



Beyaz Çürükçül Mantar *Trametes versicolor*'dan Elde Edilen Lakkaz Enzimi İle 2,4,6-Triklorofenol'ün Enzimatik Deklorinasyonunun Kinetik Modellemesi

Arzu Ünal^{1*}, Nazif Kolankaya², Abdurrahman Tanyolaç³

¹Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Biyoteknoloji Araştırma Merkezi, 06170 Yenimahalle/Ankara, Türkiye

²Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 06800 Beytepe/Ankara, Türkiye

³Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 06800 Beytepe/Ankara, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Geliş 19 Kasım 2015
Kabul 25 Şubat 2016
Çevrimiçi baskı, ISSN: 2148-127X

Anahtar Kelimeler:
Lakkaz enzimi
Trametes versicolor
Deklorinasyon
Kinetik modelleme
Beyaz çürükçül fungus

*Sorumlu Yazar:
E-mail: arzuunal@gmail.com

Ö Z E T

Bu çalışmada beyaz çürükçül mantar suşu *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi ile toksik klorlu fenolik bir bileşik olan 2,4,6-triklorofenol'ün deklorinasyonuna bağlı detoksifikasyonunun kinetik modellemesi araştırıldı. Substrat olarak kullanılan 2,4,6-triklorofenol'ün deklorinasyonuna bağlı detoksifikasyon kinetiğinin değerlendirilmesinde bir istatistik programı olan Systat 10 paket programı, deklorinasyonun kinetik davranışlarının açıklanması için iki substratlı çözüm ortamı olarak kullanıldı. Deneyler ve istatistiksel analizler sonucunda, Moser eşitliğinin en uygun kinetik model olduğu gözlemlendi. Elde edilen istatistiksel verilerden ve grafikten, çift-substratlı modelin deney verileri ile iyi bir uyum içinde olduğu görüldü. Enzimatik deklorinasyon kinetiğini tanımlayan model için elde edilen biyokinetik parametre değerleri $V_{max} = 9,341 \text{ ppmO}_2/\text{dk}$, $K_s = 38,254 \text{ g/L}$, $K_o = 20,747 \text{ ppm}$, $R = 1,895$ ve $N = 1,233$ olarak hesaplandı. Literatürde 2,4,6-triklorofenol'ün degradasyonuna ilişkin herhangi bir kinetik modelleme çalışmasına rastlanmamış olup, bu araştırma ile ilk kez tarafımızdan 2,4,6-triklorofenol'ün enzimatik deklorinasyonuna bağlı degradasyonunun kinetik modellemesi gerçekleştirildi. GC/MS Analiz sonuçları, lakkaz enzimi ile gerçekleştirilen enzimatik deklorinasyon boyunca kullanılan klorofenolik bileşiğin, %80-%100 oranında parçalandığını gösterdi. GC/MS analiz sonuçlarına bağlı olarak deklorinasyondan sorumlu olan enzimin lakkaz olduğu sonucunun literatür bulgularını da desteklediği görüldü.

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 4(3): 171-177, 2016

Kinetic Modeling of Enzymatic Dechlorination of 2,4,6-Trichlorophenol with Laccase Enzyme obtained from white rot fungus *Trametes versicolor*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 November 2015
Accepted 25 February 2016
Available online, ISSN: 2148-127X

Keywords:
Laccase enzyme
Trametes versicolor
Dechlorination
Kinetic modeling
White rot fungi

*Corresponding Author:
E-mail: arzuunal@gmail.com

ABSTRACT

This study examined kinetic modeling of the detoxification induced by dechlorination of laccase enzyme obtained from *Trametes versicolor* which is a white rot fungi strain and 2,4,6-trichlorophenol which is a toxic chlorinated phenolic compound. In the evaluation of the kinetics of detoxification induced by dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol used as substrate, the Systat 10 software package which is a statistics program was used while two-substrate solution environment was used to explain the kinetic behavior of the dechlorination. It was observed as a result of experiments and statistical analysis that Moser equation is the optimal kinetic model. Given the statistical data obtained and the graph, the dual-substrate model was found to be compatible with the experimental data. The bio-kinetic parameter values obtained for the model that identifies enzymatic dechlorination kinetics were calculated as $V_{max} = 9.341 \text{ ppmO}_2/\text{min}$, $K_s = 38.254 \text{ g/L}$, $K_o = 20.747 \text{ ppm}$, $R = 1.895$ and $N = 1.233$. In the literature, no studies were found on kinetic modeling for the degradation of 2,4,6-trichlorophenol, and through this study, we have been first to conduct a study on kinetic modeling of the degradation induced by enzymatic dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol. The GC/MS analysis results showed that the chlorophenolic compound used throughout the enzymatic dechlorination performed with laccase enzyme was degraded 80% to 100%. Based on the GC/MS analysis results, the conclusion that the enzyme responsible for the dechlorination was laccase was also found to support the findings available in literature.

Giriş

Tarımsal alanlara ve çevreye toksik, mutajen ve kanserojen etkisi bilinen korofenolik bileşiklerin deklorinasyon ve detoksifikasyon kinetikleri enzim kinetik reaksiyonlarının belirlenmesiyle sağlanır. Kimya sanayinin günümüzde üretmiş olduğu klorofenolik veya aromatik bileşiklerin geniş kullanım alanları vardır. Ancak bu bileşiklerin gerek tarım alanlarında gerekse doğal çevre ortamlarında biyoyıkımı oldukça yavaş seyreden bir süreçtir. Klorlu aromatikler toksik ve rekalsitran (biyoyıkıma dirençli) olmaları nedeniyle kazandıkları xenobiotic (ksenobiyotik) özelliklerinden dolayı çevre sağlığı açısından önemli sorunlar yaratır. Bu grup bileşiklerin deklorinasyonu, bunların detoksifikasyonlarında ve biyoyıkımında önemli bir aşama olarak ortaya çıkmaktadır.

