

Trametes versicolor Lakkazı ile 4-Klorofenol'den Klor Uzaklaştırılması

Şule Çece

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Kasım 2010

Dechlorination of 4-Chlorophenol by *Trametes versicolor* Laccase

Şule Çece

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

November 2010

Trametes versicolor Lakkazı ile 4-Klorofenol'den Klor Uzaklaştırılması

Şule Çece

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Çabuk

Kasım 2010

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Şule Çece'nin YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “*Trametes versicolor* Lakkazı ile 4-Klorofenol'den Klor Uzaklaştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ahmet Çabuk

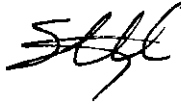
İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

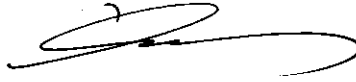
Üye : Prof. Dr. Münevver Arısoy



Üye : Doç. Dr. Semra İlhan



Üye : Doç. Dr. Tamer Akar



Üye : Doç. Dr. Cansu Filik İşcen



Üye : Doç. Dr. Ahmet Çabuk



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Klorofenoller soğutucu, yangın geciktirici, boya çözücü, pestisit, herbisit ve kereste koruyucusu olarak çeşitli alanlarda kullanılan kimyasal maddelerdir. Yüksek toksisiteleri, kanser oluşturabilmeleri ve doğada kolay bozunamamaları nedeni ile önemli kirleticiler olarak bilinirler. Klorofenollerin herhangi bir yolla organizmaya alınması ksenobiyotik (zenobiyotik) etki yaratır. Bazı mikroorganizmalar klorofenolleri biyolojik olarak bozundurup kloru ayrıştırıp, organizmadan uzaklaştırabilirler.

Bu çalışmada, *Trametes versicolor* (ATCC200801) mikroorganizması kullanılarak, buğday kepeği (3 g/100 ml) ilaveli patates dekstrozu broth ortamında, lakkaz enzimi üretilmiştir. Yüksek aktiviteli lakkaz enzimi kullanılarak, pH, substrat konsantrasyonu, enzim miktarı, inkübasyon süresi ve ortam sıcaklığı parametrelerinin 4-klorofenolden klor uzaklaştırılması işlemi üzerine olan etkisi incelenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda 4-klorofenolün toksisitesindeki değişim Microtox cihazı ile takip edilmiştir. Ayrıca klor uzaklaştırıldıktan sonra 4-klorofenolün kimyasal yapısındaki değişiklikler FTIR analizleri ile belirlenmiştir.

4-klorofenolden klor uzaklaştırılması için uygun koşullar pH 4, başlangıç substrat konsantrasyonu 200 µM, süre 30 dk ve sıcaklık 40 °C ve enzim miktarı 4 ml olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda oksijen tüketimi ve klor uzaklaştırılması arasındaki ilişki araştırılmıştır. Mikrotoksite sonuçlarına göre 5. dakikada EC₅₀ (yarım maksimal etkili konsantrasyon) değerlerinde toksisitesinde bir artış görülmüştür. 4-klorofenolün bozunduğunu belirten bulgular gözlenmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgular *Trametes versicolor* (ATCC200801)'den elde edilen lakkaz enziminin, 4-klorofenolden klor uzaklaştırılması işleminde etkin olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Örneğin: Atık suların arıtılmasında toprak temizleme işlemi gibi).

Anahtar kelimeler: Basidiyomiset, lakkaz, *Trametes versicolor*, klor uzaklaştırılması, 4-klorofenol.

SUMMARY

Chlorophenols that are often used in the production of refrigeration cooling gas systems, fire retardants, paints, solvents, pesticides, herbicides and wood preservatives, are known to be an important class of xenobiotics. Because of their high toxicity, strong resistance to degradation and ability to build up in the body, chlorophenols are considered cause for cancer. Some microorganisms are able to degrade chlorophenols and produce dechlorination of chlorophenolics.

In this study, laccase enzyme was produced through PDB culture including pellicle and *Trametes versicolor* (ATCC200801). The effect of process parameters such as: pH, substrate concentration, enzyme concentration, reaction time and temperature on the degradation of 4-chlorophenol was studied with laccase enzyme which had high activity for dechlorination of 4-chlorophenol. Correlation between oxygen consumption and dechlorination process was investigated in optimal media. Changes in toxicity versus the quantity of 4-chlorophenol were monitored using Microtox. Also, after the dechlorination of 4-chlorophenol, the changes in the chemical structure of 4-chlorophenol were determined with FTIR analysis.

Optimal conditions for dechlorination of 4-chlorophenol have been found to be: pH 4.0, substrate concentration 200 μ M, reaction time 30 min, temperature 40 °C and enzyme concentration 4 ml/L. During dechlorination studies, it was observed that the quantity of oxygen in the culture medium was decreased. Changes in the degree of toxicity of 4-chlorophenol was monitored using Microtox. Also, after the dechlorination of 4-chlorophenol, changes in chemical structure of 4-chlorophenol was determined with FTIR analysis.

Based on the results obtained from the study, we suggest that laccase enzyme produced from *Trametes versicolor* (ATCC200801) has the ability to cause dechlorination of 4-chlorophenol. The microtoxicity results showed an increase in the half maximal effective concentration (EC_{50}) in 5th min. The enzyme can be used as an effective reagent in the dechlorination processes (e.g., wastewater treatment soil remediation etc systems).

Keywords: Basidiomycetes, laccase, *Trametes versicolor*, dechlorination, 4-chlorophenol.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın planlanması ve gerçekleştirilmesinde yardımını ve desteğini esirgemeyen, öneri, eleştiri ve rehberliğiyle ufkumu açan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet ÇABUK'a içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca hep yanımda olup bana destek ve yardımcı olan çalışma arkadaşlarım, Eda BENLİ, Merve CİN AKBULUT, Serap GEDİKLİ, Pınar AYTAR, Meltem ÇELİKDEMİR ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma,

Analizlerde yardımları olan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Moleküler Sentezleme ve FTIR Spektroskopi Araştırma Laboratuvarı öğretim üyesi Doç.Dr.Güneş KÜRKCÜOĞLU'na, Selçuk Üniversitesi İstatistik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Coşkun KUŞ'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu 200819021 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Bana çalışma sevgisini ve yaptığım işte ilerleme isteğini aşıl原因, rahmetli anneme minnettirim. Her zaman olduğu gibi çalışmalarım ve tüm öğrenim hayatım boyunca sabır, özveri ve şefkatle beni destekleyen, daima yanımda olan Canım Annem'e, Babam'a ve Teyzem'e (Dr. Nural KUYUCAK) sonsuz teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Beyaz Çürükçül Funguslar.....	3
2.1.1. Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanım Alanları.....	5
2.1.1.1. Boya Giderimi.....	5
2.1.1.2. Biyolojik İyileştirme (Biyoremediasyon)	5
2.1.1.3. Kağıt Hamurundan Lignin Giderimi.....	6
2.1.1.4. Biyosensör.....	7
2.2. Basidiomycetes.....	7
2.3. <i>Trametes versicolor</i>	9
2.3.1. Biyolojik Özellikleri.....	9
2.3.2. Ekolojisi.....	10
2.3.3. <i>Trametes versicolor</i> Enzimleri ve Etkileri.....	10
2.4. Lakkaz Enzimi (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2)	11
2.4.1. Lakkazın Konumu ve Oluşumu.....	12

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.2. Lakkaz Enzimi Moleküler Yapısı.....	13
2.4.3. Lakkaz Aracılı Sistemler.....	15
2.4.4. Lakkaz Enziminin Aktif Bölgesinin Yapısı.....	16
2.4.5. Lakkaz Enziminin Katalitik Aktivitesi.....	17
2.4.6. Lakkaz Enziminin Biyolojik Fonksiyonları.....	17
2.4.7. Lakkaz Enziminin Farklı Organizmalarda Dağılışı.....	18
2.4.8. Lakkaz Enzimi Uygulama Alanları.....	25
2.5. Organik Klorofenolik Toksik Bileşikler ve Etkileri.....	34
2.6. Türkiye’de Pestisit Kullanımı.....	36
2.7. Toksikite ve Toksikite Değerlendirme Yöntemleri.....	37
2.7.1. Enzim ve Mikroorganizma Kullanarak Toksikite Tayini.....	40
2.7.1.1. Enzimatik Analiz.....	40
2.7.1.2. Mikrobiyal Biyoanaliz.....	42
2.8. Çalışmada Kullanılan Klorofenol : 4-Klorofenol.....	46
2.8.1. 4-Klorofenol Fiziksel Özellikleri.....	46
2.8.2. 4-Klorofenol Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	46
2.8.3. 4-Klorofenol İnsan Sağlığına Etkisi.....	46
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	48
3.1. Mikroorganizma ve Kültür Koşulları.....	48
3.2. Lakkaz Aktivitesinin Ölçümü.....	48

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3. Serbest Klor Ölçümleri.....	49
3.4. Çözünmüş Oksijen Ölçümleri	49
3.5. Deklorinasyon Çalışmaları.....	49
3.5.1. Deklorinasyon Çalışmalarında Kullanılan Biyoreaktörün Özellikleri..	49
3.6. Biyoreaktörde Deklorinasyon İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	50
3.6.1. Ortam pH Değerinin Enzimatik Deklorinasyona Etkisi.....	50
3.6.2. Substrat Konsantrasyonunun Enzimatik Deklorinasyona Etkisi.....	51
3.6.3. Enzim Aktivitesinin Enzimatik Deklorinasyona Etkisi.....	51
3.6.4. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Deklorinasyona Etkisi.....	51
3.6.5. Ortam Sıcaklığının Enzimatik Deklorinasyona Etkisi.....	52
3.7. İstatiksel Analizler.....	52
3.8. Toksikite Çalışmaları.....	52
3.9. FT-IR Analizleri.....	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. Trametes versicolor'dan Elde Edilen Lakkaz Enzimi İle 4-Klorofenol Deklorinasyonu İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	54
4.1.1. pH'nın 4-klorofenol Deklorinasyonuna Etkisi.....	54
4.1.1.1. pH Değerlerinin İstatiksel İncelenmesi.....	55
4.1.2. Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun 4-klorofenol Deklorinasyonuna Etkisi.....	55
4.1.2.1. Substrat Konsantrasyonunun İstatiksel Değerlendirilmesi.....	56
4.1.3. Enzim Miktarının 4-klorofenolün Deklorinasyonuna Etkisi.....	57

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.1.3.1. Enzim Miktarının İstatiksel Değerlendirilmesi.....	58
4.1.4. Sürenin 4-klorofenol Deklorinasyonuna Etkisi.....	59
4.1.4.1. İnkübasyon Süresinin İstatiksel Değerlendirilmesi.....	60
4.1.5. Sıcaklığın 4-klorofenol Deklorinasyonuna Etkisi.....	61
4.1.5.1. Sıcaklığın İstatiksel Değerlendirilmesi.....	62
4.1.6. Deklorinasyon Süresince Belirlenen Optimum Koşullarda Oksijen Tüketiminin Belirlenmesi.....	63
4.2. Toksikite Sonuçları.....	65
4.3. 4-Klorofenol Molekülünün FT-IR Titreşim Spektrumları.....	66
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	68
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.1. Beyaz çürükçül funguslar tarafından katalizlenen enzimatik lignin biyodegradasyonu ve oksijen aktivasyonu.....	4
2.3.1. <i>T. versicolor</i> yaşam alanından bir görüntü.....	9
2.4.2.1. <i>Trametes versicolor</i> ve <i>Melanocarpus albomyces</i> lakkazının omurga sıralanışı üç boyutlu şekli.....	15
2.7.1.2.1. Microtox cihazı model 500 toksisite analizeri.....	43
4.1.1.1. Lakkaz enzimi ile 4-klorofenolden klor uzaklaştırılmasında ortam pH değerinin etkisi.....	54
4.1.2.1. Lakkaz enzimiyle 4-klorofenolden fenol uzaklaştırmasında başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisi.	56
4.1.3.1. Lakkaz enzimiyle 4-klorofenolden klor uzaklaştırmasında enzim miktarının etkisi.	58
4.1.4.1. Lakkaz enzimiyle 4-klorofenolden klor uzaklaştırılmasında inkübasyon süresinin etkisi.....	60
4.1.5.1. Lakkaz enzimiyle 4-klorofenolden klor uzaklaştırmasında sıcaklığın etkisi...62	
4.1.6.1. Lakkaz enzimi ile 4-klorofenolden klor uzaklaştırılması sonucunda elde edilen çözülmüş oksijen değerleri	66
4.1.6.2. Lakkaz enzimi ile 4-klorofenol'den klor uzaklaşması sırasında ortamdaki çözülmüş oksijen konsantrasyonundaki değişim.....	64
4.2.1. 4-Klorofenol'ün toksisite değeri. (1.) enzimatik deklorinasyondan önce (2.) enzimatik deklorinasyondan sonra.....	65
4.3.1. 4-klorofenolün molekülünün 2 boyutlu yapısı.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.3.2. 4-Kloro fenol molekülünün IR titreşim spektrumları (a) 4-chloro phenol etanol çözücüsündeki spektrumu, (b) 4-chloro phenol'un bozunduktan sonra spektrumu.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.4.2.1. Değişik kaynaklardan elde edilen lakkazın molekül ağırlıkları.....	14
2.4.7.1. Lakkazların fungal üreticileri.....	19
2.4.8.1. Farklı Lakkaz Uygulamaları.....	26
2.6.1. Etki Ettikleri Canlı Gruplarına Göre 1979-2007 Yılları Arasında Etkili Madde Olarak Pestisit Tüketimi (Ton).....	37
2.7.1. Standart toksisite testleri ve test organizmaları.....	39
2.7.1.2.1. Enzim aktivitesi veya Biyosentezine dayanan kısa süreli toksisite analizi...44	
2.7.1.2.2. Kısa Süreli Bakteriyal Toksisite Analizleri.....	45
4.1.1.1.1. pH Değerinin Anova Testi ile İstatiksel Değerlendirilmesi.....	55
4.1.2.1.1. Başlangıç substrat konsantrasyonunun deklorinasyona etkisinin anova testi ile değerlendirilmesi.....	57
4.1.3.1.1. Enzim miktarının deklorinasyona etkisinin anova testi ile istatiksel olarak değerlendirilmesi.....	59
4.1.4.1.1. İnkübasyon süresinin deklorinasyona etkisinin anova testi ile değerlendirilmesi.....	61
4.1.5.1.1. Sıcaklığın deklorinasyona etkisinin anova testi ile değerlendirilmesi.....	63
4.2.1 4-Klorofenol'ün bileşiklerin deklorinasyon öncesi ve sonrası EC ₅₀ değerleri....	65

1. GİRİŞ

Endüstriyel kaynaklı birçok ürün doğada yaygın olarak bulunmayan fenol miktarının artmasına neden olmaktadır. Fenol ve türevleri sentetik reçine, plastik, biyosid, dezenfektan, boya, antioksidan, patlayıcı ve fotoğrafçılıkta kullanılan bazı kimyasalların üretiminde kullanılırlar. Bazı fenoller katı ve sıvı yakıtların işlenmesi sırasında yan ürün olarak üretilirler (Lanouette, 1977). Klorlu aromatik bileşikler, önemli miktarlarda üretilmeleri, parçalanmaya karşı dayanıklı olmaları, toksik olmaları, sediment ve biyotada birikmeleri gibi nedenlerden dolayı çevresel kirleticilerin başında gelmektedir (Chaudhry vd., 1991). Klorlu fenoller ve türevlerinin yıllık üretimi binlerce tonla ifade edilen miktarlara ulaşmaktadır. Örneğin, pentaklorofenolün yıllık üretimi yaklaşık 50.000 tondur. Bu maddeler zirai amaçlar için de kullanım potansiyelleri olması nedeni ile doğada birikmektedirler. Ayrıca, kazara olan dökülmeler, depolama tanklarının uygun bir şekilde temizlenmemesi, pestisitlerin gömüldüğü yerlerden sızmalar ve üretim yerlerindeki atıkların deşarj edilmesi de kirlenme ve birikme nedenleri arasındadır (Steiert and Crawford, 1985; Nannipieri and Bollag, 1991).

Halk sağlığı ve su kalitesi açısından dikkat edilmesi gereken bir atık türü de demir-çelik endüstrileri, petrol, petro-kimya, kömür işleme, fenol üretim endüstrileri, reçine üretimi, pestisit, boya, çözücü, ilaç, ahşap koruyucu kimyasallar, kağıt ve kağıt hamuru ve diğer kimyasal süreç endüstrilerinin en önemli hammaddelerinden olan fenol ve türevleridir (Throop, 1977).

Fenoller yüksek toksisitesi, yüksek oksijen ihtiyacı (teorik olarak, 2,4 kg O₂/kg fenol) ve düşük biyolojik parçalanma özelliğinden dolayı Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Örgütü (EPA) ve Avrupa Birliği tarafından birincil kirletici olarak adlandırılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından fenoller için sularda izin verilebilir konsantrasyon 1 ppm (parts per million) ve izin verilebilecek maksimum konsantrasyon 2 ppm olarak belirlenmiştir. Fenoller 1 ppm gibi düşük konsantrasyonda

bile içme suyunda önemli tat ve koku problemleri yaratır ve organizmalara zarar verir. Fenollü bileşiklerin çoğu insan sağlığına zarar verici potansiyele sahip oldukları için tehlikeli kirletici olarak sınıflandırılır. Bu sebeple fenolik maddeler alıcı su ortamlarına deşarj edilmeden önce dikkatli arıtım gerektiren çok yaygın organik kirleticiler arasındadır. Süreçlerden ya da atık sularından fenollerin imhası ya da giderimi önemli bir çevresel sorun olmuştur. Geleneksel olarak biyolojik arıtım, aktif karbon adsorpsiyonu, biyosorpsiyon, iyon değiştirme, ozon ile kimyasal oksidasyon ve çözücü ile ayırma, atıksulardan fenol ve türevlerini gidermek için çok yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir (Munnecke, 1977).

Fenolün arıtımı için önerilen çeşitli teknikler arasında biyolojik arıtım çevreye dost, pratik ve ekonomik olarak gösterilmektedir. Biyolojik arıtım fenolün tamamen mineralize olmasına ve ürünlerin daha zararsız ürünlere dönüşmesini sağlar. Büyüme için enerji ve karbon kaynağı olarak fenolü kullanma yeteneğinden dolayı fenolün parçalanmasında çok sayıda mikroorganizma kullanılmaktadır (Lee, et. al., 1988; Ünal, 2001).

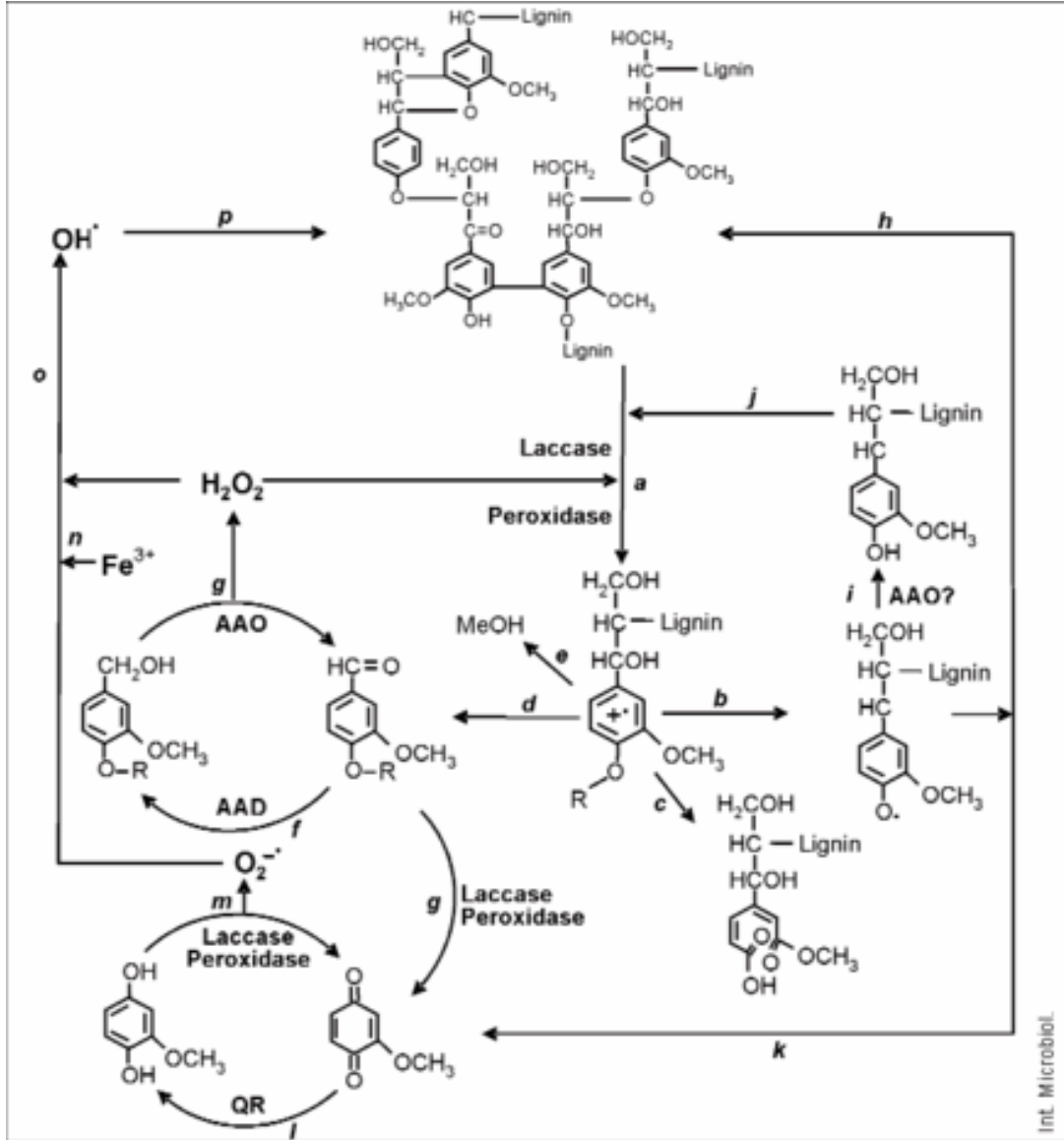
Bu çalışmada, çevresel kirletici olarak endüstriyel aktivitelerin önemli atıkları arasında yer alan klorofenolik bileşiklerden 4-klorofenol'den klor uzaklaştırılması ve detoksifikasyonu için lakkaz üreticisi olarak belirlenen *Trametes versicolor* ATCC 200801 lakkazının kullanımı ve en uygun koşulların araştırılması hedeflenmiştir. Belirlenen uygun koşullarda klor uzaklaştırılması sırasında oksijen takip edilmiş ve klor uzaklaştırma sonrasındaki toksik etki araştırılmıştır. Klor uzaklaştırıldıktan sonra 4-klorofenolün kimyasal yapısındaki değişiklikler FTIR analizleri ile belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyaz Çürükçül Funguslar

Beyaz çürükçül funguslar lignin, aromatik bileşikler ve tekstil boyaları gibi mikrobiyal ataklara karşı dayanıklı bileşikleri salgıladıkları geniş bir özgüllüğe sahip hücre dışı enzimlerle oksitleyebilirler (Cripps, et. al., 1990). Beyaz çürükçül fungusların birçoğu organik kirlilikleri geniş bir spektrumda okside edebildiği gibi azo, trifenil metan, polimerik ftalosiyanın ve heterosiklik boyalar gibi rekalsitran maddelerinde çeşitli türevlerini okside edebilmektedirler (Ollikka, et. al., 1993; Heinfling, et. al., 1997; Paszczynski, et. al., 1992). Bu organizmalar lignini parçalayan enzimleri yani lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP), mangan bağımsız peroksidaz (MnIP) ve sellobiyoz dehidrogenaz (CDH), azot, karbon veya kükürtün sınırlı olduğu ortamlarda sekonder metabolit olarak üretirler (Kirk and Farrell, 1987).

