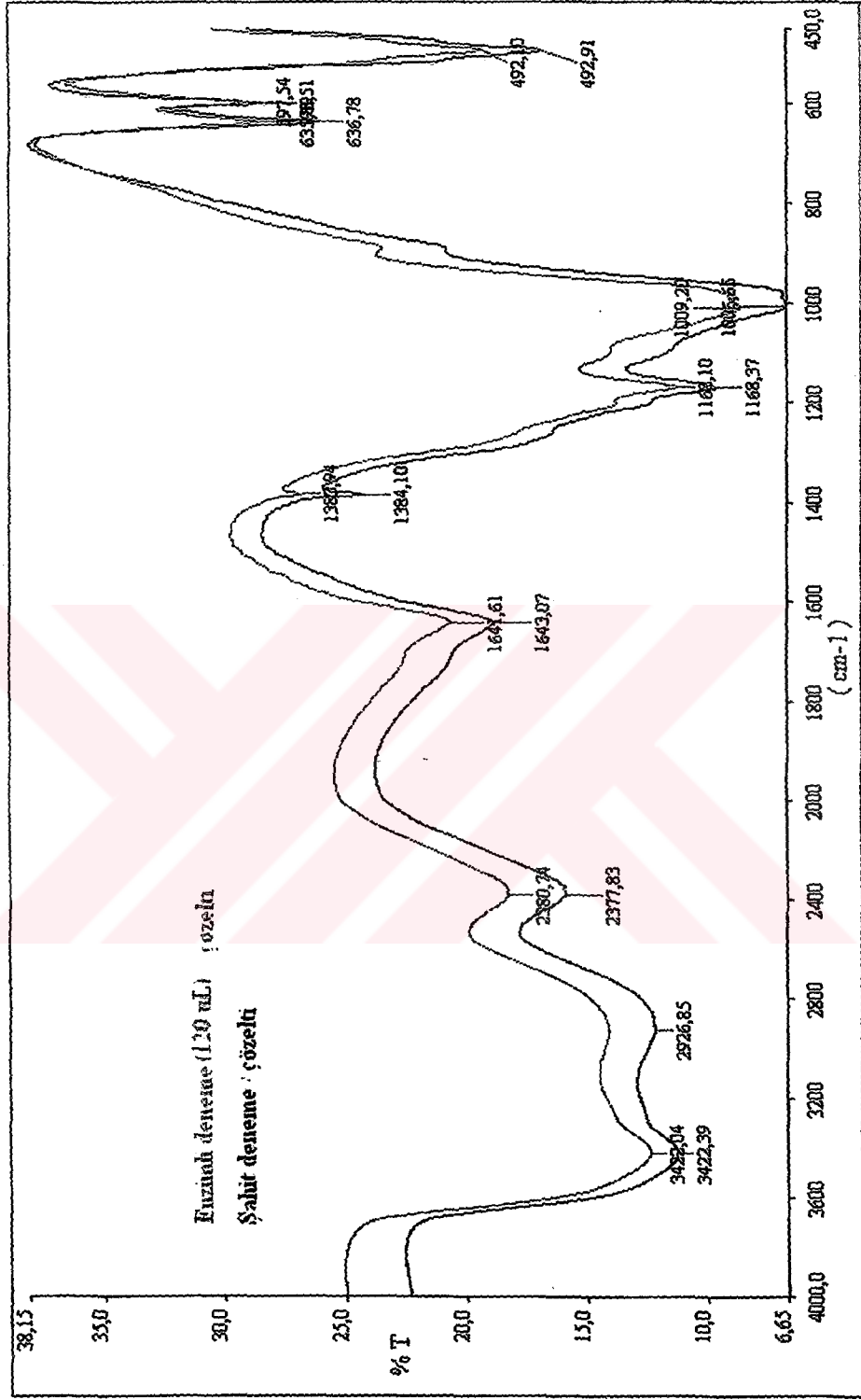
120 μL enzim miktarları ile yapılan 4 saatlik reaksiyon sonucunda elde edilen çözeltilerin çözelti ve çökelti fraksiyonları Şekil 6.60 ve Şekil 6.61'de verilmektedir. Enzimli denemenin çözelti fraksiyonunda 3435, 2870, 2365, 1641, 1201, 1166, 1082, 975, 812, 637 ve 599 cm^{-1} 'de bandlar gözlenmiştir (Şekil 6.60). Aynı grafikte yer alan şahit denemenin çözelti fraksiyonunda ise 3435, 2380, 1644, 1140, 976, 618, 501 cm^{-1} 'de bandlar gözlenmiştir. 1201, 1082, 812 cm^{-1} 'deki bandların enzim etkisiyle oluştuğu ve HA-H'de yer alan 1384 cm^{-1} 'deki bandın kaybolduğu gözlenmiştir. Enzimli denemenin ve şahit denemelerin çökelti fraksiyonlarının aynı grupları içerdiği ve ancak 1384 cm^{-1} 'deki bandın enzimli denemede olmadığı gözlenmiştir.



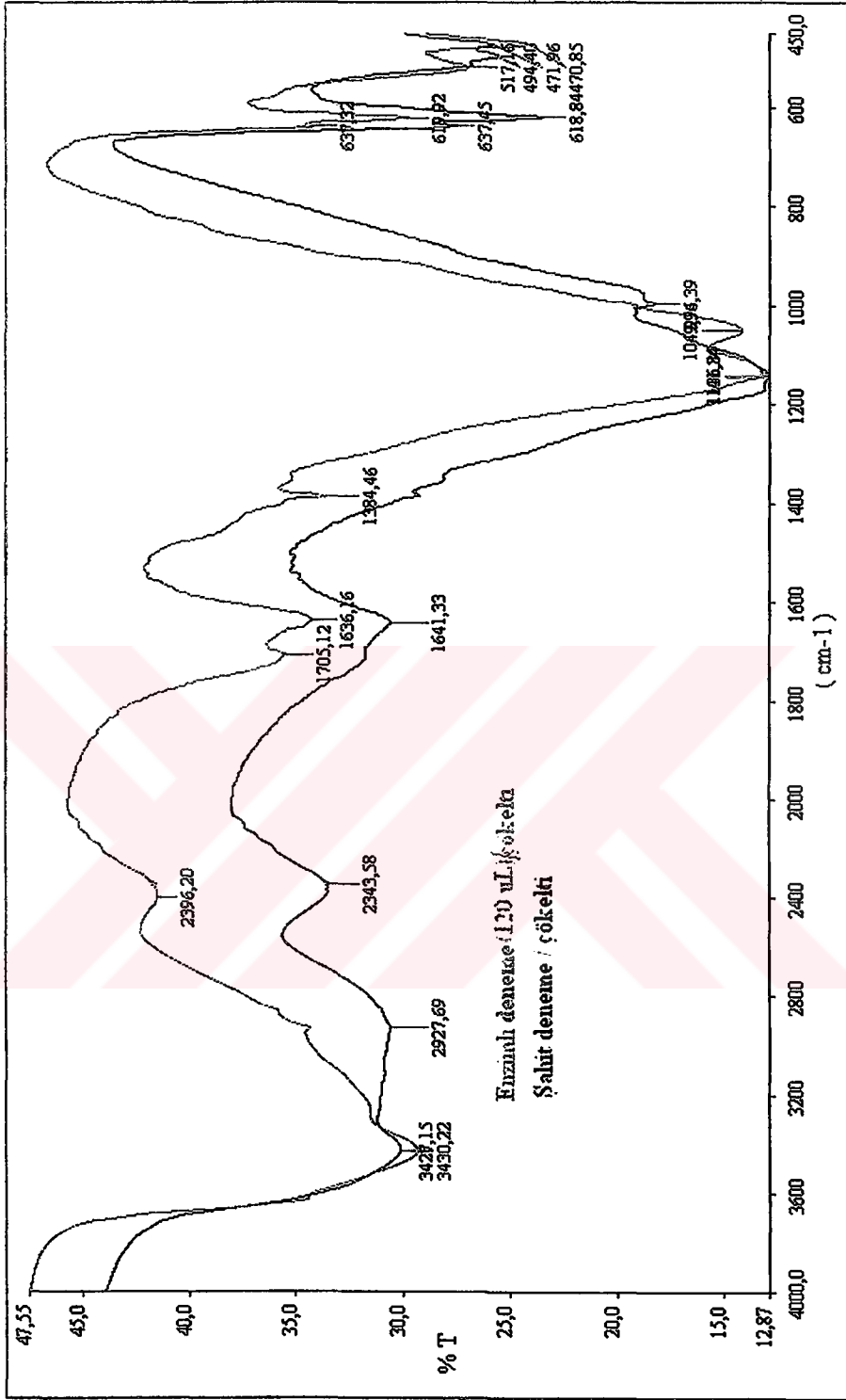
Şekil 6.53 HA-H ve HRP enziminin (120 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen H_2O_2 çözeltilerinin FTIR spektrumları



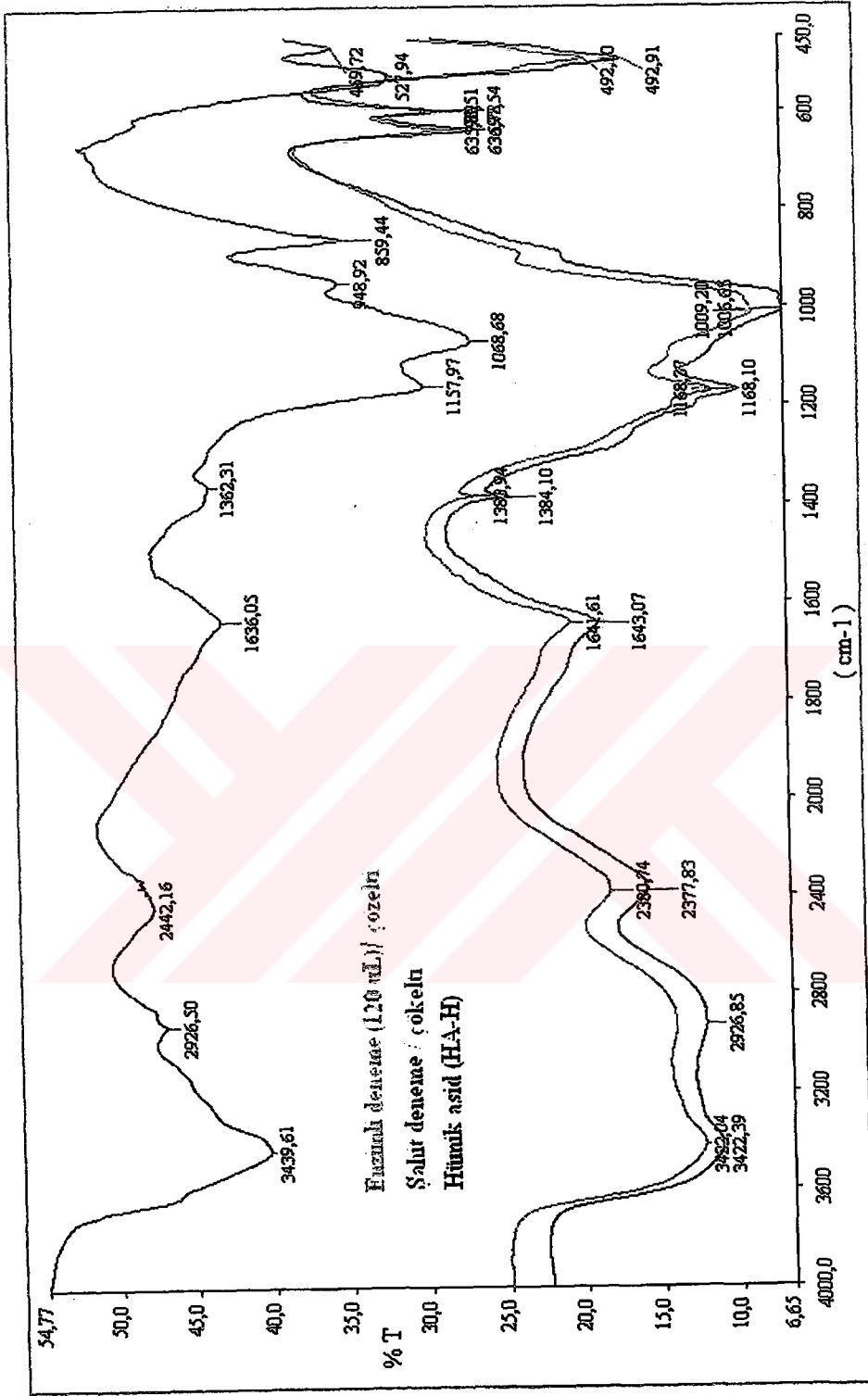
Şekil 6.54 HA-H ve HRP enziminin (120 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları



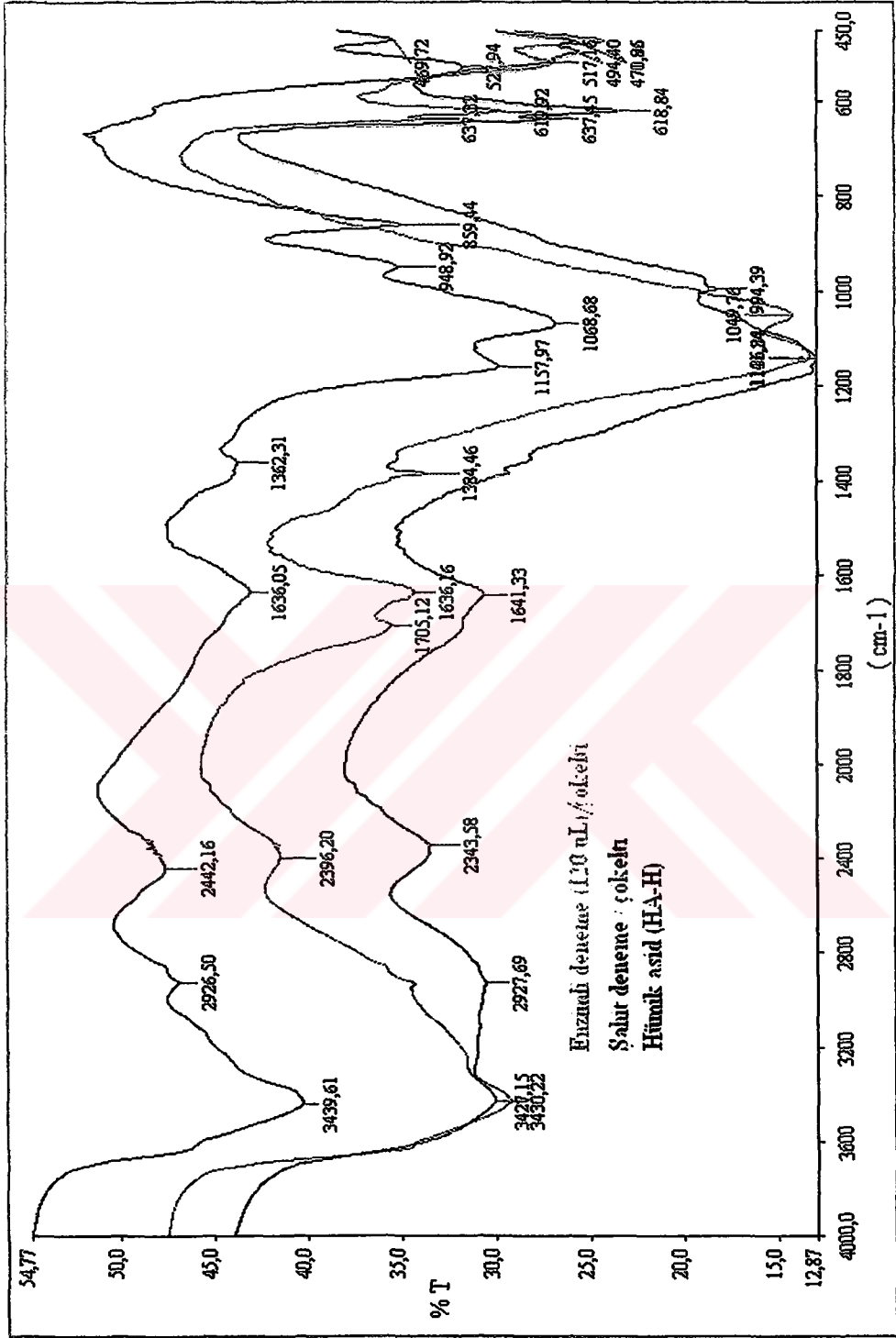
Şekil 6.55 HA-H'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin FTIR spektrumu



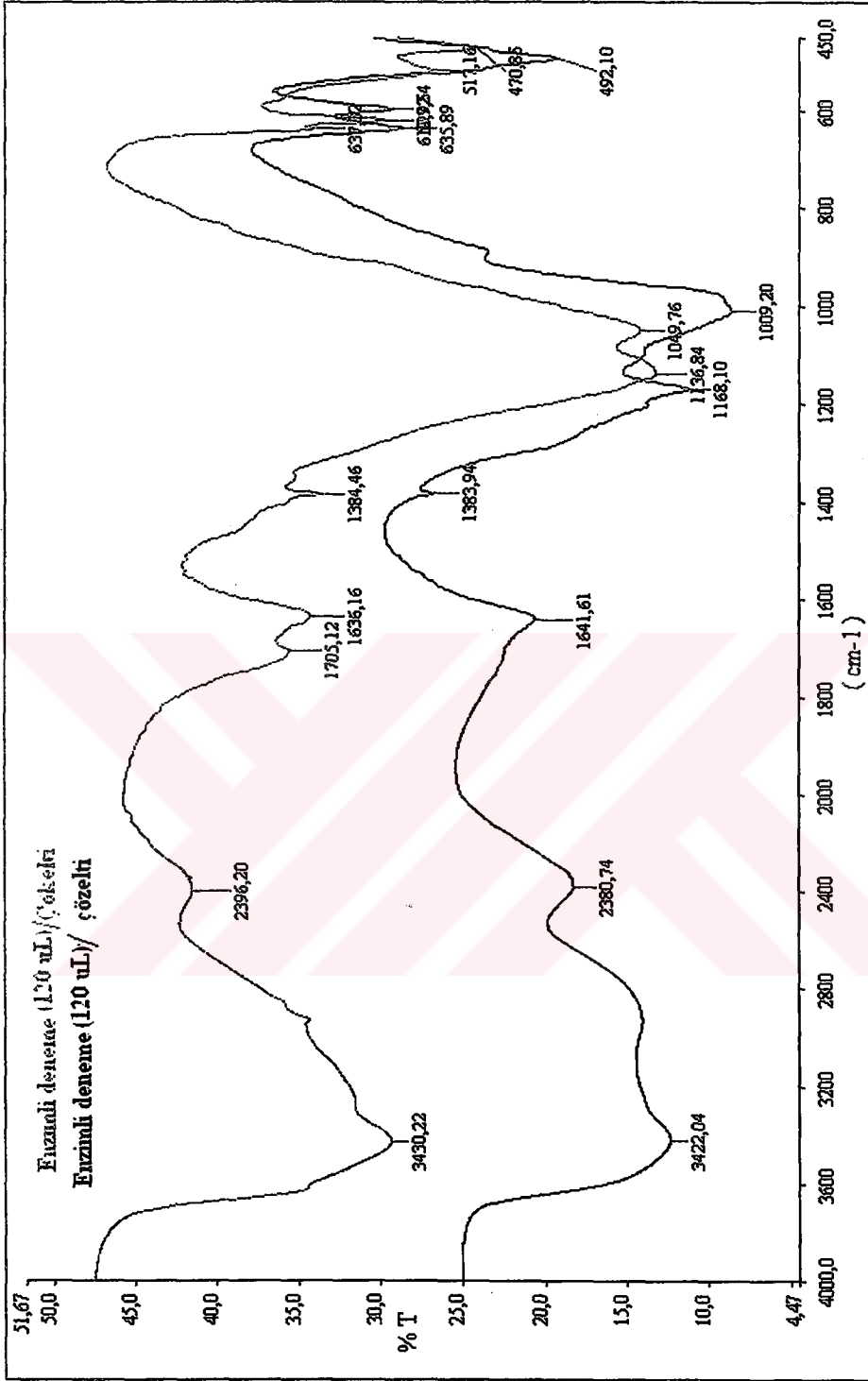
Şekil 6.56 HA-H'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltilinin FTIR spektrumu



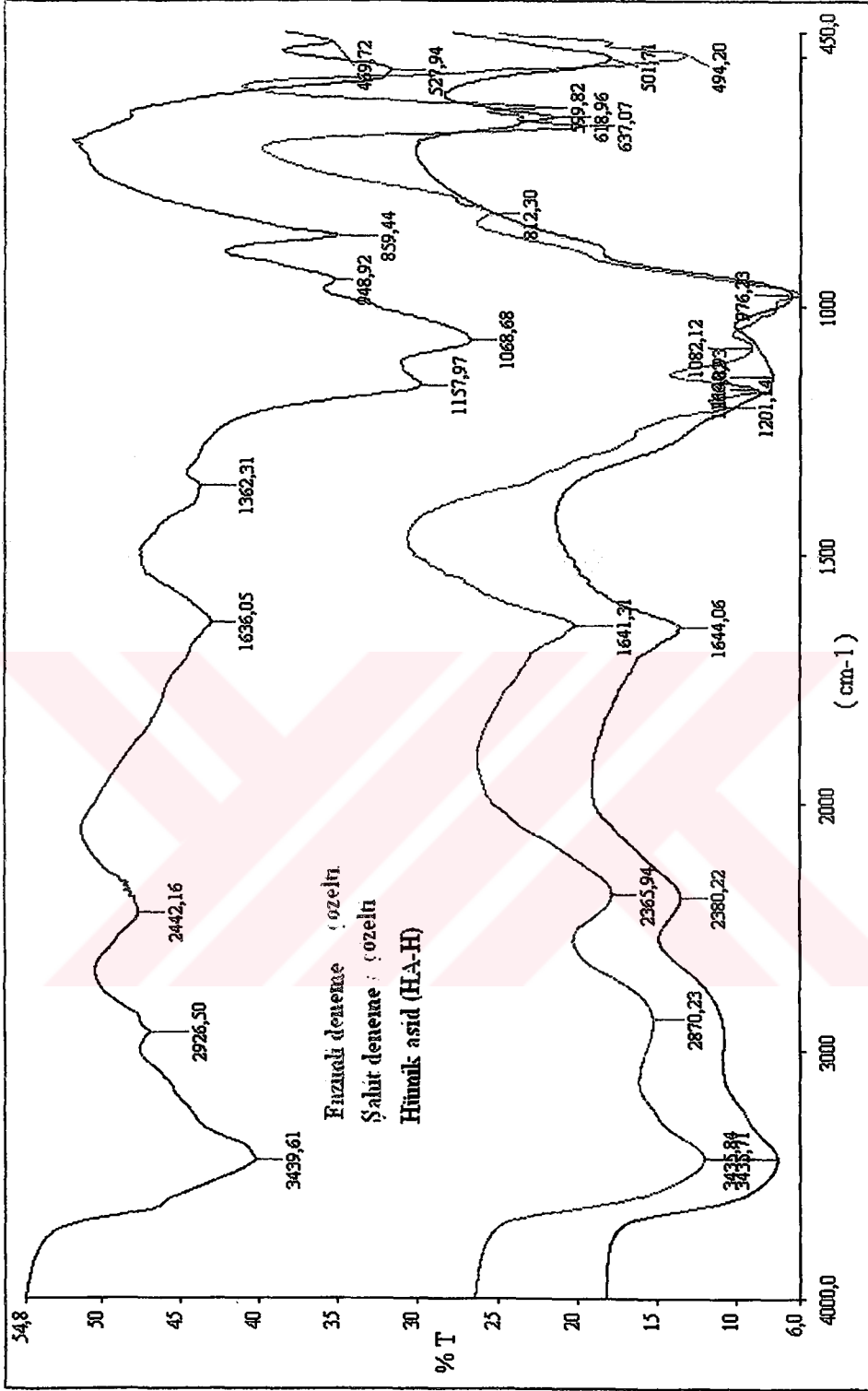
Şekil 6.57 HA-H'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin hüyük asitle (HA-H) karşılaştırılması



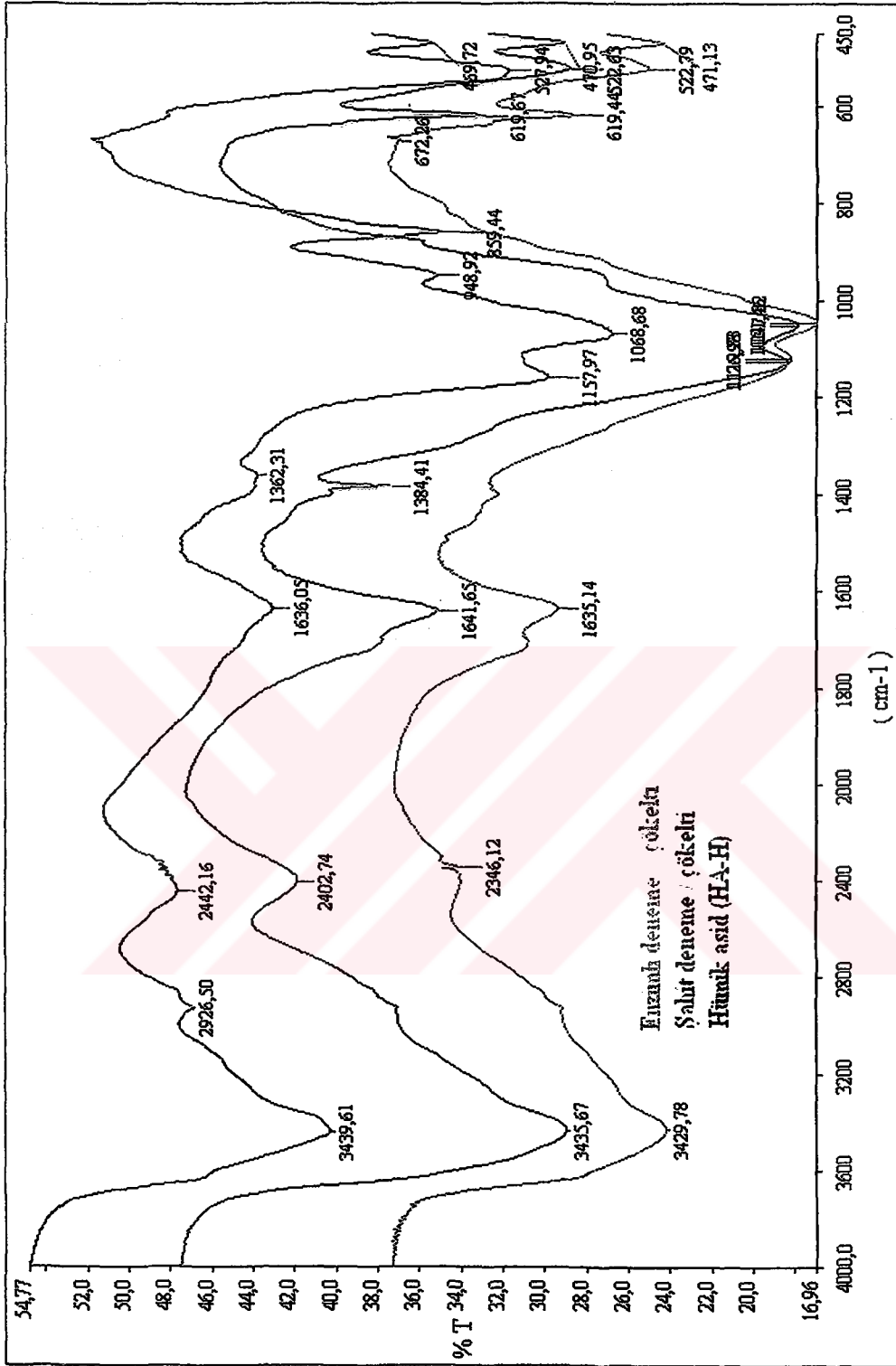
Şekil 6.58 HA-H'in HRP enzimiyle (120 μ L) reaksiyonundan elde edilen çöktelinin hümk asidle (HA-H) karşılaştırılması



Şekil 6.59 HA-H'in HRP enzimiyle (120 µL) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çökeltilerin karşılaştırılması



Şekil 6.60 HA-H'in HRP enzimiyle (120 µL) 4 saat sürede gerçekleştirilen reaksiyondan elde edilen çözeltisinin FTIR spektrumu



Şekil 6.61 HA-H'in HRP enzimiyle (120 µL) 4 saat sürede gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu

6.3.2 Hümik Asid (HA-P) ve Enzim Reaksiyonları Sonrasında Elde Edilen

Çözelti ve Çökeltilerin FTIR Spektrumları

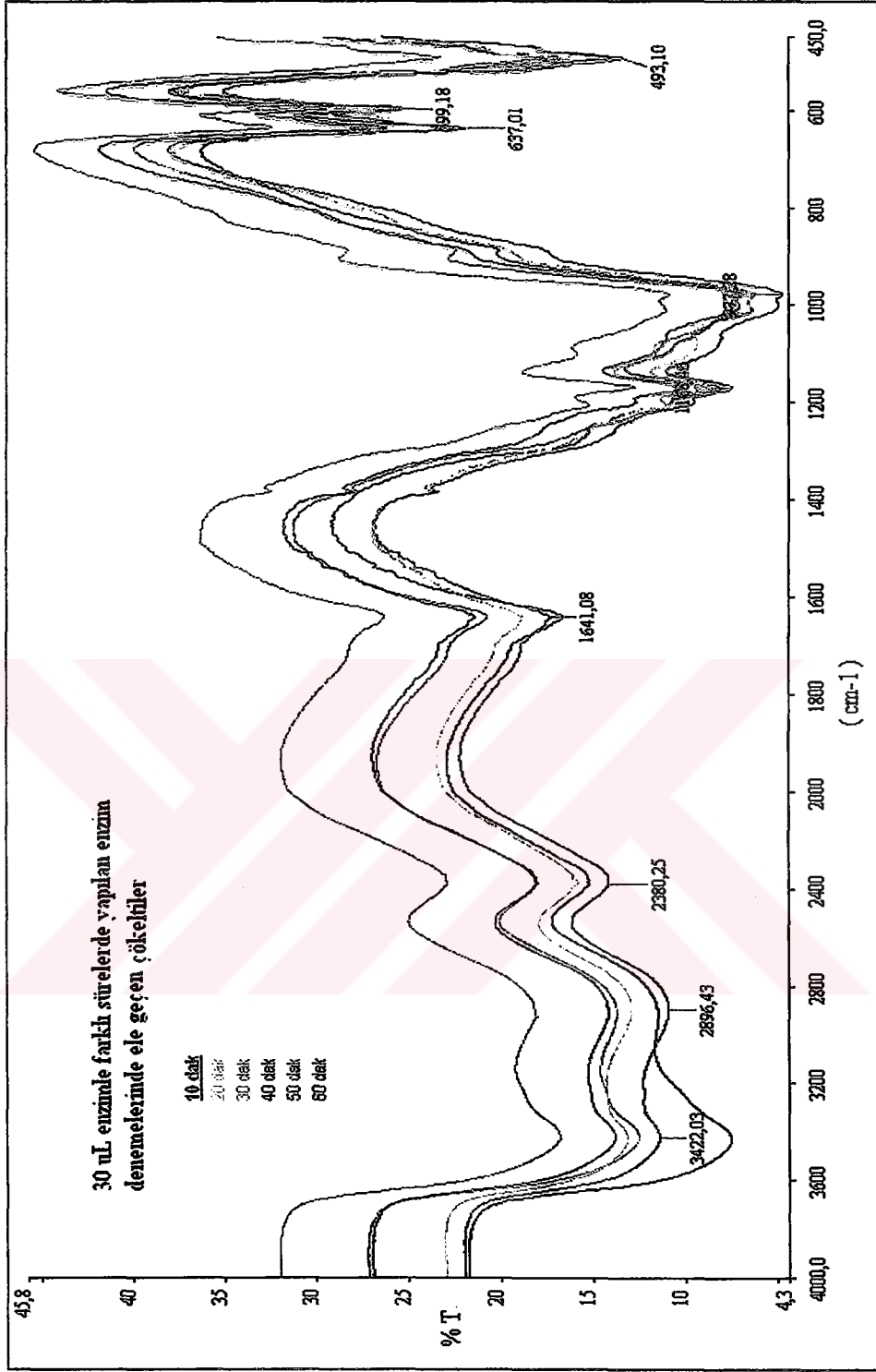
Ham Bolu-Himmetoğlu linyitinin % 4 H₂O₂ ile oksidasyonu ardından elde edilen hümik asid (HA-P) ile *Horseradish peroxidase* enzimi reaksiyona sokulmuş; 30, 60, 120 µL enzim miktarlarının ve 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık reaksiyon sürelerinin hümik asid yapısında meydana getirdiği değişimler FTIR spektroskopisiyle incelenmiştir. Enzim reaksiyonu sonrasında elde edilen çözelti santrüfüjlendi; çözelti ve çökelti olmak üzere iki fraksiyona ayrıldı ve kurutularak analiz edilmiştir. Bu iki fraksiyonun fonksiyonel grupları peroksitli hümik asid (HA-P) ile kıyaslanarak meydana gelen değişimler belirlenmiştir.

