

Trametes versicolor Lakkazı ile 2,4-Diklorofenolden Klor Uzaklaştırılması

Eda Benli

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Kasım 2010

Dechlorination of 2,4-Dichlorophenol by *Trametes versicolor* Laccase

Eda Benli

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

November 2010

Trametes versicolor Lakkazı ile 2,4-Diklorofenolden Klor Uzaklaştırılması

Eda Benli

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 Eda Benli'nin YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “*Trametes versicolor* Lakkazı ile 2,4-Diklorofenol'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 1930'lardan beri, insektisit, fungusit, antiseptikler ve dezenfektanların yapısında yaygın olarak kullanılan maddelerdir. Yüksek toksisiteleri, ayrışmaya karşı dirençleri, biyolojik birikimleri, kanserojen ve mutajenik özelliklerinden dolayı; klorofenoller ekolojik önem taşıyan kirleticiler arasında yer almaktadır.

Bu çalışmada, beyaz çürükçül bir fungal suş olan *Trametes versicolor* ATCC (200801)'un buğday kepeği içeren Potato Dextrose Broth besiyeri ortamına inkübe edilmesi ile elde edilen lakkaz aktivitesi yüksek kültür sıvısı ile 2,4-Diklorofenol'ün (2,4-DCP)deklorinasyonuna bağlı detoksifikasyonu araştırılmıştır. 2,4-DCP serbest lakkaz enzimiyle muamele edilerek; pH, başlangıç substrat konsantrasyonu, enzim miktarı, sıcaklık ve süre parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Lakkaz aktivitesine bağlı olarak klor iyonu konsantrasyonundaki değişiklikler civatiosiyanat yöntemiyle, oksijen konsantrasyonundaki değişiklikler ise oksijen metre ile ölçülerek takip edilmiştir.

Yapılan optimizasyon sonuçlarının istatistiksel olarak yorumlanması için varyans analizi yöntemi kullanılmıştır. Değerlendirmelere göre pH ve sıcaklığın deklorinasyon miktarına etkisinin fazla olmadığı diğer parametrelerin ise deklorinasyon miktarında etkili olduğu görülmüştür. Deklorinasyondan sonra 2,4-DCP'ün kimyasal yapısında meydana gelen değişiklikleri saptayabilmek için FTIR analizi yapılmıştır.

2,4DCP'ün deklorinasyon öncesi ve optimum koşullarındaki deklorinasyonu sonrasında toksisite miktarındaki değişiklikler Microtox yöntemiyle ölçülmüştür.

2,4-DCP için; optimum pH 4,0, başlangıç substrat konsantrasyonu 400 µM, enzim miktarı 4 ml, süre 7dk, sıcaklık 30 °C olarak belirlenmiştir.

Toksisite ölçümleri sonucunda 2,4-DCP 5. ve 15. dakikadaki EC₅₀ değerlerine göre toksisitesinde bir azalma olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Klor uzaklaştırılması, Basidiyomiset, Lakkaz, *Trametes versicolor*, 2,4-Diklorofenol

SUMMARY

Chlorophenols are extensively used chemicals for the synthesis of insecticide, fungicide, inhibitory of rot and disinfectant from 1930's to today. Due to their high toxicity, biological accumulation in the environment, recalcitrant to degradation, effect of carcinogenic and mutagenic, chlorophenols are listed as priority pollutants.

In this study, detoxification of 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) compound, through the treatment with high activity laccase enzyme produced from a white fungal strain, *Trametes versicolor* ATCC (200801) which was incubated in Potato Dextrose Broth culture including wheat bran was investigated. Optimization of pH value, substrate concentration, enzyme amount, temperature and reaction time was carried out through the treatment with free laccase of 2,4-dichlorophenol. According to laccase activity, changes in concentration of chlorine ion was measured with mercurythiocyanate method and changes in concentration of oxygen measured with (Jenway 9071 Model) oxygen meter.

In order to explanation of optimization results, variance analyses have been used. According to extrapolation, effects of pH and temperature have a little impact on dechlorination quantity but other parameters are effective. After the dechlorination of 2,4DCP, to recognize the changes in chemical structure of 2,4DCP, FTIR analysis was carried out.

Changes in toxicity quantity were measured both before and after the dechlorination of 2,4-DCP with Microtox method.

For 2,4-DCP; optimum pH 4,0, initial substrate concentration 400 μ M, enzyme amount 4 ml, time 7 min, temperature 30°C, were determined. As a result of toxicity measurements, according to EC₅₀ value at 5 and 15th minute, the decrease of toxicity of 2,4-DCP was observed.

Keywords: Dechlorination, Basidiomycetes, Laccase, *Trametes versicolor*, 2,4-Dichlorophenol.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın tüm aşamalarında, çalışmalarımı yönlendiren, çalışmanın yürütülmesi ve hazırlanması aşamasında her türlü imkanı sağlayan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, desteğini ve güvenini her zaman yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet ÇABUK' a

Laboratuvar çalışmalarımda desteklerini ve yardımlarını hiç esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Şule ÇECE, Merve AKBULUT, Serap GEDİKLİ, Pınar AYTAR 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 KÜRKÇÜOĞLU'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.

Eğitimimde ve her konuda olduğu gibi çalışmam boyunca bana olan inançları, güvenleri ve manevi destekleri için Canım Ailem'e ve A. Serkan Sepin'e sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
SUMMARY	VI
TEŞEKKÜR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Basidiomycetes.....	3
2.1.1. Beyaz Çürükçül Funguslar.....	4
2.1.2. <i>Trametes versicolor</i>	5
2.1.2.1. Biyolojik Özellikleri.....	5
2.1.2.2. <i>T.versicolor</i> Enzimleri ve Etkileri.....	6
2.1.2.3. <i>T. versicolor</i> 'unBiyoteknolojideki Uygulamaları.....	6
2.2. Fenoloksidazlar ve Peroksidazlar.....	7
2.3. Lakkaz Enzimi	8
2.3.1. Lakkaz Enziminin Moleküler Yapısı.....	9
2.3.2. Lakkaz Enziminin Aktif Bölgesinin Yapısı.....	10
2.3.3. Lakkaz Enziminin Uygulama Alanları.....	11
2.3.4. Lakkaz aracılı sistemler (LMS).....	20

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

2.4. Fenolün Yapısı ve Çeşitleri.....	21
2.4.1 Klorofenoller ve Sağlığa Etkileri.....	23
2.5. 2,4-Diklorofenol.....	25
2.5.1. Fiziksel Özellikleri.....	25
2.5.2. Kullanım Alanları.....	26
2.5.3. Toksik Etkileri.....	26
2.6. Toksikite Ölçüm Yöntemleri.....	26
3. YÖNTEM VE GEREÇLER.....	29
3.1. Mikroorganizma ve Kültür Koşulları.....	29
3.1.1. Potato Dextrose Broth (PDB).....	29
3.2. Lakkaz Aktivitesinin Ölçümü ve Katalaz Muamelesi.....	29
3.3. Serbest Klor Ölçümleri.....	30
3.4. Çözünmüş Oksijen Ölçümleri.....	30
3.5. Deklorinasyon Çalışmaları.....	31
3.5.1. Deklorinasyon İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	31
3.5.2. pH Değerinin Enzimatik Deklorinasyona Etkisi.....	31
3.5.3. Substrat Konsantrasyonunun Enzimatik Deklorinasyona Etkisi.....	31
3.5.4. Enzim Miktarının Enzimatik Deklorinasyona Etkisi.....	32
3.5.5. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Deklorinasyona Etkisi.....	32

İÇİNDEKİLER(Devam)

Sayfa

3.5.6. Ortam Sıcaklığının Enzimatik Deklorinasyona Etkisi.....	32
3.6. İstatistiksel Analizler.....	32
3.7. FTIR Analizleri.....	33
3.8. Toksikite Çalışmaları.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. Lakkaz Enzimiyle 2,4-diklorofenol Deklorinasyonu İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	34
4.1.1 pH değerinin 2,4-Diklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi.....	34
4.1.1.2. pH'ın İstatiksel Değerlendirmesi.....	35
4.1.2 Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun 2,4-Diklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi.....	36
4.1.2.1. Substrat Miktarının İstatiksel Değerlendirmesi.....	37
4.1.3. Enzim Miktarının 2,4-Diklorofenolün Deklorinasyonuna Etkisi.....	38
4.1.3.1. Enzim Miktarının İstatiksel Değerlendirmesi.....	39
4.1.4 Sürenin 2,4-Diklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi.....	40
4.1.4.1. Sürenin İstatiksel Değerlendirmesi.....	42
4.1.5 Sıcaklığın 2,4-Diklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi.....	43
4.1.5.1. Sıcaklığın İstatiksel Değerlendirmesi.....	44

İÇİNDEKİLER(Devam)**Sayfa**

4.2. 2,4 Diklorofenolün FTIR Spektrum Analiz Sonuçları.....	45
4.3. Toksikite Sonuçları.....	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.2.1.1. <i>Trametes versicolor</i> 'un genel bir görüntüsü.....	5
2.3.1.1. <i>Melanocarpus albomyces</i> lakkazının üç boyutlu şekli.....	10
2.4.1. Fenolün iki boyutlu moleküler yapısı.....	21
4.1.1.1. Lakkaz enzimiyle 2,4-diklorofenolden klor uzaklaştırmasında ortam pH değerinin etkisi.....	34
4.1.2.1 Lakkaz enzimiyle 2,4-diklorofenolden fenol uzaklaştırmasında başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisi.....	36
4.1.3.1 Lakkaz enzimiyle 2,4-diklorofenolden klor uzaklaştırmasında enzim miktarının etkisi.....	38
4.1.4.1 . Lakkaz enzimi ile 2,4-diklorofenol'den klor uzaklaşması sırasında ortamdaki çözülmüş oksijen konsantrasyonundaki değişim.....	40
4.1.4.1.2. Lakkaz enzimiyle 2,4-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasında sürenin etkisi.....	41
4.1.5.1 Lakkaz enzimiyle 2,4-diklorofenolden klor uzaklaştırmasında sıcaklığın etkisi.....	43
4.2.1. 2,4-Diklorofenol molekülünün 2 boyutlu yapısı.....	45
4.2.1.2. 2,4 Diklorofenol molekülünün IR titreşim spektrumları (a) 2, 4-Diklorofenol etanol çözücüsündeki spektrumu, (b) 2, 4-Diklorofenol 'un bozunduktan sonra spektrumu.....	46
4.3.1. 2,4-DCP'nin toksisite değeri. (a) enzimatik deklorinasyondan önce (b) enzimatik deklorinasyondan sonra.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.3.3.1. Lakkazın Farklı Uygulama Alanları.....	13
4.1.1.2.1. pH Parametresinin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	35
4.1.2.1.1. Substrat Miktarının İstatistiksel Değerlendirmesi.....	37
4.1.3.1.1. Enzim Miktarının İstatistiksel Değerlendirmesi.....	39
4.1.4.1.1. Sürenin İstatistiksel Değerlendirmesi.....	42
4.1.5.1.1. Sıcaklığın İstatistiksel Değerlendirmesi.....	44
4.3.1. 2,4-diklorofenol'ün deklorinasyon öncesi ve sonrası EC_{50} değerleri.....	47

1. GİRİŞ

Canlı popülasyonundaki artışa bağlı olarak beslenme, giyim, çeşitli ham maddeler ve enerji gereksinimlerinin teknolojik olarak karşılanmaları atık ve çevre kirliliği problemini oluşturmaktadır. Endüstriyel atıklar alıcı ortam olarak suya, toprağa ve atmosfere verilmelerine bağlı olarak farklı kirlilik kriterlerine neden olmaktadır. Biyoteknoloji, biyolojik sistemlerin teknolojiye uygulanmasıdır. Beyaz çürükçül funguslar çok çeşitli atık ve ksenobiyotikleri yıkabilme ve çeşitli enzimleri salgılayabilme yeteneklerinden dolayı, gün geçtikçe biyoteknolojik çalışmalarda uygulama alanı bulmaktadır (Yeşilada vd., 1997).

Klorlu fenolik bileşikler kağıt ve selüloz endüstrisi tarafından yaygın olarak üretilen, yıkımı zor bileşikler arasındadır. Birçok canlı için toksik etkileri olduğundan insan ve çevre sağlığı açısından dikkat çeken bir sorundur. Bu nedenle klorlu fenollerin biyolojik olarak parçalanması üzerine pek çok araştırma yapılmıştır. Klorofenoller; biyolojik, kimyasal, fotokimyasal yıkım, buharlaşma, dağılma ve toprak bileşenleri tarafından absorblanarak stabilizasyonu gibi bazı doğal süreçlerle dönüştürülebilirler. Ancak böyle doğal süreçler çeşitli verim ve hızda gerçekleşir ve çok yavaş olabildikleri için kirleticinin yıllarca ortamda kalmasına yol açarlar. Bu nedenle çoğu araştırma toprak ve sudaki klorofenollerin giderimi ve kontrol altına alınması için uygun yöntemler geliştirme üzerine odaklanmıştır. Sedimentasyon, koagülasyon, presipitasyon, adsorpsiyon ve kimyasal oksidasyon gibi kimyasal ve fiziksel metotları içeren klasik yöntemler genellikle pahalıdır ve enerji gereksinimleri fazladır. Bu yüzden atık suların arıtımı ve organik bileşiklerin uzaklaştırılmasında yeşil teknoloji de denilen mikroorganizmalara ve enzimlere önem vermeye başlanmıştır. Beyaz çürükçüller bu bileşiklerin çevreden uzaklaştırılmasında çok yaygın kullanılan türlerdir. Bu parçalanmayı mantar hücresi yakın çevresine salgıladığı lakkaz, mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz gibi oksidoredüktaz grubu enzimler sayesinde gerçekleştirir. Yüksek içerikli klorlu organik bileşiklerin arıtımında enzimatik aktivitenin kullanımı son teknolojilerden birisidir (Rubilar, et al., 2008).

Bu çalışmada, endüstriyel aktivitelerin önemli bir atığı olan 2,4-diklorofenol'ün, *Trametes versicolor* ATCC (200801) lakkazı ile klor uzaklaştırılması ve detoksifikasyonu için optimum koşullar belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda deklorasyonu takiben toksisitede bir değişimin olup olmadığı Microtox yöntemi ile takip edilmiştir. Ayrıca deklorasyon sürecinin 2,4-diklorofenolün yapısında meydana getirdiği kimyasal değişiklikler FTIR analizleri ile belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Basidiomycetes

Bu sınıf fungusların en gelişmiş türlerini içerir. Tüm basidiyumlu mantarlar bu sınıfta toplanır, bu sebeple sınıf içinde şapkaklı mantarlar, raf mantarları, kurt mantarları, kuş yuvaları, yer yıldızları gibi yüksek formlu mantarların yanında Uredinales ve Ustinaginales gibi yapıları ilkel olan funguslar da girer. Bu sınıf üyeleri eşeyli sporları olan basidiosporlarını basidiyum üzerinde oluştururlar. Basidiosporlar plazmogami, karyogami ve mayoz sonucu oluşur. Sınıf üyelerinin iyi gelişmiş septalı beyaz, parlak sarı ve turuncu renklerde miselleri vardır. Karbonhidrat, yağ, protein, vitamin ve organik asitlerce zengin olması sebebiyle besin olarak kullanılan türleri mevcuttur (Öner, 2001).

Kadeh şeklindeki bir mantarın yaşam döngüsünde, uzun ömürlü bir dikaryotik miselyum yer alır. Periyodik şekilde, çevresel uyarılara yanıt olarak bu miselyum eşeyli olarak ürer ve incelikle işlenmiş üreme yapıları oluşturur. Bu üreme yapıları basidiyokarp olarak isimlendirilir. Bir basidiokarpta bulunan çok sayıda basidiyum, eşeyli sporların kaynaklarıdır. Tipik bir basidiomiset hayat çemberinde, basidiosporlar çimlenerek miselleri oluştururlar ve misel hücreleri bir dikaryon üretmek üzere birleşirler. Dikaryon misel büyür ve basidiospor üreten basidia üretir. Eşeyli üreme, basidiomycetlerde askomisetlerdekine göre daha az yaygındır (Demirbağ, 2006).