Gelişen dünyada artık uluslararası anlaşmalarla kontrol altına alınan çevre sağlığının korunmasında kimyasal süreçlere alternatif olan biyolojik süreçler giderek artan bir potansiyel kazanmaktadır. “Temiz Teknoloji-Temiz Çevre” anlayışı kapsamında maliyeti düşük ve çevre dostu biyolojik süreçlerin kullanımının yaygınlaştırılması Biyoteknoloji biliminin de en önde gelen hedefleri arasındadır.

Laboratuvar ölçeğinde *Trametes versicolor* Taşpınar (1997) fungusundan elde edilen ekstrasellüler lakkaz enziminin, toksik, mutajenik ve kanserojenik etkinliği bilinen bazı klorofenolik bileşiklerin detoksifikasyonunun yapılabileceğinin saptanması; enzim kinetik modelleme çalışmaları ile detoksifikasyonun belirlenmesi, üretimi yapılacak olan lakkaz enziminin ile farklı sanayi kollarının organoklorlu ve fenollü bileşikler açısından zengin atık sularda klor ve fenol giderim çalışmalarında kullanılabilirliğinin gösterilmesi; bu şekilde biyolojik süreçlerin kullanılmasının aynı amaçla kullanılmakta olan kimyasal süreçlere kıyasla ekonomi ve çevre sağlığı açısından avantajlarının saptanması çalışmamızın amaçları arasında yer almaktadır.

Fenol oksidazlar günümüzde lakkaz ve tirozinaz tipi fenol oksidazlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Fenol oksidazlar içerisinde dikkatleri ilk çeken lakkaz enzimidir. İlk olarak 1800’lü yıllarda, *Boletus luciferus* Yoshida (1886) adlı bir mantarın ekstratında mavi bir pigment oluşumunu bildirmiş ve daha sonra, lak ağacının lateksinde lakkazın varlığını gözlemiştir. Bu enzim ayrıca, Bertrand (1896) tarafından birkaç mantar varyetesinde de tanımlanmıştır. Bourquelot ve Bertrand (1895), Bourquelot ve Bertrand (1896) tarafından yürütülen daha sonraki çalışmalarda, bazı mantar varyetelerinin, *Russula fortens* ve *R. Nigricans* (Zawistowski ve ark. (1991) ekstratlarının renginin oksidasyon sürecinde önce kırmızıya, daha sonra koyu kahverengi ve siyaha dönüştüğünü gözlemlemişlerdir. Bu araştırmacılar, yaptıkları daha sonraki araştırmalarda *R.nigricans*’ın ekstratından, ekstrattaki bir oksidaz sisteminin varlığında melanin benzeri ürünler oluşturan bir maddeyi kristalize etmişlerdir. Bu madde, Bertrand (1896) tarafından tirozin amino asidi olarak tanımlanmıştır. Lakkaz tirozine karşı inaktif olduğundan Bertrand (1896) daha sonra tirozinaz olarak adlandırılan p-hidroksifenil amin, p-hidroksifenil metil amin, p-kresol ve fenolü de içeren çeşitli monohidroksi fenolik bileşiklerin aerobik

oksidasyonlarını katalizleyen yeni bir oksidaz sistemi keşfettiğini anlamıştır (Bertrand 1908).

Lakkaz enzimi endüstriyel kullanım alanı oldukça fazla olan bir enzimdir. Diğer peroksidaz grubu enzimler oksitleyici olarak toksik ve inhibisyon etkileri olan hidrojen peroksite gereksinim duyarken, lakkaz enzimi bu amaçla sadece çözülmüş oksijeni kullanır. Lakkaz enziminin kullanımı, aynı amaçla bu aktiviteye sahip mikroorganizma kullanılmasından daha avantajlıdır. Çünkü bir enzimatik süreç olması nedeniyle daha kısa sürede sonuç elde edilebilmektedir (Arcand and Archibald, 1991).

Materyal ve Metot

Bioreaktörde Detoksifikasyon ve Kinetik Modelleme Çalışmaları

Reaktörde gerçekleştirilen enzimatik deklorinasyon reaksiyonlarını ifade eden matematiksel kinetik modelleme çalışmaları için ortam pH’sı 5,0, ortam sıcaklığı 25°C ve deklorinasyon süresi 30 dakika olarak sabitlendi. Çalışmada aktivitesi 6,1 U olan 1 mL lakkaz enzimi kullanıldı. Kinetik modelleme çalışmaları için substrat olarak, 2000-12000 ppm aralığında değişen farklı konsantrasyonlardaki 2,4,6-triklorofenol kullanıldı. Çalışmalar 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirildi.

Klorofenolik bileşiklerin deklorinasyon kinetikleri enzim kinetiklerinin belirlenmesiyle sağlanır. Enzim kinetikleri için ikili substrat interaktif modeli başlangıç klorofenolik bileşik ve çözülmüş oksijen konsantrasyonlarının bir fonksiyonu olarak ileri sürülmektedir. Literatürde temel tek substrat ifadeleri quasi-steady-state kinetikleri olarak belirtilmektedir. Çizelge 1’de analizlerde kullanılan mekanistik tek substrat ifadeleri yer almaktadır (Shuler and Kargı, 1992).

