

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BAKTERİYEL KAYNAKLI LİGNİNOLİTİK ÜÇ ENZİMİN EŞ ZAMANLI VE
FÜZYON OLARAK ÜRETİMİ VE KAĞIT HAMURUNUN AĞARTILMASINA
ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Ayşegül ÖZER

ARALIK 2018

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun / / gün ve sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Bakteriyel Kaynaklı Ligninolitik Üç Enzimin Eş Zamanlı ve Füzyon Olarak Üretimi ve Kağıt Hamurunun Ağartılmasına Etkisi“ adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır. Ligninolitik enzimlerin kağıt ağartma kapasitelerinin belirlendiği bu araştırma TÜBİTAK 113Z741 numaralı araştırma projesinden sağlanan imkânlarla yapılmıştır.

Tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, laboratuvar çalışmalarım sırasında deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, kağıt ağartma çalışmalarında yardımcı olan sayın hocam İlhan DENİZ’e, Dr. Onur Tolga OKAN’a, Orman Endüstri Yüksek Mühendisi İsmail AYDIN’a ve Orman Endüstri Yüksek Mühendisi Kevser ALTINTAŞ’a ayrıca çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan ve yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Uğur UZUNER’e, Dr. Fulya AY ŞAL’a ve tüm laboratuvar çalışma arkadaşlarıma, beni yalnız bırakmayan aileme ve desteğinden dolayı TÜBİTAK’a (Proje No: 113Z741) teşekkür ederim.

Ayşegül ÖZER
Trabzon 2018

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora tezi olarak sunduğum “Bakteriyel Kaynaklı Ligninolitik Üç Enzimin Eş Zamanlı ve Füzyon Olarak Üretilmesi ve Kağıt Hamurunun Ağartılmasına Etkisi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sabriye ÇANAKCI'nın sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 27 /12/2018

Ayşegül ÖZER

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Türkiye’de Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisi.....	3
1.3. Kağıt Hamurlarının Ağartılması	5
1.3.1. Ağartmanın Tanımı ve Amacı	5
1.3.2. Ağartma Kademeleri ve Dizinleri.....	6
1.3.3. Oksijen Delignifikasyonu	8
1.3.4. Çelat Yıkaması.....	9
1.3.5. Hidrojen Peroksit Ağartması	10
1.4. Ağartmanın Çevresel Etkileri	12
1.5. Kağıt Hamurunun Ağartılmasında Ligninolitik Enzimler	12
1.5.1. Lignin Peroksidaz (LiP).....	14
1.5.2. Lakkaz (Lak).....	15
1.5.3. Glutatyon-S-Transferaz (GST)	17
1.6. Enzimlerin Füzyon ve Operon Oluşturacak Şekilde Kullanımı	18
1.7. Çalışmanın Amacı	19
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	21
2.1. Kullanılan Mikroorganizma ve Plazmitler	21
2.2. Araştırma Materyali.....	21
2.3. Ligninolitik Genlerin Dizinlerinin Belirlenmesi	21
2.4. Ligninolitik Genlerin PCR ile Çoğaltılması	22

2.5.	Ligninolitik Genlerin Klonlanması ve Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması	22
2.6.	Ligninolitik Genlerin pMA0911 Vektörüne Klonlanması	22
2.7.	Ligninolitik Genlerin pMA0911 Vektörüne Füzyon Proteini Oluşturacak Şekilde Klonlanması.....	23
2.8.	Ligninolitik Genlerin pMA0911 Vektörüne Operon Düzeninde Klonlanması	24
2.9.	Bacillus WB800 Hüresine Transformasyon ve Gen İfadesi	25
2.10.	Lignin Peroksidaz Zimogram Analizi	25
2.11.	Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu.....	26
2.11.1.	Optimum pH	26
2.11.2.	Optimum Sıcaklık.....	26
2.11.3.	pH Kararlılığı.....	26
2.11.4.	Isıl Kararlılık.....	27
2.11.5.	Enzim Kinetiği.....	27
2.12.	Kraft Lignin Degredasyon Zonunun Belirlenmesi	27
2.13.	Kraft Lignin Degredasyon Oranının Belirlenmesi	28
2.14.	Rekombinant Bakterilerin Kraft Lignin Degredasyon Oranının Belirlenmesi	28
2.15.	Kağıt Hamurunun Enzimle Muamelesi ve Kappa Numarası Tayini	29
2.16.	Kağıt Hamurunun Rekombinant Bakteri ile Muamele Şartlarının Optimizasyonu	30
2.17.	Kağıt Hamurlarının Enzimle Muamele Şartlarının Optimizasyonu	30
2.18.	Kağıt Hamuru Ağartma Çalışmaları.....	32
2.18.1.	Oksijen Delignifikasyonu (O).....	33
2.18.2.	Çelatlama İşlemi (Q).....	33
2.18.3.	Hidrojen Peroksit Ağartması (P)	34
2.18.4.	Delignifikasyon Derecesinin Hesaplanması	35
2.19.	Kağıtlara Uygulanan Fiziksel ve Optik Testler	35
2.19.1.	Test Kağıtlarının Hazırlanması.....	35
2.19.2.	Gramaj, Kalınlık, Yoğunluk ve Hacimlilik Tayinleri.....	36
2.19.3.	Patlama Testi	36
2.19.4.	Kopma Testi.....	37
2.19.5.	Yırtılma Testi.....	37
2.19.6.	Deneme Kağıtlarına Uygulanan Optik Testler	37
2.20.	SEM Analizi	38

3.	BULGULAR.....	39
3.1.	Ligninolitik Genlerin PCR ile çoğaltılması ve pMA0911 Vektörüne Klonlanması	39
3.2.	Ligninolitik Genlerin pMA0911 Vektörüne Füzyon Proteini Oluşturacak Şekilde Klonlanması.....	40
3.3.	Ligninolitik Genlerin pMA0911 Vektörüne Operon Düzeninde Klonlanması .	40
3.4.	Bacillus Hücreesine Transformasyon ve Gen İfadesi	41
3.5.	Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu.....	43
3.5.1.	Optimum pH	43
3.5.2.	Optimum Sıcaklık	44
3.5.3.	pH Kararlılığı.....	46
3.5.4.	Isıl Kararlılık.....	47
3.5.5.	Enzim Kinetiği.....	49
3.6.	Kraft Lignin Degredasyon Zonunun Belirlenmesi	51
3.7.	Enzimlerin Kraft Lignin Degredasyon Oranının Belirlenmesi.....	52
3.8.	Rekombinant Bakterilerin Kraft Lignin Degredasyon Oranının Belirlenmesi..	52
3.9.	Kağıt Hamurunun Enzimle Muamelesi ve Kappa Tayini.....	53
3.10.	Kağıt Hamurunun Rekombinant Bakteri ile Muamele Şartlarının Optimizasyonu	53
3.11.	Kağıt Hamurunun Enzimle Muamele Şartlarının Optimizasyonu.....	56
3.12.	Kağıt Hamuru Ağartma alışmaları	62
3.13.	Kağıtlara Uygulanan Fiziksel ve Optik Testler	69
3.14.	Deneme Kağıtlarına Uygulanan Optik Testler	72
3.15.	SEM Analizinin Değerlendirilmesi	73
4.	TARTIşMA	76
5.	SONUÇLAR.....	92
6.	ÖNERİLER.....	95
7.	KAYNAKLAR	96
8.	EKLER	114

ÖZGEçMİş

Doktora Tezi

ÖZET

BAKTERİYEL KAYNAKLI LİGNİNOLİTİK ÜÇ ENZİMİN EŞ ZAMANLI VE
FÜZYON OLARAK ÜRETİMİ VE KAĞIT AĞARTILMASINA ETKİSİ

Ayşegül ÖZER

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

2018, 113 Sayfa, 4 Ek Sayfa

Bu çalışmada bakteriyel kaynaklı ligninolitik enzimler olan KpnGST, BmgLac ve RjoLip genleri füzyon ve operon düzeni oluşturacak şekilde klonlanarak ifade edildi ve biyokimyasal özellikleri belirlendi ve kızılçam kraft ve atık kağıt hamurları üzerinde optimize edildi. Optimize edilen enzimlerin tekli, ikili, üçlü ve füzyon protein formlarında her iki kağıt hamurunda ağartma dizinleri gerçekleştirilerek elde edilen kağıtların fiziksel ve optik özellikleri belirlendi. Kızılçam hamuruna uygulanan TCF ağartma dizini sonunda delignifikasyon derecesi füzyon proteininde %68,11'den %76,62'ye, üçlü enzim kombinasyonunda %69,75'den %79,18'e yükseldiği tespit edildi. Atık kağıt hamuruna yapılan TCF ağartma dizini sonucunda delignifikasyon derecesi füzyon proteininde %61,88'den %73,69'a, üçlü enzim kombinasyonunda %60,89'dan %74,65'e yükseldiği tespit edildi. Ligninolitik enzimlerle muamele edilen kızılçam hamurlarından elde edilen kağıtların ISO parlaklık değerlerinde füzyon ve üçlü enzim kombinasyonu için sırasıyla %20,21 ve %22, atık kağıt hamurlarından elde edilen kağıtların ISO parlaklık değerlerinde ise füzyon ve üçlü enzim kombinasyonu için sırasıyla %15,2 ve %16,66 oranında artış meydana geldiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler : Ağartma dizini, Füzyon, Gen İfadesi, Kappa numarası

PhD Thesis

SUMMARY

OVEREXPRESSION OF THREE BACTERIAL LIGNINOLYTIC ENZYMES AS
SIMULTANEOUSLY AND IN A FUSION FORM AND EFFECT OF PAPER
BLEACHING

Ayşegül ÖZER

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2018, 113 Pages, 4 Appendix Page

In this study, the genes encoding for KpnGST, BmgLac and RjoLip, which are bacterial ligninolytic enzymes, were cloned in both fusion and operon form, expressed and biochemical properties of the enzymes were determined and have been optimized over pine kraft and waste paper pulps. Enzymes were treated with pine kraft and waste paper pulps in single, double and triple combination. The bleaching sequences of pulps were carried out and physical and optical properties of pulps were determined. TCF bleaching sequence of pine kraft pulp analyses were resulted as the delignification rate is increased from 68.11% to 76.62%, 69.75% to 79.18% for fusion form, triple enzyme combination, respectively. TCF bleaching sequence of waste paper pulp analyses have showed that the delignification rate is increased from 61.88% to 73.69%, 60.89% to 74.65% for fusion form, triple enzyme combination, respectively. The ISO brightness value of the enzymes treated with pine kraft pulps were increased as 20.21% and 22% for fusion form and triple enzyme combination respectively. In the same way, the ISO brightness value of the enzymes treated with waste paper pulps were increased as 15.2% and 16.66% for fusion form and triple enzyme combination respectively.

Key Words: Bleaching sequence, Expression, Fusion, Kappa number

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Kraft hamurunun kademeli olarak ağartılması sonucunda oluşan renk değişimi	7
Şekil 2. Lignin peroksidazın katalitik döngüsü.....	15
Şekil 3. Lakkaz tarafından katalizlenen reaksiyonun genel şeması.....	16
Şekil 4. Bakteriyel GST'lar tarafından katalizlenen reaksiyon örnekleri	18
Şekil 5. Deneme kağıtlarının fiziksel testler için hazırlanmasında oluşturulan kesim şablonu	36
Şekil 6. GST, lignin peroksidaz ve lakkaz genlerinin PCR sonucu oluşan ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	39
Şekil 7. pMA0911 ifade vektöründe oluşturulan klonların restriksiyon enzimleriyle kesilmesi sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü.....	40
Şekil 8. Operon düzeninde ve füzyon şeklinde oluşturulan PCR fragmentinin pMA0911 klonlarının restriksiyon enzimleriyle kesilmesi sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü.....	41
Şekil 9. Operon düzeninde elde edilen fragment.....	41
Şekil 10. Bacillus WB800 hücreesindeki proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü	42
Şekil 11. Füzligninaz proteini içinde yer alan enzimlerden biri olan lignin peroksidazın zimogram görüntüsü.	43
Şekil 12. KpnGST, RjoLip ve BmgLac enzimlerinin optimum pH grafiği.....	44
Şekil 13. Füzyon proteini içinde yer alan KpnGST, RjoLip ve BmgLac enzimlerinin optimum pH grafiği	44
Şekil 14. KpnGST, RjoLip ve BmgLac enzimlerinin optimum sıcaklık grafiği	45
Şekil 15. Füzligninaz proteini içinde yer alan KpnGST, RjoLip ve BmgLac enzimlerinin optimum sıcaklık grafiği.....	45
Şekil 16. RjoLip enziminin pH kararlılık grafiği.....	46
Şekil 17. BmgLac enziminin pH kararlılık grafiği	47
Şekil 18. KpnGST enziminin pH kararlılık grafiği.....	47
Şekil 19. RjoLip enziminin ısıl kararlılık grafiği.....	48
Şekil 20. BmgLac enziminin ısıl kararlılık grafiği	48
Şekil 21. KpnGST enziminin pH kararlılık grafiği.....	49
Şekil 22. Ligninolitik enzimlerin Michealis-Menten grafiği	50
Şekil 23. Oluşturulan füzligninaz proteinindeki ligninolitik enzimlerin Michealis-Menten grafiği	51

Şekil 24.	Kızılçam kraft hamuru liflerinin SEM görüntüsü.....	74
Şekil 25.	Atık kağıt hamuru liflerinin SEM görüntüsü.....	75



TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Türkiye’deki kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde ithalat ve ihracatın yıllara göre dağılımı.....	4
Tablo 2. Ağartmada işlemlerinde kullanılan kimyasal maddeler	6
Tablo 3. Kağıt hamurlarının ağartılmasında kullanılan kimyasallar ve sembolleri	8
Tablo 4. pMA0911 vektörüne klonlama yapmak için kullanılan primerler	24
Tablo 5. Rekombinant bakteri inokülasyonu ile yapılan ağartmanın optimizasyon şartları	30
Tablo 6. Direkt enzim uygulanması ile yapılan ağartmanın optimizasyon şartları	32
Tablo 7. Kağıt hamurlarının ağartma dizininde kullanılan deney planı	34
Tablo 8. Ligninolitik enzimlerin kraft lignin degradasyon zonları	52
Tablo 9. Ligninolitik enzimlerin kraft lignin degradasyon oranları.....	52
Tablo 10. Rekombinant bakterilerin kraft lignin degradasyon oranları.....	52
Tablo 11. Kağıt hamurlarının ligninolitik enzimlerle muamelesi sonrası kappalar numaraları	53
Tablo 12. Kızılçam kraft hamurunun rekombinant bakterilerle muamelesi sonrasındaki elde edilen kappalar numaraları.....	55
Tablo 13. Kızılçam kraft hamuruna KpnGST enzimi uygulamasının optimizasyon verileri	56
Tablo 14. Kızılçam kraft hamuruna BmgLac enzimi uygulamasının optimizasyon verileri	57
Tablo 15. Kızılçam kraft hamuruna RjoLip enzimi uygulamasının optimizasyon verileri	57
Tablo 16. Kızılçam kraft hamuruna füzligninnaz proteini uygulamasının optimizasyon verileri	58
Tablo 17. Atık kağıt hamuruna KpnGST enzimi uygulamasının optimizasyon verileri ..	59
Tablo 18. Atık kağıt hamuruna BmgLac enzimi uygulamasının optimizasyon verileri ...	60
Tablo 19. Atık kağıt hamuruna RjoLip enzimi uygulamasının optimizasyon verileri	60
Tablo 20. Atık kağıt hamuruna füzligninaz proteini uygulamasının optimizasyon verileri	61
Tablo 21. Kızılçam kraft hamurunun rekombinant enzimlerle tekli olarak yapılan ağartma sonuçları.....	63
Tablo 22. Rekombinant enzimlerin ikili kombinasyonlarının kızılçam kraft hamuru ağartma sonuçları.....	64
Tablo 23. Rekombinant füzligninaz ve üçlü enzim kombinasyonunun kızılçam kraft hamuru ağartma sonuçları.....	65

Tablo 24. Atık kağıt hamurunun rekombinant enzimlerle tekli olarak yapılan ağartma sonuçları.....	66
Tablo 25. Rekombinant enzimlerin atık kağıt hamurundaki ikili ağartma sonuçları.....	67
Tablo 26. Rekombinant füzligninaz ve üçlü enzim kombinasyonu atık kağıt hamuru ağartma sonuçları.....	68
Tablo 27. Enzimle muamele edilen kızılçam kraft hamurlarının fiziksel özellikleri	70
Tablo 28. Enzimle muamele edilen atık kağıt hamurlarının fiziksel özellikleri.....	71
Tablo 29. Rekombinant enzimlerle muamele edilen kızılçam kraft hamurunun ağartma sonrası optik verileri	72
Tablo 30. Rekombinant enzimlerle muamele edilen atık kağıt hamurunun ağartma sonrası optik verileri	73



SEMBOLLER DİZİNİ

°C	: Derece
µg	: Mikro gram
µl	: Mikro litre
µM	: Mikro molar
ABTS	: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
CDNB	: 2,4-Dinitrochlorobenzene
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
GST	: Glutatyon-S-Transferaz
IPTG	: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kDa	: Kilo Dalton
LB	: Luria Bertani Broth
LiP	: Lignin peroksidaz
lt	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
PAGE	: Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
SEM	: Scanning Electron Microscopy
sn	: Saniye
TCF	: Total Chlorine Free
ECF	: Elemental Chlorine Free
U	: Ünite

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, dünyanın en büyük endüstrilerinden biridir ve bu alanda Amerika, Kanada, Finlandiya, İsveç ve Japonya gibi ülkeler lider durumdadır. Avustralya, Yeni Zelanda ve Latin Amerika'da da kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi önemli ölçüde gelişmiştir. Ayrıca önümüzdeki birkaç yıl içinde hem Çin hem de Hindistan'ın sektör büyümesinde anahtar rol oynaması beklenmektedir (Bajpai, 2012).

Dünya'daki kağıt üretimi yaklaşık olarak 380 milyon tonu bulmaktadır. Çin'deki sanayinin hızlı gelişmesi sayesinde Asya'da büyüme çok hızlıdır. Asya, dünya kağıt ve karton üretiminin yaklaşık üçte birinden fazlasını oluşturmaktadır. Kağıt ve karton tüketimi ise gün geçtikçe artmaktadır. Kağıt tüketim oranları ülkeden ülkeye önemli ölçüde değişiklik göstermektedir. Ortalama olarak bir kişi yılda 60 kg kağıt tüketirken bu rakam Amerika için 300 kg'a çıkmakta, Afrika için ise 7 kg'a kadar düşmektedir (Bajpai, 2012).

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi bir ülkenin ekonomik büyümesinde önemli rol oynamaktadır. Sermaye anlamında yoğun olmakla birlikte, kapasite aşımından da periyodik olarak etkilenmektedir. Geleneksel olarak, fazla enerji ve kimyasal madde tüketimi nedeniyle çevre kirliliğine büyük oranda neden olan bir alan olarak tanımlanmaktadır.

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi tüketici standartlarının yüksek olması ve rekabetçi üretim açısından zor zamanlar geçirmektedir. Maliyet düşürücü baskılar, şirketlerin birleşme ve devralmalar yoluyla konsolidasyonuna neden olmaktadır. Birçok araştırma ve geliştirme laboratuvarı küçültülmekte, kapatılmakta veya kısa vadeli nesnelere ve fırsatlara yönlendirilmektedir; küreselleşme, çevresel kaygılar ve rekabet dahil olmak üzere kârlılık dışsal faktörler tarafından sınırlandırılmaktadır. Orman kaynaklarını daha verimli şekilde ve daha az çevresel sorunla kullanabilmek için yeni yollar bulmaya ihtiyaç vardır. Yenilenebilir kaynakların sürdürülebilir kullanımına dayalı yeni teknolojiler, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinin gençleştirilmesi ve büyümesi için umut vaat etmektedir.

Biyoteknoloji, kağıt ve kağıt hamurunun hammaddelerinin kalitesini ve tedarikini artırma, üretim maliyetlerini azaltma, yüksek değerli yeni ürünler yaratma potansiyeline sahiptir (Anon, 2004; Mansfield ve Esteghlalian, 2003; Ojanpera, 2004; Viikari vd., 2009).

Biyoteknoloji, pratik veya ticari amaçlar için biyolojik organizma, sistem veya süreçlerin kullanımı olarak tanımlanmaktadır. Bu geniş anlamda, biyoteknoloji, son yıllarda, genetik transfer ve DNA manipülasyonu teknikleri (genetik mühendisliği gibi) ile giderek daha fazla tanımlanmasına rağmen, fermantasyon, immobilize hücre ve enzim teknolojisi, hücre ve doku kültürü ve monoklonal antikor teknikleri dahil olmak üzere çeşitli aktiviteleri kapsamaktadır. Biyoteknolojinin çekiciliği, biyolojik olmayan süreçlerin pratik olmadığı süreçler ya da ürünler sağlama, tepkimelerin özgülüğünü artırma, çevresel açıdan daha az zararlı süreçler sağlama, enerji tasarrufu sağlama ve maliyeti düşürme gibi nedenlerden ileri gelmektedir. Orman temelli endüstrilerdeki ham maddeler odun ve bileşenleridir. Bu endüstrilerde biyoteknolojinin kullanılmasına yönelik olasılıklar, doğanın en önemli biyolojik işlemlerinden olan lignoselülozik malzemelerin CO₂, su ve hümik maddelere parçalanma işlemleridir.

Kağıt endüstrisinde biyoteknoloji oldukça uzun bir süredir kullanılmaktadır (Bajpai, 2006). Biyoteknoloji, atık su arıtma sistemlerinde askıdaki katı maddelerin giderilmesi, sülfid sızılarının fermente edilmesi ve kağıt boyutlandırma için nişasta hazırlanması gibi işlemlerde endüstrinin bir parçası haline gelmiştir. Hatta kağıt makinelerindeki çökelti ve tortuların kontrolü bile biyoteknolojinin bir yönü olarak düşünülebilir. Bununla birlikte, biyoteknologlar, son birkaç yıl içinde kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde mikroorganizma ve enzim uygulamasına yönelik bir arayış içine girmişlerdir. Biyoteknoloji alanındaki bu büyüme; (i) enzimler ile kağıt ve kağıt hamuru işlenmesinde kullanılan bileşenler arasındaki etkileşimlerin daha iyi anlaşılması (ii) endüstrinin çevresel olarak zararlı olmayan teknolojiyi benimsemesi için artan bir ihtiyaç (iii) ilgili enzimler için uygun maliyetli teknolojinin geliştirilmesi, gibi sebeplerden ötürü giderek körüklenmektedir (Bajpai, 2012).

Daha az yoğun geleneksel yöntem ile birlikte iç içe olarak kullanılan uygun biyolojik sistemler, hali hazırda yapılan işlemlerdeki birçok problemin çözülmesine yardımcı olabilir. Endüstri, çevresel endişelere cevap olarak, hamuru ağartma sırasında oluşabilen klorlu aromatik yan ürünleri büyük ölçüde azaltmıştır. Mikrobiyal enzimlerin kullanımına dayanan bir teknoloji, baskı ve yazma kâğıtlarının üretiminde klor ihtiyacını azaltarak ve hatta ortadan kaldırarak bu hedefe ulaşmaya yardımcı olmuştur (Bajpai, 2009; Viikari vd., 2002). Enzimler, başka yollarla da çevresel hedefleri karşılamaya yardımcı olmuşlardır. Enzimler, mürekkep gidermeyle ilgili maliyetleri azaltarak, lifleri geri dönüştürebilme kapasitesini arttırmış ve böylece odun kaynaklarına olan talebi azaltmıştır. Enzimler, geri

dönüşüm akışındaki kirletici maddelerin de giderilmesine yardımcı olur. Kısacası enzimler, mevcut sürece müdahale etmeden kimyasal kullanımını azaltmaya yardımcı olur. Bu teknoloji, hem TCF (Totally Chlorine Free-Tamamen Klorsuz) hem de ECF (Elemental Chlorine Free-Temel Klorsuz) işlemlerinde ağartma hızını arttırmıştır.

Ticarileşmiş biyoteknolojik uygulamaların çoğu endüstriyel olarak üretilen enzimlerle dayanmaktadır (Paice ve Zhang, 2005). Enzimler, tüm canlılardaki kimyasal reaksiyonları yönlendiren katalizörlerdir ve aşağıdaki özelliklere sahiptir:

- Çok küçük miktarlarda etkilidirler. Birkaç enzim molekülü, saniyede binlerce reaksiyonu katalize edebilir.
- Reaksiyonda değişmez ve tüketilmezler.
- Reaksiyondaki aktivasyon enerjisini yükselterek reaksiyon hızını arttırmaları.
- Reaksiyona özgüdürler.
- Aktif oldukları belirli bir sıcaklık ve pH aralığı vardır.

Enzimlerin kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanımındaki temel amaç, selüloz-lignin liflerini diğer bileşenlerden özellikle de ligninden ayırmak olmakla birlikte enzimlerin kullanımı, kağıt hamuru üretiminde, kabuk soymada, liflerin modifikasyonunda ve ağartma işlemlerinde de artan bir ölçüde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmaların sonucunda kağıt hamurunun ağartılmasında öncelikle enzimler ile muamele edilmesi durumunda istenilen parlaklığın elde edilmesi için kullanılacak olan kimyasal miktarının oldukça düştüğü ortaya çıkarılmıştır.

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde saflaştırmaya gerek kalmadan kullanılabilen, hiç selülaz üretimi olmadan düşük moleküler ağırlıkta enzim üretebilen yeni mikroorganizmaların bulunması önemlidir (Bakır, 2007). Hamurun enzimlerle muamelesi lif kalitesinin artırılması ve fiyatın düşürülmesinin yanı sıra yerli kaynaktan bir enzimin kullanımının dışa bağımlılığı azaltacak olması endüstriyel alanda umut vaatmektedir.

1.2. Türkiye’de Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisi

Dünyada en çok kağıt tüketiminin olduğu ülke Çin’dir. 2013 yılı verilerine bakıldığında Çin yaklaşık 89 milyon ton kağıt tüketmiştir. Çin’den sonra ikinci sırada 68,8 milyon ton ile Amerika yer almaktadır. Son yılların verileri incelendiğinde Amerika pazarının daraldığı görülmektedir. İtalya, Almanya, Fransa ve İngiltere gibi ülkeler önemli

pazar paylarına sahipken, İspanya ve Rusya’da tüketim değişken bir seyir izlemektedir. Ülkemizdeki kağıt tüketimine bakıldığında son yıllarda artış olduğu göze çarpmaktadır. Türkiye, 2013 yılında 5,7 milyon ton kağıt tüketerek dünyada dokuzuncu sırada yer almıştır (TÜİK, 2016). Ülkemiz kağıt ve kağıt ürünleri sektöründe maalesef dışa bağımlıdır. Tüketimde dokuzuncu sırada olan Türkiye ihracatta yirmi birinci sırada olup dünya ihracatından aldığı pay giderek yükselmektedir.

1990’lı yılların ortasına kadar sektör, kamu hakimiyetinde olması nedeniyle uzun yıllar dış rekabete kapalı kalmıştır. Avrupa Birliği gümrük süreci ve özelleştirmeler ile birlikte sektör, yeni ve rekabetçi bir döneme girmiştir. Kağıt ve kağıt ürünleri endüstrisinde teknoloji ve hammadde açısından dışa bağımlılık oldukça yüksektir. Sektörde en yüksek üretim oluklu mukavvada gerçekleştirilmektedir. Oluklu mukavva üretimi Marmara ve Ege Bölgesi’nde yoğun olarak görülmektedir. Yüksek üretim teknolojisi bakımından Türkiye’de oluklu mukavva sektörü rekabetçi konumdadır. Ülkemiz, Almanya, İtalya, Fransa, İngiltere ve İspanya’nın ardından Avrupa’da altıncı büyük üretici konumundadır. Üretimini yaklaşık %97’lik kısmını iç pazara yapan sektör Avrupa standartlarında üretim yapmaktadır.