Phanerochaete crysosporium'un ligninolitik enzimleri sadece karbon, azot veya kükürt sınırlamasıyla tetiklenen sıvı kültürlerde sekonder metabolizma fazında ürettiği bulunmuştur. *Trametes versicolor* oldukça fazla çalışılmış ve önemli miktarda lakkaz salgılayan bir diğer beyaz çürükçül fungustur. *Coriolus versicolor* ve *Polyporus versicolor* olarakta bilinmektedir. *Phanerochaete crysosporium*'a benzer şekilde *Trametes versicolor* da mangan peroksidaz enzimini salgılar (Call and Mucke, 1997).



Şekil 2.1.1. Beyaz çürükçül funguslar tarafından katalizlenen enzimatik lignin biyodegradasyonu ve oksijen aktivasyonu (Gutiérrez and Martínez, 1996).

2.1.1. Beyaz Çürükçül Fungusların Kullanım Alanları

2.1.1.1. Boya Giderimi

Beyaz çürükçül funguslar boya gideren mikroorganizmalar içinde en yoğun çalışılmış olanlarıdır. Endüstride sentetik boyalar boyama ve baskı işlemlerinde oldukça yaygın olarak kullanılırlar. Yıllık 10.000 çeşidin üzerinde boya ticari olarak 7×10^5 tondan fazla üretilir ve yılda yaklaşık 50.000 ton deşarj edilir. Renk değişimi, atıksularda çoğunlukla ilk fark edilen kontaminasyondur. Sudaki çok küçük miktardaki (10-50 mg/L) boya su yüzeyinin gaz çözünürlüğü ile gaz geçirgenliğini etkiler. En büyük boya grubunu oluşturan birçok azo boya çevrede anaerobik koşullarda kanserojen aminlere ayrışabilir. Sentetik boyalar farklı ve kararlı yapılarından dolayı oluşan renklerine göre sınıflandırılır. Azo, antrakinin ve indigo belli başlı ticari boyalardır. Sentetik boyaların birçoğu mikrobiyal yıkıma karşı dirençlidir. Bu bileşikler başta tekstil, gıda, biyomedikal ve plastik endüstrileri olmak üzere birçok endüstride renklendirici olarak kullanılırlar (Paul and Philippe, et. al., 2005). Birbirinden farklı kimyasal yapılarıdaki sentetik boyaların renginin giderilmesinde lakkaz, *Trametes versicolor* tarafından sentezlenen en önemli hücre dışı enzimlerden birisidir. Antrakinin gibi bazı boyalar lakkaz için iyi bir substrattır ve renk giderimleri enzim aktivitesiyle orantılıdır.

2.1.1.2. Biyolojik İyileştirme (Biyoremediasyon)

Lakkaz, toksik fenolik bileşiklerin enzimatik oksidasyon yoluyla yıkılarak toksisitesi daha düşük olan bileşiklere dönüştürülmesinde kullanılır. Kömür, petrol rafinerisi, organik kimyasalların üretimi ve zeytinyağı üretimi gibi birçok endüstriyel sürecin atık sularında fenolik bileşikler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda

immobilize lakkazın, fenol ve klorofenollü kirliliklerin gideriminde oldukça yararlı olduğu bulunmuştur (Zille, 2005). Polimerik polifenol bileşikler, lakkaz katalizli oksidatif bağlanmayla genellikle suda çözünmezler. Böylece filtrasyon veya sedimentasyonla kolaylıkla ayrılabilirler. Endüstriyel atıksulardan fenoliklerin giderimi önemli bir problemdir, çünkü bu bileşiklerin çoğu toksiktir ve içme sularındaki varlıkları sağlık açısından tehlike oluşturur. Fenolik kirleticiler fenoksi herbisitler gibi tarımsal aktivitelerden, kağıt veya kağıt hamuru işleyen endüstriyel süreçlerden, petrokimyasallardan, boya endüstrisinden, diğer organik kimyasallardan veya tekstil endüstrilerinden kaynaklanabilir. Atıksuların detoksifikasyonunda serbest enzimlerin kullanımını kısıtlayan temel nedenler: proteolitik etki tarafından denatüre olmalarına karşı olan hassasiyetleri, pH ve sıcaklıktır. Lakkaz, fenolik maddelerin gideriminde diğer ligninolitik enzimlere kıyasla avantaja sahiptir. Bu üstünlük lignin peroksidazlar gibi hidrojen peroksitin varlığına gerek duymamasıdır. Ayrıca tirozinazlardan daha geniş substrat özgülüğüne sahiptirler. Bununla birlikte serbest lakkaz, enzimin stabilitesini arttırmak için değişik materyallere immobilize edilmektedir (Bar, 2001). Lakkazın 2,4,6-triklorofenol'ün 2,6-dikloro-1,4-hidokinol ve 2,6-dikloro-1,4-benzokinona dönüşmesinden de sorumlu olduğu bulunmuştur (Leontievsky, et. al., 1997).

2.1.1.3. Kağıt Hamurundan Lignin Giderimi

Ağaç; yapısında selüloz, hemiselüloz, hidroksifenil-propan alt birimlerinden oluşan kompleks bir polimer olan ligninden oluşan uzun ve ince fiberlerin yığılması olarak tanımlanabilir. Lignin orta tabakada bulunur ve burada doğal bir yapışkan görevi görür. Ayrıca lignin, selüloz ve hemiselüloz arasında bağ oluşturucu niteliktedir. Dolayısıyla kağıt hamuru oluşturmak için, ligninin mekanik veya kimyasal yolla uzaklaştırılması gereklidir. Kimyasal kağıt hamuru süreçlerinde, ağartma işlemi olarak adlandırılan lignin fraksiyonlarının eliminasyonu için güçlü kimyasal maddeler kullanılır. Genellikle ağartma

işleminde klor (Cl_2), klordioksit (ClO_2) ve ozon (O_3) kullanılır. Ancak, günümüzde klor kullanımı kanserojenik maddelerin oluşumuna neden olduğundan dolayı yasaklanmış, klordioksit kullanımına da çok sıkı sınırlamalar getirilmiştir. Bu nedenle yeni uygulamalar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Beyaz çürükçül fungusların oksidatif enzimlerinin karışımı kullanılarak ligninin yıkımı gerçekleştirilebilir. Ancak ligninin kompleks yapısından dolayı enzimle etkileşime girebilmesi için aracı (mediatör) bileşikler kullanılmalıdır (Sergio, 2006).

2.1.1.4. Biyosensör

Biyosensör elektronik dönüştürücü içeren biyolojik bileşenle bütünleşmiş bir probtur. Bu şekilde hazırlanan prob biyokimyasal veya fiziksel değişiklikler göz önüne alınarak biyokimyasal sinyalleri elektriksel değer olarak belirler ve kaydeder. Günümüzde lakkaz içeren birçok biyosensör, atıksuda aromatik aminler ve fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanımı amacıyla geliştirilmektedir (Dumschat, 1991).

2.2. Basidiomycetes

Bu sınıf fungusların en gelişmiş türlerini içerir. Sınıf içinde; şapkalı mantarlar, kurt mantarları, raf mantarları, yer yıldızları, kuş yuvaları gibi birçok yüksek formlu mantarların yanında Uredinales ve Ustinaginales gibi yapıları oldukça ilkel yapıda funguslar da girer. Bunun sebebi tüm basidiyumlu mantarların bu sınıf altında toplanmasıdır. Bu sınıfın üyelerinin ortak özelliği eşeyli sporları olan basidiosporlarını basidiyum üzerinde oluşturmalarıdır. Bu sınıf üyelerinin esas tipik sporları olan basidiosporlar; plazmogami, karyogami ve mayoz sonucu oluşur. Sınıf üyelerinin iyi gelişmiş septalı beyaz, parlak sarı ve turuncu renklerde miselleri vardır. Protein, yağ, karbonhidrat, vitamin ve organik

asitlerce zengin olması sebebiyle besin olarak kullanılan türleri vardır. Bazı türleri mikoriza oluşturur (Öner, 2001).

Kadeh şeklindeki bir mantarın yaşam döngüsünde, uzun ömürlü bir dikaryotik miselyum yer alır. Periyodik olarak, çevresel uyarılara yanıt olarak bu miselyum eşeyli olarak ürer ve incelikle işlenmiş üreme yapılarını oluşturur. Bu üreme yapıları bazidiyokarp olarak isimlendirilir. Bir bazidiyokarpta bulunan çok sayıda basidiyum, eşeyssel sporların kaynaklarıdır. Tipik bir basidiyomiset hayat çemberinde, basidiyosporlar çimlenerek miselleri oluştururlar ve misel hücreleri bir dikaryon üretmek üzere birleşirler. Dikaryon misel büyür ve basidiyospor üreten basidia üretir. Eşeyssiz üreme, basidiomisetlerde askomisetlerdekine göre daha az yaygındır (Demirbağ, 2006).

Filamentli funguslar renkleri, sertlik dereceleri (yumuşaklık) ve çürüme (çürütme) çeşitlerine göre beyaz, kahverengi ve yumuşak olarak üç sınıfa ayrılırlar. Yumuşak çürükçül funguslar Ascomycetes ve fungi imperfecti (Deuteromycetes) gruplarını içerir ve selülozu ayrıştırırken lignini kısmi olarak parçalayabilir. Kahverengi çürükçül funguslar basidiomisetlerin bir kısmını içerir ve hemiselüloz ile selülozun ayrıştırılması için tercih edilir. Lignini metil giderimi yaparak parçalar ve bunun sonucunda da ürün olarak amorf, kahve renkli ve kolayca ufalanan kalıntılar oluşur. Lignini kinonlara yıkar ve dolayısıyla kahve renk oluşur (Dizge, 2007).

2.3. *Trametes versicolor*



Şekil 2.3.1. *Trametes versicolor* yaşam alanından bir görüntü

2.3.1. Biyolojik Özellikleri

Fruktifikasyon organı çoğunlukla bantlı yapılardan oluştuğu için “hint kuyruğu fungusu” olarak bilenen bu tür bir basidiomycete üyesidir.

Bantlar genellikle açık-koyu kahverenkli. Ancak beyazdan sarımsı kahverengiye hatta mavi, turuncu, kestane rengine kadar değişebilir. Bu değişiklikler genetik polimorfizmden kaynaklanır. Ancak güneş ışığı gibi çevresel faktörlerden de etkilenebilir.

Yelpaze şeklinde olan basidiyokarp 10 cm çap, 0.5 cm kalınlığına kadar ulaşabilir ve üst üste binmiş raf şeklinde büyür. Basidiokarpın yüzeyi açık ve koyu konsantrik bantlar şeklindedir, yüzeyi düzden kadifemsiye kadar değişir. Basidiyokarpın yüzeyinde küçük, dairesel yada köşeli biçimde olan mm’de 3-5 adet 20 spor tüpü bulunmaktadır. Olgun

basidiyoporlar zarsı ve 2x6 µm uzunluğundadır (online: <https://fungolgenomics.concordia.ca/fungi/Tver.php>. erişim tarihi: 01/08/2010).

2.3.2. Ekolojisi

T. versicolor, tropik ve subtropik ormanlarda çok yaygın bir türdür. Sert odunlu ağaçlarda lignini parçalayan (delignifikasyon) önemli bir fungus türüdür. Bu nedenle beyaz çürükçül funguslar arasında sınıflandırılır. Bazen canlı ağaçlarda da odunun çürümesine neden olabilir (online: <https://fungolgenomics.concordia.ca/fungi/>, erişim tarihi: 01-08-2010)

2.3.3. *Trametes versicolor* Enzimleri ve Etkileri

Trametes versicolor'un sahip olduğu ligninolitik enzimler çevre biyoteknolojisi başta olmak üzere biyoteknolojide çok geniş bir şekilde kullanılmaktadır.

Trametes versicolor, odun lignoselülozunun parçalanmasında rol oynayan birçok enzimi sentezlemektedir. Bunlar lignin peroksidazın (LiP) 16 izoformu, mangan peroksidazın (MnP) 5 izoformu, lakkaz, karboksimetil sellülaz ve sellobiyaz dehidrogenazdır.

T.versicolor'un lignini parçalayan enzimlerinin ekspresyonunu düzenleyen mekanizmaları yaygın bir şekilde çalışılmıştır. LiP ve MnP'nin izozimlerini kodlayan genler tek bir gen grubu olarak toplanmıştır. Hücre içi ve hücre dışı proteazlar, lakkaz ve peroksidaz aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar. Bakır alışverişi enzimleri tahA ve CtaA, protein katlanması sırasında bu kofaktörün hücre içi varlığını kontrol ederek lakkazın üretimini düzenlerler. *T.versicolor* potansiyel olarak toksik metalleri şelatlamak için oksalik asit salgılar ve MnP ile Mn(III)'u stabilize eder (online: <https://fungolgenomics.concordia.ca/fungi/Tver.php>, erişim tarihi:02/08/2010).

T. versicolor'un ürettiği lakkaz enzimi çok sayıda klor eklenmiş bifeniller (PCB), tekstil boya ve poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi biyolojik yıkıma dirençli birçok yeni sentez kimyasalı (ksenobiyotikleri) substrat olarak kullanabilir. Ayrıca *T. versicolor*'un enzimleri kağıt endüstrisinde de kullanılmaktadır. Kağıt hamurunu beyazlatmak için *T. versicolor*'dan üretilen enzimler kullanılmaktadır (Ünal ve Kolankaya, 2001).

Ayrıca *T. versicolor*'un çok değerli tıbbi bileşikleri vardır. Taşıdığı en önemli bileşik crystin (PSC) adıyla bilinmektedir. PSC proteinlere bağlı polysakkarit demektir. Bu bileşik AIDS dahil bir çok virüsün gelişmesini baskı altına alır. Kanserin çoğunda olumlu etki yaptığı da bilinmektedir. Özellikle gastrointestinal-mide ve bağırsak kanserlerinde Japonya'da ilaç olarak kullanılmaktadır. (Stamets, 2000).

2.4. Lakkaz Enzimi (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2)

Lakkaz mavi bakır proteinleri veya mavi bakır oksidaz ile birlikte bitki askorbik oksidaz ve memeli plazma protein serüloplazması gibi diğer enzimlerin küçük grubuna dahildir (Thurston, 1994; Xu, 1996). Bu proteinler 4 katalitik bakır atomu birleşimi karakterindedir. Bir bakır atomu substrata bağlanarak indirgenir T1 alanına yerleşir ve oksitleyici destek durumundaki Cu^{2+} karakteristik mavi-yeşilimsi rengin oluşumundan sorumludur (Thurston, 1994; Alcalde, 2007). Diğer üç bakır atomu bir araya gelerek moleküler oksijene bağlanır ve T2/T3 adını alır.

Yoshida, ilk kez lakkazı 1883 yılında Japon lak ağacı olan *Rhus vernicifera*'nın salgılarından çıkartmıştır (Levine, 1965; Thurston, 1994). 1996'da Bertrand ve Laborde tarafından ilk kez bir fungusun elde edildiği kanıtlanmıştır (Levine, 1965; Thurston, 1994). Çeşitli Ascomycetes, Deuteromycetes ve Basidiomycetes grubu mikroorganizmalar oldukça yüksek miktarda lakkaz enzimi üretme yeteneğindedir; özellikle lignin

metabolizmasıyla ilgili beyaz çürükçül funguslarda bolca bulunur (Bourbonnais, et. al., 1995; Leontievsky, et. al., 1997).

2.4.1. Lakkazın Konumu ve Oluşumu

Lakkaz yaygın olarak mavi bakır içeren büyük proteinlerde bulunur. Yüksek bitki ve funguslarda geniş aralıkta bulunmuştur (Leontievsky, et. al., 1997; Kiiskinen, et. al., 2004) Son yıllarda *Azospirillum lipoferum* (Diamantidis, et. al., 2000), *Bacillus subtilis* (Martins, et. al., 2002), *Streptomyces lavendulae* (Suzuki, et. al., 2003), *Streptomyces cyaneus* (Arias, et. al., 2003) ve *Marinomonas mediterranea* (Jimenez and Juarez, et. al., 2005) bakterilerinden lakkaz tanımlanmıştır. Yüksek bitkilerde lakkaz oluşumu funguslardan çok daha kısıtlıdır. Lahana, şalgam, pancar, elma, kuşkonmaz, patates, armut ve diğer çeşitli sebzelerde lakkaz tespit edilmiştir (Levine, 1965). Lakkazın varlığı ilk kez *Rhus vernicifera* 'da belgelendirilmiştir (Huttermann, et. al., 2001).

Lakkaz; Ascomycetes, Deuteromycetes ve Basidiomycetes sınıfı funguslardan izole edilmiştir (Assavanig, et. al., 1992). Bu funguslardan lignin degradasyonu çalışmalarında Ascomycetes ve Deuteromycetes sınıflarında beyaz çürükçül funguslar olan, Basidiomycetes kadar kesin sonuçlar yoktur. Tanımlanan ilk lakkaz olan Ascomycete *Monocillium indicum* lakkazı peroksidatif aktivite göstermektedir (Thakker, et. al., 1992).

Beyaz çürükçül funguslar olan Basidiomycetes'ler ligninin yıkımı üzerine çok etkilidir ve bunun üzerine birçok çalışma bulunur. Lignin yıkımından sorumlu olan enzimler; lignin peroksidaz fenolik ve fenolik olmayan bölümlerin oksidasyonunu kataliz eder, mangan bağlı peroksidaz, lakkaz fenolik bileşikleri fenoksi redükalleri ve quinona oksitler, glukoz oksidaz ve gliksal oksidaz H₂O₂ üretiminde ve sellülobiyoz-quinon oksidoredüktaz quinon redüksiyonunu sağlar (Thakker, et. al., 1992).

Veratril alkol oksidaz ve bazı esterazlar doğal odun yıkımı işleminde rol oynayabilirler. Lignin yıkımının farklı dereceleri diğer ahşap bileşenler açısından çevre koşulları ve mantar türlerine bağlıdır. Lignin yıkımını başaran başka bir mekanizma yoktur ve bu olayın da çeşitli mikroorganizmaların farklı enzimatik mekanizması ile oluştuğu kanıtlanmıştır. Örnek olarak lignin yıkabilen alt sınıfa ait bir mikroorganizma olan *Pleurotus ostreatus* lakkaz, mangan peroksidaz ve veratril alkol oksidaz üretir ancak lignin peroksidaz üretmez (Palmieri, et. al., 1997).

Beyaz çürükçül funguslardaki ligninolitik enzimler genellikle hücre dışı olarak tanımlanır. Litaretürde hücre içi lakkazların oluşumu ile ilgili kanıt yoktur (Schlosser, et. al., 1997). *Neurospora crassa* için Froehner ve Eriksson tarafından tanımlanan hücre içi lakkaz enzimi, hücre dışı enzimler kadar iyidir (Froehner and Eriksson, 1974). Önerilerine göre intrasellüler lakkaz, ekstrasellüler lakkaz oluşumu için bir öncü olup oluşumlarında hiçbir farklılık yoktur.

2.4.2. Lakkaz Enzimi Moleküler Yapısı

Lakkazlar, moleküler oksijeni suya indirgeyerek özellikle fenol ve anilinler olmak üzere birçok aromatik bileşiğin oksidasyonunu katalizleyebilen çok bakırlı enzimlerdir. Aynı reaksiyon birçok tarımsal ve endüstriyel kimyasal maddenin transformasyonunda da görülmektedir (Gienfreda, et. al., 1999).

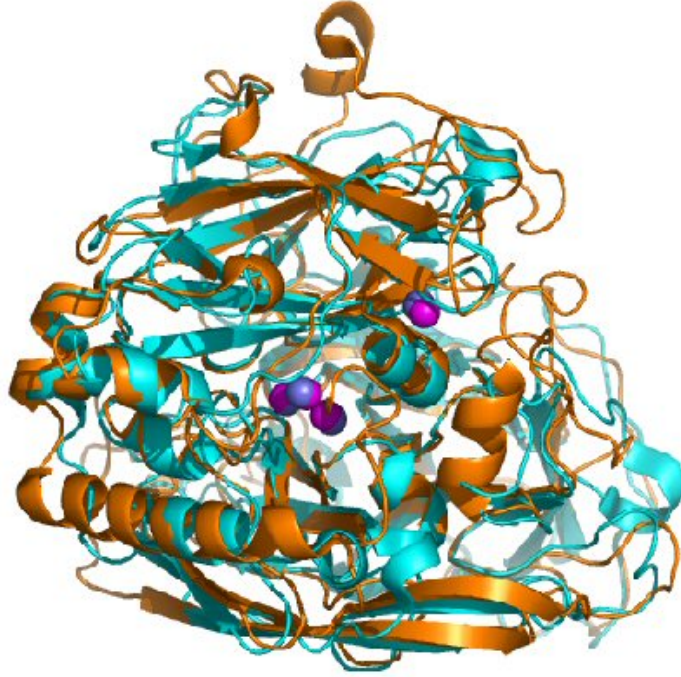
Birçok fungal lakkaz monomerik, dimerik veya tetramerik glikoproteinlerdir. Fungal lakkaz ve glikozilasyon salgılanması rol oynadığı bilinmektedir ve proteolitik yıkımı, bakır tutma ve termal duyarlılığa hassastır. 43 Monomer aralıklarının moleküler kütlesi yaklaşık 5-10 kDa'dır. Kovalent bağlı karbonhidrat kısmı (toplam molekül ağırlığının %10-45'i kadar) enzimin yüksek stabilitesini sağlamada önemli bir özelliğe katkısı olabilir. 50 Enzim içeriği karbonhidratlar, heksozaminler, glikoz, mannoz, galaktoz,

fruktoz ve arabinozdur. Değişik kaynaklardan elde edilen lakkaza ait molekül ağırlıkları Çizelge 2.1'de verilmiştir (Yarapolov, et. al., 1994).

Çizelge 2.4.2.1. Değişik kaynaklardan elde edilen lakkazın molekül ağırlığı geniş bir aralıkta değişir (Yarapolov, et. al., 1994).

Lakkaz Kaynağı	Molekül Ağırlığı, kDa
<i>Pleurotus osreatus</i>	59
<i>Botrytis cinerea</i>	72
<i>Phellinus noxius</i>	70
<i>Trametes versicolor</i>	66
<i>Rhus vemiciifera</i>	140
<i>Sycamore sp.</i>	95

Farklı kaynaklardan elde edilen lakkazların izoelektrik noktaları ise 2.9 ile 4.5 arasında değişmektedir. Lakkaz molekülü genellikle dört adet bakır atomu içerir.



Şekil 2.4.2.1. *Trametes versicolor* ve *Melanocarpus albomyces* lakkazının omurga sıralanışı üç boyutlu şekli (online: <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood2.html>, erişimtarihi:02-08-2010).

2.4.3. Lakkaz Aracılı Sistemler

Diğer ligninotik enzimlere göre lakkaz düşük potansiyel redoks için ve ligninin rasgele polimer doğası gereği sadece fenolik parçaları ve okside olabilir (Kersten, et. al., 1990; Evans and Hedger, 2001). Lakkazın düşük moleküler ağırlığındaki bileşiklerle beraber yüksek redoks potansiyeli (>900 mV) mediatör olarak isimlendirilir, ligninin fenolik olmayan oksidasyonunda kullanılabilir (Eggert, et. al., 1996). Son yıllarda yeni ve

etkili sentetik mediatörlerin bulunuşu ile ksantobiyotiklerin lakkaz katalizlenmesi genişletilmiştir (Eggert, et. al., 1996; Bourbonnais, et. al., 1997; Camarero, et. al., 2005).