30 µL enzim miktarları ile yapılan 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık reaksiyonlar sonucunda ele geçen çözeltinin çözelti ve çökelti fraksiyonları Şekil 6.62 ve Şekil 6.63'de verilmektedir. Çözelti fraksiyonlarının hepsinde zamana bağlı olarak değişen belirgin bir fark gözlenmemiştir. FTIR spektrumlarında 3422, 2380, 1641, 1168, 977, 637, 599, 493 cm⁻¹ dalga boylarında bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.62). Çökelti fraksiyonları incelendiğinde ise çözelti fraksiyonunda olduğu gibi fonksiyonel gruplarda zamana bağlı bir değişim gözlenmemiştir. FTIR spektrumlarında 3428, 2928, 1706, 1635, 1384, 1355, 994, 636, 619, 501 cm⁻¹ dalga boylarında bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.63).

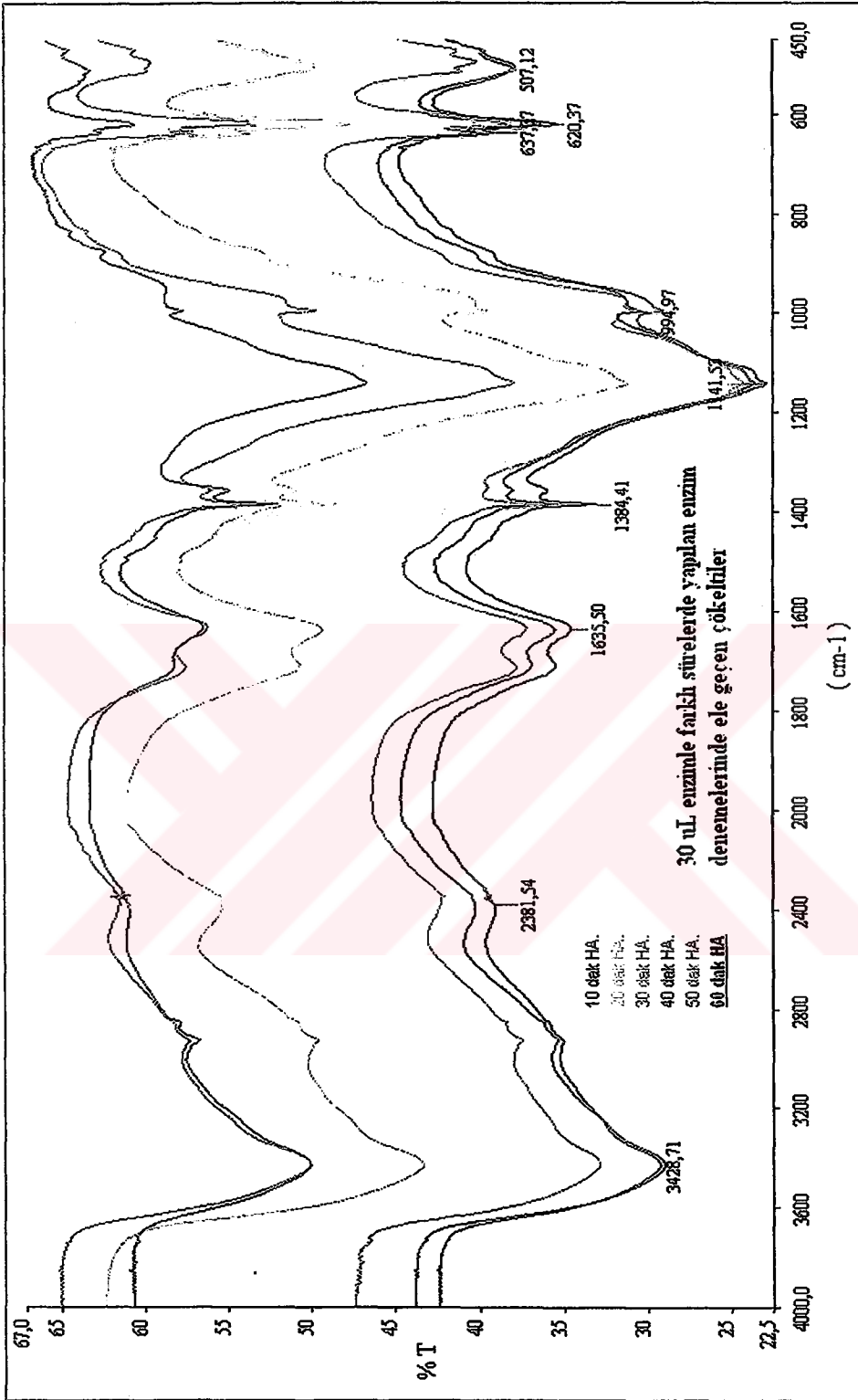
Şahit deneme, enzimli deneme (çözelti) ve HA-P kıyaslandığında enzim etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda 850 cm⁻¹'de bandın oluştuğu, 2925 cm⁻¹ dalga boylarındaki bandın ortaya çıktığı görülmüştür (Şekil 6.66). İşlem görmemiş HA-P'de görülen 1076 cm⁻¹'deki band kaybolmuştur.

Şahit deneme, enzimli deneme (çökelti) ve HA-P kıyaslandığında enzim etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda 1706, 1355, 1384 cm⁻¹'de bandların oluştuğu, HA-P'de gözlenen 859 cm⁻¹'deki bandın kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 6.67).

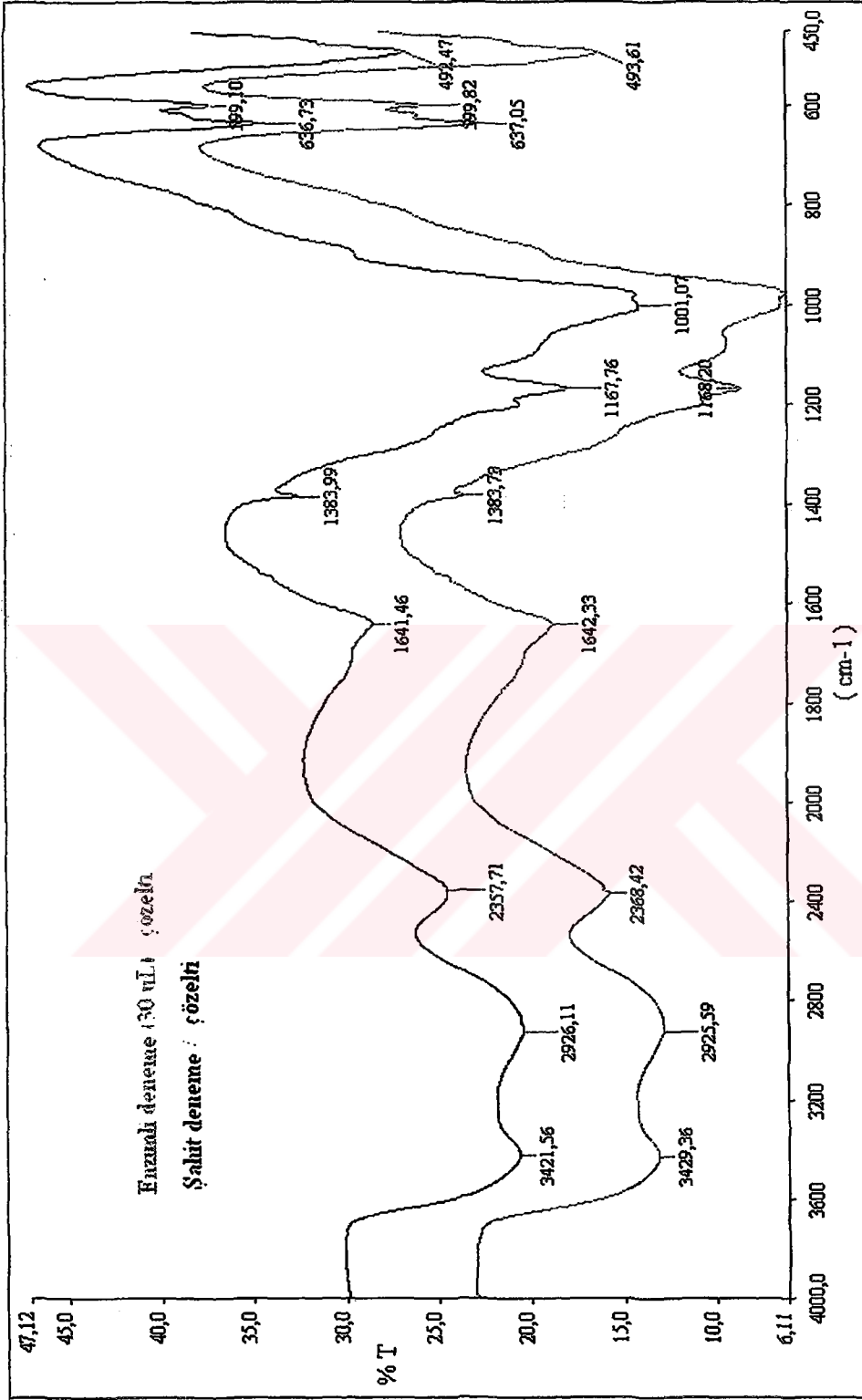
Enzimli deneme sonrasında elde edilen çözelti ve çökelti fraksiyonları kıyaslandığında kıyaslandığında çökeltelerde çözeltilerden farklı olarak 1706 ve 1355 cm⁻¹'deki bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.68).



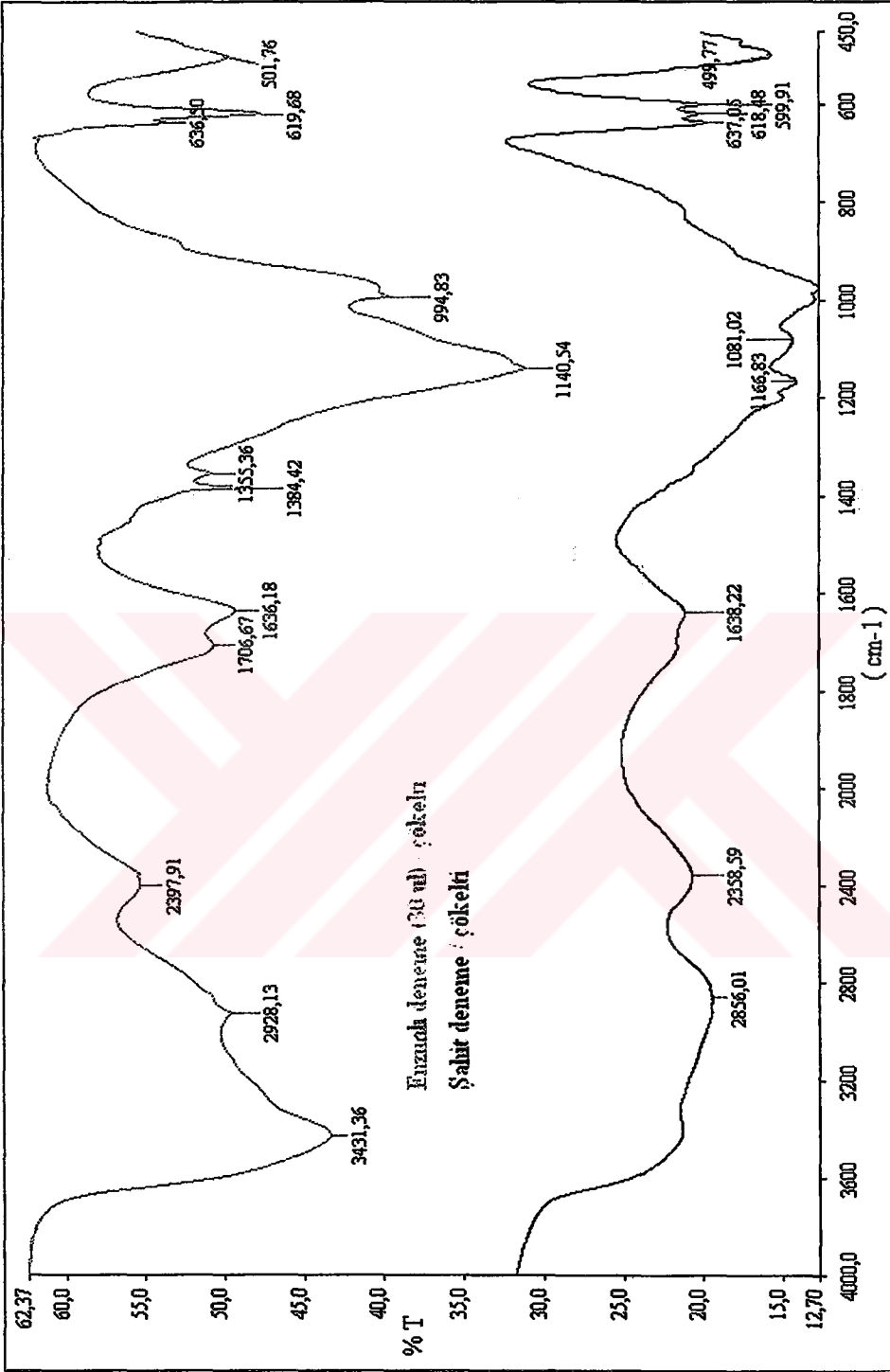
Şekil 6.62 HA-P ve HRP enziminin (30 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları



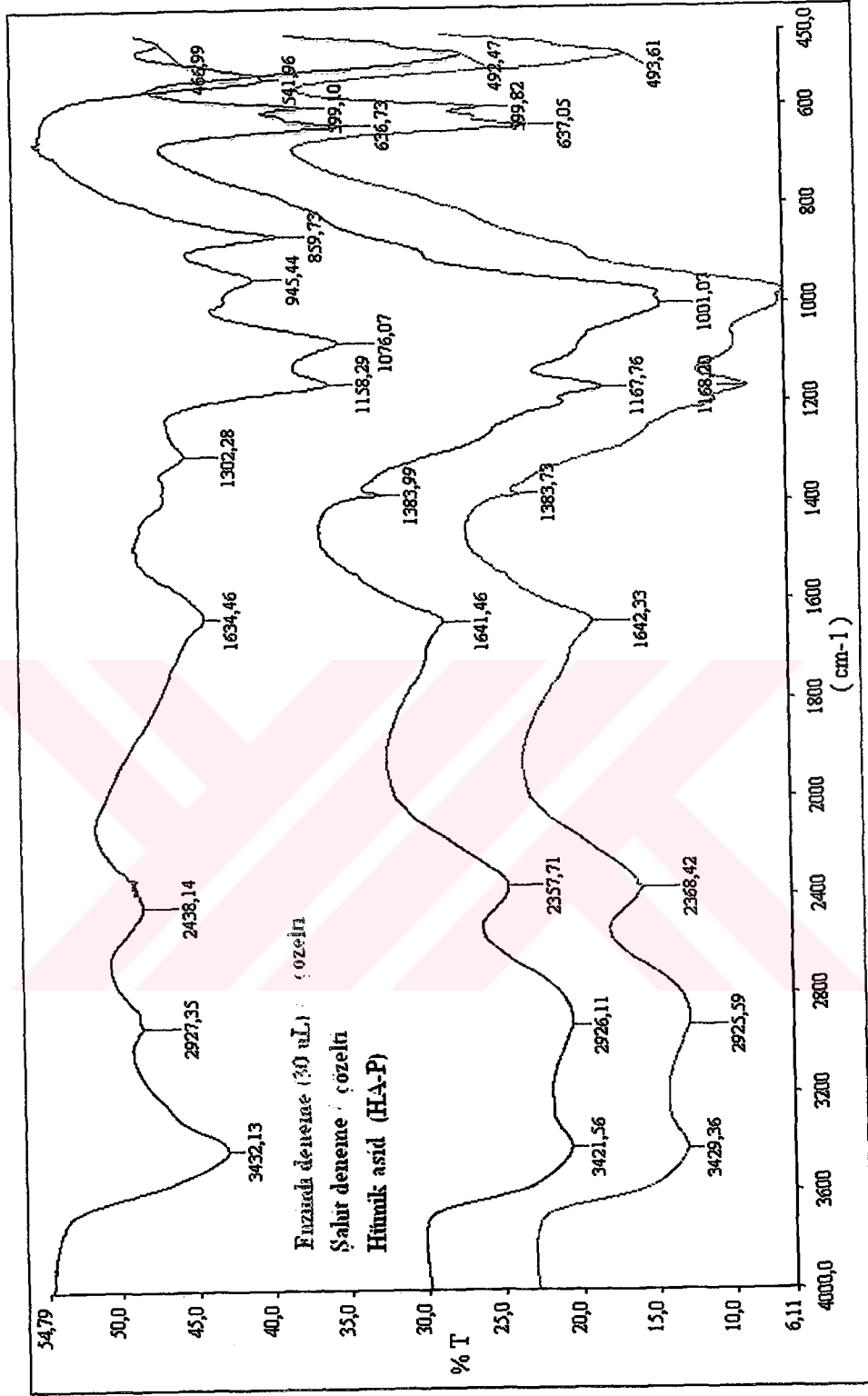
Şekil 6.63 HA-P ve HRP enziminin (30 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları



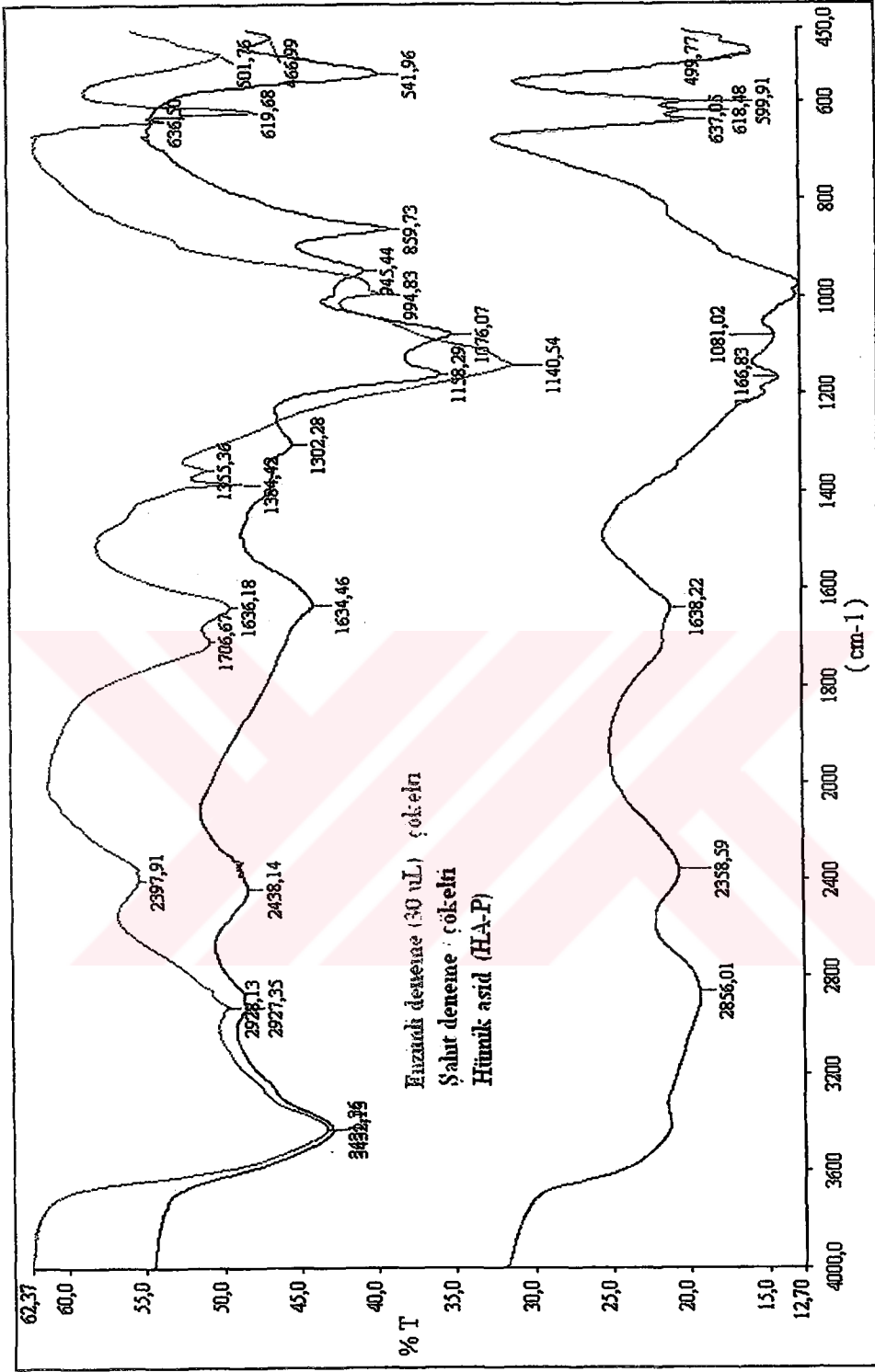
Şekil 6.64 HA-P'in HRP enzimiyle (30 μ L) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin FTIR spektrumu



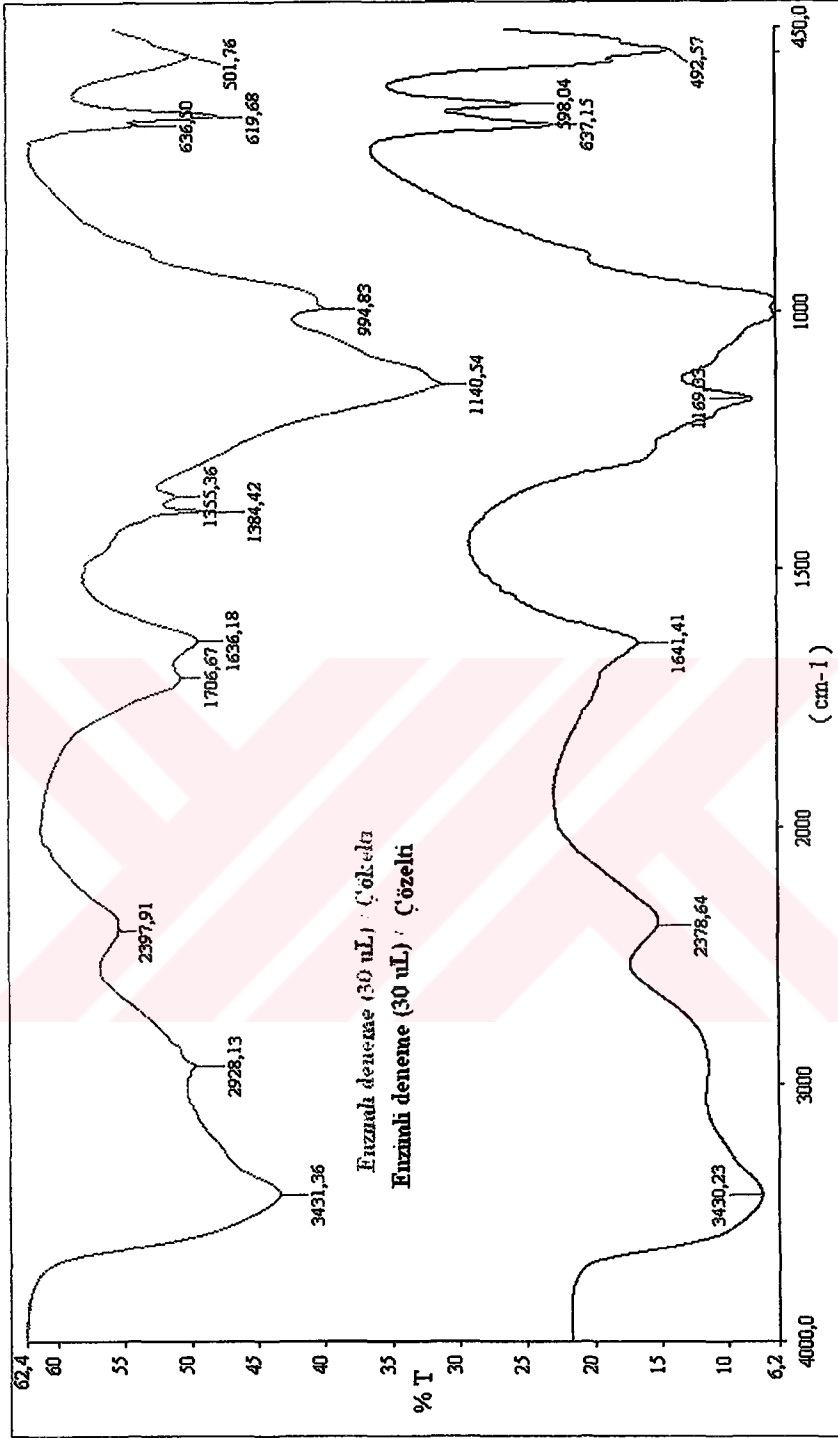
Şekil 6.65 HA-P'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu



Şekil 6.66 HA-P'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin hüyük asidle (HA-H) karşılaştırılması



Şekil 6.67 HA-P'in HRP enzimiyle (30 μ L) reaksiyonundan elde edilen çöktelinin hüyük asitle (HA-H) karşılaştırılması



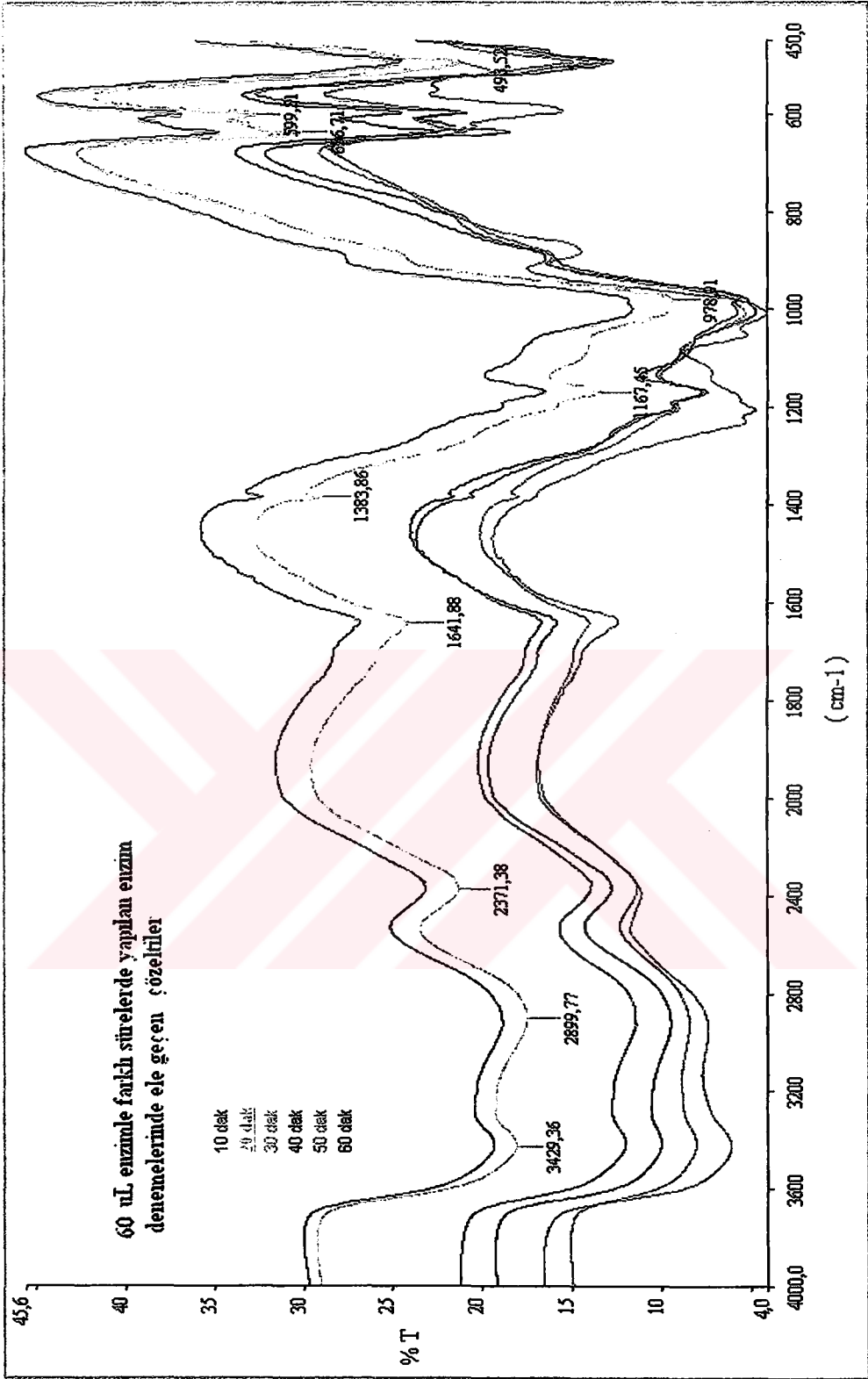
Şekil 6.68 HA-P'in HRP enzimiyle (30 µL) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çökeltilerin karşılaştırılması

60 µL enzim miktarları ile yapılan 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık reaksiyonlar sonucunda ele geçen çözeltinin çözelti ve çökelti fraksiyonları Şekil 6.69 ve Şekil 6.70'de verilmektedir. Çözelti fraksiyonlarının hepsinde zamana bağlı olarak değişen belirgin bir fark gözlenmemiştir. FTIR spektrumlarında 3430, 2899, 2371, 1641, 1168, 978, 637, 598, 492 cm^{-1} 'de bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.69). Çökelti fraksiyonları incelendiğinde ise çözelti fraksiyonunda olduğu gibi fonksiyonel gruplarda zamana bağlı bir değişim gözlenmemiştir. FTIR spektrumlarında 3428, 2381, 1706, 1635, 1384, 1116, 995, 637, 620, 512 cm^{-1} 'de bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.70).