Klorofenolik bileşiklerin deklorinasyonunu katalizleyen lakkaz için reaksiyon kinetiklerinin belirlenmesi ve kinetik matematiksel modellemesinin yapılabilmesi için 2,4,6-triklorofenolün ve çözülmüş oksijenin farklı başlangıç konsantrasyonları ele alınarak reaksiyon hızları hesaplanması yoluna gidildi. Bununla ilgili olarak 2000-12000 ppm aralığında 2,4,6-triklorofenolün değişen farklı substrat konsantrasyonları baz alındı. Reaktörde gerçekleştirilen bu çalışmada 2,4,6-triklorofenolün enzimatik deklorinasyonu sırasında lakkaz aktivitesine bağlı olarak tüketilen çözülmüş oksijen miktarı Jenway 9071 Model oksijenmetre ile ölçüldü.

Başlangıç Reaksiyon Hızlarının Bulunması

30 dakika süreyle izlenen enzimatik deklorinasyon deneyleri için başlangıç reaksiyon hızları, çözülmüş oksijen derişimi profiline doğrusal regresyonu ile elde edilen doğrunun eğiminden elde edildi.

Enzimatik Deklorinasyon Reaksiyonunu İfade Eden Matematiksel Model

Deklorinasyon deneyleri sonucunda elde edilen reaksiyon ilk hız değerleri, enzimatik deklorinasyon reaksiyonuna tepkenlerin etkilerinin matematiksel bir model ile açıklanması için SYSTAT 10 istatistik programı ile değerlendirildi. SYSTAT 10 doğrusal olmayan

regresyon yaparak sayısal çözümü gerçekleştiren bir programdır. Literatürde yer alan 5 temel enzim kinetiği ifadesi Çizelge 1’de verildi. SYSTAT 10 istatistik programı ile elde edilen reaksiyon ilk hızları ile 2,4,6-triklorofenol ve çözülmüş oksijen derişimleri, Çizelge 2’de belirtilen 25 iki substratlı kombinasyon modele göre değerlendirildi. SYSTAT 10 istatistik programı, programa girilen ilk hız ve tepken derişimlerinin maksimum 25 iterasyonda çözmeye çalışmakta ve otomatik 0 değeri ile iterasyona başlamaktadır. Program değerlendirme sonucunda kinetik modelde yer alan sabitlerin değerlerini ve kararlılık indeksini (R^2) bize sunmaktadır. Ayrıca program düzeltilmiş korelasyon sayısını da vererek modellerin birbirleriyle de karşılaştırılabilmesine olanak vermektedir (Baybalı, 2003).

Reaksiyon Ortamı Sıcaklığının Başlangıç Reaksiyon Hızı Üzerine Etkisi

Bu çalışmada 10-40°C aralığında değiştirilen farklı sıcaklık değerlerindeki başlangıç reaksiyon hızları bulundu. Farklı sıcaklıklarda izlenen enzimatik deklorinasyon deneyleri için başlangıç reaksiyon hızları, çözülmüş oksijen derişimi profilinin doğrusal regresyonu

ile elde edilen doğrunun eğiminden hesaplandı. Bulunan bu reaksiyon hızlarının incelenmesi sonucu sıcaklığın başlangıç reaksiyon hızı üzerine etkisi ve reaksiyon aktivasyon enerjisi belirlendi. Aktivasyon enerjisi hesaplanırken Arrhenius eşitliğinden yararlanıldı. Buna göre, yapılan sıcaklık deneylerinde 1/T sıcaklık değerlerine karşılık çizilen lnV grafiğinin eğiminden E_a değeri hesaplandı.

Sonuçlar

2,4,6-triklorofenol ve Oksijen Derişimlerinin Başlangıç Reaksiyon Hızları Üzerine Etkileri

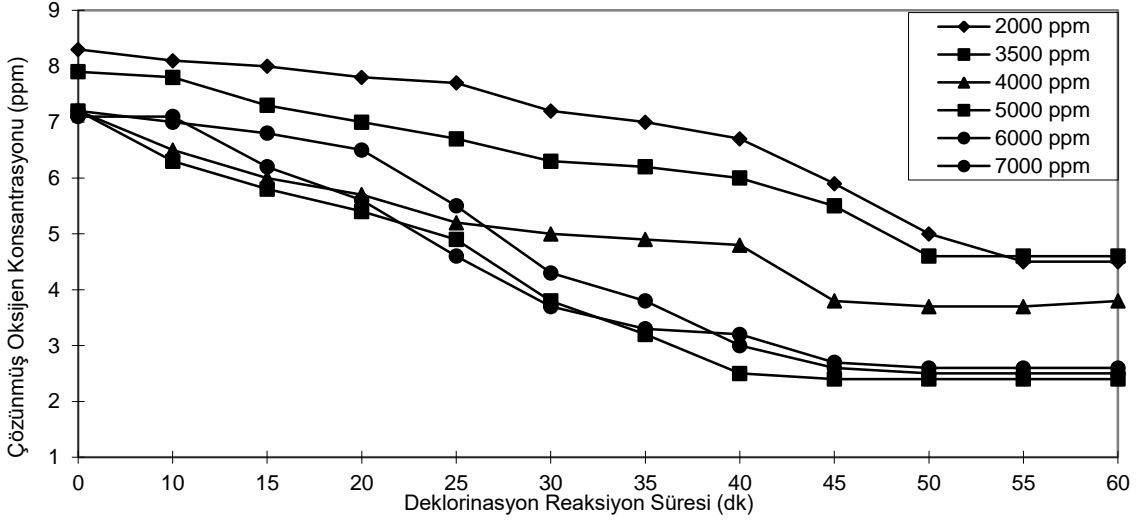
Kinetik modelleme çalışmaları kapsamında 2000-7000 ppm arasında değişen düşük konsantrasyonlardaki (Şekil 1) ve 8000-12000 ppm arasında değişen yüksek konsantrasyonlardaki (Şekil 2) 2,4,6-triklorofenolün deklorinasyonu sırasında çözülmüş oksijen konsantrasyonlarının değişimi incelendi. Deneyde reaksiyon sıcaklığı 25°C, pH:5.0 olarak sabitlendi. Reaksiyon ortamına %50 (V:V) etilalkol ve %50 (V:V) 50 mM sodyum asetat tamponu eklendi. Çalışmada 6,1 U enzim kullanıldı.