Bu şube, aynı zamanda mikoriza oluşturan mutualistleri ve bitki parazitlerini içerir, odun ve diğer bitkisel maddelerin önemli ayrıştırıcılarıdır. Basidiomycetler odunda en fazla bulunan ve kompleks bir monomer olan ligninin en iyi ayrıştırıcılarıdır. Pek çok raf mantarı zayıf ya da zarar görmüş ağaçların odun kısmında parazit yaşar ve ağaç öldükten sonra odunu ayrıştırır. Paslar ve odunların oluşturduğu iki basidiomiset grubu özellikle çok zararlı bitki parazitlerini içerir (Campbell and Reece, 2006).

2.1.1. Beyaz Çürükçül Funguslar

Beyaz çürükçül funguslar lignin, aromatik bileşikler ve tekstil boyaları gibi mikrobiyal ataklara karşı dayanıklı bileşikleri salgıladıkları spesifik olmayan ekstraselüler enzimlerle oksitleyebilirler. Beyaz çürükçül fungusların birçoğunun organik kirlilikleri geniş bir spektrumda okside edebildiği gibi azo, trifenil metan, polimerik ftalosiyanın ve heterosiklik boyalar gibi rekalsitran maddelerin de çeşitli türlerini okside edebildiği bulunmuştur. Lignini CO₂ ve H₂O'ya oksitleyen tek grup funguslar içinde yer almaktadır. Bu kültürler lignini parçalayan enzimleri yani lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP), mangan bağımsız peroksidaz (MnIP) ve sellobiyoz dehidrogenaz (CDH), azot, karbon veya kükürdün sınırlı olduğu ortamlarda sekonder metabolitler olarak salgırlarlar (Dizge, 2007).

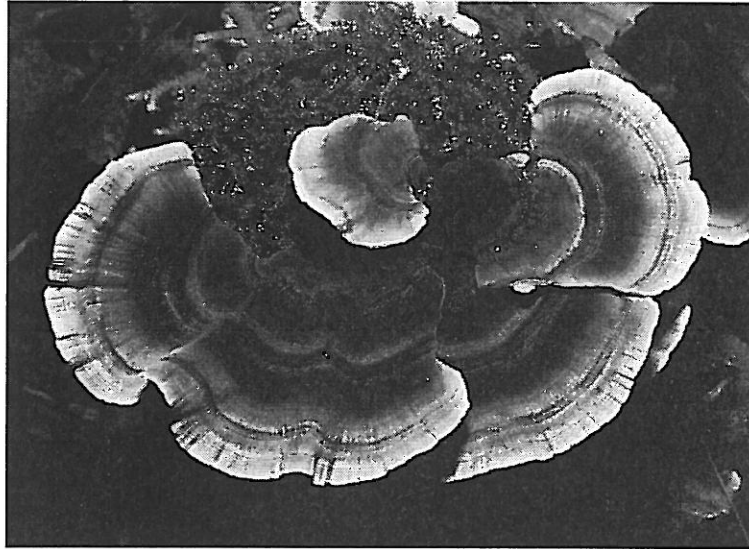
Son zamanlarda endüstriyel uygulamalarda özellikle de tekstil endüstrisinde boyar maddelerin renk gideriminde yer alan üç fonksiyonel enzimin Lignin peroksidaz (LiP), Mangan peroksidaz (MnP) ve H₂O₂ bağlı peroksidazlar olduğu belirtilmiştir. Lakkaz ise sadece belirli türler tarafından salgılanan diğer bir fonksiyonel hücre dışı enzimdir (Beilen and Li, 2002).

Beyaz çürükçül funguslara örnek olarak *Chrysosporium lignorum*, *T. versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Stereum hirsutum*, *Pleurotus ostreatus*, *Hebeloma crustuliniform* ve *Armillaria luteobubalina*, *Schizophyllum commune* ve *Daldinia concentrica* verilebilir. Özellikle *T. versicolor* ve *P. chrysosporium*'un kullanımı çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için özellikle çevresel açıdan yaygındır. Beyaz çürükçül funguslar, organik moleküller üzerinde rol oynayan çeşitli enzimleri üretirler (Tabak, 2008).

2.1.2. *Trametes versicolor*

2.1.2.1. Biyolojik Özellikleri

Polyporaceae grubuna ait olup *Coriolus versicolor* adıyla da bilinmektedir. Yüzeyi ince tüylü ve organizmanın genetiğine ve bulunduğu çevreye göre değişen farklı renk tonlarına sahip konsantrik renkli halkalar yeşil, gri, mavi, kahverengi, sarı, pas sarısı kuşaklar kenarları krem veya beyaz renkli bir kuşakla çerçeveselmiştir. Dünyada çok yaygın olup odun tahripçisidir. Bu mantar bazen beyaz çürükçül etmen bazen de parazit olarak ağaçlar üzerinde görülür. İlkbahar ve sonbaharda ölü ve kurumak üzere olan ağaç kütüklerinde toplu şekilde çıkar. Bu mantarın sahip olduğu ligninolitik enzimleri çevre biyoteknolojisi başta olmak üzere biyoteknolojide çok geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu mantarın çok değerli tıbbi bileşikleri vardır. Taşıdığı en önemli bileşik crystin (PSC) adıyla bilinmektedir. PSC proteinlere bağlı polisakkarit demektir. Bu bileşik AIDS dahil bir çok virüsün gelişmesini baskı altına alır. Kanselerin çoğunda olumlu etki yaptığı da bilinmektedir. Özellikle gastrointestinal kanserlerde Japonya'da ilaç olarak kullanılmaktadır (Stamets, 2000).



Şekil 2.1.2.1.1. *Trametes versicolor*'un genel bir görüntüsü

(online: <http://curbstonevalley.com/blog/?p=1242>, erişim tarihi: 02/08/2010).

2.1.2.2. *T.versicolor* Enzimleri ve Etkileri

T. versicolor, odun lignoselülozunun parçalanmasında rol oynayan birçok enzimi sentezlemektedir. Bunlar lignin peroksidazın (LiP) 16 izoformu, mangan peroksidazın (MnP) 5 izoformu, lakkaz, karboksimetil sellülaz, aviselaz ve sellobiyaz dehidrogenazdır. *T. versicolor*'un ürettiği lakkaz poliklorinlenmiş bifeniller (PCB), tekstil boyaları ve poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi biyolojik yıkıma dirençli birçok yeni sentez kimyasalı (ksenobiyotikleri) parçalamada kullanabilir. Ayrıca *T. versicolor*'un enzimleri kağıt endüstrisinde de kullanılmaktadır. Kağıt hamurunu beyazlatmak için *T. versicolor* kullanılmaktadır. Bu türün kültürleri, antibiyotikleri sentezleyebilir yada parçalayabilir, karoten türevli aromatik bileşiklerini üretebilir veya petrolün yüksek moleküler ağırlıklı asfalt bileşenlerini biyolojik olarak parçalayabilir (Ünal ve Kolankaya, 2001).

2.1.2.3. *Trametes versicolor*'un Biyoteknolojideki Uygulamaları

Endüstriyel atıklardan kaynaklanan çevresel kirlilik problemleri yaşamı olumsuz yönde etkilemektedir. Yüksek organik madde içeriği olan atıklar anaerobik veya aerobik biyodegradasyon yöntemleriyle arıtılabilmektedirler. Ancak bu süreçler ile yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin küçük bir kısmı elimine edilebilmektedir (Pazarlıoğlu vd., 2008).

T. versicolor, bir beyaz çürükçül fungus olarak nütrient sınırlayıcı koşullar altında ligninolitik bileşikleri melanoidinleri ve poliaromatik bileşikleri ekstraselüler yolla ve spesifik olmayan bir aktivite ile parçalayacak kompleks bir enzimatik sisteme sahiptir (Pazarlıoğlu vd., 2008).

T. versicolor'a ait lakkaz (Lac), MnP, LiP ve sellobioz dehidrogenaz (CDH) gibi enzimler biyodegradasyon çalışmalarında biyoteknolojik öneme sahiptirler. Lakkaz, fenolik ve fenolik olmayan bileşiklerin oksidasyonunu katalizleme ve sentetik boyaları mineralize etme özelliğine sahiptir. Sellobioz dehidrogenaz, bir hemoflavoenzim olup sellobiozu seçimli olarak oksitler ve aynı zamanda birçok substratı indirger. *T. versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi, poliklorlu bifeniller, tekstil boyaları ve

poliaromatik hidrokarbonlar gibi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görev alır. Ayrıca bu enzim, kağıt ve posa endüstrisinde Kraft posasının beyazlatılmasında (biobleaching), odun yongalarının muamelesini içeren biyoteknolojik proseslerde (biopulping), sentetik boyaların renksizleştirilmesinde ve herbisit degradasyonunda kullanılmaktadır (Pazarlıoğlu vd., 2008).

2.2.Fenoloksidazlar ve Peroksidazlar

Fenoloksidazlar ve peroksidazlar, birçok canlı (mikroorganizma, bitki ve hayvan) hücre tarafından üretilen 2 grup oksidoredüktazdır. Onlar bazen oksijenazların içinde de sınıflandırılır, fakat kendine has özelliklerinden dolayı ayrı şekilde sınıflandırılır. Her iki grubun da ana üreticileri, lignin transformasyonunda bu enzimlerin ilk rolünü üstlenen beyaz çürükçül funguslardır (Burns, et al., 2002).

Tirozinaz ve lakkazları içeren fenol oksidazlar aktivite için moleküler oksijen gerektirir oysa ki atkuyruğundan (HRP) elde edilen peroksidaz, ligninaz (lignin- ve manganez peroksidaz) ve kloroperoksidazdan oluşan peroksidazlar, hidrojen perokside gereksinim duyar. Bazılarında örneğin mangan peroksidazda reaksiyon, bivalent (+2 yüklü) mangan ve belli tipteki tamponlar gibi diğer bileşenlerin varlığına bağlıdır. Farklı mekanizmalarla her iki grup enzim de, polimerik ürünlerin oluşumuyla sonuçlanan oksidatif reaksiyon aracılığıyla fenolik ve fenolik olmayan aromatik bileşiklerin oksidasyonunu katalizler. Polifenoloksidazlar, tirozinazlar ve lakkazlar olmak üzere 2 alt sınıfa ayrılır.

Tirozinazlar; polifenoloksidazlar, fenolazlar veya katekolazlar olarak isimlendirilen bakır içeren monoksijenazlardır.

Lakkazlar funguslar tarafından üretilen çok bakırlı proteinlerdir. Bu enzimler bakteri ve bitkiler tarafından da sentezlenirler. Bu grup enzimler literatürde çok çalışılmıştır. Lakkazların orijinleri hakkındaki bilgi daha çok yüksek oranda onların üretimi için gereken ihtiyaçları, özellikleri ve moleküler karakterizasyonu, kinetik özellikleri üzerinedir (Burns, et al., 2002).

Peroksidazlar, fenoloksidaz ve yaygın oksijenazlardan farklı olarak bir diğer oksijenaz grubudur. Çünkü onlar koenzime ihtiyaç duymaz ve hidrojen perokside bağımlıdır. Metil peroksit veya etil peroksit gibi alkil hidroperoksidazlar, düşük

spesifite ile hidrojen akseptörü olarak rol oynar. Peroksidazlar mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda yaygındır, polimerik ürünleri oluşturan doğal ve sentetik substratların oksidasyonunu katalizler. En çok çalışılmış peroksidaz, atkuyruğundan (HRP) üretilmesine rağmen lignin ve mangan peroksidaz gibi diğer fungal peroksidazlar da mevcuttur (Burns, et al., 2002).

2.3. Lakkaz Enzimi

Lakkaz, geçtiğimiz yüzyılın sonlarından itibaren yapılan çalışmalara konu olan birkaç enzimden biridir. İlk kez, 1883 yılında Yoshida tarafından Japon lak ağacı olarak da bilinen *Rhus vernicifera*'nın eksudatlarında bulunmuştur. Oksijenin dört elektronunun suya indirgenmesini katalizleyen, katalitik merkezinde bakır atomları içeren mavi bakır oksidazlardan biridir ya da polifenol enzim de denir. Lakkazın yanı sıra askorbat oksidazlar ve serüloplazminler de genellikle katalitik merkezlerinde bakır atomları içerirler. Lakkazlar çeşitli aromatik, özellikle fenolik substratların (hidrokinon, guaiakol, 2,6- dimetoksifenol, daimin) oksidasyonunu katalizleyen ekstrasellüler bir enzimdir. Lakkaz ve lakkaz benzeri çoklu bakır oksidazlar ağırlıklı olarak mantar ve bitkilerde tanımlanmıştır (Piontek et al., 2002).

Bu enzim geniş substrat özgüllüğü göstermesinden ötürü çevre kirliliğinin giderilmesinde sıkça kullanılan bir enzimdir. Fungal lakkazlar polifenol oksidasyonundaki büyük kapasiteleri nedeniyle birçok biyokimyasal sürece dahil olurlar. Çevrede lignin ve hümitik asitin yıkımını gerçekleştirirler, böylece topraktaki organik madde ve küresel karbon döngüsüne katkıda bulunurlar. Özellikle Basidiomycetes'lerden elde edilen fungal lakkazlar gösterdikleri substrat çeşitliliklerinden ötürü biyoremediasyon gibi biyoteknolojik çalışmalarda geniş bir kullanım alanı bulurlar. Azo boyalar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, endokrin bozucular gibi çoğu dayanıklı çevresel kirleticilerin de biyotransformasyonunu gerçekleştirirler (Thurston, 1994).

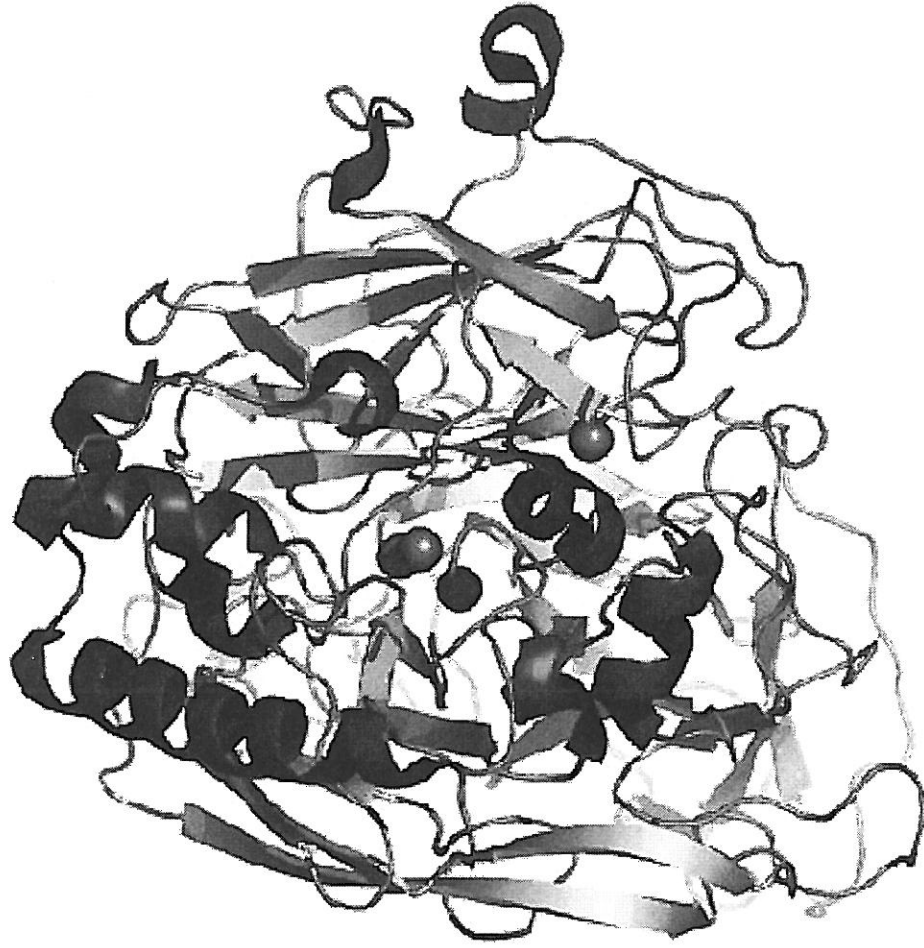
Lakkaz, fenollerdeki bir elektronu kullanarak fenol radikallerine oksitler ve moleküler oksijeni abiyotik reaksiyon ile suya dönüştürür. Su için gerekli hidrojen iyonunu ise fenolden alır (Perez, et al., 1998).