Tablo 1. Türkiye’deki kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde ithalat ve ihracatın yıllara göre dağılımı (TÜİK, 2016)

Kağıt ve Kağıt Hamuru Dış Ticaret Rakamları (Milyar Dolar)			
Yıl	İthalat	İhracat	Dış Ticaret Açığı
2012	2,88	1,03	1,85
2013	3,09	1,14	1,95
2014	3,17	1,20	1,97
2015	2,68	1,19	1,49
2016(Ocak- Ağustos)	1,87	0,89	0,98

Ülkemizde kağıt sektörünün gelişmesinin sağlanabilmesi, üretim tesislerinde sürekli modernizasyonun gerçekleştirilebilmesi için yatırımların artarak devam etmesi

gerekmektedir. Türkiye’de kağıt ve kağıt ürünleri imalatında hammadde temininde çeşitli sorunlarla karşılaşmaktadır. Ülkemizde, kağıt geri dönüşüm oranının da düşük seviyede olması nedeniyle kağıt üreticileri ithalata bağımlıdır. Kağıt üretimindeki maliyetlerin yüksek oluşu ve bazı kağıt türlerinde yeterli kaliteye ulaşamaması nedeniyle yurtiçi tüketimin neredeyse yarısı ithalat ile karşılanmaktadır. Bu nedenle sektörde her zaman dış ticaret açığı görülmektedir (Tablo 1).

1.3. Kağıt Hamurlarının Ağartılması

1.3.1. Ağartmanın Tanımı ve Amacı

Ağartma işlemi, belirli pH, sıcaklık, süre ve konsantrasyon koşulları altında, selülozik materyallere, odun ya da odunsu olmayan hammaddelerden üretilen kağıt hamurlarının lif-su süspansiyonuna uygulanan ve hamur parlaklığını arttıran kimyasal bir yöntemdir. Ağartma işlemi ile birlikte kağıdın bir çok özelliğinde iyileşme meydana gelir. Bunlardan birkaçı, kağıdın yazı ve basım özelliklerinde iyileşme ve buna bağlı olarak kullanılabilirliği ve çekiciliğinde artma, kağıdın kullanım alanı ve hizmet süresinde artma ve hamura kirlilik veren istenmeyen kirleticilerin uzaklaştırılmasıdır (Okan, 2010; Kalyoncu, 2011).

Ağartma işleminin en temel amacı selüloz liflerini kalıntı ligninden en düşük fiziksel zararlar ayırmak ve liflerden mümkün olduğunca fazla kalıntı lignini çözerek uzaklaştırmak, böylece istenilen parlaklık seviyesine ulaşmaktır. Lignin, görünür ışığın kağıt hamuru lifleri tarafından absorbe edilmesini sağlar. Pişirilmemiş bir hamurda ligninin odunu renklendirme özelliği azdır fakat alkali bir ortamda uygulanan pişirme sırasında meydana gelen reaksiyonlar sonrasında kalıntı lignindeki kromoforik grupların artmasıyla görünür ışığı daha fazla absorbe etmeye başlar ve ligninin renginde koyulaşma görünür. Ağartma işlemi hamurun parlaklığı, ligninin uzaklaştırılması veya ligninin liflere verdiği rengin giderilmesi ile artırılır (Reeve, 1989; Farr vd., 1992; Fredette, 1996; Bajpai, 2005).

Pişirme işleminden sonra üretilen kağıt hamurları oldukça koyu renkli olur. Bundan dolayı bu hamurlar ağartma işlemine uğratılmadan kağıt yapımına uygun değildir. Kaliteli kağıt üretimi sağlam ve yüksek parlaklık özelliğine sahip lifler ile yapılmaktadır. Kağıt hamurunun parlaklığını arttırmak ve kalıntı lignini uzaklaştırmak için ağartma işleminin uygulanması zorunludur. Aynı zamanda kağıt hamurunda kirlilik oluşturan maddelerin

arındırılması, oluşan ürünün yaşlanması ve sararmasını önlemek amacıyla renk kararlılığının artırılması ve çevresel yönden problem olabilecek durumların ortadan kaldırılması ağartma işleminin diğer hedeflerini oluşturmaktadır (EPA, 1993, Kalyoncu 2011).

Kağıt hamurunun ağartılması, hamur içerisindeki oksitlenebilir yapıları da etkilemektedir. Bu yüzden ağartmada, lignin kadar hemiselüloz ve selüloz da bozunmaya uğrayabilir. Ancak ağartmada kullanılan kimyasal maddeler pişirmede kullanılan kimyasal maddelere göre lignin uzaklaştırma açısından oldukça seçici olduğundan ağartma işlemi bir ölçüde etkili bir temizleme sürecidir (Reeve, 1996).

1.3.2. Ağartma Kademeleri ve Dizinleri

Ağartma yapacağımız hamura hangi ağartma metodunu kullanacağımızın seçimini (Tablo 2), ağartılmamış hamurun karakteri ve ağartıldıktan sonra kağıt hamurunda istenilen kalite belirler. Ağartma işleminde mümkün olduğunca az materyalin uzaklaştırılarak hamur veriminin yüksek tutulması ve yüksek parlaklık arzu edilen bir durumdur (Okan, 2010). Kimyasal kağıt hamurlarının ağartılmasında tek bir ağartıcı ile elde edilen delignifikasyon oranı ve parlaklık artışı yeterli olmadığından etkili ağartma işlemi gerçekleştirilmez. Bundan dolayı ağartma işlemi birbirini takip eden ve farklı özellik gösteren kademeler ve yıkama işlemlerinde oluşan dizinler şeklinde uygulanır. Bu şekilde çok kademeli olarak kullanılmasının ağartma üzerine etkisi büyük olmakla birlikte kalıntı ligninin, liflerden seçici şekilde uzaklaştırılması da kolaydır (Reeve, 1996).

Tablo 2. Ağartma işlemlerinde kullanılan kimyasal maddeler

A.Lignini Ağartan Metodlar (Rydholm, 1965)	B.Lignini Uzaklaştıran Metodlar (Rydholm, 1965, Sjöström, 1993)	C.Karbonhidratları Uzaklaştıran Metodlar (Rydholm, 1965)
1.Sodyum Bisülfid 2.Sodyum veya Çinko ditiyonit 3.Sodyum borhidrür 4.Sodyum veya Hidrojen Peroksit	1. Klor 2. Hipoklorit 3. Alkali Ekstraksiyonu 4. Klor Dioksit 5. Hidrojen Peroksit ve Oksijen 6. Ozon	1.Sıcak ve Soğuk Alkali Saflaştırması

Dizinin ilk kademeleri, hamurdaki ligninin uzaklaştırılmasında ve nihai hamurda istenen parlaklık değerinin sağlanmasında en büyük görevi üstlenir. Sonraki kademeler ise, hamurdaki fazla lignini uzaklaştırdığı, dolayısıyla parlaklığın yüksek seviyeye ulaştırıldığı kademelerdir (Nelson, 1998). Ağartma basamaklarının ağartma fonksiyonlarına yüklediği özel görevler vardır, bu görevler arasında kalsiyum ve ligninin uzaklaştırılması ve uygun miktardaki karbohidratların ekstraksiyonu sayılabilir. Bu görevlerin de yapılabilmesi için özel tekniklere ve ekipmanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Rydholm, 1965).

Kimyasal hamurun ağartılmasında kullanılan oksidantlar, ligninin parçalanarak moleküler büyüklüğünün azaltılmasını sağlarlar. Birçok ağartma kimyasalları, kalıntı ligninde asidik gruplar oluşturan oksitlenme ajanlarıdır. Asidik koşullar altında yapılan bir ağartma kademesinden sonra uygulanan alkali ekstraksiyon kademesi ile ortamda oluşan, suda çözünmeyen asidik lignin ürünlerinin uzaklaştırılması sağlanır (Nelson, 1998). Alkaliler, özellikle sodyum hidroksit, asidik özellik kazanan lignini hidrolize etmede ve çözümede görev alır. Günümüzde ağartılacak hamurun türüne ve istenen parlaklık derecesine bağlı olarak hamurdaki lignini oksitlemek, çözmek ve hamur rengini açmak gibi işlemler için 4-6 adet ağartma kademesinden oluşan dizinler kullanılmaktadır (Şekil 1). Her bir oksidatif ağartma kademesi sonrasında uygulanan yıkama işlemleri ile hamurdan çözülmüş partiküller uzaklaştırılarak, ağartmanın etkisi geliştirilir (Nelson, 1998).



Şekil 1. Kraft hamurunun kademeli olarak ağartılması sonucunda oluşan renk değişimi

Kimyasal kağıt hamurlarının içinde kraft pişirme yöntemi ile elde edilen kağıt hamurları en koyu renkli ve ağartılması en zor olan hamur türüdür. Bu nedenle kraft hamurların ağartılmasında daha çok ağartma dizini basamaklarına ve daha fazla kimyasala ihtiyaç duyulur (Tablo 3). Kraft hamurunun tam anlamıyla ağartılabilmesi için, ağartma dizini her kademe arasında yıkama yapılacak şekilde, sırayla alkali ve asidik kademeler olarak düzenlenmelidir (Dahl, 1999).

Tablo 3. Kağıt hamurlarının ağartılmasında kullanılan kimyasallar ve sembolleri

Sembol	Kimyasal	Sembol	Kimyasal
C	Klor	E	Sodyum hidroksit
D	Klordioksit	X	Enzim
H	Hipoklorit	Q	Çelatlama ajanı
O	Oksijen	A	Asit
P	Hidrojen peroksit	Pa	Perasetik asit
Z	Ozon	Px	Peroksimonosülfürik asit

1.3.3. Oksijen Delignifikasyonu (O)

Oksijen delignifikasyonu ilk olarak Joy ve Camphell tarafından kağıt hamurlarının ağartılmasındaki iyileştirmeler üzerine bir patent alımıyla yapılmaya başlanmıştır. Kağıt hamurunun alkali bir ortamda oksijen kullanılarak kalıntı lignin fraksiyonunu uzaklaştırma işlemine oksijen delignifikasyonu adı verilir. Belirli bir basınç altında yapılan bu işlem hamurdaki kalıntı ligninin yaklaşık olarak %35-50'sini uzaklaştırmaktadır (Okan, 2010).

Oksijen delignifikasyonu genel olarak kraft hamurları için kullanılmakta olup, uygun sıcaklık ve basınç altında, yüksek veya orta konsantrasyonda, tek veya kademeli olarak tüm hamurlara uygulanabilmektedir (Gullichsen ve Fogelholm, 1999). Oksijen delignifikasyonunun uygulama kolaylığı, işlem sonrası hamur kalitesi, toplam maliyet ve çevresel açıdan avantaj sağlamaktadır (Suchy ve Argyropoulos, 2002). Bu yöntemin en önemli özelliği çevreye karşı oldukça zararsız olmasıdır. Atık sudaki COD (Kimyasal oksijen isteği), BOD (Biyolojik oksijen isteği), renk ve klorlu organik bileşikler bu yöntem

ile önemli oranda azaltılabilmektedir. Ağartma işleminde kullanılan kimyasal madde yükünü azaltması, kraft kimyasal madde döngüsüne uygun olması diğer önemli özelliklerindedir (Okan, 2010).

Oksijen delignifikasyonu işleminde hamur buharla karıştırıldıktan sonra besleme tankına gönderilir. Reaksiyon ortamını alkali yapmak için NaOH ya da asitlendirilmiş beyaz çözelti kullanılır. Gerekli miktardaki alkali, besleme tankının üstünde bulunan bir tahliye pompası ile hamura karıştırıldıktan sonra, ek buharla birlikte oksijen gazı da orta konsantrasyonda çalışan makaslama etkisine sahip karıştırıcıya gönderilir. Bu karıştırıcı oksijeni hamura karıştırır. Daha sonra karışım yukarı akımlı bir reaktöre gönderilir. Yıkayıcı olarak, dönen tambur tipi yıkayıcı ya da basınç altında çalışan yıkayıcılar kullanılabilir. Yıkama kademesi oksijen delignifikasyonu ile çözünen maddelerin hamur içerisinden tamamen ayrılmasını sağlar. Aynı zamanda elde edilen süzüntü çözelti alkali ve hamurdan çözünen bileşenler dışında zararlı bileşikler içermez. Bundan dolayı doğrudan çözelti geri kazanma sistemine gönderilebilir. Böylece atık çözelti içindeki alkali geri kazanılabilir olmakta birlikte çevre kirlenmesine de yol açmamaktadır.

Oksijenin işletmeler bakımından düşük maliyetli bir oksidasyon maddesi olması, atık suların korozyon yapıcı bileşik içermemesi birçok fabrika tarafından bu yöntemin kolaylıkla benimsenmesine yol açmıştır. Oksijen delignifikasyonunun çevresel parametreler üzerinde ve bazı işletme maliyetleri üzerinde olumlu etkisi olması avantajları arasındadır. Bununla birlikte ana dezavantajı da kapital maliyetlerinin yüksek olması ve fabrika geri kazanma sistemine ilave yük getirmesidir (Nelson, 1998; Okan, 2010; Kalyoncu, 2011).

1.3.4. Çelat Yıkaması (Q)

Mangan, demir, bakır gibi bazı geçiş metalleri, ağartma dizilerinde kullanılan oksijen esaslı ağartıcıların bozulmasında etkilidirler. Odun liflerinden ve fabrikalardan gelen proses sularından kaynaklanan bu kirletici metal iyonları, ağartılmış kimyasal hamurda bulunmaktadır (Colodette vd., 1989; Abbot ve Hobbs, 1991; Presley vd., 1996). Geçiş metal iyonları hamur viskozitesini düşürür ve ağartma işleminin sonunda final hamurda renk koyuluğu oluşumunu hızlandırır (Kutney ve Evans, 1985). Bu nedenle ağartmada metal iyonlarının uzaklaştırılması oldukça önemli olmakla birlikte uzaklaştırılması için asit muamelesi ya da çelatlama işlemi yapılmaktadır (Sixta, 2006).

Kağıt endüstrisinde genel olarak kullanılan çelatlar etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve dietilentriaminpentaasetik asit (DTPA)'dır (Anderson vd., 1996). Çelatlayıcıların görevi ağır metal iyonları ile çözünebilir formda kompleksler oluşturarak, hidrojen peroksit gibi ağartıcı kimyasalları, zararlı metal iyonlarına karşı korumaktır (Colodette vd., 1989). Aynı zamanda çelatlayıcılar ağartma işleminde hamura ilave edilerek viskoziteye de koruyucu etki yapmaktadır. Çelatlama kademesinde bir sonraki hidrojen peroksit, perasetik asit ve ozon gibi oksijen esaslı ağartıcıların kullanıldığı kademelerde sorun oluşturmaması açısından hamurun metal içeriğini düşürmek amaçlanmaktadır (Heuts ve Gellerstedt, 1998). Hamurda oldukça küçük oranlarda bile kalan metaller hamura sıkıca bağlandığından dolayı çelatlama işleminin ardından etkili bir yıkama işlemi yapılmalıdır (Sixta, 2006).