Çizelge 1 Literatürde yer alan mekanistik farklı kinetik modeller (Shuler ve Kargı, 1992).

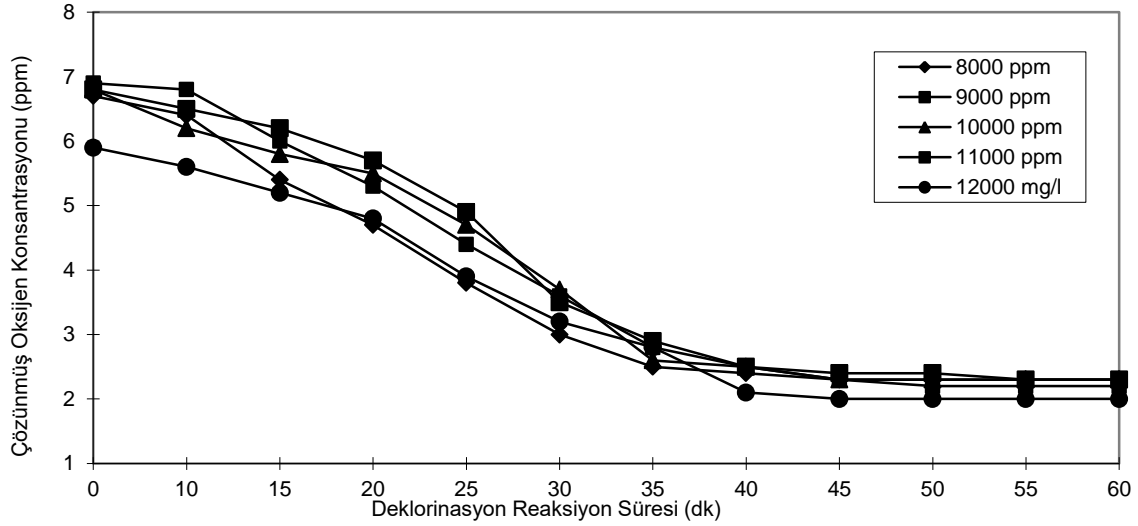
Hız ifadesi	Kinetik Model
$V=V_mS/(K_m+S)$	Michaelis-Menten (M-M)
$V=V_mS^n/(K_m+S^n)$	Moser (Mo)
$V=V_mS/(K_m(1+(S/K_i))+S)$	Yarışmalı inhibisyon (Y.li.İ.)
$V=V_mS/((K_m+S)(1+(S/K_i)))$	Yarışmasız inhibisyon (Y.sız.İ.)
$V=V_mS/(K_m+S(1+(S/K_i)))$	Karışık inhibisyon (K.İ.)

Çizelge 2 Kinetik model çalışmalarında kullanılan iki substratlı reaksiyon hız ifadeleri (Baybalı, 2003)