Mediatör “elektron mekiği” gibi bir çeşit olaydan sorumlu küçük bir moleküldür: enzim bir kez güçlü bir ara oksitleyici üreterek yükseltgenir, co-mediatör (okside mediatör) oluşur, enzimatik keseden yayılır ve büyüklüğü nedeniyle doğrudan aktif siteye giremez herhangi bir substrat oksidasidasyonu olmaz. Ayrıca kullanılan mediatörler ara basamaklarda doğal olarak oluşan yapısal problemlerin oksidasyonuna izin verir. Enzim ve polimer doğrudan etkileşime geçemez (Banci, et. al., 1999).

2.4.4. Lakkaz Enziminin Aktif Bölgesinin Yapısı

Hidrojen peroksit oluşturmadan doğrudan suya katılan oksijene dört elektron aktaran oksidazlar genellikle karmaşık enzimlerdir. Lakkaz bu tip enzimlerin en basitlerinden birisidir. Bakır 1’in ligantlarından biri sistein veya metionin (lakkaz kanağına göre) olabilir.

Elektron Paramanyetik Rezonans (EPR) analizleri bakır 2’nin üç azot atomuna bağlandığını göstermektedir. Dördüncü bakır 2 ligantının da bir su molekülü olduğu gösterilmiştir (Winkler, et. al., 1982).

Lakkaz enzimine anyonların bağlanması üzerine yapılan kimyasal ve spektral analizler N_3^- , O_2^{2-} ve F^- iyonları için bakır 2 ve bakır 3 tipi bölgelerin yüksek afinite gösterdiklerini ortaya koymuştur.

Bakır 2 ve 3 atomlarının azot ile bağlanması olasıdır. Lakkaz içine bir elektron bakır 1 üzerinden girebilir ve bakır 2’ye geçebilir. Bakır 2 ayrılması, bakır 2 ve bakır 3 atomları arasında elektron geçişini engeller. Bakır 2 ve bakır 3 molekülleri muhtemelen birlikte çalışmaktadır ve oksijenin indirgenmesinden sorumludur (Winkler, et. al., 1982).

2.4.5. Lakkaz Enziminin Katalitik Aktivitesi

Bakır aktif bölgesi bulunan lakkazlar fenol bileşikleri, polifenoller, lignin poliamin gibi pek çok bileşiğin oksidasyon reaksiyonlarını katalizlerler. Enzimatik reaksiyonun ikinci substratı moleküler oksijendir. Diğer oksidoredüktazlarla katalizlenen reaksiyonlardan farklı olarak lakkaz tarafından katalizlenen reaksiyonlarda moleküler halde bulunan oksijene elektronların transferi ile su molekülü oluşturulur (Baybalı, 2003).

2.4.6. Lakkaz Enziminin Biyolojik Fonksiyonları

Lakkazlar için bitki yaralanmasına cevap, fruktifikasyon organlarının geliştirilmesi, hücre duvarının yeniden yapılanması ve topraktaki humik maddenin metabolik dönüşümü gibi birçok farklı fizyolojik rolü bulunur. Aynı zamanda lakkazların partenogeneziste, sporulasyon, fungal spor pigmentasyonu ve fungal morfogeneziste rol oynadıklarına inanılmaktadır. Lakkazların en çok tartışılan ve üzerinde en çok çalışılan konularından biri bitki hücre duvarının ligninleşme işlemi ve odunun beyaz çürümesi süresince lignin depolimerizasyonu ile ilgilidir (Thurston, 1994).

Bitki hücre duvarının yapısal bileşeni olan lignin, hidrolizlenemeyen C-C ve C-O bağları ile bağlanmış fenil propanoid birimlerinden oluşan heterojen ve karmaşık çok parçalı fenolik biyolojik polimerdir. Lakkaz üreticileri olarak odun çürümesinde Basidiomycete funguslarının fazla olması, fungal lakkazların lignin depolimerizasyonunda önemli rol oynadıklarını göstermektedir. Bu fonksiyon lignin sentezleyen sistemin bileşenleri olarak bitkisel kaynaklı lakkazlar ile çalışmaktadır (Thurston, 1994).

Genelde enzimler çok iyi bir şekilde substrata özgüdür fakat lignin parçalayan enzimlerin önemli bir özelliği de substrat aralığının geniş olmasıdır. En önemli ligninolitik enzimler; lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve lakkazdır. Yine de sellobiyoz; quinon oksidoredüktaz, sellobiyoz dehidrogenaz, glioksalat oksidaz, glukoz oksidaz (glukoz-1

oksidaz ve piranoz-2-oksidaz), veratril alkol oksidaz ve bazı esterazlar gibi diğer bazı enzimler de odunun doğal bozunmasının karmaşık sürecinde yer alır (Dizge, 2009).

Ligninin biyolojik olarak parçalanması; enzimatik polimerizasyon ile depolimerizasyon arasındaki denklige ulaşmak için birbirini etkileyen birçok enzimin ve enzimatik olmayan bileşenin etkisi altında meydana gelmektedir. Bazı deneysel kanıtlara göre ise lignin üzerinde her iki aktivitenin de rol oynayabileceğini göstermektedir (Erbil vd., 2006).

2.4.7. Lakkaz Enziminin Farklı Organizmalarda Dağılışı

Yoshida tarafından ilk olarak *Rhus vernicifera*'da lakkaz varlığının tespit edilmesinden sonra diğer bitki hücrelerinde de lakkaz aktivitesi saptanmıştır. Çınar ağacının hücre süspansiyon kültürlerinde, kayısıda, fasulye hipokotil hücre duvarlarında, mango meyvesinin öz suyunda ve tütünün ksileminde lakkaz ve lakkaz benzeri aktiviteler bulunmuştur. Bitkisel lakkazlarla ilgili yapılan çalışmalarda da daha çok bu enzimlerin bitkilerin hangi bölgelerinde birikmiş olduğu, bitki iletim sisteminde nasıl çalıştığı, enzim regülasyon noktaları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu enzimlerin bitkilerde lignin birikmesine öncülük eden son oksidatif basamakta rol oynadığı yönünde yorumlar yapılmaktadır (Tabak, 2008).

Özellikle Basidiomycete sınıfından beyaz çürükçül funguslar lakkaz enzimi sayesinde substratı mineralize edebilir. *Azospirillum lipoferum* gibi mikroorganizmalardan elde edilen bakteriyel lakkazlar da mevcuttur. *Azospirillum* bakterileri toprakta, ot ve tahılların rizosfer kısmında bulunmaktadır. Bitki büyümesini arttırmak amacı ile kültürü yapılan bitkilere bu bakteriler aşılanır. Freire ve arkadaşları, çeşitli substrat ve inhibitörleri kullanarak *Azospirillum lipoferum*'dan elde edilen lakkaz ile fungal lakkazların benzer oksidatif özelliklere sahip olduklarını göstermişlerdir. Malliga ve arkadaşları (1996) ile

Uyama (2002) ve arkadaşları da bir siyanobakter olan *Anabaena azollae*'da lakkaz aktivitesini kanıtlamışlardır (Malliga, et. al., 1996; Uyama, et. al., 2002).

Çizelge 2.4.7.1. Lakkazların fungal üreticileri (Gienfreda, et. al., 1999)

FUNGUS	SINIF	REFERANS
<i>Abortiporus biennis</i>	Bacidiomycete	Nerud and Misurcova, 1996
<i>Agaricus bisporus</i>	Bacidiomycete	Giovannozzi and Sermanni, et. al.,1982; Matcham ve Wood, 1992; Perry, et. al.,1993; Ratcliffe, et. al.,1994; Wood, 1980
<i>Agaricus brunnescens</i>	Bacidiomycete	Fagan and Fergus, 1984
<i>Armillara mellea</i>	Bacidiomycete	Bilal and Thurston, 1996; Rehman and Thurston, 1992; Worrall, et. al., 1986
<i>Aspergillus nidulans</i>	Ascomycete	Aramayo and Timberlake, 1990; Kurtz and Champe, 1982; Law and Timberlake, 1980
<i>Botryosphaeria sp.</i>	Ascomycete	Barbosa vd., 1996
<i>Botrytis cinerea</i>	Deuteromycete	Bollag and Leoowicz, 1984; Fortina,et.al.,1996; Marbach, et. al., 1983; Nun, et. al., 1988; Slomczynski, et. al., 1995; Viterbo, et. al., 1993

Çizelge 2.4.7.1. Lakkazların fungal üreticileri (Gienfreda, et. al., 1999) (devam)

FUNGUS	SINIF	REFERANS
<i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	Bacidiomycete	Fukushima and Kirk, 1995; Ruttiman and Johnson, et. al., 1992, 1993
<i>Cerrena maxima</i>	Bacidiomycete	Gindilis, et. al., 1990
<i>Cerrena unicolor</i>	Bacidiomycete	Bekker, et. al.,1990; Gianfreda, et. al., 1998; Pelaez, et. al., 1995; Zakariashvili and Elisashvili, 1993
<i>Chaetomium thermophile</i>	Ascomycete	Ishigami, et. al., 1988
<i>Corioloopsis occidentalis</i>	Bacidiomycete	Nerud and Misurcoba, 1996
<i>Coriolus consicolor</i>	Bacidiomycete	Zhou, et. al., 1993
<i>Coriolus hirsutus</i>	Bacidiomycete	Gindilis, et. al., 1988; Kojima, et. al., 1990
<i>Coriolus verllereus</i>	Bacidiomycete	Zhou, et. al., 1993
<i>Cyathus bulleri</i>	Deuteromycete	Banerjee and Vohra, 1991
<i>Curvularia sp.</i>	Bacidiomycete	Vasdev and Kulad, 1994
<i>Daedalea flavida</i>	Bacidiomycete	Arora and Sandhu, 1985
<i>Phellinus igninarius</i>	Bacidiomycete	Szklarz, et. al., 1989

Çizelge 2.4.7.1. Lakkazların fungal üreticileri (Gienfreda, et. al., 1999) (devam)

FUNGUS	SINIF	REFERANS
<i>Phellinus torulosus</i>	Bacidiomycete	Pelaez, et. al., 1995
<i>Phlebia brevispora</i>	Bacidiomycete	Ruttiman and Johnsın, et. al., 1992
<i>Phlebia ochraceofulva</i>	Bacidiomycete	Vares, et. al., 1993
<i>Phlebia radiata</i>	Bacidiomycete	Kantelinel, et. al., 1989; Lundell, et. al., 1990; Moilanen, et. al., 1996; Niku-Paavola, et. al.,1990; Rogalski, et. al., 1991
<i>Phlebia tremellosa</i>	Bacidiomycete	Vares, et. al., 1994
<i>Pholiota aegerita</i>	Bacidiomycete	Von Hunolstein, et. al., 1986
<i>Pholiota mutabilis</i>	Bacidiomycete	Bollag and Leonowicz, 1984; Leonowicz and Malinowska, 1983; Leonowicz, et. al., 1979
<i>Pleurotus eryngii</i>	Bacidiomycete	Munoz, et. al., 1997; Pelaez, et. al., 1995
<i>Pleurotus spp.</i>	Bacidiomycete	Sanjust, et. al., 1991

Çizelge 2.4.7.1. Lakkazların fungal üreticileri (Gienfreda, et. al., 1999) (devam)

FUNGUS	SINIF	REFERANS
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bacidiomycete	Ardon, et. al., 1996; Bollag and Leonowicz, 1983; Lee and Suh, 1985; Marzullo, et. al., 1995; Nerud and Misurcova, 1996; Palmeieri, et. al., 1993; Platt, et. al., 1984; Sannia, et. al., 1986
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Bacidiomycete	Masaphy and Levanon, 1992
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Bacidiomycete	Fu, et. al., 1997; Kamuran vd., 1997; Nerud and Misurcova, 1996; Sollai, et. al., 1996
<i>Pleurotus tigrinus</i>	Bacidiomycete	Akhmedova, et. al., 1994
<i>Polyporus anceps</i>	Bacidiomycete	Peire and Gold, 1991; Petroski, et. al., 1980
<i>Polyporus anisoporus</i>	Bacidiomycete	Vaitkyavichyus, et. al., 1984
<i>Polyporus brumalis</i>	Bacidiomycete	Trojanowski, et. al., 1995
<i>Polyporus ciliatus</i>	Bacidiomycete	Nerud and Misurcova, 1996
<i>Polyporus hirsutus</i>	Bacidiomycete	Amin, et. al., 1985

Çizelge 2.4.7.1. Lakkazların fungal üreticileri (Gienfreda, et. al., 1999) (devam)

FUNGUS	SINIF	REFERANS
<i>Polyporus pinsitus</i>	Bacidiomycete	Xu, et. al., 1996; Yaver, et. al., 1996
<i>Podospora anserina</i>	Ascomycete	Bollag and Leonowicz, 1984; Hoffmann and Eser, 1997; Minuth, et. al., 1978
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Bacidiomycete	Eggert, et. al., 1996a; Gomez and Alarcon, et. al., 1989; Qin, et. al., 1996
<i>Pycnoporus coccineus</i>	Bacidiomycete	Oda, et. al., 1991
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Bacidiomycete	Esposito, et. al., 1993; Nerud and Misurcova, 1996
<i>Rhizoctonia praticola</i>	Deuteromycete	Bollag, et. al., 1979; Bollag and Leonowicz, 1984; Shuttleworth, et. al., 1986
<i>Rhizpctonia solani</i>	Deuteromycete	Wahleithner, et. al., 1996; Xu, et. al., 1996
<i>Rigidoporus lignosus</i>	Deuteromycete	Galliano, et. al., 1991; Nicole, 1982
<i>Schizophyllum commune</i>	Bacidiomycete	De Veries, et. al., 1986

Çizelge 2.4.7.1. Lakkazların fungal üreticileri (Gienfreda, et. al., 1999) (devam)

FUNGUS	SINIF	REFERANS
<i>Scytalidium thermophilum</i>	Bacidiomycete	Berka, et. al., 1995; Xu, et. al., 1996
<i>Trametes hirsuta</i>	Bacidiomycete	Arora and Sandhu, 1984
<i>Trametes sanguinea</i>	Bacidiomycete	Nishizawa, et. al., 1995
<i>Trametes versicolor</i>	Bacidiomycete	Bollag and Leonowicz, 1984; Katase and Bollag, 1991; Milstein, et. al., 1989; Paice, et. al., 1993; Pelaez, et. al., 1995; Rogalski, et. al., 1991b; Von Hunolstein, et. al., 1986
<i>Trichocladium canadense</i>	Deuteromycete	Durrant, 1996
<i>Trichoderma</i> spp.	Deuteromycete	Assavanig, et. al., 1992
<i>Tyromyces incarnatus</i>	Bacidiomycete	Tsujiyama and Nakano, 1996

2.4.8. Lakkaz Enzimi Uygulama Alanları

Enzimatik oksidasyon teknikleri, selüloz, kağıt, tekstil ve gıda endüstrisinin de içinde bulunduğu çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni yeniden işleyip kullanır hale getiren enzimler endüstriyel amaçlar için kullanışlıdır. Moleküler oksijeni kullanılır hale getiren lakkaz (benzendiol: oksijen oksidoreduktaz; EC 1.10.3.2) yukarıdaki amaçlar için uygun bir enzimdir. Lakkaz molekülü, üç redoks bölgesinde dağılmış monomer başına genellikle dört bakır atomu içeren dimerik veya tetramerik glikoproteindir. Lakkaz enzimi, moleküler dioksijenin suya indirgenmesi ile birleştirilen, bazı inorganik iyonların yanı sıra orto ve paradifenollerin, aminofenollerin, polifenollerin, poliaminlerin, ligninlerin ve aril diaminlerin oksidasyonunu da katalizlemektedir (Couto and Herrera, 2006; Tzanov, et. al., 2003).

Trametes versicolor'dan elde edilen lakkaz enzimi ile ilgili literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Çizelge 2.4.8. 1.'de de gösterildiği gibi lakkaz enziminin boyaların deklorizasyonu, ksenobiyotiklerin yıkımı, biyosensörler, atık iyileştirme, biyopulping, organik sentez, gıda endüstrisi ve biyolojik ağartma gibi çeşitli biyoteknolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Klorofenolik bileşiklerin direkt deklorinasyonu da gerçekleştirilmiştir (Arcand and Archibald, 1991; Ünal, 2004). Tetrakloroguaiakol gibi çeşitli klorlu aromatiklerin klor gideriminde (deklorinasyon) kullanılmıştır. Klorlu organik maddede yaklaşık %85 oranında bir yıkım gözlenmiştir (Limura, et. al., 1996).

Literatürde yer alan diğer bir çalışma ise fenolik bileşiklerin lakkaz enzimi aracılığıyla detoksifikasyonudur (Bollag, et. al., 1988). Poliüretan köpüklerle tutuklanmış *Trametes versicolor*'un direkt kullanımı ve esmer selüloz hamurunun enzimatik olarak biyolojik ağartımı çalışmaları yapılmıştır (Kirkpatrick, et. al., 1990). Ancak enzimatik çalışmalarda daha kısa sürede sonuç alınmaktadır. Kraft selüloz hamurunun enzimatik ağartılması çalışmasında klor gideriminin 15 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleştiği ve lakkaz enzimlerinin esmer kraft selüloz hamurunun Kappa değerini önemli oranlarda

düşürdüğü, beyazlığını ve parlaklığını artırmakta önemli oranda etkin olduklarını bildirilmiştir (Taşpınar ve Kolankaya, 1998).

Çizelge 2.4.8. 1. Farklı Lakkaz Uygulamaları (Tabak, 2008)

Uygulama	Lakkaz Kaynağı	Referans
Boyaların Deklorizasyonu	<i>Aspergillus</i> (genetiği modifiye edilmiş)	Soares, et. al., 2001a, Soares, et. al., 2001b, Soares, et. al., 2002
	<i>Aspergillus niger</i>	Michniewicz, et. al., 2003
	<i>Cerrena unicolor</i>	Reyes, et. al., 1999
	<i>Coriolopsis gallica</i>	Gomez, et. al., 2005
	<i>Coriolopsis rigida</i>	Ünyayar, et. al., 2005
	<i>Funalia trogii</i>	
	<i>Irpex lateus</i>	Kasinath, et. al., 2003
	<i>Myceliophthora thermophila</i>	Claus, et. al., 2002
	<i>Polyporus eryngii</i> , <i>Pynoporus pinsitus</i> ,	
	<i>Trametes versicolor</i>	Camarero, et. al., 2004
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Hou, et. al., 2004
	<i>P.ostreatus</i>	Palmieri, et. al., 2005
	<i>P.cinnabarinus</i>	Mccarthy, et. al., 1999
<i>P.cinnabarinus</i>	Scliephake, et. al., 2000	
<i>Sclerotium rolfisii</i> , <i>Trametes hirsuta</i>	Campos, et. al., 2001	
<i>Streptomyces cyaneus</i>	Arias, et. al., 2003	

Çizelge 2.4.8. 1. Farklı Lakkaz Uygulamaları (Tabak, 2008) (devam)

Uygulama	Lakkaz Kaynağı	Referans
Boyalarn Deklorizasyonu	<i>T.hirsuta</i>	Abadulla, et. al., 2000
	<i>T.hirsuta</i>	Dominguez, et. al., 2005
	<i>T.hirsuta</i>	Moles, et. al., 2003
	<i>T.hirsuta</i>	Rodriguez Couto, et. al., 2004a
	<i>T.hirsuta</i>	Rodriguez Couto, et. al., 2004c
	<i>T.hirsuta</i>	Rodriguez Couto, et. al., 2005
	<i>T.hirsuta</i>	Rodriguez Couto, et. al., 2006
	<i>T.hirsuta</i>	Rodriguez Couto and Sanroman, 2006
	<i>T.hirsuta</i>	Rodriguez Couto and Sanroman, 2005
	<i>T.hirsuta</i>	Rodriguez Couto, et. al., 2004b
	<i>T.hirsuta, T.versicolor</i>	Nyanhongo, et. al., 2002
	<i>Trametes modesta</i>	Rehorek, et. al., 2004
	<i>T.modesta</i>	Levin, et. al., 2005
	<i>Trametes trogii</i>	Maceiras, et. al., 2001
	<i>T.versicolor</i>	Lorenzo, et. al., 2002
	<i>T.versicolor</i>	Rodriguez Couto, et. al., 2002
	<i>T.versicolor</i>	Peralta and Zamora, et. al., 2003 Blanquez, et. al., 2004
	<i>T.versicolor</i>	Tavares, et. al., 2004
	<i>T.versicolor</i>	

Çizelge 2.4.8. 1. Farklı Lakkaz Uygulamaları (Tabak, 2008) (devam)

Uygulama	Lakkaz Kaynağı	Referans
Ksenobiyotiklerin Degredasyonu	<i>Chaetomiaceae familyasının 1-4 irki</i>	Saito, et. al., 2004
	<i>Caldosporium sphaerospermum</i>	Potin, et. al., 2004
	<i>Coprinus cinereus, Myceliophthora thermophila, P.pinsitus, Rhizoctonia solani</i>	Kulys, et. al., 2003
	<i>C.gallica</i>	Pickard, et. al., 1999
	<i>C.gallica</i>	Vandertol and Vanier, et. al., 2002
	<i>Coriolus hirsutus</i>	Cho, et. al., 2002
	<i>Coriolus versicolor</i>	Itoh, et. al., 2000
	<i>C.versicolor</i>	Okazaki, et. al., 2002
	<i>Myceliophthora thermophyta, Trametes pubescens</i>	Nicotra, et. al., 2004
	<i>Panus tigrinus</i>	Zavarzina, et. al., 2004
	<i>P.ostreatus</i>	Eggen, 1999
	<i>P.ostreatus</i>	Hublik and Schinner, 2000
	<i>P.ostreatus, T.versicolor</i>	Keum and Li, 2004
	<i>P.cinnabarinus</i>	Mougin, et. al., 2002
	<i>Pyricularia oryzae</i>	Lante, et. al., 2000
	<i>P.oryzae</i>	Carunchio, et. al., 2001
	<i>Rhus vernicifera</i>	Moeder, et. al., 2004
<i>T.hirsuta</i>	Niku and Paavola ve Viikari, 2000	

Çizelge 2.4.8. 1. Farklı Lakkaz Uygulamaları (Tabak, 2008) (devam)

Uygulama	Lakkaz Kaynağı	Referans
Ksenobiyotiklerin Degredasyonu	<i>T.hirsuta</i> D10	Niku Paavola and Viikari, 2000
	<i>Trametes sp.</i>	Böhmer, et. al., 1988
	<i>Trametes sp.</i>	Tanaka, et. al., 2001
	<i>T.versicolor</i>	Tanaka, et. al., 2003
	<i>T.versicolor</i>	Collins, et. al., 1996
	<i>T.versicolor</i>	Johannes, et. al., 1998
	<i>T.versicolor</i>	Majcherczyk, et. al., 1998
	<i>T.versicolor</i>	Johannes and Majcherczyk, 2000
	<i>T.versicolor</i>	Majcherczyk and Johannes, 2000
	<i>T.versicolor</i>	Castro, et. al., 2003
	<i>T.versicolor</i>	Dodor, et. al., 2004
	<i>T.villosa</i>	Fabbrini, et. al., 2001
	<i>T.villosa</i>	Fukuda, et. al., 2001; Kang, et. al., 2002
	<i>Trichophyton sp.</i> LKY-7	Cantarella, et. al., 2003; Jung, et. al., 2003
	Tanımlanmamış	Zhang, et. al., 2002
Biyosensörler	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>A.niger</i> , <i>T.versicolor</i>	Timur, et. al., 2004