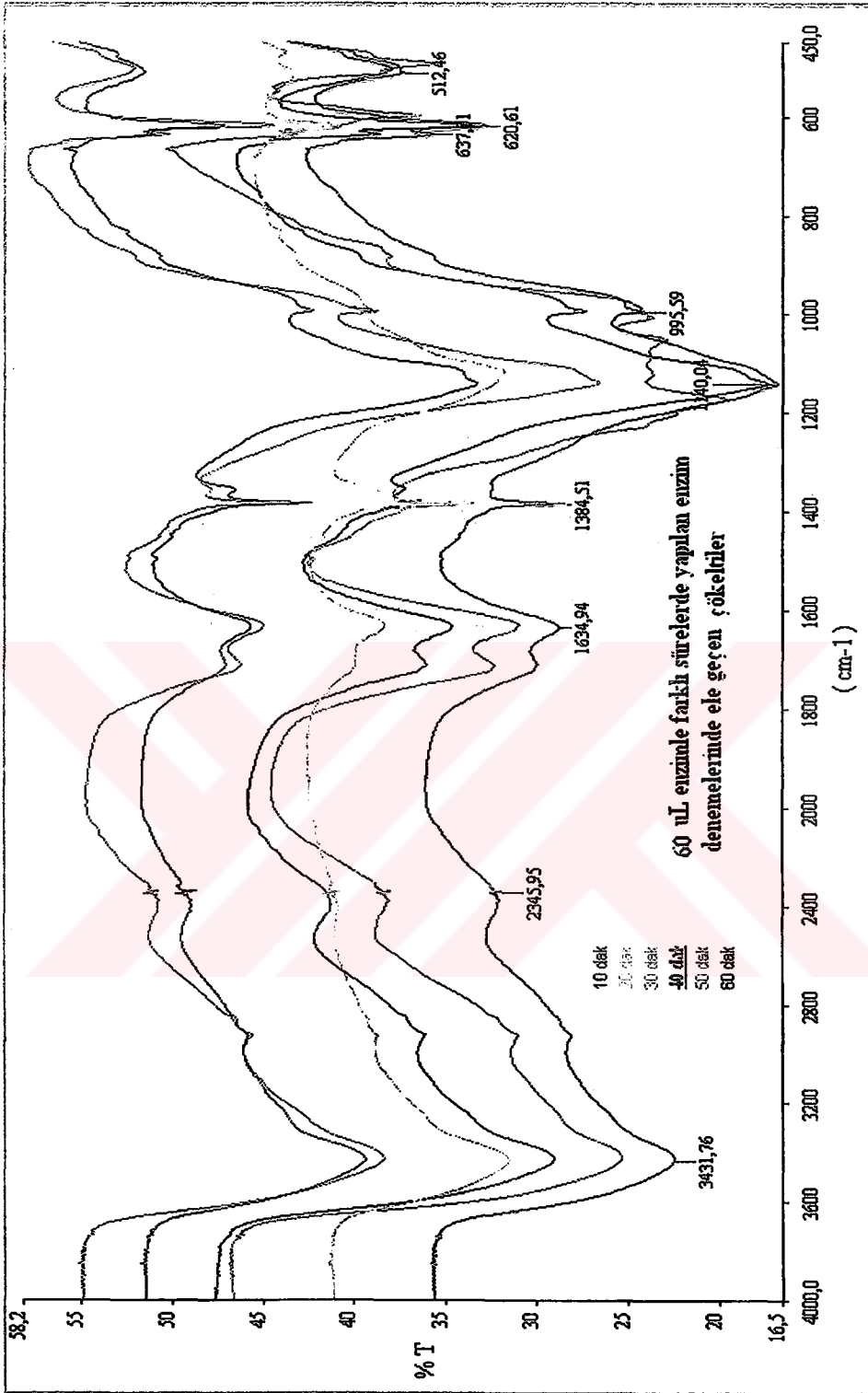
Şahit deneme, enzimli deneme (çözelti) ve HA-P kıyaslandığında enzim etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda 859 cm^{-1} ve 1384 cm^{-1} 'deki bandların kaybolduğu görülmüştür (Şekil 6.73). HA-P'de görülen 1076 cm^{-1} 'deki bandın kaybolduğu gözlenmiştir.

Şahit deneme, enzimli deneme (çökelti) ve HA-P kıyaslandığında enzim etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda 1706, 1355, 1384 cm^{-1} 'de bandların oluştuğu, HA-P'de gözlenen 859 cm^{-1} 'de bandın kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 6.74).

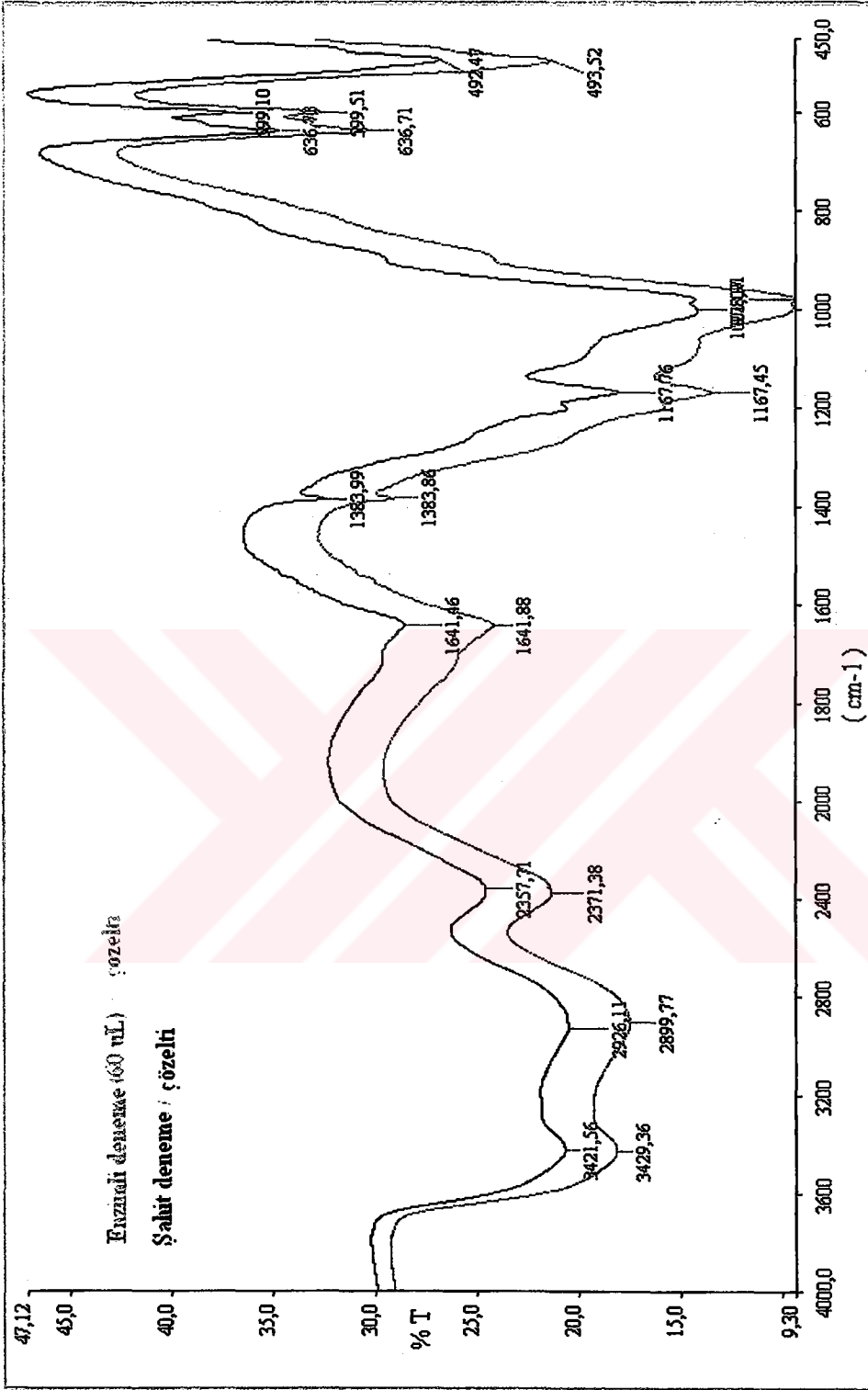
Enzimli denemeden elde edilen çözelti ve çökelti fraksiyonları kıyaslandığında çöktelerde çözültiden farklı olarak 1706 ve 1355 cm^{-1} 'de bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.75).



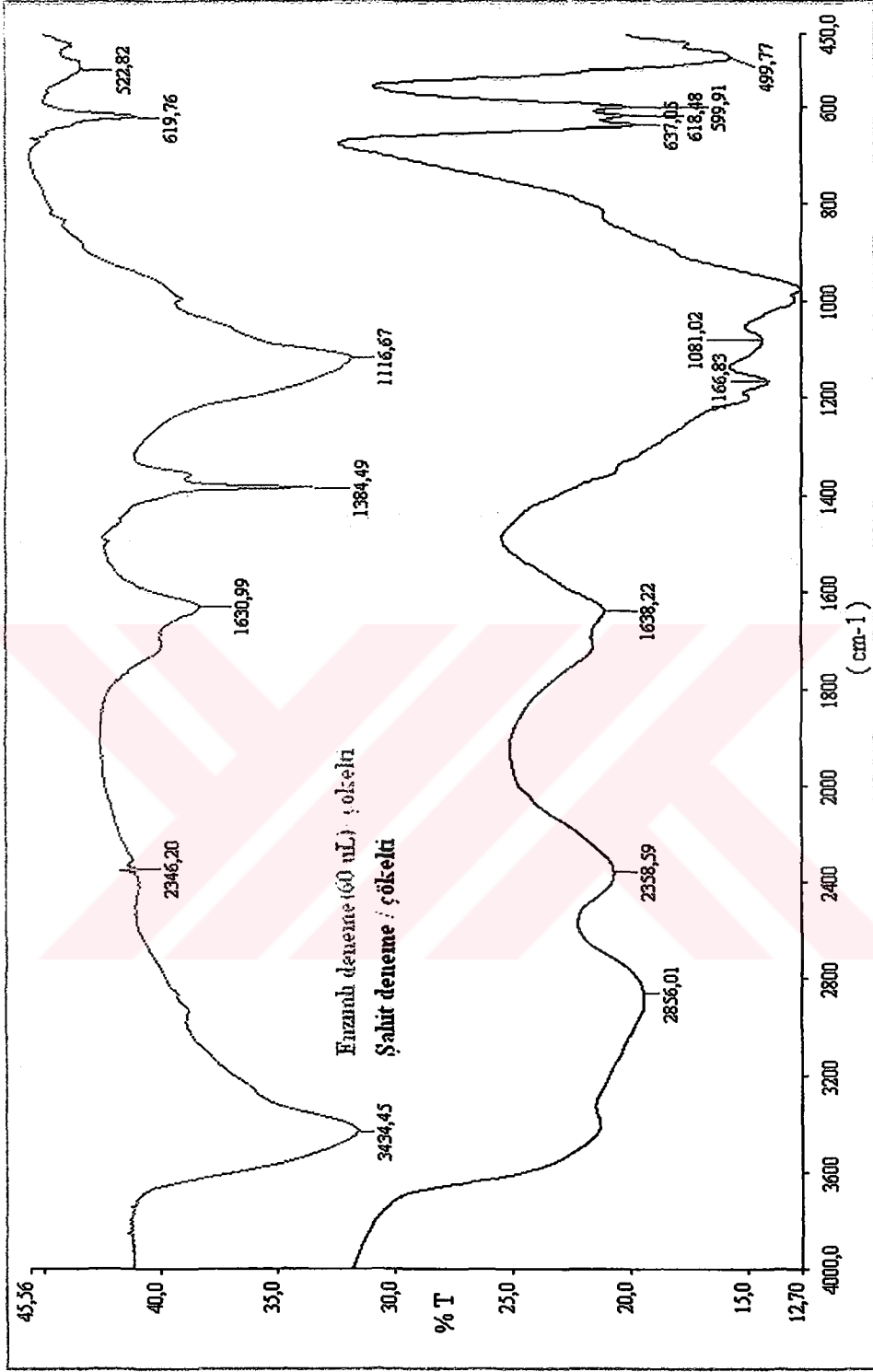
Şekil 6.69 HA-P ve HRP enziminin (60 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları



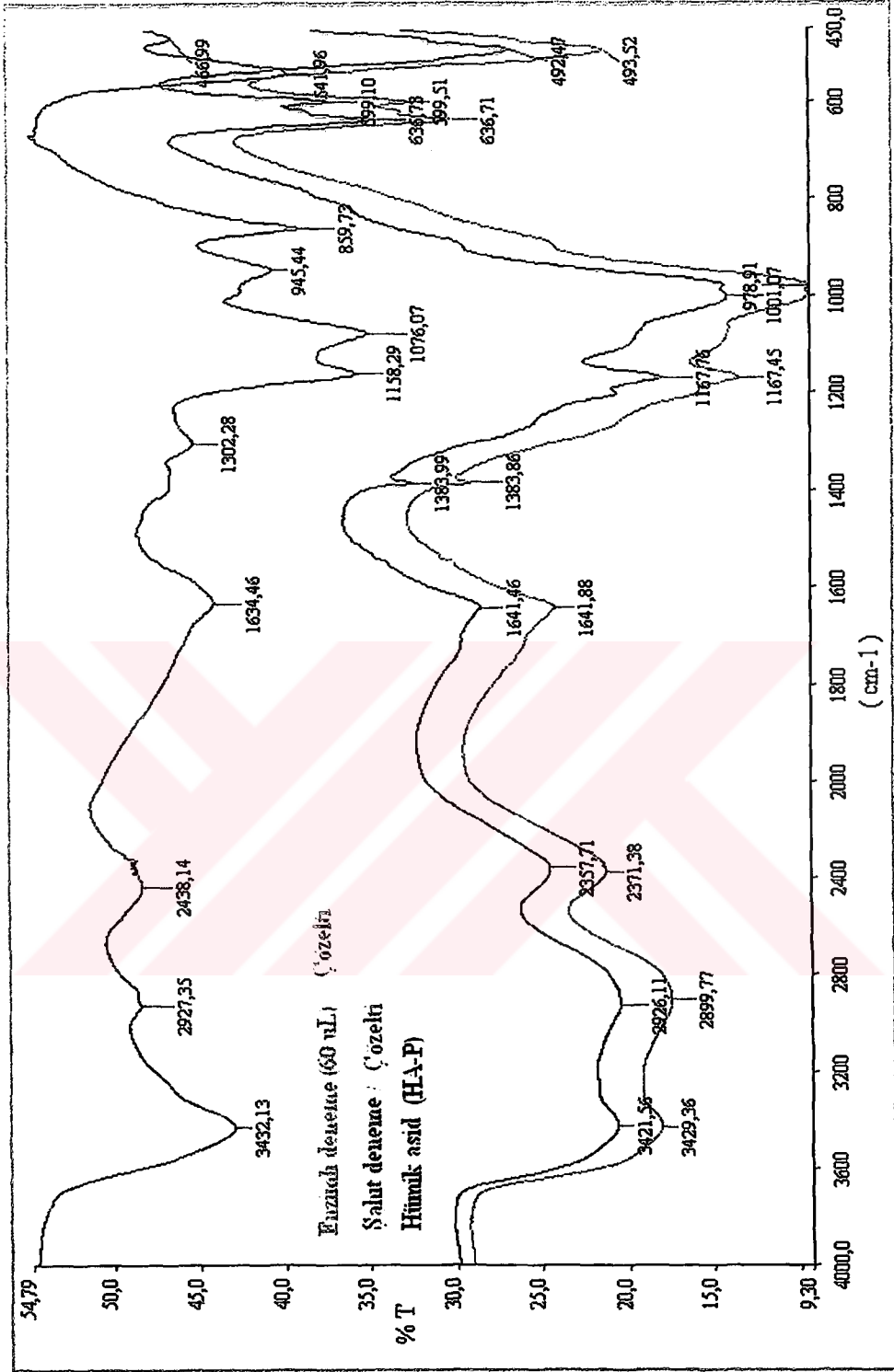
Şekil 6.70 HA-P ve HRP enziminin (60 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları



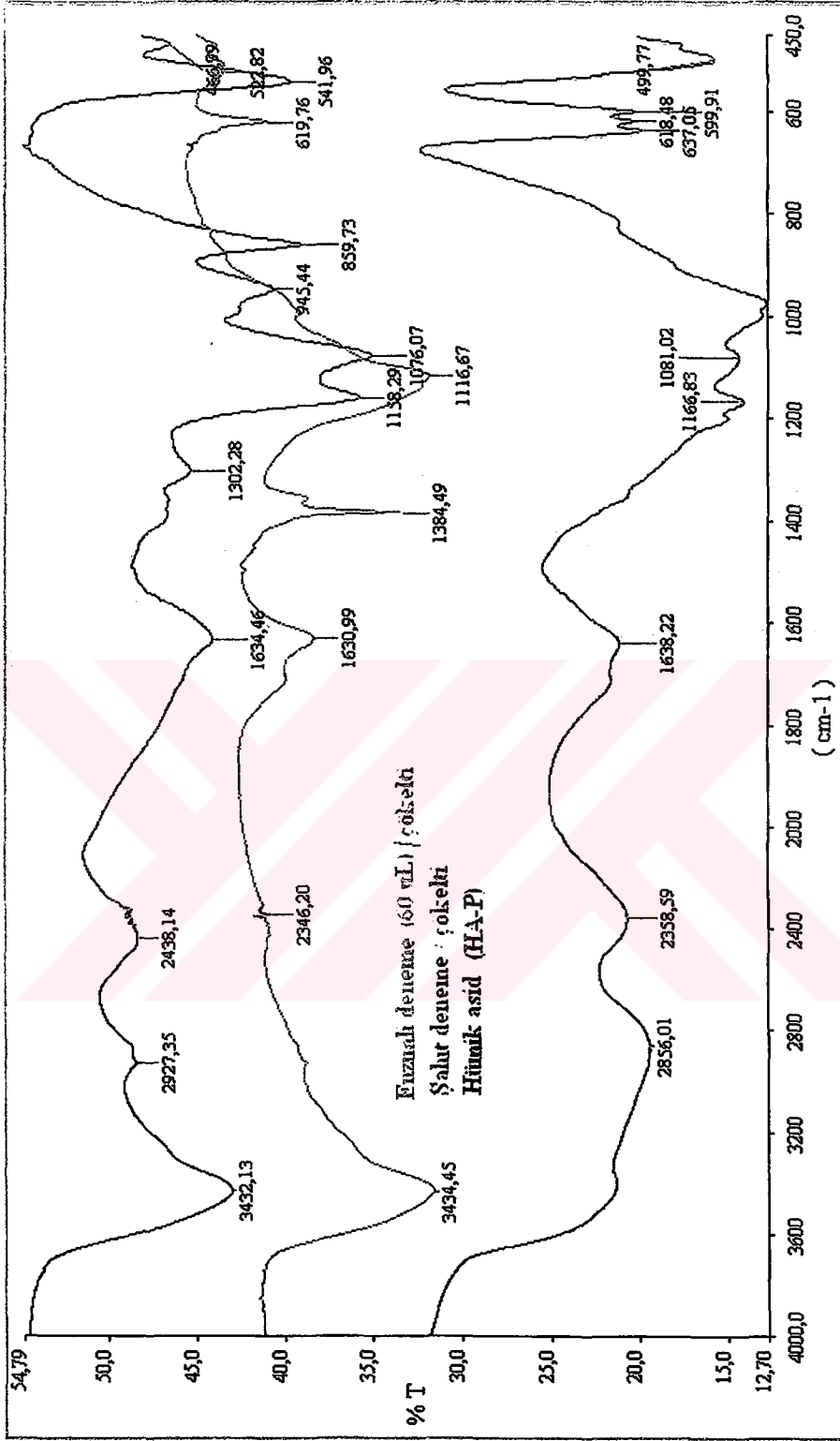
Şekil 6.71 HA-P'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin FTIR spektrumu



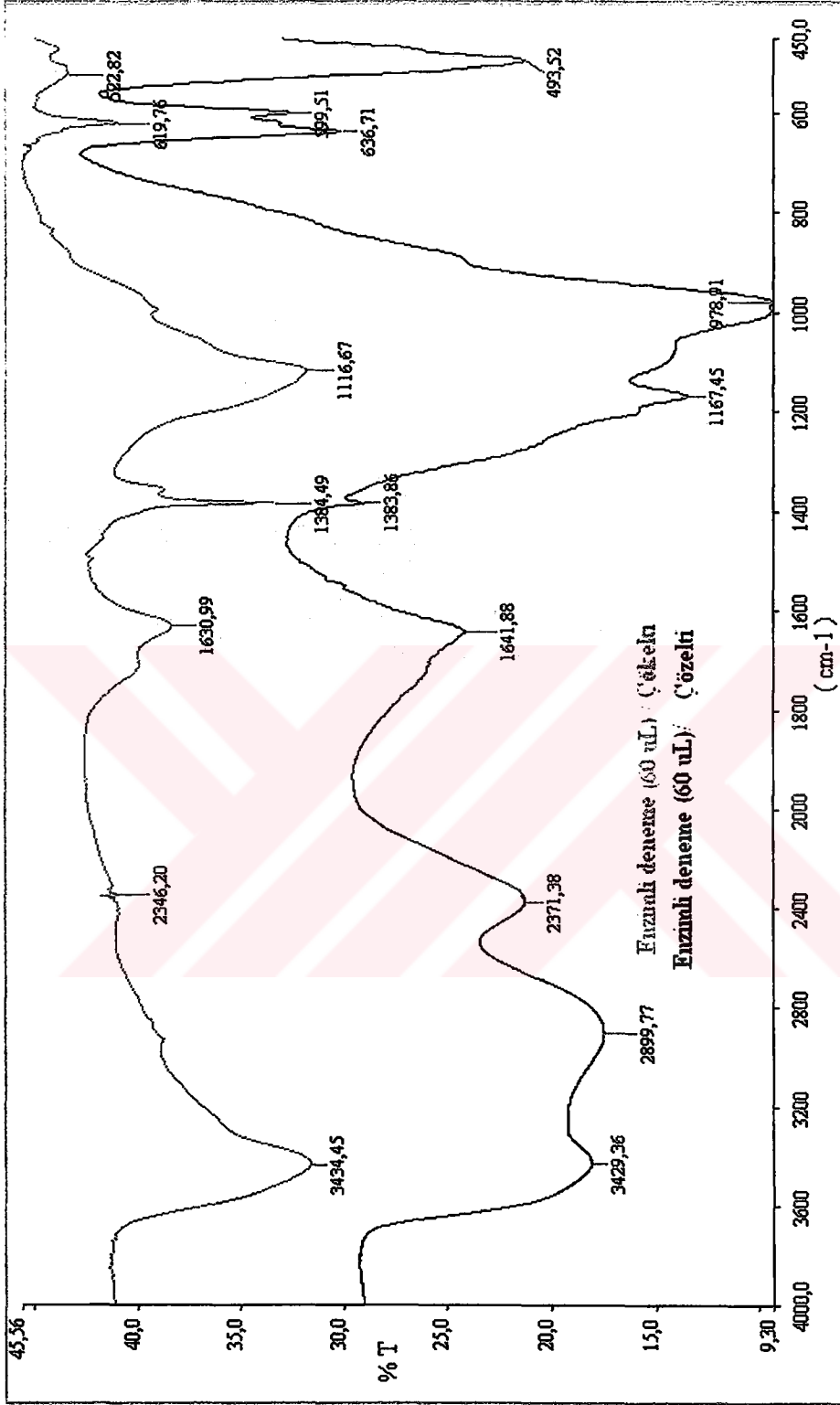
Şekil 6.72 HA-P'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu



Şekil 6.73 HA-P'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması



Şekil 6.74 HA-P'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin hüyük asidle (HA-H) karşılaştırılması



Şekil 6.75 HA-P'in HRP enzimiyle (60 µL) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çökeltinin karşılaştırılması

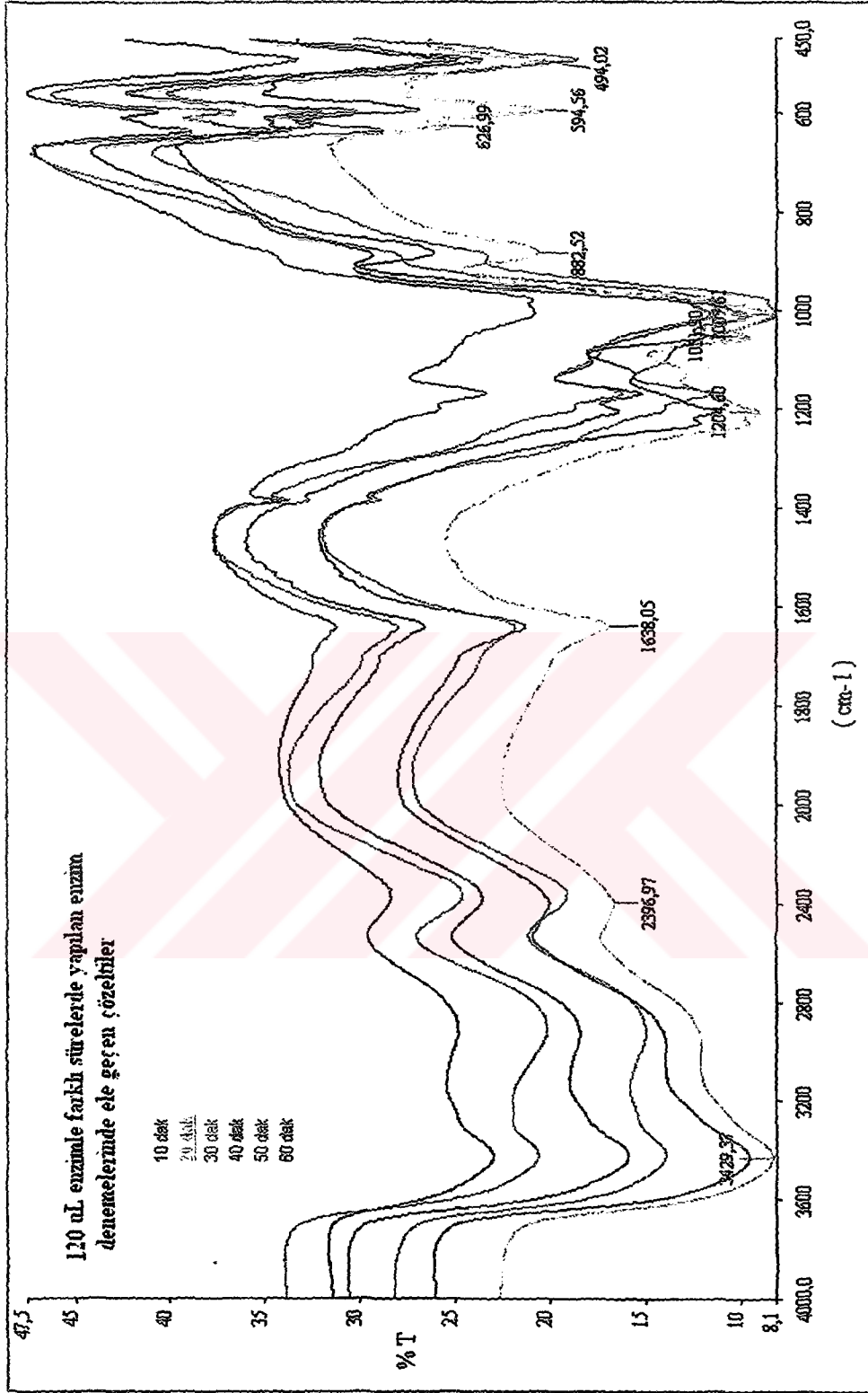
120 µL enzim miktarları ile yapılan 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık reaksiyonlar sonucunda ele geçen çözelti ve çökelti fraksiyonları Şekil 6.85 ve Şekil 6.86'da verilmektedir. Çözelti fraksiyonlarında 882 cm⁻¹'de meydana gelen bandın zamana bağlı olarak kaybolduğu gözlenmemiştir. Bu durum reaksiyon süresinin uzamasına bağlı olarak aromatik grupların parçalandığını göstermektedir. FTIR spektrumlarında 3429, 2396, 1638/1640, 1204, 1167, 1051, 1007, 888/883, 626, 594 ve 494 cm⁻¹'de bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.85). Çökelti fraksiyonları incelendiğinde fonksiyonel gruplarda zamana bağlı bir değişim gözlenmemiştir. FTIR spektrumlarında 3428, 1710, 1632, 1384, 1140, 1083, 1006, 995, 620, 514, 472 cm⁻¹'de bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.86).

Şahit deneme, enzimli deneme (çözelti) ve HA-P kıyaslandığında enzim etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda 850 cm⁻¹'deki bandın kaybolduğu görülmüştür (Şekil 6.89). HA-P'de gözlenen 1076 cm⁻¹'deki band etki sonucunda kaybolmuştur.

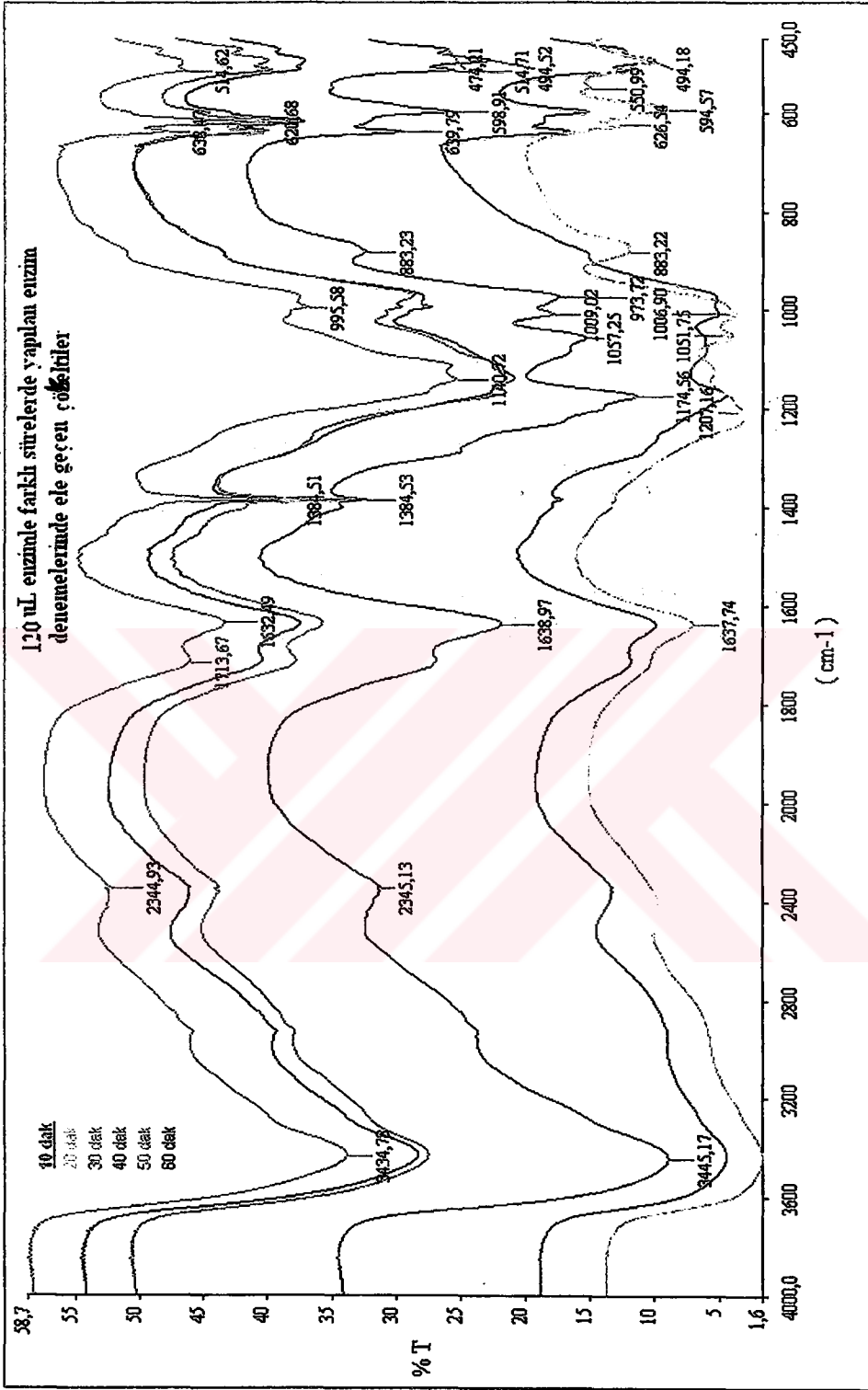
Şahit deneme, enzimli deneme (çökelti) ve HA-P kıyaslandığında enzim etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda 1713 ve 1384 cm⁻¹'deki bandların oluştuğu, HA-P'de gözlenen 859 cm⁻¹'deki bandın kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 6.90). Enzim etkisiyle 1140 cm⁻¹'deki bandın etki sonrasında genişlediği görülmüştür.