1.3.5. Hidrojen Peroksit Ağartması (P)

Geleneksel ağartma dizinlerinde etkili bir ağartıcı olmayan hidrojen peroksit, TCF ağartma yönteminde kullanılan etkili ağartıcılardandır (Van Lierop vd., 1993; Troughton vd., 1994; Bajpai, 2005). Kağıt hamuru endüstrisinde yaygın ve çok yönlü olarak kullanılan oksidatif bir ağartıcı olan hidrojen peroksit, alkalen koşullar altında mekanik ve kimyasal hamurların ağartılmasında ve mürekkep uzaklaştırma işlemlerinde kullanılan en iyi kimyasaldır (Holladay ve Solari 1963; Andrews ve Singh, 1979; Anderson, 1992; Troughton ve Sarot, 1992; Nelson vd., 1995; Nelson, 1998; Pikka vd., 2000).

TCF ağartmasının son kademesi olarak kullanılan hidrojen peroksit, ağartılmış hamurlarda parlaklık dönüşümünü sağlayan karbonil gruplarını ve ağartma dizinlerinin başlangıç kademelerinde kullanılan klor, klordioksit veya oksijenin oluşturduğu kinon yapılarını uzaklaştırma özelliğine sahiptir. Bu şekilde kararlı bir parlaklık değeri sağlanmaktadır. Aynı zamanda hidrojen peroksitin bozunma ürünlerinin su ve oksijen olması çevresel yönden problem oluşturmaz (Kalyoncu, 2011).

Hidrojen peroksit kimyasal hamurların ağartılmasında çoğunlukla diğer ağartıcıların etkinliğini ve ağartılmış hamurların son parlaklık değerlerini arttırmak üzere kullanılır (Anderson, 1992; Anderson ve Amini, 1996). Araştırmacılar yüksek parlaklık değerine ulaşmak için yapılan hidrojen peroksit ağartmasında iki reaksiyonun oluştuğunu bildirmişlerdir. Bunlardan biri perhidroksil anyonu (HOO^-) ile lignin yapısında konjuge karbonil yapılarını içeren kromoforların uzaklaştırılması, diğeri ise peroksidin ayrışması

sonucu oluşan HO^{\bullet} ve O_2^{\bullet} radikalleri ile lignin degradasyonu, çözünmesi ve uzaklaşmasıdır (Anderson ve Amini, 1996; Backman ve Gellerstedt, 1993). Radikaller ligninin aromatik halkası ile oksidatif bozunma reaksiyonu şeklinde reaksiyona girer ve ligninin moleküler hidrofilik özelliğini ve çözünürlüğünü artırır (Bajpai, 2005; Kalyoncu, 2011). Bununla birlikte hidrojen peroksit ağartmasında asıl ağartıcı fonksiyona sahip olan radikallerin oluşabilmesi için alkalen şartlar mutlaka gereklidir. Delignifikasyon işleminde radikallerin olumlu etkilerinin yanında çok olumsuz etkileri de bulunmaktadır. Bu nedenle yüksek miktarda bulunan geçiş metalllerinin peroksit ağartmasından önce ya asit yıkaması işlemiyle ya da çelatlama işlemiyle uzaklaştırılması gerekmektedir (Sixta, 2006).

Peroksit ağartmasında mekanik ve kimyasal hamurlar arasında farklılık meydana gelir. Mekanik hamurlarda hamura renk veren kromoforik yapılar uzaklaştırılırken, lignin ve hamur verimi değişmeden kalır. Bundan farklı olarak kimyasal hamurların peroksit ile ağartılması işleminde lignin kapsamlı şekilde modifikasyona uğrar ve çeşitli yeni yapılar meydana gelir. Bu işlemde peroksidin bozunma ürünü olarak perhidroksil (HOO^-) iyonları, hidroksil (HO^{\bullet}) radikalleri ve süperoksit (O_2^{\bullet}) radikal iyonları meydana gelir (Dence ve Reeve, 1996; Hobbs ve Abbot, 1992). Bu yapılar önemli ara ürünler olmakla birlikte ağartma işlemi esnasında yan reaksiyonlar vermektedir. Perhidroksil anyonunun (HOO^-) oldukça kuvvetli bir nükleofil olmasından dolayı, ligninin elektronca zengin aromatik halkasına atakta bulunamaz ve lignindeki karbonil içerikli kromoforlar ile reaksiyona girer (Gierer, 1982). Hidroksil (HO^{\bullet}) ve ondan daha az oranda oluşan süperoksit (O_2^{\bullet}) radikallerinin ağartma reaksiyonlarında katılımları daha düşük oranlardadır (Hobbs ve Abbot, 1991; Gellerstedt ve Pettersson, 1982; Dence ve Reeve, 1996; Gellerstedt ve Lindors, 1991; Lachenal vd., 1994). Hidroksil radikalleri hidrojen peroksidin geçiş metallilerinin katalizörlenerek bozunması sonucu oluşmaktadır (Dence ve Reeve, 1996; Gierer vd., 1991). Hidroksil radikalleri, lignindeki fenolik yapılarla reaksiyona girmektedir bununla birlikte karbohidratları da bozundurma özelliklerine sahiptirler. Süperoksit radikalleri ise selülozun bozunmasına neden olurlar (Dence ve Reeve, 1996). Bu nedenle bu radikallerin oluşturduğu reaksiyonlar delignifikasyon için olumlu etki yaparken, selüloz için olumsuz depolimerizasyona sebep olmaktadır (Kalyoncu, 2011).

Peroksit kademesinden önce uygulanan çelatlama kademesi sayesinde hamurların direnç özelliklerinde önemli kayıplar olmaksızın daha yüksek parlaklık değerlerine ulaşmak mümkün olduğu için peroksit kademesinde daha zorlu işlem koşulları seçilebilmektedir (Abrantes vd., 2007). Oksijen bazlı kimyasal olan hidrojen peroksit, TCF

ağartmasında en çok kullanılan ağartıcıdır (Mariani vd., 1999; de la Rosa vd., 2002; Khristova vd., 2003; Roncero vd., 2003; Shatalov ve Pereira, 2005).

1.4. Ağartmanın Çevresel Etkileri

Günümüzde yapılan çalışmalarda, Kraft hamurunun ağartılmasından sonra oluşan atık suyun zehirli içeriğe sahip olduğu, su ekosistemine ve suda yaşayan canlılara zarar verdiği belirlenmiştir. Yapılan testler sonucunda fabrika atıklarının, balıklarda fiziksel bozukluklar ve hormonal değişiklikler, ciğer hastalıkları, solunum sisteminde düzensizlikler, kan bileşiminde farklılıklar, deri ve solungaçlarında görülen deformasyon, hücre fonksiyonlarında görülen bozukluk ve yeni nesillerde görülen yapısal farklılıklar gibi etkilere neden olduğu belirlenmiştir (Leithe-Eriksen, 2001).

Yapılan çalışmalarda, toksiditeye sadece klor içeren bileşiklerin değil, odun ekstraktiflerinin de neden olduğu belirlenmiştir (Kalyoncu, 2004). Ligninin bozunmasıyla oluşan fenoller, kateşoller, guyasiller ve aromatik hidrokarbonlar ile, ekstraktif madde kaynaklı düşük miktarda reçine ve yağ asitlerinin klorlanması ile toksik etki daha da artmaktadır. Ağartma sırasında toksik özellikteki maddelerin oluşumunu azaltmanın bir yolu, ağartma işleminde ilk kademe olarak hamurdaki lignin miktarını azaltmaktır (Reeve, 1996). Bu nedenle, pişirmede delignifikasyonu uzatmak, oksijen delignifikasyonu, ön enzim uygulaması, klor basamağının modifiye edilmesi, oksijen ve/veya hidrojen peroksitle güçlendirilmiş kostik ekstraksiyonu gibi yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (Barroca vd., 2001).

1.5. Kağıt Hamurunun Ağartılmasında Ligninolitik Enzimler

Enzimlerin kullanım alanlarının endüstriyel boyuta taşınması, enzim kullanılabilecek en büyük pazarlardan birinin kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Dünyada, gün geçtikçe artan kağıt ihtiyacı, çevre dostu çalışmalar ve etkili üretim süreci önem kazanmaktadır (Karademir vd., 2002).

Kağıt, doğal polimerler olan selüloz, hemiselüloz ve lignin bileşenlerinden oluşur. Lignin, kağıt üretimi aşamasında istenmeyen bir madde olarak kimyasal hamur üretiminde ve ağartma işlemlerinde hamurdan uzaklaştırılmaya çalışılır (Karademir vd., 2002). Kağıt

ve kağıt hamuru endüstrisinde enzimatik uygulamalar 1980'den sonra başlamıştır. Kağıt hamuru ve kağıt üretimini geliştirmek için ligninolitik enzimlere ek olarak sellobiyohidrolaz, endoglukanaz, endoksilanaz, endomannanaz, galaktanaz, poligalakturonaz, ferulik asit esteraz vb. gibi pek çok farklı enzimlerin kullanılabilceği açıklanmıştır (Aehle, 2004). Bunların dışında glutatyon-S-transferaz (GST) enziminin lignin degrades ettiği rapor edilmiş fakat şu ana kadar kağıt ağartma kapasitesi ile ilgili hiçbir çalışma yapılmamıştır.

Kağıt hamurundan ligninin giderilmesi ile yapılan ağartma işlemi genel olarak klor ve hipoklorit (klor dioksit) gibi kimyasallar ile yapılmaktadır. Bu tür kimyasalların kullanımını sonucu oluşan klorlanmış organik bileşiklerin toksik, mutajenik ve karsinojenik etki gibi çok sayıda tehlikeleri olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda kağıt endüstrisinde ağartma amacıyla klor yerine enzimlerin kullanımının, kağıt hamurlarından ligninin ayrılmasını kolaylaştırdığı ve bu yolla çok daha az klor kullanımının sağlandığı saptanmıştır (Beg vd., 2001). Enzimlerin, kağıt hamurunun hazırlanmasında beyazlaştırma ajanı olarak klor kullanımının azaltılması ve kağıt hamurundan lignini ayırma özelliği en ümit verici uygulamalarından biri olmuştur (Viikari vd., 1986; Beg vd., 2001).

Enzim uygulaması kağıt hamurunun fibrilasyonunu ve su tutuşunu artırır, işlenmemiş kağıt hamurunda dövme miktarını düşürür, hurda kağıt hamurunda bağları onarır (Viikari vd., 1986; Beg vd., 2001). Biyoteknolojik metodun prensibi, selülozu uzaklaştırmaksızın ligninin hamurdan uzaklaşmasını sağlamaktır. Çünkü selülozun azaltılması, kağıt kalitesine etki eden asıl problemdir.

Kağıt hamurunda bulunan ligninin degradesyonu için daha çok mantarlardan elde edilen ligninolitik enzimler kullanılmaktadır. Ama pratik uygulamalara bakıldığında yüksek pH, sınırlı oksijen ve lignin konsantrasyonu gibi ekstrem çevre ve substrat şartlarında mantarların kararlılıkları pek iyi değildir. Bakteriler ise mantarların bu dezavantajlarının aksine geniş çevresel adaptasyon yetenekleri ve çok yönlü biyokimyasaları sayesinde avantaj sağlamaktadırlar. Bu nedenle son yıllarda lignin degrades eden bakterilerle ilgili yapılan çalışmalar ağırlık kazanmıştır.

Yapılan çalışmalara bakıldığında lakkazlar odun hamurundaki ve kraft hamur fiberlerindeki lignini depolimerize ederler. Endüstride lakkazın en sık kullanıldığı alan kraft hamurunun ağartılmasıdır (Strebotnik ve Hammel, 2000). Arias vdadaşları (2003) *Streptomyces cyaneus* türüyle yaptıkları çalışmada bakterinin ökaliptustan elde edilen kraft hamurunda kappa numarasını %18,4 oranında düşürüp kağıt parlaklığını %2,2 oranında

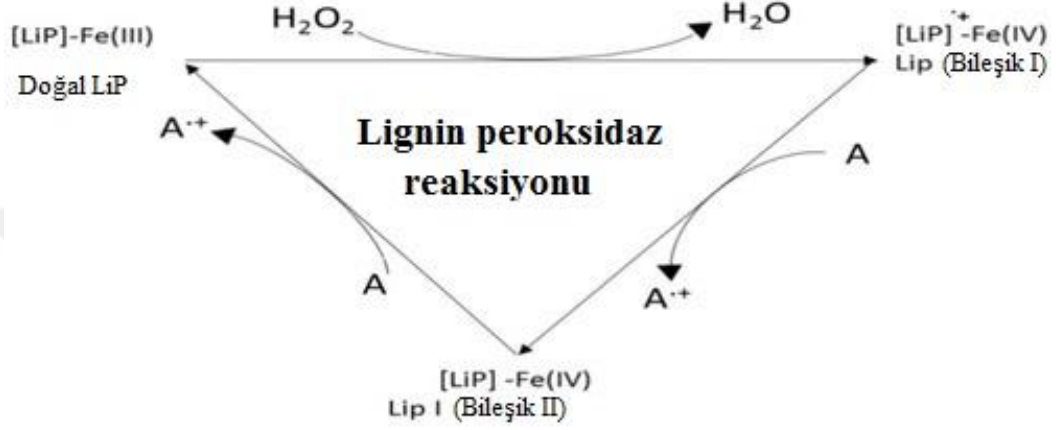
arttırdığını bulmuşlardır. Yine Singh (2008) yaptığı çalışmada, *Gamma proteobacterium* grubuna ait JB suşu ile çalışmış ve elde ettiği lakkaz enziminin 55°C'de dört saat muamelesi sonucu kappa numarasını %21 oranında azalttığını ve kağıt parlaklığını %5,89 oranında arttırdığını rapor etmiştir. Gelecekte kimyasal olarak çok yönlü bileşiklerin fiber yüzeylere tutturulmasında bu enzim, kağıt hamurlarının geri dönüştürülmüş olarak tekrar kullanılmasını sağlayabilir (Rodrigez ve Toca, 2006; Mocchiutti vd., 2005; Saparrat vd., 2008). Lignin peroksidazlar lakkazlarla karşılaştırıldığında ağartma için tercih edilen biyokatalizörlerdir (Bajpai, 2004; Sigoillot vd., 2005). Lignin peroksidaz ve mangan peroksidazın kağıt hamurunun ve atıkların rengini açmada etkili oldukları rapor edilmiştir (Ferrer vd., 1991; Michel vd., 1991; Moreira vd., 2003).