Çizelge 2.4.8. 1. Farklı Lakkaz Uygulamaları (Tabak, 2008) (devam)

Uygulama	Lakkaz Kaynağı	Referans
Biyosensörler	<i>A.bisporus</i> , <i>R.vernicifera</i> , <i>Rigidoporus lignosus</i>	Vianello, et. al., 2004
	<i>T.versicolor</i> <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Myceliophthora thermophila</i> , <i>P.pinsitus</i>	Kulys and Vidzinaite, 2003
	<i>C.unicolor</i>	Jarosz and Wilkolazka, et. al., 2004
	<i>C.unicolor</i>	Jarosz and Wilkolazka, et. al., 2005
	<i>C.hirsutus</i>	Marko and Varga, et. al., 1995
	<i>C.hirsutus</i>	Lisdar, et. al., 1997
	<i>C.hirsutus</i>	Bauer, et. al., 1999
	<i>C.hirsutus</i>	Kuznetsov, et. al., 2001
	<i>C.hirsutus</i> , <i>R.vernicifera</i>	Freire, et. al., 2002
	<i>C.versicolor</i>	Gupta, et. al., 2003
	<i>P.ostreatus</i>	Gomes and Rebelo, 2003
	<i>P.oryzae</i>	Leite, et. al., 2003
	<i>R.vernicifera</i>	Palmore and Kim, 1999
	<i>T.versicolor</i>	Gardiol, et. al., 1996
	<i>T.versicolor</i>	Leech and Daigle, 1998
		Freire, et. al., 2001; Gomes and Rebelo, 2003

Çizelge 2.4.8. 1. Farklı Lakkaz Uygulamaları (Tabak, 2008) (devam)

Uygulama	Lakkaz Kaynağı	Referans
Biyosensörler	<i>T.versicolor</i>	Haghighi, et. al., 2003
	<i>T.versicolor</i>	Gomes, et. al., 2004
	<i>T.versicolor</i>	Roy, et. al., 2005
	<i>T.versicolor</i>	Ferry and Leech, 2005
Atık İyileştirme	<i>C.gallica</i>	Calvo, et. al., 1998
	<i>Gliocladium virens</i>	Murugesan, 2003
	<i>Lentinula edodes</i>	D'Annibale, et. al., 1999
	<i>L.edodes</i>	D'Annibale, et. al., 2000
	<i>L.edodes</i>	Casa, et. al., 2003
	<i>P.tigrinus</i>	D'Annibale, et. al., 2004
	<i>P.ostreatus</i>	Aggelis, et. al., 2003
	<i>Pleurotus spp.</i>	Tsioulpas, et. al., 2002
	<i>Pycnoporus coccineus</i>	Jaouani, et. al., 2005
	<i>R.vernicifera</i>	Durante, et. al., 2004
	<i>Trametes</i> sp. AH28-2 ırkı	Xiao, et. al., 2003
	<i>T.versicolor</i>	Jolival, et. al., 2000
	<i>T.versicolor</i>	Edwards, et. al., 2002
<i>T.versicolor</i>	Lucas, et. al., 2003	

Çizelge 2.4.8. 1. Farklı Lakkaz Uygulamaları (Tabak, 2008) (devam)

Uygulama	Lakkaz Kaynağı	Referans
Biyopulping	<i>Fomes fomentarius</i> , <i>Ganoderma collosum</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Merulius tremellosus</i> , <i>Phlebia radiata</i>	Bourbonnais, et. al.,1997
	<i>P.ostreatus</i> , <i>T.versicolor</i>	Bourbonnais, et. al.,1997
	<i>C.versicolor</i>	Call and Mücke, 1997 (Lignozym-prosesi)
	<i>Peniophora sp.</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>T.hirsuta</i> , <i>T.versicolor</i>	Kandioller and Christov, 2001
	<i>T.versicolor</i>	Archibald, et. al.,1997
	<i>T.versicolor</i>	Crestini and Argyropoulos, 1998 Jacop, et. al.,1999
	Tanımlanmamış	Scaley, et. al.,1999
	Tanımlanmamış	Chakar and Ragauskas, 2001
	Tanımlanmamış	Poppius and Levlin, et al.,2001
Tanımlanmamış	Tamminen, et. al.,2003	
Organik Sentez	<i>C.hirsuta</i>	Baker, et. al.,1996
	<i>C.hirsuta</i>	Karamyshev, et. al., 2003
	<i>P.cinnabarinus</i>	Mikolasch, et. al.,2002
	<i>P.cocconeus</i>	Uyama and Kobayashi, 2002
	<i>P.oryzae</i>	Setti, et. al.,1999
	<i>T.versicolor</i>	Fritz Langhals ve Kunath, 1998

Çizelge 2.4.8. 1. Farklı Lakkaz Uygulamaları (Tabak, 2008) (devam)

Uygulama	Lakkaz Kaynağı	Referans
Organik Sentez	<i>T.versicolor</i>	Aktaş, et. al.,2001
	<i>T.versicolor</i>	Schafer, et. al., 2001
	<i>T.versicolor</i>	Aktaş ve Tanyolaç, 2003
	<i>T.villosa</i>	Uchida, et. al., 2001
Gıda Endüstrisi	Çin lak ağacı reçinesi	Huang, et. al.,1995
	<i>Myceliophthora thermophili</i>	Micard and Thibault, 1999
	<i>P.pinsitius</i>	Georis, et. al., 2003
	<i>P.cinnabarinus</i>	Kuuva, et. al.,2003
	<i>T.hirsuta</i>	Crecchio, et. al.,1995
	<i>T.versicolor</i>	Mathiasen, et. al.,1996
	Tanımlanmamış	Petersen and Mathiasen, 1997
	Tanımlanmamış	Norsker, et. al.,2000
Biyolojik ağartma	<i>C.versicolor</i>	Balakshin, et. al., 2001
	<i>P.eryngii, P.cinnabarinus</i>	Camaero, et. al.,2004
	<i>T.versicolor</i>	Georis, et. al.,2003
	<i>P.cinnabarinus</i>	Paice, et. al.,1995
	<i>T.versicolor</i>	Archibald, et. al.,1997
	<i>T.versicolor</i>	Balakshin, et. al.,2001
	Tanımlanmamış	Han, et. al.,2002
Kumaş (kot) beyazlatma	<i>T.versicolor</i>	Pazarlıoğlu vd., 2005

2.5. Organik Klorofenolik Toksik Bileşikler ve Etkileri

İnsan, hayvan ve bitki sağlığını dış parazitlerden korumak, aynı zamanda tarımda verimin ve ürünün kalitesini arttırmada tarım zararlılarına karşı zorunlu olarak kullanılan kimyasal maddeler genel olarak pestisit olarak tanımlanır. Toksik ve mutajenik özelliklerinden dolayı çevre ve sağlık sorunları yaratan pestisitler, uzun bir süredir pek çok bilimsel araştırmanın temelini oluşturmaktadır (Durmuşoğlu vd., 2008).

Dünya nüfusunun hızla arttığı çağımızda açlık sorununun çözülebilmesi için, II. Dünya Savaşı'ndan sonra tarımsal üretimi arttırmada pestisitlerin rastgele kullanılması, çevreye saçılan endüstriyel atıklar ve diğer toksik maddeler, giderek artan tehlikeli boyutlarda toplum sağlığını tehdit etmektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde bir tarım ülkesi olan ülkemizde, bilimsel tarımın giderek yoğunlaşmasıyla yılda 50-60 bin ton kadar pestisit kullanılmaktadır. Dünyanın birçok ülkesinde, özellikle gelişmekte olan ülkelerde tarım ilaçlarından zehirlenmeler facia niteliğinde olabilmektedir (Delen vd., 2005).

Pestisitler, kullanıldıkları zararlılara göre böcek öldürücüler (insektisidler), mantar öldürücüler (fungusidler), zararlı otları yok edenler (herbisidler), çok ayaklı ve keneleri öldürenler (akarisidler), bakteri öldürenler (bakterisidler), nematodları öldürenler (nematisidler) vb. gibi isimlendirilirler.

Klorofenoller, organoklor (organik klorlu) insektisidler içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu tür insektisidlerin metabolizmaları ve böbrekten eliminasyonları yavaştır. Üretiminde ve kullanımında çalışanların vücutlarında, organoklorlu insektisidler birikip kronik zehirlenmelere yol açabilmektedir. Ayrıca genel popülasyonda vücutta biriken insektisid oranı oldukça yüksek düzeylere ulaşabilmektedir.

Organik klorlu (organoklor) insektisidler suda az çözünen, çok dayanıklı, biyodegradasyona dayanıklı, toprakta, suda ve yiyeceklerde uzun süre kalabilen, insan ve

hayvanların organizmalarında uzun yarı ömürlü katı maddelerdir. Tohumların, odunların ilaçlanmasında ve evlerde böceklere karşı kullanılırlar (Altınışık, 2007).

Fenol ve fenolün klorlanmış formları pestisit olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Fenol ve klorofenoller; klorofenol üretimi, kağıt ağartma işlemi sırasında, suların dezenfeksiyonu ve organik maddelerin yakılması sırasında oluşmaktadır (Puhakka, et. al.,1992; Ha, et. al.,2000). Klorofenollerin bu şekilde yoğun olarak kullanımları, yeraltı ve yüzeysel sulara değişik konsantrasyonlarda klorofenol kirliliğine neden olmuştur. Artan endüstrileşmeye paralel olarak, daha sıkı deşarj standartları uygulanmaya başlamış ve içme suyunda klorfenol konsantrasyonu dünya sağlık örgütü tarafından 1 mg/L olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla, doğal kaynak sularının kalitelerinin korunması amacıyla, atıksulardan klorofenollerin giderilmesi şarttır (Ha, et. al.,2000).

Fenol içeren su klorlandığında zehirli poliklorlu fenoller oluşur. EPA (Environmental Protection Agency) yüzey sularındaki fenolün 1 ppb (parts per million)'den fazla olduğu durumlarda içilemeyeceğini belirtmektedir (EPA, 1991).

Organik klorlu insektisidler organizmaya girdikten sonra önce yağ dokusunda dağılırlar ve idrarla atılan suda çözünür klorlu metabolitlerine dönüşürler. Daha sonra yağ dokusundan yavaş bir şekilde birikirler (Altınışık, 2007).

Sütte ve yağ dokusunda biriktiklerinden, eti ve sütü tüketilen hayvanlardan insanlara geçme riski vardır. Ayrıca tarım ilaçları ekolojik dengeyi de önemli ölçüde bozmaktadır. Toprağın, suların ve havanın pestisidlerle kirlenmesi, burada yaşayan canlıların (mikroorganizmalar, yararlı parazit böcekler, solucanlar, arılar, kuşlar v.b.) yok olmasına yol açarak, gelecek nesiller için doğanın verimliliğini yok etmekte ve insan sağlığını tehlikeye sokmaktadır. Pestisidlerle kirlenmiş topraklarda yetişen ürünlerde bulunan kalıntılar etinden, sütünden ve yumurtasından faydalandığımız hayvanların vücutlarına girerek birikirler. İçersinde kalıntı bulunan bu gıda ürünleriyle beslenen insanlarda da pestisit kalıntıları birikerek ciddi sağlık sorunlarına yol açabilir. Pestisidler topraktan süzülerek yer altı sularına ya da buharlaşma ile havaya da karışabilmektedirler.

2.6. Türkiye’de Pestisit Kullanımı

Türkiye’de pestisit kullanımı 1960’lı yıllarda, zararlıların her türüsüne karşı mücadelede kullanılan DDT ile başlamıştır. Tarım ülkesi olan Türkiye’de tarımsal haşere kontrolü için en etkili yöntem kimyasal kullanmaktır. 1940’lı yıllardan beri sentetik organoklorlu pestisitler oldukça çok miktarda üretilmiş ve zararlıları karşı kullanıma sunulmuştur. Bunlar arasında, aldrin, DDT ve heptaklor 1980'lere kadar kullanılmıştır sonrasında ise kullanımları yasaklanmıştır. Diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye’de de organoklorlu insektisit kalıntıları öncelikle insanlar tarafından tüketilen balık, midye ve süt gibi gıdalarda tespit edilmiştir (Kolankaya, 2004).

Günümüzde, tarımsal üretimde sorun olan hastalık, zararlı ve yabancı otların olumsuz etkilerinden ekonomik olarak korunabilmek için tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de zararlı yönetimi ilkeleri çerçevesinde pestisit kullanımı halen vazgeçilmez unsurlardandır. Dünyada 3 milyon tona, ülkemizde ise 30 bin tona ulaşan pestisit tüketimi bunun en önemli göstergesidir (Delen, 2008).

Çizelge 2.6.1’de görüldüğü gibi, Türkiye’de yıllık pestisit tüketimi, yıllık iniş ve çıkışlara rağmen, 1979-2007 yılları arasında %270 oranında artmıştır (Delen, 2008). Bu değer yıllık olarak %9.64 artışa karşılık gelmektedir. Özellikle son yıllardaki önemli artışlar dikkat çekicidir.

Çizelge 2.6.1. Etki Ettikleri Canlı Gruplarına Göre 1979-2007 Yılları Arasında Etkili Madde Olarak Pestisit Tüketimi (Ton)* (Delen, 2008)

Pestisit Grupları	1979	1987	1994	1996	2002	2006	2007
Insektisitler	2.288	3.303	2.065	3.027	2.251	3.406	7.304
Akarisitler	203	240	192	223	297	219	315
Yağlar	1.595	2.147	2.147	2.871	2.428	2.144	2.447
Fumigant ve Nematisitler	316	322	531	1.077	1.559	2.650	3.031
Fungisitler	1.537	2.612	2.201	2.951	1.964	4.432	4.945
Herbisitler	2.452	3.495	3.903	3.644	3.697	5.400	4.638
Mollusitler	5.6	2.1	2.5	3.3	1.8	6.7	11.0
Toplam	8.396	12.112	10.872	13.797	12.199	18.258	22.681

* Göztaşı ve toz kükürt dahil değildir.

2.7. Toksikite ve Toksikite Değerlendirme Yöntemleri

Su kirliliği değerlendirmelerinde fiziksel ya da kimyasal yöntemler tek başına su organizmaları üzerine kirleticilerin etkilerini değerlendiremediği için toksisite testleri gereklidir. Örneğin karmaşık bileşiklerin toksik etkileri ve kimyasal maddelerin sinerjik etkileri fiziksel ve kimyasal yöntemlerle belirlenememektedir (APHA, 1989; EPA, 1991).

Toksikite testleri, çevreye toksik deşarjların verilmesinin kontrol edilmesinde ve denetlenmesinde EPA (Environmental Protection Agency) tarafından önerilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, ekosistem kirleticilerini denetlemek ve kontrol etmek için kimyasal analizler ve biyolojik analizler zehirlilik testleri ile birlikte kullanılmalı tezini ortaya çıkarmıştır. (Gerbardt, 1998; Aruldoss and Viraraghavan, 1998). Huber (1979),

petrol rafineri atıksularının zehirliliğini belirlemek için yaptığı çalışmasında biyoanaliz sonuçları ile NH₃, gres yağı, BOİ (Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı) gibi klasik parametreler arasında bir korelasyon belirleyememiştir. II. Dünya Savaşı öncesi bazı araştırmacılar özellikle balıklarda metallerin toksik etkilerini incelemiştir. Savaş sonrası da özellikle İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da birçok toksisite laboratuvarları kurulmuştur.

Bazı Avrupa ülkeleri artan kimyasal madde atıklarından sonra toksisite çalışmalarına hızlı bir şekilde yönelmişlerdir. 1970'li yılların sonu ve 1980'li yılların başında toksisite çalışmaları artmış ve American Public Health Association (APHA), The American Society for Testing and Materials (ASTM), The U.S. Army Corps of Engineers of Materials the UK Ministry of Agriculture Fisheries And Food (MAFF), The Paris Commission (PAROCM), The Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) ve The Water Research Centre (WRC) gibi ulusal ve uluslararası kuruluşlar birçok standart metod geliştirmişlerdir (Bat ve Öztürk, 1998).

Toksisite testleri; su hayatı için çevre koşullarının uygunluğunu, atık toksisitesi üzerinde çevresel faktörlerin etkisini, test türü üzerine atığın toksisitesini, atıksu arıtım metodlarının etkisini, su kirliliği kontrolü çalışmalarında gerekli arıtım derecesini ve izin verilebilir atıksu deşarj oranlarını belirlemek için kullanılmaktadır. Ülkemizde atıksu deşarjlarını kontrol etmede kullanılan Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliğine göre ise sadece endüstri kuruluşları için müsaade edilebilir atık madde deşarj miktarını ve su kalite standartlarına uygunluğu belirlemek için toksisite testleri kullanılmaktadır (SKKY, 1991). Toksisite testleri; algler, planktonlar, kirpikli protozoalar, mercanlar, yumuşakçalar, halkalılar, Daphnia (su piresi), makro - kabuklular, su böcekleri, balıklar ve çeşitli sucul ve bahçe bitkileri gibi biyosensörlerle yapılmaktadır (APHA, 1989).

Çeşitli şartlar için biyoindikatör olarak kullanılan test organizmaları Çizelge 2.7.1'de verilmiştir. Farklı su organizmalarının aynı toksik maddelere hassaslıkları farklıdır ve hatta organizmalar aynı toksik maddeye yaşam döngüsü boyunca eşit derecede dayanıklı değildir. Eğer organizmalar daha önce zehirleyicilere maruz kaldıysa toleransı

değişebilmektedir. Vaal ve arkadaşları (2000), su organizmalarıyla yaptıkları toksisite çalışmalarında organizmaların farklı bileşiklere farklı tepki verdiğini ve organizmaların bazılarının belirli bileşiklere daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir.

Atıksularda zehirlilik testleri, laboratuvarlarda ya da doğal ortamlarda biyoindikatör organizmalar üzerindeki etkinin ölçülmesi şeklinde standardize edilmiştir (EPA 1991).

Çizelge 2.7.1. Standart toksisite testleri ve test organizmaları (Ford 1992).

Toksisite test tipi	Tatlı su organizmaları	Deniz organizmaları
Kronik	Alg (<i>Selenestrum Capricornutum</i>) <i>Ceriodaphnia Dubia</i> İribaş golyan (<i>Pimephales Promelas</i>)	Sheepshead minnow (<i>Cypronodon Variegatus</i>) Atlantik gümüş balığı (<i>Menidia Berylina</i>) Mysids (<i>Mysidopsis Bahia</i>) <i>Champia Parvula</i>
Akut	<i>Lepomis Macrochirus</i> <i>Ceriodaphnia Dubia</i> Su piresi (<i>Daphnia Pulex</i>) İribaş golyan (<i>Pimephales Promelas</i>) Gökkuşığı alabalığı (<i>Salmo Gairdneri</i>)	Gümüş balığı (<i>Menidia Menidia</i>) Grass shrimp (<i>Plaemonetes Pugio</i>) Atlantik gümüş balığı (<i>Menidia Berylina</i>) Mysids (<i>Mysidopsis Bahia</i>) Sheepshead minnow (<i>Cypronodon Variegatus</i>)

2.7.1. Enzim ve Mikroorganizma Kullanarak Toksikite Tayini

Atıksu arıtım tesislerinde mikrobiyal toksisite analiz uygulamaları 4 katagoriye ayrılmaktadır;

1. İlk katagori, toplam sistemdeki çeşitli noktalarda biriken atıksu toksisitesini izleme ve bu analizlerin kullanılmasını içermektedir. Hedef, toksikant etkiden biyolojik arıtım işleminin korunmasıdır. Bu görüntüleme testleri, toksikant kaynakların atıksu arıtım sistemine girişini belirlemede yardımcı olabilir.
2. İkinci katagori işlemdeki toksisite analizinin kullanılması endstriyel atıkların zehirsizleştirilmesi için ön işlem seçeneklerinin değerlendirilerek kontrol edilmesidir.
3. Üçüncü katagori kısa süreli mikrobiyal ve enzimatik analiz uygulamaları, atıksu ve çamur arıtımda kullanılan biyolojik işlemlerin toksik inhibisyonunu saptamaktır.
4. Son olarak sorun olan toksik kimyasalları belirlemede toksisite redüksiyon değerlendirme (toxicity reduction evaluation-TRE) ile hızlı analizlerin kullanılması ile ilgilidir.

Atıksu arıtma tesislerinde toksisite değerlendirilmesi için en sık kullanılan enzimatik ve mikrobiyal deneyleri; enzimatik analiz ve mikrobiyal biyoanaliz yöntemleridir (Bitton, 1994)

2.7.1.1. Enzimatik Analiz

Enzimler hayvan, bitki ve mikrobiyal hücrelerin biyolojik reaksiyonların katalizlenmesini sağlarlar. Toprakta iyi bilinen mikrobiyal populasyonların toksik kimyasalların ters etkisini belirlemek için enzimler kullanılır (Burns, 1982). Sucul çevrelerde bazı enzimler (dehidrogenaz gibi) mikrobiyal aktivite ile yakından ilişkilidir

(Dermer, et al., 1980). Kimyasal toksisitenin suda ve atıksuda basit enzimatik deneyler kullanarak uygun ve hızlı saptanabilmesi için küçültülüp otomatikleştirilebilir. Atıksu arıtım tesislerini de içine alan sucul çevrelerde birkaç değişik enzim (dehidrogenaz, ATPaz, fosfotaz, esteraz, üreaz, lusiferaz, β -galaktosidaz, glukosidaz) toksisite değerlendirilmesi için incelenmiştir. Çizelge 2.7.1.2.2.'de bulunan listede kısa süreli toksisite analizleri, enzim aktivitesi veya biyosentezine dayanır (Bitton, 1994).

Dehidrogenaz enzimleri atıksu arıtma işlemleri toksisite testlerinde en çok yararlanılan enzimlerdir. Dehidrogenaz aktivitesi, oksidoredüksiyon boyalarının örneğin; trifenil tetrazolium klorid (TTC), nitroblue tetrazolium (NBT), 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolium klorid (INT) veya resazurin, redüksiyonun ölçümü deneyidir. Bazı toksisite testleri atıksudaki dehidrogenaz aktivitesi inhibisyonuna dayanarak geliştirilmiştir (Bitton and Koopman, 1986).

Son gelişmelerde testler, kimyasalların inhibisyon etkileri enzim biyosentezi yerine enzim aktivitesine dayanır. Örneğin de nova biyosentezi *-Escherichia coli*'deki β -galaktozidazın biyosentezi enzim aktivitesine göre toksikantlara daha duyarlıdır (Dutton, et al., 1988; Reinhartz, et al., 1987). Toksi-kromotest ticari bir toksisite analizidir, *E.coli*'nin β -galaktosidaz biyosentezinde kimyasalların inhibisyon etkisine dayanır (Reinhartz, et al., 1987). Bununla birlikte enzim biyosentezi diğer analizlere (Örn. Microtox, *Ceriodaphnia dubia*) göre fazla hassas değildir ve atıksudaki atık veya tortu özünün toksisitesini değerlendirmek için kullanılır (Koopman, et al., 1988; Koopman, et al., 1989; Kwan and Dutka, 1990). *Bacillus licheniformis* α -glukosidazının biyosentezinde, kimyasalların inhibisyon etkisine dayanarak yapılan toksisite testi yüksek hassasiyet sağlamaktadır (Campbell, et al., 1993).