Enzimle reaksiyon sonrasında elde edilen çözelti fraksiyonunda 1168 ve 1007 cm⁻¹'deki bandların, çökeltide ise 1713, 1038, 1140 ve 995 cm⁻¹'deki bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.91).

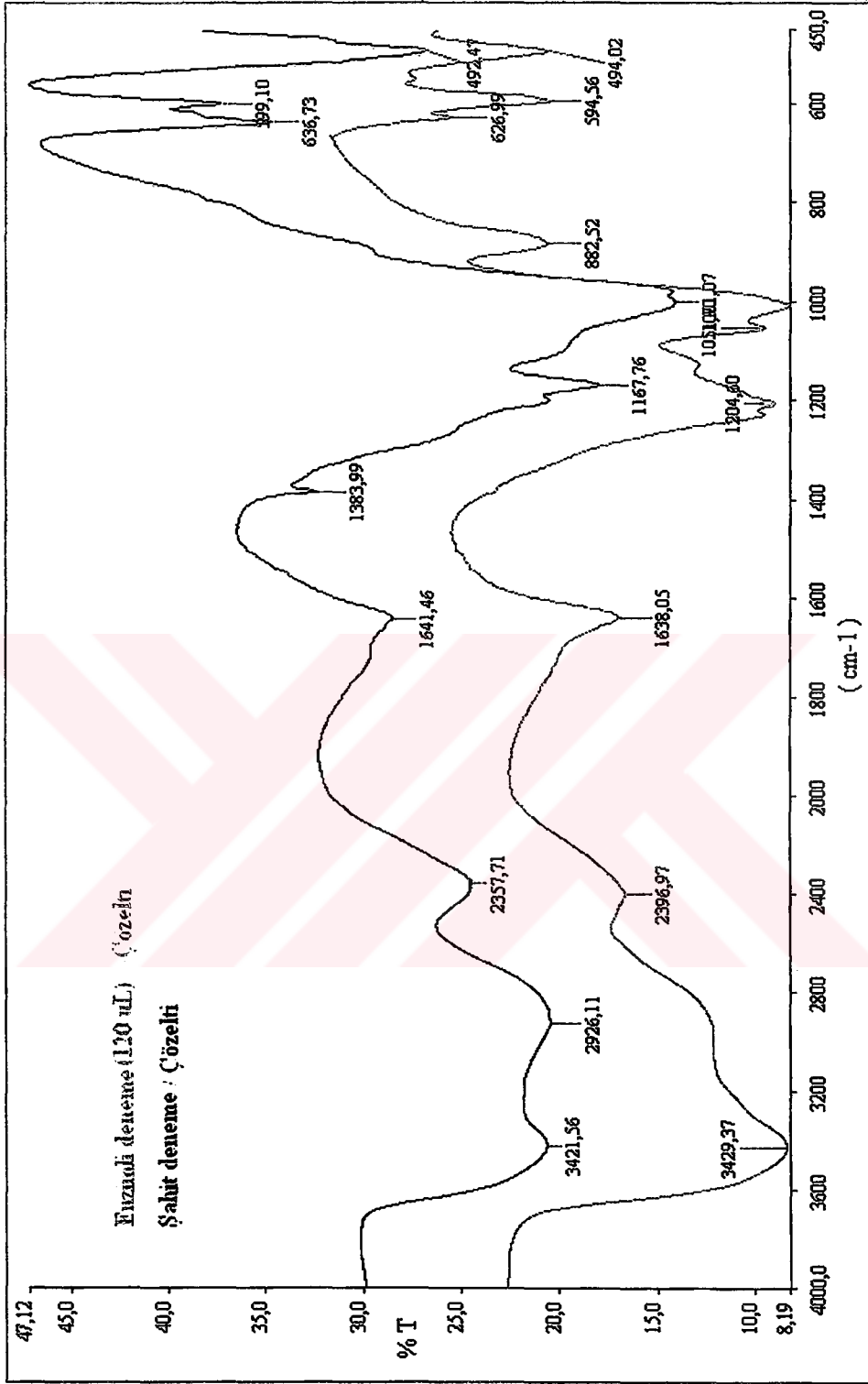
120 µL enzim miktarları ile yapılan 4 saatlik reaksiyon sonucunda elde edilen çözeltinin çözelti ve çökelti fraksiyonları Şekil 6.83 ve Şekil 6.84'de verilmektedir. Enzimli denemenin çözelti fraksiyonunun ve şahit denemenin çökelti fraksiyonu aynı grupları içermekte olduğu ancak HA-P'de gözlenen 859 cm⁻¹'deki bandın enzimli denemede olmadığı gözlenmiştir.



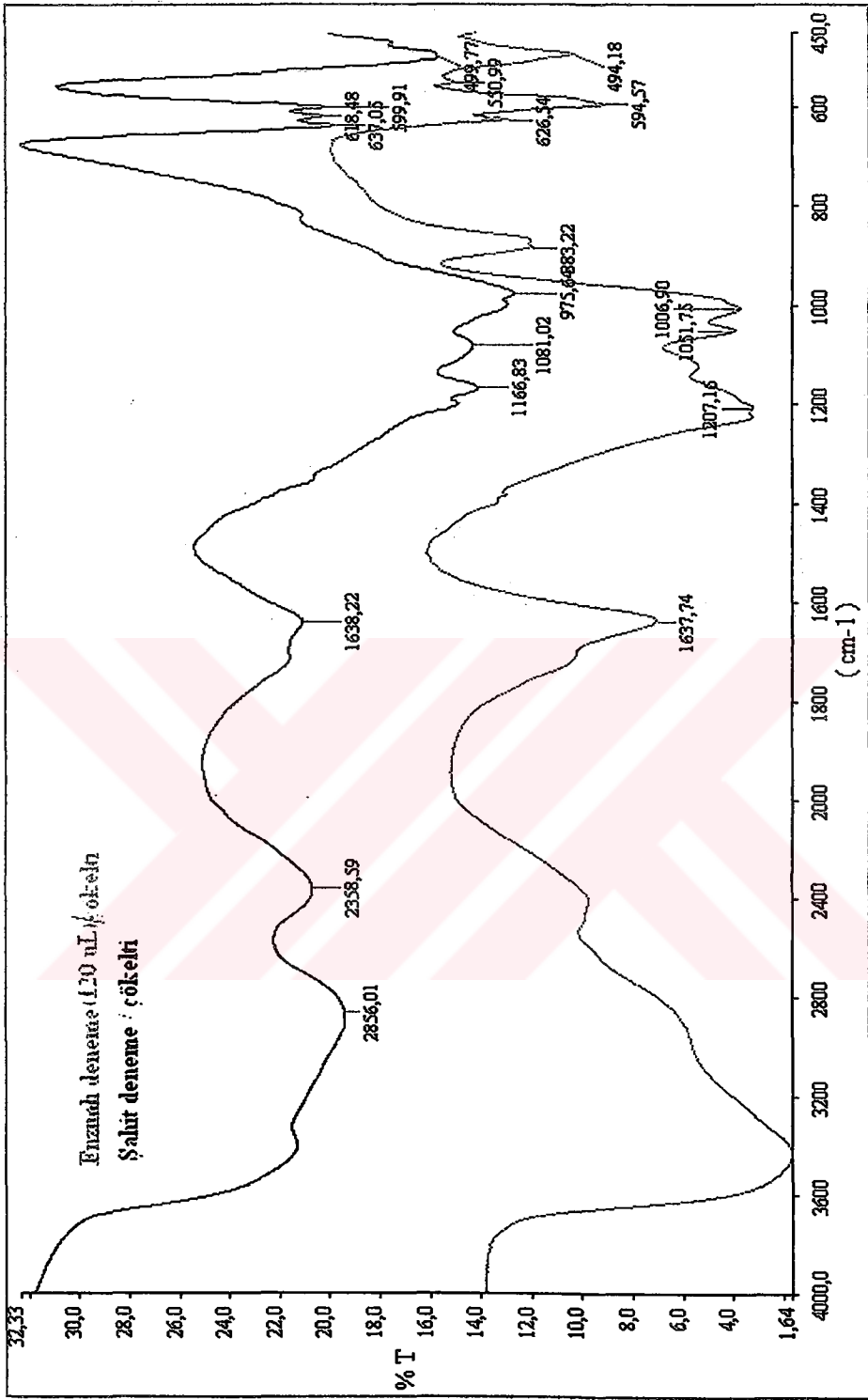
Şekil 6.76 HA-P ve HRP enziminin (120 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları



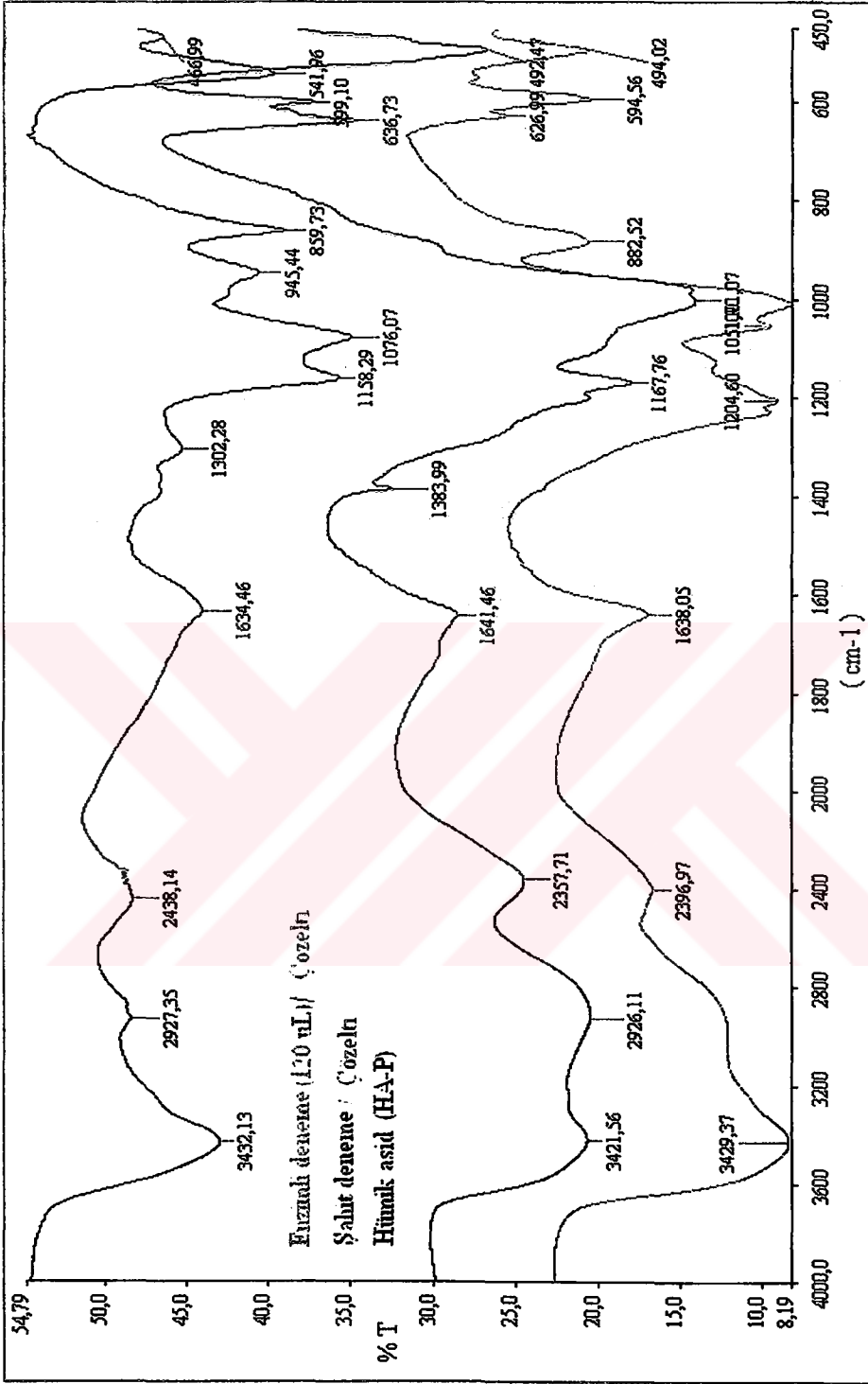
Şekil 6.77 HA-P ve HRP enziminin (120 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları



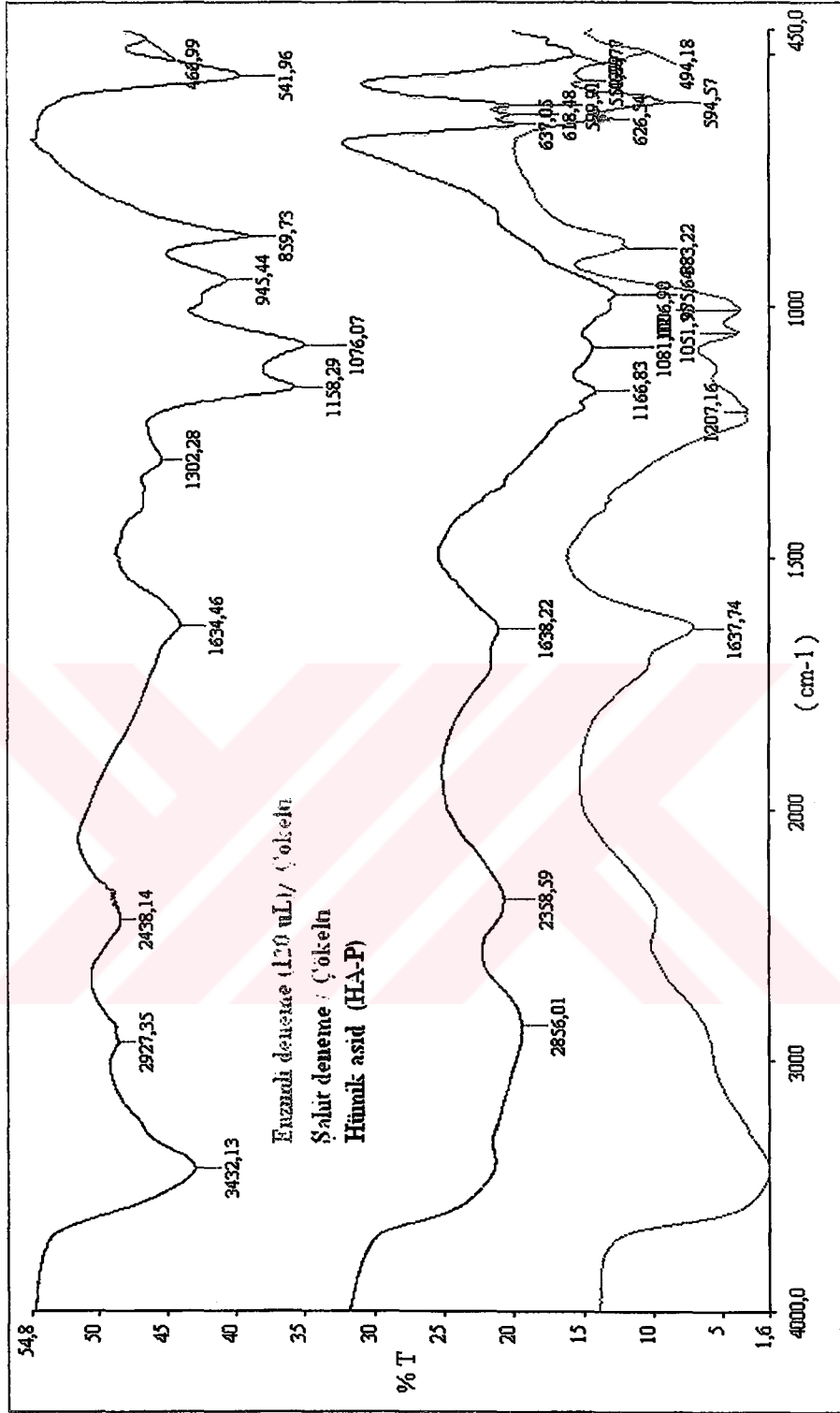
Şekil 6.78 HA-P'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin FTIR spektrumu



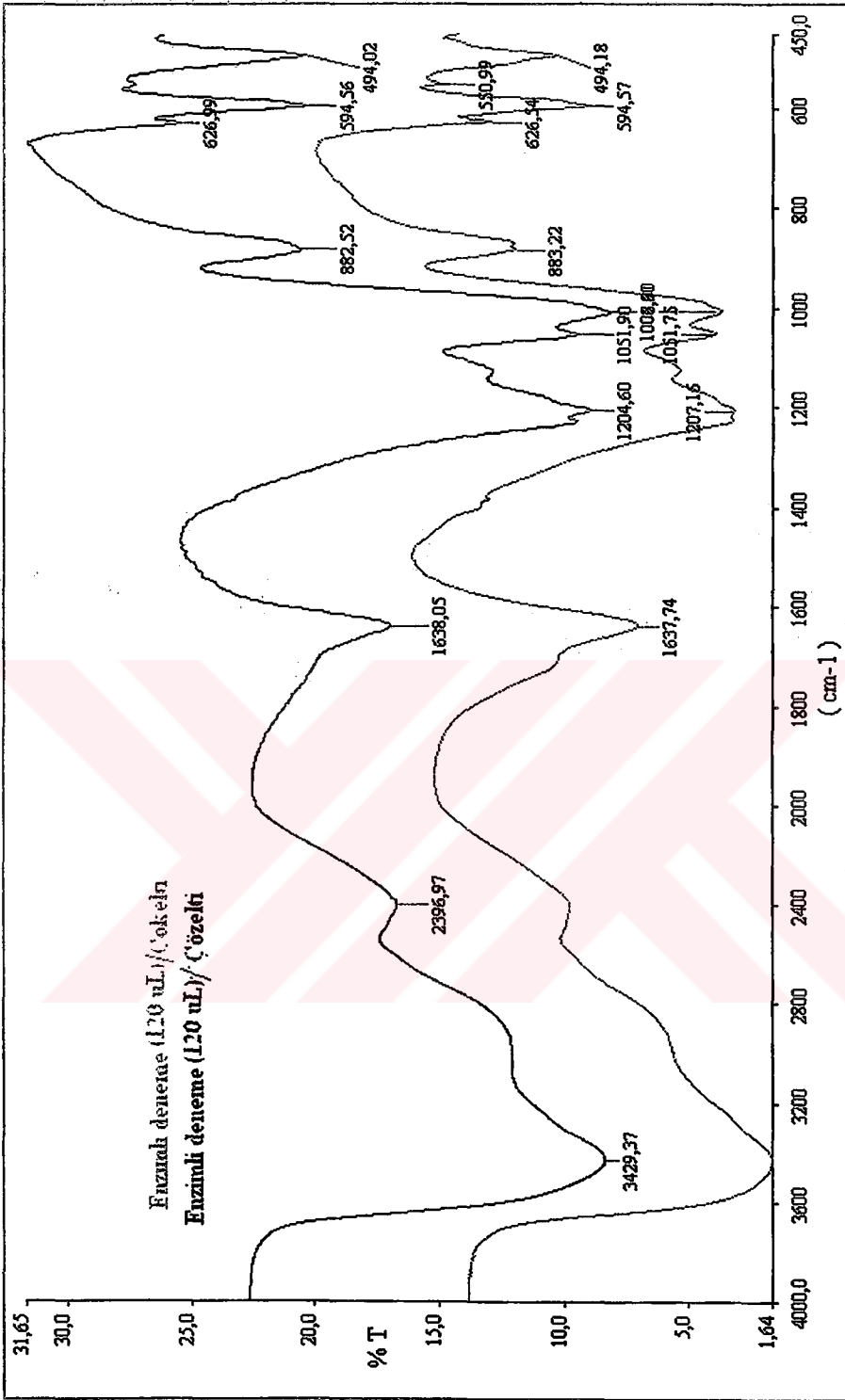
Şekil 6.79 HA-P'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltilinin FTIR spektrumu



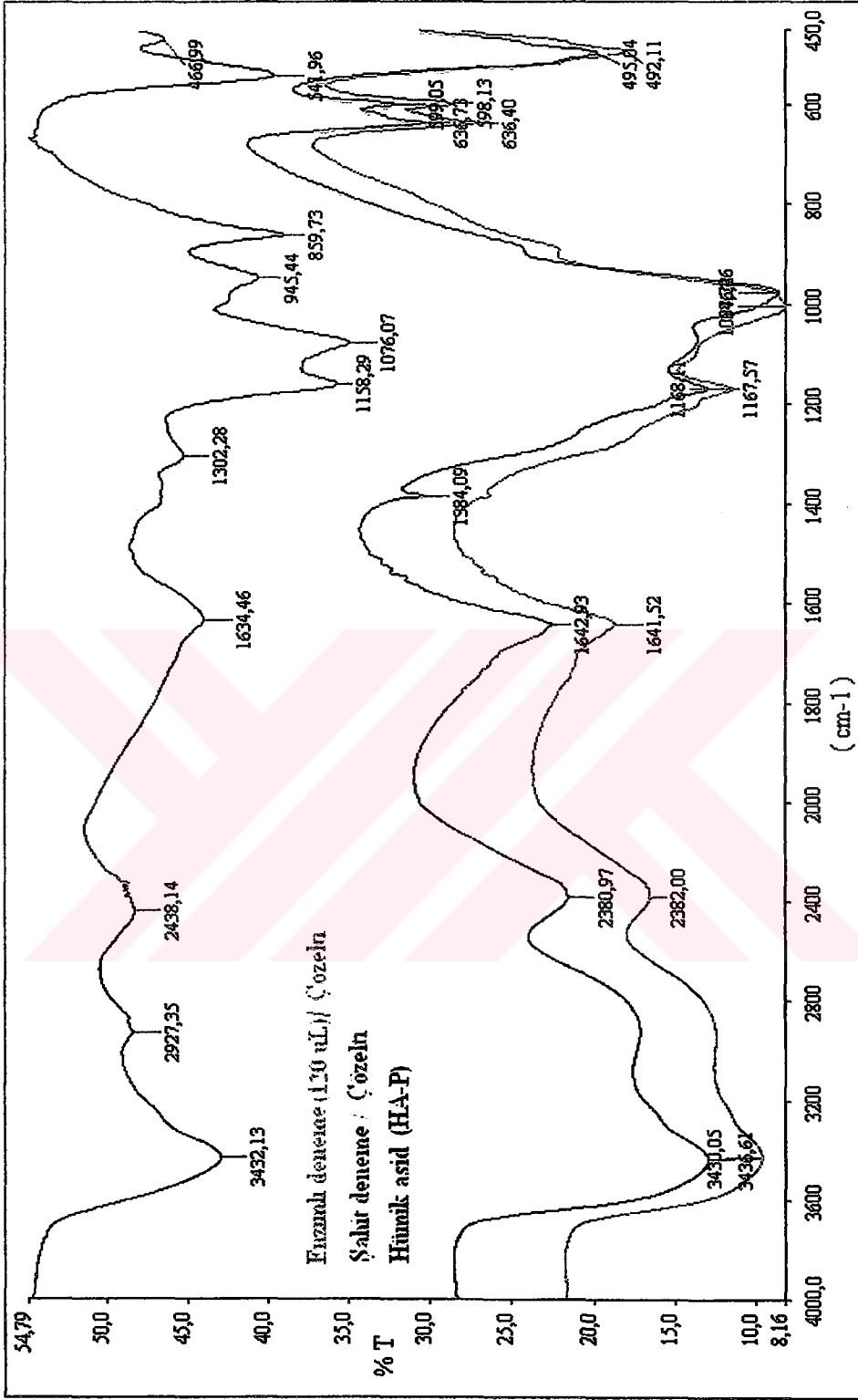
Şekil 6.80 HA-P'in HRP enzimiyle (120 μ L) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin hümik asitle (HA-H) karşılaştırılması



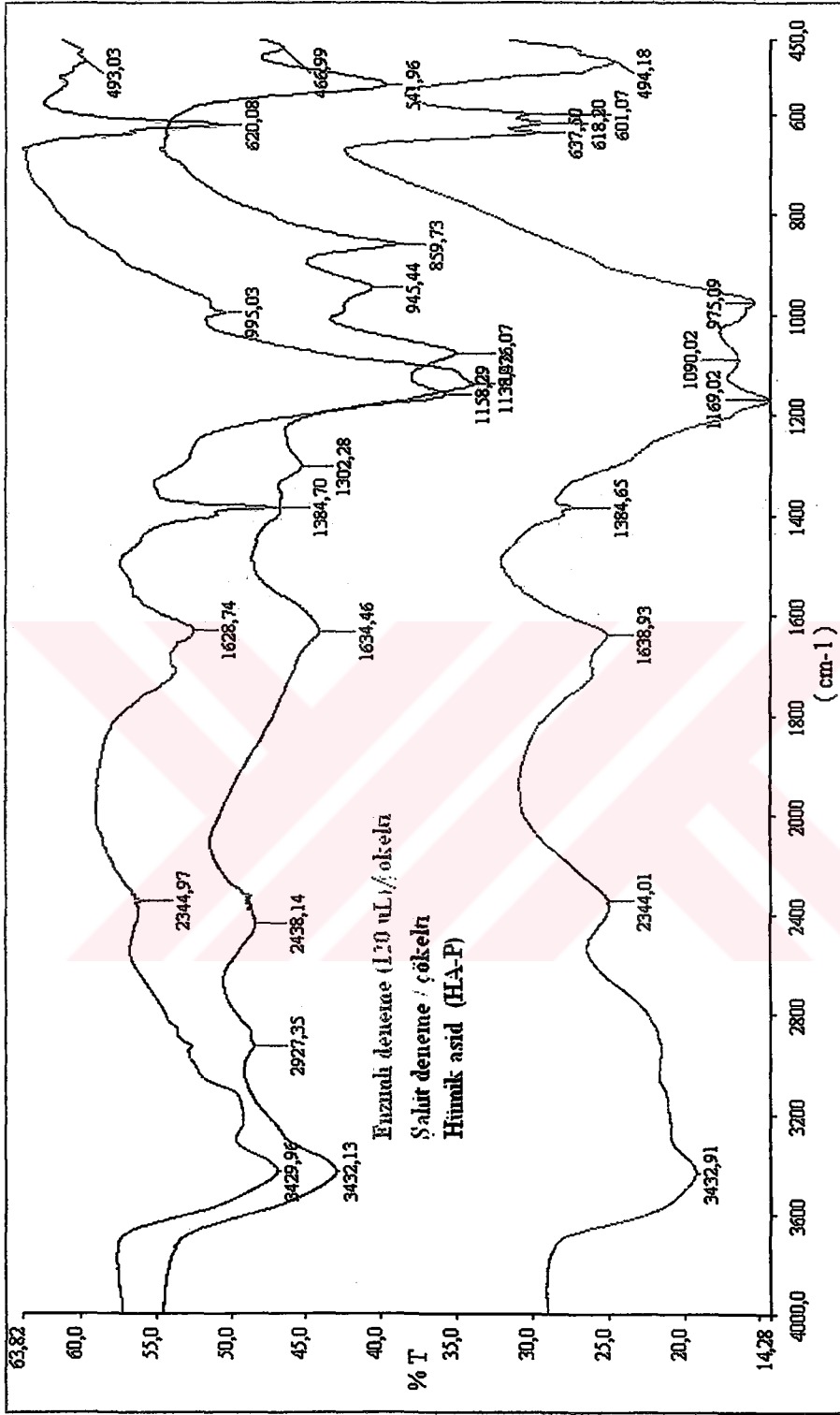
Şekil 6.81 HA-P'in HRP enzimiyle (120 μ L) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin hüyük asitle (HA-H) karşılaştırılması.