Yukarıda bahsedilen çalışmalardan da anlaşılacağı gibi ligninolitik enzimler günümüzde endüstriyel olarak uygulanan hem ECF hem de TCF denilen ağartma yöntemlerinde kullanılmaktadır. TCF uygulaması ile kağıt parlaklığının arttığı, lif uzunluğunun korunduğu ve ağartma masraflarında azalma olduğu belirtilmiştir (Aehle, 2004). Son zamanlarda, enzimlerle birlikte O₂ (oksijen), O₃ (ozon) veya H₂O₂ (hidrojen peroksit)'in de kullanıldığı TCF ağartma yöntemleri geliştirilmiştir.

1.5.1. Lignin Peroksidaz (LiP)

LiP (EC 1.11.1.14) ligninin H₂O₂ bağımlı oksidatif depolimerizasyonunu katalize eder (Piontek vd., 2001). LiP, ilk olarak beyaz çürüklük mantar olan *Phanerochaete chrysosporium*'un hücre dışı ortamında keşfedilmiştir (Kirk ve Farrell, 1987). LiP'lar, yaklaşık 40 kDa civarında moleküler ağırlığa sahip hemoproteinlerdir. Prostetik grup olarak, fenolik olmayan lignin ünitelerinin oksidasyonunun katalizini başlatabilmek için hidrojen peroksit gereksinim duyan demir protoporfirin içermektedirler. Polimerik substratlar da dahil olmak üzere çeşitli indirgeyici substratları okside etme kapasitesine sahiptir (Oyadomari vd., 2003). Lignin peroksidaz, yüksek redoks potansiyeli ve geniş substrat aralığı sayesinde çeşitli endüstriyel işlemlerin uygulamaları için yüksek potansiyele sahiptir (Erden vd., 2009). Enzim çok az substrat özgüllüğü gösterir ve çok çeşitli lignin modelli bileşiklerle hatta ligninle ilgili olmayan bileşiklerle bile reaksiyon verir (Barr ve Aust, 1994). Serbest fenolik grupları olmayan metoksilli aromatik halkaları okside edebilmektedir. Bu oksidasyon sonucunda ileriki aşamalardaki halka açma,

demetilasyon ve fenol dimerizasyonu gibi metabolik yollarda reaksiyona girecek olan katyonlar oluşur (Haglund, 1999). Lakkazların aksine lignin peroksidaz, yüksek redoks potansiyelindeki bileşikleri parçalamak için bir aracı sisteme gereksinim duymaz. Fakat katalizi başlatabilmek için H_2O_2 'ye ihtiyaç duyar. Lignin peroksidaz, reaksiyonu üç adımda gerçekleştirir (Şekil 2).



Şekil 2. Lignin peroksidazın katalitik döngüsü (Datta vd., 2017)

Adım 1: İstirahat halindeki doğal LiP ([LiP]-Fe(III)) H_2O_2 ile oksidasyona girerek Bileşik I'i (oxo-feril ara ürünü [Fe(IV)]) oluşturur

Adım 2: Bileşik I, elektron kazanmak için fenolik olmayan aromatik indirgeyici substrat (A) ile indirgenerek Bileşik II'yi oluşturur

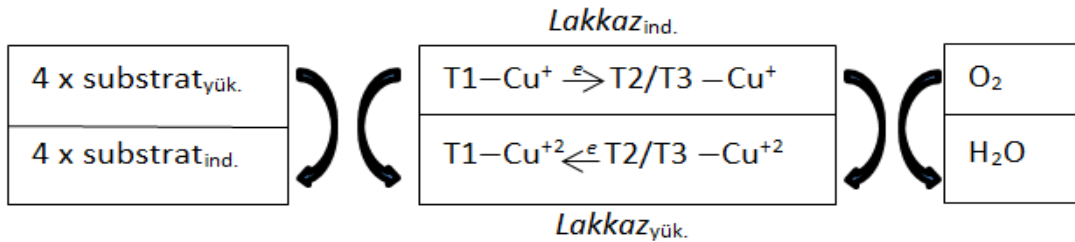
Adım 3: Son olarak, Bileşik II, indirgeyici substrat A'dan bir elektron daha alarak doğal LiP formuna geri döndüğünde oksidasyon döngüsü sona erer.

1.5.2. Lakkaz (Lak)

Lakkaz (EC 1.10.3.2, p-difenol oksidaz), çok çeşitli organik ve inorganik maddeleri okside eden oksidoredüktaz grubuna ait bakır içeren bir enzimdir. Lakkaz, ilk kez Yoshida tarafından 1883'te *Rhus vernicifera*'dan elde edilmiştir. Başlangıçta, lakkazın lignin peroksidaza kıyasla daha düşük redoks potansiyeline sahip olması nedeniyle sadece fenolik bileşikler okside edebileceği varsayılmıştır (Kersten vd., 1990). Bununla birlikte, aracı bir molekülün (LMS: Laccase mediator system) dahil olmasıyla birlikte, çok çeşitli maddeler

lakkaz tarafından oksitlenebilir. Lakkaz aracıları, enzim tarafından kolayca oksitlenen ve daha sonra substrat tarafından indirgenen düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Enzimin büyük boyutlu olması nedeniyle, substrat enzimin aktif bölgesine ulaşamaz. Küçük boyutundan dolayı kullanılabilen aracı bir molekül, enzimden substrata bir elektronun taşıyıcısı olarak işlev görür (Li vd., 1999). Aracı molekül, enzimin aktif bölgesine kolayca ulaşır ve yüksek redoks potansiyeline sahip daha kararlı bir ara maddeye okside olur. Oksitlenmiş aracı molekül, enzimden uzaklaşır ve orijinal haline dönmeye önce daha kompleks substratları oksitler (Call ve Mucke, 1997). Enzimlerin çoğu, polifenoller, difenoller, benzenetiol ve aromatik aminler gibi çeşitli substratları oksitleyebilen lakkazın aksine substrat spesifiktir.

Lakkazın aktif bölgesi dört bakır atomu içerir ve üç grup şeklinde (T1, T2, T3) incelenir (Yaropolov vd., 1994; Solomon vd., 1996). Bakır atomları paramanyetik rezonans sinyallerine (EPR: Elektron Paramanyetik Rezonans) göre farklılık gösterirler (Gianfreda vd., 1999). Fenolik substrat için, katalizin birinci aşamasında proton, hidroksil grubundan çıkarılır ve bir fenoksil radikaline dönüştürülür. Aynı zamanda, serbest bırakılan bir elektron T1 bakır atomu ile etkileşir ve onu Cu^{+2} formundan Cu^+ indirgenmiş formuna dönüştürür. Üretilen fenoksil radikalleri, kinonlara ayrıca oksitlenebilir veya hidrojenasyon, orantısızlaştırma ve polimerizasyon gibi enzimatik olmayan reaksiyonlara katılabilir. Substrat oksidasyonunun bir sonucu olarak, Cu T1 üzerindeki elde edilen elektronlar, enzimin sabit formunun (tamamen oksitlenmiş) aktif bir forma dönüşmesine yol açan üç atomlu kompleks T2 / T3'e aktarılır. Lakkazların aktif merkezinde, bakırın tam indirgenmesi için, 4 fenolik substrat molekülünün 4 tek elektronlu oksidasyon reaksiyonu gereklidir (Şekil 3) (Kaczmarek vd., 2017).



Şekil 3. Lakkaz tarafından katalizlenen reaksiyonun genel şeması (Kaczmarek vd., 2017)

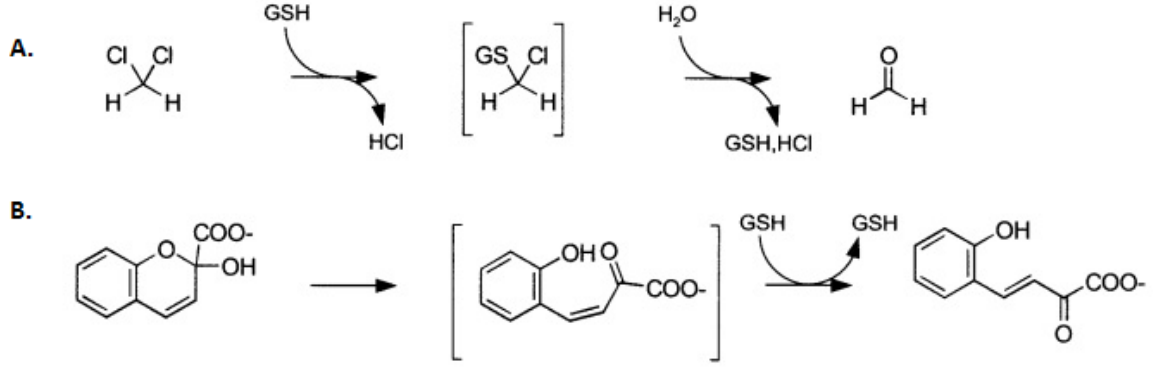
1.5.3. Glutatyon-S-transferaz (GST)

Glutatyon-S-transferazlar, zararlı ksenobiyotikleri ve endobiyotikleri detoksifiye ederek hücreyi koruyan bir protein ailesine dahildir (Hayes, 2005). Bunun dışında GST farklı hücresel fonksiyonları da yerine getirir. Bu enzim grubu ökaryot ve prokaryotların her ikisinde de bulunur.

GST'lar; sistolik GST, mitokondriyal GST, mikrozomal GST ve bakteriyel fosfomisin dirençli proteinler olmak üzere dört temel sınıfa ayrılır (Armstrong, 2000). Sistolik GST'lar kimyasal, fiziksel ve yapısal özelliklerine göre kendi aralarında oldukça farklı sınıflara ayrılırlar. Mitokondriyal GST'lar aynı zamanda GST'ların ökaryotlarda karakterize edilen kapp sınıfı olarak da bilinir (Robinson, 2004). Üçüncü GST sınıfı ise membran bağımlı transferazları kapsamaktadır ve bu sınıf glutatyon metabolizmasında görev alır. Bu üç temel sınıf tüm prokaryotlarda da temsil edilmesine rağmen dördüncü sınıf sadece bakterilerde bulunur.

Bakterilerde GST varlığı ilk olarak Takashi Shishido tarafından rapor edilmiştir. Daha sonra siyanobakteriler, proteobakteriler, fotootoroflar ve bazı gram pozitif bakterilerin glutatyon içerdiği tespit edilmiştir (Fahey ve Sundquist 1991). Siyanobakterilerde de yüksek seviyede glutatyon tespit edilmiştir. Glutatyon metabolizması hücreleri fotosentez sırasında oluşan oksijene karşı korur. *E. coli* ve diğer proteobakterilerde glutatyon ve glutatyon bağımlı enzimler hücrelerin oksidatif strese karşı korunması, proteinlerin doğru katlanması, regülasyon ve enzim degradasyonu gibi çok çeşitli metabolik basamaklarda görev alırlar.

Bu enzim genellikle dimer oluşturduğunda aktivite gösterir. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda hem homodimer hem de heterodimer GST enzimleri tespit edilmiştir. GST enzimleri yapısal olarak ifade edildikleri gibi çeşitli substratlarla da indüklenebilirler. GST enziminin bilinen substratlarının çoğu sentetik ksenobiyotiklerdir. Diklorometan dehalojenaz karakterize edilen ilk bakteriyel GST'dir. Bu enzim diklorometanın (DCM) formaldehit ve HCl'ye glutatyon bağımlı dönüşümünü katalizler. (Vuilleumier vd., 2002). Böylelikle metilotrofik bakterilerin tek karbon ve enerji kaynağı DCM olan ortamlarda büyümelerini sağlar (Şekil 4A). GST tarafından katalizlenen bir başka reaksiyon 1999 yılında Masai tarafından *Sphingomonas paucimobilis*'den elde edilen LigF'nin eter bağlarının kırılması olarak rapor edilmiştir.



Şekil 4. Bakteriyel GST'lar tarafından katalizlenen reaksiyon örnekleri: A. Diklorometanın dehalojenizasyonu; B. lignin yapısındaki eter bağlarının kırılması (Vuilleumier vd., 2002)

1.6. Enzimlerin Füzyon ve Operon Oluşturacak Şekilde Kullanımı

Evrim sırasında proteinleri ilgili fonksiyonlara kodlayan genler sıklıkla füzyon olaylarından geçerek çok işlevli enzimler üretmiştir. Biyokimyacılar ve biyomühendisler, protein evrimini anlamada ortak bir hedefi paylaşırlar ve doğada gözlenen süreçleri taklit etmek için protein mühendisliği yöntemlerini kullanmaktadırlar (Bloom ve Arnold 2009). İki ya da daha fazla reaksiyonu katalize edebilen çok-alanlı enzimler üretmek ve tek bir polipeptide çoklu katalitik özellikler dahil etmek rekombinant ürün için üretim ve saflaştırma işlemlerini basitleştirerek, endüstriyel işlemlerde enzim maliyetlerini azaltmak için potansiyel bir stratejidir. Dahası, enzimler füzyon haline getirildiğinde, ortaya çıkan katalitik alanlar arasındaki fiziksel yakınlık, reaksiyonların oranını artırabilir ve füzyon enzimler, ayrı ayrı ebeveyn enzimlerinin aktiviteleri ile karşılaştırıldığında daha iyi bir performansa sahip olabilirler (Gilbert vd., 1998).

Füzyon proteinler geliştirilmiş stabilite, yeni substrat spesifitelerinin oluşturulması ve artırılmış biyosensör duyarlılığı için substrat afinitesinin artırılması dahil olmak üzere çeşitli amaçlar için yapılandırılabilirler. Yapılan çalışmalarda lignoselülozik materyallere etki eden çok işlevli enzimlerin yaratılmasının, biyokütle bozunması dahil olmak üzere çeşitli işlemlerde yer alan enzimlerin iyileştirilmesi için pratik bir seçenek olduğu gösterilmiştir (Fan vd., 2009). Enzim füzyonlarının yapımında önemli bir özellik, ebeveyn proteinlerinin katalitik özelliklerinin korunması veya geliştirilmesidir. Yaygın olarak kullanılan bir yaklaşım, ebeveyn enzimlerinin N ve C uçları arasındaki "uçtan uca"

füzyonu içerir; bununla birlikte bu teknik, yanlış katlanma veya etki alanları arasındaki sterik engellemeden kaynaklanan kısıtlamalara bağlı olarak fonksiyonel olmayan füzyonlarla sonuçlanabilir. Bazı durumlarda, bu kısıtlamalar, etki alanları arası esnekliği arttırmak ve ebeveyn enzimlerinin işlevselliğini korumak için füzyon bölgesinde bir ilmi sokulması ile aşılabılır (Fan vd., 2009).

