

**DECHLORINATION OF CHLORINE FROM 2-CHLOROPHENOL WITH
TRAMETES VERSICOLOR CRUDE LACCASE****Merve AKBULUT¹, Pınar AYTAR¹, Serap GEDİKLİ¹, Arzu ÜNAL²,
Ahmet ÇABUK^{*3}, Nazif KOLANKAYA⁴**¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Meşelik-ESKİŞEHİR²Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, ANKARA³Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Meşelik-ESKİŞEHİR⁴Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ANKARA**Received/Geliş: 06.01.2011 Revised/Düzeltilme: 07.06.2011 Accepted/Kabul: 29.06.2011****ABSTRACT**

In this study, chlorine from 2-chlorophenol was removed with crude laccase enzyme produced from *Trametes versicolor* ATCC (200801) grown in PDB culture including wheat straw. Effects of pH value, substrate concentration, enzyme amount, contact time and temperature on dechlorination were examined. Besides, dissolved oxygen consumption was followed simultaneously dechlorination and the decrease was observed. A change in toxicity of 2-chlorophenol under determined optimum conditions was monitored through Microtox. Also, after the dechlorination of 2-chlorophenol, changes in chemical structure of 2-chlorophenol was determined with FTIR analysis.

Optimum dechlorination conditions of 2-chlorophenol have been determined as pH 4.0, substrat concentration 150µM, enzyme amount 4 ml, contact time 15 min and temperature 40 °C. During dechlorination studies, decrease of oxygen amounts in the reaction medium and not altering the results after catalase addition to experiment medium have been made us think that responsible enzyme dechlorination of 2-chlorophenol is laccase.

Keywords: Laccase, 2-chlorophenol, dechlorination.

**TRAMETES VERSICOLOR HAM LAKKAZI İLE 2-KLOROFENOLDEN KLOR
UZAKLAŞTIRILMASI****ÖZET**

Bu çalışmada, buğday kepeği ilave edilen potato dekstroz broth (PDB) ortamında büyütülen *Trametes versicolor* ATCC (200801)'den üretilen ham lakkaz enzimi ile 2-klorofenolden klor uzaklaştırılmıştır. pH, substrat konsantrasyonu, enzim miktarı, inkübasyon süresi ve ortam sıcaklığı parametrelerinin deklorinasyon üzerine etkileri incelenmiştir. Deklorinasyonla eş zamanlı olarak çözünmüş oksijen tüketimi de takip edilmiş ve düşüş gözlemlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda 2-klorofenolün toksisitesindeki değişim Microtox ile değerlendirilmiştir. Ayrıca klor uzaklaştırdıktan sonra 2-klorofenolün kimyasal yapısındaki değişiklikler FTIR analizleri ile belirlenmiştir.

2-klorofenolün optimum deklorinasyon koşulları pH 4, substrat konsantrasyonu 150 µM, enzim miktarı 4 ml, temas süresi 15 dk, ortam sıcaklığı 40 °C olarak belirlenmiştir. Bu süreçte klor uzaklaştırılmasına koşut olarak ortamdaki oksijenin azalması ve deney ortamına katalaz ilavesinden sonra elde edilen sonuçların değişmemesi klor uzaklaştırılmasından sorumlu olan enzimin lakkaz olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Lakkaz, 2-klorofenol, deklorinasyon.

* Corresponding Author/Sorumlu Yazar: e-mail/e-ileti: acabuk@ogu.edu.tr, tel: (222) 239 37 50 / 2439

1. GİRİŞ

Sahip oldukları zehirli ve mutajenik etkileri nedeniyle klorofenolik bileşikler araştırmacılar tarafından ilgi çekmektedir. Bu bileşikler, pestisitler içerisinde sınıflandırılan ve sıklıkla kullanılan biyositler arasında yer almaktadır. Suda kısmen çözümleri nedeniyle bu zehirli bileşiklere nehir, göl ve diğer sucul alanlarda bol miktarda rastlanılmaktadır. Endüstriyel aktivitelerin yoğun olduğu gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde klorofenoller gibi kirleticilere rastlanması beklenen bir durumdur [1]. Klorofenoller tekstil, ilaç, plastik, kağıt ve boya endüstrisi faaliyetleri, tarım ilaçları ve dezenfektan maddelerinin yapımı ve yanma süreçleri sonucu çevreye yayılmaktadırlar. Fenoller çok düşük konsantrasyonlarda dahi suda tat ve koku problemi oluşturan, yüksek konsantrasyonlarda ise insan ve sucul yaşam bakımından zehirli etkisi bulunan organik bileşiklerdir. Klorofenolik bileşiklerin çevredeki durumu ve toksisitesi hakkında sürekli artan bilgiler, bu bileşiklerin yasal olarak denetim altına alınmasını gerektirmektedir [2]. Toksikolojik özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda klorofenolik bileşiklerin toksikolojik etkisinin bağlı bulunan klor sayısının artmasıyla arttığı belirtilmiştir [1,3].