Şekil 6.82 HA-P'in HRP enzimiyle (120 μ L) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çökeltilerinin karşılaştırılması



Şekil 6.83 HA-P'in HRP enzimiyle (120 μ L) 4 saat sürede gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin FTIR spektrumu



Şekil 6.84 HA-P'in HRP enzimiyle (120 μ L) 4 saat sürede gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu

6.3.3 Hümik Asid (HA-N) ve Enzim Reaksiyonları Sonrasında Elde Edilen

Çözelti ve Çökeltilerin FTIR Spektrumları

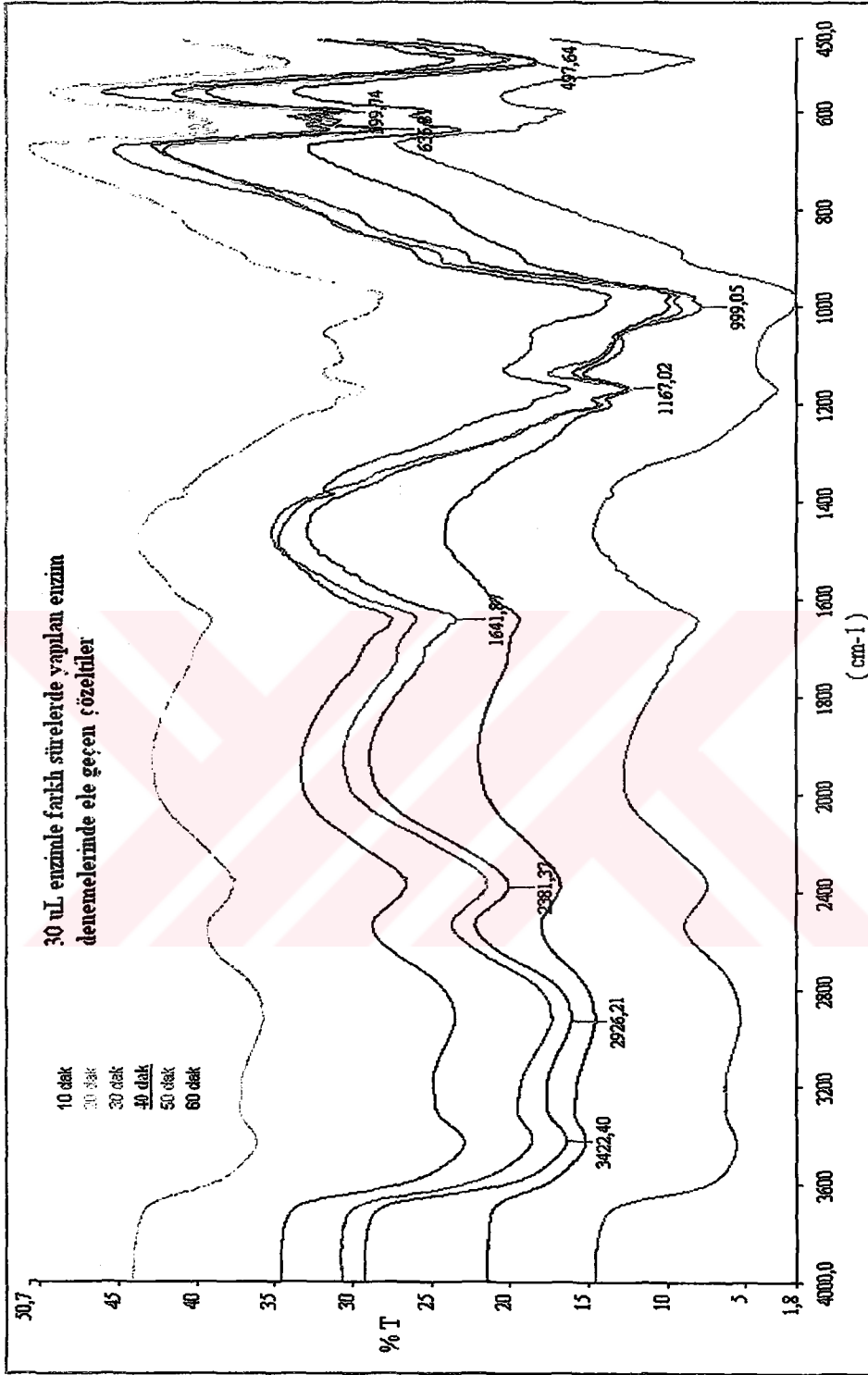
Ham Bolu-Himmetoğlu linyitinin % 30 HNO₃ ile oksidasyonu ardından elde edilen hümik asid (HA-N) ile *Horseradish peroxidase* enzimi reaksiyona sokulmuş; 30, 60, 120 µL enzim miktarlarının ve 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık reaksiyon sürelerinin hümik asid yapısında meydana getirdiği değişimler FTIR spektroskopisiyle incelenmiştir. Enzim reaksiyonu sonrasında elde edilen çözelti santrüflendi; çözelti ve çökelti olmak üzere iki fraksiyona ayrıldı ve kurutularak analiz edildi. Bu iki fraksiyonun fonksiyonel grupları nitrik asidle muamele sonrasında ekstrakte edilen hümik asid (HA-N) ile kıyaslanarak meydana gelen değişimler belirlendi.

30 µL enzim miktarları ile yapılan 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık reaksiyonlar sonucunda elde edilen çözelti ve çökelti fraksiyonları Şekil 6.85 ve Şekil 6.86'da verilmektedir. Çözelti fraksiyonlarının hepsinde zamana bağlı olarak değişen belirgin bir fark gözlenmemiştir. FTIR spektrumlarında 3422, 2926, 2381, 1641, 1167, 999, 637, 599, 497 cm⁻¹'de bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.85). Çökelti fraksiyonları incelendiğinde ise çözelti fraksiyonunda olduğu gibi fonksiyonel gruplarda zamana bağlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu ürünlerin FTIR spektrumlarında 3411, 2928, 2382, 1709, 1628, 1100, 995, 637, 621, 493 cm⁻¹ civarında bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.86).

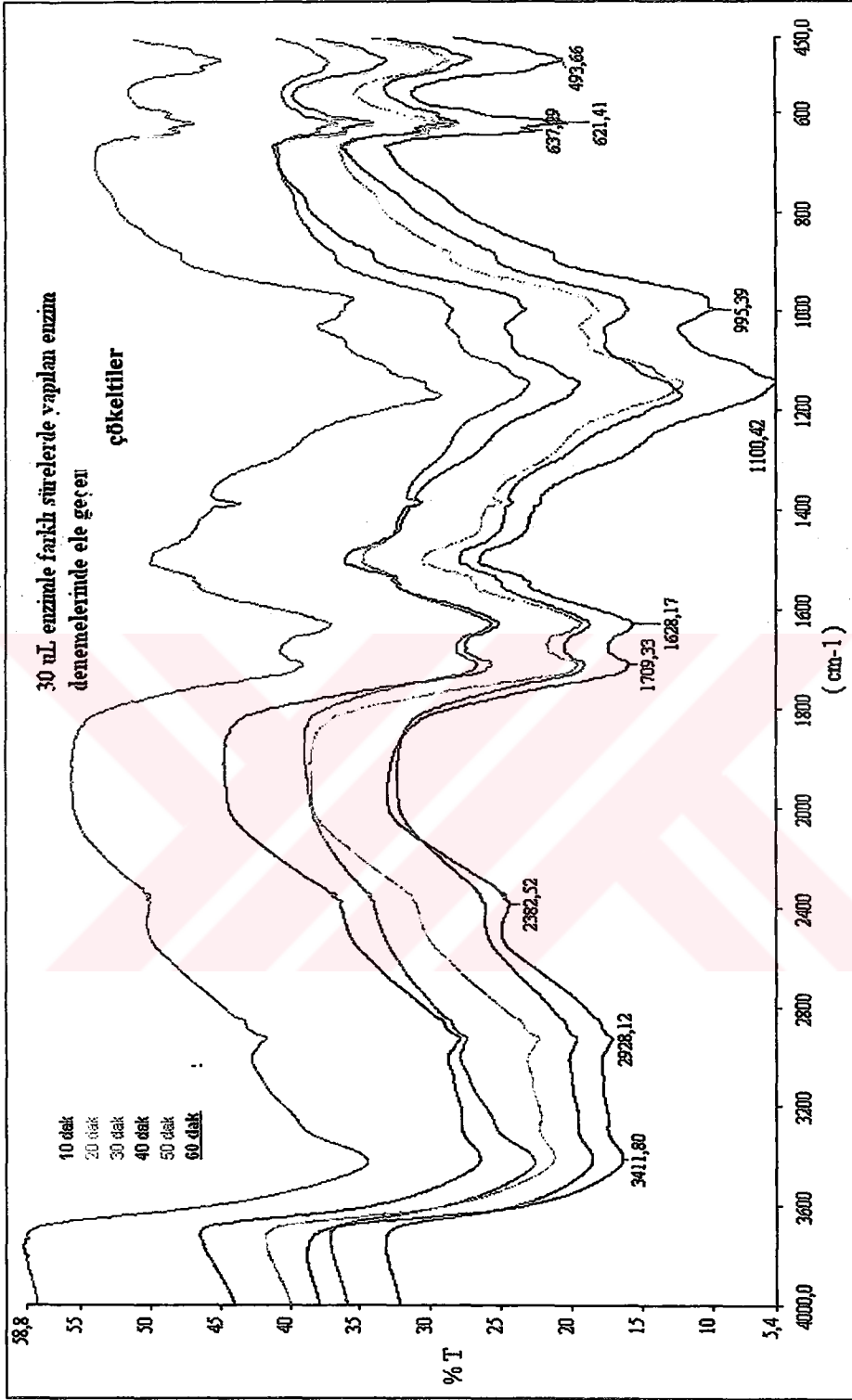
Şahit deneme, enzimli deneme (çözelti) ve HA-N kıyaslandığında enzim etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda 861, 2920, 1384, 1077 cm⁻¹'de bandların kaybolduğu görülmüştür (Şekil 6.89).

Şahit deneme, enzimli deneme (çökelti) ve HA-N kıyaslandığında enzim etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda 1710 ve 2380 cm⁻¹'de bandların oluştuğu, HA-N'de gözlenen 861, 1077 cm⁻¹'de bandların kaybolduğu ve 1384 cm⁻¹'deki bandın ise azaldığı gözlenmiştir (Şekil 6.90).

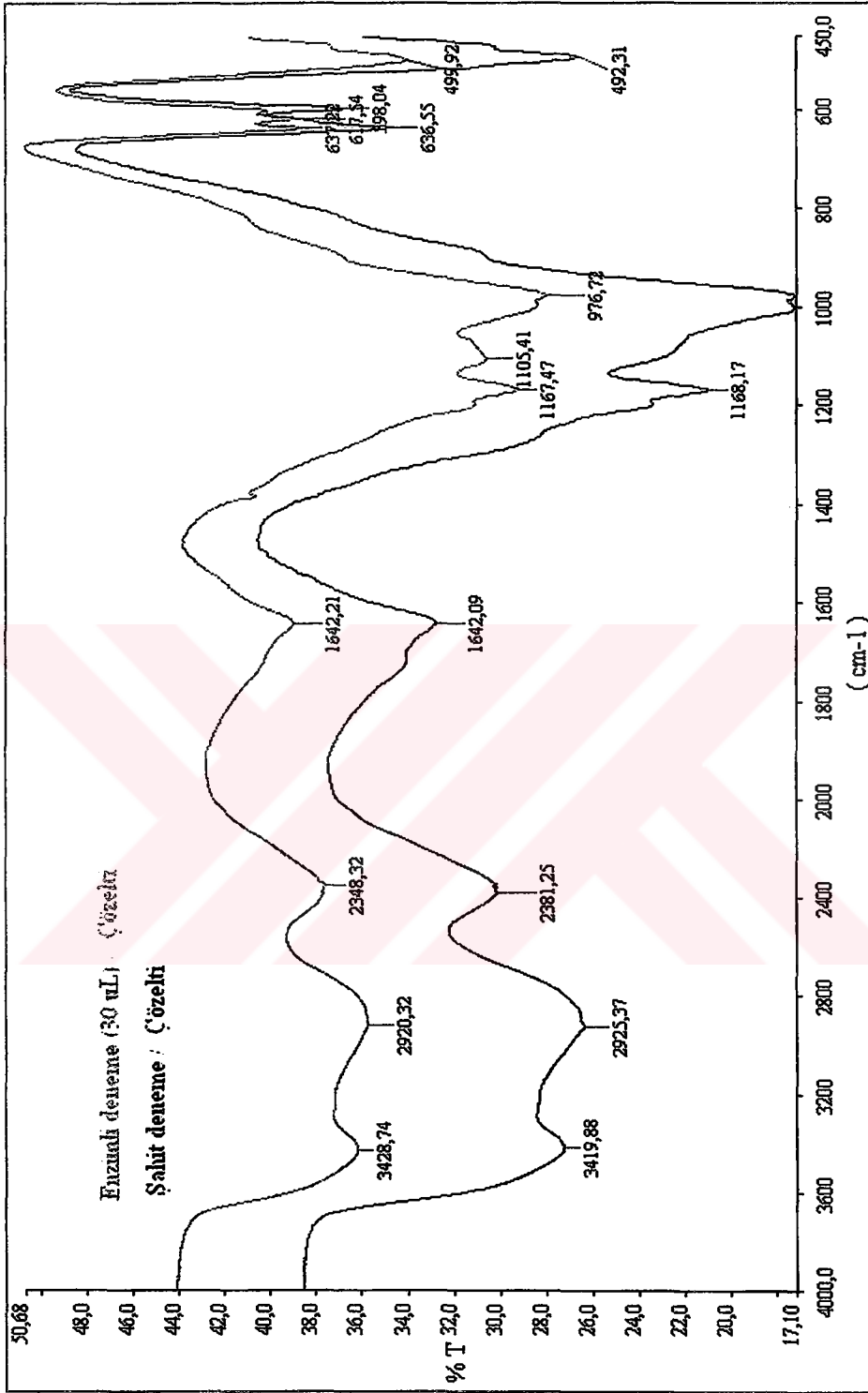
Enzimle yapılan reaksiyonlar sonrasında çözelti ve çökelti fraksiyonları kıyaslandığında çökeltilerde çözeltilerden farklı olarak 1710 ve 1105 cm⁻¹'deki bandların varolduğu saptanmıştır (Şekil 6.91).



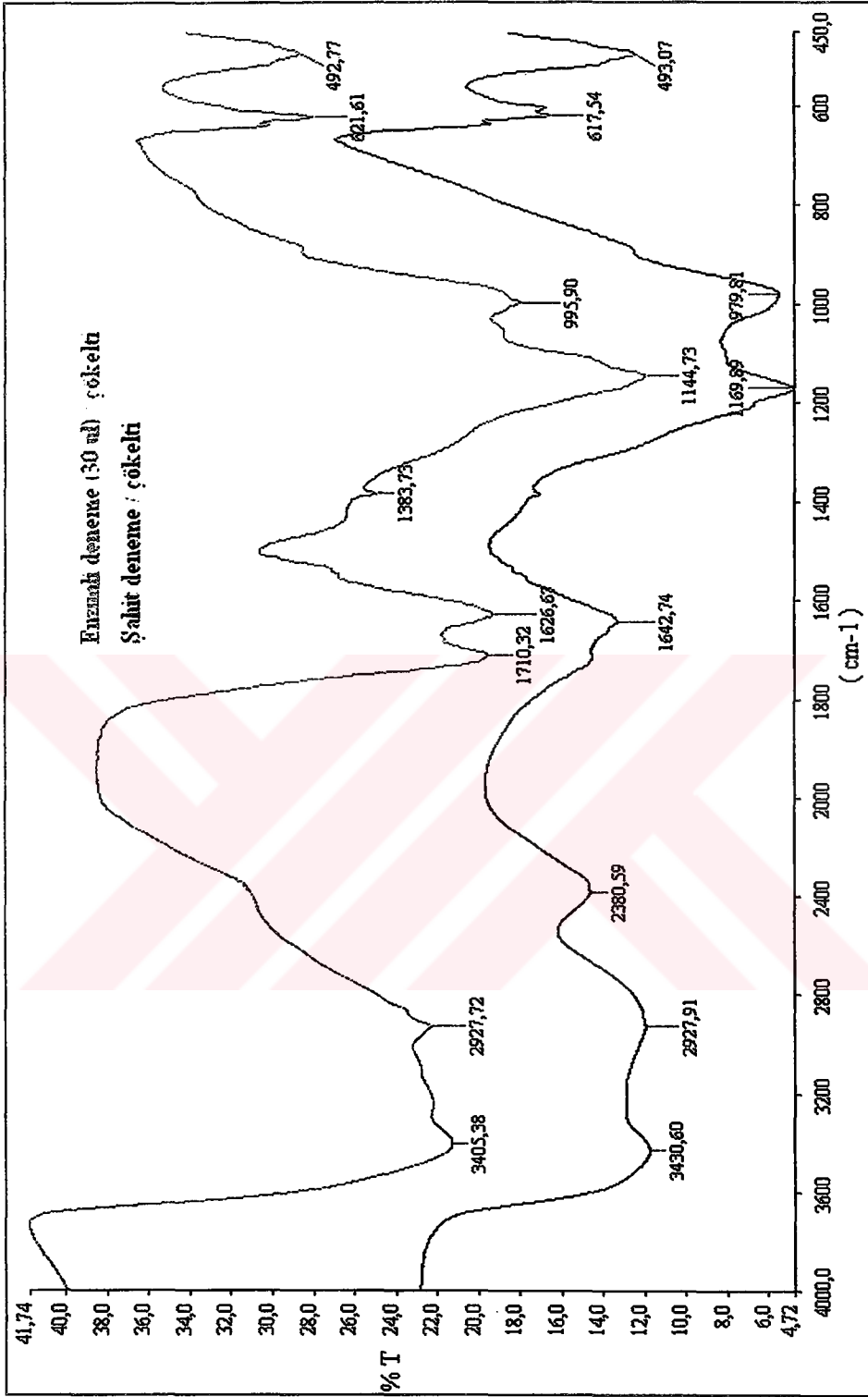
Şekil 6.85 HA-N ve HRP enziminin (30 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları



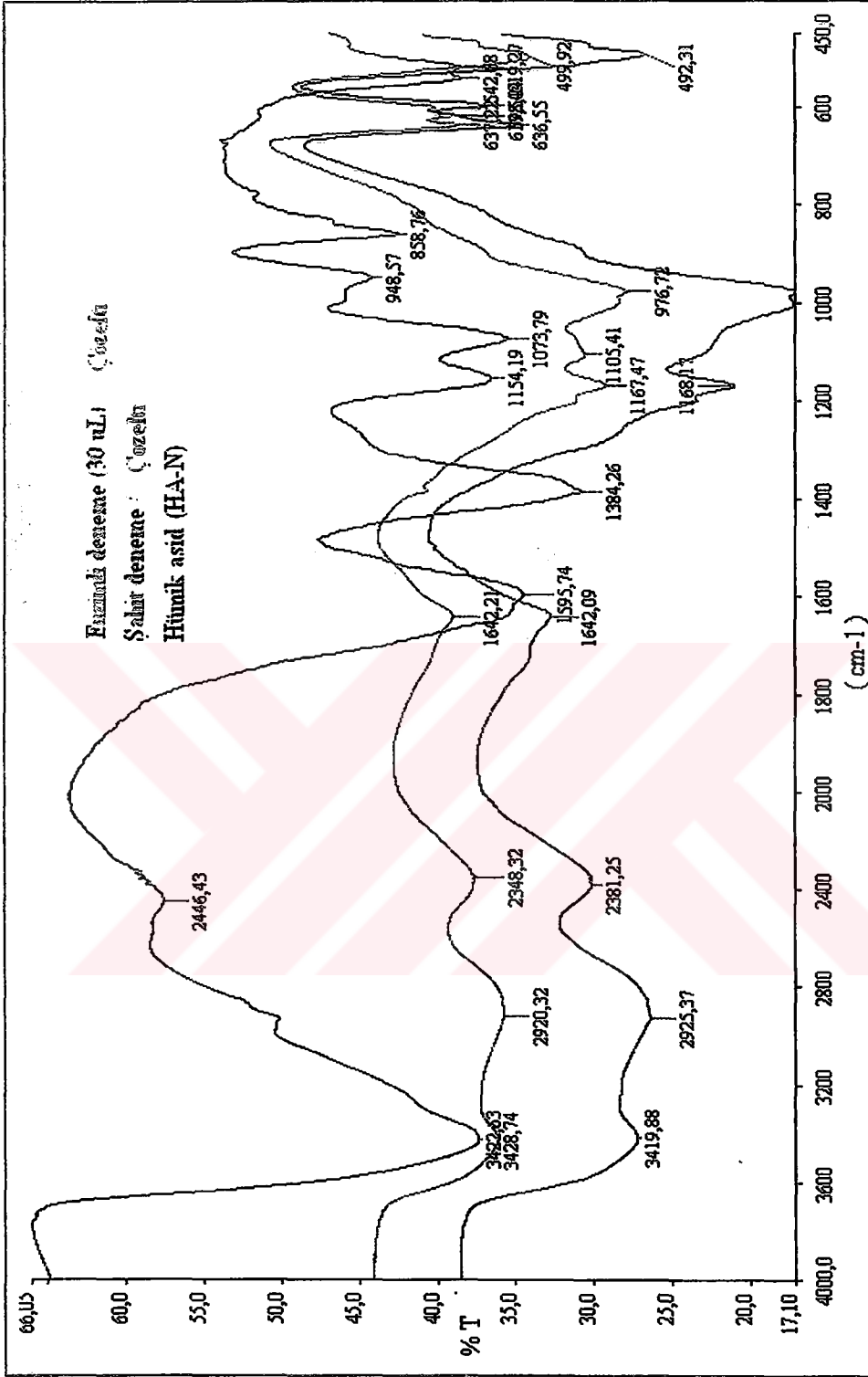
Şekil 6.86 HA-N ve HRP enziminin (30 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çöktürmelerin FTIR spektrumları



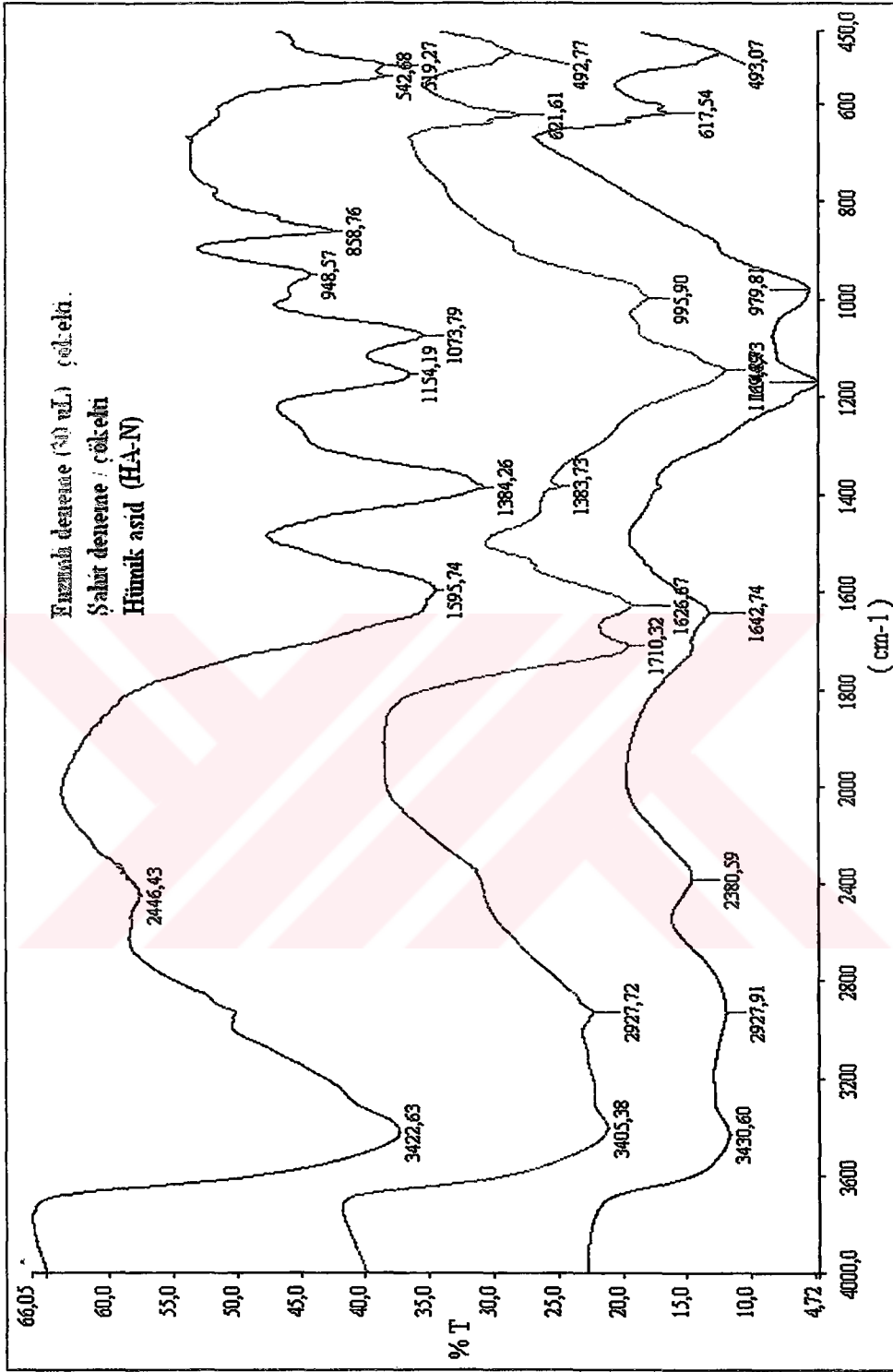
Şekil 6.87 HA-N'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin FTIR spektrumu



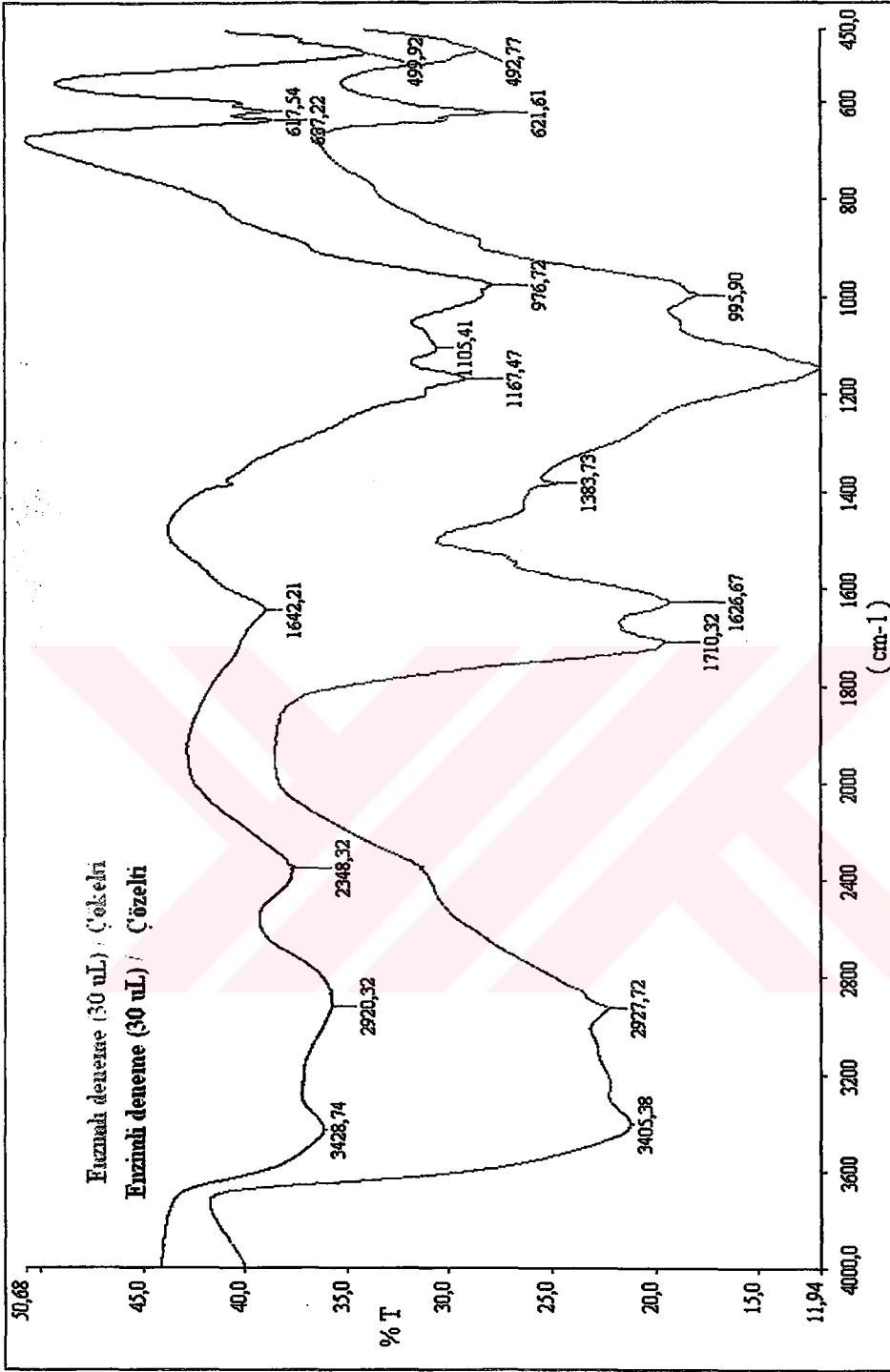
Şekil 6.88 HA-N'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu



Şekil 6.89 HA-N'in HRP enzimiyle (30 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin hümkik asidle (HA-H) karşılaştırılması



Şekil 6.90 HA-N'in HRP enzimiyle (30 μ L) reaksiyonundan elde edilen çökeltilisinin hümkik asidle (HA-H) karşılaştırılması



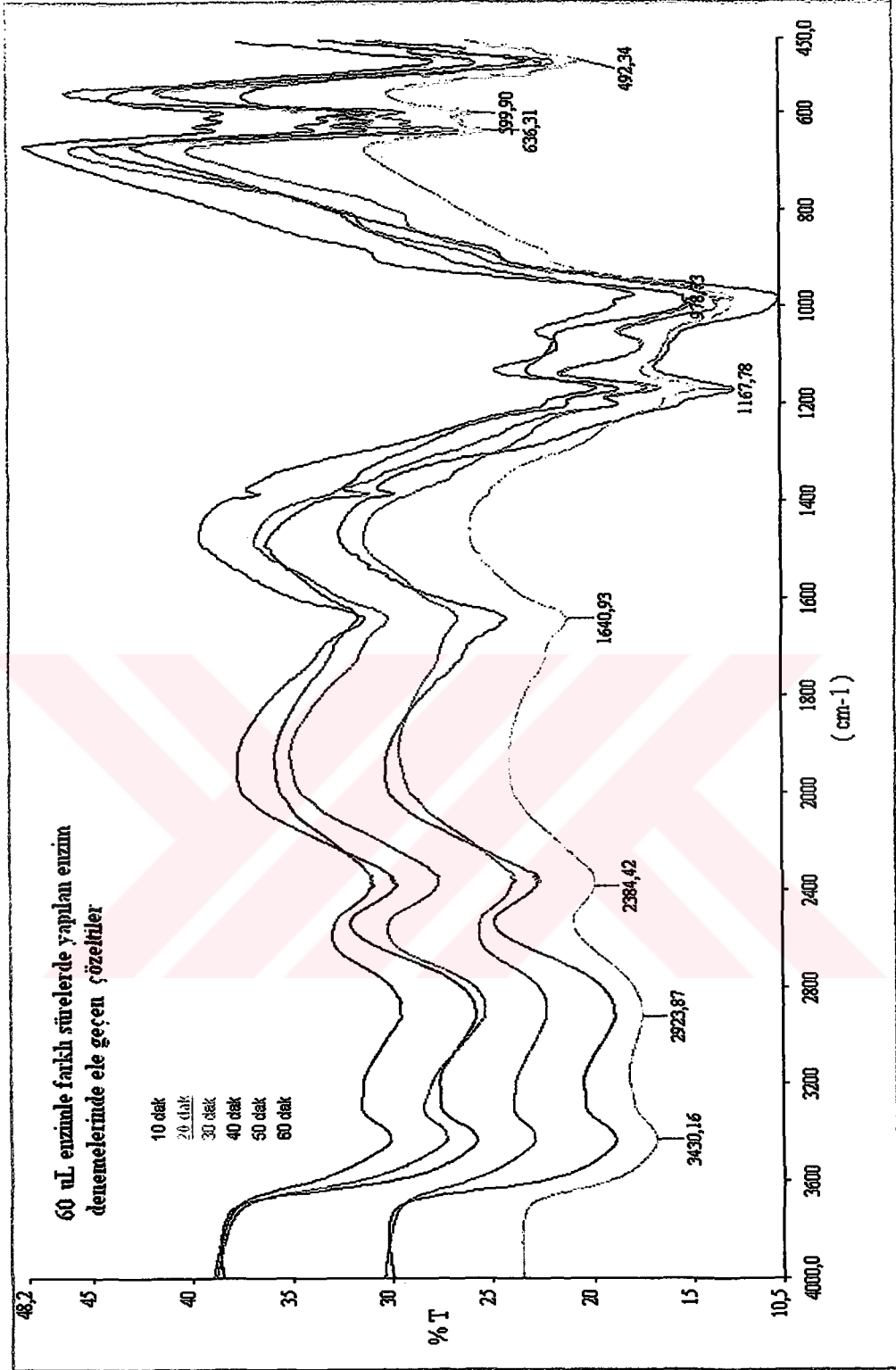
Şekil 6.91 HA-N'in HRP enzimiyle (30 μ L) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çöktürlerin karşılaştırılması

60 µL enzim miktarları ile yapılan 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık reaksiyonlar sonucunda elde edilen çözelti ve çökelti fraksiyonları Şekil 6.92 ve Şekil 6.93'de verilmektedir. Çözelti fraksiyonlarının hepsinde zamana bağlı olarak değişen belirgin bir fark gözlenmemiştir. FTIR spektrumlarında 3430, 2923, 2384, 1640, 1167, 978, 636, 599, 492 cm^{-1} 'de bandların varlığı gözlenmiştir (Şekil 6.92). Çökelti fraksiyonları incelendiğinde ise çözelti fraksiyonunda olduğu gibi fonksiyonel gruplarda zamana bağlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu ürünlerin FTIR spektrumlarında 3428, 2928, 1709, 1628, 1384, 1141, 994, 621, 500 cm^{-1} 'de oluşmuş bandlar gözlenmiştir (Şekil 6.93).