Yine operon oluşumuna baktığımız zaman, birlikte eksprese edilen proteinlerin konsantrasyonları arasındaki dalgalanmaları azaltması gibi bir yararı mevcuttur (Tabor vd., 2008). Nispi protein konsantrasyonlarındaki dalgalanmalar, çoklu proteinler sıkı bir kompleks oluşturduğunda veya uyum halinde hareket ettiğinde, savurgan olabilir (Swain 2004). Bir yukarı akış genini çeviren ribozomların aynı mRNA molekülü üzerindeki aşağı akış geninin translasyonuna yardımcı olduğu translasyonel kuplaj, operon oluşumunun bu tür dalgalanmaları azaltabileceği bir yol olarak vurgulanmıştır (Swain 2004). Ayrıca tıpkı füzyon oluşumunda olduğu gibi ebeveyn enzimlerin tek tek eksprese edilmesinden tek seferde eksprese edilmesi biyoteknolojik maliyet açısından daha uygundur.

1.7. Çalışmanın Amacı

Bakterilerin ligninolitik enzimlerinin araştırılması ve bunların kağıt endüstrisinde, polisiklik aromatik maddelerin biyoremediasyonunda, boya gideriminde ve sanayinin diğer alanlarında kullanılması ile ilgili günümüze kadar yapılan çalışma sayısı çok azdır. Bu tip çalışmalar genellikle mantarlar ile yapılmıştır ve yapılmaktadır. Yapılan alternatif çalışmalarda lignin degrade eden mikroorganizmalardan yararlanılmaya çalışılmaktadır. Mantarların lignini degrade edebilen bu türlü güçlü enzim sistemleri bulunmaktadır. Fakat mantarlar yüksek pH, sınırlı oksijen gibi ekstrem çevre ve substrat şartlarında yararlı olamamaktadır. Bu yüzden günümüzde adaptasyon yetenekleri güçlü olan bakteriler dikkat çekmeye başlamıştır ve bakterilerin lignin degrade eden sistemleri üzerindeki çalışmalarda artış olmuştur. Şu ana kadar yapılan çalışmalar göz önüne alındığında lignin peroksidaz ve özellikle lakkaz enzimleri kullanılarak yapılan birçok ağartma çalışması mevcuttur. Fakat GST'nin lignin degrade ettiği tespit edilmesine rağmen herhangi bir ağartma çalışmasında kullanılmamıştır.

Yapılan bu çalışmada ligninolitik aktiviteye sahip olan GST, lignin peroksidaz ve lakkaz genleri hem ayrı ayrı hem operon düzeni şeklinde hem de füzyon oluşturacak

şekilde klonlanarak kraft lignin üzerindeki aktiviteleri ortaya konulmuş ve kağıt hamuru üzerindeki ağartma özellikleri incelenmiştir.

Kızılçam kraft kağıt hamuru ve atık kağıtlardan elde edilen kağıt hamurları bu enzimler ile hem ayrı ayrı hem de ikili ve üçlü kombinasyonlar şeklinde muamele edilerek, kağıt ağartılmasında, klor dioksidin lignini okside etmesi ile başlayan reaksiyonlar zincirinin sonunda oluşan toksik ve kanserojen özellikteki klorlanmış organo bileşiklerin, insan sağlığını ve çevreyi ciddi anlamda tehdit etme riskini azaltması ve bu alanda söz konusu enzimlerin kullanılarak biyolojik ağartma işlemlerinin yaygınlaşip bu tehditlerin ortadan kaldırılmasına katkı sağlanması amaçlanmıştır.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Mikroorganizma ve Plazmitler

Lakkaz ve GST kaynağı olarak KTÜ, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda daha önce yapılan çalışmalarda topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* ve *Klebsiella pneumonia* bakterileri kullanıldı. Lignin peroksidaz kaynağı olarak ise DSMZ (Almanya) kültür merkezinden satın alınan *Rhodococcus jostii* bakterisi kullanıldı. Genlerin klonlanması için Dr. Yu Xia tarafından temin edilen pMA0911 mekik vektörü ve konak hücre olarak Dr. Wong tarafından temin edilen *Bacillus* WB800 hücresi kullanıldı.

2.2. Araştırma Materyali

Çalışmada ülkemizde ibrelili ağaçtan kraft yöntemiyle kağıt hamuru üretimi yapan Oyka-Zonguldak-Çaycuma fabrikasından satın alınan kızılçam kağıt hamuru örnekleri (Kappa no: 50) ve Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği laboratuvarı tarafından mürekkep giderme işlemi yapılan atık kağıt hamuru (Kappa no: 25) kullanıldı.

2.3. Ligninolitik Genlerin Dizinlerinin Belirlenmesi

Bacillus megaterium, *Klebsiella pneumonia* ve *Rhodococcus jostii* suşlarına ait lakkaz, GST ve lignin peroksidaz genlerinin çoğaltılması için uygun primerler dizayn edildi. Bu primerler, söz konusu suşlara ait GenBank'ta bulunan dizinler baz alınarak oluşturuldu. Çoğaltılan genlerin daha sonraki çalışmalarda uygun bir ekspresyon vektörüne aktarılabilmesi için ileri primerine *EcoRI* restriksiyon enzimi kesim bölgesi, geri primerine de *BamHI* enzimi kesim bölgesi ilave edildi (Tablo 4).

2.4. Ligninolitik Genlerin PCR ile oğaltılması

Ligninolitik genler, Sambrook vd. (2001) prosedürüne göre izole edilen genomik DNA'dan uygun primerler kullanılarak, PCR ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonlarında, 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi "Biometra Personal Cycler"da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk denatürasyon basamağı 95 °C'de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü DNA zincirinin denatürasyonu için 94 °C'de 30 saniye, primerlerin DNA'ya bağlanması (annealing) için 55 °C'de 1 dakika, yeni sentezlenen DNA zincirinin uzatılması (extension) için 72 °C'de 1,5 dakika ve son basamak olarak 72 °C'de 5 dakika şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl'si %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra "BioDocAnalyze" sistemiyle görüntüledi.

2.5. Ligninolitik Genlerin Klonlanması ve Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması

PCR reaksiyonları ile çoğaltılan ligninolitik genler (GST, lakkaz ve lignin peroksidaz), pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü konsantrasyonlar [1,2 µg pGEM-T Vektör (50 ng/ µl); 12 µl genomik DNA (4 ng/ µl); 100 U T4 DNA Ligaz; 200 µl 2X Ligasyon Tamponu] ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı. Klonlanma sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis vdadaşlarının (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildi. İzole edilen bu plazmitlerin hangilerinin istenilen parçayı taşıdığını belirlemek amacı ile plazmitler *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Doğruluğu teyit edilen klonların baz dizisi, otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla (Macrogen, Hollanda) belirlendi.

2.6. Ligninolitik Genlerin pMA0911 Vektörüne Klonlanması

Ligninolitik genleri *EcoRI-BamHI* kesim bölgeleri arasına klonlayabilmek için, Tablo 4'de verilen GST0911F-GST0911R, Lak0911F-Lak0911R ve LiP0911F-LiP0911R

primer çiftleri ile *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus megaterium* ve *Rhodococcus jostii* genomik DNA'ları sırasıyla kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR şartları olarak Bölüm 2.4.'de anlatılan şartlar kullanıldı. PCR ürünü *EcoRI* ve *BamHI* enzimleri ile kesilerek, aynı enzimlerle kesilmiş pMA0911 vektörü ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Ligasyon ürünleri *E. coli* JM101 hücresine aktarıldı. Restriksiyon endonükleazlar ile doğruluğu teyit edilen klonlar pMA0911GST, pMA0911Lak ve pMA0911LiP olarak adlandırıldı ve *Bacillus* WB800 hücresine aktarıldı.

2.7. Ligninolitik Genlerin pMA0911 Vektörüne Füzyon Proteini Oluşturacak Şekilde Klonlanması

pMA0911 vektörüne klonlanmış olan füzyon fragmentinin oluşturulması için ilk olarak GST geni Tablo 4'de verilen GST0911F ve GST0911R primerleri ile lakkaz ve lignin peroksidaz genleri ise yine Tablo 4'de verilen Lak0911F ve Lak0911R, Lip0911F ve Lip0911R primerleri ile ayrı ayrı standart PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Bu PCR reaksiyonları sonucunda GST, lakkaz ve lignin peroksidaz genleri elde edildi. Genlerin tek tek elde edildiği standart PCR reaksiyonundan sonra oluşan ürünler kalıp olarak kullanılarak Tablo 4'de verilen GST0911F ve Lak0911R primerleri ile GST-LiP-Lak üçlü fragmentini elde etmek amacıyla PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR şartları şu şekilde oluşturuldu: 94°C'de 2 dakikalık denatürasyon basamağının ardından 35 döngü 94°C'de 10 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniye bağlanma (annealing) ve 72°C'de 2 dakika uzama (extention) son olarak da 72°C'de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. Oluşan PCR ürünü *EcoRI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleriyle kesildi. Aynı şekilde pMA0911 ifade vektörü de aynı enzimlerle kesildi. Kesilmiş PCR ürünü ve kesilmiş pMA0911 vektörü %0,7'lik agaroz jelde yürütüldü, kesim sonucu oluşan PCR ürünü ve pMA0911 vektör DNA'ları jelden kesilip çıkarıldı ve Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas) ile temizlendi. Temizlenen PCR ürünü ve pMA0911 vektörü ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünü *E. coli* JM101 hücresine transforme edildi. İnkübasyon sonucunda elde edilen kolonilerden, klonun varlığı restriksiyon endonükleazlar ile kontrol edildi. Restriksiyon endonükleazlar ile doğruluğu teyit edilen klon pMA0911Füz olarak adlandırıldı ve *Bacillus* WB800 hücresine aktarıldı.

Tablo 4. pMA0911 Vektörüne Klonlama Yapmak İçin Kullanılan Primerler

GST0911 F	5'- G ATGTCAGAGCAAAACTAC -3'
GST0911 R	5'- CGGATCCTTACGCCTGGCGCTTATC -3'
Lak0911 F	5'- GGAATTCATGAATCCTGAGCATT A -3'
Lak0911 R	5'- CGGATCCTTACTCCTCCTTAAAGCCTATG -3'
Lip0911 F	5'- GGAATTCATGCCAGGCCAGTCG -3'
Lip0911 R	5'- CGGATCCTCATTGCGATACTCCTTTGAGACC -3'
GSTOprF	5'- GCG CCT GCA GGA TGT CAG AGC AAA ACT A -3'
GSTOprR	5'- TTT AGG TGG CAC AAA TGT GAG GCT TAC GCC TGG CGC TTA T -3'
LipOprF	5'- ATA AGC GCC AGG CGT AAG CCT CAC ATT TGT GCC ACC TAA A -3'
LipOprR	5'- AGG TGG CAC AAA TGT GAG GCT TAT TGC GAT ACT CCT TTG A -3'
LakOprF	5'- TCA AAG GAG TAT CGC AAT AAG CCT CAC ATT TGT GCC ACC T -3'
LakOprR	5'- CGC CTG CAG GCT AGC TTA CTC CTC CTT ATA GCC -3'

2.8. Ligninolitik Genlerin pMA0911 Vektörüne Operon Düzeninde Klonlanması

Operon düzeninde klonlama yapmak için pMA0911GST, pMA0911Lak ve pMA0911LiP klonları kalıp olarak kullanıldı. GST, lignin peroksidaz ve lakkaz genlerinin operon düzenindeki fragmentlerini oluşturmak için pMA0911GST, pMA0911Lak ve pMA0911LiP klonları kalıp olarak kullanılarak bölüm 2.7.'de anlatılan PCR (Wach, 1996) gerçekleştirildi.

İlk olarak GST geni Tablo 4'de verilen GSTOprF ve GSTOprR primerleri ile lignin peroksidaz geni yine Tablo 4'de verilen LipOprF ve LipOprR primerleri ile lakkaz geni ise LakOprF ve LakOprR primerleri ile standart PCR yöntemi ile ayrı ayrı buldukları pMA0911 klonları kalıp olarak kullanılarak çoğaltıldı. Oluşan PCR ürünleri kalıp olarak kullanılarak GSTOprF ve LakOprR primerleri ile PCR gerçekleştirildi ve elde edilen fragment *Sbf*I ve *Nhe*I enzimleri ile kesildi ve yine aynı enzimlerle kesilen pMA0911 vektörüyle ligaz enzimi kullanılarak birleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünü *E. coli* JM101 hücresine transforme edildi. İnkübasyon sonucunda elde edilen kolonilerden, klonun varlığı restriksiyon endonükleazlar ile kontrol edildi. Restriksiyon endonükleazlar ile

doğruluğu teyit edilen klon pMA0911Op olarak adlandırıldı ve *Bacillus WB800* hücresine aktarıldı.

2.9. *Bacillus WB800* Hücresine Transformasyon ve Gen İfadesi

Kompotent hücre hazırlamak için *Bacillus WB800* hücre kültürü 30°C'de bir gece inkübe edildi. Elde edilen gece kültüründen 10 ml'lik SPI besiyerine 1:100 oranında inokülasyon gerçekleştirildi. Hücreler durgun faza gelene kadar yaklaşık 4 saat 37°C'de 160 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda 1 ml hücre kültürü 20 ml SPII besiyerine transfer edildi ve 30°C'de 80 rpm'de 2 saat inkübe edildi. 2 saat sonunda hücreler 14 ml'lik tüplere alınarak üzerlerine 10 µl 100 mM EGTA ilave edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Daha sonra kompotent hale gelen hücrelere 1 µg plazmit eklendi ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından, hücreler 100 µg/ml kanamisin içeren LB besiyerine inoküle edildi. Genlerin ifadesi için rekombinant plazmit içeren *Bacillus WB800* hücreleri 100 µg/ml kanamisin ve %1,5 oranında mısır nişastası içeren LB besiyerinde 37°C'de 200 rpm'de 36 saat boyunca inkübe edildi, daha sonra hücreler 10000 rpm'de 10 dakika çöktürülerek süpernatant kısmı enzim solüsyonu olarak kullanıldı.