Lakkaz özellikle bütün odunsu bileşiklerin yıkımını gerçekleştirebilen tek organizma olan beyaz çürükçül mantarlar tarafından oldukça çok üretilir. *Trametes* sp., en etkili lignin degradasyonu yapabilen cinslerden birisidir (Xavier, 2002).

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 katalizli reaksiyonlarda moleküler halde bulunan oksijene elektronların transferi ile su molekülü oluşturulur (Ünal, 2004).

2.3.1. Lakkaz Enziminin Moleküler Yapısı

Bir glikoprotein olan lakkaz enziminin karbonhidrat içeriği, protein molekülünün ağırlıkça %15-45'ini oluşturur. Enzimin içerdiği karbonhidratlar; heksozamin, glikoz, mannoz, galaktoz, fruktoz ve arabinozdur. Değişik kaynaklardan elde edilen lakkazın molekül ağırlığı değişiklik gösterir (Yarapolov, et al., 1994).



Şekil 2.3.1.1. *Melanocarpus albomyces* lakkazının üç boyutlu şekli

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

2.3.2. Lakkaz Enziminin Aktif Bölgesinin Yapısı

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

Elektron Paramanyetik Rezonans (EPR) analizleri bakır 2'nin üç azot atomuna bağlandığını göstermektedir. Dördüncü bakır 2 ligandının da bir su molekülü olduğu gösterilmiştir. Lakkaz enzimine anyonların bağlanması üzerine yapılan kimyasal ve spektral analizler N_3^- , O_2 ve F^- iyonları için bakır 2 ve bakır 3 tipi bölgelerin yüksek afinite gösterdiklerini ortaya koymuştur (Winkler, et al., 1982).

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).

2.3.3. Lakkaz Enziminin Uygulama Alanları

- 1) Yağ fabrikası atıksuyundan fenol giderimi (D'Annibale, et al., 2000).
- 2) Toksik klorofenolik bileşiklerin degradasyonu (Filazzola, et al., 1999; Sannino, et al., 1999).
- 3) Tekstil atıksularının degradasyonu (Dur'an and Esposito, 2000).
- 4) Fenolik endüstriyel atıksuların dekolorizasyonu (Davis and Burns, 1990).
- 5) Ağartılmış Kraft selüloz hamurunun biyolojik deklorinasyonu (Ünal ve Kolankaya, 2001).
- 6) Azo boyalarının degradasyonu (Chivukula and Renganathan, 1995).
- 7) Fenol detoksifikasyonu (Gianfreda, et al., 1998).
- 8) Kateşol oksidasyonu (Burton, et al., 1998).
- 9) Boyaların dekolorizasyonu (Rodriques, et al., 1999).
- 10) 1-naphtol'ün polimerizasyonu (Aktaş, et al., 2001).
- 11) Analitik biyosensör olarak kullanımı (Hartmeier, et al., 1998).

12) Benzopyrenlerin degradasyonu (Rama, et al., 1998).

13) Toprak kirleticilerinin toksinlerinin giderilmesinde; hidrojen vericisi olarak toprak toksinlerinin giderilmesinde oluşan humus parçaları ile toprağı zenginleştirmede(Luterek, et al., 1997).

Çizelge 2.3.3. 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>Corioloopsis gallica</i>	Gomez, et. al., 2005
	<i>Corioloopsis rigida</i>	Ünyayar, et. al., 2005
	<i>Funalia trogii</i>	
	<i>Irpex lateus</i>	Kasinath, et. al., 2003
	<i>Myceliophthora thermophila</i> , <i>Polyporus eryngii</i> , <i>Pynoporus pinsitus</i> ,	Claus, et. al., 2002
	<i>Trametes versicolor</i>	Camarero, et. al., 2004
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Hou, et. al., 2004

Çizelge 2.3.3. 1. Farklı Lakkaz Uygulamaları (Tabak, 2008) (devam)

Boyaların Deklorizasyonu	<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 rolfsii, Trametes hirsuta</i>	Campos, et. al., 2001
	<i>Streptomyces cyaneus</i>	Arias, et. al., 2003
	<i>T.hirsuta</i>	Abadulla, et. al., 2000
	<i>T.hirsuta</i>	Dominguez, et. al., 2005
	<i>T.versicolor</i>	Lorenzo, et. al., 2002
	<i>T.versicolor</i>	Rodriguez Couto, et. al., 2002
	<i>Trametes modesta</i>	Rehorek, et. al., 2004

Çizelge 2.3.3. 1. Farklı Lakkaz Uygulamaları (Tabak, 2008) (devam)

Ksenobiyotiklerin degradasyonu	<i>Coriolus versicolor</i>	Okazaki, et al., 2002
	<i>Myceliophthora thermophyta</i> , <i>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-Paavola and Viikari, 2000
	<i>Trametes sp.</i>	Tanaka, et al., 2001
	<i>Trametes sp.</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	

Çizelge 2.3.3. 1. Farklı Lakkaz Uygulamaları (Tabak, 2008) (devam)

Ksenobiyotiklerin degradasyonu	<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 vd., 2004
	<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-Wilkolazka, et al., 2004
	<i>C.unicolor</i>	Jarosz-Wilkolazka, et al., 2005
	<i>C.hirsutus</i>	Marko-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

Çizelge 2.3.3.1. Lakkazın Farklı Uygulama Alanları (Tabak, 2008) (devam)

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 sp. AH28-2 irki</i>	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 2.3.3.1. Lakkazın Farklı Uygulama Alanları (Tabak, 2008) (devam)

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, T.versicolor</i>	Bourbonnais, et al., 1997
	<i>C.versicolor</i>	Call ve Mücke, 1997 (Lignozym-prosesi)
	<i>Peniophora sp.,</i> <i>Pycnoporus sanguineus,</i> <i>T.hirsuta, T.versicolor</i>	Kandioller and Christov, 2001
	<i>T.versicolor</i>	Crestini and Argyropolus, 1998
	Tanımlanmamış	Scaley, et al., 1999
	Tanımlanmamış	Chakar and Ragauskas, 2001
	Tanımlanmamış	Poppius-Levlin, et al., 2001
Tanımlanmamış	Tamminen, et al., 2003	

Çizelge 2.3.3.1. Lakkazın Farklı Uygulama Alanları (Tabak, 2008) (devam)

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

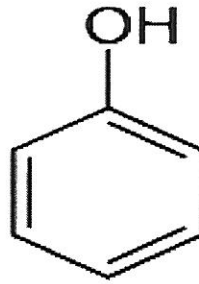
2.3.4. Lakkaz aracılı sistemler (LMS)

Son 10 yılda lakkazın çok fonksiyonlu bir enzim olmasının yanı sıra lakkaz aracılı sistemler (LMS) aracılığıyla bu özelliği daha da genişletilmiştir. 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) veya 1-hidroksibenzotriazol (HBT) gibi düşük molekül ağırlığına sahip moleküllerle enzimlerin kombinasyonu hem bilinen substratların dönüşümünde yüksek oranları sağlamakta hem de lakkazın tek başına yapamayacağı yeni reaksiyonlar eklemektedir. Kağıt hamuru beyazlatma endüstrisinde veya zararlı ksenobiyotiklerin (polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi) uzaklaştırılmasında LMS'nin çalıştığı yapılan deneylerle desteklenmiştir. Genellikle tüm aracı moleküller (örneğin syringaldizin) lakkazın substratlarıdır. Onlar T1 bölgesinde kolayca okside edilebilir. Bazı durumlarda çok stabil olmayan ve daha kompleks substratlara okside edebilen reaktif katyonik radikaller üretebilirler. Bu mekanizmada aracı molekül, lignin gibi yüksek molekül ağırlıklı substratların okside edilebilmesine izin veren difüzlenebilir bir elektron taşıyıcısı olarak rol oynamaktadır.

Lakkaz molekülü ile elde edilen elektronlar sonunda su oluşturması için oksijene transfer edilir (T2/T3 üç çekirdekli grupta). Bir aracı molekülün çalışması avantajdır. Çünkü bu lakkazın iki hedefi gerçekleştirmesini sağlar: i) sterik engel problemlerini aşarak polimerlerin oksidasyonun sağlamak (enzim ve polimer direkt olarak birbirini etkilememek zorundadır) ii) substrat aralığının genişlemesi. Etkili bir aracı molekül, lakkazinkinden daha yüksek bir redoks potansiyeline sahip olmamalıdır. Substratinkinden daha yüksek bir potansiyel ve serbest difüzlenebilme yeteneği genelde daha önemlidir. Karışık aracı moleküllerin sinerjik etkisi lakkazla gerçekleştirilen oksidasyonu geliştirebilir. Fakat kimyasal araçlar çok daha toksiktir, pahalıdır ve stabil değildir. Bundan başka onlar yan ürün oluşumuna neden olmaktadır ve enzimi inaktive etmektedirler. Bunun üstesinden gelmek için lakkazın yönlendirilmiş evrimi veya tirozin gibi doğal aracı moleküller için arayışlarda bulunmak gibi yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir (Alcalde, 2007).

2.4. Fenolün Yapısı ve Çeşitleri

Benzen hidrojenlerinden biri veya birkaçı yerine Hidroksil (OH) gruplarının girmesiyle türeyen organik bileşiklere fenoller denir. Saf halde renksiz olan fenol, deri ile temas ederse deriyi yakar ve zehirlidir. Fenik asit de denilen fenol, zayıf asidik özellik gösterir. (http://www.cem.yildiz.edu.tr/3-menu_icerikleri/3-egitim-ogretim/ogretim_kademeleri/lisans/ders_notlari/0412022-CK2/ck2-df10.pdf)



Şekil 2.4.1 Fenolün iki boyutlu moleküler yapısı

Fenollerin sudaki eriyikleri, demir-III klorür eriyiği ile mavi renk meydana getirir. Fenolün sudaki eriyiğine brom suyu damlatılırsa (2, 4, 6) tribrom fenolden ibaret renksiz, kristal yapılı bir çökelek meydana gelir. Bu ayırım fenol için hassastır (http://www.cem.yildiz.edu.tr/3-menu_icerikleri/3-egitim-ogretim/ogretim_kademeleri/lisans/ders_notlari/0412022-CK2/ck2-df10.pdf)

Fenoller aromatik bileşikler arasında en önemlisi olarak bilinir. Başlıca 3 tipte bulunabilirler:

1) Monohidroksifenoller: Aromatik bileşikler arasında en önemli organikler olarak bilinir. Aslında tek (-OH) içeren bir grubun genel adı olan bu gruptan en çok fenol HO ile karşılaşırız.

Bu madde içerdiği (-OH) nedeniyle ilk bakışta alkol izlenimi verse de suda çok sınırlı olan ($K_a=1,2 \cdot 10^{-10}$) hidrolizi sırasında az miktarda H^+ ve fenil köküne ayrışır ve bu nedenle zayıf bir asit gibi davranır.

Kontrollü bazı enzim reaksiyonları yardımıyla sularda 500 mg/L'ye kadar fenolün biyolojik arıtılması güç olup 250 mg/L'ye kadar zehirli etkisi yoktur (http://www.cem.yildiz.edu.tr/3-menu_icerikleri/3-egitim-ogretim/ogretim_kademeleri/lisans/ders_notlari/0412022-CK2/ck2-df10.pdf).

2) Kresoller: Fenollerin diğer homolog serisi kresollerdir. Kömür katranında bulunurlar ve böcek öldürücü özellikleri vardır. Kresollerin 3 türü mevcuttur; ortokresoller, metakresol ve parakresol. Bazı kresollerin karışımı olan lizol, dezenfeksiyon maddesi olarak satılır. Bu öldürücü etki nedeniyle kresol içeren sanayi sularının biyolojik yöntemlerle arıtılması güç olup, 250 mg/L'ye kadar zehirli etkisi yoktur (http://www.cem.yildiz.edu.tr/3-menu_icerikleri/3-egitim-ogretim/ogretim_kademeleri/lisans/ders_notlari/0412022-CK2/ck2-df10.pdf).

3) Polihidroksifenoller: Dihidroksifenollerin 3 izomer şekli vardır. Hepsinin de fenole alıştırılmış aktif çamur tesislerinde kolaylıkla okside edildikleri gösterilmiştir.

Trihidroksifenollere örnek olarak ise, Pirogallol (1, 2, 3, trihidroksibenzen) verilebilir. Pirigallol, alkali çözeltilerdeki oksijeni emdiği için gaz veya su içindeki oksijen konsantrasyonunu belirlemede kullanılır. Ayrıca tabakhane atık suları ile fotoğraf sanayi atık sularında pirogallol bulunur. Bu tip sular, demir içeren yüzeysel sulara deşarj edildiklerinde mürekkebimsi demir III pirogallat oluştururlar (http://www.cem.yildiz.edu.tr/3-menu_icerikleri/3-egitim-ogretim/ogretim_kademeleri/lisans/ders_notlari/0412022-CK2/ck2-df10.pdf).

Plastiklerin en önemli bileşiklerinden olan fenoller, dünyada ve Türkiye'de en çok fenolik reçine üretiminde, kauçuk işleme, izolasyon, ve yüksek sürtünmeye dayanıklı malzemelerin imalatında kullanılmaktadır. Fenoller ayrıca ilaç, boya ve pestisitlerde de hammadde olarak kullanılır.

Fenollü atık suların oluşmasına yol açan birçok endüstriyel faaliyet arasında, yağ rafinerileri, kimyasal tesisler, patlayıcı üreticileri, reçine üretimi ve kok fırınları önemli yer tutmaktadır (http://www.cem.yildiz.edu.tr/3-menu_icerikleri/3-egitim-ogretim/ogretim_kademeleri/lisans/ders_notlari/0412022-CK2/ck2-df10.pdf).

Fenol içeren atık suların diğer kaynakları arasında orlon üretimi, kağıt üretim tesislerinde kostik havalı temizleyiciler, azot işleme, tekstil fabrikaları, fiberglas üretimi, dökümhaneler ve kullanılmış kauçukların geri kazanıldığı tesisler gösterilebilir. İçme ve besin endüstrisi sularında fenolün mevcudiyeti suyun tadını bozar. Fenol içeren su klorlandığında zehirlipoliklorlu fenoller oluşur. EPA (Environmental Protection Agency) yüzey sularının 1 ppb'den az fenol içerebileceğini belirtmektedir. Karbonizasyon prosesi sırasında suya önemli miktarda fenol karışmaktadır. Demir çelik fabrikaları, kok ve havagazı üretim tesisleri karbonizasyon süreci ile işletilmektedir (ATSDR, 1999).

2.4.1 Klorofenoller ve Sağlığa Etkileri

Klorofenoller, fenole 1- 5 arasında klor eklenmiş organik kimyasallardır ve fenolün bir veya daha fazla hidrojen atomu klor atomuyla yer değiştirmiştir. Fenol, benzenden elde edilen en basit aromatik hidrokarbondur. 5 tip klorofenol vardır: mono klorofenoller, di klorofenoller, tri klorofenoller, tetra klorofenoller ve penta klorofenoller. 19 tane klorofenol türevidir. 2 klorofenol hariç bütün klorofenoller katı halde bulunurlar ve erime sıcaklıkları 33 °C ile 191 °C arasında değişiklik gösterir. Çoğu klorofenol suda çözünür (ATSDR, 1999).

Klorofenoller, fenol yapısındaki renksiz, zayıf asidik ve zehirli organik bileşiklerdir. Bakteri, böcek ve zararlı ot öldürücü olarak kullanılan bu bileşiklerin büyük bir bölümü fenolün klorla tepkimeye sokulmasıyla, bazıları da poliklorlu benzenin hidrolizi ile elde edilir (ATSDR, 1999).

Yüksek toksisiteleri, ayrışmaya karşı dirençleri, biyolojik birikimleri, kanserojen ve mutajenik özelliklerinden dolayı; klorofenoller ekolojik önem taşıyan kirleticiler arasında yer almaktadır (Uysal ve Türkmen, 2004).