Yaygın bir kullanıma sahip klorlu fenoller kolayca parçalanmadıkları için doğada birikmekte ve çevre açısından sorun teşkil etmektedirler. Bu bileşikler fiziksel, kimyasal ve/veya biyolojik yöntemlerle bertaraf edilebilir. Önerilen çeşitli teknikler arasında biyolojik arıtım; çevreye dost, pratik ve ekonomik olarak gösterilmektedir. Biyolojik arıtım bu toksik kimyasalların tamamen mineralize olmasına ve ürünlerin daha az zararlı bir forma dönüşmesini sağlar. Büyüme için enerji ve karbon kaynağı olarak bu bileşikleri kullanma yeteneğine sahip çok sayıda mikroorganizma kullanılmaktadır [4, 5]. Bu nedenle klorlu fenollerin mikrobiyal giderimi ya da yıkımı üzerine oldukça fazla araştırma yapılmıştır [1, 4, 6].

Klorofenolik bileşiklerin de içinde bulunduğu ksenobiyotik (yeni sentez, doğaya yabancı) ve rekalsitran özellikteki birçok kimyasal bileşik söz konusu fungusların sahip olduğu ve geniş substrat-özümlülüğü gösteren peroksidad grubu enzimlerle yıkılabilmektedir. Ancak ekonomik açıdan bakıldığında oksitleyici ajan olarak kullanılan H₂O₂'nin ekstra bir maliyet getirmesi ve tepkime sırasında yüksek miktarlarda tüketiminin arıtım sürecini olumsuz etkilemesi dezavantaj olarak görülmektedir. Bu nedenle son yıllarda fenol ve türevlerinin gideriminde peroksidad grubu enzimlerin yerine fenol oksidazların kullanılması gündeme gelmiştir. Bu tercihin başlıca nedeni, fenol oksidazların oksitleyici ajan olarak H₂O₂ yerine moleküler oksijeni (O₂) kullanmalarıdır. Böylece, peroksidad grubu enzimlerin kullanıldığı iyileştirme sürecinde, H₂O₂'den kaynaklanan dezavantaj fenol oksidaz grubu enzimlerin kullanılmasıyla ortadan kalkmaktadır [7].

Arcand ve Archibald (1991) *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi ile çeşitli klorlu fenolik bileşiklerden klor uzaklaştırabilmiş ve *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimini kullanmanın *Phanerochaete chrysosporium*'dan elde edilen peroksidad enzimine göre daha avantajlı olduğunu bildirmişlerdir. Bunu da hidrojen peroksitle gereksinim duyulmaması ve lakkazın çok daha kararlı olmasına bağlamışlardır [6, 8].

Bu çalışmada, *T. versicolor* (ATCC200801)'den elde edilen indüklenmiş lakkaz ile 2-klorofenolden klor uzaklaştırılması hedeflenmiştir. Deklorinasyon; klor ölçümleri yapılarak takip edilmiş ve ortamdaki oksijen tüketimi ile FTIR analizleri sayesinde desteklenmiştir. Deklorinasyon sürecini etkileyebilecek pH, substrat konsantrasyonu, enzim miktarı, reaksiyon süresi ve sıcaklık gibi parametreler çalışmada değerlendirilmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

Mikroorganizma ve Kültür Koşulları

Çalışmalarda, *Trametes versicolor* ATCC (200801) kullanılmıştır. Çalışma süresince kültürler Potato dekstroz agarda (PDA-Acumedica) +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Stok kültürlerden buğday kepeği içeren Potato dekstroz broth 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, deneyde ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Lakkaz Aktivitesinin Ölçümü

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 (pH 4,5) ve enzim kaynağı olarak 0,1 mL kültür süpernatantı kullanılmıştır. 37 °C’de 15 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra 465 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Schimadzu 2450 UV Vis-spectrophotometer) absorbans ölçülmüştür [9].

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

Katalaz Muamelesi

Lakkaz enzimi aktivitesi yüksek kültür süpernatantı ile 2-CP’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-CP için belirlenen optimum koşullarda deney ortamına ilave edilmiştir.

Serbest Klor ve Çözünmüş Oksijen Ölçümleri

Deklорinasyon çalışmalarında yapılan klor ölçümleri literatürde civatiosiyanat yöntemi olarak bilinen ve serbest klor ölçümüne dayanan bir yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle göre, 9 M (100ml) HNO₃, 0,25 M (100ml) Fe(NH₄)(SO₄)₂ 12H₂O ve doymuş Hg(SCN₂) çözeltileri hazırlanmıştır [10]. Başlangıç oksijen miktarı ve deklорinasyona bağlı ortamda tüketilen oksijen miktarı (Jenway 9071 Model) oksijen metre ile ölçülerek takip edilmiştir.

Deklорinasyon Çalışmaları

Bu çalışmada 2-CP’den klor uzaklaştırılmasında ham lakkaz enziminin etkinliği araştırılmıştır. Klor uzaklaştırılması için en uygun koşullarının belirlenmesi amacıyla pH değeri, substrat konsantrasyonu, sıcaklık, enzim konsantrasyonu ve temas süresi denenmiştir. Denemelerde enzim kaynağı olarak buğday kepeği ilaveli PDB’de *T. versicolor* ile üretilen yüksek aktiviteli lakkaz enzimi kullanılmıştır. Tüm optimizasyon çalışmalarında denatüre enzim ile kontrol grupları oluşturulmuş ve elde edilen sonuçlar kontrol grupları ile kıyaslanmıştır. Deneyler 3 tekrarlı ve birbirinden bağımsız çalışmalar şeklinde yapılmıştır.