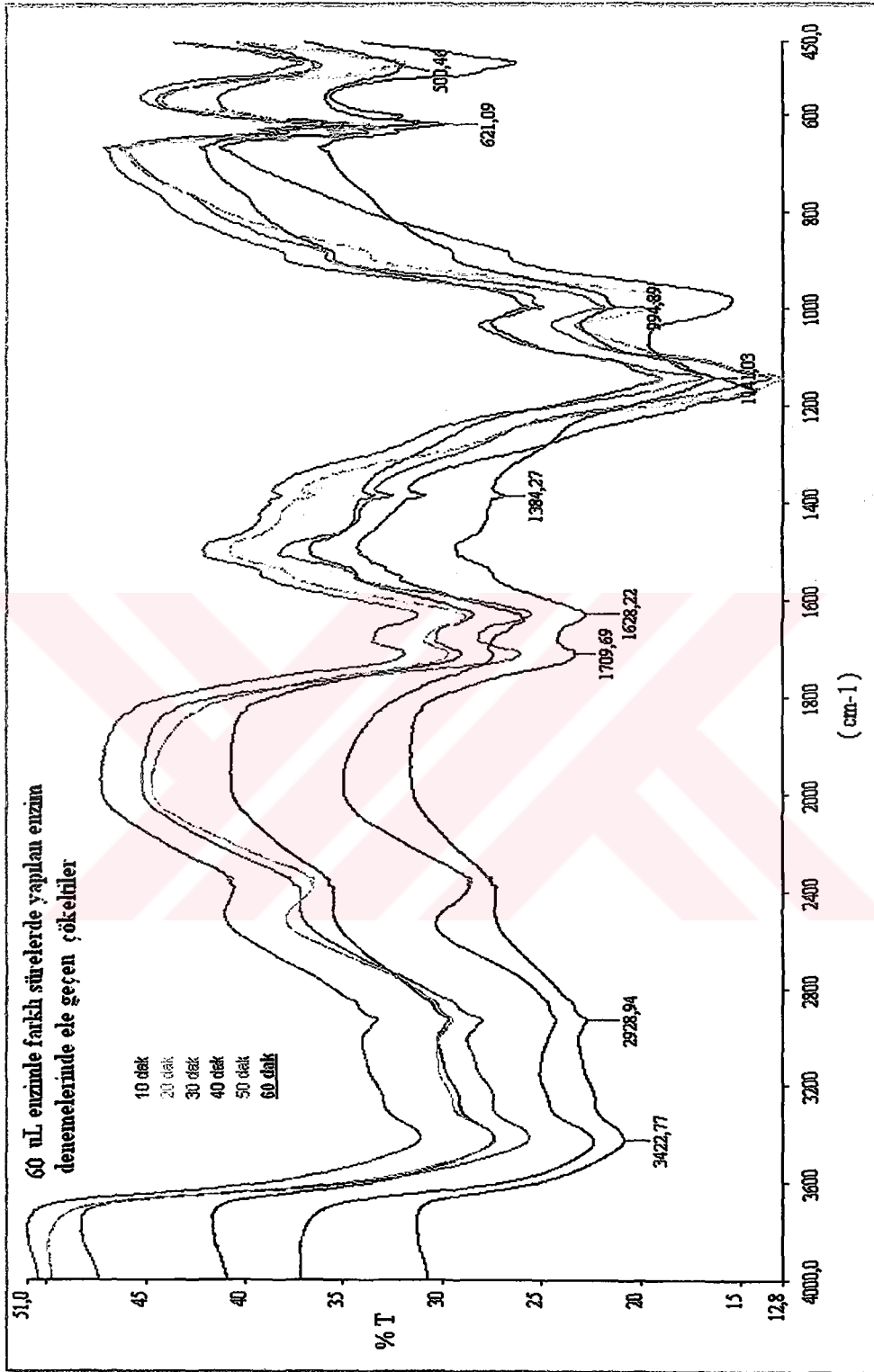
Şahit deneme, enzimli deneme (çözelti) ve HA-N kıyaslandığında enzim etkisiyle HA-N'de görülen 1076, 861 cm^{-1} ve 1384 cm^{-1} 'deki bandların kaybolduğu görülmüştür (Şekil 6.96).

Şahit deneme, enzimli deneme (çökelti) ve HA-N kıyaslandığında enzim etkisiyle 1709, 1141 cm^{-1} 'deki bandların oluştuğu, HA-N'de gözlenen 1384, 861 cm^{-1} 'deki bandın kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 6.97).

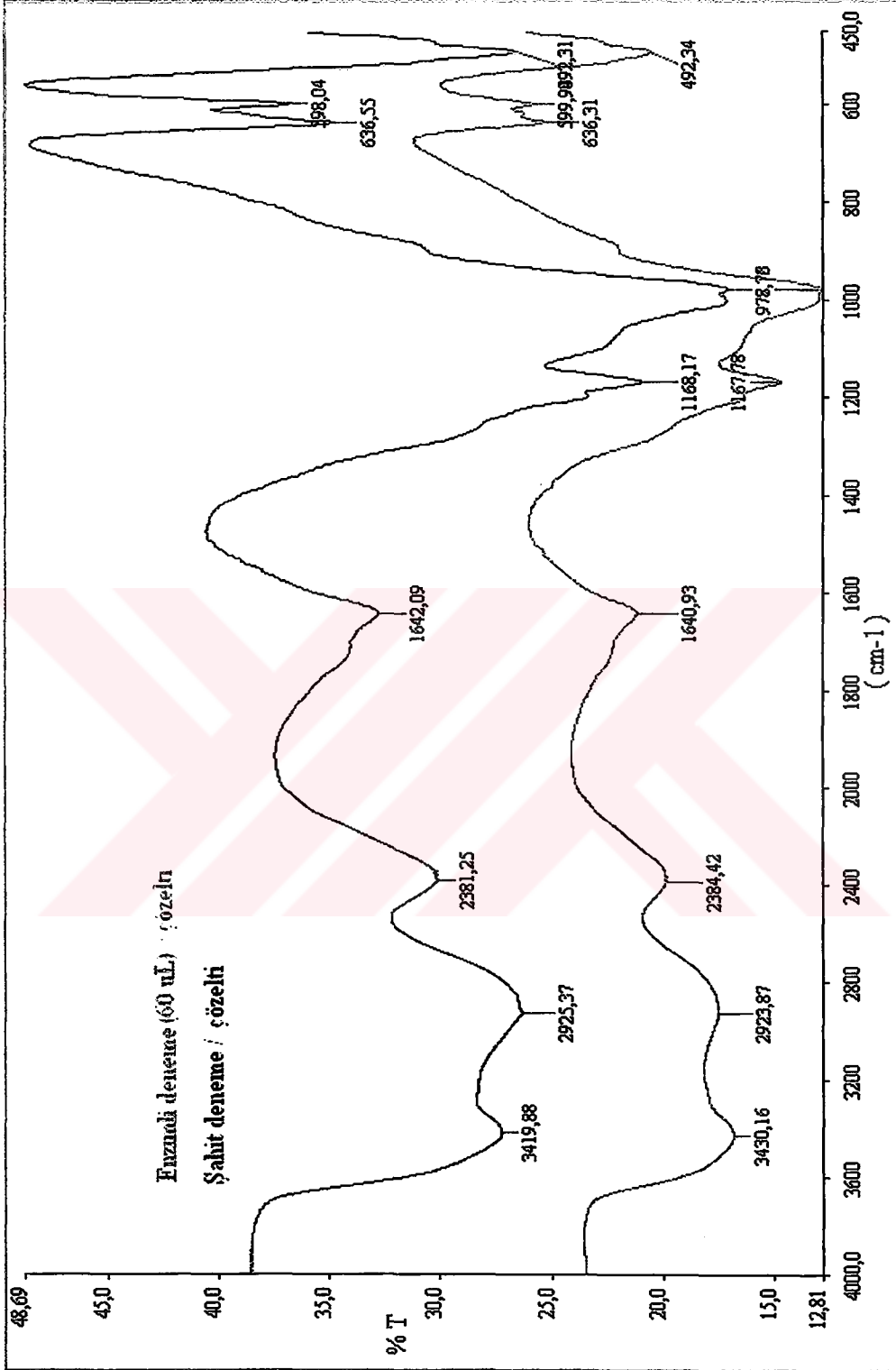
Enzimle yapılan reaksiyonlar sonrasında elde edilen çözelti ve çökelti fraksiyonları kıyaslandığında çökeltelerde çözeltilerden farklı olarak 1709 cm^{-1} 'de bandın oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.98).



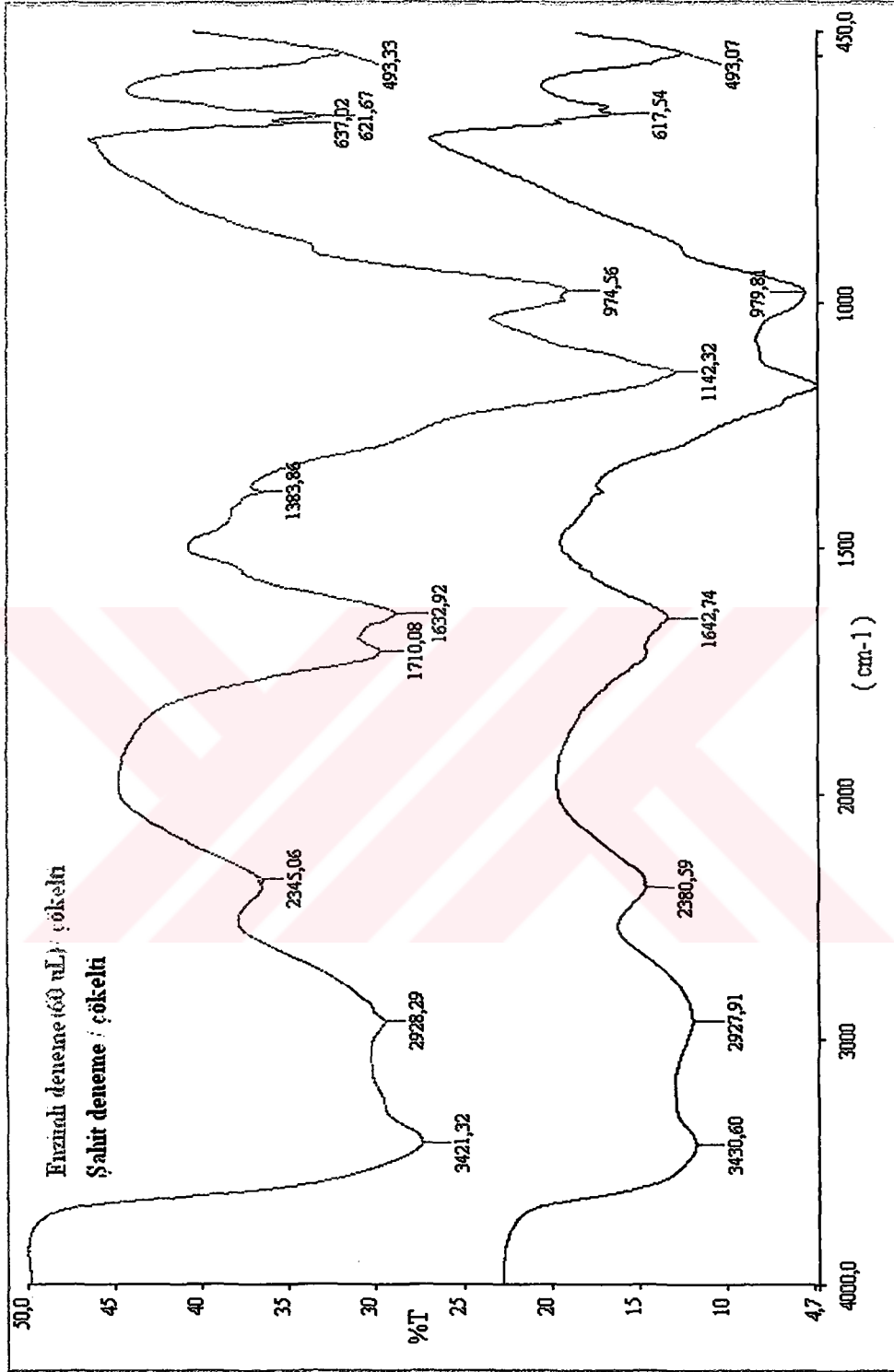
Şekil 6.92 HA-N ve HRP enziminin (60 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları



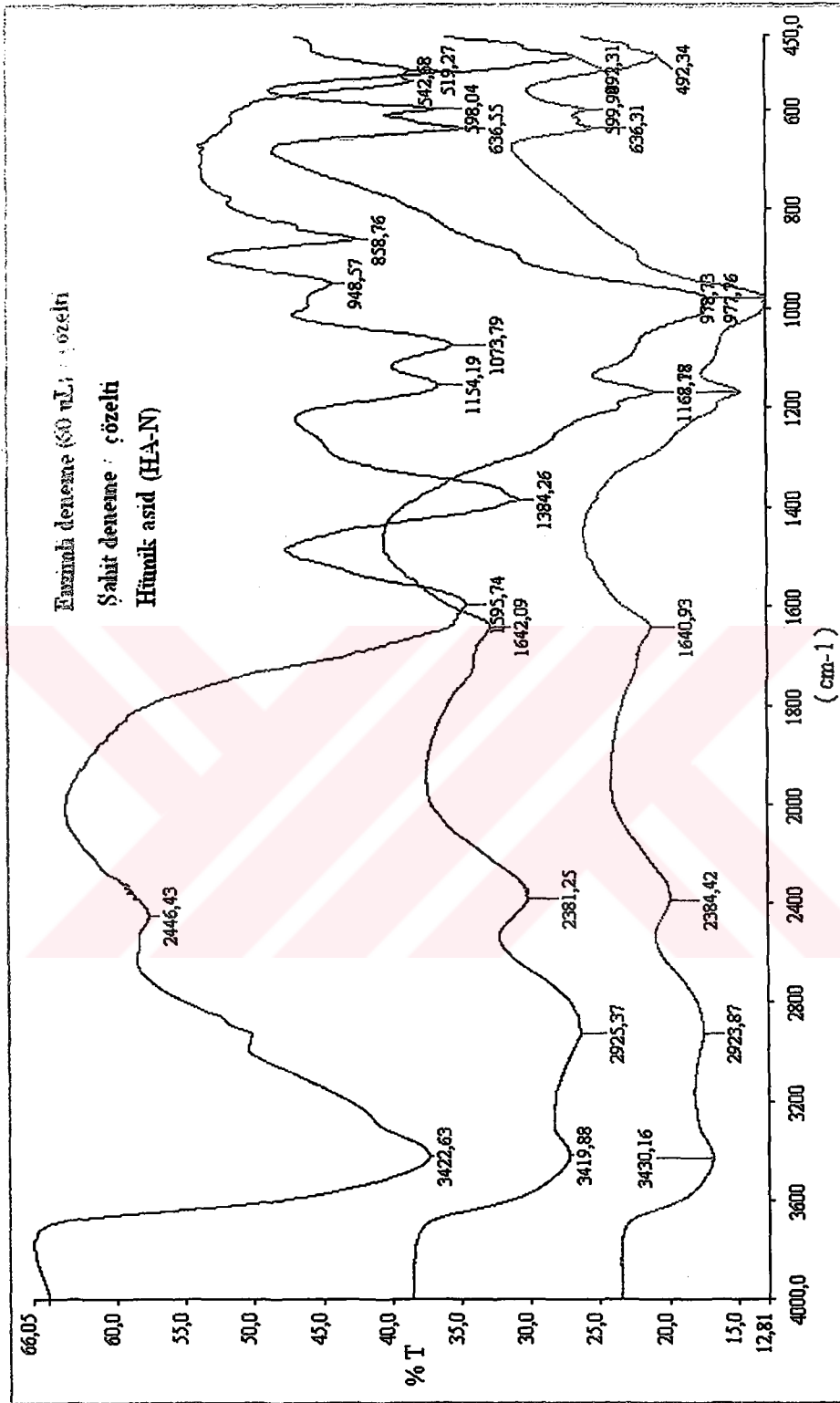
Şekil 6.93 HA-N ve HRP enziminin (60 µL) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları



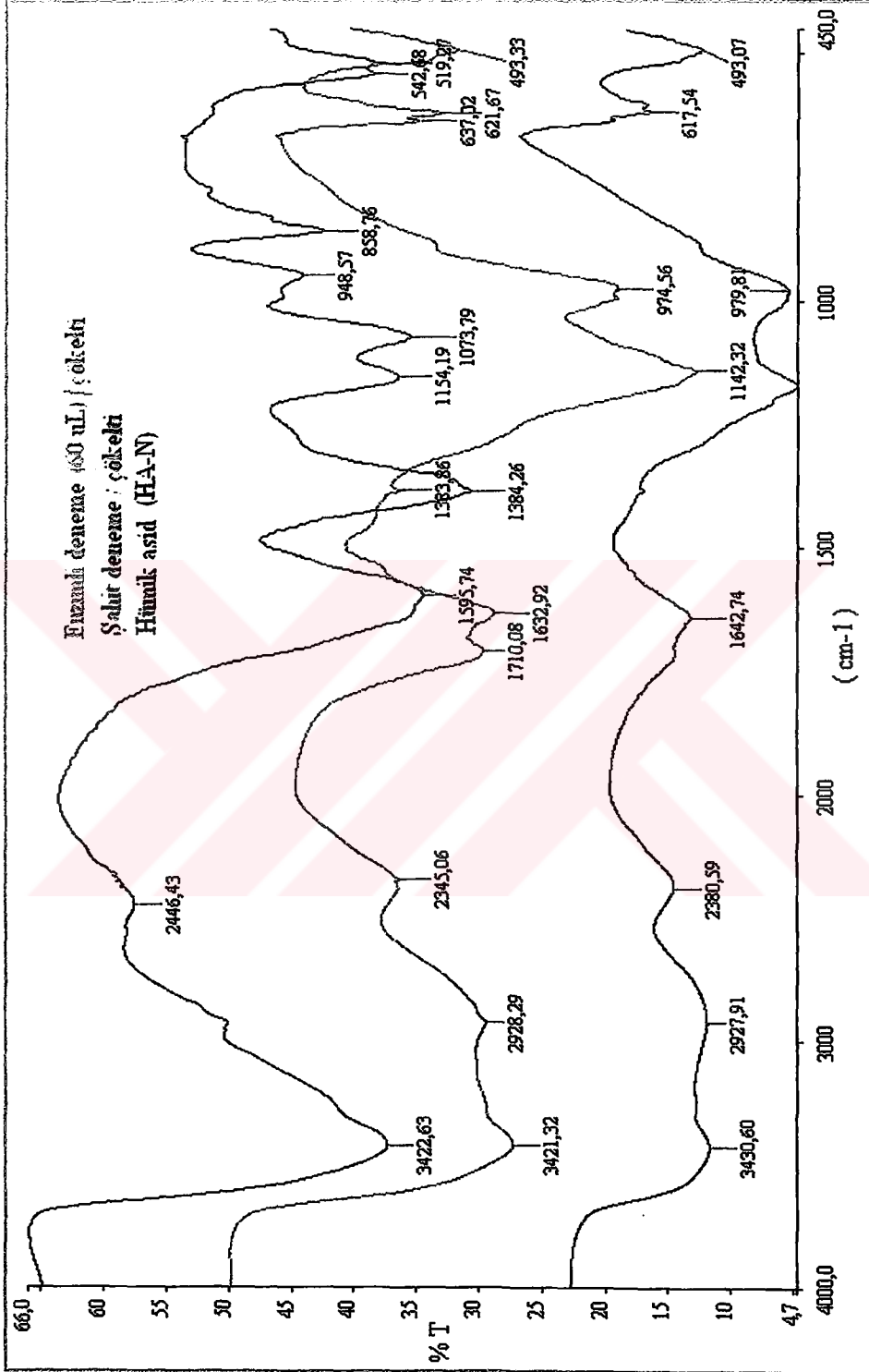
Şekil 6.94 HA-N'in HRP enzimiyle (60 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin FTIR spektrumu



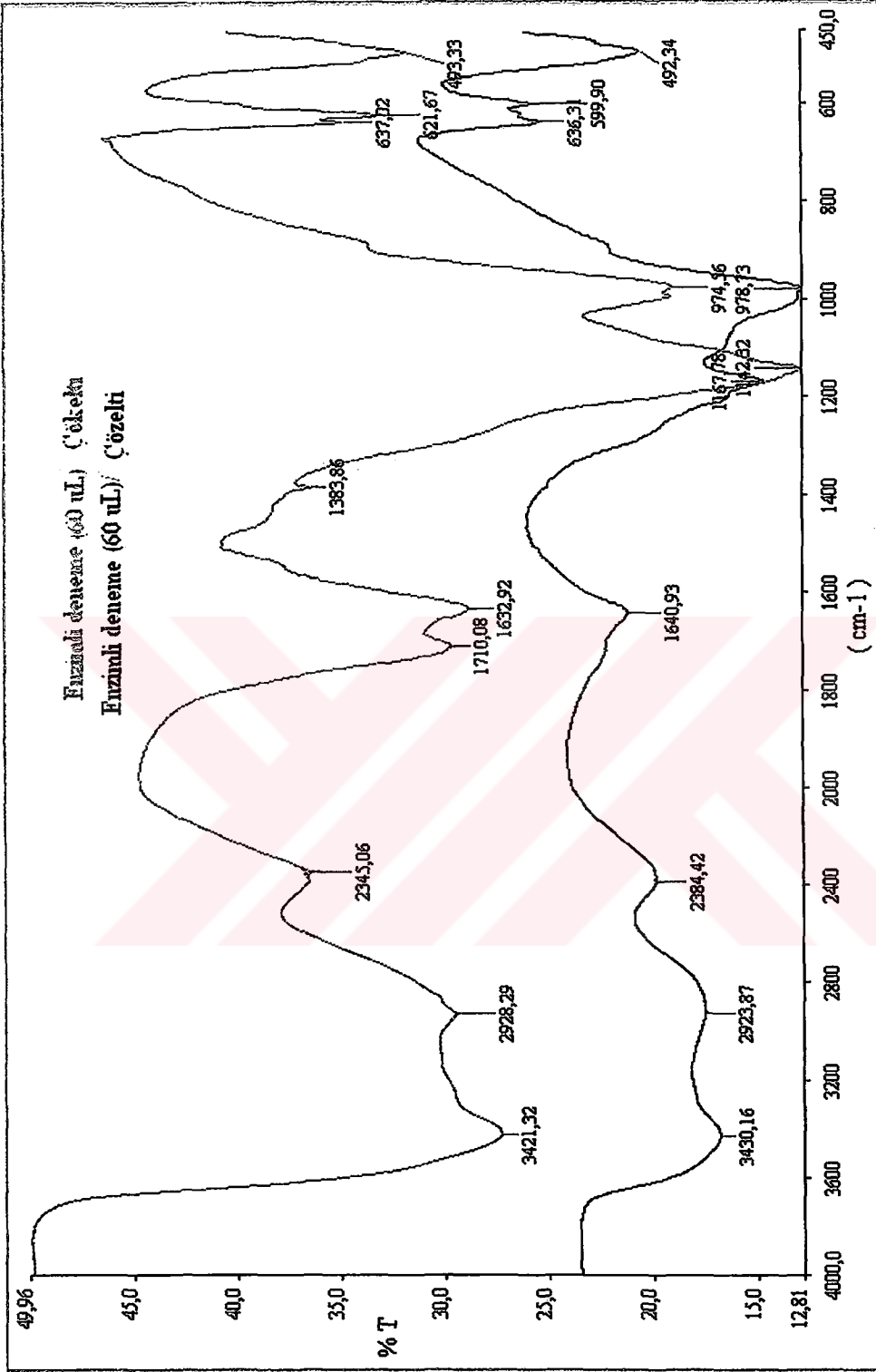
Şekil 6.95 HA-N'in HRP enzimiyle (60 μL) reaksiyonundan elde edilen çökeltilisinin FTIR spektrumu



Şekil 6.96 HA-N'in HRP enzimiyle (60 μ L) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin hüyük asidle (HA-H) karşılaştırılması



Şekil 6.97 HA-N'in HRP enzimiyle (60 μ L) reaksiyonundan elde edilen çökeltilisinin hümmik asidle (HA-H) karşılaştırılması



Şekil 6.98 HA-N'in HRP enzimiyle (60 μ L) gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çözelti ve çökeltilerin karşılaştırılması

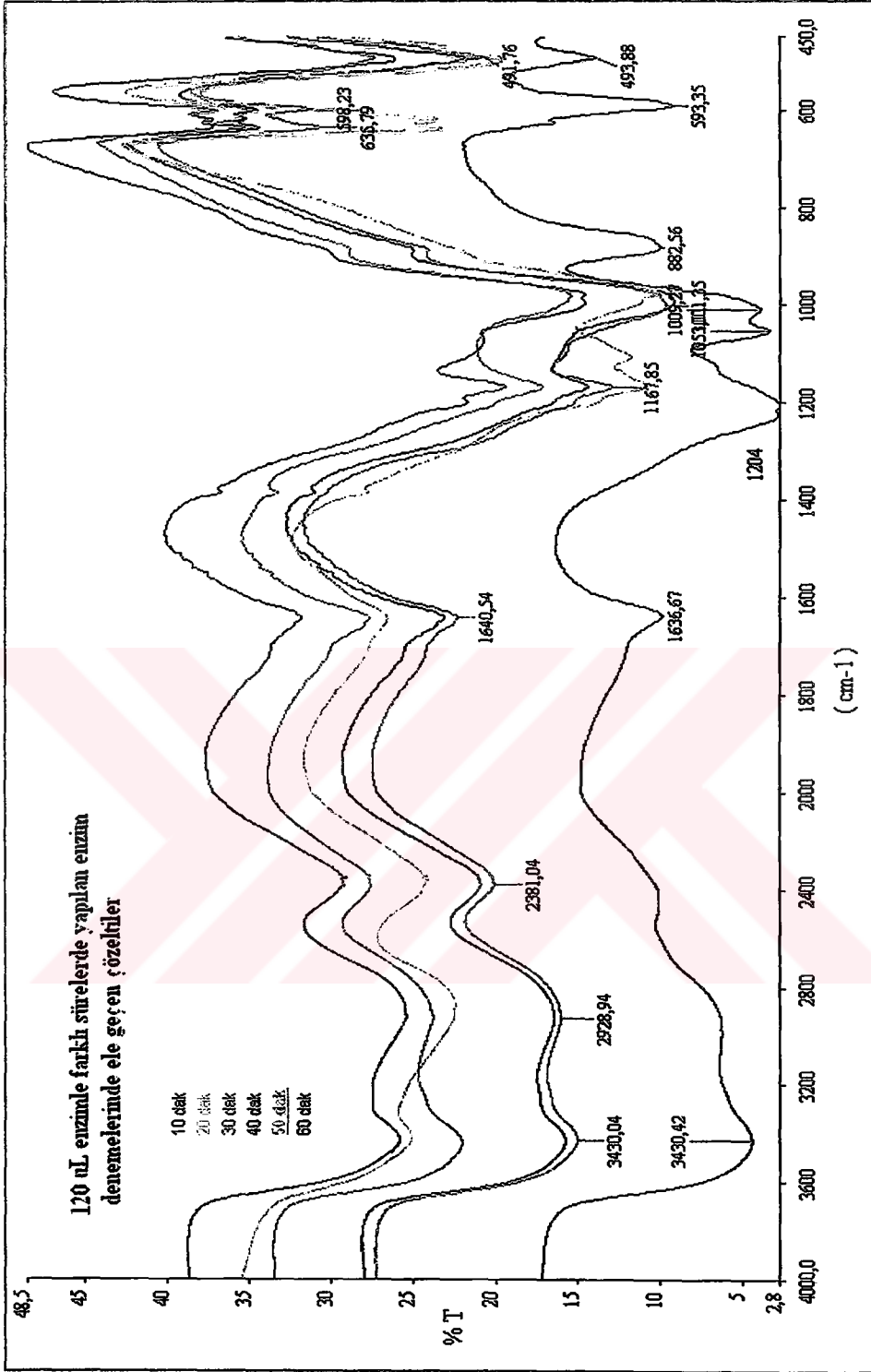
120 µL enzim miktarları ile yapılan 10, 20, 30, 40, 50, 60 dakikalık reaksiyonlar sonucunda elde edilen çözelti ve çökelti fraksiyonları Şekil 6.99 ve Şekil 6.100'de verilmektedir. Çözelti fraksiyonlarında 882 cm⁻¹'de meydana gelen bandın zamana bağlı olarak kaybolduğu gözlenmemiştir. Ancak 60 dakikalık denemede tekrar oluştuğu gözlenmiştir. FTIR spektrumlarında 3430, 2928, 2381, 1640, 1204, 1167, 1053, 1009, 635, 598 ve 493 cm⁻¹'de bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.99). Çökelti fraksiyonları incelendiğinde fonksiyonel gruplarda zamana bağlı bir değişim gözlenmemiştir. Ancak 60 dakikalık denemeden elde edilen üründe diğerlerinden farklı olarak 1051, 1008 ve 882 cm⁻¹'de piklerin oluştuğu gözlenmiştir. Diğer ürünlerin FTIR spektrumlarında 3422, 1713, 1632, 1170, 995, 626, 593 cm⁻¹'de bandların varlığı gözlenmiştir (Şekil 6.100).

Şahit deneme, enzimli deneme (çözelti) ve HA-N kıyaslandığında enzim etkisiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda HA-N'de oluşan 1384, 1076, 861 cm⁻¹'deki bandların kaybolduğu görülmüştür (Şekil 6.103). Enzimli denemede şahit denemeye göre 882 cm⁻¹ 'dendeki bandın oluştuğu gözlenmiştir.