Klorofenoller üretilmeleri veya pestisit olarak kullanılmaları esnasında çevreye bulaşabilirler. Kimyasal endüstrinin bu atık suları arıtım yapılmadan deşarj edilirse önemli çevre problemlerine yol açar.

Türkiye, pestisitler ve diğerk toksik maddelerin çevrede yol açtığı problemlerle yüzleşmektedir. Bunun en önemli sebebi olarak organoklorlu pestisitlerin tarımda kontrolsüz olarak kullanımını görülmektedir. Bu toksik maddeler, çevrede akut ve kronik etkilere yol açmaktadır. Göksu Deltası'nda 13 organoklorlu pestisit; su, sediment, balık ve su kuşlarında tespit edilmiştir. Sakarya Bölgesi'ndeki Sakarya Gölü'nde, Orta Anadolu'da 5 gölde ve Meriç Deltası'nda sedimentte ve balık örneklerinde klorlu pestisit analizi yapılmıştır. Topraktaki mikroorganizmalar ve bazı saprofit funguslar deklorinasyon yoluyla klorlu hidrokarbonları detoksifikasyona uğratabilirler. Bu degradasyon sonucunda Cl miktarında azalma gözlenir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu toksik maddelerin degradasyonunda enzim teknolojisinin kullanılmasına odaklanmıştır (Kolankaya, 2006).

Çoğu klorofenol suya karışırken çok azı da havaya karışır. Havaya karışan klorofenoller güneş ışığı yardımıyla parçalanabilir ve daha sonra yağmur suyuyla havadan temizlenirler. Su, toprak ve sedimentte bulunan düşük seviyedeki klorofenoller birkaç gün veya birkaç hafta içinde mikroorganizmalar tarafından çevreden uzaklaştırılırlar. Çoğu insan, içme sularının klorla dezenfekte edilmesiyle çok az seviyede klorofenole maruz kalmaktadır. Aşırı dozda klorofenole maruz kalmak karaciğerk ve immün sistem hasarına yol açabilir (ATSDR, 1999).

Yiyecek yoluyla alınan klorofenoller hızlıca vücuda karışır, deri vasıtasıyla da hızlı bir şekilde vücuda nüfuz edebilirler. Monoklorofenoller vücutta çok fazla kalmazlar, daha az zararlı ürünlere dönüştürülürler ve çoğu 24 saat içinde idrar yoluyla atılırlar. Diğerk klorofenoller de (diklorofenol, triklorofenol, tetraklorofenol), vücutta birkaç gün kalıp vücutu idrar yoluyla terk ederler (ATSDR, 1999).

Farklı fizikokimyasal ve biyolojik yöntemler, örneğink aktif karbon adsorpsiyonu, kimyasal oksidasyon ve aerobik- anaerobik biyolojik yıkım gibi, geliştirilmiş ve sudan klorlu aromatiklerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılmıştır. Klorofenollerin biyolojik

yıkımı aromatik halkadaki klorun sayısına ve pozisyonuna bağlıdır. Genellikle klor grubu sayısının artmasıyla birlikte biyolojik yıkım verimi azalır (Kargı ve Eker, 2004).

Fenoller protoplazmik zehir olduklarından tüm canlı hücre türlerine zarar verirler. Fenollerin öldürücü dozları deri tarafından adsorplanabilir. Fenol varlığı suda tat ve koku olarak anlaşılabilir(0.01-0.1 mg/l). Fenol içeren suların içilmesi şiddetli böbrek bozukluklarına, ağır sarsıntılara ve hatta ölümlere neden olabilir. Klor içeren fenollerin zehirleyici etkisi ise izomere bağlı olarak değişim gösterir. Klorlu fenollerin çoğu deride ve gözde oldukça yıpratıcı özelliğe sahiptir ve yine zehirleyici miktarlar deriden adsorplanabilir (ATSDR, 1999).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından fenoller için sularda izin verilebilir konsantrasyon 0.001 mg/L ve izin verilebilecek maksimum konsantrasyon 0.002 mg/L olarak belirlenmiştir. 1 µg/L gibi düşük konsantrasyonda bile içme suyunda önemli tat ve koku problemleri yaratır ve organizmalara zarar verir (WHO, 1986).

2.5. 2,4-Diklorofenol

2.5.1. Fiziksel Özellikleri

Kimyasal formülü: $C_6H_4Cl_2O$

Molekül ağırlığı: 163 g/ mol

Erime sıcaklığı: 45 °C

Kaynama noktası: 760 mmHg basınçta 210 °C

2,4-diklorofenol, renksiz, kristal katı halde bulunan, nötral pH'larda suda kısmen çözünen, etanol ve benzen gibi çözeltiler içerisinde oldukça iyi çözünen bir bileşiktir. Zayıf bir asit gibi davranır ve alkali çözeltilerde yüksek seviyelerde çözünerek kendi tuzunu oluşturur (EPA, 1980).

2.5.2. Kullanım Alanları

2,4-diklorofenol, kimya endüstrisinde bir ara bileşik olarak 2,4-diklorofenoksiasetik asitin (2,4-D) ve türevlerinin (germisitler, toprak sterilantları gibi) yapımında, tarım endüstrisinde güve önleyici, antiseptik ve tohum dezenfektanları olarak kullanılan belli metil bileşiklerinin yapımında kullanılmaktadır. 2,4-diklorofenol, ayrıca daha sonra klorlanmak suretiyle ağaç ürünlerinin korunmasında kullanılan pentaklorofenole dönüşmektedir (EPA, 1980).

2.5.3. Toksik Etkileri

2,4-diklorofenol, üretildiği veya kimyasal ara bileşik olarak kullanıldığı endüstriyel akıntılardan, klorlanma süreçlerinden, kağıt hamurunun ağartılma işlemleri sonucunda ve yakma süreçleri veya toprakta yer alan çeşitli pestisitlerin metabolizmaları sonucunda da ortama karışmaktadır. Ortamın pH'sına bağlı olarak, toprakta ve suda ayrışmadan ve iyonize formlarda bulunabilir. Suyu verilmesi halinde, özellikle pH'ya bağlı olarak sedimentlere adsorbsiyonu önemli bir problemdir. Kontamine olmuş yüzey suları veya kontamine havanın solunması sonucunda canlılar üzerinde etkisini göstermektedir (Spectrum Laboratories, 2002).

İnsanlar tarafından solunum, deri, gözler ve sindirim yolları vasıtasıyla maruz kalınan 2,4-diklorofenolün zehir sınıfı 3 olarak tanımlanmaktadır. Bu grup zehirler güçlü toksinler kategorisinde yer alırlar (Merck KGaA, Darmstadt, 2000).

2.6. Toksikite Ölçüm Yöntemleri

Tekstil, deri ve petrokimya endüstrilerinin proses atıklarında bulunan ağır metal, solvent, sülfür, krom ile aromatik ve alifatik hidrokarbonlar mikroorganizmalar üzerinde stres oluşturarak alıcı ortam ekosisteminde akut ve kronik olabilecek toksik etkiler yaratmaktadırlar. Değişik endüstriyel atık sularda yapılan ekotoksikolojik

çalışmalarda kullanılan biyotoksisite testlerinin fiziksel ve kimyasal parametrelerle birlikte kullanılarak karşılaştırılması ve uygunluklarının teyit edilmesi gerekmektedir.

Toksisite çalışmalarında endüstriyel atık suların özelliklerine bağlı olarak kullanılacak organizmaların oluşturacağı tepkilerin farklı olacağı, atık sudaki kimyasal maddelerin antagonistik ve sinerjistik etkilerinin olabileceği göz ardı edilmemelidir. Toksisite testinin temeli, canlı organizmaların test edilecek su veya atık su numunesi ile etkileşime girmesine ve canlı organizma üzerinde oluşan etkinin ölçülmesine dayanır. Standart yöntemlerde bu konuya ilişkin balık biyodeneyi yöntemi bulunmaktadır. Ancak bu yöntem herhangi bir acil durum söz konusu olduğunda sonuç almak açısından oldukça yavaş kalmaktadır. Şimdilerde atık, atık su ve endüstriyel kimyasalların zararlı etkilerinin değerlendirilmesi için *Lemna minor* (duckweed), *Lepidium sativum*, protox, thamnotox, daphtox, algaltox, *Vibrio fischeri* gibi hızlı, kolay, düşük maliyetli toksisite testleri kullanılmaktadır (Aydın vd., 2007).

Toksisite testi, birçok kuruluş tarafından kontaminasyon tespiti için kullanılmaktadır. Son zamanlarda kullanılabilir toksik maddelerin tespiti konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda çok sayıda bileşen tanımlanmıştır. Bunlar suda stabil ve çözünür olabilir, çok az kokuya veya renge sahip olabilir ve çok düşük konsantrasyonları bile insan sağlığını tehlikeye sokabilir. Bu toksik maddeler, askeri birimler tarafından kullanılan savaş kimyasalları, biyolojik toksinler (aflatoksin, risin), patojenler ve endüstriyel kimyasallar (siyanür, ağır metaller) şeklinde olabilmektedir (SDI, Environmental Protection, 2000).

Balık biyodeneyi dışında kullanılan bir başka yöntem ise, daha hızlı sonuç veren ve daha verimli olan bakteri kullanılan biyosensör yöntemidir. Bakteri kullanılan biyosensörler, diğer organizmalara göre test için daha uygundur. Bakteriyel hücreler sudaki toksisiteye daha hızlı cevap verirler. Bakteriyel hücreler, memeli hücrelerine göre daha hızlı metabolik hıza sahiplerdir ve yüksek organizmalarda bulunan kompleks organ sistemlerine sahip değildirler (Aydın vd., 2007).

Bakteri kullanılan biyosensörler, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar verir. Sonuçlar yüksek hassasiyetlidir ve hatalı sonuç verme oranı çok düşüktür. En iyi

sonuçlar, yeterli veri sağlanarak, lokal su kalitesi referans alınarak elde edilir. Bu, su kalitesinde değişiklik olması durumunda karşılaştırma için gerekli olacaktır (Aydın vd., 2007).

Mikrotox test sistemi ile toksik etkilerin biyoluminesant bakteriler üzerine etkileri de saptanmaktadır. Ekotoksikolojik alışmalar laboratuvar koşulları yanında, doğal koşullarda sürdürölen biyolojik izleme çalışmaları ile de desteklenmektedir. Lüminesant bakteri ışımastndaki azalmanın tespiti yöntemiyle alışan Microtox toksisite ölçüm sistemi, *Vibrio fisheri* olarak bilinen bakteriyi kullanır. Bunun sebebi, tür olarak bu bakterinin birçok kimyasala karşı hassas olmasıdır. Bu mikroorganizma normal metabolizma sırasında ışık ürettiği için toksisitenin takibine çok uygundur. Numunedeki toksik maddeler, organizmaların metabolizmasını ters yönde etkiler ve lüminesantta azalmaya neden olur (http://www.yeneranalitik.com/toksisite_olcum_cihazı.html).

Ayrıca *Lemna minor* ve *Lepidium sativum* toksisite testleri fitotoksisite test yöntemleridir. Fitotoksistide toksik kirletici kök büyümesini engellemektedir. Paralel olarak yapılan deneylerle kök uzunlukları karşılaştırılarak toksik etki belirlenmektedir (Aydın vd., 2007).

Devare ve Bahadır 1994'de 4 farklı endüstriyel atık maddenin zehirliliğini belirlemek için *L. sativum*, *L. minor* gibi test bitkilerini kullanmışlardır. alışmalarında kök büyüme hızında azalma tespit etmişler, fakat EC₅₀ değerini belirleyememişlerdir (Aydın vd., 2007).

Daphnotox ve Thamnotox toksisite ölçüm yöntemleri larvaların ölüm oranına bakılarak EC₅₀ değeri belirlenmesi mantığıyla uygulanmaktadır. Atık suya maruz bırakıldıktan sonra ortamdaki ölü larvalar sayılarak % inhibisyon değeri belirlenmektedir (Daphtokit FTM Standard Operational Procedure, 2006).

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. Mikroorganizma ve Kültür Koşulları

Çalışmalarda, *Trametes versicolor* ATCC (200801) kullanılmıştır. *T. versicolor*, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Prof. Dr. Nazif Kolankaya'dan temin edilmiştir. Kültürler Potato dekstroz agarda (PDA-Accumedia) +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Stok kültürlerden PDA besiyerine ekim yapılarak aktiflenen kültürlerden buğday kepeği içeren PDB besiyeri ortamına ekim yapılarak 12 gün süreyle 150 rpm çalkalama hızında ve 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda kültür sıvısı filtre edilerek pelletlerden ayrılmıştır. Kültür sıvısı ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Üretilen kültür sıvıları -20 °C'de, kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

3.1.1. Potato Dekstroz Broth (PDB) :

Hazır besiyeri kullanılmıştır (Acumedia).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/100 ml distile su</u>
Potato Infusion Solids	4,0
Dekstroz	20

Hazır karışımdan 24 g tartılarak son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su ile hazırlanmıştır. Besiyerinin pH değeri 5,1'dir. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.2. Lakkaz Aktivitesinin Ölçümü ve Katalaz Muamelesi

Lakkaz aktivitesi ölçümü için tepkime tüplerinde toplam hacim 5 mL olacak şekilde substrat olarak 4,9 mL ve 1 mM Guaikol içeren 50 mM Sodyum-Asetat

tamponu (pH4,5) ve enzim kaynağı olarak 0,1 mL kültür süpernatantı kullanıldı. 37 °C'de 15 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra 465 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Schimadzu 2450 UV Vis-spectrophotometer) absorbans ölçüldü (Taşpınar ve Kolankaya,1998).

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

Lakkaz enzimi aktivitesi yüksek kültür süpernatantı ile 2,4-DCP'nin deklorinasyon çalışmalarında ortamda bulunabilecek olan lignin peroksidaz ve mangan peroksidazın deklorizasyona olası katkısını engellemek amacı ile çalışma ortamından H₂O₂'nin uzaklaştırılması için katalaz ilave edilmiştir. Bu denemede, pH 7.2 olan 0,25 M KH₂PO₄ tamponuna % 0,2 (v/v) oranında katalaz ilave edilerek hazırlanan enzim preparasyonundan lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantına ilave edilerek kullanılmıştır. Katalaz ilave edilmiş kültür süpernatantı, 2,4-DCP için belirlenen optimum koşullarda deney ortamına ilave edilmiştir.

3.3. Serbest Klor Ölçümleri

Deklorinasyon çalışmalarında yapılan klor ölçümleri literatürde civatiosiyanat yöntemi olarak bilinen ve serbest klor ölçümüne dayanan bir yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde göre, 9 M (100 ml) HNO₃, 0,25 M (100 ml) Fe(NH₄)(SO₄)₂12H₂O ve doymuş Hg(SCN₂) çözeltileri hazırlanmıştır (Greenberg vd.,1992).

3.4. Çözünmüş Oksijen Ölçümleri

Çalışılan parametrelerde belirlenen deklorinasyon optimum koşulları sabit tutularak, başlangıç oksijen miktarı ve deklorinasyona bağlı ortamda tüketilen oksijen miktarı (Jenway 9071 Model) oksijen metre ile ölçülerek takip edilmiştir.

3.5. Deklorinasyon Çalışmaları

3.5.1. Deklorinasyon İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında 2,4-diklorofenol bileşiğinden klor uzaklaştırılmasında ham lakkaz enziminin etkinliği araştırılmıştır. Klor uzaklaştırılması için en uygun koşulların belirlenmesi amacıyla pH değeri, substrat konsantrasyonu, sıcaklık, enzim konsantrasyonu ve süre 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. Deneyle 2 tekrarlı ve birbirinden bağımsız çalışmalar şeklinde yapılmıştır.

3.5.2. pH değerinin Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

Çalışmanın bu aşamasında ortam pH'sının enzimatik deklorinasyona etkisi araştırılmıştır. Çeşitli tampon çözeltilerle pH 3-10 aralığında ortamlar hazırlanmıştır. pH 3-5 için 0,2 M asetat tamponu, pH 6-8 için 0,2 M fosfat tamponu, pH 9-10 için ise 0.2 M Tris-HCl tamponları kullanılmıştır. Deneyle sırasında reaksiyon hacmi 100 ml, klorofenolik bileşik (2,4-diklorofenol) miktarı 150 µM, serbest enzim miktarı 1 ml, deklorinasyon süresi 30 dk, ortam sıcaklığı 30°C'de sabit tutulmuştur. Klorofenolik bileşiklerin çözünürlüğünü sağlamak için %1 etanol ilave edilmiştir.