Reaksiyon ortamının pH değerinin enzimatik deklорinasyona etkisini belirlemek için pH 3 ile 10 aralığında çalışılmıştır. Çeşitli tampon çözeltilerle belirtilen aralıklarda reaksiyon ortamları hazırlanmıştır. pH 3-5 için asetat tamponu, pH 6-8 için fosfat tamponu, pH 9-10 için ise Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. Deneyler sırasında reaksiyon hacmi 100 ml olup diğer parametreler sabit tutulmuştur. Tüm optimizasyon deneylerinde klorofenolik bileşiğin çözünürlüğünü sağlamak için ortama %1 (v/v) oranında etanol ilave edilmiştir.

Substrat konsantrasyonunun enzimatik deklорinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla 2-CP konsantrasyonu 50-500 µM arasında çalışılmış ve diğer parametreler sabit tutulmuştur.

Enzim miktarının, enzimatik deklорinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla 2-CP içeren ortama miktarı 0,5-4 ml aralığında değişen ham lakkaz enzimi ilave edilmiş ve 30 dakika sonunda serbest klor ve çözünmüş oksijen miktarı ölçülmüştür.

İnkübasyon süresinin enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla 2-CP içeren ortamdan 0-120 dk süreler arasında örnekler alınarak serbest klor ve çözülmüş oksijen ölçümleri yapılmıştır.

Ortam sıcaklığının enzimatik deklorinasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla 2-CP içeren ortamın sıcaklığı 10-50 °C aralığındaki değerlerde değiştirilerek çalışılmış ve serbest klor ile eş zamanlı olarak çözülmüş oksijen ölçümleri yapılmıştır.

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.

Toksiste Çalışmaları

Çevresel açıdan kirlenici, toksik ve uzun süre bulunduğu ortamda etkisini koruyabilen bir bileşik olan 2-CP'nin, lakkaz enzimiyle biyoyıkımı hedeflenmiştir. Biyolojik yıkım çalışmaları yukarıda bahsedildiği biçimde sistematik olarak gerçekleştirilmiş ve kirlenicinin hem yıkım öncesinde ve hem de yıkım çalışmaları sonrasında toksisitesindeki değişim yapılan ölçümlerle takip edilmiştir. Toksikite ölçümleri *Vibrio fischeri*'nin sahip olduğu lusiferaz enzimi ile gerçekleştireceği ışımının ölçümüne dayanan mikrotoksiste test cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Böylece yıkıma uğratılan 2-CP aynı zamanda toksisitesindeki değişim Microtox® ile takip edilmiştir.

FTIR Analizleri

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

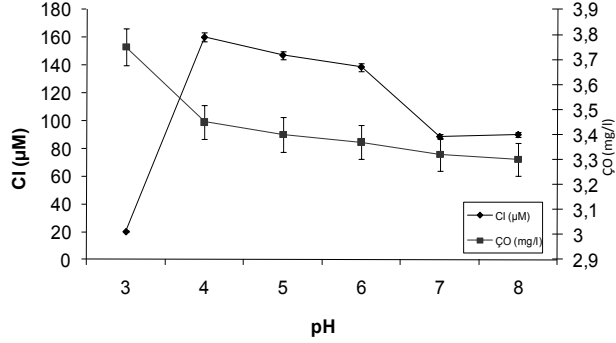
3. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada *Trametes versicolor*'un lakkaz enzimiyle 2-klorofenolden klor uzaklaştırılmasında optimizasyon çalışmaları yapılarak deklorinasyon için uygun koşullar belirlenmiştir. Bu amaçla sırasıyla pH, substrat konsantrasyonu, enzim miktarı, inkübasyon süresi ve sıcaklığın klor uzaklaştırılmasına etkisi incelenmiştir.

Enzimlerle yapılan deklorinasyon çalışmaları ve benzer çalışmalarda önemli bir çevresel etken de ortamın pH değeridir. Bu nedenle geniş bir pH aralığında (3-10) çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 2-CP'nin *T. versicolor*'dan elde edilen ham lakkaz enzimi ile deklorinasyonu için en uygun pH değeri 4 olarak belirlenmiştir ve pH 4'ten sonra dikkate değer bir azalma göstermiştir (Şekil 1).

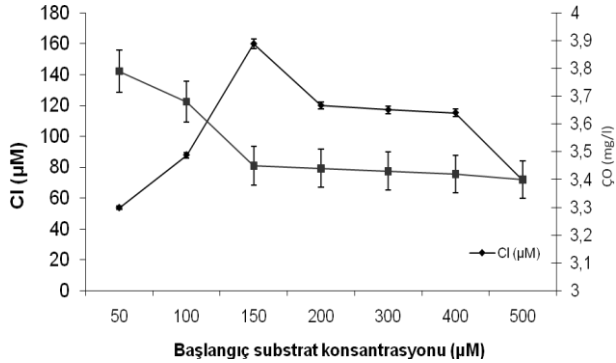
Anova testi ile yapılan istatistiksel analiz çalışmalarında, 2-CP deklorinasyonunda pH için p değerinin 0.05'ten küçük olması sebebi ile anlamlı olduğu kabul edilmektedir. Ünal (2004), yaptığı benzer bir çalışmada 2,4,6-triklorofenol, 2,4-diklorofenol, 4- klorofenol bileşiklerinin deklorinasyonunda yine lakkaz enzimini kullanmış ve optimum pH değerini 5.0 olarak belirlediğini bildirmiştir. Zhang ve arkadaşları (2008), 2,4-DCP, 4-CP ve 2 CP'nin lakkaz enzimi ile yıkımı için yaptıkları çalışmada optimum pH'ın 5.0 - 6.0 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre bazik pH değerlerinde de deklorinasyonun gerçekleştiği görülmektedir [12]. Ancak, bu pH değerlerinde kontrol grupları ile yapılan karşılaştırmalar ve lakkaz enziminin söz konusu pH değerlerinde düşük aktiviteye sahip olması ile bu durum açıklanabilir. Bazik pH değerlerinde daha çok kimyasal süreçlerin etkili olması olası

olarak değerlendirilebilir. pH değerinin 7'den büyük olduğu durumlarda lakkaz enziminin aktivitesini kaybettiği rapor edilmiştir [13].