2.7.1.2. Mikrobiyal Biyoanaliz

Çevresel örneklerin toksisitesini belirlemek için bazı bakteriyel analizler uygundur (Bitton and Dutka, 1986). Bakteriyel analizlerin seçimi Çizelge 2.7.1.2.3.'de gösterilmektedir.

Toksik kimyasallar, biyolüminesent bakterilerin ışık ürünlerini tersine etkileyebilirler. Toksikite analizi olan ticarileştirilmiş adı ile Microtox analizinde, biyolüminesent deniz bakterisi olan *Photobacterium phosphoreum*'un donmuş-kuru kültürlerinden yararlanılmaktadır (Bulich, 1990). Şekil 2.7.1.2.1.'de Microtox cihazı model 500 toksisite analizi görülmektedir.

Bu test *P. phosphoreum*'un toksik kimyasallar tarafından inhibisyonuna dayanır. Mikrotox testi, atıksu atıklarının, kompleks endüstriyel atıkların (yağ rafinerileri, kağır ve kağıt hamuru gibi), fosil yakıt işlem suyu, çöküntü özütü, temiz arazi doldurma ve zararlı atık sızıntı suyunun toksisitesinin belirlenmesinde kullanılır (Munkittrick, et al., 1991). Bu analiz balıklarla, *Daphnia*, ve algal biyoanalizlerle birlikte iyi bağlantı gösterir (Logue, et al., 1990). Bununla birlikte toksik metallere karşı da çok hassas değildir. Microtox cihazı, atıksu veya içme suyu arıtım tesislerinde toksikantların girişinin doğrudan izlenmesi için yararlı olabilir (Levi, et al., 1989).



Şekil 2.7.1.2.1. Microtox cihazı model 500 toksisite analizeri

Toksisite testinde ayrı saf veya karışık bakteri kültürlerinin büyüme inhibisyonuna da dayanabilir (Trevors, 1986) Testler bakteriyel yoğunluk değişimlerini belirlemede katı büyüme ortamında veya ATP üzerinde bakteri süspansiyonlarının optik yoğunluk, inhibisyon zonlarının ölçümüyle oluşur.

Çizelge 2.7.1.2.2. Enzim aktivitesi veya Biyosentezine dayanan kısa süreli toksisite analizi (Bitton ve Koopman, 1992)

Enzim	Son Nokta Ölçümü	Yorumlar
Dehidrogenaz	INT veya TTC gibi boyaların oksidoredüksiyonunda redüksiyon ölçümü	Çoğunlukla su, atıksu, toprak ve tortu testleri
ATPaz	ATP bir substrat olarak kullanıldığında Fosfat konsantrasyonu ölçümü	İn vivo ve in vitro testlerde kullanılır.
Esteraz	Florosent olmayan substratların degradasyonunda floresent ürünlerin ölçümü	Organofosfotaz ve karbamatların asetilkolinesteraz duyarlılığı
Fosfotaz	İnorganik fosfatın veya substratın (fenol gibi) organik payının ölçümü	Topraktaki ağır metal toksisitesi
Üreaz	Üreden amonyak ölçümü	Genellikle toprakta çalışılmıştır.
Lusiferaz	Substrat olarak kullanılan ATP'nin ışık üretimi ölçümü	ATP-TOX biyoanalizi ile birlikte bakteri kültüründeki ATP seviyelerinin inhibisyonunda kullanılır
β -Galaktosidaz	o-nitrofenil- β -D-galaktosidin hidrolizinin ölçümü	Enzim aktivitesi ve biyosentezinde test edilen toksikant etkileri
α -Glukosidaz	p-nitrofenil- α -D-glukosid	Enzim biyosentez testlerinde toksikant etkileri
Trifosfotaz	Ehrlich ayıracına eklenip 568 nm absorbansta ölçümü	Enzim biyosentez testlerinde toksikant etkileri

Çizelge 2.7.1.2.3. Kısa Süreli Bakteriyal Toksisite Analizleri (Bitton and Koopman, 1992)

Analiz	Test için Kaynak
Microtox	<i>Photobacterium phosphoreum</i> 'un biyoluminisens inhibisyonu
<i>Spirillum volutans</i>	Toksikantların neden olduğu flegella demetlerinin dönüş koordinasyonlarının azalmasına eşlik eden hareketlilikteki azalma
Büyüme İnhibisyonu	Saf (örn. <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i>) veya karışık kültürlerin büyüme inhibisyonlarının ölçümü
Uygulanabilme Analizler	Agar plakada bulunan bakteri kültürlerinin toksikant etkilerine uygulanabilirliğinin ölçümü
ATP analizleri	Mikroorganizmalarda ATP basamaklarına toksik kimyasalların inhibisyon etkisi
ATP-TOX analizleri	Lusiferaz aktivitesinin inhibisyonu ve bakteri kültürlerinin, ATP ölçümleri tarafından, büyüme inhibisyonu testine dayanır.
Solunum Ölçümü	Çevresel örneklerde mikrobiyal solunuma toksikantların etkilerinin ölçümü
Toxi-Kromotest	<i>E. coli</i> 'de bulunan β -Galaktosidaz biyosentezinin inhibisyonuna dayanır.
α -Glukosidaz biyosentezi analizi	<i>Bacillus Licheniformis</i> 'te bulunan α -Galaktosidaz biyosentezinin inhibisyonuna dayanır.
Nitrobakter biyoanalizi	Nitratın nitrit oksidasyonu inhibisyonuna dayanır.
Mikrok calorimetre	Mikrobiyal toplulukların sıcaklık üretiminin azalışının ölçümü

2.8. Çalışmada Kullanılan Klorofenol: 4-Klorofenol

2.8.1. 4-Klorofenol Fiziksel Özellikleri

Moleküler formülü C_6H_5ClO olan 4-klorofenolün molekül ağırlığı 128,56 g/mol'dür. 4-klorofenol berrak sıvıdır. Hafif asidiktir ve suda çözünür. Erime sıcaklığı 43-45 °C, kaynama noktası ise 220 °C'dir. (online: <http://www.t3db.org/toxins/T3D0868>, erişim tarihi: 11/08/2010)

2.8.2. 4-Klorofenol Özellikleri ve Kullanım Alanları

Dezenfektan ajanı olarak kullanılan 4 veya para-klorofenol, para pozisyonunda bir klor atomuna sahip bir monoklorofenoldür.

4-klorofenol; böcek, ot ilaçları, koruyucular, antiseptikler ve dezenfektanların sentez için bir ara ürün olarak kullanılır. Bu kimyasallar ilaç, boya, aromatik bileşikler ve diğer organik bileşiklerin yapımında da kullanılırlar. Ayrıca kömürden sülfür ve azot bileşiklerini ayıklamak için çözücü olarak da kullanılır. (online:<http://www.chemicaland21.com/industrialchem/organic/pCHLOROPHENOL.htm>, erişim tarihi: 11/08/2010)

2.8.3. 4-Klorofenol İnsan Sağlığına Etkisi

Toksik etkisi bulunan 4-klorofenolün minimum risk düzeyi 0,01 (mg / kg / gün)'dür. İnsanlara soluma yolu ile kirlenmiş içme sularından veya deri ve göz temasından bulaşabilmektedir.

Kanser oluşturma riski olan 4-klorofenol epitel dokuda tahriş edicidir. Kornea ile temas halinde hafif kızarıklık ile şiddetli korozyon sonucu kan toplanmasına kadar etki gösterebilir. Havadan solunma halinde akciğerlerde kanamaya ve hızlı soluklanmaya neden olabilir. Ağızdan buluşma durumunda titreme, kronik kasılma havaleleri, vücut duruşunda eğilme, kamburlaşma, nefes darlığı ve koma gibi çok çeşitli sinirsel etkileri görülebilmektedir (online:<http://www.t3db.org/toxins/T3D0868>, erişim tarihi: 11/08/2010)

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Mikroorganizma ve Kültür Koşulları

Çalışmalarda, *Trametes versicolor* ATCC (200801) kullanılmıştır. Kültürler çalışma süresince ve sonrasında potato destroz agarda (PDA-Acumedica) +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Stok kültürlerden yatık PDA besiyerlerine ekim yapılarak 30 °C'de 12 gün inkübasyona bırakılmış ve bu kültürler aşılama için aktif kültürler olarak kullanılmıştır. Kültürün yüzeyinden kazıma ile distile su içerisine alınan miseller toplam 40 ml hacimde homojenizatör ile (Heidolph) homojenize edilmiştir. Homojenizattan 3 ml alınarak buğday kepeği ilaveli (3 gr/100 ml) potato destroz broth (PDB) besiyerine ilaveleri yapılarak indüklenmiştir (Gedikli, 2008).

3.2. Lakkaz Aktivitesinin Ölçümü

Lakkaz aktivitesi ölçümünde Coll ve arkadaşlarının (1993) belirttiği yöntem izlenmiştir. Lakkaz aktivitesi ölçümü için tepkime tüplerinde toplam hacim 5 ml olacak şekilde substrat olarak 4,9 ml ve 1 mM guaiakol içeren 50 mM Sodyum asetat tamponu (pH 4,5) ve enzim kaynağı olarak 0,1 ml kültür süpernatantı kullanılmıştır. 37 °C'de 15 dakika inkübasyondan sonra 465 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Schimadzu 2450 UV Vis-spectrophotometer) absorbans ölçülmüştür (Coll, et. al., 1993).

Çalışmada, 37 °C, 1 dakika, 465 nm dalga boyunda absorbansı 0,1 birim arttıran enzim aktivitesi 1 Unit aktivite olarak tanımlanmıştır.

3.3. Serbest Klor Ölçümleri

Deklorinasyon çalışmalarında yapılan klor ölçümleri literatürde civa tiyosiyanat yöntemi olarak bilinen ve serbest klor ölçümüne dayanan bir yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre, 9 M (100 ml) HNO₃, 0,25 M (100 ml) Fe(NH₄)(SO₄)₂.12H₂O ve doymuş Hg(SCN₂) çözeltileri hazırlanmıştır (Greenberg, 1992).

3.4. Çözünmüş Oksijen Ölçümleri

Deklorinasyon koşullarının optimizasyonu çalışmalarında elde edilen veriler sabit tutularak deklorinasyona paralel olarak ortamda tüketilen oksijen miktarı (Jenway 9071 Model) oksijen metre ile ölçülerek takip edilmiştir. Kültür sıvısında bulunabilecek herhangi bir peroksidaz enzim aktivitesini engellemek amacıyla reaksiyon ortamına katalaz ilavesi yapılmıştır.

3.5. Deklorinasyon Çalışmaları

3.5.1. Deklorinasyon Çalışmalarında Kullanılan Biyoreaktörün Özellikleri

Enzimatik deklorinasyon çalışmaları için gerekli olan biyoreaktör, reaktör kabı, karıştırıcılı-ısıtıcı sistem, ısı kontrollü su banyosundan oluşmaktadır. Bu çalışmada Ünal, (2004) tarafından tasarlanan biyoreaktör kullanılmıştır. Biyoreaktör kabı borosilikat camdan yapılmış ve toplam çalışma hacmi 100 ml'dir. Karıştırıcılı-ısıtıcı sistem ise dijital ısıtıcılı tablası olan ve reaktör kabının içine yerleştirildiği su banyosunda sıcaklık probu ile sıcaklık kontrolü yapabilen termostatlı bir manyetik karıştırıcıdan oluşmaktadır. Tüm optimizasyon çalışmalarında denatüre enzim konularak kontrol grupları oluşturulmuş, elde

edilen sonuçlar kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Tüm deneyler en az 2 tekrarlı ve birbirinden bağımsız olarak yapılmıştır.

3.6. Biyoreaktörde Deklorinasyon İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında 4-Klorofenol bileşiğinden klor uzaklaştırılmasında ham lakkaz enziminin etkinliği araştırılmıştır. Klor uzaklaştırılması için en uygun koşulların belirlenmesi amacıyla pH değeri, substrat konsantrasyonu, sıcaklık, enzim konsantrasyonu ve inkübasyon süresi denenmiştir. Denemelerde enzim kaynağı olarak buğday kepeği ilaveli PDB'de *T. versicolor* ile üretilen yüksek aktiviteli lakkaz enzimi kullanılmıştır. Tüm optimizasyon çalışmalarında denatüre enzim ile kontrol grupları oluşturulmuş ve elde edilen sonuçlar kontrol grupları ile kıyaslanmıştır. Deneyler 2 tekrarlı ve birbirinden bağımsız çalışmalar şeklinde yapılmıştır.

3.6.1. Ortam pH Değerinin Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

Ortam pH değerinin enzimatik deklorinasyona etkisini incelemek amacıyla çeşitli tampon çözeltilerle farklı pH'larda ortamlar hazırlanmıştır ve pH 3 ile 10 aralığında değiştirilmiştir. Tampon pH'lar için; pH 3,0-5,0 için 0.2 M asetat tamponu, pH 6,0-8,0 için 0.2 M fosfat tamponu, pH 9,0-10,0 için ise 0.2 M Tris-HCL tamponları seçilmiş ve kullanılmıştır. Bu deneyler sırasında reaktördeki reaksiyon hacmi 100 ml, klorofenolik bileşik (4-klorofenol) konsantrasyonu 150 µM, serbest enzim miktarı 1 ml ve deklorinasyon süresi 30 dakika, ortam sıcaklığı 30±1 °C'de sabit tutulmuştur. Klorofenolik bileşiklerin çözünürlüğünü sağlamak için ortalama %1 v/v etanol ilave edilmiştir.

3.6.2. Substrat Konsantrasyonunun Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

Substrat konsantrasyonunun enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla klorofenolik bileşik (4-klorofenol) konsantrasyonu 50-500 μM arasında değiştirilmiştir. Substrat konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi sırasında diğer koşullar; deneyler sırasında daha önce optimum değer olarak belirlenen pH 4, reaksiyon hacmi 100 ml, serbest enzim miktarı 1 ml, ortam sıcaklığı 30 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulmuştur. Klorofenolik bileşiklerin çözünürlüğünü sağlamak için ortalama %1v/v etanol ilave edilmiştir.

3.6.3. Enzim Aktivitesinin Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

Enzim aktivitesinin enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla 0,5 ile 4,0 ml aralığında değişen farklı miktarlardaki ham lakkaz enzimi, klorofenolik bileşik olan 4-klorofenolle muamele edilmiştir. Deneyler sırasında daha önceki çalışmalarda optimum olarak seçilen pH 4 ve başlangıç substrat konsantrasyonu 200 μM olarak sabit tutulmuştur. Enzim miktarının etkisinin belirlenmesi sırasında diğer koşullar ise, reaksiyon hacmi 100 ml, deklorinasyon süresi 30 dk, ortam sıcaklığı 30°C 'dir. Klorofenolik bileşiklerin çözünürlüğünü sağlamak için ortama %1v/v oranında etanol ilave edilmiştir.

3.6.4. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

İnkübasyon süresinin enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla klorofenolik bileşik (4-klorofenol) içeren ortamdan 0-120 dk süreler arasında örnekler alınarak ölçüm yapıldı. Deneyler sırasında pH 4, başlangıç substrat konsantrasyonu 200 μM , enzim miktarı 4 ml olarak sabit tutulmuştur. Bu değerler optimum olarak daha önceki çalışmalarda belirlenen değerlerdir. Diğer parametreler ise, reaksiyon hacmi 100 ml, ortam

sıcaklığı 30°C'dir. Klorofenolik bileşiklerin çözünürlüğünü sağlamak için ortama %1 v/v oranında etanol ilave edilmiştir.

3.6.5. Ortam Sıcaklığının Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

Ortam sıcaklığının enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla 10 °C ile 50 °C aralığında değişen farklı sıcaklık değerlerinde çalışılmıştır. Deneyler sırasında pH 4, başlangıç substrat konsantrasyonu 200 µM, enzim miktarı 4 ml, deklorinasyon süresi 30 dk, reaksiyon hacmi 100 ml koşullarında çalışılmıştır. Klorofenolik bileşiklerin çözünürlüğünü sağlamak için %1v/v etanol ilave edilmiştir.

3.7. İstatiksel Analizler

Tüm optimizasyon çalışmalarında elde edilen grupların ortalamaları varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. Farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için posthoc olarak Tukey testi kullanılmıştır.

3.8. Toksikite Çalışmaları

Çevresel açıdan kirletici, toksik ve uzun süre bulunduğu ortamda etkisini koruyabilen bir bileşik olan 4-klorofenol'ün, lakkaz enzimiyle biyoyıkımı hedeflenmiştir. Biyolojik yıkım çalışmaları yukarıda bahsedildiği biçimde sistematik olarak gerçekleştirilmiş ve tüm kirleticilerin hem yıkım öncesinde ve hem de yıkım çalışmaları sonrasında toksisitelerindeki değişim yapılan ölçümlerle takip edilmiştir. Toksikite ölçümleri *Vibrio fisheri*'nin sahip olduğu lusiferaz enzimi ile gerçekleştireceği ışımının ölçümüne dayanan mikrotoksikite test cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Böylece yıkıma

uğratılan 4-klorofenol'un aynı zamanda toksisitesindeki değişim literatürde kabul gören standart bir yöntem ile belirlenmiş ve takip edilmiştir.

3.9. FT-IR Analizleri

Klor uzaklaştıma işlemi öncesi ve sonrası FTIR analizleri yapılmıştır. Sıvı örnekler ve KBr sıvı hücrelerine 10 µl emdirilmiştir. Analizler, KBr sıvı hücrelerinde Perkin Elmer FT-IR 100 spektrometer'da gerçekleştirilmiştir. FTIR analizleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Moleküler Sentezleme ve FTR Spektroskopi Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

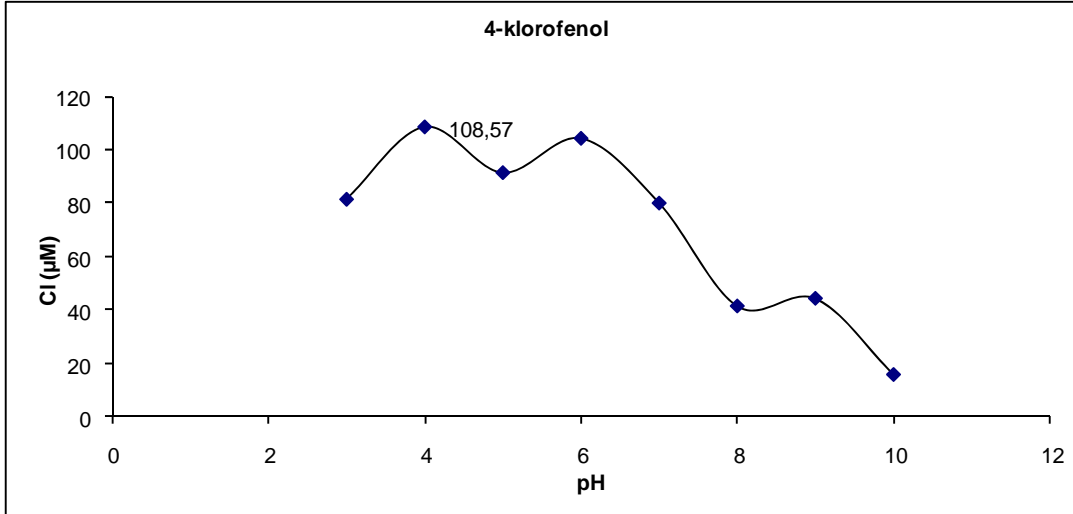
4. BULGULAR

4.1. *Trametes versicolor*'dan Elde Edilen Lakkaz Enzimi İle 4-Klorofenol Deklorinasyonu İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi

4.1.1. pH'ın 4-klorofenol Deklorinasyonuna Etkisi

4-klorofenolden klor uzaklaştırılmasında pH'ın etkisini belirlemek için geniş bir pH aralığında yapılan çalışmalar sonucunda en uygun değerin pH 4 olduğu görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.1.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1.1.1. Lakkaz enzimi ile 4-klorofenolden klor uzaklaştırılmasında ortam pH değerinin etkisi. (Çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu 150 µM; enzim aktivitesi 22.792U/ml; enzim miktarı 1 ml; sıcaklık 30 °C)

4.1.1.1. pH Değerlerinin İstatiksel İncelenmesi

pH değerleri arasındaki farka bakıldığında sig değerinin 0,05'ten küçük olması (0,000 < 0,05) nedeni ile pH değerleri arasındaki fark anlamlıdır denilir.

Çizelge 4.1.1.1.1. pH Değerinin Anova Testi ile İstatiksel Değerlendirilmesi

ANOVA

PH

	Karesel YanılgıToplamı	df	Ortalama Kare	F	Sig.
Gruplar arasında	15548,971	7	2221,282	19,971	,000
Gruplar Dahilinde	889,795	8	111,224		
Toplam	16438,765	15			

PH

VAR00001	N	Alfa için altkümeler= .05			
		1	2	3	
Tukey HSD ^a	8,00	2	16,4286		
	6,00	2	41,4286	41,4286	
	7,00	2	43,5715	43,5715	
	5,00	2		80,7143	
	1,00	2		81,4286	
	3,00	2		92,1429	
	4,00	2		104,2857	
	2,00	2		108,5714	
	Sig.		,286	,062	,264

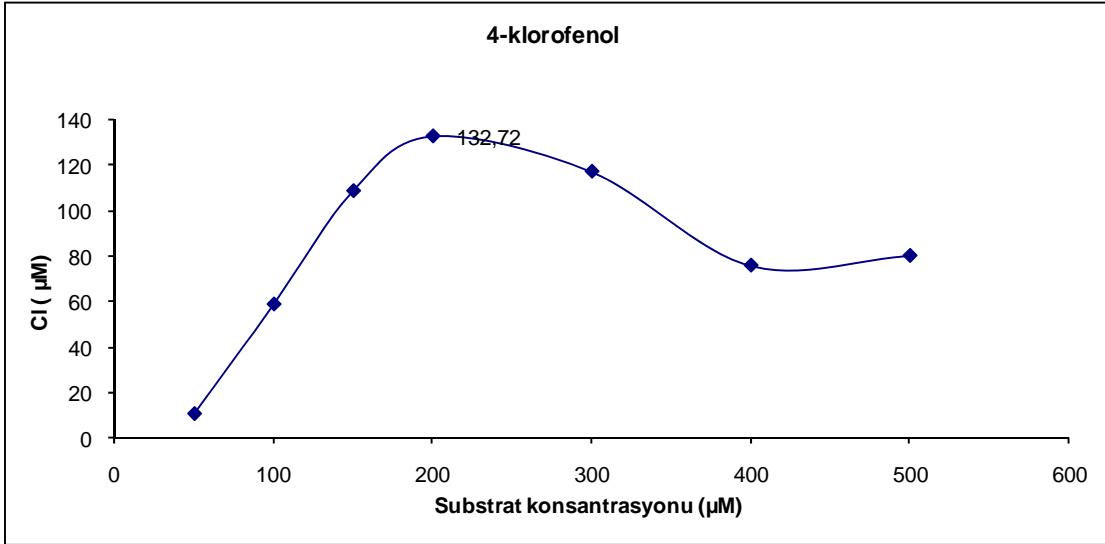
Gruplar için homojen altkümelerin anlamları gösterilmiştir.

a. Harmonik ortalama için kullanılan örnek boyutu= 2,000.

4.1.2 Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun 4-klorofenol Deklorinasyonuna Etkisi

4-klorofenolden fenol uzaklaştırmasında başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneysel çalışmanın sonucunda en uygun başlangıç

substrat konsantrasyonu 200 μM olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.1.2.1 'de verilmiştir.