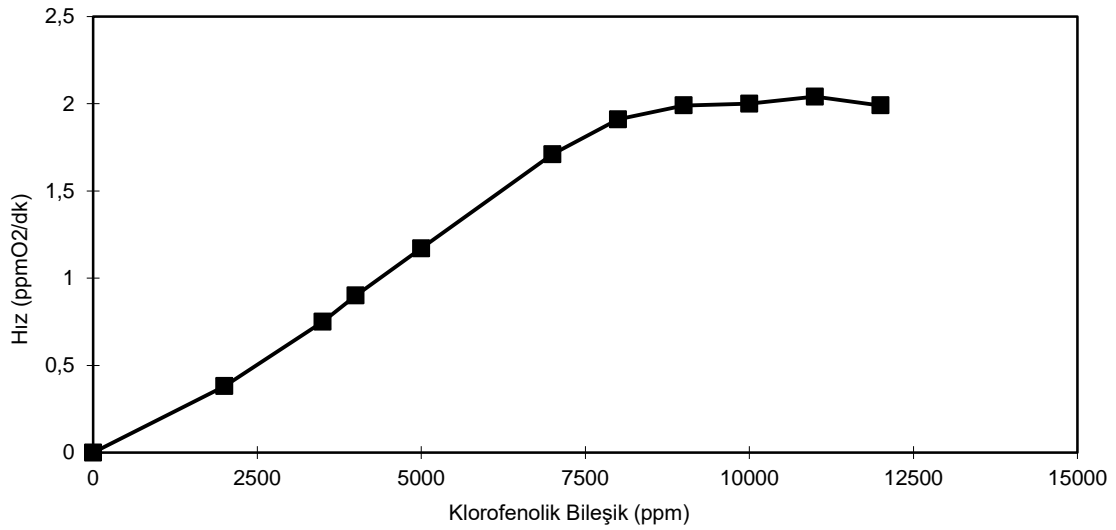
No	Hız İfadesi	Kombinasyon
1	$V=V_m*(S/(K_s+S))*(O/(K_o+O))$	(M-M) * (M-M)
2	$V=V_m*(S/(K_s+S))*(O^n/(K_o+O^n))$	(M-M) * (Mo)
3	$V=V_m*(S/(K_s+S))*(O/((K_o*(1+(O/K_i))+O))$	(M-M) * (Y.li.İ.)
4	$V=V_m*(S/(K_s+S))*(O/((K_o+O)*(1+(O/K_i)))$	(M-M) * (Y.sız.İ.)
5	$V=V_m*(S/(K_s+S))*(O/(K_o+O*(1+(O/K_i)))$	(M-M) * (K.İ.)
6	$V=V_m*(S^f/(K_s+S^f))*(O/(K_o+O))$	(Mo) * (M-M)
7	$V=V_m*(S^f/(K_s+S^f))*(O^n/(K_o+O^n))$	(Mo) * (Mo)
8	$V=V_m*(S^f/(K_s+S^f))*(O^n/((K_o*(1+(O/K_i))+O))$	(Mo) * (Y.li.İ.)
9	$V=V_m*(S^f/(K_s+S^f))*(O^n/((K_o+O)*(1+(O/K_i)))$	(Mo) * (Y.sız.İ.)
10	$V=V_m*(S^f/(K_s+S^f))*(O^n/(K_o+O*(1+(O/K_i))))$	(Mo) * (K.İ.)
11	$V=V_m*(S/((K_s*(1+(S/K_{is}))+S))*O/(K_o+O))$	(Y.li.İ.) * (M-M)
12	$V=V_m*(S/((K_s*(1+(S/K_{is}))+S))*O^n/(K_o+O^n))$	(Y.li.İ.) * (Mo)
13	$V=V_m*(S/((K_s*(1+(S/K_{is}))+S))*O/((K_o*(1+(O/K_{io}))+O))$	(Y.li.İ.) * (Y.li.İ.)
14	$V=V_m*(S/((K_s*(1+(S/K_{is}))+S))*O/((K_o+O)*(1+(O/K_i)))$	(Y.li.İ.) * (Y.sız.İ.)
15	$V=V_m*(S/((K_s*(1+(S/K_{is}))+S))*O/(K_o+O*(1+(O/K_{io}))))$	(Y.li.İ.) * (K.İ.)
16	$V=V_m*(S/((K_s+S)*1+(S/K_i)))*O/(K_o+O)$	(Y.sız.İ.) * (M-M)
17	$V=V_m*(S/((K_s+S)*1+(S/K_i)))*O^n/(K_o+O^n)$	(Y.sız.İ.) * (Mo)
18	$V=V_m*(S/((K_s+S)*1+(S/K_i)))*O/((K_o*(1+(O/K_{io}))+O))$	(Y.sız.İ.) * (Y.li.İ.)
19	$V=V_m*(S/((K_s+S)*1+(S/K_i)))*O/((K_o+O)*(1+(O/K_i)))$	(Y.sız.İ.) * (Y.sız.İ.)
20	$V=V_m*(S/((K_s+S)*1+(S/K_i)))*O/(K_o+O*(1+(O/K_{io})))$	(Y.sız.İ.) * (K.İ.)
21	$V=V_m*(S/(K_s+(S*(1+(S/K_{is})))))*O/(K_o+O)$	(K.İ.) * (M-M)
22	$V=V_m*(S/(K_s+(S*(1+(S/K_{is})))))*O^n/(K_o+O^n)$	(K.İ.) * (Mo)
23	$V=V_m*(S/(K_s+(S*(1+(S/K_{is})))))*O/((K_o*(1+(O/K_{io}))+O))$	(K.İ.) * (Y.li.İ.)
24	$V=V_m*(S/(K_s+(S*(1+(S/K_{is})))))*O/((K_o+O)*(1+(O/K_i)))$	(K.İ.) * (Y.sız.İ.)
25	$V=V_m*(S/(K_s+(S*(1+(S/K_{is})))))*O/(K_o+O*(1+(O/K_{io})))$	(K.İ.) * (K.İ.)



Şekil 1 2,4,6-triklorofenol'ün farklı başlangıç konsantrasyonları için çözünmüş oksijen konsantrasyonu/zaman profili (2,4,6-TCP'ün düşük konsantrasyonları)



Şekil 2 2,4,6-triklorofenol'ün farklı başlangıç konsantrasyonları için çözünmüş oksijen konsantrasyonu/zaman profili (2,4,6-TCP'ün yüksek konsantrasyonları)



Şekil 3 Başlangıç reaksiyon hızının farklı başlangıç klorofenol derişimleri ile değişimi

Başlangıç Klorofenol ve çözünmüş oksijen derişimlerinden elde edilen başlangıç tepkiyen derişimleri ve reaksiyon hızları belirlendi. Reaksiyon başlangıç hızları, deklorinasyon zamanına karşı çözünmüş oksijen derişimini gösteren regresyon eğrilerinin eğiminden hesaplandı. Deneysel olarak elde edilen net başlangıç reaksiyon hızları Çizelge 3’de verildi.

Deneysel olarak elde edilen başlangıç reaksiyon hızları, başlangıç klorofenol derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3).