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

2-CP'den klor uzaklaştırmasında başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneysel çalışmanın sonucunda en uygun başlangıç substrat konsantrasyonu 150 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 2).

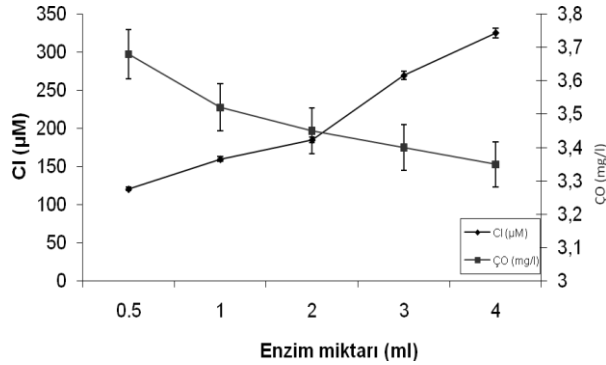


Şekil 2. Lakkaz enzimiyle 2-klorofenolden klor uzaklaştırmasında başlangıç substrat konsantrasyonunun etkisi (çalışma koşulları: pH 4; enzim miktarı 1ml; sıcaklık 30 °C; süre 30 dk).

Yapılan istatistiksel analiz çalışmalarında, substrat değerleri arasındaki farka bakıldığında p değerinin 0,05'ten (0,01<0,05) küçük olması nedeni ile substrat değerleri arasındaki farkın anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Şentürk ve Büyükgüngör'ün yaptıkları çalışmada 4-klorofenol bileşiğini giderim verimi başlangıç konsantrasyonunun artması ile azalmaktadır. Başlangıç 4-klorofenol konsantrasyonu 48,0 mg/L'den 260,0 mg/L'ye arttığı zaman giderim verimi yarı yarıya azalarak % 47 seviyesine düşmüştür. Konsantrasyon 715,60 mg/L olduğunda ise biyokütle sadece % 5,52'lik bir giderim sağlayabilmiştir. Biyokütlenin biyosorpsiyon kapasitesi ise verimin aksine 4-klorofenol konsantrasyonundaki artış ile belirli bir sınır değere kadar artmakta daha sonra azalmaktadır [5].

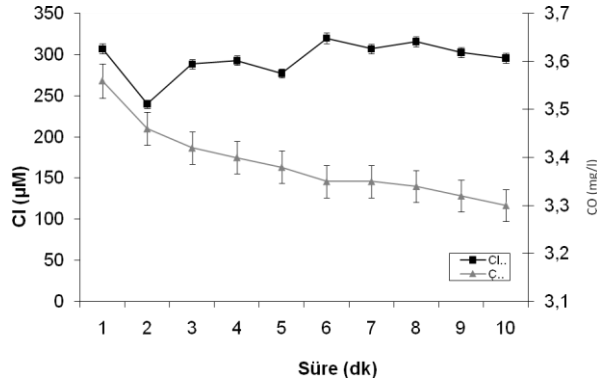
Enzim miktarının deklorasyona etkisinin belirlenmesi amacıyla 0,5 ml ve 4 ml arasında değişen değerlerde yapılan çalışmanın sonucunda optimum enzim miktarı 4 ml olarak belirlenmiştir (Şekil 3).

Enzim miktarı değerleri arasındaki farka bakıldığında p değerinin 0,05'ten ($0,01 < 0,05$) küçük olması nedeni ile farkın anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde, beklenildiği gibi enzim miktarının artışına koşut olarak deklorasyon değerinde de artış kaydedilmiştir. En yüksek deklorasyon değerine 4 ml enzim miktarı ile ulaşılmıştır. Zhang ve arkadaşları, 2-CP'nin biyoyıkımında, lakkaz enziminin artırılmasıyla yıkım yüzdesinin de arttığını belirtmişlerdir [12].



Şekil 3. Lakkaz enzimiyle 2-klorofenolden klor uzaklaştırmasında enzim miktarının etkisi (çalışma koşulları: pH 4; başlangıç substrat konsantrasyonu 150 µM ; sıcaklık 30 °C; süre 30 dk).

Inkübasyon süresinin 2-CP'den klor uzaklaşmasına olan etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda en uygun süre 15 dk olarak belirlenmiştir (Şekil 4).