Şekil 4.1.2.1. Lakkaz enzimiyle 4-klorofenolden fenol uzaklaştırmasında başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4; enzim aktivitesi 22.792U/ml; enzim miktarı 1ml; sıcaklık 30 °C)

4.1.2.1. Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun İstatiksel Değerlendirilmesi

Substrat değerleri arasındaki farka bakıldığında sig değerinin 0,05'ten küçük olması ($0,000 < 0,05$) nedeni ile Substrat değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur denilir.

(Çizelge 4.1.2.1.1)

Çizelge 4.1.2.1.1. Başlangıç substrat konsantrasyonunun deklorasyona etkisinin anova testi ile değerlendirilmesi

ANOVA

SUBSTRAT

	Karesel Yanılgı Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Sig.
Gruplar arasında	20423,448	6	3403,908	30,091	,000
Gruplar dahilinde	791,838	7	113,120		
Toplam	21215,286	13			

SUBSTRAT

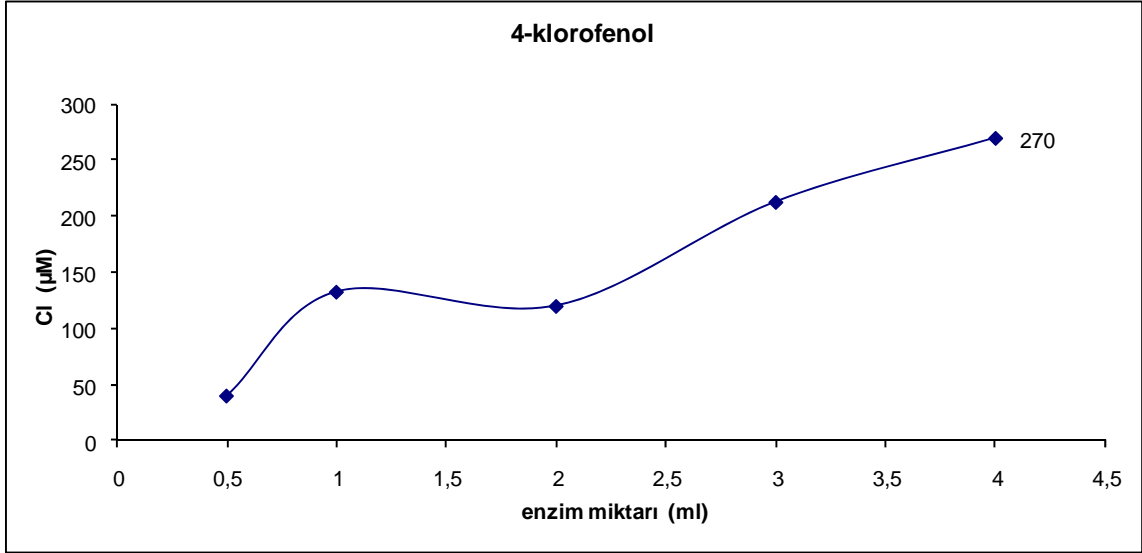
VAR00003	N	Alfa için Altkümeler = .05			
		1	2	3	4
Tukey HSD ^a 1,00	2	10,2600			
2,00	2		58,5714		
6,00	2		76,4286	76,4286	
7,00	2		80,7144	80,7144	
3,00	2			108,5714	108,5714
5,00	2			117,1429	117,1429
4,00	2				132,5715
Sig.		1,000	,447	,059	,372

Gruplar için homojen altkümelerin anlamları gösterilmiştir.

a. Harmonik ortalama için kullanılan örnek boyutu= 2,000

4.1.3. Enzim Miktarının 4-klorofenolün Deklorasyonuna Etkisi

Enzim miktarının enzimatik deklorasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı miktarlarda enzim kullanılarak yapılan çalışmanın sonucunda enzim miktarı 4 ml olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.1.3.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1.3.1. Lakkaz enzimiyle 4-klorofenolden klor uzaklaştırmasında enzim miktarının etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4; başlangıç substrat konsantrasyonu 200 µM; enzim aktivitesi 22.792U/ml; sıcaklık 30 °C)

4.1.3.1. Enzim Miktarının İstatiksel Değerlendirilmesi

Enzim miktarı değerleri arasındaki farka bakıldığında sig değerinin 0,05'ten ($0,007 < 0,05$) küçük olması nedeni ile Enzim miktarı değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur denilebilir. (Çizelge 4.1.3.1.1)

Çizelge 4.1.3.1.1. Enzim miktarının deklorinyasyona etkisinin anova testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi

ANOVA

Enzim Miktarı

	Karesel Yanılgı Toplamı	df	Ortalama kare	F	Sig.
Gruplar arasında	63038,116	4	15759,529	13,830	,007
Gruplar dahilinde	5697,737	5	1139,547		
Toplam	68735,853	9			

emiktari

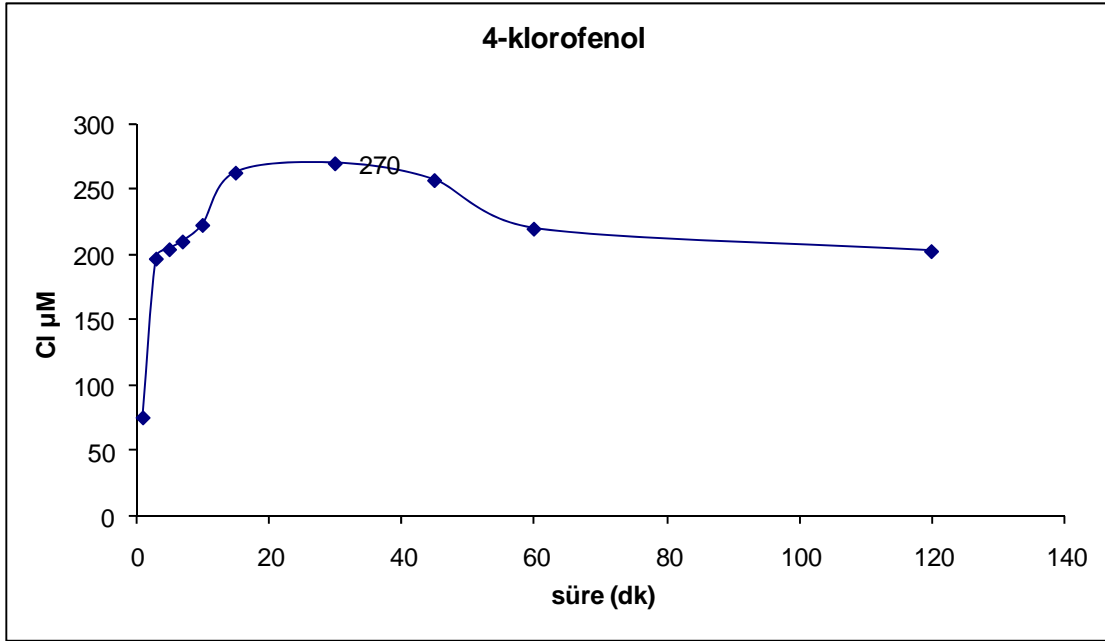
VAR00005	N	Alfa için altkümeler = .05		
		1	2	3
Tukey HSD ^a 1,00	2	40,7143		
3,00	2	120,0000	120,0000	
2,00	2	132,7200	132,7200	
4,00	2		212,8571	212,8571
5,00	2			270,7143
Sig.		,180	,175	,500

Gruplar için homojen altkümelerin anlamları gösterilmiştir.

a. Harmonik ortalama için kullanılan örnek boyutu= 2,000

4.1.4. İnkübasyon Süresinin 4-klorofenol Deklorinasyonuna Etkisi

İnkübasyon süresinin 4-klorofenolden klor uzaklaşmasına olan etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda en uygun süre 30 dk olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1.4.1. Lakkaz enzimiyle 4-klorofenolden klor uzaklaştırılmasında inkübasyon süresinin etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4; başlangıç substrat konsantrasyonu 200 µM; enzim miktarı 4 ml; enzim aktivitesi 22.792U/ml; sıcaklık 30 °C)

4.1.4.1. İnkübasyon Süresinin İstatiksel Değerlendirilmesi

Süre değerleri arasındaki farka bakıldığında sig değerinin 0,05'ten ($0,015 < 0,05$) küçük olması nedeni ile Süre değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur denilir. (Çizelge 4.1.4.1.1)

Çizelge 4.1.4.1.1. İnkübasyon süresinin deklorinyona etkisinin anova testi ile değerlendirilmesi

ANOVA

SÜRE

	Karesel Yanılgı Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Sig.
Gruplar arasında	52673,573	9	5852,619	4,440	,015
Gruplar dahilinde	13180,980	10	1318,098		
Toplam	65854,553	19			

SÜRE

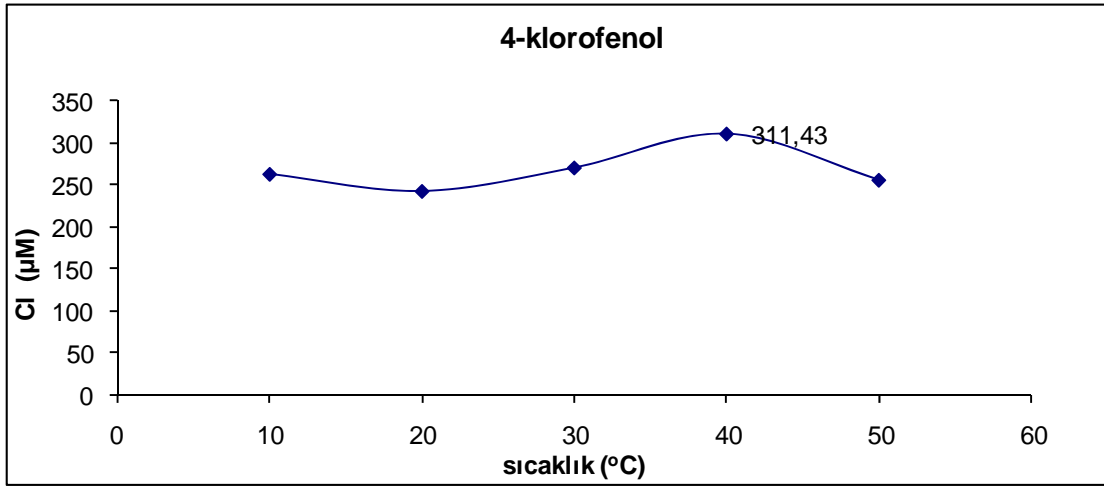
VAR00007	N	Alfa için Altkümeler = .05	
		1	2
Tukey HSD	1,00	2	75,7143
	2,00	2	197,1429
	10,00	2	203,5714
	3,00	2	205,0000
	4,00	2	210,7143
	9,00	2	220,7143
	5,00	2	223,5714
	8,00	2	257,1429
	6,00	2	262,8571
	7,00	2	262,8572
	Sig		,071

Gruplar için homojen altkümelerin anlamları gösterilmiştir.

- a. Harmonik ortalama için kullanılan örnek boyutu= 2,000

4.1.5. Sıcaklığın 4-klorofenol Deklorinasyonuna Etkisi

Sıcaklığın 4-klorofenolün enzimatik deklorinasyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda optimum sıcaklık 40 °C olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.5.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1.5.1. Lakkaz enzimiyle 4-klorofenolden klor uzaklaştırmasında sıcaklığın etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4; başlangıç substrat konsantrasyonu 200 µM; enzim miktarı 4 ml; enzim aktivitesi 22.792U/ml; süre 30 dk)

4.1.5.1. Sıcaklığın İstatiksel Değerlendirilmesi

Sıcaklık değerleri arasındaki farka bakıldığında sig değerinin 0,05’ten büyük olması (0,176>0,05) nedeni ile sıcaklık değerleri arasındaki fark anlamsızdır denilir. (Çizelge 4.1.5.1.1)

Çizelge 4.1.5.1.1. Sıcaklığın deklorasyona etkisinin anova testi ile değerlendirilmesi**ANOVA****SICAKLIK**

	Karesel Yanılgı Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Sig.
Gruplar arasında	5399,706	4	1349,927	2,450	,176
Gruplar dahilinde	2754,940	5	550,988		
Toplam	8154,646	9			

SICAKLIK

		Alfa için Altkümeler = .05	
VAR00009		N	1
Tukey HSD	2,00	2	242,8571
	5,00	2	255,7143
	1,00	2	262,8571
	3,00	2	270,5715
	4,00	2	311,4286
	Sig.		,147

Gruplar için homojen altkümelerin anlamları gösterilmiştir.

a. Harmonik ortalama için kullanılan örnek boyutu= 2,000

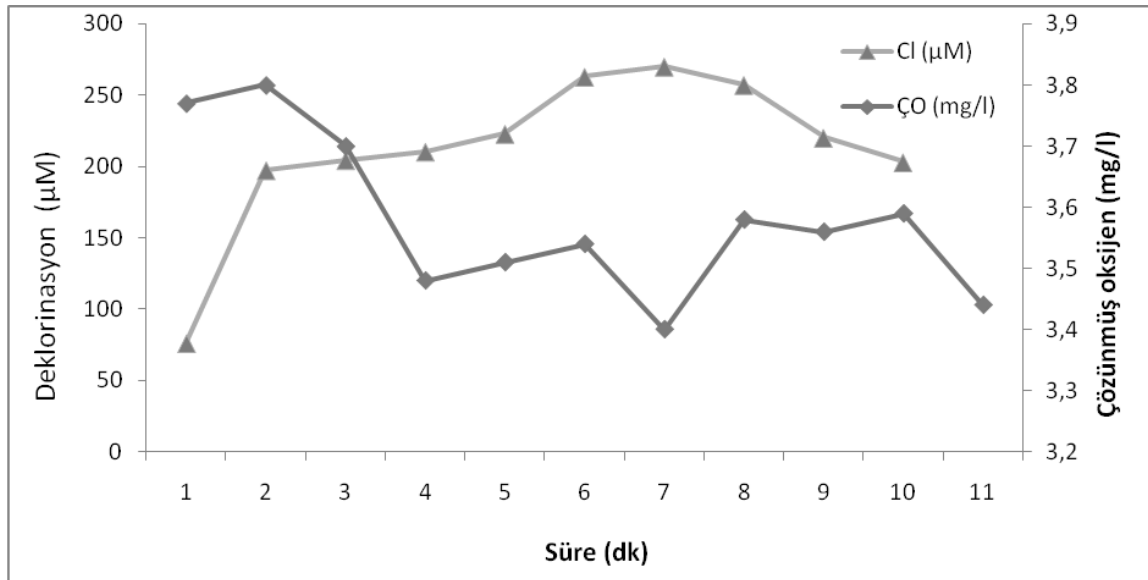
4.1.6. Deklorasyon Süresince Belirlenen Optimum Koşullarda Oksijen Tüketiminin Belirlenmesi

4-klorofenol bileşiğinin lakkaz enzimi ile deklorasyon sürecinde ortamda bulunan çözülmüş oksijen miktarındaki değişim takip edilmiştir.

Enzimatik klor uzaklaştırılması sürecinde ortamdaki çözülmüş oksijen miktarındaki değişim, çözülmüş oksijen probu ile takip edilmiştir. Enzim miktarı 1 ml olacak şekilde

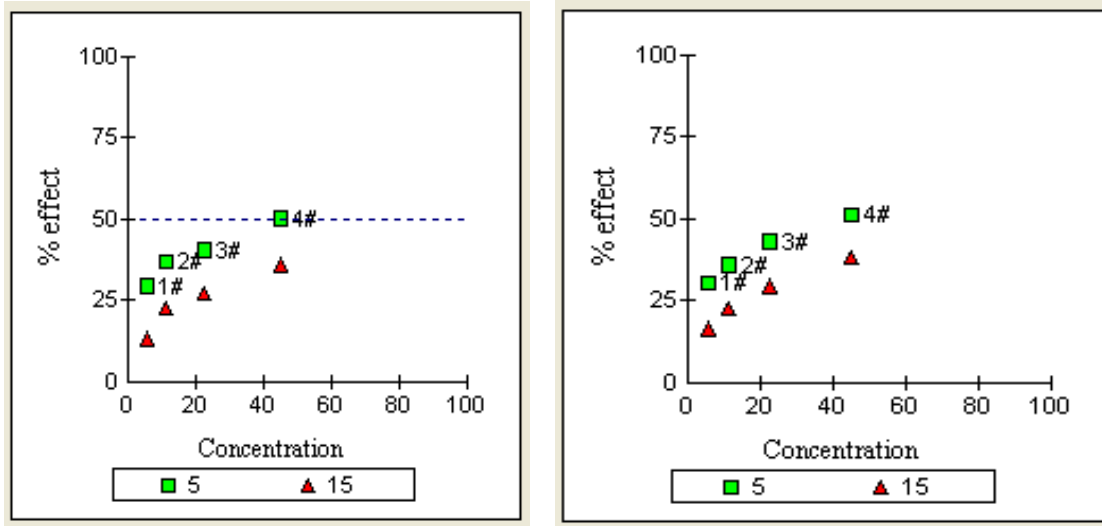
diğer uygun koşullar sabit tutularak (Çalışma koşulları: pH 4; başlangıç substrat konsantrasyonu 200 μM ; sıcaklık 40 $^{\circ}\text{C}$; enzim aktivitesi 22.792U/ml; süre 10 dk) 4-klorofenol bileşiğinin lakkaz enzimi ile deklorinasyonları sürecinde ortamda bulunan çözünmüş oksijen miktarındaki değişim takip edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında enzim miktarı daha önce belirtildiği gibi 4 ml olarak belirlenmiştir. Ancak, reaksiyon ortamında beklenildiği üzere oksijen tüketimindeki değişimi görebilmek ve reaksiyon ortamını daha az seyreltmek için bu çalışmada enzim miktarı 1 ml olarak sabit tutulmuştur. Süre olarak da bu klorlu bileşiğin deklorinasyonu için optimum değer 30 dakika bulunmuş olmasına rağmen eş zamanlı oksijen ve klor ölçüm takibi 10 dakika süresince gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Şekil 4.1.6.2.'de verilmektedir.

Grafikten de görülebileceği gibi, 4-klorofenol bileşiği için deklorinasyon arttıkça oksijenin tüketildiği görülmektedir. Lakkaz enziminin aktivite gösterebilmesi için ortamda çözünmüş oksijene gereksinim duymaktadır. Bu nedenle reaksiyon ilerledikçe ortamdaki oksijen miktarı azalmaktadır.



Şekil 4.1.6.2. Lakkaz enzimi ile 4-klorofenol'den klor uzaklaşması sırasında ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki değişim (çalışma koşulları: pH 4, 200 μM başlangıç substrat konsantrasyonu; sıcaklık 40 $^{\circ}\text{C}$; enzim aktivitesi 22.792U/ml; enzim miktarı 4 ml)

4.2. Toksikite Sonuçları



(1.)

(2.)

Şekil 4.2.1. 4-Klorofenol'ün toksisite değeri. (1.) enzimatik deklorinasyondan önce (2.) enzimatik deklorinasyondan sonra

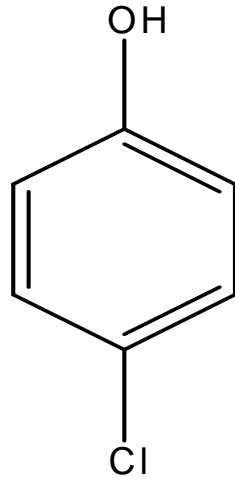
Çizelge 4.2.1 4-Klorofenol'ün bileşiklerin deklorinasyon öncesi ve sonrası EC_{50} değerleri

	5. dakikadaki EC_{50}		15. dakikadaki EC_{50}	
	Deklorinasyon öncesi	Deklorinasyon sonrası	Deklorinasyon öncesi	Deklorinasyon sonrası
4-Klorofenol	%46	%41	%105	%108

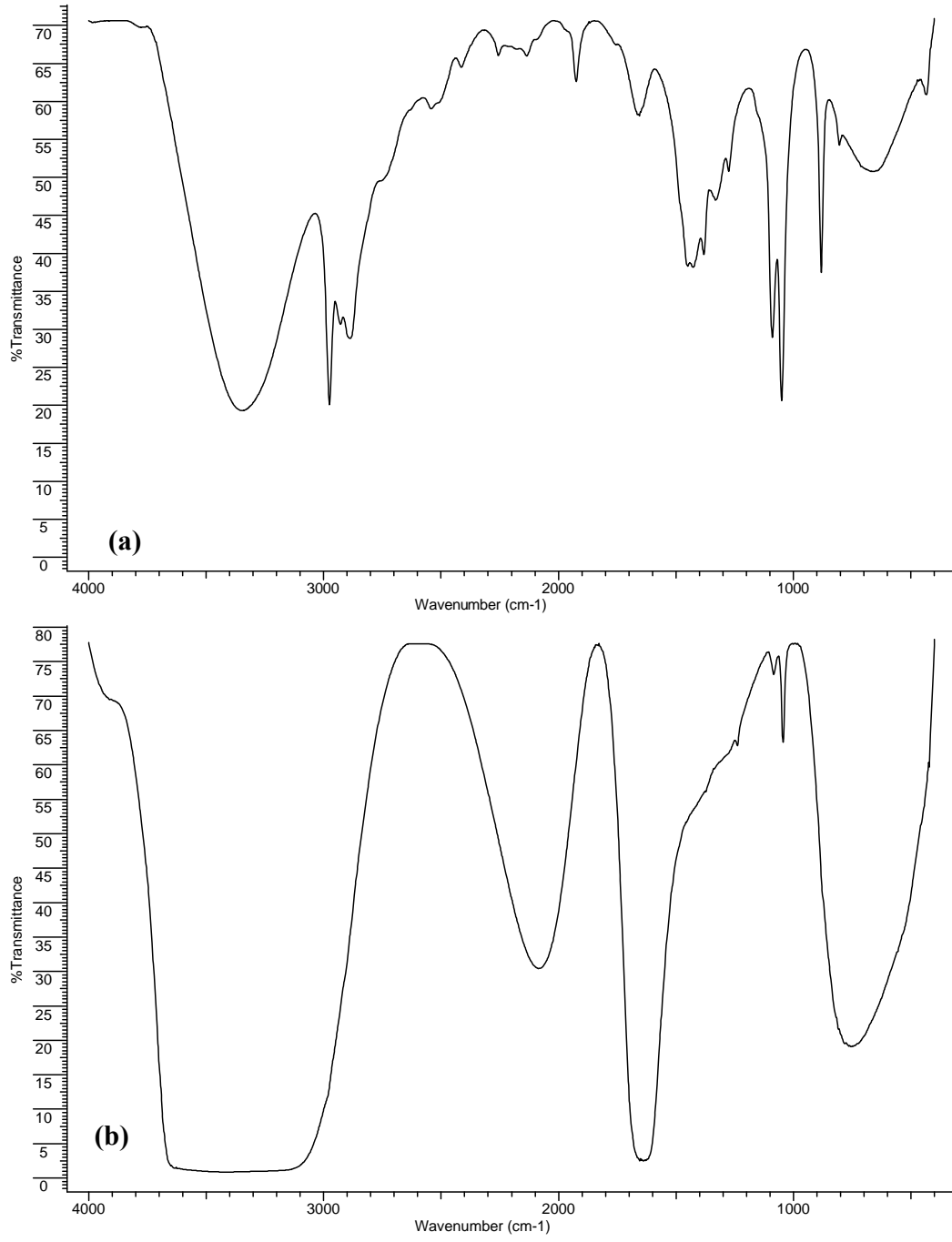
Bu çalışma ile elde edilen veriler göstermektedir ki *T. versicolor* (ATCC 200801)'den elde edilen lakkaz enzimi ile 4-klorofenol bileşiğinin etkin olarak klor uzaklaştırılması yapılabilmektedir. Uygun koşullar sırası ile 30 dakika, pH 4,0, 200 μ M başlangıç substrat konsantrasyonu, 40 °C sıcaklık ve 4 ml enzim miktarıdır. Belirlenen

uygun koşullar altında mikrotoksisite sonuçlarına bakıldığında toksisitedeki %3 oranında düşüş gözlenmiştir.