3.5.3. Substrat Konsantrasyonunun Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

Substrat konsantrasyonunun enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla klorofenolik bileşik (2,4-diklorofenol) konsantrasyonu 50-500 µM arasında çalışılmıştır. Deneyle sırasında pH 4, reaksiyon hacmi 100 ml, serbest enzim miktarı 1

ml, deklorinasyon süresi 30 dk, ortam sıcaklığı 30°C'de sabit tutulmuştur. Klorofenolik bileşiklerin çözünürlüğünü sağlamak için %1 etanol ilave edilmiştir.

3.5.4. Enzim Miktarının Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

Enzim miktarının, enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla klorofenolik bileşik (2,4-diklorofenol) içeren ortama miktarı 0,5-4,0 ml aralığında değişen ham lakkaz enzimi ilave edilmiştir. Deneyler sırasında daha önceki çalışmalarda optimum olarak seçilen pH 4,0 ve başlangıç substrat konsantrasyonu 400 µM olarak sabit tutulmuştur. Diğer koşullar ise, reaksiyon hacmi 100 ml, deklorinasyon süresi 30 dk, ortam sıcaklığı 30°C'dir. Klorofenolik bileşiklerin çözünürlüğünü sağlamak için ortama %1 (v/v) oranında etanol ilave edilmiştir.

3.5.5. İnkübasyon Süresinin Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

İnkübasyon süresinin enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla klorofenolik bileşik (2,4-diklorofenol) içeren ortamdan 0-120 dk arasında örnekler alınarak ölçüm yapıldı. Deneyler sırasında pH 4, başlangıç substrat konsantrasyonu 400 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. İnkübasyon süre optimizasyonunda çözünmüş oksijen konsantrasyonu da takip edilmiştir.

3.5.6. Ortam Sıcaklığının Enzimatik Deklorinasyona Etkisi

Ortam sıcaklığının enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla klorofenolik bileşik (2,4-diklorofenol) içeren ortamın sıcaklığı 10-50°C aralığındaki değerlerde değiştirilerek çalışılmıştır. Deneyler sırasında pH 4, başlangıç substrat

konsantrasyonu 400 μ M, enzim miktarı 4 ml, deklorinasyon süresi 7 dk, reaksiyon hacmi 100 ml'dir. Klorofenolik bileşiklerin çözünürlüğünü sağlamak için %1 etanol ilave edilmiştir.

3.6. 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.

3.7. FTIR Analizleri

Klor uzaklaştırma işlemi öncesi ve sonrası FTIR analizleri yapılmıştır. Sıvı örnekler KBr sıvı hücrelerine 10 μ l emdirilmiştir. Analizler, KBr sıvı hücrelerinde Perkin Elmer FT-IR 100 spektrometer'da gerçekleştirilmiştir. FTIR analizleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü'nde yapılmıştır.

3.8. Toksikite Çalışmaları

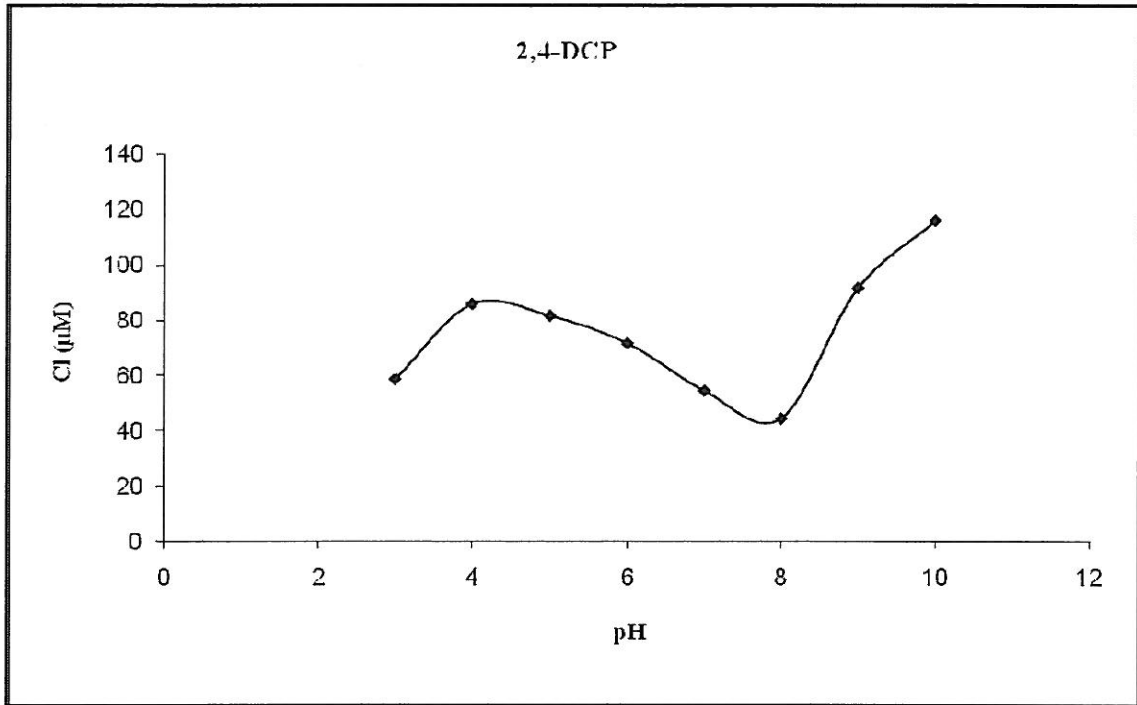
Çevresel açıdan kirletici, toksik ve uzun süre bulunduğu ortamda etkisini koruyabilen bir bileşik olan 2,4-diklorofenolün, lakkaz enzimiyle biyoyıkımı hedeflenmiştir. Biyolojik yıkım çalışmaları yukarıda bahsedildiği biçimde sistematik olarak gerçekleştirilmiş ve tüm kirleticilerin hem yıkım öncesinde ve hem de yıkım çalışmaları sonrasında toksisitelerindeki değişim yapılan ölçümlerle takip edilmiştir. Toksikite ölçümleri *Vibrio fischeri*'nin sahip olduğu lusiferaz enzimi ile gerçekleştireceği ışımının ölçümüne dayanan mikrotoksikite test cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Böylece yıkıma uğratılan 2,4-diklorofenolün aynı zamanda toksisitesindeki değişim literatürde kabul gören standart bir yöntem ile belirlenmiş ve takip edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Lakkaz Enzimiyle 2,4-Diklorofenol Deklorinasyonu İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi

4.1.1 pH'ın 2,4-Diklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi

2,4-diklorofenolden fenol uzaklaştırmasında pH'ın etkisini belirlemek için geniş bir pH aralığında yapılan çalışma sonucunda en uygun değer pH 4,0 olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1.1.1. Lakkaz enzimiyle 2,4-diklorofenolden klor uzaklaştırmasında ortam pH değerinin etkisi. (Çalışma koşulları: başlangıç substrat konsantrasyonu 150 µM, enzim aktivitesi 23 U/ml, enzim miktarı 1 ml, sıcaklık 30 °C, süre 30 dk).

4.1.1.2. pH'm İstatiksel Değerlendirmesi

Çizelge 4.1.1.2.1. pH Parametresinin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

ANOVA

PH

	Karesel Yanılgı Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Sig.
Gruplar Arasında	7524,494	7	1074,928	2,870	,081
Gruplar Dahilinde	2995,916	8	374,489		
Toplam	10520,410	15			

pH değerleri arasındaki farka bakıldığında sig değerinin 0,05 ten büyük olması nedeni ile ($0,81 > 0,05$) pH değerleri arasındaki fark anlamsızdır.

PH

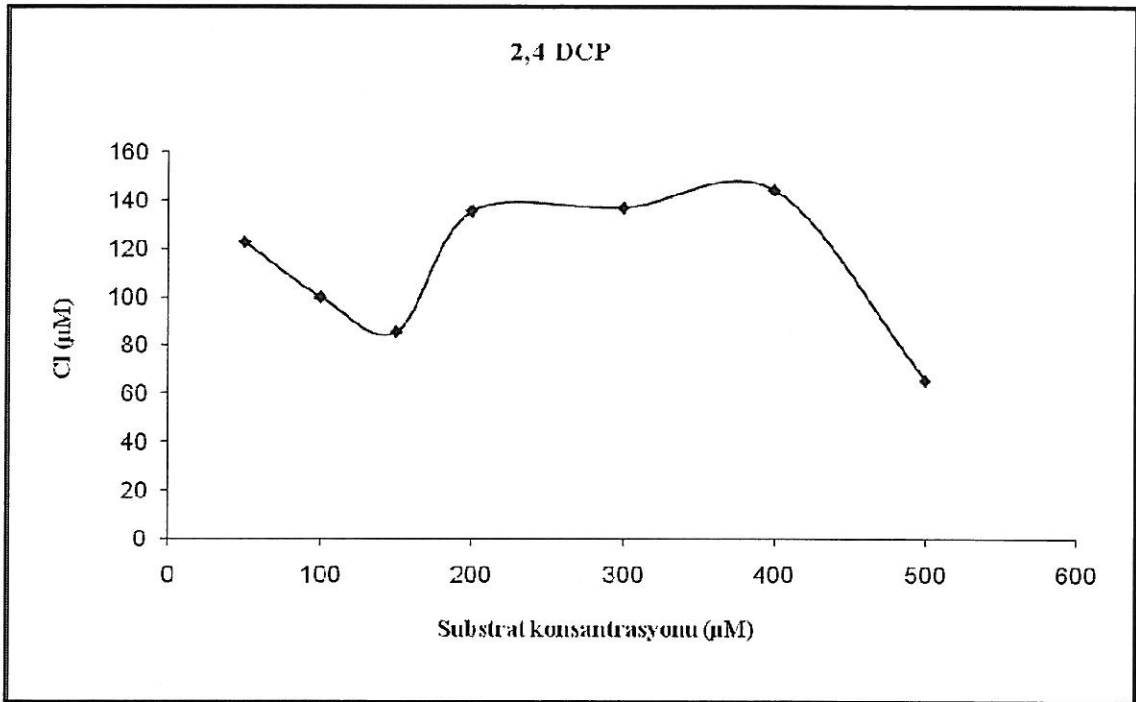
	VAR00011	N	Subset for alpha = .05
			1
Tukey HSD ^a	6,00	2	44,2858
	5,00	2	54,2857
	1,00	2	58,5714
	4,00	2	70,7143
	3,00	2	82,1429
	2,00	2	85,0000
	7,00	2	92,1429
	8,00	2	115,7143
	Sig.		,070

Gruplar için homojen altkümelerin anlamları gösterilmiştir.

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

4.1.2 Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun 2,4-Diklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi

2,4-diklorofenolden fenol uzaklaştırmasında başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneysel çalışmanın sonucunda en uygun başlangıç substrat konsantrasyonu 400 μM olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.1.2.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1.2.1 Lakkaz enzimiyle 2,4-diklorofenolden fenol uzaklaştırmasında başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4; enzim aktivitesi 23 U/ml; enzim miktarı 1 ml; sıcaklık 30 °C; süre 30 dk).

4.1.2.1. Substrat Miktarının İstatiksel Değerlendirmesi

Çizelge 4.1.2.1.1.

ANOVA

SUBSTRAT

	Karesel Yanılgı Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Sig.
Gruplar Arasında	10565,778	6	1760,963	14,537	,001
Gruplar Dahilinde	847,959	7	121,137		
Toplam	11413,737	13			

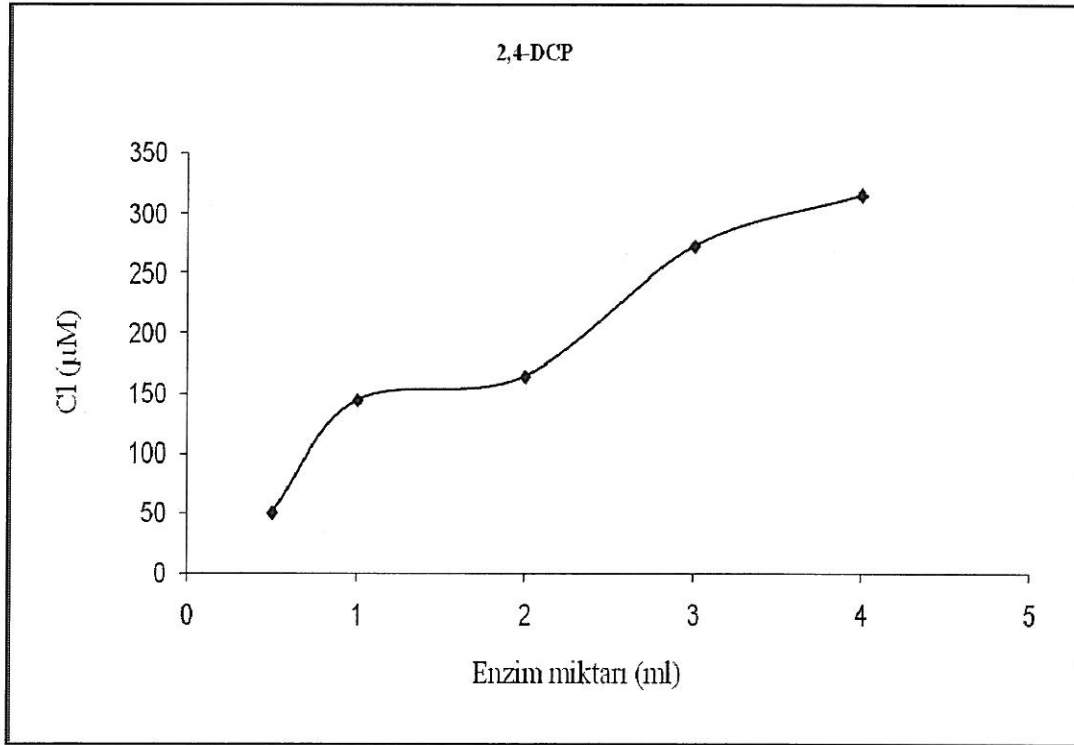
Substrat değerleri arasındaki farka bakıldığında sig değerinin 0,05 ten küçük olması nedeni ile ($0,01 < 0,05$) Substrat değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur.

SUBSTRAT

VAR00013	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
Tukey HSD ^a					
7,00	2	66,4286			
3,00	2	85,0000	85,0000		
2,00	2	100,0000	100,0000	100,0000	
1,00	2		122,1429	122,1429	122,1429
4,00	2			135,7100	135,7100
5,00	2			137,1429	137,1429
6,00	2				144,2857
Sig.		,149	,101	,101	,479

4.1.3. Enzim Miktarının 2,4-Diklorofenolün Deklorinasyonuna Etkisi

Enzim miktarının enzimatik deklorinasyona 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 2,4-diklorofenolden klor uzaklaştırmasında enzim miktarının etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4; başlangıç substrat konsantrasyonu 400 µM; enzim aktivitesi 23 U/ml; sıcaklık 30 °C; süre 30 dk).

4.1.3.1. Enzim Miktarının İstatiksel Değerlendirmesi

Çizelge 4.1.3.1.1.