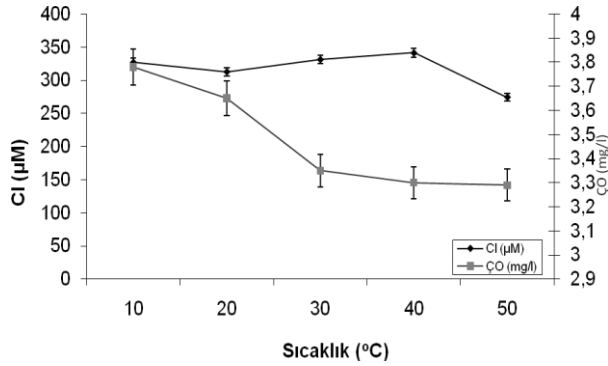
Şekil 4. Lakkaz enzimiyle 2-klorofenolden klor uzaklaştırılmasında sürenin etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4; başlangıç substrat konsantrasyonu 150 µM; enzim miktarı 4 ml; sıcaklık 30 °C)

Süre değerleri arasındaki farka bakıldığında p değerinin 0,05 ten ($0,012 < 0,05$) küçük olması nedeni ile farkın anlamlı olduğu kabul edilmiştir. Zhang ve arkadaşları yaptığı çalışmada 2,4-DCP, 2-CP, 4-CP'ün yıkımı için en uygun sürenin 10 saat bulunduğu bildirmiştir [12]. Literatür ile karşılaştırıldığında elde edilen optimum sürenin kısa olduğu söylenebilir. Burada kısa

sürede elde edilen yüksek deklorinasyon değerleri çevresel uygulamalar açısından önemli bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

2-klorofenolden klor uzaklaştırılmasında optimum sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 10-50 °C değerleri arasında değişen sıcaklıklarda çalışılmıştır. En uygun sıcaklık 40 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 5).

Sıcaklık değerleri arasındaki farka bakıldığında p değerinin 0,05 ten ($0,346 > 0,05$) büyük olması nedeni ile farkın anlamsız olduğu kabul edilmiştir. Lakkaz enziminin 60 °C'ye kadar sıcaklık artışlarından etkilenmediği ve hatta yüksek sıcaklık değerlerinde düşük sıcaklık değerlerine kıyasla daha kararlı olduğu bilinmektedir. Dizge ve arkadaşları beyaz çürükçül fungusların atıksu arıtımında kullanım potansiyellerini araştırmışlardır [14]. Buna göre; arıtımın 25-30 °C sıcaklıklarda gerçekleşmesi özellikle sıcaklığın yüksek olduğu yerlerde büyük bir avantaj sağlayabilir. Diğer yandan sıcaklık artışı ile elde edilen yüksek serbest klor miktarı lakkaz enziminin stabilitesindeki artış ile açıklanabilir [15].



Şekil 5. Lakkaz enzimiyle 2-klorofenolden klor uzaklaştırmasında sıcaklığın etkisi. (Çalışma koşulları: pH 4; başlangıç substrat konsantrasyonu 150 µM; enzim miktarı 4 ml; süre 15 dk).

Murugesan ve arkadaşları redoks aracı moleküllerini kullanarak lakkazın triklosanın transformasyonunu çalışmışlar ve %56,5 TCS uzaklaştırılmasını 24 saatte gerçekleştirmişlerdir. Zhao ve arkadaşları toprakta kontaminant olan diklorodifeniltrikoroetanı uzaklaştırmak amacı ile bir beyaz çürükçül fungustan elde edilen lakkazı kullanmış ve degrade edebilmişlerdir. Yin ve arkadaşları lakkaz katalizini ve fotokataliz prosedürlerini birlikte kullanarak pentaklorofenol ve 2,4-diklorofenolü parçalamışlardır [16-18].

Optimizasyon çalışmalarının sırasında çalışmada kullanılan klorofenolik bileşiğin lakkaz enzimi ile deklorinasyon sürecinde ortamda bulunan çözünmüş oksijen miktarındaki değişim de takip edilmiştir. Deklorinasyon arttıkça oksijenin tüketildiği de gözlemlenmiştir. Burada oksijen tüketiminin az olduğu düşünülebilir. Ancak inkübasyon sürelerinin kısa olması bu durumu açıklayabilmektedir. Kontrol gruplarında yapılan ölçümlerde çözünmüş oksijen miktarında herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Enzim kaynağı olarak lakkaz aktivitesi yüksek kültür süpernatantı kullanılmıştır. Bilindiği üzere lakkaz enzimi ortamdaki oksijene gereksinim duymaktadır. Çalışmada enzim kaynağı olarak kültür sıvısı kullanılmıştır. Bu nedenle kültür sıvısında bulunabilecek olası bir peroksidaz aktivitesinin deklorinasyon sürecinde etkili olma ihtimali göz önünde bulundurulmuştur. Bu nedenle, kültür sıvısında bulunabilecek peroksidaz grubu bir enzimin de deklorinasyonda rol oynayıp oynamadığının anlaşılabilmesi için reaksiyon ortamına katalaz ilavesi yapılmıştır. Böylece ortamda bulunabilecek olası H₂O₂'inde ortamdaki uzaklaştırılması ve dolayısı ile peroksidaz aktivitesinin engellenmesi sağlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda katalaz ilave edilmeyen deney grubundan farklı bir sonuca ulaşılmamıştır.

Dolayısı ile elde edilen veriler klor uzaklaştırılmasında başlıca lakkazın sorumlu olduğunu göstermektedir.