Kompotent hücre hazırlanmasında kullanılan besiyerleri:

SPI : 10 ml Spizizen's salts, 100 µl %50 glukoz, 50 µl %2 kazein, 50 µl %10 maya ekstraktı, 250 µl 2 mg/ml triptofan

SPII : 20 ml SPI, 50 µl 50 mM CaCl₂, 50 µl 250 mM MgCl₂, 50 µl 2 mg/ml triptofan

2.10. Lignin Peroksidaz Zimogram Analizi

Zimogram analizi ile lignin peroksidaz aktivitesini belirlemek için substrat olarak o-Dianisidine (Sigma, D9143) kullanıldı. Öncelikle enzimler native poliakrilamid jel elektroforezine tabi tutuldu. Bunun için, proteinlerden uygun miktarda (40 µg) alınarak bu ürüne eşit miktarda 2X muamele tamponu (0,15 M Tris-HCl pH 6,8 ve %20 Gliserol) ilave edildikten sonra, numuneler %15'lik poliakrilamid jeline (PAGE) yüklendi. 0,75 mm kalınlığındaki her bir jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel staining solution (50 mg o-dianisidine, 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 5,5) ve 0,75 ml %3 H₂O₂) ile muamele edildi. Aktivite gösteren protein bantları şeffaf zemin üzerinde koyu kırmızı-kahverengi olarak görüldü.

2.11. Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu

2.11.1. Optimum pH

Lignin peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, lakkaz ve füzyon formundaki enzimlerinin aktivitesine pH'nın etkisi, 50 mM sitrat tamponu (pH 3,0-6,0), 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0-8,0), 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0-9,0) ve 50 mM Glisin tamponu (pH 9,0) değerlerinde gerçekleştirildi.

2.11.2. Optimum Sıcaklık

Lignin peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, lakkaz ve füzyon formundaki enzimlerin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri, standart aktivite deneyi ile 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90°C'ye ayarlanmış ısıtıcılarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyonlar ile belirlendi.

2.11.3. pH Kararlılığı

Lignin peroksidaz enziminin pH kararlılığını belirlemek amacıyla enzim, pH'sı 3,0-4,0 ve 5,0 olan 50 mM sitrat tamponunda enzimin en iyi çalıştığı optimum sıcaklıkta 90 dakika boyunca inkübe edildi.

Lakkaz enziminin pH kararlılığını belirlemek amacıyla enzim pH'sı 4,0- 4,5-5,0-5,5 ve 6,0 olan 50 mM sitrat tamponunda enzimin en iyi çalıştığı optimum sıcaklıkta 150 dakika boyunca inkübe edildi.

GST enziminin pH kararlılığını belirlemek amacıyla enzim, pH'sı 5,0 ve 6,0 olan 50 mM sitrat tamponunda; pH'sı 7,0 olan 50 mM fosfat tamponunda enzimin en iyi çalıştığı optimum sıcaklıkta 90 dakika boyunca inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite testine göre ölçülerek enzimlerin en kararlı olduğu pH belirlendi.

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen füzyon formundaki enzimlerin pH kararlılıkları da tek tek enzimler için yapılan testlere göre gerçekleştirildi.

2.11.4. Isıl Kararlılık

Lignin peroksidaz enziminin kararlılığına ısının etkisini incelemek için enzim, 120 dakika 50 mM sitrat (pH 4,0) tamponunda, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C ve 60°C’de inkübe edildi. İnkübasyon boyunca belirli sürelerde tüplerden alınan örneklerde kalan aktivite, optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite testine göre ölçüldü.

Lakkaz enziminin kararlılığına ısının etkisini incelemek amacıyla enzim, 150 dakika 50 mM sitrat (pH 4,5) tamponunda, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C’de inkübe edildi. İnkübasyon boyunca belirli sürelerde tüplerden alınan örneklerde kalan aktivite optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite testine göre ölçüldü.

GST enziminin kararlılığına ısının etkisini incelemek amacıyla enzim, 90 dakika 50 mM sitrat (pH 6,0) tamponunda, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C ve 60°C’de inkübe edildi. İnkübasyon boyunca belirli sürelerde tüplerden alınan örneklerde kalan aktivite optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite testine göre ölçüldü. Deney başlangıcında yani sıfırıncı dakikada tüplerden alınan örneklerin aktivitesi ile istenilen zamanlarda alınan örneklerdeki aktiviteler kıyaslanarak bir ısıl kararlılığı grafiği çizildi.

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen füzyon formundaki enzimlerin ısıl kararlılıkları da tek tek enzimler için yapılan testlere göre gerçekleştirildi.

2.11.5. Enzim Kinetiği

Ligninolitik enzimlerin kısmi kinetik verileri değişik substrat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen reaksiyonlar ile belirlendi. Michaelis-Menten sabiti (Km) ve maksimum hız (Vmax) değerleri hazırlanan Lineweaver–Burk eğrisinde x ve y eksenlerini kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi.

2.12. Kraft Lignin Degredasyon Zonunun Belirlenmesi

%0,25 oranında kraft lignin içeren LBM (g^{-1} : KH_2PO_4 1g, $C_4H_{12}N_2O_6$ 0,5g, $CuSO_4.5H_2O$ 0,001g, $MgSO_4.7H_2O$ 0,5g, $Fe_2(SO_4)_3$ 0,001g, Maya özütü 0,01g, $CaCl_2.2H_2O$ 0,01g, $MnSO_4.H_2O$ 0,001g, agar 16 g) temel besiyeri hazırlandı ve 7 cm’lik petrilere döküldü. Daha sonra besiyeri içerisine steril cam çubukla 0,5 cm çapında kuyucuk açıldı ve içerisine 100 μ l enzim ilave edildi. Enzimlerin optimum çalışma sıcaklıklarına

ayarlanmış etüvde 1 gece bekletilen petrilerde kuyucukların etrafında açık renkli zon oluştuğu gözlemlendi ve kraft lignini degradasyonları gözle test edildi. Enzimlerin her biri ayrı ayrı kuyucuklara ilave edildiği gibi ikili kombinasyonlar, operon düzeninden elde edilen üçlü kombinasyonlar ve füzyon formundaki şekli de test edildi. Oluşan zonlar ölçülerek milimetrik olarak hesaplandı.

2.13. Enzimlerin Kraft Lignin Degradasyon Oranının Belirlenmesi

%0,25 oranında kraft lignin içeren LBM (g^{-1} : KH_2PO_4 1g, $C_4H_{12}N_2O_6$ 0,5g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,001g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5g, $Fe_2(SO_4)_3$ 0,001g, Maya özütü 0,01g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,01g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,001g, agar 16 g) temel besiyeri kullanılarak yapılan deneyde 2 ml sıvı besiyeri içerisine 100 μ l enzim ilave edildi. Enzimlerin optimum çalışma sıcaklıklarına ayarlanmış etüvde 2 saat bekletilen medium spektrofotometre de 465 nm'de ölçülerek enzimlerin kraft lignin degradasyonları tespit edildi. Kraft lignin ilavesi yapılmayan LBM besiyeri kör olarak kullanıldı. Enzim ilavesi yapılmayan %0,25 oranında kraft lignin içeren LBM besiyerinin absorbansı ilk absorbans olarak kabul edildi. Enzim ilavesi yapılarak 2 saat inoküle edilen besiyerinin absorbansı ise son absorbans olarak kabul edildi. Enzimlerin her biri ayrı ayrı kullanıldığı gibi ikili ve üçlü kombinasyonlar ve füzyon proteini şeklinde de test edildi. Kraft lignin degradasyon oranlarını belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\% \text{ Degradasyon} = \frac{\text{İlk Absorbans} - \text{Son Absorbans}}{\text{İlk Absorbans}} \times 100$$

2.14. Rekombinant Bakterilerin Kraft Lignin Degradasyon Oranının Belirlenmesi

%0,25 oranında kraft lignin içeren LBM (g^{-1} : KH_2PO_4 1g, $C_4H_{12}N_2O_6$ 0,5g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,001g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5g, $Fe_2(SO_4)_3$ 0,001g, Maya özütü 0,01g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,01g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,001g, agar 16 g) temel besiyeri kullanılarak yapılan deneyde 10 ml sıvı besiyeri içerisine 100 μ l bakteri inokülasyonu yapıldı. İnokülasyonu yapılan bakteri kültürü 37°C'lik etüvlerde 120 rpm'de 5 gün boyunca çoğaltıldı. 5 gün sonunda örnekler 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant kısımları spektrofotometre

de 465 nm'de ölçülerek kraft lignin degradasyonları tespit edildi. Kraft lignin ilavesi yapılmayan LBM besiyeri kör olarak kullanıldı. Bakteri inokülasyonu yapılmayan %0,25 oranında kraft lignin içeren LBM besiyerinin absorbansı ilk absorbans olarak kabul edildi. Bakteri inokülasyonu yapılarak 5 gün sonra santrifüj edilen kültürün absorbansı ise son absorbans olarak kabul edildi. Kraft lignin degradasyon oranlarını belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\% \text{ Degradasyon} = \frac{\text{İlk Absorbans} - \text{Son Absorbans}}{\text{İlk Absorbans}} \times 100$$

2.15. Kağıt Hamurunun Enzimle Muamelesi ve Kappa Numarası Tayini

Kağıt hamurunun enzim aracılığıyla delignifikasyonu için 5 g tam kuru hamur %5 yoğunlukta olacak şekilde GST, lakkaz, lignin peroksidaz ve füzyon proteini için sırasıyla pH 6,0, 4,5, 4,0 ve 5,0 olan sitrat tamponunda 120 dakika bekletildi. Enzim miktarı 0,5 kg/t hamur olacak şekilde ayarlandı. İkili ve üçlü enzim kombinasyonlarında her enzimin çalışabileceği optimum şartlar sağlanmaya çalışıldı. Bu kombinasyonlarda her üç enzim içinde uygun bir çalışma pH'ı olan pH 5 sitrat tamponu kullanıldı.

Kraft hamurunun, delignifikasyonunun kontrolü için kappa numarası belirlendi. Kappa numarası 1 g tam kuru hamurun, belirli koşullar altında tükettiği 0,1 N KMnO₄ çözeltilisinin mililitre cinsinden ölçüsüdür. Kappa numarası, hamur üretim yöntemi ve kullanılan hammaddeye bağlı olarak belirlenmiş 0,15 faktörünün çarpılması sonucu elde edilen değer % olarak hamurda kalan lignini vermektedir. Bu nedenle kappa numarası, ağartma da kullanılacak reaktiflerin miktarının hesaplanmasında ve ligninden arındırılmış hamur veriminin bulunmasında yararlanılan kullanışlı bir değerdir. Bu çalışmada Kappa numarası tayini TAPPI T 236 om-99 standardına göre her hamur için iki defa yapıldı. Kappa numarasının belirlenmesi elde edilen her bir enzim ve bu enzimlerin ikili ve üçlü kombinasyonları için ayrı ayrı yapıldı.

2.16. Kağıt Hamurunun Rekombinant Bakteri ile Muamele Şartlarının Optimizasyonu

Kızılçam kraft hamuru rekombinant bakteriler (her bir geni ayrı ayrı içeren, üç geni bir operon düzeninde içeren ve füzyon formunda içeren rekombinant bakteriler) ile muamele edilerek delignifikasyonu sağlamak amacıyla yapılan çalışmada 24 saatlik 25 ml bakteri kültürü, 5 g tam kuru hamur içeren 500 ml MSM besiyerine (L^{-1} : maya özütü 6 g, sodyum klorür 4 g, magnezyum sülfat 0,2 g, kalsiyum karbonat 0,1 g, amonyum sülfat 0,5 g, malt özütü 6 g) inoküle edildi ve bakterinin sahip olduğu enzimin optimum sıcaklığı ve bakterinin üreyebildiği optimum sıcaklık dikkate alınarak ayarlanan belli bir sıcaklıkta 250 rpm'de 7 gün boyunca inkübe edildi. Daha sonra bakteri üremesi ve enzim üretimini optimize etmek amacıyla farklı sıcaklıklar ve farklı pH'lar denendi. Ayrıca enzim üretimini arttırmak amacı ile ortama farklı konsantrasyonlarda veratril alkol eklendi. Optimizasyon parametreleri Tablo 5'de verildi.

Tablo 5. Rekombinant bakteri inokülasyonu ile yapılan ağartmanın optimizasyon şartları

Sıcaklık	30°C	40°C	50°C	60°C
pH	4,0	5,0	6,0	7,0
Veratril alkol	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM

Kontrol grubu olarak, her bir deney şartı için, rekombinant bakteri içermeyen hamur örnekleri aynı şartlar altında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hamur distile su ile yıkandı ve daha sonra hamurun rutubeti TAPPI T 264 om-88 standart metoduna göre belirlendi. Optimum şartların belirlenebilmesi için TAPPI T 236 om-99 standardına göre kapa tayini yapıldı.

2.17. Kağıt Hamurlarının Enzimle Muamele Şartlarının Optimizasyonu

Bu çalışmada kullanılan kızılçam kraft hamuru ve atık kağıt hamuru üzerinde ligninolitik aktivitenin araştırılması için her üç enzim açısından ayrı ayrı optimizasyon çalışmaları yapıldı. Optimizasyon, hamur konsantrasyonu, enzim miktarı, veratril alkol

miktarı, hidrojen peroksit miktarı ve ABTS miktarı gibi parametrelerin farklı değerlerde değiştirilmesi ile gerçekleştirildi (Tablo 6). Optimizasyon parametreleri belirlenirken her üç enziminde aktivitesini arttırmaya yardımcı olacak aracı maddeler kullanıldı. KpnGST enziminde böylesi bir aracıya ihtiyaç duyulmazken BmgLac için ABTS, lignin peroksidaz için ise veratril alkol kullanıldı. Yine RjoLip aktivitesini arttırmak amacıyla reaksiyonun başlamasını sağlayan H₂O₂ konsantrasyonu da optimize edildi. Füzligninaz proteini için ABTS, veratril alkol ve H₂O₂ konsantrasyonu da optimize edildi. İkili ve üçlü kombinasyonda uygulanan enzimatik ağartma için ekstra bir optimizasyon çalışması yapılmadı. Söz konusu kombinasyonlar her enzimin optimum çalıştığı şartlar birlikte uygulanarak gerçekleştirildi.