ANOVA

enzim miktarı

	Karesel Yanılgı Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Sig.
Gruplar Arasında	90366,124	4	22591,531	31,395	,001
Gruplar Dahilinde	3597,966	5	719,593		
Toplam	93964,090	9			

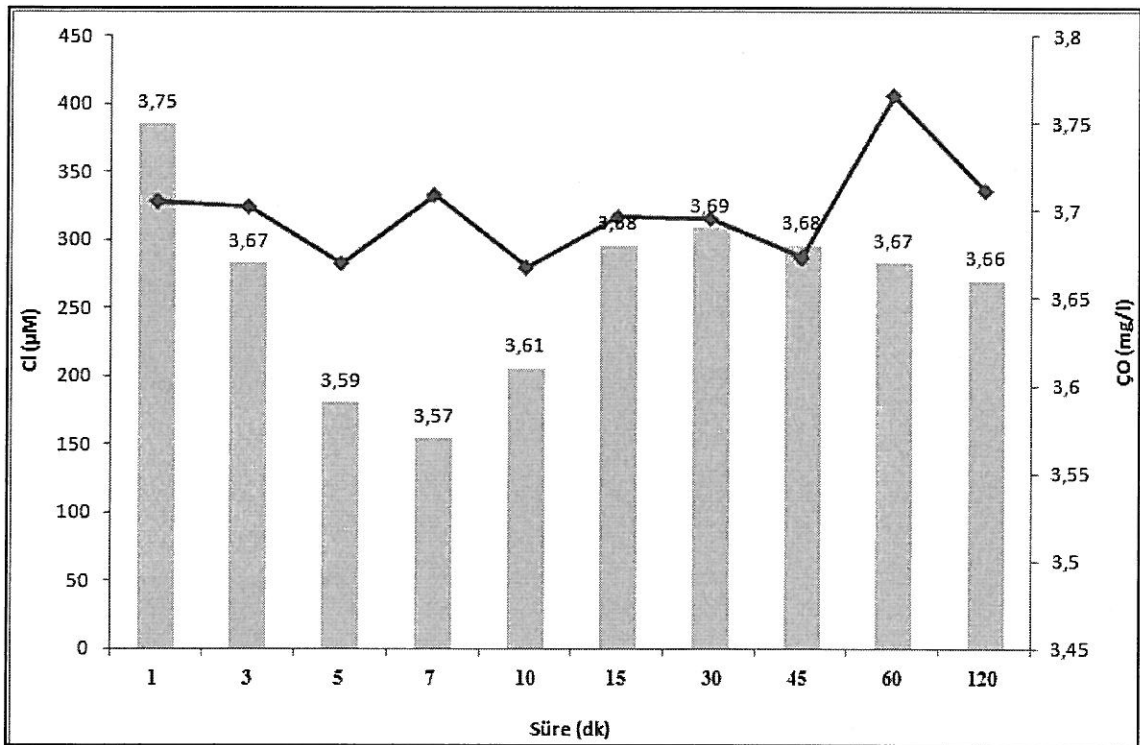
emiktari

VAR00015	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	
Tukey HSD ^a	1,00	2	49,2857		
	2,00	2	144,2856	144,2856	
	3,00	2		165,0000	
	4,00	2			272,8571
	5,00	2			315,7143
	Sig.		,078	,928	,555

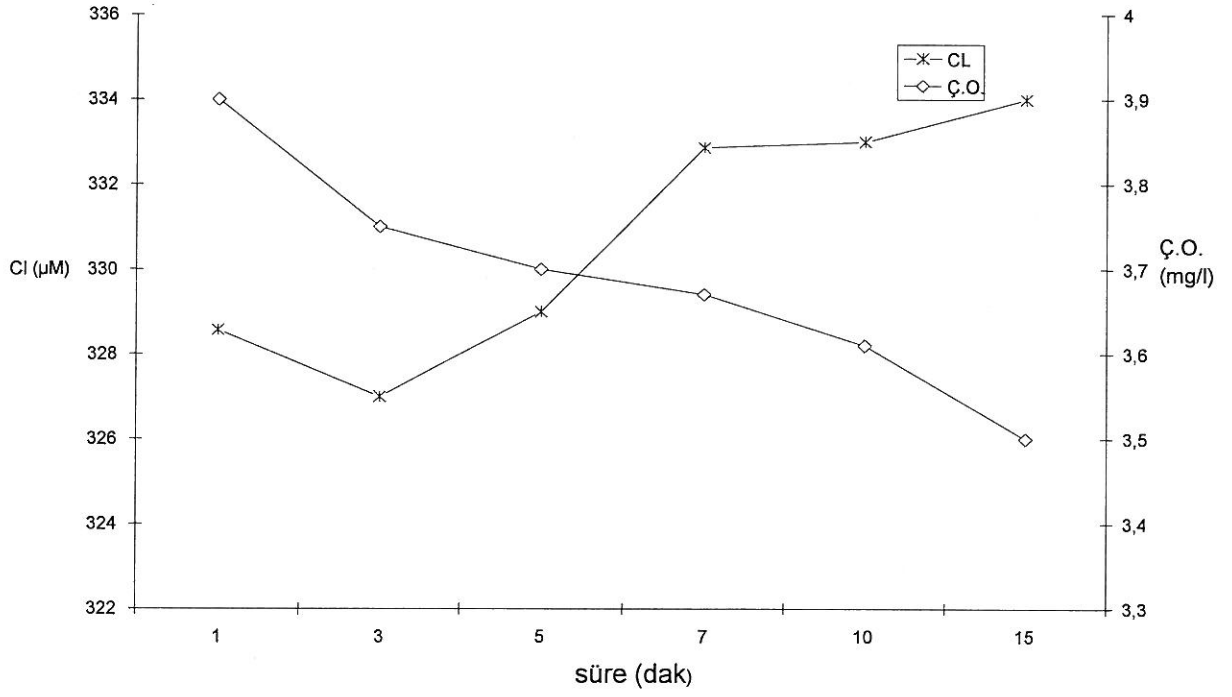
Enzim miktarı değerleri arasındaki farka bakıldığında sigma değerinin 0,05'ten küçük olması nedeni ile ($0,01 < 0,05$) enzim miktarı değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur.

4.1.4 Sürenin 2,4-Diklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi

İnkübasyon süresinin 2,4-diklorofenolden klor uzaklaşmasına olan etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda en uygun süre 7 dk olarak belirlenmiştir. İnkübasyon süresi optimizasyonunda eş zamanlı olarak çözülmüş oksijen konsantrasyonu da takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1.4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1.4.1. Lakkaz enzimi ile 2,4-diklorofenol'den klor uzaklaşması sırasında ortamdaki çözülmüş oksijen konsantrasyonundaki değişim (çalışma koşulları: pH 4, 400 µM başlangıç substrat konsantrasyonu; sıcaklık 30 °C; enzim aktivitesi 22.792U/ml; enzim miktarı 4 ml)



Şekil 4.1.4.2. Lakkaz enzimiyle 2,4-diklorofenolden klor uzaklaştırılmasında sürenin etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4; başlangıç substrat konsantrasyonu 400 µM; enzim aktivitesi 23 U/ml; enzim miktarı 4 ml; sıcaklık 30 °C).

4.1.4.1. Sürenin İstatiksel Değerlendirmesi

Çizelge 4.1.4.1.1.

ANOVA

SÜRE

	Karesel Yan Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Sig.
Gruplar Arasında	23748,978	9	2638,775	3,193	,042
Gruplar Dahilinde	8263,257	10	826,326		
Toplam	32012,234	19			

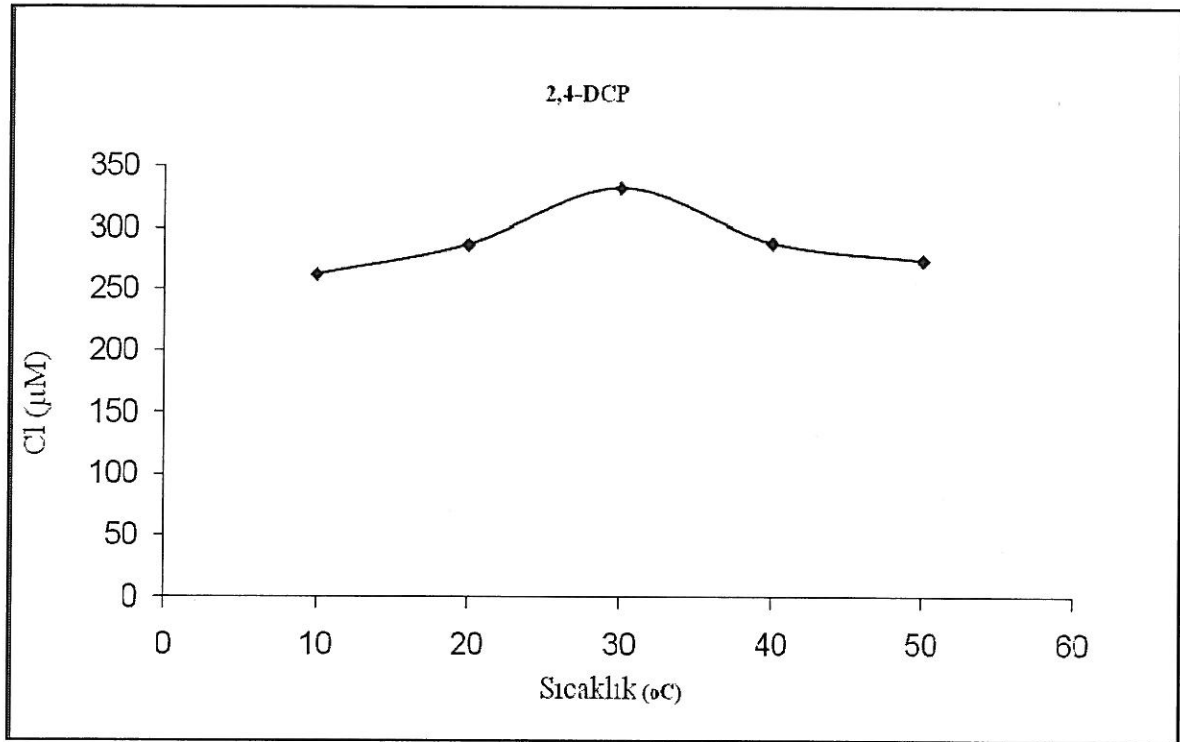
SÜRE

VAR00017	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Tukey HSD ^a			
5,00	2	280,7143	
3,00	2	282,8572	
8,00	2	287,8572	
7,00	2	315,7142	315,7142
6,00	2	317,1429	317,1429
2,00	2	325,0001	325,0001
1,00	2	329,2857	329,2857
4,00	2	333,5715	333,5715
10,00	2	336,4286	336,4286
9,00	2		405,7143
Sig.		,650	,162

Süre değerleri arasındaki farka bakıldığında sig değerinin 0,05 ten ($0,042 < 0,05$) küçük olması nedeni ile Süre değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur.

4.1.5 Sıcaklığın 2,4-Diklorofenol Deklorinasyonuna Etkisi

Sıcaklığın 2,4-diklorofenolün enzimatik deklorinasyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda optimum sıcaklık 30 °C olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.1.5.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1.5.1 Lakkaz enzimiyle 2,4-diklorofenolden klor uzaklaştırmasında sıcaklığın etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4,0; başlangıç substrat konsantrasyonu 400 µM; enzim aktivitesi 23 U/ml; enzim miktarı 4 ml; süre 7 dk).

4.1.5.1. Sıcaklığın İstatiksel Değerlendirmesi

Çizelge 4.1.5.1.1.

ANOVA

sicaklik

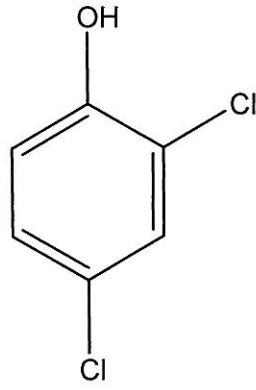
	Karesel Yanılgı Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Sig.
Gruplar Arasında	5779,593	4	1444,898	,978	,495
Gruplar Dahilinde	7388,770	5	1477,754		
Toplam	13168,363	9			

sicaklik

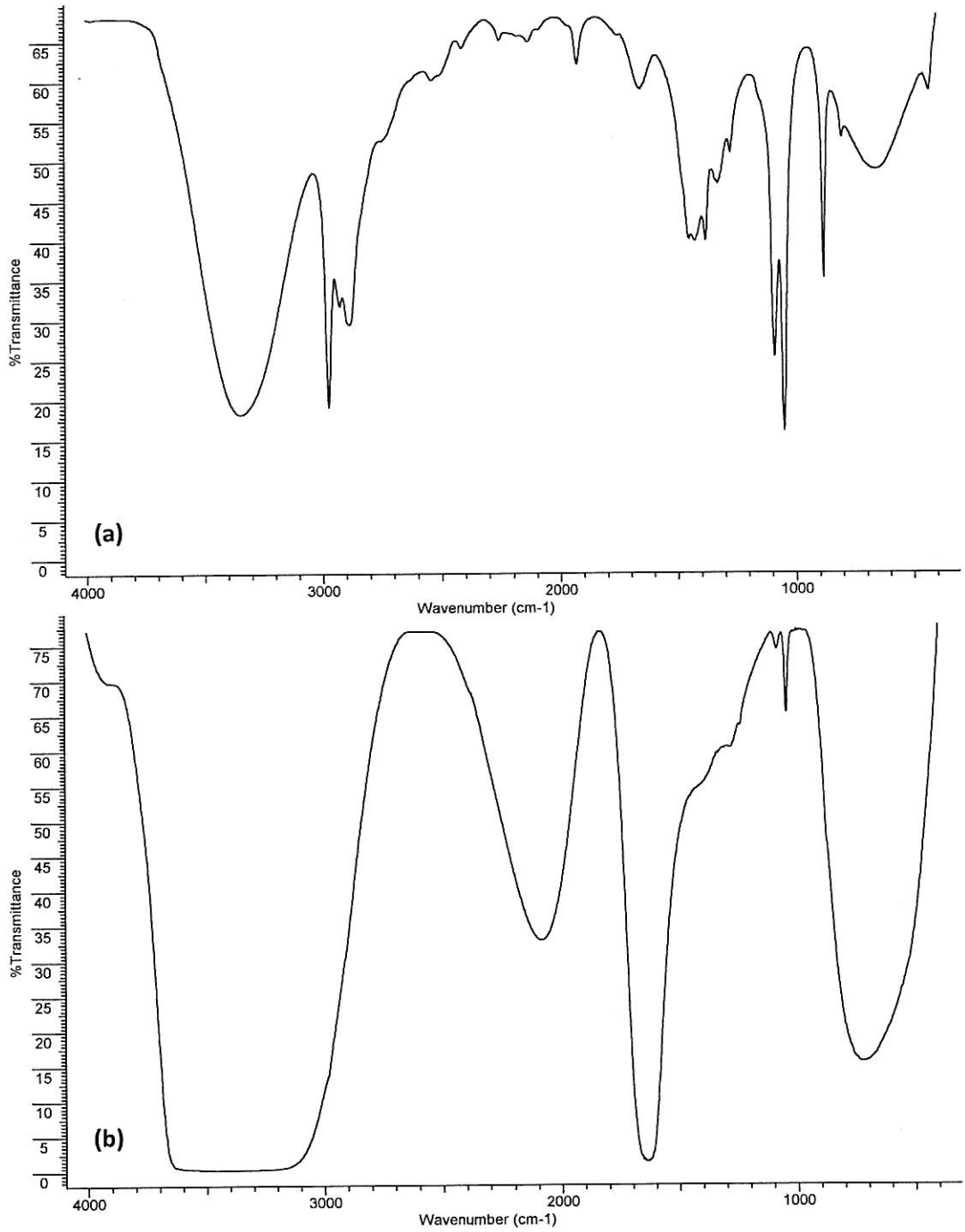
		Subset for alpha = .05	
VAR00019		1	
Tukey HSD ^a	1,00	2	262,8571
	5,00	2	274,2857
	2,00	2	287,1428
	4,00	2	288,5714
	3,00	2	333,5714
	Sig.		,444

Sıcaklık değerleri arasındaki farka bakıldığında sigma değerinin 0,05'ten büyük olması nedeni ile ($0,495 > 0,05$) sıcaklık değerleri arasındaki fark anlamsızdır.