Çalışmanın temel hedefi deklorasyonu gerçekleştirilen klorofenolik bileşiğin aynı zamanda toksisitesindeki olası değişikliğin belirlenmesidir. Bu nedenle elde edilen optimum değerlerde yapılan deklorasyon çalışmalarının sonucunda deklorasyon öncesi ve sonrasında toksisite tayinleri Microtox cihazı ile yapılmıştır. 2-klorofenol bileşiğinin 5. ve 15. dakikadaki EC₅₀ değerlerinde toksisitesinde bir artış görülmüştür (Çizelge 1).

Deklорasyon 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. Toksikite ölçümlerinde ortamda klor bileşiklerinin bulunması test organizması olan *Vibrio fischeri* için de toksik bir etki göstermektedir. *V. fischeri* klora oldukça hassas bir organizmadır. Klorofenolik bileşiklerin deklорasyon çalışmasından sonra toksisitelerinde artış olması ise oluşan yıkım ürünlerinin başlangıç bileşiğine kıyasla daha toksik bileşenler olarak reaksiyon ortamında bulunduğunu göstermektedir [19].

Çizelge 1. 2-CP'nin EC₅₀ toksisite değeri. (a) enzimatik deklорasyondan önce (b) enzimatik deklорasyondan sonra

	5. dakikadaki EC ₅₀		15. dakikadaki EC ₅₀	
	Deklорasyon öncesi	Deklорasyon sonrası	Deklорasyon öncesi	Deklорasyon sonrası
2-CP	%55	%36	%90	%61

Yapılan toksisite analizlerinde klor uzaklaştırıldıktan sonra ortamda kalan bileşiğin başlangıçtakine kıyasla daha toksik bir duruma geldiği görülmüştür. Bu sonuçlardan yola çıkarak, daha ileri bir yıkım sürecinin geliştirilmesi gereği ortaya çıkmıştır.

Klor uzaklaştırıldıktan sonra 2-CP'nin kimyasal yapısındaki değişiklikler FTIR analizleri ile belirlenmiştir (Şekil 6).

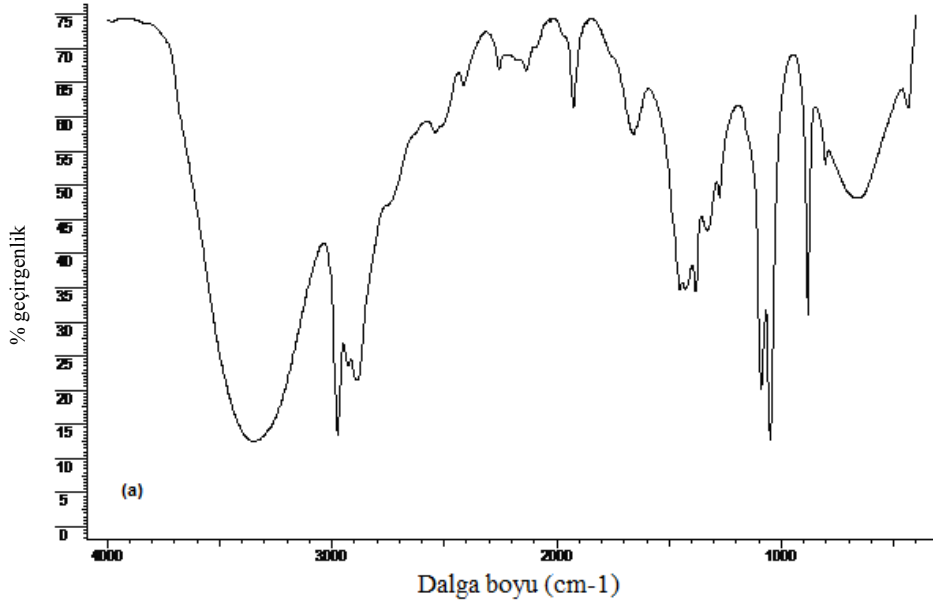
Fenollerde serbest O-H gerilmesi 3600 cm⁻¹ 'de keskin bir bant olarak görülür. Molekülde hidrojen bağı varsa O-H gerilmesi 3100-3500 cm⁻¹ arasında geniş bir bant olarak gözlenir [20]. 2-CP molekülünde 3506 cm⁻¹'de O-H gerilmesi gözlenmiş olup bu değer molekülde molekül içi hidrojen bağı olduğunu gösterir. Aromatik C-H gerilme titreşimleri 3000-2900 cm⁻¹ de görülürken 2-CP için bu gerilmeler 3077, 3040 ve 2955 cm⁻¹'de gözlenmiştir. Benzenin dejenere C-C gerilme modları 1365-1650 cm⁻¹ bölgesinde gözlenir. 2-CP molekülünde 1594 cm⁻¹'de C=C gerilme modu, 1452, 1480 ve 1586 cm⁻¹'de C-C gerilme modu gözlenmiştir. Bu titreşimler fenollerde düzlem içi O-H eğilme moduyla çiftlenmesinden dolayı yüksek frekans bölgelerine kayar. Fenollerde, C-O gerilme titreşimleri 1000-1350 cm⁻¹ arasında şiddetli bir bant verir ve C=C gerilme titreşimleri ile karışık modlar olarak gözlenir [21]. 2-CP için 1340 cm⁻¹'de şiddetli C-O gerilme titreşimleri gözlenmiştir. C-Cl gerilme titreşimi 800 cm⁻¹ civarında görülürken, 2-CP molekülü için bu bant 833 cm⁻¹'de gözlenmiştir. Fenolün O-H düzlem içi eğilme titreşimi 1150-1250 cm⁻¹'deki bölgede görülür ve düzlem dışı eğilme ve gerilme frekansları farklı olarak molekül içi hidrojen bağından etkilenmezler. O-H düzlem dışı eğilme titreşimleri 517-710 cm⁻¹'deki bölgede görülür. Hem moleküller arası hem de molekül içi etkileşim olduğundan frekanslar serbest O-H'dan daha yüksek frekans değerlerine kayar. Sübstituentli benzende düzlem içi C-H eğilme titreşimler 1000-1300 cm⁻¹'de gözlenirken düzlem dışı C-H eğilme titreşimleri 600-1000 cm⁻¹'de gözlenir [22]. 2-CP molekülünde 1057 ve 1029 cm⁻¹'de düzlem içi C-H eğilme titreşimler gözlenirken 679 ve 748 cm⁻¹'de düzlem dışı C-H eğilme titreşimleri gözlenmiştir.