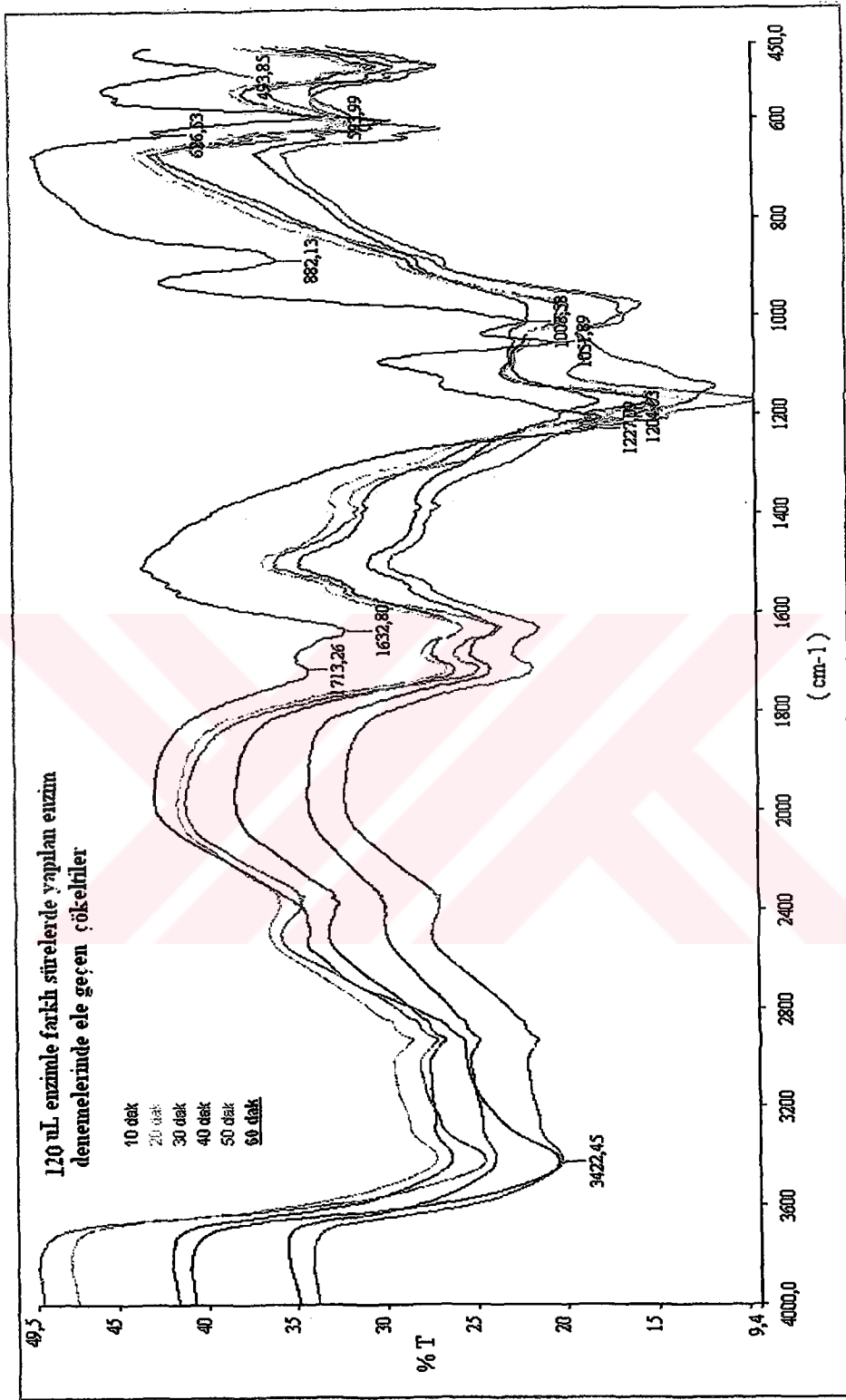
Şahit deneme, enzimli deneme (çökelti) ve HA-N kıyaslandığında enzim etkisiyle 1713, 1227, 1204, 1051, 1008, 882 cm⁻¹'de bandların oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.104). HA-N'de görünen 1384, 1077 cm⁻¹'deki bandların kaybolduğu gözlenmiştir.

Enzimli denemelerden elde edilen çözelti ve çökelti kıyaslandığında çökelti çözeltilerde çözeltilerden farklı olarak çökelti fraksiyonunda 1713 cm⁻¹'deki bandın oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 6.105).

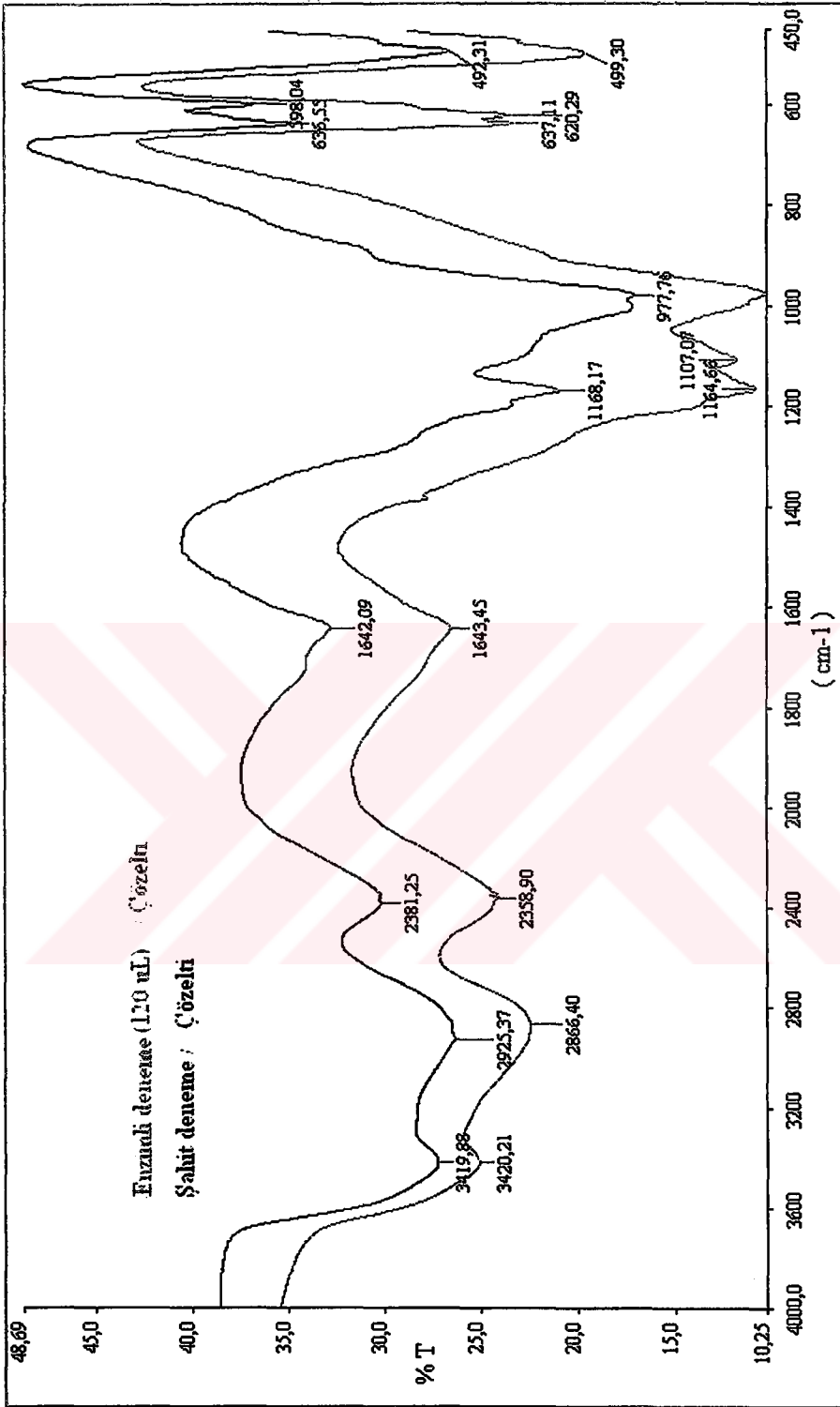
120 µL enzim miktarları ile yapılan 4 saatlik reaksiyon sonucunda elde edilen çözeltinin çözelti ve çökelti fraksiyonları Şekil 6.106 ve Şekil 6.107'de verilmektedir. Enzimli denemenin çözelti fraksiyonu ve şahit denemenin çökelti fraksiyonu aynı grupları içerdiği ancak HA-N'de gözlenen 861 cm⁻¹'deki bandın her iki fraksiyonda da yer almadığı gözlenmiştir.



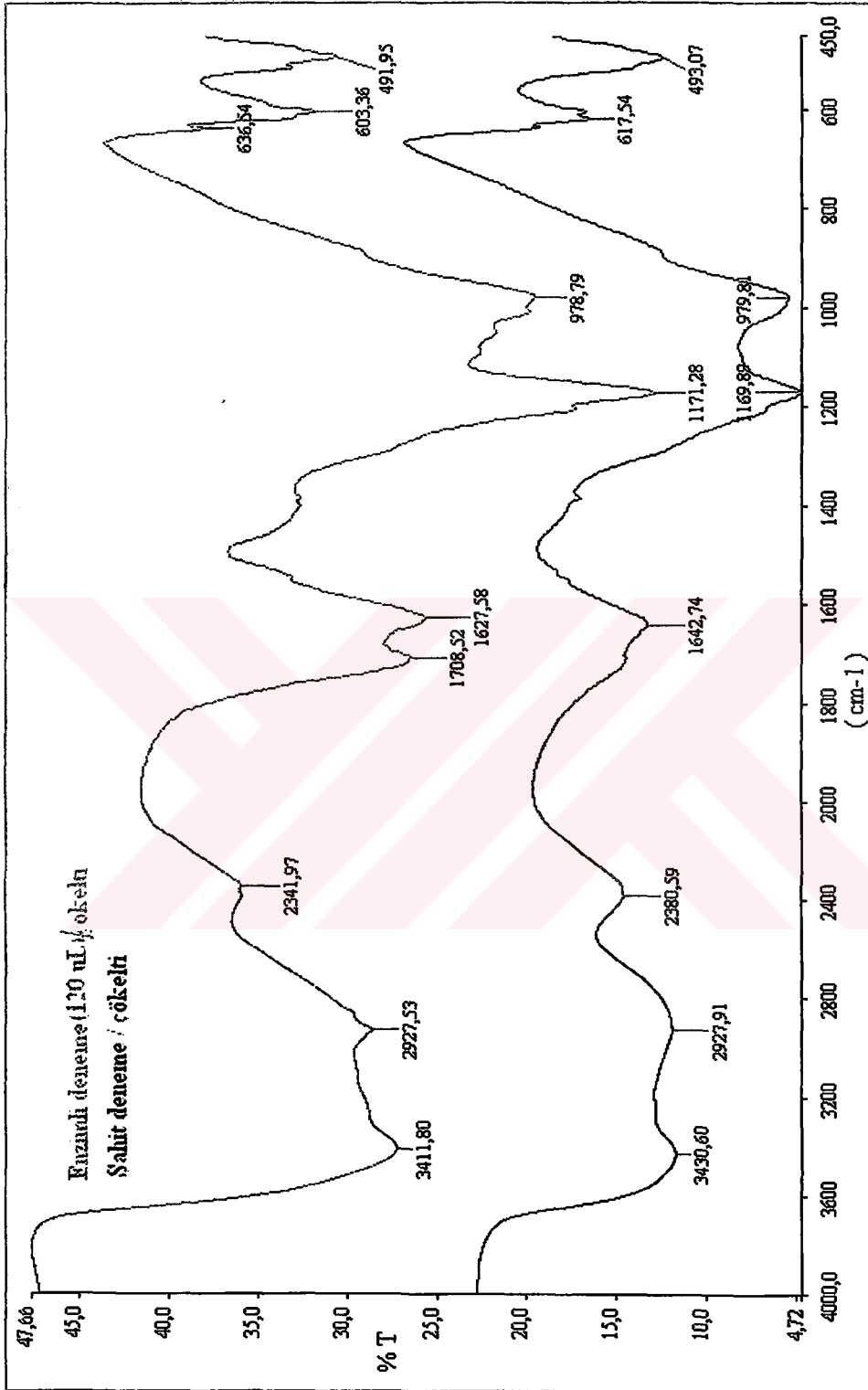
Şekil 6.99 HA-N ve HRP enziminin (120 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çözeltilerin FTIR spektrumları



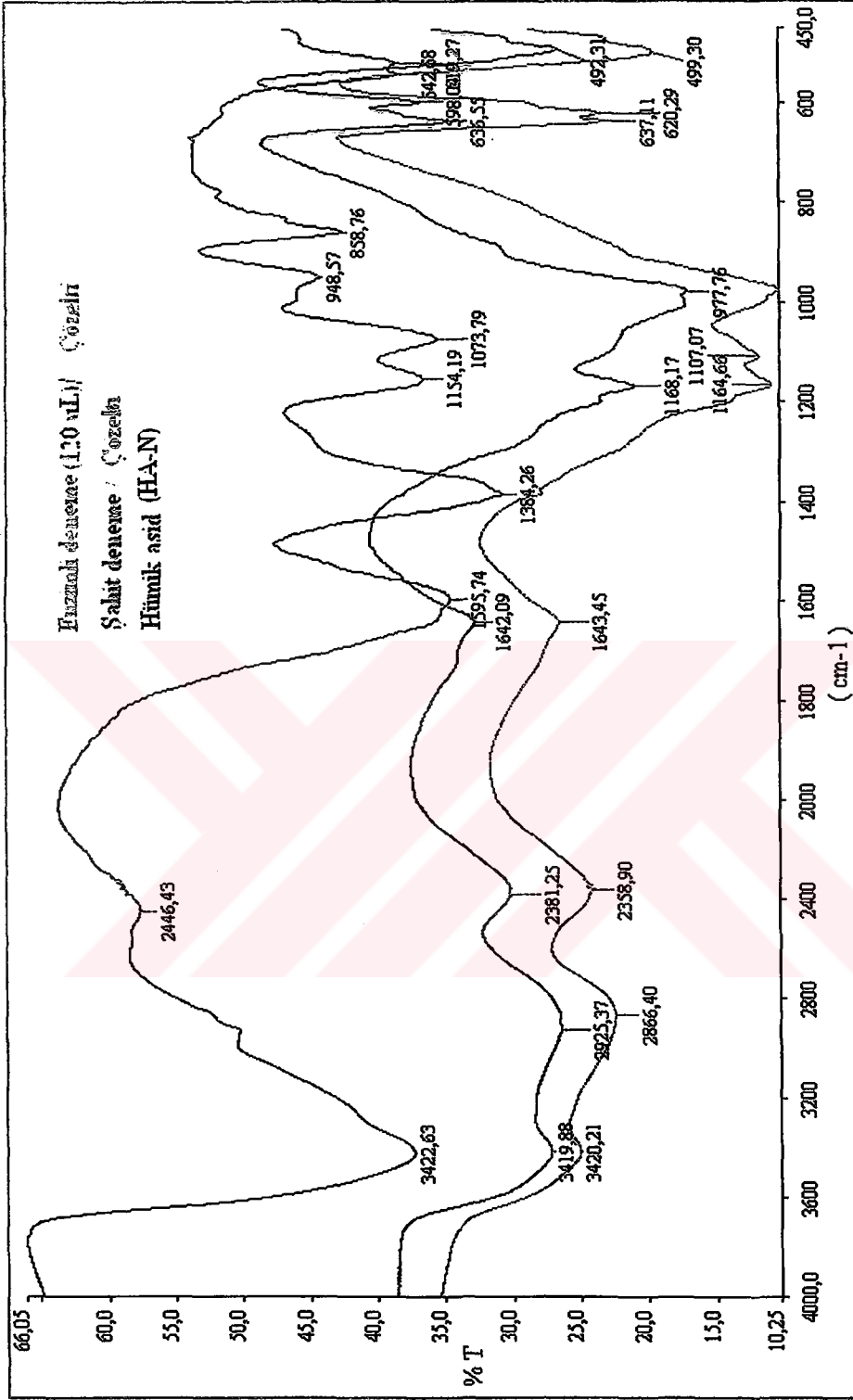
Şekil 6.100 HA-N ve HRP enziminin (120 μ L) farklı sürelerde gerçekleştirilen reaksiyonlarından elde edilen çökeltilerin FTIR spektrumları



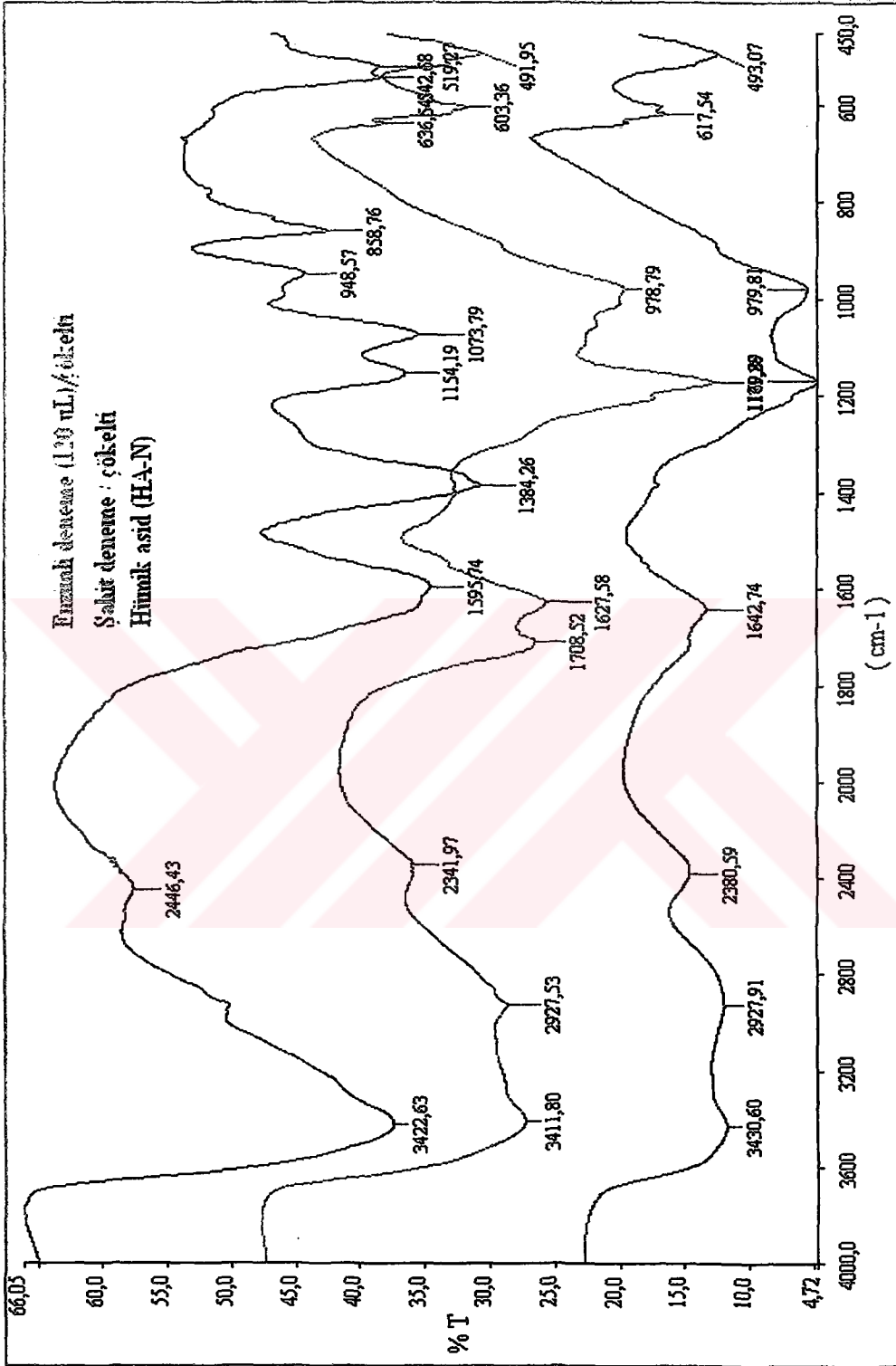
Şekil 6.101 HA-N'in HRP enzimiyle (120 µL) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin FTIR spektrumu



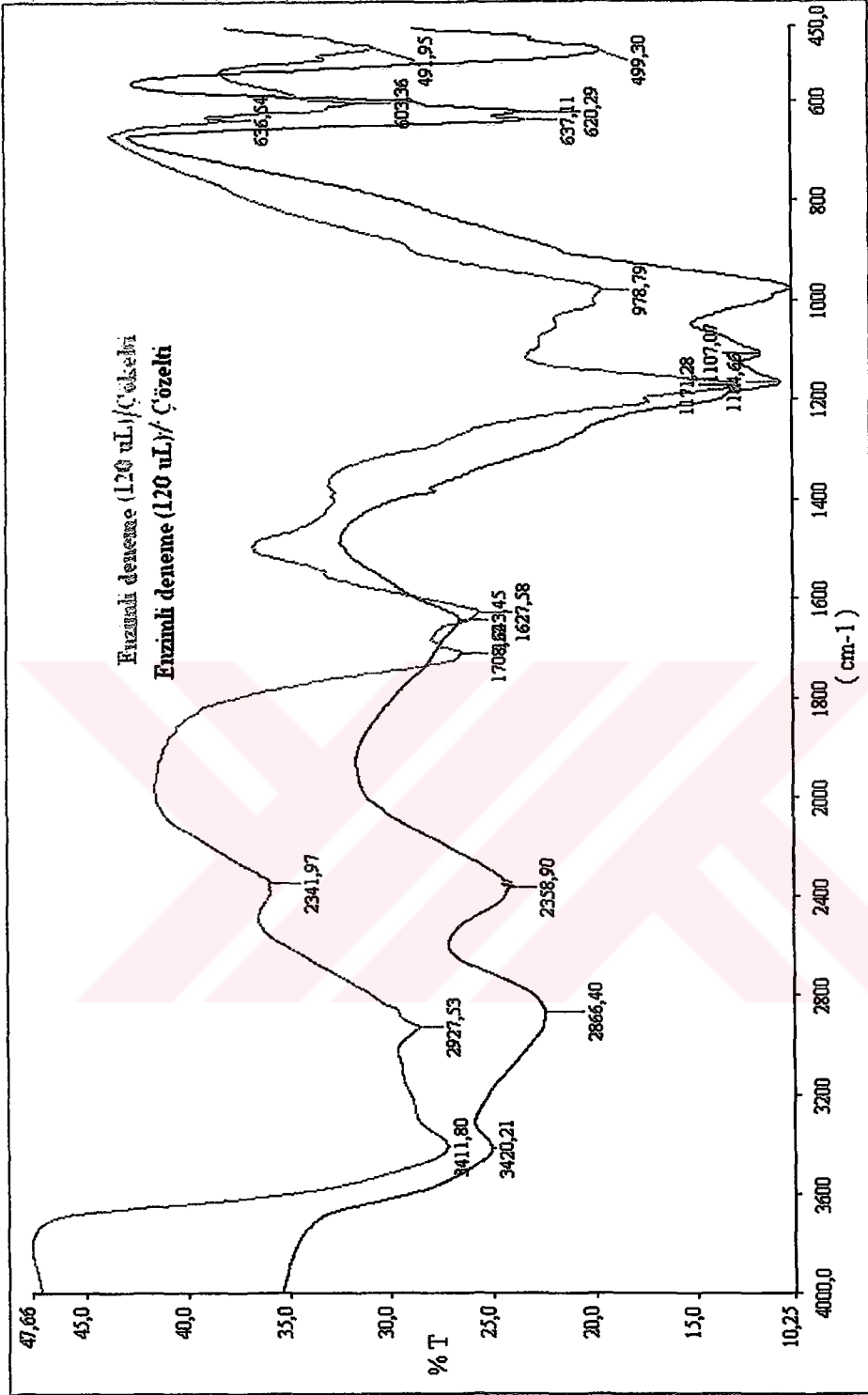
Şekil 6.102 HA-N'in HRP enzimiyle (120 μ L) reaksiyonundan elde edilen çökeltilisinin FTIR spektrumu



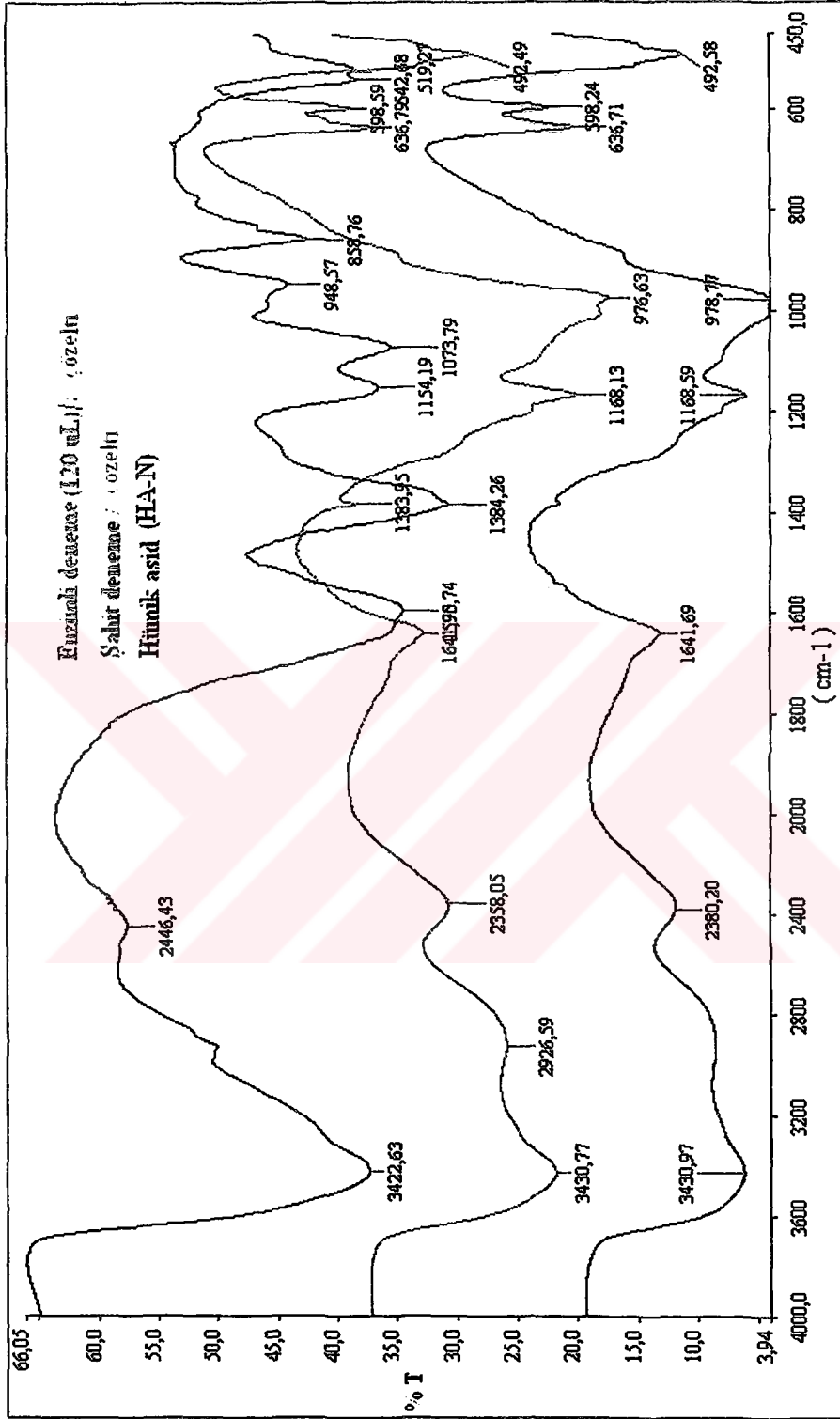
Şekil 6.103 HA-N'in HRP enzimiyle (120 μ L) reaksiyonundan elde edilen çözeltisinin hümkik asidle (HA-H) karşılaştırılması



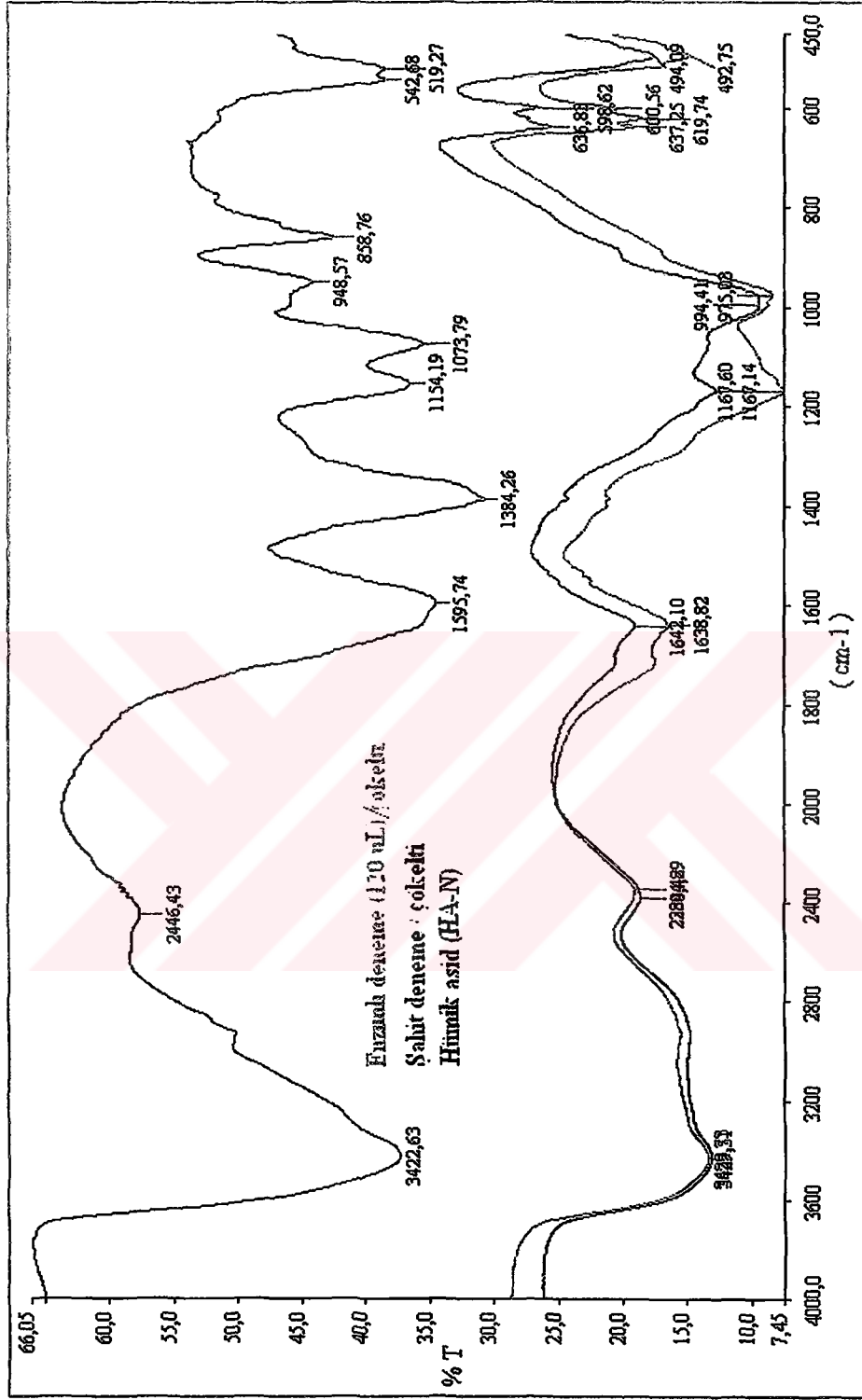
Şekil 6.104 HA-N'in HRP enzimiyle (120 μ L) reaksiyonundan elde edilen çökeltilisinin hümkik asidle (HA-H) karşılaştırılması



Şekil 6.105 HA-N'in HRP enzimiyle (120 µL) gerçekleştirilen reaksiyondan elde edilen çözelti ve çökeltilerin karşılaştırılması



Şekil 6.106 HA-N'in HRP enzimiyle (120 μ L) 4 saat sürede gerçekleştirilen reaksiyondan elde edilen çözeltisinin FTIR spektrumu



Şekil 6.107 HA-N'in HRP enzimiyle (120 µL) 4 saat sürede gerçekleştirilen reaksiyonundan elde edilen çökeltisinin FTIR spektrumu

Deneysel çalışmalardan elde edilen verilere ve literatür çalışmalarına göre aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

1. Nitrik asitle uygulanan kimyasal oksidasyon işlemi linyitlerde organik madde çözünürlüğüne yol açmış yapıda karbonil/karboksil (COOH, C=O) ve aromatik nitro gruplarının (N-O) oluşumuna neden olmuştur.
2. Yapılan çalışmada mikroorganizmanın (*Phanerochaete chrysosporium*) oksidlendirilmiş linyitleri sıvılaştırdığı kanıtlanmıştır. Numunelerin mikroorganizma ortamına konulmasının ardından 2. günde sıvılaştığı gözlenmiştir.
3. En yüksek mikrobiyal çözünürlük değerinin Bolu'da en düşük çözünürlüğün ise Bursa linyitinde olduğu belirlenmiştir (Bolu linyiti : % 31 kül, %0.9 S, 2860 kcal/kg, %55 O ; Bursa linyiti : % 6 kül, %1.09 S, 4620 kcal/kg, % 42 O). Linyit numuneleri arasında ilk sıvılaşan numunenin Muğla linyiti olduğu gözlenmiştir. Muğla linyitinin diğer linyitlere oranla küçük partiküllere sahip olması mikrobiyal sıvılaştırmanın daha etkin ve çabuk olmasını sağlamıştır. UV-Vis spektrumlarından alınan absorban değerleri mikrobiyal çözünürlüğün Bolu-Himmetoğlu> Kütahya-Seyitömer> Konya-İlgin> Muğla-Yatağan> Bursa-Kestelek olduğunu göstermektedir.
4. Mikroorganizmanın nitrik asitle oksidlendirilmiş linyitleri azot ve karbon kaynağı olarak kullandığı düşünülmektedir. Mikroorganizmanın kömür yapısında N-O, N-H ve C-O bağlarına etki ettiği FTIR spektroskopisi ile kanıtlanmıştır.
5. Oluşan sıvı ürünlerin tamamen suda çözünen aromatik yapılu bileşiklerin bir karışımı olduğu ve polar özellik taşıdığı saptanmıştır. Sıvı ürünlerin tüm linyit numunelerinde benzer fonksiyonel grupları içerdiği, temelde aromatik halkalı bir yapı sergilediği, metilen köprüleriyle beraber hidroksil gruplarında içeren bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir.
6. GC-MS kromatogramları sıvı ürünlerin asetonda çözünen fraksiyonunun düşük molekül ağırlığına sahip C₇-C₂₂' lu bileşikler olduğunu göstermiştir.