Çizelge 3 Deklorinasyon başlangıç reaksiyon hızları

2,4,6-triklorofenol Derişimi (ppm)	Başlangıç Çözünmüş Oksijen Derişimi (ppm)	Başlangıç Reaksiyon Hızı (ppmO ₂ /dk)
0	0	0
2000	8,3	0,38
3500	7,9	0,75
4000	7,2	0,90
5000	7,1	1,17
6000	7,0	1,27
7000	6,9	1,71
8000	6,8	1,91
9000	6,7	1,99
10000	6,6	2,00
11000	5,9	2,04
12000	5,9	2,05

Çizelge 4 Enzimatik deklorinasyon kinetiğini tanımlayan model için elde edilen biyokinetik parametre değerleri

Biyokinetik Parametre	Enzimatik Biyokinetik Değer
V _{max}	9,341 ppmO ₂ /dk
K _s	38,254 g/L
K _o	20,747 ppm
R	1,895
N	1,233

Deklorinasyon Kinetiği İçin Matematiksel Model

Enzimatik deklorinasyon kinetiğini tanımlayan model için elde edilen biyokinetik parametre değerleri, Çizelge 2’de belirtilen 25 kombinasyon modelin denenmesiyle SYSTAT 10 Programı kullanılmak suretiyle bulundu. Kinetik modelin Moser Eşitliği’ne uyumluluk gösterdiği saptandı.

Değerlendirmeler sonucunda, düzeltilmiş korelasyon katsayısı 0,986 olan ve anlamlı biyo-kinetik katsayı değerlerini veren, aşağıdaki eşitlikteki model sistemi, en iyi tanımlayan kombinasyon olarak belirlenmiştir. Bu model Çizelge 2’de belirtilen 7’nci eşitliktir.

$$V = V_m \cdot (S^r / (K_s + S^r)) \cdot (O^n / (K_o + O^n))$$

Bu eşitlikte

V : Başlangıç reaksiyon hızı (ppmO₂/dak)

V_m : Maksimum reaksiyon hızı (ppmO₂/dak)

S : Klorofenolik bileşiğin (2,4,6-Triklorofenol’ün) başlangıç derişimi (ppm)

O : Çözünmüş oksijenin başlangıç derişimi (ppm)

K_s : Klorofenolik bileşiğe göre Moser sabiti (ppm)

K_o : Oksijene göre Moser sabiti (ppm)

n : Moser denkliği sabiti

r : Moser denkliği sabiti

Model uyumunun gözlenmesi için deneysel olarak elde edilmiş hızlara karşı modelin verdiği hızlar Şekil 4.’de grafiğe geçirildi. Elde edilen istatistiksel verilerden ve grafiğten, çift-substratlı modelin deney verileri ile iyi bir uyum içinde olduğu görülmektedir.

Sabit enzim aktivitesi için (6,1 U) V_{max}, K_s, K_o değerleri SYSTAT 10 istatistik paket programı yardımıyla hesaplandı. Elde edilen değerler Çizelge 4’de verildi.

Çizelgedeki bu değerler 2,4,6-Triklorofenol’ün enzimatik olarak deklorinasyon reaksiyonunu tanımlayan değerlerdir. Literatürde enzimatik 2,4,6-Triklorofenol deklorinasyonu için hiçbir kinetik model çalışması yapılmamıştır. İlk kez tarafımızdan 2,4,6-Triklorofenol’ün enzimatik deklorinasyonunun kinetik modellenmesi yapılmıştır.

Sıcaklığın Başlangıç Reaksiyon Hızına Etkisi

Sıcaklık deneyleri sonucunda elde edilen ilk hızlar deney süresince sabit tutulan sıcaklık değerlerine karşı grafiğe geçirildi. Yüksek sıcaklıklarda gözlemlenen yüksek hızlar enzim kimyası gereğince belirli bir sıcaklıktan sonra enzimin denatüre olması sebebiyle gözlenemez. Şekil 5’de deklorinasyon reaksiyonunun yürütüldüğü reaksiyon sıcaklıklarında elde edilen reaksiyon ilk hız değerleri görülmektedir. Buna göre reaksiyon ilk hız değerleri 40°C’ye kadar artmış ancak artış trendi bu sıcaklıktan sonra azalmaya başlamıştır.

Lakkaz enziminin katalizlediği deklorinasyon reaksiyonu için aktivasyon enerjisi Arrhenius eşitliği ve reaksiyon için elde edilen kinetik modelde yapılan matematiksel değişiklikler sonucu elde edilen yeni formülde lnV’ye karşılık 1/T değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edildi.

Değişiklikler şu şekilde gösterilebilir:

$$V = V_m \cdot (S^r / (K_s + S^r)) \cdot (O^n / (K_o + O^n))$$

deklorinasyon kinetik ifadesinde tüm sıcaklık deneyleri için

$$(S^r / (K_s + S^r)) \cdot (O^n / (K_o + O^n))$$

sabit bir değer almaktadır. O halde eşitlik

$$V = \beta V_{max}$$

şeklinde yazılabilir. Burada β bir sabit sayıdır.

$$V_{max} = k_2 (E_o)$$

$$k_2 = A e^{-E_o/RT}$$

olarak ifade edilebileceğine göre,

$$V \propto V_{max} \propto A e^{-E_o/RT}$$

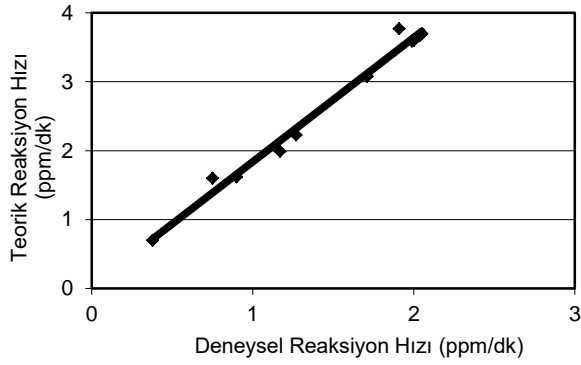
şeklinde bir orantı yazılabilir. Buna göre sıcaklık deneyleri sonucunda elde edilen ilk hız değerleri (V) Arrhenius eşitliği ile doğru orantılıdır. Buradan;

$$V = \lambda e^{-E_o/RT}$$

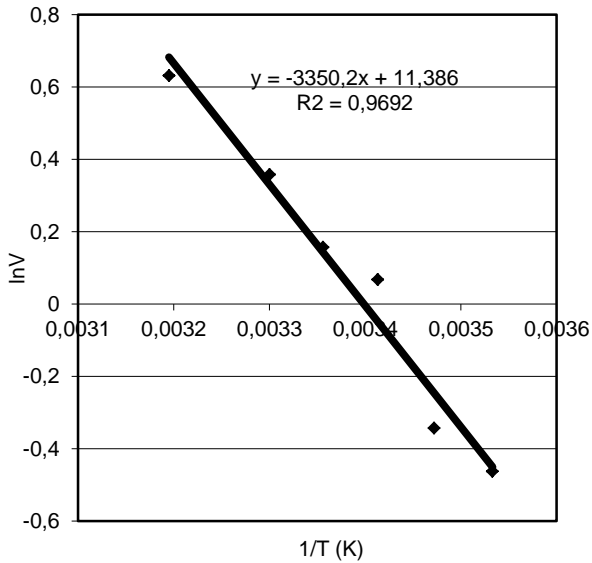
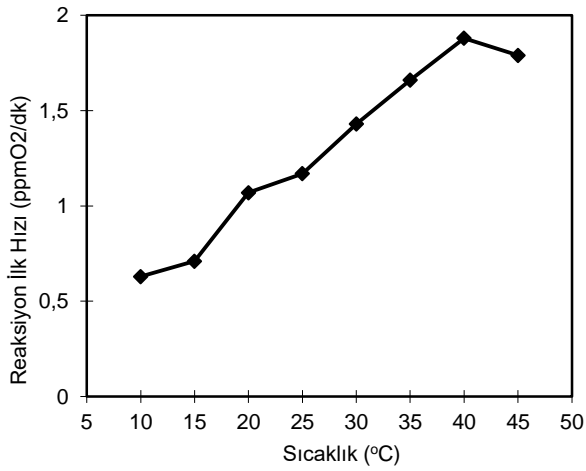
şeklinde bir eşitlik yazılabilir. Burada λ yeni bir orantı katsayısıdır. Eşitliğin her iki tarafının da doğal logaritması alındığında

$$\ln V = \ln \lambda - E_a / RT$$

şeklinde bir ifade elde edilir.



Şekil 4 Teorik olarak hesaplanan başlangıç reaksiyon hızlarına karşı deneysel olarak elde edilen başlangıç reaksiyon hızları



Şekil 6 lnV'ye karşı 1/T'nin değişim profili

Bu eşitliğe göre lnV'ye karşılık çizilen 1/T değerleri bize Şekil 6'daki grafiği vermektedir.

Elde edilen grafiğin eğimi $-E_a / R$ 'ye eşittir. Buradan E_a değeri 6.618 kcal/mol olarak hesaplandı. Yapılan bir diğer çalışmada ise Resorsinol'ün enzimatik polimerleşme reaksiyonu için aktivasyon enerjisi 11.250 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Her iki çalışmada elde edilen bu değerler, literatürde lakkaz katalizli reaksiyonlar için verilen 4-20 kcal/mol aralığındadır Shuler ve Kargı (1992), Bollag ve ark. (1988).

Tartışma

Kinetik modelleme çalışmaları kapsamında tarım alanları ve çevreye toksik etki gösteren klorofenolik bileşiğin deklorinasyonuna bağlı çözülmüş oksijen konsantrasyonlarının değişimi incelendi. 2,4,6-triklorofenol'ün fungal enzimatik detoksifikasyonuna bağlı olarak başlangıç çözülmüş oksijen derişiminin 8.3 ppm'den 5.9 ppm'e düştüğü gözlemlendi. Detoksifikasyon amacıyla kullanılan lakkaz enziminin çözülmüş oksijene ihtiyaç duyduğu saptandı. Başlangıç klorofenol ve çözülmüş oksijen derişimlerinden elde edilen başlangıç tepkiyen derişimleri ve reaksiyon hızları Çizelge 3.'de verildi. Deneysel olarak elde edilen başlangıç reaksiyon hızları, başlangıç klorofenol derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 3). Enzimatik deklorinasyon kinetiğini tanımlayan model için elde edilen biyokinetik parametre değerleri, Çizelge 2'de belirtilen 25 kombinasyon modelin denenmesiyle SYSTAT 10 Programı kullanılmak suretiyle bulundu. Kinetik modelin Moser Eşitliği'ne uyumluluk gösterdiği saptandı.

Değerlendirmeler sonucunda, korelasyon katsayısı 0.986 olan ve anlamlı biyo-kinetik katsayı değerlerini veren, $V = V_m \cdot (S^r / (K_s + S^r)) \cdot (O^N / (K_o + O^N))$ eşitliliği, kinetik modellemeyi en iyi tanımlayan kombinasyon olarak belirlendi.