4.2. 2,4 Diklorofenolün FTIR Spektrum Analiz Sonuçları



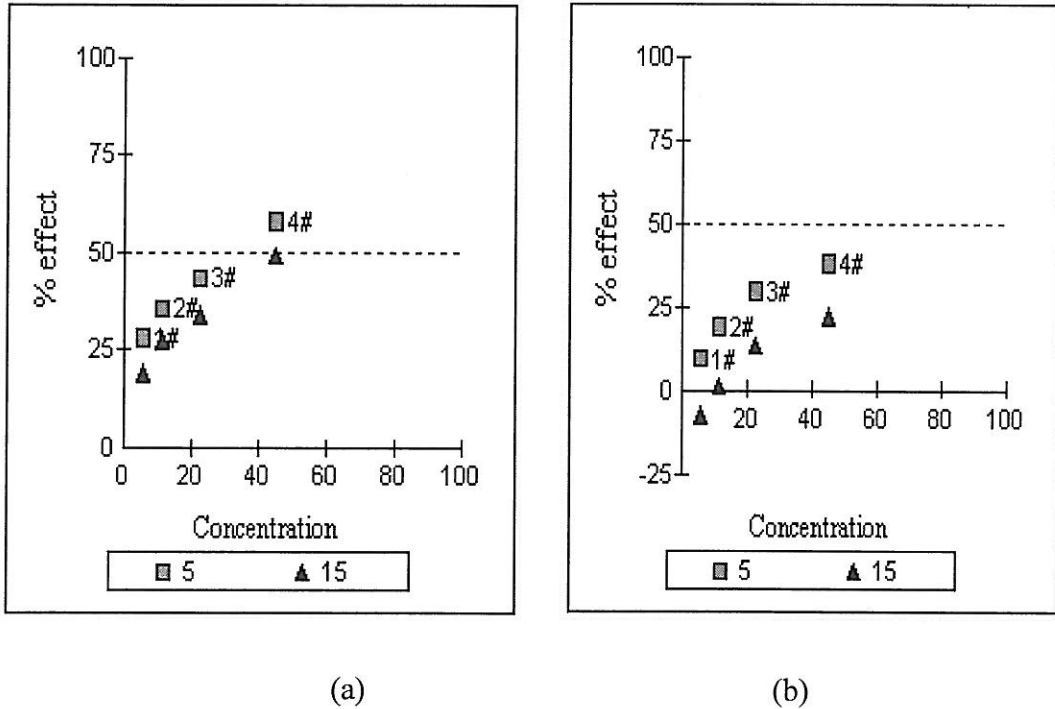
Şekil 4.2.1. 2,4-Diklorofenol molekülünün kimyasal yapısı



Şekil 4.2.1.2. 2,4 Diklorofenol molekülünün IR titreşim spektrumları (a) 2, 4-Diklorofenol etanol çözücüsündeki spektrumu, (b) 2, 4-Diklorofenol 'un bozunduktan sonra spektrumu.

4.3. Toksikite Sonuçları

Deklorinasyon öncesi ve sonrası 2,4-diklorofenol'ün toksisite değerleri Şekil 4.3.1 ve Çizelge 4.3.1'de verilmiştir.



Şekil 4.3.1. 2,4-DCP'nin toksisite değeri. (a) enzimatik deklorinasyondan önce (b) enzimatik deklorinasyondan sonra.

Çizelge 4.3.1. 2,4-diklorofenol'ün deklorinasyon öncesi ve sonrası EC_{50} değerleri

	5. dakikadaki EC_{50}		15. dakikadaki EC_{50}	
	Deklorinasyon öncesi	Deklorinasyon sonrası	Deklorinasyon öncesi	Deklorinasyon sonrası
2,4-DCP	%28	%66	%50	%190

TARTIŞMA

Klorofenoller; atık yakılması, tarım ilaçlarının kontrolsüz olarak kullanılması ve bazı endüstriyel aktivitelerden dolayı ortaya çıkmaktadır (Tarighian, et al., 2003). Fenolik maddelerin toksisitesi ve kanserojen etkilerinden dolayı, arıtılmadan doğaya deşarj edilmeleri oldukça tehlikeli olup, deşarjdan önce uygun yöntem ya da yöntemler ile arıtılmaları gerekmektedir.

Biyolojik arıtım, fiziksel ve kimyasal arıtımın neden olduğu ikincil kirlilik problemleri oluşturmaması ve arıtım sürecinin ilave bir kimyasal uygulama gerektirmemesi gibi üstünlüklere sahip olması açısından tercih edilmektedir. Biyolojik arıtımda sahip oldukları metabolik çeşitlilik nedeni ile mikroorganizmalar vazgeçilmez bir kaynaktır. Bu nedenle mikrobiyal hücreler ve onların sahip oldukları enzim ve/ veya enzim sistemleri kullanılarak pek çok kirleticinin arıtımı yapılabilmektedir. Doğada artan konsantrasyonları ve yıkıma olan dirençleri ile dikkat çeken, kimya endüstrisinin ürünü olan, yeni sentez bileşikler çevre kirliliği ile mücadelede önemli bir konumda yer almaktadır.

Mikrobiyal hücrelerin arıtım teknolojilerinde kullanım üstünlükleri bulunmakla birlikte enzim ya da karışık enzim preparatları da kullanım açısından önemli üstünlüklere sahiptir. Enzimlerle muamele son yıllarda çevredeki toksik ksenobiyotiklerin iyileştirilmesinde kullanılan alternatif bir yöntemdir. Yapılan çalışmalarda, fenoller ve aromatik aminler; peroksidaz, lakkaz veya tirozinaz gibi çeşitli fenoloksidazlarla muamele sonucunda sudan uzaklaştırılabilmektedir. Buradaki mekanizma bu kirleticilerin enzimlerle serbest radikallere veya quinonlara oksidasyonunun sağlanmasıdır (Ahn, et al., 2002).

Literatürde çeşitli basidiyomiset türleri ile klorofenolik bileşiklerin yıkıma uğratıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Arisoy ve Kolankaya, 1997; Arisoy, 1998; Reddy and Gold, 2000).

Klorofenollerin basidiyomisetlerle dönüştürülmesi çalışmaları yüksek mineralizasyonla sonuçlanmıştır(50-70%) (Joshi and Gold, 1993 ; Leontievsky, et al., 2000; Reddy and Gold, 2000; Reddy, et al., 1998; Valli and Gold, 1991).

Pentaklorofenol ve triklorofenollerin yıkımı sırasında ortaya çıkan ara ürünler monoklorofenol ve diklorofenollerin yıkımı sırasında çıkan ara ürünlerden daha fazladır ve bu durum klorofenolün yıkıma karşı olan direnciyle ilişkilendirilmiştir. Aromatik halkaya bağlı olan klor atomlarının sayısı arttıkça bileşiğin yıkıma karşı olan direncinin de arttığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle PCP ve TCP'nin yıkımı mono ve diklorofenollerin yıkımından daha zordur (Janik and Wolf, 1992). Bununla beraber bazı araştırmacılar orto ve para pozisyonunda klor bulunan klorofenollerin, meta pozisyonunda klor bulunan klorofenollere göre fungal enzimler tarafından daha iyi metabolize olabildiklerini göstermişlerdir (Dec and Bollag, 1990; Kadhim, et al., 1999; Rodakiewicz- Nowack, et al., 1999).

Genel olarak, o-klorofenollerin lakkaz ile katalizlenmesi p-klorofenollerin lakkaz ile katalizlenmesinden daha hızlı gerçekleşir. Benzen halkasındaki -OH grubu aktif bir gruptur, bağlı olduğu benzen halkasını da aktive eder ve elektrofilik grupla tepkimesini kolaylaştırır. Elektrofilik grup önce orto ve para pozisyonuyla tepkimeye girer. Orto pozisyonu elektrofilik pozisyon için para pozisyonuna göre daha kolaydır(Zhang, et al., 2007).

Bu çalışmada 2,4-diklorofenolden klor uzaklaştırmak için fenoloksidaz grubu bir enzim olan lakkaz enzimini kullanılmıştır. Lakkaz sentezi için en zengin mikroorganizma grubu beyaz çürükçül funguslardır. Beyaz çürükçül fungusların bir üyesi olan *Trametes versicolor* sunulan tez çalışmasında enzim üreticisi olarak kullanılmıştır. Literatürde *Trametes versicolor*'un lakkaz üreticisi olarak kullanıldığını bilinmektedir (Arcand and Archibald, 1991; Ünal ve Kolankaya, 2001; Gedikli, 2008).

2,4-diklorofenolün *Trametes versicolor* lakkazı ile deklorasyonu için optimum koşullar belirlenmiştir. Bu amaçla; pH, başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık, süre ve enzim miktarı parametreleri çalışılmıştır. İnkübasyon koşullarının enzimatik deklorasyona etkisinin araştırıldığı serbest enzimle yapılan çalışmada, optimum süre 7

dakika, optimum pH 4,0, optimum sıcaklık 30°C, uygun substrat konsantrasyonu 400 µM ve optimum enzim miktarı 4 ml olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler varyans analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Enzimatik reaksiyonlarda pH önemli bir parametredir. Lakkaz enzimi geniş bir pH aralığında çalıştığı bilinen, ancak optimum değerinin 4,0 ile 5,0 arasında olan bir enzimdir. Bu nedenle, tez çalışmasında geniş bir pH aralığı denenmiştir. Denenen farklı pH değerleri için uygun tamponlar kullanılmıştır. Denemelerde kullanılan tampon çözeltiler 3.5.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanarak pH 3-10 aralığında çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen veriler incelendiğinde en yüksek deklorinasyon değerine pH 4,0'de ulaşılmıştır (Şekil 4.1.1). Bu da lakkaz enziminin optimum değeri ile uygundur. Yapılan istatistiksel analizin sonucunda, pH değerleri arasındaki farka bakıldığında p değerinin 0,05 ten ($0,81 > 0,05$) büyük olması nedeni ile pH değerleri arasındaki fark anlamsız olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.1.2.1). Burada daha geniş bir pH değerlerinde çalışma yapılması ile anlamlı sonuçlar elde edilebilir. Ancak yapılan çalışmada en yüksek deklorinasyon değerine pH 4,0'da ulaşılması nedeni ile optimum değer olarak belirlenmiştir. Ayrıca Şekil 4.1.1.1. incelendiğinde bazik pH değerlerinde elde edilen deklorinasyon değerlerinin enzimatik olmaktan çok kimyasal bir etki ile olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle optimum değer olarak pH 4,0 seçilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda bu değer sabit tutulmuştur.

Literatürde yapılan benzer çalışmalar incelendiğinde lakkaz enzimi ile çeşitli klorofenolik bileşiklerin lakkaz enzimi ile deklorinasyonunda optimum pH değeri 5,0-5,5 arasında bulunduğu bildirilmiştir (Ünal, 2004; Silva, et al., 2009; Zhang, et al., 2009). Sunulan tez çalışmasında elde edilen veriler incelendiğinde pH 5,0 ile pH 4,0 elde edilen deklorinasyon değerlerinin bir birine yakın olduğu görülmektedir (Şekil 4.1.1.1). Ancak az bir farkta olsa pH 4,0'de elde edilen deklorinasyon değeri daha yüksektir.

Bilindiği üzere substrat konsantrasyonunun artması enzimatik reaksiyonların belirli bir oranda artışına neden olur. Şekil 4.1.2.1'den de görülebileceği gibi substrat konsantrasyonunda 150 µM'dan sonra artış ile enzimatik deklorinasyonunda arttığı görülmektedir. Yapılan optimizasyon çalışmasının sonucunda 2,4-DCP için en uygun

başlangıç konsantrasyon değeri 400 μ M olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.2.1). Yapılan istatistik analizin sonucunda, substrat değerleri arasındaki farka bakıldığında p değerinin 0,05'ten ($0,01 < 0,05$) küçük olması nedeni ile substrat değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.1.2.1.1). Literatürde düşük konsantrasyondaki klorofenolik bileşiklerle (< 100 mg/ lt) daha etkin sonuçların elde edildiği görülmektedir (Armenante, et al., 1994; Wang, et al., 2000). Bu nedenle 400 μ M lık bir başlangıç konsantrasyonunda nispeten yüksek sayılabilecek bir deklorinasyon değerinin elde edilmesi çalışma sonuçları açısından önemli olarak değerlendirilmektedir.

Enzimatik deklorinasyona enzim miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda 0,5-4 ml arasındaki enzim miktarları denenmiştir. 2,4-DCP'nin lakkaz enzimiyle deklorinasyonunda en uygun enzim miktarı 4 ml olarak belirlenmiştir. Beklenildiği gibi enzim miktarı arttıkça ortamda bulunan serbest klor miktarının da arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.3.1). Yapılan istatistiksel analizin sonucunda enzim miktarı değerleri arasındaki farka bakıldığında p değerinin 0,05'ten ($0,01 < 0,05$) küçük olması nedeni ile enzim miktarı değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur denilir (Şekil 4.1.3.1.1).

Belirlenen uygun pH, substrat konsantrasyonu ve enzim miktarı değerleriyle inkübasyon süresinin 2,4DCP'den klor uzaklaştırılması üzerine etkisinin belirlendiği çalışmada en uygun süre 7dk. olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.4.1). Yapılan istatistiksel analizin sonucunda süre değerleri arasındaki farka bakıldığında p değerinin 0,05'den ($0,042 < 0,05$) küçük olması nedeni ile süre değerleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.1.4.1.1). Bu nedenle süredeki değişikliklerin deklorinasyon miktarını değiştirdiğini söyleyebiliriz. Elde edilen sürenin 7 dakika olması literatürle karşılaştırıldığında nispeten kısa bir süre olarak değerlendirilmektedir.

Klorofenolün *P.chryso sporium* kültürüyle mineralizasyonu ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır (Gill and Arora, 2003; Joshi and Gold, 1993; Mileski, et al., 1988; Reddy, et al., 1998; Valli and Gold, 1991). 2,4-DCP'ün mineralizasyonunu çalışmış ve bu çalışma 24 günlük bir inkübasyon süresinin ardından substratın yaklaşık olarak %50'sinin CO₂'ye indirildiğini göstermiştir (Valli and Gold, 1991). Lakkaz enzimiyle 2,4-DCP'nin yıkımıyla ilgili benzer bir çalışmada uygun süre 10 saat olarak

bildirilmiştir (Zhang, et al., 2007). Literatür ile karşılaştırıldığında elde edilen optimum sürenin kısa olduğu söylenebilir. Burada kısa sürede elde edilen yüksek deklorinasyon değerinin çevresel uygulamalar açısından önemli bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

2,4-DCP'ün lakkazla deklorinasyonunun optimizasyonu için son parametre olarak sıcaklık çalışılmıştır. Sıcaklık değerleri 10-50°C arasında geniş bir aralıkta çalışılmış ve optimum sıcaklık 30°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.5.1). Daha önce yapılan çalışmalarda lakkazın optimum çalışma sıcaklığı belirlenmiştir. 2,4-diklorofenolün kitozan ile immobilize edilmiş lakkazla deklorinasyon çalışmasında uygun sıcaklık 35-45°C olarak bulunmuştur (Zhang, et al., 2009). Yapılan istatistiksel analizin sonucunda sıcaklık değerleri arasındaki farka bakıldığında p değerinin 0,05'ten ($0,495 > 0,05$) büyük olması nedeni ile sıcaklık değerleri arasındaki fark anlamsızdır (Şekil 4.1.5.1.1). Bu da bize sıcaklık değişiminin deklorinasyon miktarı üzerinde etkisinin olmadığını göstermektedir. Daha geniş bir sıcaklık aralığında çalışılırsa daha etkin sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir. Şekil 4.1.5.1 incelendiğinde en yüksek sıcaklık değerine 30 °C de ulaşılması nedeni ile bu değer optimum olarak seçilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda sabit tutulmuştur.

Lakkaz enzimi oksidasyon için oksijene gereksinim duyan bir enzimdir. Bu çalışmada yapılan her ölçümde inkübasyon öncesi ve sonrasında ortamdaki oksijen miktarı ölçülmüş ve yapılan çalışma sonucunda ortamdaki oksijen miktarının düzenli olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Buradaki azalmanın lakkaz enziminin aktivitesinden kaynaklanıp kaynaklanmadığını kanıtlamak için çalışma yapılmıştır. Kültür sıvısında bulunabilecek peroksidaz grubu bir enzimin de deklorinasyonda rol oynayıp oynamadığının anlaşılabilmesi için reaksiyon ortamına katalaz ilavesi yapılmıştır. Böylece ortamda bulunabilecek olası H_2O_2 'in de ortamdan uzaklaştırılması ve peroksidaz enziminin aktivitesinin engellenmesi sağlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda katalaz ilave edilmeyen deney grubundan farklı bir sonuca ulaşılmamıştır. Elde edilen bu veriler klor uzaklaştırılmasından başlıca lakkazın sorumlu olduğunu göstermektedir.