7. Bolu linyitinden ekstrakte edilen hümik asidlerin (HA-H) mikrobiyal muamelesi sonrasında elde edilen sıvı ürünler (çözelti ve çökelti kısımları) incelendiğinde, mikroorganizmanın alifatik hidrokarbonlardaki C-H bağlarına etki ettiği belirlenmiştir. Etki sonucunda ester yapılı bileşiklerin oluştuğu saptanmıştır.
8. Peroksitle oksidlendirilmiş linyitten ekstrakte edilen hümik asidlerde (HA-P) alifatik hidrokarbonların mikroorganizma etkisinden sonra yok olduğu ve 1158 cm^{-1} 'deki bandın (alifarik eterler, (C-O)) ve 885 cm^{-1} 'deki bandın (aromatik halkalarda C-H) çok küçüldüğü gözlenmiştir.
9. Nitrik asitle oksidlendirilmiş linyitten ekstrakte edilen hümik asidlerde (HA-N) nitro gruplarının kaybolduğu (N-O), 1154 cm^{-1} 'deki bandın (C-O) kaybolduğu ve 885 cm^{-1} 'deki bandın (aromatik halkalardaki C-H grupları) çok küçüldüğü gözlenmiştir.
10. Oksidlendirilmiş linyitlerden elde edilen hümik asidlere mikroorganizma etkisi sonucunda mikrobiyal sıvılaştırmanın 10-30 dakika içinde gerçekleştiği gözlenmiştir. UV-Vis spektrumlarından alınan absorpsiyon değerleri mikrobiyal çözünürlüğün HA-N > HA-P > HA-H şeklinde olduğunu göstermektedir. Mikrobiyal etki sonrasında oluşan sıvılarda çeşitli kimyasal maddelerin mikroorganizma aracılığıyla üretildiği GC-MS kromatogramlarında belirlenmiştir.

HRP enziminin kömür molekülüne etki ederek, makromolekülleri depolimerize ettiği yapılan bu çalışmayla ilk kez kanıtlanmıştır. Kömürden ekstrakte edilen hümik asidlerin substrat olarak kullanıldığı enzim deneylerinde aşağıdaki sonuçlara varılmıştır.

HA-H, HA-P ve HA-H olarak kodlanan hümik asidlerde en fazla etkinin HA-H'de olduğu belirlenmiştir. Reaksiyon sonrasında alınan çözelti ve çökelti kısımlarının FTIR spektroskopisiyle incelenmesi sonucunda varılan değerlendirmeler şöyledir:

1- Bolu linyitinden ekstrakte edilen hümik asidlerin (HA-H) substrat olarak kullanıldığı çalışmalar:

Yapılan çalışmalarda, 30 ve 60 μL enzim miktarının hümik asid molekülünde benzer etkiler gösterdiği FTIR spektroskopisiyle belirlenmiştir. Enzimle yapılan reaksiyonların ardından santrifüjleme yoluyla ayrılan çözelti fazlarında; amin gruplarında (N-H; 2442 cm^{-1}) parçalanma, aromatik eterlerin (C-O; 1286 cm^{-1}), alifatik eterlerin (C-O; 1180, 1006 cm^{-1}), aromatik halkaya bağlı yada polisiklik aromatik yapılardaki C-H gruplarının (886 cm^{-1}) oluşumu gözlenmiştir. Reaksiyon çözeltisinin santrifüjleme yoluyla elde edilen çökelti kısmında ise aromatik halkalarda (C=C; 1400 cm^{-1}) artış, alifatik eter (C-O; 1006 cm^{-1}) gruplarının oluşumu, aromatik halkaya bağlı yada polisiklik aromatik yapılardaki (C-H; 886 cm^{-1}) karbon hidrojen gruplarında artış gözlenmiştir. 120 μL enzim miktarıyla çalışılan denemelerde 30 ve 60 μL enzim miktarlarıyla yapılan denemelerden farklı sonuçlar alınmıştır. gözlenmiştir. Çözelti kısımlarının yapılarında herhangi bir değişim olmadığı, çökelti kısımlarında ise alifatik eter (C-O; 1049 cm^{-1}), karbonil grupları (C=O; 1705 cm^{-1}) ve metil gruplarının (CH_3 ; 1383 cm^{-1}) oluştuğu gözlenmiştir.

2- %4 H_2O_2 ile oksidlendirilmiş Bolu linyitinden ekstrakte edilen hümik asidlerin (HA-P) substrat olarak kullanıldığı çalışmalar:

HA-P'in substrat olarak kullanıldığı denemelerde 30 μL enzim miktarıyla yapılan çalışmada elde edilen çözelti ve çöktelerde değişim olmadığı dolayısıyla herhangi bir etkinin bulunmadığı belirlenmiştir. Hümik asidin 60 μL enzimle yapılan denemelerinde ise çözelti kısmında değişim olmadığı, fakat çöktide metilen gruplarının (1384 cm^{-1}) oluştuğu, amin gruplarında (N-H; 2438 cm^{-1}) parçalanma olduğu gözlenmiştir. 120 μL enzimle yapılan denemelerde ise çözelti ve çöktide aromatik halkaya bağlı C-H gruplarının (882 cm^{-1}) ve alifatik eterler (C-O; 1051 cm^{-1}) gruplarının oluştuğu gözlenmiştir.

3- %30 HNO_3 ile oksidlendirilmiş bolu linyitinden ekstrakte edilen hümik asidlerin (HA-N) substrat olarak kullanıldığı çalışmalar:

HAH'nin substrat olarak kullanıldığı çalışmalarda elde edilen çözelti kısımlarında herhangi bir değişime rastlanılmamış, fakat çöktelerde karbonil gruplarının (1708 cm^{-1} , C=O) oluştuğu gözlenmiştir. Bu durum enzimin oksidasyon-redüksiyon mekanizmasını kullanarak moleküllerde oksidasyona yol açtığını göstermektedir. 4 saat süreyle çalışılan denemelerde ise etki gözlenmemiştir. Enzimin belirli bir süre sonunda inhibisyona uğradığı dolayısıyla etkisinin azaldığı ya da yok olduğu düşünülmektedir.

Kömür yapısı ve mikrobiyal etki mekanizması arasındaki ilişkinin iyi kurulabilmesi için linyit numunelerinin petrografik analizlerinin yapılması önerilmektedir. Ayrıca mikrobiyal etkiyle meydana gelen sıvı ürünlerin yapısının aydınlatılmasında LC-MS tekniğinin kullanılması oldukça faydalı olacaktır.



KAYNAKLAR

Alvarez, R., Clemente, C. ve Gómez-Limón, D., (2003), "The Influence of Nitric Acid Oxidation of Low Rank Coal and Its Impact on Coal Structure", *Fuel*, 82 (15-17): 2007-2015.

ASTM, (1991), *Annual Book of ASTM Standards, Part 26*, Philadelphia.

Başaran, Y., (2001), *Düşük Kaliteli Türk Kömürlerinin Mikrobiyal Sıvılaştırılması, Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.*

Beker, Ü.G., Kural, O. ve Dağalp, M., (1998), *Kömürün Briketlenmesi*, Kural, O., Ed., *Kömür: Özellikleri, Teknolojisi ve Çevre İlişkileri*, İTÜ, İstanbul.

Bend, S.L., (1992), "The Origin Formation and Petrographic Composition of Coal", *Fuel*, 71:851-870.

Berkowitz, N., (1985), *The Chemistry of Coal*, Elsevier Science, Amsterdam.

Butuzova, L., Krzton, A. ve Bazarova, O., (1998), "Structure and Properties of Humic Acids Obtained from Thermo-oxidised Brown Coal", *Fuel*, 77 (6): 581-584.

Bockrath, B.C. ve S.Friedman, S., (Eds.), *Symp.Ser.No.169. American Chemical Society, Washington.*

Cartz, L. ve Hirsch, P.B., (1960), "A Contribution to the Structure of Coals from X-Ray Diffraction Studies," *Proceedings from the Royal Society of London.*

Chakrabartty S.K., ve Berkowitz, N., (1976), "Non-aromatic Skeletal Structures in Coal" *Fuel*, 55 (4): 362-363.

Catcheside, D.E.A. ve Ralph, J.P., (1999), "Biological Processing of Coal", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52 (16-24):16-22.

Catcheside, D.E.A. ve Mallett, K.J., (1991), "Solubilization of Australian Lignites by Fungi and Other Microorganisms", *Energy & Fuels*, 5: 141-145.

Cohen, M.S., Feldman, K.A., Brown, C.S. ve Gray E.T., (1990), "Isolation and Identification of the Coal-Solubilizing Agent Produced by *Trametes Versicolor*", *Apply Environ Microbiol.*, 56: 3285-3291.

Cohen, M.S. ve Gabriele P.D., (1982), "Degradation of Coal by the Fungi *Polyporus versicolor* and *Poria monticola*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 (1):23-27.

Cohen, M.S., Wilson, B.W. ve Bean R.M., (1990), *Enzymatic Solubilization of Coal*, Wise, D.L., Ed., "Bioprocessing and Biotreatment of Coal, Marcel Dekker, New York.

Couch, G.R., (1990), *Biotechnology and Coal: A European Perspective*, Wise, D.L., Ed., *Bioprocessing and Biotreatment of Coal, Marcel Dekker, New York.*

Crawford, D.L. ve Gupta, R.K., (1990), "Characterization of Extracellular Bacterial Enzymes which Depolymerize a Soluble Lignite Coal Polymer", *Biotechnology for the Production of Clean Fuels*, August 27-28, Washington.

Eligwe, C.A., (1988), "Microbial Desulphurization of Coal", *Fuel*, 67: 451-458.

Fang J. ve Barcelona, M.J., (2003), "Coupled Oxidation of Aromatic Hydrocarbons by Horseradish Peroxidase and Hydrogen Peroxide", *Chemosphere*, 50 (1):105-109.

Fakoussa, R.M. ve Hofrichter, M., (1999), "Biotechnology and Microbiology of Coal Degradation", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52:25-40.

Fakoussa, R.M., (1981), *Coal as a Substrate for Microorganisms. Investigations of the Microbial Decomposition of Untreated Bituminous Coal*, Doctoral Dissertation, Rhein Friedrich – Wilhelms University, Bonn.

Fakoussa, R.M., (1990), *Microbiological Treatment of German Hard Coal*, Ed: Wise, D.L. *Bioprocessing and Biotreatment of Coal*, Marcel Dekker, New York.

Fakoussa, R.M. ve Hofrichter, M., (1999), "Biotechnology and Microbiology of Coal Degradation", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52:25-40.

Gibson, J., (1978), *J. Inst. Fuel*, 51:67.

Given, P.H., (1960), *Fuel*, 60, 147.

Gold, M.H., Wariishi, H. ve Valli, K., (1989), *Extracellular Peroxidases Involved in Lignin Degradation by the White Rot Basidiomycetes Phanerochaete chrysosporium*. Whitaker J.R., Sonnet P.E., Ed., *Biocatalysts in Agricultural Biotechnology*, American Chemical Society, Washington.

Gold, M.H. ve Alic, M., (1993), "Molecular Biology of the Lignin Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*", *Microbiol. Rev.*, 57: 605-622.

Gomez., F., Amils, R. Ve Marin, I., (1999), "Bioremoval of Organic and Inorganic Sulphur from Coal Samples", *Apply Microbiol Biotechnology*, 52:118-121.

Gökçay, C.F., Kolankaya, N. ve Dilek, F.B., (2001), "Microbial Solubilization of Lignites", *Fuel*, 80:1421-1433.

Gökhan, Ş.I., (1990), *Kömürün Biyolojik Bozunması: Bazı Türk Linyitlerinin Streptomyces Setonii 75 Vi2 ile İşlenmesi*", ODTÜ, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Guo, Y. ve Bustin, R.M., (1998), "FTIR Spectroscopy and Reflectance of Modern Charcoals and Fungal Decayed Woods: Implications For Studies of Inertinite in Coals", *International Journal of Coal Geology*, 37:29-53.

Haddock, J.D. ve Ferry, J.G., (1990), *Anaerobic Metabolism of Aromatic Compounds*, Wise, D.L., Ed., *Bioprocessing and Biotreatment of Coal*, Marcel Dekker, New York.

Haenel M.W., (1992), "Recent Progress in Coal Structure Research", *Fuel*, 71 (11): 1211-1223.

Hammel, K.E., (1997), "Fungal Degradation of Lignin", CAB International *Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition*, Eds: G.Cadisich ve K.E.Giller.

Hatakka, A., (1994), "Lignin-Modifying Enzymes from Selected White-Rot-Fungi: Production and Role in Lignin Degradation", *FEMS Microbiol Rev.* 13:125-135.

Herbert J., Johnson, H. ve Johnson L., (1990), *Economic Factors in the Bioprocessing of Coal*", Wise, D.L., Ed., *Bioprocessing and Biotreatment of Coal*, Marcel Dekker, New York.

Hill, G.R. ve Lyon, L.B., (1962) . *Ind. Eng.Chem.* 54:36.

Hofrichter, M., Ziegenhagen, D., Sorge, S., Bublitz, F. ve Fritsche, W., (1999), "Degradation of Lignite (low-rank coal) by Ligninolytic Basidiomycetes and Their Manganese Peroxidase System", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52:78-84.

Hölker, U., Ludwig, S., Scheel, T., Höfer, M., (1999), "Mechanisms of Coal Solubilization by the Deuteromycetes *Trichoderma Atroviride* and *Fusarium Oxysporum*", *App. Microbiol. Biotechnol.*, 52:57-59.

Hofrichter, M., Bublitz, F. ve Fritsche, W., (1997), "Fungal Attack on Coal II. Solubilization of Low-rank Coal by Filamentous Fungi", *Fuel Processing Technology*, 52: 55-64.

Hofrichter, M., Bublitz, F. ve Fritsche, W., (1997), "Fungal Attack on Coal: I.Modification of Hard Coal by Fungi", *Fuel Processing Technology*, 52:43-53.

Hofrichter, M. ve Fritsche, W. (1997), "Depolymerization of Low-rank Coal by Extracellular Fungal Enzyme Systems. II. The Ligninolytic Enzymes of the Coal-humic-acid-depolymerizing Fungus *Nematoloma Frowardii* b19", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*47: 419-424.

Hofrichter, M. ve Fritsche, W. (1997), "Depolymerization of Low-rank Coal by Extracellular Fungal Enzyme Systems. III. In vitro depolymerization of coal humic acids by a crude preparation of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii* b19", *Appl.Microbiol.Biotechnol.*,47:566-571.

Hofrichter, M., Scheibner, K., Bublitz, F., Schneegaß, I., Ziegenhagen, D., Martens, R., ve Fritsche, W., (1999), "Depolymerization of Straw Lignin by Manganese Peroxidase from *Nematoloma Frowardii* is Accompanied by Release of Carbon Dioxide", *Holzforschung*, 52: 161-166.

- Hofrichter, M., Vares, T., Scheibner, K., Galkin, S., Sipilä, J. ve Hatakka, A., (1999), "Mineralization and Solubilization of Synthetic Lignin (DHP) by Manganese Peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*", *J. Biotechnol.* 67:217-228.
- Hofrichter, M., Ziegenhagen, D., Sorge, S., Ullrich, R., Bublitz, F. ve Fritsche, W., (1999), "Degradation of Lignite (low-rank coal) by Ligninolytic Basidiomycetes and Their Manganese Peroxidase System", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:78-84.
- Hofrichter, M., Vares, T., Kalsi M., Scheibner, K., Hatakka, A., (1999), "Production of Ligninolytic Enzymes and Organic Acids and Mineralization of ¹⁴C-labeled Lignin During Solid-state Fermentation of Wheat Straw with the White-rot fungus *Nematoloma frowardii*", *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1864-1870
- Hölker, U., Mönkemann, H. ve Höfer, M., (1997), "A System to Analyze the Complex Physiological States of Coal Solubilizing Fungi", *Fuel Processing Technology*, 52:65-71.
- Hüttinger, K.J. ve Michenfelder, A.W., (1987), "Molecular Structure of A Brown Coal", *Fuel*, 66:1164-1165.
- John, V.T. ve Dahlberg, M., (1990), *Bioreactor Study of the Microbial Degradation of Low-Rank Coals*, Ed: Wise, D.L *Bioprocessing and Biotreatment of Coal*, Marcel Dekker, New York.
- Karayiğit, A.İ. ve Köksoy, M., (1998), *Kömürün Oluşumu ve Sınıflandırılması*, Kural, O., Ed., *Kömür: Özellikleri, Teknolojisi ve Çevre İlişkileri*, İTÜ, İstanbul.
- Kavuşan, G., (1998), *Kömürlerin Jeokimyasal Özellikleri ve Organik Maddelerin Kömürleşme Sürecindeki Dönüşümü*, Kural, O., Ed., *Kömür: Özellikleri, Teknolojisi ve Çevre İlişkileri*, İTÜ, İstanbul.
- Klein, J., Pfeifer, F., Schacht, S. ve Sinder, Ch., (1997), "Environmental Aspects of Bioconversion Processes", *Fuel Processing Technology*, 52:17-25.
- Klein, J., (1999), "Biological Processing of Fossil Fuels", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52 (2-15):1-15.
- Kurkova, M., Klika, Z., Klikova, C. ve Havel, J., (2004), "Humic Acids from Oxidized Coals I. Elementel Composition, Titration Curves, Heavy Metals in HA Samples, Nuclear Magnetic Resonance Spektra of HAs and Infrared Spectroscopy", *Chemosphere*, 54:1237-1245.
- Lapin, D. ve Matson, J.V., (1990) "Bioconversion of Solubilized Lignite: Pilot Reactor Studies", Wise, D.L., Ed., *Bioprocessing and Biotreatment of Coal*, Marcel Dekker, New York.
- Leuschner, A.P., Laquidara, M.J. ve Martel, A.S., (1990), "Biological Methane Production from Texas Lignite", Wise, D.L., Ed., *Bioprocessing and Biotreatment of Coal*, Marcel Dekker.

Li., Zhao, Z., Huang, W., Peng, P., Sheng, G. ve Fu, J., (2004), "Characterization of Humic Acids", Organic Geochemistry, In press.

Machnikowska, H., Pawelec, K. ve Podgorska, A., (2002), "Microbial Degredation of Low Rank Coals", Fuel Processing Technology, 77-78:17-23.

Masuka, C.P. (1992), " J.Anal. Appl.Pyrolysis" , 23:195.

Martyniuk, H. ve Wieckowska, J., (2003), "Adsorbition of Metal Ions on Humic Acids Extracted from Brown Coals", Fuel Processing Technology, 84:23-26.

Mazumdar, B.K., Chakrabartty, S.K. ve Lahiri, A., (1962), Fuel, 41:129.

Meriçboyu, A.E., Beker, Ü.G. ve Küçükbayrak, S., (1998), Kömürün Kullanımını Belirleyen Önemli Özellikleri, Kural, O., Ed., Kömür: Özellikleri, Teknolojisi ve Çevre İlişkileri, İTÜ, İstanbul.

Perez, M.G., Martin-Neto, L. ve Saab, S.C., (2004), "Characterization of Humic Acids from A Brazilian Oxisol under Different Tillage Systems by EPR", 13C NMR, FTIR and Fluorescence Spectroscopy", Geoderma, 118:181-190.

Pitt, G., (1979), In Coal and Modern Coal Processing, An Introduction, G.J.Pitt and G.R.Millward (Eds.), Academic, Chap.2., New York.

Quigley, D.R., Breckenridge, C.R. ve Dugan, P.R., (1989a), "Effects of Multivalent Cations on Low-rank Coal Solubilities in Alkaline Solutions and Microbial Cultures", Energy&Fuels, 3:571-574.

Quigley, D.R., Ward, B., Crawford, D.L., Hatcher, H.J. ve Dugan, P.R., (1989b), "Evidence that Microbially Produced Alkaline Materials are Involved in Coal Biosolubilization", Appl. Biochem. Biotechnol., 20/21: 753-763.

Quigley, D.R., Wey J.E, Breckenridge C.R. ve Hatcher H.J., (1987), "Comparison of Alkali and Microbial Solubilization of Oxidized, Low-Rank Coals". In: Proceedings of the Biological Treatment of Coals Workshop U.S. Department of Energy, Germantown.

Ralph, J.P. ve Catcheside, D.E.A., (1994), "Decolourisation and Depolymerisation of Solubilised Low-Rank Coal by the White-Rot Basidiomycete Phanerochaete Chrysosporium", Appl Microbiol Biotechnol., 42:536-542.

Ralph, J.P. ve Catcheside, D.E.A. (1998a), "Involvement of Manganase Peroxidase in Transformation of Macromolecules from Low-rank Coal by the White-rot Fungus Phanerochaete chrysosporium", Apply Microbiol Biotechnology, 49:778-784.

Ralph, J.P. ve Catcheside, D.E.A., (1999), "Transformation of Macromolecules from a Brown Coal by Lignin Peroxidase", Apply Microbiol Biotechnol., 52:70-77.

Reed, L., (1990), Research Opportunities in Coal Bioprocessing.,Ed:Wise, D.L Bioprocessing and Biotreatment of Coal, Marcel Dekker, New York.

Shinn, J.H., (1985), "The Structure of Coal and its Liquefaction Products: A Reactive Model", International Conference on Coal Science, Sydney, Australia, Oct, 28-31, pp.738-741.

Solomon, P.R., (1981), In New Approaches in Coal Chemistry, B.D.Blaustein, B.C., B.C.Bockrath and S.Friedman (Eds.), Symp.Ser.No.169. American Chemical Society, Washington, pp.61.

Speight, J.G., (1994), The Chemistry and Technology of Coal, Marcel Dekker, New York.

Srivastava, R.D., Campbell, I.M. ve Blaustein, B.D., (1989), "Coal Bioprocessing, A Research-Needs Assessment", Chemical Engineering Progress, 12:45-53.

Stach, E., Mackowsky, M., Teichmüller, M., Taylor., G.H., Chanra, D. ve Teichmüller, R., (1975), "Stach's textbook of Coal Petrology", Gabrüder Brontraeger, Berlin, Stuttgart, pp.414.

Sternberg, H.W., (1978), Mechanism of coal liquefaction, in Scientific Problems in Coal Utilization (B.R.Cooper, ed.), Technical Information Department, U.S.Department of Energy, Washington.

Thomas, M.K., (1985), "Coal Structures", British Gas Report No. LRST 775.

Tien, M. ve Kirk, T.K., (1983), "Lignin-degrading Enzyme from the Hymenocete *Phanerochaete chrysosporium* Burds", Science, 221:661-663.

Tien, M., Kirk, T.K., Bull, C. ve Fee, J.A., (1986), "Steady-State and Transient-State Kinetic Studies on the Oxidation of 3,4-Dimethoxy- Benzyl Alcohol Catalyzed by Ligninase of *Phanerochaete Chrysosporium* Burds.", J Biol Chem, 261:1687-1693.

Torres, E., Bustos-Jaimes, I. ve Le Borgne, S., (2003), "Potential Use of Oxidative Enzymes for the Detoxification of Organic Pollutants" Applied Catalysis B: Environmental, Volume 46, 31:1-15.

Van Krevelen, D.W., (1961), Coal: Typology, Chemistry, Physics, Constitution, Elsevier, Amsterdam.

Vayısoğlu, E.S., (1993), Türk Kömürleri ve Maserallerininin Süperkritik Toluen Ekstraksiyonu ve Elde Edilen Ürünlerin Kimyasal Yapısının Saptanması, Çukurova Üniversitesi, Adana.

Veitch, N.C. ve Nigel C., (2004), "Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme" Phytochemistry, (65), 3:249-259.

Wang, J.W., Nascimento, C.G.D. ve Hsu-Chou, R.S., (1990), Chemical Methods of Enhancing the Biodegradation of Lignite, Wise, D.L., Ed., Bioprocessing and Biotreatment of Coal, Marcel Dekker, New York.

Wariishi, H., Huang, J., Dunford, H.B. ve Gold, M.H., (1991), "Reactions of Lignin Peroxidase Compounds I and II with Veratryl Alcohol", J. Biol. Chem., 266:694-699.

Wiser, W., (1975), American Chem. Soc. Div.Fuel Prep.Pap. 20:122.

Wolfrum, ., (1983), "Correlations Between Petrographic Properties, Chemical Structure and Technological Behaviour of Rhenish Brown Coal, Am.Chem. Soc. Div.Fuel Chem.Prep., 28(4) pp.11-55.

Wondrack L, Szanto M, ve Wood, W.A., (1989), "Depolymerization Of Water Soluble Coal Polymer From Subbituminous Coal And Lignite By Lignin Peroxidase", Appl Biochem Biotechnol. 20/21: 765-780.

Wood, W.A. ve Wondrack, L.M., (1990), "Enzymatic Depolimerization of Coal", USA Patent, Patent No: 4,960,669.

Wood, W.A. ve Wondrack, L.M., (1991), "Aqueous-soluble Polymeric Coal Substrate for Depolimerization by A Lignin Peroxidase", USA Patent, Patent No: 5,036,013.

Ralph JP, Catcheside DEA (1997) Transformations of low-rank coal by Phanerochaete chrysosporium and other wood-rot fungi. Fuel Processing Technol. 52, 79-93.

Yaman, S., Çelik, M.S. ve Küçükbayrak, S., (1998), "Kömürün Kükürdünün Giderilmesi", Kural, O., Ed., "Kömür: Özellikleri, Teknolojisi ve Çevre İlişkileri", pp.337.

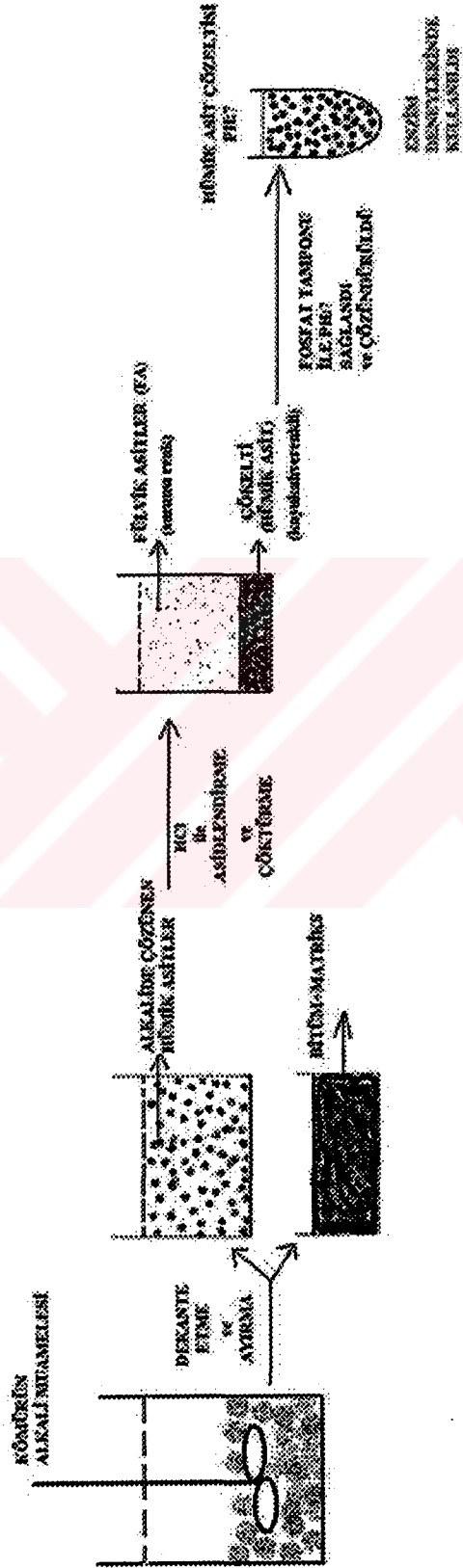
Yıldırım, Y. ve Göllü, E., (1998), "Kömürün Pazarlanması ve Geleceği", Kural, O., Ed., "Kömür: Özellikleri, Teknolojisi ve Çevre İlişkileri, İTÜ, İstanbul, 65-185.

INTERNET KAYNAKLARI

[1] <http://www.unige.ch/LABPV/publications/silaghi/Dumitrescu.html>

EKLER

Ek 1 Linyitten Hünik Asid Eldesinin Şematik Gösterimi



Ek 2 Hümik Asitle (HA-H, HA-P, HA-N) Yapılan Enzim Reaksiyonlarında Elde Edilen Çözelti ve Çökeltilerin Şematik Gösterimi

HÜMİK ASİT ÇÖZELTİSİ PH:7



ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	05.01.1975	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1989-1992	Soma Linyit Lisesi
Lisans	1993-1997	Yıldız Üniversitesi Kimya-Metalurji Fak. Kimya Mühendisliği Bölümü
Yüksek Lisans	1997-2000	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Müh. Anabilim Dalı
Doktora	2000-2005	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Müh. Anabilim Dalı

Çalıştığı kurum(lar)

1998-Devam ediyor YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi