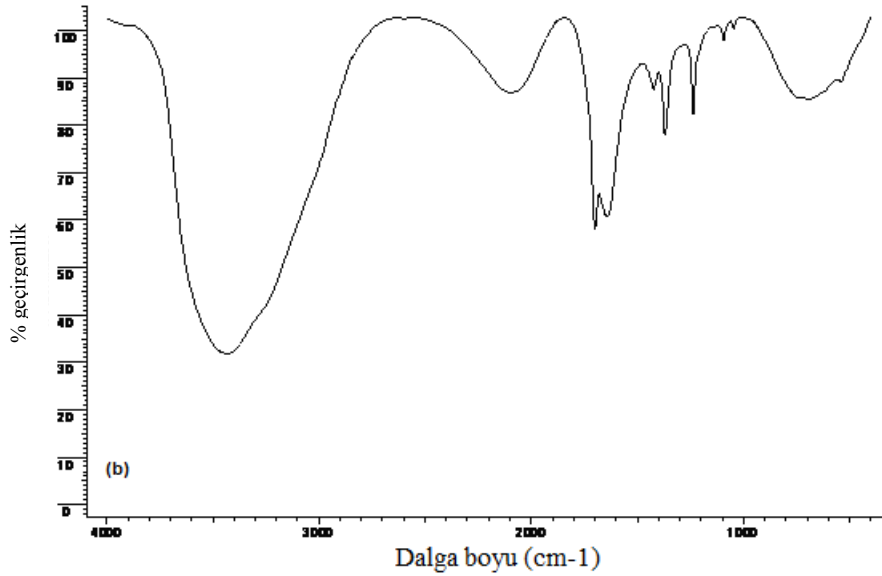
Etanol çözücüsünün polar protik çözücü olmasından dolayı hem molekül içi hem de moleküller arası etkileşimlere bağlı olarak bant genişliği artar. Etanol'de 3350 cm⁻¹'de O-H

gerilme titreşimi gözlenirken, aromatik C-H gerilme titreşimleri 2975, 2929 ve 2887 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Halka içi C=C gerilme titreşimi; 1655 cm^{-1} 'de gözlenirken 1452, 1425 ve 1381 cm^{-1} 'de C-C gerilme titreşimi gözlenmiştir. C-O gerilme titreşimleri 1331 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. C-Cl gerilme titreşimi 881 cm^{-1} 'de gözlenmiştir.

2-CP molekülünün etanoldeki FT-IR spektrumunda 670 cm^{-1} 'de gözlenen yayvan pik molekül ile etanol arasında yük transferi ve elektrostatik etkileşmeler olduğunu göstermektedir. Klor atomunun elektronegatif olma özelliği etkileşme şiddetini artırmaktadır. Lakkaz enzimi ile bozulan molekülün FT-IR spektrumunda 696 cm^{-1} 'de gözlenen daha geniş ve daha yayvan pik molekül ile çözücü arasında meydana gelen daha şiddetli yük transferlerini ve elektrostatik etkileşmeleri gösterir. Bu durumda molekülde bozunmalar meydana gelir ve Cl atomu molekülden ayrılır.

Bu çalışmada elde edilen veriler değerlendirildiğinde, belirlenen optimum koşullarda, *Trametes versicolor*'dan elde edilen yüksek aktiviteli lakkaz enzimi ile 2-klorofenol'den klor uzaklaştırılabildiği ortaya konulmuştur. Yapılan FT-IR analizleri ile klor uzaklaştırmadan önceki ve klor uzaklaştırıldıktan sonra 2-klorofenolün yapısındaki değişimler incelenerek deklorinasyon takip edilmeye çalışılmıştır. IR titreşim spektrumu incelendiğinde 2-klorofenol molekülünün lakkaz enziminde bozunduktan sonra Cl atomunun ayrıldığı sonucuna varılmıştır. Yapılan toksisite analizlerinde klor uzaklaştırıldıktan sonra ortamda kalan bileşiğin başlangıçtakine kıyasla daha toksik bir duruma geldiği görülmüştür. Deklorinasyon ile sadece klor atomu ayrılmış ve bileşik daha kolay yıkılabilir bir form haline gelmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, daha ileri bir yıkım sürecinin geliştirilmesi gereği ortaya çıkmıştır.