Klor uzaklaştırıldıktan sonra 2,4-diklorofenolün kimyasal yapısındaki değişiklikler FTIR analizleri ile belirlenmiştir.

2,4-diklorofenol molekülünün etanoldeki spektrumunda 3351 cm^{-1} 'de şiddetli ve geniş pik O-H gerilme titreşim bandına aittir. 2975, 2928 ve 2887 cm^{-1} 'de aromatik C-H gerilme titreşim gözlenmektedir. 1425 cm^{-1} 'de C=C gerilme titreşimi, 1421, 1381 ve 1331 cm^{-1} 'de C-C gerilme titreşimleri gözlenir. 1275 cm^{-1} 'de C-O gerilme titreşimi gözlenirken 1090 ve 1050 cm^{-1} 'de düzlem içi C-H eğilme titreşimi, 804 ve 662 cm^{-1} 'de düzlem dışı C-H eğilme titreşimi gözlenmiştir.

2,4-Diklorofenol molekülünün lakkaz enzimi içinde titreşim spektrumunda piklerin genişlikleri artmakla birlikte bandların şiddetler artmıştır. Gözlenen geniş, yayvan ve şiddetli pikler molekül ve çözücü arasındaki yük transferi, elektrostatik etkileşimleri ve bozunmalar meydana geldiğini gösterir (Şekil 4.2.1.2). Cl atomunun elektronegatif özelliğinden dolayı molekülde meydana gelebilecek bozunmalar bu atomlar üzerinde olacaktır. Bu durumda molekülde bozunmalar meydana geldiği Cl atomunun molekülden ayrıldığını söyleyebiliriz. Bunun yanı sıra OH grubundaki oksijen atomunun elektronegatif olması bu gruba yakın olan Cl atomunun daha önce bozunmasına sebep olur.

Bu tez çalışmasında deklorasyonu gerçekleştirilen 2,4-DCP bileşiğinin aynı zamanda toksisite durumundaki olası değişimler de belirlenmiştir. Bu amaçla, 2,4-DCP bileşiğinin deklorasyon öncesi ve bulunan optimum koşullarda deklorasyonunun sonrasında toksisite tayinleri Microtox cihazı ile yapılmıştır. Çalışma sonucunda 2,4-DCP 5. ve 15. dakikadaki EC_{50} değerlerine göre toksisitesinde bir azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.1).

Deklorasyon sürecinin doğal bir sonucu olarak reaksiyon ortamında serbest klor miktarı artmaktadır. Reaksiyon ortamında klor konsantrasyonunun artışı da toksik bir özellik katabilir. Bu nedenle toksisite tayini çalışmalarında oluşan serbest klorun toksik etkisini engellemek için ortama sodyum tiyosülfat ilave edilmiştir. Toksisite ölçümlerinde ortamda klor bileşiklerinin bulunması test organizması olan *Vibrio fischeri* için de toksik bir etki göstermektedir. *V. fischeri* klora oldukça hassas bir organizmadır.

Bu nedenle microtox yöntemi ile toksisite belirlenmesi sürecinde klor bileşikleri ortamda var ise, sodyum tiyosülfat kullanılarak bu klorların baskılanması önerilmektedir. Tez çalışması kapsamında da bu gerekçeler ile toksisite ölçümleri sırasında ortamda oluşan klorlar baskılanmış ve toksisite ölçümleri yapılmıştır. Bu durumda toksisitenin azalması oluşan yıkım ürünlerinin toksik olmadığı ya da başlangıç bileşiğine kıyasla daha az toksik olduğu fikrini vermektedir.

Çalışma sonunda elde edilen veriler incelendiğinde *T. versicolor*'dan elde edilen yüksek lakkaz aktivitesine sahip kültür süpenatantı ile 2,4 diklorofenolden belirlenen optimum koşullarda etkin bir biçimde klor uzaklaştırılabildiği görülmüştür. Deklorinasyon süreci sonunda oluşan bileşik 2,4 diklorofenole kıyasla daha az toksik olduğu microtox analizleri ile belirlenmiştir. Bu çalışmada aktivitesi indüklenmiş ham lakkaz ile 2,4-diklorofenol bileşiğinin hem deklorinasyonu hem de detoksifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda deklorinasyona uğratılmış 2,4 diklorofenolün daha ileri yıkım reaksiyonlarının belirlenmesi gereği vardır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahn, M. Y., Dec, J., Kim, J. and Bollag J. M., 2002, Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. *J. Environ. Qual.*, 31, 1509–1515.
- Aktaş N., Çiçek H., Ünal Taşpınar A., Kibarer G., Kolankaya N. and Tanyolaç A., 2001, Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1 naphthol, *Bioresource Technology*, 80, 29-36.
- Alcalde Miguel, 2007, Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications, *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*, J. Poliana, AP. MacCabe (Eds), Springer, Netherlands, An invitro toxicity test system—Acute effects of some chlorinated compounds, 461-470.
- Arcand, L. and Archibald, F. S., 1991, Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 194-202.
- Armenante, P. M., Pal, N. and Lewandowski, 1994, G. Role of mycelium and extracellular protein in the biodegradation of 2,4,6-tricklorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1711-1718.
- Arisoy, M. 1998, Biodegradation of chlorinated organic compounds by white-rot fungi. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60:872-876.
- Arisoy, M., Kolankaya, N., 1997, Biodegradation of lindane by *Pleurotus Sajor-caju* and toxic effect of lindane and its metobolites on mice, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59, 352- 359.

- Agency for Toxic Substances & Disease Registry, Public Health Statement for Chlorophenols, 1999.
- Aydın, M.E., Yıldız, S., Özcan, S., Kara, G., 2007, Atıksuların Akut Toksisitesinin Belirlenmesinde Farklı Biotest Yöntemlerinin Uygulanması, 7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, 694-700.
- Beilen, J. and Li, Z., 2002, Enzyme Technology: An Overview, Current Opinion in Biotechnology, 13, 338–344.
- Burns R. G., Dick R. P., 2002, Enzymes in the environment, Activity, Ecology and Applications, Copyright Marcel Dekker, p.515-525.
- Burton, S.G., Boshaff, A., Edwards, W. and Rose, P.D., 1998, Biotransformation of phenol using immobilized polyphenol oxidase, J. Mol. Catal. B Enzymatic, 5, 411.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., 2006, Biology, Benjamin Cumming, Pearson Education.
- Chivukula, M. and Renganathan, V., 1995, Phenolic azo-dye oxidation by laccase from *Pyricularia orizae*, Appl. Environ. Microbiol., 61, 4374.
- D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V. and Sermanni, G.G., 2000, Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater, Journal of Biotech., 77, 265-273.
- Davis, S. and Burns, R.G., 1990, Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases, Appl Microbiol Biotechnol, 32, 721-726.

- Daphtoxkit FTM magna, 2006, Crustacean toxicity screening test for freshwater, Standart Operational Procedure. Nazareth, Belgium. p. 27.
- Dec, J., and Bollag, J. M., 1990, Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 19, 543–550.
- Demirbağ, Z., 2006, Genel Mikrobiyoloji, Trabzon, s. 252-253.
- Dizge Göksel M., 2007, *Trametes versicolor* beyaz çürükçül fungusundan lakkaz enziminin saflaştırılması ve kısmi nitelendirilmesi, GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dur'an, N., and Esposito, E., 2000, Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. Appl. Catal. B Environ., 28, 83–99.
- EPA, 1980, Ambient water quality criteria for 2,4-dichlorophenol, EPA 440/5-80-042, <http://www.epa.gov/ost/pc/ambientwqc/24dichlorophenol80.pdf>.
- Filazzola, M. T., Sannino, F., Rao, M. A., and Gianfreda, L., 1999, Effect of various pollutants and soil-like constituents on laccase from *Cerrena unicolor*. J. Environ. Qual., 28, 1929–1938.
- Gianfreda, L., Sannino, F., Filazzola, M.T. and Leonowicz, A., 1998, Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*, J. Mol. Catal. B. enzymatic, 4, 13.
- Gedikli, S., 2008, Çeşitli Makrofungus İzolatlarının Lakkaz Üretim Yetenekleri Açısından Değerlendirilmesi ve Dekolorizasyon Uygulamalarında Kullanılabilirliği, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

- Gill, P. K., and Arora, D. S., 2003, Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 28–33.
- Hartmeier, W., Reiss, M., Hactehal, M., Kox, G. and Metzger, J., 1998, Biosensors in environmental analytics for the determination of sum parameters, *Bioforum*, 21, 380, *J. Appl. Toxicol.*, 12, 351–358.
- Janik, F., and Wolf, H. U., 1992, The Ca^{2+} -transport-ATPase of human erythrocytes as an invitro toxicity test system—Acute effects of some chlorinated compounds. *J. Appl. Toxicol.*, 12, 351–358.
- Joshi, D. K., and Gold, M. H., 1993, Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1779–1785.
- Kadhim, H., Graham, C., Barratt, P., Evans, C. S., and Rastall, R. A., 1999, Removal of phenolic compounds in water using *Coriolus versicolor* grown on wheat bran. *Enzyme Microb. Technol.*, 24, 303–307.
- Kargi, F., Eker, S., 2004,. Toxicity and batch biodegradation kinetics of 2,4 dichlorophenol by pure *Pseudomonas putida* culture, *Enzyme Microb. Technol.* 35, 5, 424-428.
- Kolankaya, D., 2006, Organochlorine pesticide residues and their toxic effects on the environment and organisms in Turkey, *Intern. J. Environ. Anal. Chem*, 147-160.
- Leontievsky, A. A., Myasoedova, N. M., Baskunov, B. P., Evans, C. S., and Golovleva, L. A., 2000, Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*, *Biodegradation*, 11, 331–340.

Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas-Wasilewska, A., Rogalski, J., Jazsek, M., Malarcazyk, E., Dawidowicz, A., Finksboots, M., Ginalska, G., Leonowicz, A., 1997, Screening of the Wood-rotting Fungi for Laccase Production: Induction by Ferulic Acid, Partial Purification, and Immobilization of Laccase from the High Laccase-producing Strain, *Cerena unicolor*, Acta Microbiol., 46., 3, 297-311.

Merck KGaA, Darmstadt, 2000, Chemical reagents, Baden, W. (Ed.)

Mileski, G. J., Bumpus, J. A., Jurek, M. A., and Aust, S. D., 1988, Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., 54, 2880–2885.

Öner M., 2001, Genel mikrobiyoloji, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 90.

Pazarlıoğlu, N., Saruışık, A.M., Timur, S., Telefoncu, A., Gorton, L., Akkaya A., 2008, Zirai Atıklar Kullanılarak *Trametes versicolor*'dan Piranoz 2- Oksidaz Enziminin Karıştırmalı Tank Reaktörde Üretimi, Tekstil Sanayinde Biyo-Ağartmada Kullanımı ve Biyo-Analitik Uygulama Olanaklarının Araştırılması, Proje No: 104M420

Pérez, J., Rubia, T. de la, Ben Hamman O., Martínez J., 1998, *Phanerochaete flavidobalba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill waste waters. Appl Environ Microbiol 64, 2726-2729.

Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T., 2002, Crystal structure of a Laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90- Å Resolution containing a full complement of coppers, The Journal of Biological Chemistry, 277, 37663-37669

Rama, R., Mougin, C., Boyer, F.D., Kollmann, A., Malosse, C. and Sigoillot, 1998, Biotransformation of benzo(a) pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*, Biotechnol. Lett., 20, 1101.

- Reddy, G. V. B, Gelpke, M. D. S., and Gold, M. H., 1998, Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*, involvement of reductive dechlorination. *J. Bacteriol.*, 180, 5159–5164.
- Reddy, G. V. B., and Gold, M. H., 2000, Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology*, 146, 405–413.
- Rodakiewicz-Nowak, J., Haber, J., Pozdnyakova, N., Leontievsky, A., and Golovleva, L. A., 1999, Effect of ethanol on enzymatic activity of fungal laccases. *Biosci. Rep.*, 19, 589–600.
- Rodriguez, E., Pickard, M.A. and Vazquez-Duhalt, R., 1999, Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi, *Curr. Microbiol.*, 38, 27-32.
- Rubilar, O., Diez, M.C., Gianfreda, L., 2008, Transformation of chlorinated phenolic compounds by White Rot Fungi. *Critical Reviews in Environmental and Science Technology*, 38, 227- 268.
- Sannino, F., Filazzola, M.T., Violante, A. and Gianfreda, L., 1999, Fate of herbicide influenced by biotic and abiotic interactions, *Chemosphere*, 39, 2, 333-341.
- Silva, H.H.B., Schneider, A.L.S., Wisbeck, E., Furlan, S. A., 2009, Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by *Pleurotus ostreatus* DSM 1833, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52,6,1563-1570.
- Spectrum Laboratories, 2002, Chemical Fact Sheet, C.A.S. No. 120832, 2,4-Dichlorophenol, <http://www.speclab.com/compound/cl20832.htm>.
- Stamets, P., 2000, *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Berkely: Ten Speed Press.
- Tabak, Ö., 2008, Çeşitli Basidiomycetes İzolatları ile Klorofenolik Bileşiklerin Biyolojik Yıkımı., Yüksek Lisans Tezi, ESOGÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Tarighian, A., Hill, G., Headley, J. ve Pedras, S., 2003. Enhancement of 4 chlorophenol biodegradation using glucose, *Clean Techn., Environmental Policy*, 61-65.
- Thurston, C.F., 1994, The structure and function of fungal laccases, *Microbiology*, 140, 19-26.
- U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999.
- US. Department of Health and Human Services. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Toxicological Profile for Methylene Chloride, September 2000, 313.
- Uysal, A. ve Türkmen, A., 2004, Klorofenollü bileşiklerin ayrışabilirliğinin biyosürefektan kullanımı ile hızlandırılması, *SKDD* 14, 23-30.
- Ünal (Taşpınar), A. and Kolankaya, N., 2001, Dechlorination of Bleached Kraft Pulp by Laccase Enzyme Produced from Some White-Rot Fungi, *Türk. J. Biol.*, 25, 67-72.
- Ünal, A., 2004, Lakkaz enzimi ile bazı toksik klorofenolik bileşiklerin detoksifikasyonu, Doktora Tez, H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 104s.
- Valli, K., and Gold, M. H., 1991, Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.*, 173, 345-352.
- Wang, C.C., Lee, C.M., Lu, C.J., Chuang, M.S., Huang, C.Z., 2000, Biodegradation of 2,4,6 trichlorophenol in the presence of primary substrate by immobilized pure culture bacteria, *Chemosphere*, 41, 12, 1873-1879.

- Winkler, M. E., Spira, D. J., Lu-Bien, C. D., 1982, Anion Binding to Oxidized Type 2 Depleted and Native Laccase: a spectrophotocospically effective Model for Exogenous Ligand Binding to the Type 3-Type 2 Active Site, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 107, 2, 727.
- World Health Organization. Environmental health criteria for chlorophenols other than pentachlorophenol. Supplement. Draft, 1986.
- Xavier AMRB, Tavares APM, Ferreira R and Amado F., 2002, *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry, *Electron J Biotechnol.*, 10, 444–451.
- Yarapalov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S. and Varfolomeyev, S.D., 1994, Laccase Properties, catalytic mechanism and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49, 257-279.
- Yeşilada, Ö ., Fışkın, K., Şık, S., Özcan, B., 1997, Beyaz Çürükçül Funguslarla yağ fabrikası atıklarının aerobik degradasyonu ve değerlendirmesi, *Tübitak Yayınları*, 66 s.
- Zhang, J., Liu, X., Xu, Z., Chen, H., Yang, Y., 2007, Degradation of chlorophenols catalyzed by laccase, *International Biodeterioration and Biodegradation* 61, 351-356.
- Zhang, J., Xu, Z., Chen, H., Zong, Y., 2009, Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*, Department of Environmental Science, College of Environmental Science and Engineering, Peking University, Beijing 100801, PR China
- (http://www.cem.yildiz.edu.tr/3-menu_icerikleri/3-egitim-ogretim/ogretim_kademeleri/lisans/ders_notlari/0412022-CK2/ck2-df10.pdf, erişim tarihi: 27/07/2010).

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

(online: <http://curbstonevalley.com/blog/?p=1242>, erişim tarihi: 02/08/2010).

(http://www.yeneranalitik.com/toksisite_olcum_cihazı.html, erişim tarihi:22/08/2010).