Elde edilen istatistiksel verilerden ve grafikten, çift-substratlı modelin deney verileri ile iyi bir uyum içinde olduğu görüldü.

Enzimatik deklorinasyon kinetiğini tanımlayan model için elde edilen biyokinetik parametre değerleri $V_{max} = 9.341$ ppmO₂/dk, $K_s = 38.254$ g/L, $K_o = 20.747$ ppm, $R = 1.895$ ve $N = 1.233$ 'tür.

Bu değerler 2,4,6-triklorofenol'ün enzimatik olarak degradasyon reaksiyonunu tanımlayan değerlerdir. Literatürde 2,4,6-triklorofenol'ün degradasyonu ile ilgili olarak kinetik model çalışmasına rastlanmamıştır. İlk kez bu çalışma ile 2,4,6-triklorofenol'ün enzimatik deklorinasyonuna bağlı degradasyonunun kinetik modellemesi gerçekleştirildi.

Sıcaklığın başlangıç reaksiyon hızına etkisinin denendiği kinetik modelleme çalışmalarında reaksiyon ilk hız değerlerinin 40°C'ye kadar arttığı, ancak artış trendinin bu sıcaklıktan sonra azalmaya başladığı saptandı. Literatürde yer alan bilgilere göre, lakkaz enziminin katalizlediği bazı polimerleşme reaksiyonlarının yürütüldüğü reaksiyon sıcaklıklarından elde edilen ilk hız değerlerinin 50°C'ye kadar artış gösterdiği, ancak bu artış trendinin 45°C'den sonra azalmaya başladığı belirlenmiştir (Baybalı, 2003). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar literatür bilgisini doğrulamaktadır.

Lakkaz enziminin katalizlediği deklorinasyon reaksiyonu için aktivasyon enerjisi Arrhenius eşitliği kullanılarak hesaplandı. Buradan E_a değeri 6.618 kcal/mol olarak elde edildi. Elde edilen bu değer lakkaz enziminin katalizlediği diğer enzimatik reaksiyonlar ile uyum göstermektedir Atlow ve ark. (1984) 1 naftol'ün enzimatik polimerleşme reaksiyonu için aktivasyon enerjisi 15.362 kcal/mol olarak hesaplanmıştır Aktaş (1999), Aktaş ve ark. (2001). Yapılan bir diğer çalışmada ise Resorsinol'ün enzimatik polimerleşme reaksiyonu için aktivasyon enerjisi 11.250 kcal/mol olarak hesaplanmıştır

(Baybalı, 2003). Her üç çalışmada elde edilen bu değerler, literatürde lakkaz katalizli reaksiyonlar için verilen 4-20 kcal/mol aralığındadır (Shuler ve Kargı, 1992).

Sonuç olarak; bu çalışma ile beyaz çürükçül mantar *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkaz enzimi ile 2,4,6-triklorofenolün enzimatik detoksifikasyonunun kinetik modellemesi yapılarak enzim patentleme aşamasında kriterler arasında yer alan kinetik modelleme çalışması yapıldı. Elde edilen kinetik modellemenin Moser Eşitliğine uyum gösterdiği görüldü.

Bu araştırma ile ilk kez 2,4,6-triklorofenolün enzimatik deklorasyonuna bağlı degradasyon ve detoksifikasyonunun kinetik modellemesi gerçekleştirildi.

Kaynaklar

- Aktaş N. 1999. 1-Naftol'un Enzimatik Polimerizasyonunun ve Reaksiyon Kinetiğinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Bilim Uzmanlığı Tezi.
- Aktaş N, Çiçek H, Ünal Taşpınar A, Kibarer G, Kolankaya N, Tanyolaç A. 2001. Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol. *Bioresource Technology*. 80: 29-36.
- Arcand RL, Archibald FS. 1991. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*, *Enzyme. Microb. Technol.* 13:194-203.

- Atlow SC, Banadonna-Apora L, Klivanov AM. 1984. Dephenolization of industrial wastewaters catalysed by polyphenol oxidase, *Biotechnology and Bioengineering*. 26: 599-603.
- Baybalı M. 2003. Resorsinol'ün Enzimatik Polimerizasyon Kinetiğinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Mühendislik Tezi.
- Bertrand G. 1896. Sur une Nouvelle Oxydase, ou Ferment Soluble Oxydant, D'origine Vegetale. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 122: 1215.
- Bertrand G. 1908. Action of tyrosinase on some compounds similar to tyrosine. *C.R. Acad. Sci. Paris*. 145: 1352-1355.
- Bollag JM, Shuttleworth, KL, Anderson DH. 1988. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *App. and Environ. Microb.* 54: 3086-3091.
- Bourquelot E, Bertrand G. 1895. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 47: 579.
- Bourquelot E, Bertrand G. 1896. *J. Pharm. Chem.* 3: 177-180.
- Shuler ML, Kargı, F. 1992. *Bioprocesses Engineering: Basic Concepts*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs NJ. USA. 58-98p.
- Taşpınar A. 1997. Kraft Selüloz Hamurunun Biyolojik Deklorasyonunu. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Yoshida H. 1886. *Chemistry of Lacquer (Urushi)*. Part I, *J. Chem. Soc.* 43: 472-486.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C. G. and Eskin, N. A. M., 1991, Phenol oxidase. In: *Oxidative enzymes in foods*, D. S. Robinson and N.A.M. Eskin, eds., Elsevier Applied Science London and New York, 217-273.