Şekil 6. 2-CP'nin FTIR spektrumu (a) Etanol çözücüsünde 2-CP'nin spektrumu (b) Lakkazla deklorinasyondan sonra 2-CP'nin spektrumu

Acknowledgments / Teşekkür

Bu çalışmada Merve Akbulut'un yüksek lisans tezinin bir kısmı sunulmaktadır. Analizlerde yardımları olan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Moleküler Sentezleme ve FTIR Spektroskopi Araştırma Laboratuvarı'na ve Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi İstatistik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Coşkun KUŞ'a teşekkür ederiz. Bu çalışmanın bir kısmı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nu tarafından 200819021 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

REFERENCES / KAYNAKLAR

- [1] Miyazaki A., Amano T., Saito H., Nakano Y., "Acute Toxicity of Chlorophenols to Earthworms Using a Simple Paper Contact Method and Comparison with Toxicities to Fresh Water Organisms", *Chemosphere*, 47, 65-69, 2002.
- [2] Aydın M.E., Özcan S., "Konya Yeraltı Sularında Klorlu fenoller", *S.Ü. Müh.-Mim. Fak. Derg.*, 20, 9-17, 2005.
- [3] Gedikli S., Aytar P., Ünal A., Yamaç M., Çabuk A., Kolankaya N., "Enhancement with inducers of laccase production by some strains and application of enzyme to dechlorination of 2,4,5-trichlorophenol", *Electronic Journal of Biotechnology*, DOI: 10.2225/vol13-issue6-fulltext-4, 2010.
- [4] Hsieh F.M., Huang C., Lin T.F., Chen Y.M., Lin J.C., "Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation", *Process Biochemistry*, 43, 83-92, 2008.
- [5] Şentürk İ.G., Büyükgüngör H., "Aspergillus niger ile sucul ortamdan fenol bileşiklerinin biyosorpsiyonu", *İTÜ Dergisi Su Kirlenmesi Kontrolü*, 19, 1-2, 3-14, 2009.

- [6] Ünal A., Kolankaya N., “Dechlorination of Bleached Kraft Pulp by Laccase Enzyme Produced from some White-Rot Fungi”, *Türk. J. Biol.*, 25, 67-72, 2001.
- [7] Tabak Ö., Gedikli S., Aytar P., Ünal A., Çabuk A., Kolankaya N., “Trametes versicolor Lakkazı ile Pentaklorofenol ve 2,6-Diklorofenol’den Klor Uzaklaştırılması”, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 7, 3, 13-23, 2009.
- [8] Arcand R.L., Archibald F.S., “Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from Trametes (Coriolus) versicolor”, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 194- 203, 1991.
- [9] Coll P. M., Fernandez-Abalos J.M., Villanueva J.R., Santamaria R., Perez P., “Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971)”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2607–2613, 1993.
- [10] Greenberg A.E., Clesceri L.S., Eaton A.D., In: "Standard methods for the examination of water and wastewater", 18th ed., APHA, WEF & AWWA, Washington, D. C, 1992.
- [11] Ünal, A., 2004, “Lakkaz Enzimi ile Bazı Toksik Klorofenolik Bileşiklerin Detoksifikasyonu”, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 104.
- [12] Zhang, Z., Cissoko, N., Wo, J., and Xu, X., “Factors Influencing the Dechlorination of 2,4-dichlorophenol by Ni-Fe Nanoparticles in the Presence of Humic Acid”, *Journal of Hazardous Materials*, 165, 78-86, 2008.
- [13] Bollag J.M., Shuttleworth, K.L. and Anderson, D.H., “Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds”, *Appl. Environ. Microb.*, 54, 3086-3091, 1988.
- [14] Dizge, M., “Trametes versicolor beyaz çürükçül funguslardan lakkaz enziminin saflaştırılması ve kısmi nitelendirilmesi”, GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
- [15] Niku-Paavola, M.L., Fagerström, R., Kruus, K., Viikari, L., “Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from Peniophora species”, *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 100-102, 2004.
- [16] Murugesan, K., Chang, Y.Y., Kim Y.M., Jomg-Rok, J., Kim, E.J., Chang, Y.S., “Enhanced transformation of triclosan by laccase in the presence of redox mediators”, *Water Research*, 44, 298-308, 2010.
- [17] Zhao, Y.C., Yi, X.Y., Zhang, M., Liu, L., Ma, W.J., “Fundamental study of degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane in soil by laccase from white rot fungi”, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 7, 359-366, 2010.
- [18] Yin, L.F., Shen, Z.Y., Niu, J.F., Chen, J., Duan Y.P. “Degradation of pentachlorophenol and 2,4-dichlorophenol by sequential visible-light driven photocatalysis and laccase catalysis”, *Environmental Science & Technology*, 44, 9117-9122, 2010.
- [19] Gu, M., Choi, S., Monitoring and classification of toxicity using recombinant bioluminescent bacteria, *Water Science and Technology*, 43, 147–154, 2001.
- [20] Bienko, A.J. Z., Latajka, D.C. Bienko, D. Michalska, “Theoretical infrared spectra of p-nitrophenol and o-nitrophenol. Vibrational assignment based on Density Functional Theory studies”, *Chem. Phys.* 250, 123-129, 1999.
- [21] Alpert, N. L., Keiser W. E., Szymanski H. A., “IR Theory and Practice of Infrared Spectroscopy” Plenum Press, New York, 1970.
- [22] Dwivedi, C.P.D., Sharma S.N., *Ind. J. Pure Appl. Phys.*, 11, 447, 1973.