4.3. 4-Klorofenol Molekülünün FT-IR Titreşim Spektrumları



Şekil 4.3.1. 4-klorofenolün molekülünün 2 boyutlu yapısı



Şekil 4.3.2. 4-Klorofenol molekülünün IR titreşim spektrumları (a) 4-Klorofenol'ün etanol çözücüsündeki spektrumu, (b) 4- Klorofenol'ün bozunduktan sonra spektrumu.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Teknolojinin ve endüstrinin gelişimine paralel olarak çevresel kirleticilerin kullanımı ve bu kirleticilerin canlılar üzerine oluşturdukları toksik etkiler artış göstermektedir. Bu toksik etkileri azaltıcı veya tamamen detoksifiye edebilme özellikleri olan mikroorganizmaların enzim ve enzim sistemleri bu aşamada önem kazanmaktadır. Belirli organizma grupları sahip oldukları geniş substrat özgüllüğü gösteren enzim ve ilişkili sistemleri ile önemli faydalar sunmaktadır. Bu organizmalar arasında bakterilerden *Pseudomonas* genusu ve funguslardan *Bacidiomycetes* üyelerinin saf kültür veya bir konsorsiyum halinde kullanılmasıyla pek çok çevresel kirleticiyi yıkıma uğratma yetenekleri araştırmacılar tarafından belirlenmiştir.

Bacidiomycetes üyeleri ve özellikle beyaz çürükçül funguslar pestisit ve trinitrotoluen (TNT) içeren atıksu deşarjları ve kağıt endüstrisi tarafından üretilen klorlanmış lignin atıkları gibi çeşitli karmaşık fenol içeren bileşikler parçalamakta da kullanılmaktadırlar. Bu funguslar lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz gibi sekonder metabolitleri aracılığıyla polisiklik aromatik, poliklorlanmış bifenil ve dioksin bileşiklerini hatta DDT'yi ve birçok klorlu fenolik bileşikler parçalayabilmektedirler. Bu özellikleri nedeniyle *Basidiomycete* üyeleri, araştırmacıların yoğun olarak çalışmalarını sürdürdükleri ve literatürde sıklıkla karşılaşılan ve çevresel uygulamalarda da karşımıza çıkmaktadır. Bunların başında *Phanerochetae chrysosporium* ve *Trametes versicolor* gelmektedir. Çevrede bulunan ve/veya yeni sentezlenen ve kullanılan pek çok çevresel kirletici söz konusu organizmaların sahip oldukları çeşitli enzim sistemleri aracılığıyla parçalanabilmektedir (Shah, et. al., 1992; Arısoy ve Kolankaya, 1997; Taşpınar ve Kolankaya, 1998; Yeşilada vd., 1998; Tuomela, et. al., 2000; Ünal ve Kolankaya, 2001; Lara, et. al., 2003; Çabuk vd., 2006; Leitao, et. al., 2007; Tabak, 2008)

Klor, organik bileşiklerle kompleks oluşturduğunda ortaya çıkan klorlu organik bileşik toksik özellik kazanır. Klorun organik bileşiklerin yapısına girmesiyle ortaya çıkan diğer bir özelliği de klorun yapısında bulunan organik bileşiğin rekalsitrant (biyolojik

yıkıma karşı dayanıklı) bir nitelik kazanması ve elektron alma potansiyelinin artmasıdır. Klorlu organik bileşikte organik molekülün aromatik yapıda olması durumunda rekalsitran özellik daha fazla artar. Tarım zararlıları ile mücadelede kullanılan klorlu organik bileşiklerin klorlu aromatik yapıda olanları, kullandıkları doğal ortamlarda çok daha uzun süre yıkılmadan kalabilmektedirler (Matsumura, 1985). Klorlu bileşiklerin oluşturduğu polimer yapılar (PVC gibi) doğal koşullarda uzun süre kalabilme özelliği gösterirler. Birçok klorlu aromatik yapının rekalsitran ve toksik özelliklerinin yanı sıra mutajenik ve kanserojen özellikleri de bulunduğu gösterilmiştir (Shoham, et. al., 1992). Ayrıca bu bileşiklerin lipofilik karakterde olmaları da klorlu aromatik bileşiklerin yağ dokularında birikim göstermelerinin nedenini oluşturmaktadır.

Günümüzde klorlu aromatik bileşiklerin klor giderimini amaçlayan birçok araştırma yapılmaktadır (Bergbauer, et. al., 1991). Bu çalışmalarda özellikle farklı fungusların klor gideriminde etkin oldukları gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda toksik klorofenolik bileşik olan 4-klorofenolün lakkaz enzimi ile deklorasyonu ve enzimatik işlem sonrası toksisite değişiminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Toksisite değişimi, *Vibrio fischeri* mikrotoksosite testiyle tayin edilmiş ve enzimatik deklorasyon sonrası toksisitede çok az bir artış gözlenmiştir.

Çalışmamızda deklorasyon katalizörü olarak kullanılan lakkaz enzimi fenoloksidaz grubu enzimler içinde yer alıp, aktif radikallerin oluşumunu katalizleyen bir enzimdir. Lakkaz enziminin çeşitli mikroorganizmalarda bulunduğu gösterilmişse de, lakkaz sentezi açısından en zengin mikroorganizma grubunu beyaz çürükçül fungusların oluşturduğu bilinmektedir. Bu grup içinde *Trametes versicolor* lakkaz aktivitesi gerektiren birçok çalışmada enzim kaynağı olarak kullanılmıştır (Arcand and Archibald, 1991). Çalışmamızda lakkaz üreticisi olarak *Trametes versicolor* ATCC (200801) kullanılmıştır. Lakkaz aktivitesi açısından Modifiye Vogel ortamında 12 günlük inkübasyon süresi bulunan mikroorganizmaya büyüme ortamına daha yüksek aktivite gösterebilmesi için elde edilen homojenizattan (3 ml) buğday kepeği (3 gr/100 ml) eklenmiş potato destroz broth (PDB) besiyerine ekim yapılmıştır. Böylece ligninolitik aktivite gösteren mikroorganizma lakkaz üretimi açısından indüklenmiştir (22.792 U/ml).

Arcand ve Archibald'ın (1991) gerçekleştirdiği bir çalışmada *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enziminin değişik klorlu fenollerden klor uzaklaştırdığı saptanmıştır. *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimini kullanmanın *Phanerochaete chrysosporium*'dan elde edilen peroksidaz enzimine göre hidrojen peroksit (H_2O_2) gereksinim duyulmaması, lakkazın çok daha stabil olması ve immobilize edilerek etkili bir şekilde kullanılabilmesi açısından daha avantajlı olduğu bildirilmiştir.

Klorlu aromatik bileşiklerin lakkaz enzimi ile klor giderimini çalışan araştırmacılar serbest klor ölçümü ile oksijen tüketimi arasında bir korelasyon olduğunu gözlemlemişlerdir (Ünal, 2004). Bu tez çalışmasında da benzer ilişki bulunmuştur, reaktörde enzimatik deklorinasyon boyunca ortamda bulunan 4-klorofenolün serbest klor iyonu şeklinde artış gösterdiği ve oksijen miktarının da zamana bağlı olarak azaldığı görülmüştür.

Bu çalışmada deklorinasyon optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla sırası ile pH, süre, substrat konsantrasyonu, enzim miktarı ve sıcaklığın klor uzaklaştırılmasına etkisi incelenmiştir. Belirlenen uygun koşullarda klor uzaklaştırılması süresince oksijen miktarındaki değişim gözlenmiştir. *Vibrio fischeri* mikrotoksisite testiyle de klor uzaklaştırılması sonucunda toksik etkinin azaltıldığı belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler ile değerlendirmelerle en uygun değerler seçilmiştir.

Enzimlerle yapılan deklorinasyon ve benzer çalışmalarda önemli bir çevresel etken de ortamın pH değeridir. Bu nedenle geniş bir pH aralığında (3-10) çalışma yapılmıştır. 4-klorofenolden klor uzaklaştırılmasında en uygun değerinin pH 4 olduğu görülmüştür. Anova testi ile yapılan istatistiksel analiz çalışmalarında, 4-klorofenol deklorinasyonunda pH için sig değerinin 0.05'ten küçük olması sebebi ile anlamlı olduğu kabul edilmektedir (Çizelge 4.1.1.1.1). Ünal (2004)'ın yaptığı benzer bir çalışmada 2,4,6-triklorofenol, 2,4-diklorofenol, 4-klorofenol bileşiklerinin deklorinasyonunda yine lakkaz enzimini kullanmış ve optimum pH değerini 5.0 olarak belirlediğini bildirmiştir. Elde edilen bu değer literatürde de pek çok araştırmacı tarafından yapılan ve farklı substratlar kullanıldığında

lakkaz enzimi için elde edilen optimum pH değerine yakın bir değer olduğu söylenebilir (Ünal, 2004; Zhang, et. al., 2008; Cho, et. al., 1999).

Ladislao ve Galil (2004), pH değerindeki artış ile biyokütlenin denge anındaki sorpsiyon kapasitesindeki azalmanın pH'daki değişimden dolayı olabileceğini ileri sürmüş ve bunu şu şekilde açıklamıştır. pH değerindeki artış ile hücre üzerindeki tüm yüzey yükü negatif olur ve biyokütle yüzeyinin bağlayıcı bölgeleri ile negatif yüklü fenol ve klorofenol arasındaki elektrostatik çekimin azalmasına yol açar. pH biyokütlenin yüzey özellikleri ile fenol ve klorofenollerin iyonizasyon derecesini önemli ölçüde etkiler. Yüksek pH değerlerinde fenol ve klorofenol molekülleri üzerinde bulunan elektrik yükleri, kirleticinin hedef bölgelere bağlanmasını ve taşınım işlemini engelleyebilir. Gerçekte, hücre zarından klorofenollerin iyonize formunun difüzyonu ayırma işleminde hız sınırlayıcı aşama olarak ortaya çıkar.

Denizli ve arkadaşları (2005), sucul ortamdan fenollerini gidermek için kurutulmuş *Pleurotus sajor caju'* nun kullanım potansiyelini değerlendirdikleri çalışmada da pH'nın biyosorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisini yukarıda anlatılanlara benzer şekilde açıklamıştır.

Ortama ilave edilen başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacı ile 150 µM ve 500 µM aralığında değişen miktarlarda klorofenolik bileşik ilave edilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.2.1'de verilmiştir. Ortama ilave edilen 4-klorofenol miktarı 200 µM olduğunda en yüksek deklorinasyon değerine ulaşılmıştır. 200 µM'dan sonra bir düşüş gözlenmiş ve 300 µM'dan sonra neredeyse dengeli deklorinasyon değerleri elde edilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz çalışmalarında, substrat değerleri arasındaki farka bakıldığında sig değerinin 0,05'ten ($0,000 < 0,05$) küçük olması nedeni ile substrat değerleri arasındaki farkın anlamlı olduğu kabul edilmiştir (Çizelge 4.1.2.1.1).

Şentürk ve Büyükgüngör'ün (2008) yaptıkları çalışmada 4-klorofenol bileşiğini giderim verimi başlangıç konsantrasyonunun artması ile azalmaktadır. Başlangıç 4-klorofenol konsantrasyonu 48,0 mg/L'den 260,0 mg/L'ye arttığı zaman giderim verimi yarı yarıya azalarak % 47 seviyesine düşmüştür. Konsantrasyon 715,60 mg/L olduğunda ise

biyokütle sadece % 5,52'lik bir giderim sağlayabilmiştir. Biyokütlenin biyosorpsiyon kapasitesi ise verimin aksine 4-klorofenol konsantrasyonundaki artış ile belirli bir sınır değere kadar artmakta daha sonra azalmaktadır.

Enzim miktarının etkisinin araştırılması amacıyla ilgili yapılan çalışmada reaktöre ilave edilen enzim miktarları 0,5 ml ile 4,0 ml arasında değiştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.3.1'de verilmektedir. Enzim miktarı değerleri arasındaki farka bakıldığında sig değerinin 0,05'ten ($0,007 < 0,05$) küçük olması nedeni ile enzim miktarı değerleri arasındaki farkın anlamlı olduğu kabul edilmiştir (Çizelge 4.1.3.1.1). 4-klorofenol ile yapılan çalışmada elde edilen veriler incelendiğinde, beklenildiği gibi enzim miktarı artışına bağlı olarak deklorinasyon değerinde de artış görülmektedir. En yüksek deklorinasyon değerine 4 ml enzim miktarı ile ulaşılmıştır (Gedikli, et. al., 2010)

Sürenin etkisini incelemek amacıyla çalışmada 120 dakika boyunca ölçümler sürdürülerek örnekler alınıp klor miktarı ölçülmüştür. 4-klorofenolden uzaklaşarak serbest hale geçen klor miktarı 30 dakikada en yüksek seviyeye ulaştıktan sonra düşerek dengeli bir durum karşımıza çıkmaktadır (Şekil 4.1.4.1.). Bhattacharya and Banerjee 8 IU ml^{-1} konsantrasyona sahip enzimle pH 6'da, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de yaklaşık %98 deklorinasyon gözlemlenmiştir ancak bu değeri 9 saatlik süres sonucunda elde edebilmiştir. Bizim çalışmamızda süreç, 30 dakika gibi daha kısa bir periyotta gerçekleşmiştir. Süre değerleri arasındaki farka bakıldığında sig değerinin 0,05'ten ($0,015 < 0,05$) küçük olması nedeni ile Süre değerleri arasındaki farkın anlamlı olduğu kabul edilmiştir (Çizelge 4.1.4.1.1).

Reaksiyon oluşabilmesi için uygun sıcaklığın belirlenmesi amacıyla sıcaklık değerleri $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ile $50 \text{ }^\circ\text{C}$ arasında değiştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.5.1'de verilmiştir. Reaksiyon en yüksek seviyede bulunduğu en uygun sıcaklık $40 \text{ }^\circ\text{C}$ olarak tespit edilmiştir. Sıcaklık değerleri arasındaki farka bakıldığında sig değerinin 0,05'ten ($0,176 > 0,05$) büyük olması nedeni ile sıcaklık değerleri arasındaki farkın anlamsız olduğu kabul edilmiştir (Çizelge 4.1.5.1.1). Lakkaz enziminin $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 'ye kadar sıcaklık artışlarından etkilenmediği ve hatta yüksek sıcaklık değerlerinde düşük sıcaklık değerlerine kıyasla daha kararlı olduğu bilinmektedir (Niku-Paavola, et. al., 2004). Bhattacharya ve

arkadaşları 36 ve 40 °C’de maksimum klor degradasyonu elde etmişlerdir. Daha yüksek sıcaklıklarda ise aktivitede keskin bir düşüş gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda da deklorinasyon etkinliği başta sıcaklığa paralel artış gösterirken 40 °C’den sonra düşüş göstermeye başlamıştır. Sıcaklıktaki artış temel olarak enzim moleküllerinin daha fazla kinetik enerjiye sahip olmasını sağlayacak ve dolayısıyla enzim moleküllerinin katalizlediği moleküllere çarpma sıklığını artacaktır kanısının aksine bu çalışmada, belli bir noktadan sonra sıcaklıktaki artış muhtemelen hidrojen bağlarının kırılmasına neden olmuş ve bu enzimatik reaksiyonun olumsuz yönde etkilenmesine öncülük etmiş olabilir. Benzer sonuçlar literatürde de bulunmaktadır (Bhattacharya et. al., 2009).

Günümüzde birçok laboratuvarında çevre kirleticilerinin toksisitesi, genotoksisitesi ve mutajenitesi üzerinde denemeler yapılmaktadır. Bu test, biyoluminesans bakterilerde ışık emisyonunun inhibisyonu yöntemi ile toksisitenin belirlenmesidir.

Belirlenen optimum koşullarda deklorinasyonu yapılan söz konusu bileşikler için detoksifikasyonun değişip değişmediği belirlenmiştir. 4-klorofenolün *T.versicolor* lakkazı kullanılarak klor uzaklaştırılması çalışmasında lüminesans bir bakteri olan *Vibrio fischeri* ile Microtox 500 cihazında yapılan analizde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.1’de verilmektedir. Grafik değerlendirildiğinde 4-klorofenolün *T. versicolor* lakkazı kullanılarak toksisitenin 5. dakikasındaki EC₅₀ değerlerinde artış, 15. dakikasındaki EC₅₀ değerlerinde ise bir miktar azalma görülmektedir (Çizelge 4.2.1).

Literatürde de deklorinasyon deneyleri sonrasında paralel toksisite değişimleri gözlenmiştir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar; çalışılan klorofenolik bileşiği ve denature enzimi içeren kontrol örneklerinin bile *V. fischeri*’ye yeterince toksik etki gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle deklorinasyon sonrası örnek toksisite analizine verilmeden önce seri dilüsyona tabi tutulmuştur. Böylelikle toksik bileşiğin konsantrasyonu sub-letal konsantrasyonun altına indirilmiştir (Gu ve Choi, 2001). Bu tez çalışmasında deklorinasyonu gerçekleştirilen 4-klorofenol toksisitesi için verilen değerler ana bileşiğin toksisitesi ile ortaya çıkan ürünlerin toksisitesinin birbirine yakın olduğunu göstermektedir. Evgenidou ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu

araştırmacılar fotokatalitik bir süreçle dichlorvos ve dimethoate gibi bileşiklerin klorlarını uzaklaştırmaya çalışmışlar ve fotokatalitik iyileştirmenin her zaman toksisiteyi azaltıcı yönde bir eğilim göstermeyeceğini hatta sürecin toksisitede artışa da neden olabileceğini ifade etmişlerdir (Evgenidou, et. al., 2005a; 2005b).

Toksisite testlerinde kısa yaşam döngüsüne sahip olan fungusların, bakterilerin, alglerin ve protozoonların üreme, enzim aktiviteleri, solunum ve nitrifikasyon faaliyetlerinden yararlanılmaktadır. Mikropsal toksisite testleri olarak da adlandırılan bu yöntemler hızlı, ekonomik ve düşük örnek hacimleri gerektiren yöntemlerdir (Bitton and Koopman, 1992).

Klorlu fenollerini daha az toksik ürünlere parçalayan enzimlerin kullanımı bu bileşiklerin kontrolünde etkili bir yöntem olabilir. Ancak, enzimler istenmeyen toksik ürünler de oluşturabileceğinden enzimlerin hangi ürünleri oluşturdukları belirlenmelidir (Ünal, 2001).

Klor uzaklaştırıldıktan sonra 4-klorofenol'ün kimyasal yapısındaki değişiklikler FTIR analizleri ile belirlenmiştir. 4-klorofenol molekülünün IR titreşim spektrumları Şekil 4.3.2.'de görölmektedir. 4-klorofenol molekülü için 3344 cm^{-1} 'de O-H gerilme titreşimi gözlenirken, 2975, 2928 ve 2886 cm^{-1} 'de aromatik C-H gerilme titreşimleri görölmektedir. 1449 cm^{-1} 'de C=C gerilme titreşimi gözlenirken, 1426, 1382 ve 1332 cm^{-1} 'de gözlenen bantlar C-C titreşimleridir. 1275 cm^{-1} 'de C-O gerilme titreşimleridir. 881 cm^{-1} 'de C-Cl gerilme titreşimleri görölmektedir.

4-klorofenol molekülünün lakkaz enzimiyle yıkıldıktan sonra FTIR titreşim spektrumunda piklerin genişlikleri artmakla birlikte bantların şiddetleri de artmıştır. Gözlenen geniş, yayvan ve şiddetli pikler molekül ve çözücü arasındaki yük transferi, elektrostatik etkileşmeleri ve bozunmalar meydana geldiğini gösterir. Cl atomunun elektronegatif özelliğinden dolayı molekülde meydana gelebilecek bozunmalar bu atomlar üzerinde olacaktır. Bu durumda molekülde bozunmalar meydana geldiği Cl atomunun molekülden ayrıldığını söyleyebiliriz.

Denemelerde modifiye vogel ortamında *Trametes versicolor*'un inkübe edilmesi sonucunda elde edilen yüksek lakkaz aktivitesine sahip kültür sıvısı kullanılmıştır. Bu kültür sıvısından lakkazın saflaştırılmasına yönelik herhangi bir işlem yapılmamıştır. Bu nedenle kültür sıvısında peroksidaz grubu enzimlerinin de bulunması göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen klor gideriminden lakkaz enziminin sorumlu olup olmadığının ortaya konulması gerekmektedir. Bilindiği gibi peroksidaz grubu enzimler oksitleyici ajan olarak H_2O_2 'e bağımlıdır. Bu nedenle ortamda H_2O_2 'in bulunması zorunludur. Buradan yola çıkılarak reaksiyon ortamına H_2O_2 ilave edilmediği için herhangi bir peroksidaz aktivitesi olmadığı söylenebilir. Ancak, inkübasyon sırasında oluşabilecek olası H_2O_2 'in etkisini ortadan kaldırmak için kültür sıvısı katalaz ile muamele edilmiştir. Katalaz ile işlem görmüş kültür sıvısı ile katalaz ilave edilmemiş kültür sıvısından elde edilen deklorinasyon değerleri arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durum kültür sıvısında bulunan lakkaz enziminin deklorinasyondan sorumlu olduğu fikrini desteklemektedir.

Literatürde 2008 yılında Şentürk ve Büyükgüngör'ün yapmış olduğu *Aspergillus niger* ile sucul ortamdan fenol bileşiklerinin biyosorpsiyonu çalışmasında fenol, 2-klorofenol ve 4-klorofenolün biyosorpsiyonu üzerine biyokütle konsantrasyonu, başlangıç pH'ı, başlangıç fenol ve klorofenol konsantrasyonu ve temas süresi gibi deneysel parametrelerin etkileri araştırılmıştır. Arıtım sonucunda fenol ve 2-klorofenol 48 saat içinde dengeye ulaşırken 4-klorofenol 96 saatlik biyosorpsiyon işleminden sonra dengeye ulaşmıştır. Denge sonunda her üç bileşik için de düşük kirletici konsantrasyonlarında % 90'nın üzerinde giderim verimi elde edilmiştir. 50 mg/L başlangıç konsantrasyonundaki fenol, 2-klorofenol ve 4-klorofenol ile yapılan pH çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçlar; her üç kirletici için de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sentetik atıksuyun doğal pH değeri olan 5–6 arasında en yüksek verime ulaşılmış, bu değerinde değişiklik göstermesi ile verimin azaldığı belirlenmiştir. pH değerindeki değişiklik ile biyokütlenin biyosorpsiyon kapasitesinin değişmesi farklı pH değerlerinde biyokütle üzerindeki yüzey yükünün farklılık göstermesi ile ilişkilendirilmiştir (Şentürk ve Büyükgüngör, 2008).

Bu tez çalışmasında elde edilen veriler değerlendirildiğinde, belirlenen optimum koşullarda, *Trametes versicolor*'dan elde edilen yüksek aktiviteli lakkaz enzimi ile 4-klorofenol'den klor uzaklaştırılabildiği ortaya konulmuştur. Yapılan FTIR analizleri ile klor uzaklaştırmadan önceki ve klor uzaklaştırıldıktan sonra 4-klorofenolün yapısındaki değişimler incelenerek deklorinasyon takip edilmeye çalışılmıştır. IR titreşim spektrumu incelendiğinde 4-klorofenol molekülünün lakkaz enziminde bozunduktan sonra Cl atomunun ayrıldığı sonucuna varılmıştır. Yapılan toksisite analizlerinde klor uzaklaştırıldıktan sonra ortamda kalan bileşiğin başlangıçtakine kıyasla daha toksik bir duruma geldiği görülmüştür. Bu sonuçlardan yola çıkarak, daha ileri bir yıkım sürecinin geliştirilmesi gereği ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alcalde, M., 2007, Laccase: biological functions, molecular structure and industrial applications. In Industrial Enzymes: structure, function and applications. Edited by: J Polaina J, MacCabe AP. New York, Springer, 459-474 p.
- Altınışık, U., 2007, Sıçanlarda Subletal Doz ile Oluşturulan Akut Diazinon Toksisitesinde Pankreas Hasarının Zamana Göre Değişimi, Tıpta Uzmanlık Tezi.
- APHA, 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Part 800. Bioassay methods for aquatic organisms. 14 Th. ed., Amer. Wat. Works Ass., Wat. Pollut., Fed., Washington DC.
- Arcand, R.L. and Archibald, F.S., 1991, Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*, Enzyme Microb. Technol., 13, 194- 203.
- Arias, M.E., Arenas, M., Rodríguez, J., Soliveri, J., Ball A.S., and Hernández, M., 2003, Applied and Environmental Microbiology, 69, 1953.
- Arısoy, M., and Kolankaya, N., 1997, Biodegradation of lindane by *Pleurotus sajor-caju* and toxic effects of lindane and its metabolites on mice, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 59, 352-359.
- Aruldoss, J.A., and Viraraghavan, T., 1998, Toxicity testing of refinery wastewater using Microtox, B. Environ. Contam. Tox., 60, 456-463.
- Assavanig, A., Amornkitticharoen, B., Ekpaisal, N., Meevootisom, V., and Flegel, T.W., 1992, Isolation Characterization and Function of Laccase from *Trichoderma*, Applied Microbiology and Biotechnology, 38, 198-202.
- Banci, L., Ciofi-Baffoni S., Tien,M., 1999, Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers, Biochemistry, 38, 3205-3210.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bar, M., 2001, Kinetics and Physico-Chemical Properties of White-Rot Fungal Laccases, Doktora Tezi.
- Bat, L., ve Öztürk, M., 1998, Akuatik toksikoloji, S.D.Ü Eğirdir Su Ürünleri Fak. Dergisi, 21, 148-165.
- Baybalı, M., 2003, Resorsinol'un Enzimatik Polimerizasyon Kinetiğinin İncelenmesi, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Bergbauer, M., Eggert, C., and Kraepelin, G., 1991, Degredation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white rot fungus *Trametes versicolor*, Appl. Microbial. Biotechnol., 35, 105-109.
- Bhattacharya, S.S., Banerjee, R., 2008, Laccase mediated biodegradation of 2,4-DCP using response surface methodology, Chemosphere, 73, 81–85.
- Bhattacharya, S.S., Karmakar, S., Banerjee, R., 2009, Optimization of laccase mediated biodegradation of 2,4-dichlorophenol using genetic algorithm, Water Research, 43, 3503-3510.
- Bitton, G., 1994, Biotransformation of Xenobiotics and Metals, Wastewater Microbiology, Ed. By G. Bitton John Willey and Sons Puplicaton, 313 p.
- Bitton, G., 1994, Toxicity assay with enzyme and microorganism, Wastewater Microbiology, 374-379.
- Bitton, G., and Dutka, B.J., 1986, Toxicity testing using microorganisms, Florida, CRC Press, 163.
- Bitton, G., and Koopman B., 1986, INT–dehydrogenase test for activated sludge process control, Biotechnology and Bioengineering, 28, 7, 1080–1085.
- Bitton, G., and Koopman, B., 1992, MetPAD™: a bioassay for rapid assessment of heavy metal toxicity in wastewater, Water Environment Research.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bollag, J.M., Shuttleworth K.L., and Anderson D.H., 1988, Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds, *Appl Environ Microbiol.*, 54(12), 3086–3091.
- Bourbonnais, R., Paice, M., Reid, I., Lanthier, P., and Yaguchi, M., 1995, Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 61, 1876-1880.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie E., and Borneman, S., 1997, Reactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 12, 4627-4632.
- Bulich, A.A., Tung, K.K., and Scheibner, G., 1990, The luminescent bacteria toxicity test: Its potential as an *in vitro* alternative, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 5, 2, 71–77.
- Burns, R.G., 1982, Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology, *Soil Biology and Biochemistry*, 14, 5, 423-427.
- Call, H. and Mücke, I., 1997, History, Overview and Applications of Mediated Lignolytic Systems, Especially Laccase-Mediator-Systems (Lignozymprocess), *J. Biotechnol.*, 53, 163-202.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, M.J., Martinez, A.T., 2005, Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 71, 1775-1784.
- Campbell, L.J. and Brown, W.C., 1993, A New Cloning Vector and Expression Strategy for Genes Encoding Proteins Toxic to *Escherichia coli*, *Gene*, 127, 1, 99-103.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chaudhry, G. R. and Chapalamadugu, S., 1991, Biodegradation of Halogenated Organic Compounds, *Microbiological Reviews*, 55, 59-79.
- Cho, N., Rogalski, J., Jazsek, M., Luterek, J., Wojtas-Wasilewska, M., Malarczyk E., Fink-Boots M., and Leonowicz A., 1999, Effect of Coniferyl Alcohol Addition on Removal of Chlorophenols from Water Effluent by Fungal Laccase, *J Wood Sci.*, 45, 174-178.
- Coll, P. M., Fernandez-Abalos, J. M., Villanueva, J. R., Santamaria, R. and Perez, P., 1993, Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2607–2613.
- Couto, S.R. and Herrera, J.L.T., 2006, Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, *Biotechnology Advances*, 24, 500–513.
- Cripps, C., Bumpus, J., Aust, Sd., 1990, Biodegradation of Azo and Heterocyclic Dyes by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1114–1118.
- Çabuk, A., Ünal, A.T., and Kolankaya, N., 2006, Biodegradation of cyanide by a white-rot fungus, *Trametes versicolor*, *Biotechnology Letters*, 28, 1313-1317.
- Delen, N., 2008, *Fungisitler*, Nobel Yayınevi, 108-114.
- Delen, N., Durmuşoğlu E., Güncan A., Güngör N., Turgut C., ve Burçak A., 2005, Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları, Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre.
- Demirbağ, Z., 2006, *Genel Mikrobiyoloji*, Trabzon, 252-253.
- Denizli, A., Cihangir, N., Tüzmen, N. ve Alsancak, G., 2005, Removal of chlorophenols from aquatic systems using the dried and dead fungus *Pleurotus sajor caju*, *Bioresource Technology*, 96, 59-62.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dermer, C.D., Curtis, V.S. and Leach, F.R., 1980, Biochemical indicators of subsurface pollution, 203 p.
- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P. and Bally, R., 2000, Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*, *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 919-927.
- Dizge, M., 2007, *Trametes versicolor* beyaz çürükçül funguslardan lakkaz enziminin saflaştırılması ve kısmi nitelendirilmesi, GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dökmeci, İ., 1994, Toksikoloji, Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi-Pestisidlerle Zehirlenmeler, 582-605.
- Dumschat, C., Müller, H., Stein, K., and Schwedt, G., 1991, Pesticide-sensitive ISFET based on enzyme inhibition, *Analytica Chimica Acta* 252, 7-9.
- Durmuşoğlu, E., Tiryaki, O., ve Canhilal R., 2008, Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları.
- Dutton, R. J., Bitton, G. and Koopman, B., 1988, Enzyme biosynthesis versus enzyme activity as a basis for microbial toxicity testing, *Toxicity Assessment*, 3 (3) 245–253.
- Eggert, C., Temp, U. and Erikson, K.E.L, 1996, The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 62, 1151-1158.
- EPA, 1991, U.S Environmental Protection Agency, U.S. Army Corps of Engineers, Short Term Methods for Estimating The Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Fresh Organisms, Washington.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erbil, N., Coruk, G., Dığrak, M., 2006, Kahraman Maraş Civarındaki Ekstrem Ortamlardan İzole Edilen Bakterilerde Lignin Biyodegradasyonunun Araştırılması, Fırat Üni. Fen ve Müh. Bil. Dergisi 18 (4), 485-492.
- Evans, C.S. and Hedger, J.N., 2001, Degradation of plant cell wall polymers, Fungi in bioremediation. (Ed. G.M. Gadd, British Mycological Society, Cambridge Univ. Press. UK,1-20.
- Evgenidou, E., Konstantinos, F., Ioannis, P., 2005a, Photocatalytic oxidation of dimethoate in aqueous solutions, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 175, 29–38.
- Evgenidou, E., Konstantinos, F., Ioannis, P., Fytianos, 2005b, Semiconductor–sensitized photodegradation of dichlorvos in water using TiO₂ and ZnO as catalysts, Applied Catalysis B: Environmental, 59, 81–89.
- Ford, D.L., 1992, Toxicity reduction evaluation and control, Tech. Publ., England, 3, 25-28.
- Froehner, S.C., and Eriksson, K.E.L., 1974, Purification and Properties of *Neurospora crassa* Laccase, J. of Biotechnol., 120(1), 458- 465.
- Gedikli, S., 2008, Çeşitli Makrofungus İzolatlarının Lakkaz Üretim Yetenekleri Açısından Değerlendirilmesi ve Deklorizasyon Uygulamalarında Kullanılabilirliği, Yüksek Lisans Tezi.
- Gedikli, S., Aytar, P., Ünal, A., Yamaç, M., Çabuk, A., Kolankaya, N., 2010, Enhancement with inducers of laccase production by some strains and application of enzyme to dechlorination of 2,4,5-trichlorophenol, Electronic Journal of Biotechnology, DOI: 10.2225/vol13-issue6-fulltext-4.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gerbardt, A., 1998, Whole toxicity testing with *Oncorhynchus Mykiss* (Walbaum 1792): Survival and behavioral responses to a dilution series of a mining effluent in South Africa, *Arch. Environ. Con. Tox.*, 35, 309-316.
- Gienfreda, L., Xu, F., Bollag J., 1999, Laccase: A useful Group of oxidoreductive enzymes, CRC Pres LLC.
- Greenberg, A., 1992, Standard Methods for the Examinations of Waters and Wastewaters; 18th ed. American Public Health Association, Washington, 61-65.
- Gu, M., Choi, S., 2001, Monitoring and classification of toxicity using recombinant bioluminescent bacteria, *Water Science and Technology*, 43, 147–154.
- Gutiérrez, A., Martínez, AT., 1996, Biodegradación de la lignina: Una perspectiva actual, *Rev. Iberoam. Micol.*, 13, 18-23.
- Ha, S.R., Qishan, L., and Vinitnanharat, S., 2000, COD Removal of Phenolic Wastewater by Biological Activated Carbon-Sequencing Batch Reactor in the Present of 2,4-DCP, *Wat. Sci. Tech.*, 42 (5-6), 171-178.
- Heinfling, A., Bergbauer, M., Szewzyk, U., 1997, Biodegradation of Azo and Phthalocyanine Dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 261–266.
- Huber, L., Baumung, H., Metzner, G., and Popp, W., 1979, Ecological Effects of Refinery Effluents in Fresh Water with Particular Reference to Substances on list 1 of The EEC Guidelines For Water Protection. In: *The Environmental Impact of. Refinery Effluents*, CONCAWE Report no 5/79.
- Huttermann, A.C., Mai A. and Kharazipour, A., 2001, Modification of lignin for the production of new compounded materials, *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 55, 387-384.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jimenez-Juarez, N., Roman-Miranda, R., Baeza, A., Sánchez-Amat, A., Vazquez-Duhalt R. and Valderrama, B., 2005, Alkali and halide-resistant catalysis by the multipotent oxidase from *Marinomonas mediterranea*, *J. of Biotechnol.*, 117, 73-82.
- Kersten, P.J., Kalyanaraman, B., Hammel, K.E., Reinhammar B. and Kirk, Y.K., 1990, Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes, *Biochemical J.*, 268(2), 475-480.
- Kiiskinen, L.L., Palonen, H., Linder, M., Viikari L., and Kruus, K., 2004, Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme, *Microbiol.*, 150, 3065-3074 .
- Kirk, T. and Farrell, R., 1987, Enzymatic Combustion: The Microbial Degradation of Lignin, *Annu. Rev. Microbiol.*, 41, 465–505.
- Kirkpatrick, N., Reid, I.D., Ziomek, E., and Paice M.G., 1990, Biological leaching of hardwood craft pulp usin *Trametes (Coriolus) versicolor*, immobilized poliurethane foam, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 105-108.
- Kolankaya, D., 2004, Organochlorine pesticide residues and their toxic effects on the environment and organisms in Turkey, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* Vol. 86, Nos. 1–2, 147–160.
- Koopman, B., Bitton, G. and Bozeman, J., 1989, Toxicity testing using immobilized algae, *Aquatic Toxicology*, 14, 4, 345-352.
- Koopman, B., Bitton, G. and Morel, L.J., 1988, Use of Microtox™ for assessing copper complexation with organic compounds, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 17, 4, 493-496.
- Kwan, K.K., Dutka, B.J., Rao, S.S., and Liu, D., 1990, Mutatox test: A new test for monitoring environmental genotoxic agents, *Environmental Pollution*, 65, 323-332.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ladislao, B., and Galil, N., 2004, Biosorption of phenol and chlorophenols by acclimated residential biomass under bioremediation conditions in a sandy aquifer, *Water Research*, 38, 267-276.
- Lanouette, K. H., 1977, Treatment of phenolic wastes, *Chemical Engineering*, 17, 99-106.
- Lara, M.A., Malavar, A.J.R., Rojas, O.,J., Holmquit, O., Gonzalez, A.M., Bullon, J., Perazola, N., and Araujo, E., 2003, Black liquar lignin biodegradation by *Trametes elegans*, *Int. Biodet. And Biodeg.*, 52, 167-173.
- Lee, M. D., Thomas, J. M., Borden, P.C., Bedient, P. B., Wilson, J. T., and Ward, C. H., 1988, Biorestitution of aquifers contaminated with organic compounds, *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, 18, 29-89.
- Leitao, A.L., Duarte, M.P., and Santos Oliveira, J., 2007, Degredation of phenol by halotolerant strain of *Penicillium chrysogenum*. *Int.Biodeter. Biodeg.*, 59, 200-225.
- Leontievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova N. and Golovleva, L., 1997, Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi, *FEBS Microbiol. Letters*, 413-446.
- Leontievsky, A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J.K., Pozdnyakova, N.N., Myasoedova, N.M., Kalkkinen, N., Golovleva, L.A., Cammack, R., Thurston, C.F., and Hatakka, A., 1997, Blue and Yellow Laccases of Ligninolytic Fungi, *Fems. Microbiol. Lett.*, 156, 9-14.
- Levi, Y., Henriet, C., Coutant, J.P., and Lucas, M., 1989, Monitoring acute toxicity in rivers with the help of the Microtox test, *IWSA, Specialised conference*, 7, 25-31.
- Levine, W.G., 1965, Laccase, a review, In: *The biochemistry of copper*, Academic Press Inc., New York, 371-385.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Limura, Y., Hartikainen, P., and Tatsumi, K., 1996, Dechlorination of tetrachloroguaiacol by laccase of white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 45, 434-439.
- Logue, C., Voiland, G., Bitton, G., Koopman, B., and Mazidji, C.N., 1990, Use of Microtox® and *Ceriodaphnia* bioassays in wastewater fractionation, Toxicity Assessment, 5, 3, 265–277.
- Malliga, P., Uma, L., and Subramanian, G., 1996, Lignolytic activity of the cyanobacterium *Anabaena azollae* ML2 and the value of coir waste as a carrier for BGA biofertilizer, Microbios, 86, 175-183.
- Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Jones G.H., and Henriques, A.O., 2002, Substrate and Dioxygen Binding to the Endospore Coat Laccase from *Bacillus subtilis*, J.of Biological Chem., 277, 18849.
- Matsumura, F., 1985, Effects of Pesticides on Wildlife, Toxikology of Insecticides, Second Edition, NY, 437-444.
- Munkittrick, K.R., Power, E.A., and Sergy, G.A., 1991, The relative sensitivity of microtox®, daphnid, rainbow trout, and fathead minnow acute lethality tests, Environmental Toxicology and Water Quality, 6, 1, 35–62.
- Munnecke, D.M., 1977, Detoxification of pesticides using soluble or immobilized enzymes, Process Biochem., 13, 14-17.
- Nannipieri, P. and Bollag, J. M., 1991, Use of enzymes to detoxify pesticide-contaminated soils and waters, J. Environ. Qual., 20, 510-517.
- Niku-Paavola, M.L., Fagerström, R., Kruus, K., Viikari, L., 2004, Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from *Peniophora* species, Enzyme and Microbial Technology, 35, 100-102.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ollikka, P., Alhonma, K., Leppä-Nen, K., Glumoff, V.M., Rajjola, T., Suominen, I., 1993, Decolorization of Azo, Triphenyl Methane, Heterocyclic, and Polymeric Dyes by Lignin Peroxidase Isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*, Appl. Environ. Microbiol, 59, 4010-4016.
- Öner M., 2001, Genel Mikrobiyoloji, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 90.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso A. and Sanna, G., 1997, A Novel White Laccase from *Pleurotus ostreatus*, J. of Biological Chem., 272-313.
- Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M., Goszczynski, S., Crawford, R. and Crawford, D., 1992, Mineralization of Sulfonated Azo Dyes and Sulfanilic Acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*, Appl. Environ. Microbiol., 58, 3598–3604.
- Paul-Philippe, C. and Juliana, A., 2005, Contribution of Manganese Peroxidase and Laccase to Dye Decoloration by *Trametes versicolor*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 69, 276–285.
- Puhakka, J. A. and Järvinen, K., 1992, Aerobic fluidized-bed treatment of polychlorinated phenolic wood preservative constituents, Water Research, 26(6), 765-770.
- Reinhartz, A., Lampert, I., Herzberg, M., and Fish, F., 1987, A new, short term, sensitive, bacterial assay kit for the detection of toxicants, Toxicity Assessment, 2, 2, 193–206.
- Riva, S., 2006, Laccases: Blue Enzymes for Green Chemistry, Trends in Biotechnol., 24, 5, 219-226.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schlosser, D., Grey, R., and Fritsche, W., 1997, Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor* Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood, *Appl. Microbial Biotechnology*, 4, 412-418.
- Şentürk, İ. ve Büyükgüngör, H., 2008, *Aspergillus niger* ile sucul ortamdan fenol bileşiklerinin biyosorpsiyonu, *İtüdergisi/e, su kirlenmesi kontrolü*, 19, 1-2, 3-14.
- Shah, M.M., Grover T.A., and Aust, S.D., 1992, Metabolism of cyanide by *Phanerochaete chrysosporium*., *Arch Biochem Biophys*, 290-1, 173-178.
- Shoham, Y., Schwartz, Z., Khasin, A., Gat, O., Zosim, Z., and Rosenberg, E., 1992, Delignification of wood pulp by a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* strain T-6, *Biodegradation*, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, 3, 207-218.
- SKKY (Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliği) Teknik Usuller Tebliği, 7 Ocak 1991 RG 20748.
- Stamets, P., 2000, *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms 3rd Ed.*, Ten Speed Press, Berkely, C.A., 382-386 p.
- Steiert, J. G., Crawford R. L., 1985, Microbial degradation of chlorinated phenols, *Trends in Biotechnol.*, 3, 300-304.
- Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto J., Inamori, Y., 2003, A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67, 2167-2175.
- Tabak, Ö., 2008, *Çesitli Basidiomycetes izolatları ile klorofenolik bileşiklerin biyolojik Yıkımı, Yüksek Lisans Tezi.*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Taşpınar, A., Kolankaya, N., 1998, Optimization of Enzymatic Chlorine Removal from Kraft Pulp. Bull. of Environ. Contamin. and Toxicol., 61, 15-21.
- Thakker, G.D., Evans, C.S., Rao, K.K., 1992, Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena, Appl. Microbiol. Biotechnology, 37, 321-323.
- Throop, W. M., 1977, Alternative methods of phenol wastewater control, J. Hazardous Materials, 77:319-329.
- Thurston, C.F., 1994, The structure and function of fungal laccases, Microbiology 140, 19-26.
- Trevors, J.T., Stratton, G.W., Gadd, G.M., 1986, Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi, Can J. Microbiol., 32(6), 447-464.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itavaara, M., 2000, Biodegradation of lignin in copost environment: a review, Bioresource Tech. 72, 169-183.
- Tzanov, T., Basto C., Guebitz G. and Cavaco-Paulo A., 2003, Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching of cotton, Macromol. Mater. Eng., 288, 807–810.
- Uyama, H., and Kobayaski, S., 2002, Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 19–20, 117–127.
- Ünal, A., 2004, Lakkaz Enzimi ile Bazı Toksik Klorofenolik Bileşiklerin Detoksifikasyonu. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 104.
- Ünal, A., Kolankaya, N., 2001, Dechlorination of Bleached Kraft Pulp by Laccase Enzyme Produced from some White-Rot Fungi, Türk. J. Biol., 25, 67-72.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ünal, A., Kolankaya, N., 2004, Chlorine Removal from pp'DDT by Laccase Enzyme Produced from *Trametes versicolor*, Turkish Electronic Journal of Biotechnology 2, 27-21.
- Ünal, Ü.M., 2001, Endüstriyel Atıksulardan Klorlu Fenollerin Biyolojik Yöntemlerle Parçalanması. Çev-Kor, 11, 41, 16-19.
- Vaal, M.A., Leeuwen, C., J.V., and Hoekstra, J.A., 2000, Variation in sensitivity of aquatic species to toxicants practical consequences for effect assessment of chemical substances, Environ. Manage., 25, 415-423.
- Winkler, E., Darlene, J., Cynthia, D., Thomas, J., and Edward I., 1982, Anion binding to oxidized type 2 depleted and native laccase: A spectroscopically effective model for exogenous ligand binding to the type 3 - type 2 active site, Biochemical and Bioph. Res. Coms. 107, 2, 727-734.
- Xu, F., 1996, Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as Well as Halide Inhibition, Biochemistry 35, 23, 7608-7614.
- Yarapolov, A.I., Skorobogatko, D.V., Vartanov, S.S. and Vartolomeyev, S.D., 1994, Laccase properties, catalytic mechanism and applicability, Appl. Biochem. Biotechnol. 40, 257-262.
- Yeşilada, O., Şık, S., and Şam, M., 1998, Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii*: Effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14, 37-42.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhang, Z., Cissoko, N., Wo, J., and Xu, X., 2008, Factors Influencing the Dechlorination of 2,4-dichlorophenol by Ni-Fe Nanoparticles in the Presence of Humic Acid, J. of Hazardous Materials, 165, 78-86.

Zille, A., 2005, Laccase Reactions for Textile Application, Doktora Tezi.

online: <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood2.html>, erişim tarihi: 02-08-2010

online: <http://www.t3db.org/toxins/T3D0868>, erişim tarihi: 11/08/2010

online: <http://www.t3db.org/toxins/T3D0868>, erişim tarihi: 11/08/2010

online: <https://fungalenomics.concordia.ca/fungi/>, erişim tarihi: 01-08-2010

online: <https://fungalenomics.concordia.ca/fungi/Tver.php>, erişim tarihi: 01-08-2010

online: <https://fungalenomics.concordia.ca/fungi/Tver.php>, erişim tarihi:02/08/2010

online:<http://www.chemicaland21.com/industrialchem/organic/pCHLOROPHENOL.htm>,
erişim tarihi:11/08/2010