Kağıt hamuru örneklerinin enzim ile muamelesi, optimizasyon parametreleri haricinde, enzimlerin optimum sıcaklık ve pH'larında polietilen poşet içerisinde karıştırılarak çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılarak gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak, her bir deney şartı için enzim içermeyen hamur örnekleri aynı şartlar altında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hamur distile su ile yıkandı ve daha sonra hamurun rutubeti TAPPI T 264 om-88 standart metoduna göre belirlendi. Optimum şartların belirlenebilmesi için TAPPI T 236 om-99 standardına göre kappa tayini yapıldı.

Tablo 6. Direkt enzim uygulaması ile yapılan ağartmanın optimizasyon şartları

KpnGST	Enzim miktarı (U/g)	4 U/g	6 U/g	8 U/g	10 U/g
	Hamur konsantrasyonu	%3	%5	%7	%10
BmgLak	Enzim miktarı (U/g)	4 U/g	6 U/g	8 U/g	10 U/g
	Hamur konsantrasyonu	%3	%5	%7	%10
	ABTS konsantrasyonu	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM
RjoLip	Enzim miktarı (U/g)	4U/g	6 U/g	8 U/g	10 U/g
	Hamur konsantrasyonu	%3	%5	%7	%10
	Veratril alkol konsantrasyonu	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM
	H ₂ O ₂ konsantrasyonu	0,1 mM	0,5 mM	1 mM	3 mM
Füzligninaz	Enzim miktarı (U/g)	4 U/g	6 U/g	8 U/g	10 U/g
	ABTS konsantrasyonu	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM
	Hamur konsantrasyonu	%3	%5	%7	%10
	Veratril alkol konsantrasyonu	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM
	H ₂ O ₂ konsantrasyonu	0,1 mM	0,5 mM	1 mM	3 mM

2.18. Kağıt Hamuru Ağartma Çalışmaları

Yapılan bu çalışmada her bir enzim için belirlenmiş olan optimum koşullar altında, klor ve klorlu bileşikler içermeyen, oksidatif özellikli, çevre dostu ağartıcılardan oluşan TCF ağartma dizini kullanılarak kağıt hamurunun ağartılması gerçekleştirildi. Buradaki amaç ağartıcı kimyasalların gereksiz kullanımının azaltılarak ağartma maliyetinin

düşürülmesi olarak belirlendi. Buradan yola çıkarak yapılacak olan ağartma dizini basamakları “XOQP” kademeleri olarak belirlendi. Bunlar: Enzim Delignifikasyonu (X), Oksijen Delignifikasyonu (O), Çelat Yıkaması (Q), Hidrojen Peroksit Ağartması (P) şeklindedir. Yapılan ağartma dizininin deney planı Tablo 7’de verildi.

2.18.1. Oksijen Delignifikasyonu (O)

Enzim ağartması yapılmış kağıt hamurları için oksijen delignifikasyonu Tablo 7’de verilen şartlara göre gerçekleştirildi. Deney için kontrol grupları ile birlikte her bir enzim için 50 g tam kuru hamur kullanıldı. Bu basamakta kullanılan NaOH alkali bir ortam oluşturarak kağıttaki ksilanların uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Sixta, 2006). Magnezyum sülfat ise selülozun çözeltide meydana gelen radikaller tarafından bozunmasını ve katalitik ayrışmasını önlemek amacıyla ağartma ortamına ilave edilmektedir (Linden ve Ohman, 1997; Van Heiningen ve Violette, 2003). Oksijen delignifikasyonu ile reaksiyon ortamında oluşan perhidroksil iyonlarının lignindeki kromoforik grupları oksitleyerek renklerini açması parlaklık artışına neden olmaktadır (Gullichsen ve Fogelholm, 1999).

2.18.2. Çelatlama İşlemi (Q)

TCF ağartmasında kullanılan oksidatif ağartıcılardan en yaygın olarak kullanılan hidrojen peroksit, düşük seçicilik özelliği nedeniyle hamurda ciddi viskozite kayıpları oluşturabilir (Gierer vd., 1991; Gierer, 1993). Bu duruma hidrojen peroksidin demir, bakır, manganez gibi geçiş metalleri katalizörlüğünde bozunması sonucu oluşan HO• gibi aktif radikaller neden olmaktadır (Johansson ve Ljunggren, 1991; Cardona-Barrau vd., 2001; Duarte ve Lachenal, 2002; Cardona-Barrau vd., 2003). Bu metalin kompleks oluşturucu ajanlar ile çelatlanması peroksit degradasyonunu ve dolayısıyla da selüloz degradasyonunu azaltır (Mariani vd., 1999; de la Rosa vd., 2002; Duarte ve Lachenal, 2002; Lapierre vd., 2003). Hamurların ağartma işleminde genellikle son kademe olarak kullanılan peroksit kademesinden önce, metal iyonlarının uzaklaştırılması amacıyla hamurlara çelatlama işlemi uygulandı. Çelatlama işleminde çelatlayıcı olarak EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) kullanıldı. İşlem koşulları Tablo 7’de yer alan plana göre her bir hamura enzim ve kontrol grubuyla birlikte uygulandı ve her bir uygulamada 50 g tam kuru hamur kullanıldı.

Tablo 7. Kağıt hamurlarının ağartma dizininde kullanılan deney planı

OKSİJEN DELİGNİFİKASYONU (O)	
NaOH Oranı (%)	4
MgSO ₄ Oranı (%)	1
O ₂ Basıncı (Kg/cm ²)	7
İşlem Süresi (Dk)	60 dk
Sıcaklık (°C)	100°C
Konsantrasyon (%)	12
ÇELATLAMA İŞLEMİ (Q)	
Çelatlayıcı	EDTA
Çelat Oranı (%)	%2
İlk pH	7
İşlem Süresi (dk)	60 dk
Sıcaklık (°C)	90°C
Konsantrasyon (%)	12
HİDROJEN PEROKSİT AĞARTMASI (P)	
H ₂ O ₂ (%)	%5
NaOH (%)	%4
MgSO ₄ (%)	%1
İşlem Süresi (dk)	120 dk
Sıcaklık (°C)	80°C
Konsantrasyon (%)	12

2.18.3. Hidrojen Peroksit Ağartması (P)

TCF ağartmasının son kademesi olarak hidrojen peroksit kullanıldı. Son kademeler daha çok hamurların parlaklık değerlerinin artırılması üzerine uygulanmaktadır. Hidrojen

peroksit, yüksek verim ve parlaklık değerine sahip hamurların üretilmesi amacıyla yaygın bir şekilde ağartma dizinlerinin son ağartma kademesi olarak kullanılmaktadır (Renders, 1995). Hidrojen peroksit ağartması kapa numarasından ziyade parlaklık artışında etkili olan kimyasal bir maddedir. Yapılan ağartmada hidrojen peroksidin aktif olabilmesi için ortama yeterli ölçüde alkali ilave edilmesi gerekmektedir. Bu kademedeki tüm enzim ve kontrol gruplarına aynı şartlar uygulandı ve her uygulamada 50 g tam kuru hamur kullanıldı.

2.18.4. Delignifikasyon Derecesinin Hesaplanması

Delignifikasyon derecesi uygulanan işlemler sonrası hamurdan, ligninin ne kadarlık kısmının uzaklaştırıldığı hakkında bilgi veren önemli bir parametredir. Delignifikasyon derecesi aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı.

$$\text{Delignifikasyon derecesi} = [(K_a - K_b)/K_a] \times 100$$

Burada;

K_a: Delignifikasyon öncesi kapa numarası

K_b: Delignifikasyon sonrası kapa numarasıdır.

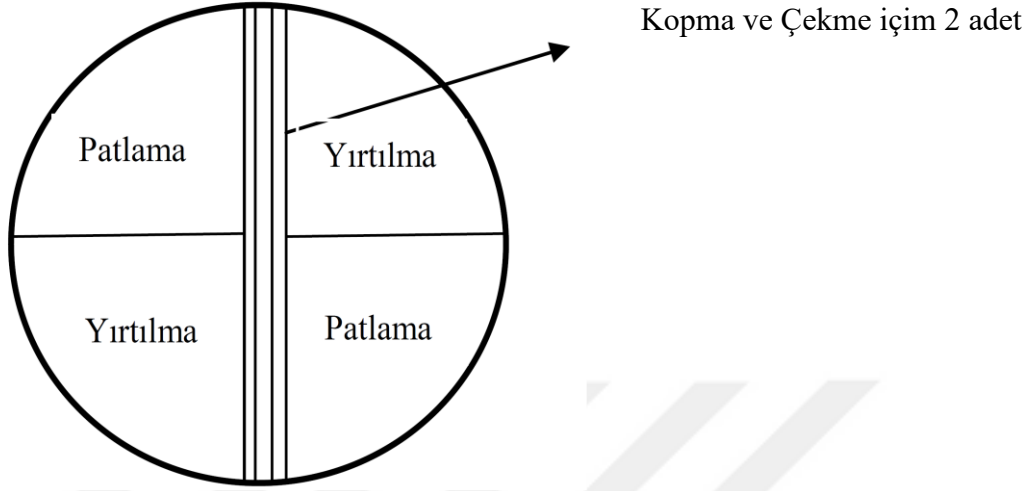
Her bir ağartma kademesinden sonra kağıt hamurları distile su ile yıkandı ve kondisyonlanması için bekletildikten sonra rutubet tayini yapıldı. Daha sonra uzaklaştırılan lignin miktarının belirlenip delignifikasyon derecesinin hesaplanabilmesi için kapa tayini yapıldı.

2.19. Kağıtlara Uygulanan Fiziksel ve Optik Testler

2.19.1. Test Kağıtlarının Hazırlanması

Ağartma yapılmış kağıt hamurlarından Regmed marka Rapid Köthen laboratuvar tipi kağıt makinesinde 70 ± 5 g/m² ağırlığında kağıtlar yapıldı. Yapılan deneme kağıtları TAPPI T 402 om-88 standardına göre $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ve bağıl nemi % 50 ± 3 olarak ayarlandı ve kondisyonlama odasında 24 saat süreyle bekletildikten sonra fiziksel testlere tabi tutuldu.

Daha sonra da Şekil 5’de gösterildiği gibi kesilerek fiziksel özelliklerine bakılmak üzere test kağıtları hazırlandı.



Şekil 5. Deneme kağıtlarının fiziksel testler için hazırlanmasında oluşturulan şablonu

2.19.2. Gramaj, Kalınlık, Yoğunluk ve Hacimlilik Tayinleri

Kullanılan test kağıtlarının gramajları TAPPI T 410 om-98 standardı kullanılarak yapılmış ve sonuçlar $1m^2$ 'deki tam kuru madde miktarı olarak verilmiştir. Ayrıca kağıtların kalınlıkları TAPPI T 411 om-88 standardına uygun olarak belirlenirken hacimlilik ve yoğunluk değerleri ise hesaplama yoluyla bulunmuştur.

2.19.3. Patlama Testi

Kağıtların patlama testleri TAPPI 403 om-91 metoduna göre kg/cm^2 cinsinden Müllen aletinde standart patlama testi ile gerçekleştirildi. Patlama direnci kadran üzerinden kgf/cm^2 olarak kaydedildi ve patlama indisi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Patlama indisi (kPa.m}^2/\text{g)} = \frac{\text{Patl. Dir. (kgf/cm}^2\text{)x98,06}}{\text{Gramaj(g/m}^2\text{)}}$$

2.19.4. Kopma Testi

TAPPI 404 om-87 standardına uygun olarak Karl Frank-800 pendulum tipi kopma cihazı ile kağıt şeritlerin gram-kuvvet cinsinden kopma direnci ölçüldü. 15 mm genişliğinde kesilen kağıt şeritler, 100 mm uzunluğunda aralığa sahip koparma çeneleri arasına yerleştirilerek ve çekme hızı 120 mm/dak. olarak ayarlanarak kopmanın 20 ± 5 saniyede gerçekleşmesi sağlandı. Kaydedilen gram-kuvvet (gf) cinsinden kopma direnci aşağıdaki formüle göre kopma indisine çevrildi.

$$\text{Kopma indisi (N.m/g)} = \frac{\text{Kopma Direnci (gf) x 0,0098}}{\text{Şerit genişliği (m) x Gramaj(g/m}^2\text{)}}$$

2.19.5. Yırtılma Testi

Yırtılma testi, TAPPI 414 om-88 standardına göre Elmendorf-1650 tipi yırtılma cihazında yapıldı. Kağıt örnekleri 62x100 mm boyutlarında kesildikten sonra 4 kat olacak şekilde yırtılma işlemi gerçekleştirildi. Kadrandaki okunan değer aşağıdaki formül yardımı ile yırtılma indisine çevrildi.

$$\text{Yırtılma indisi (mN.m}^2\text{/g)} = \frac{\text{Okunan değer x 3 x 9,8}}{\text{Kağıt ad. x Gramaj(g/m}^2\text{)}}$$

2.19.6. Deneme Kağıtlarına Uygulanan Optik Testler

Standart yöntemlere göre elde edilen kağıtların optik özelliklerinin tespitinde Elrepho 3300 model spektroskopik alet kullanıldı. Kağıtların parlaklık ölçümleri ISO/DIS 2470 standardına uygun olarak gerçekleştirildi. Renk ölçümleri ISO/CD 5631 standardına uygun olarak yapıldı.

2.20. SEM Analizi

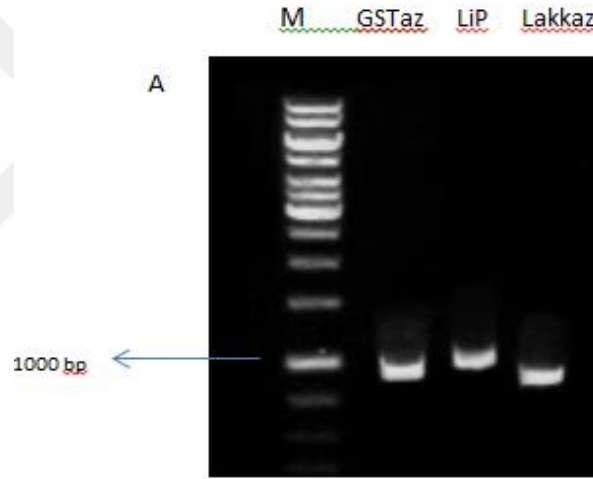
Çalışmada ligninolitik enzimlerle tekli, ikili, üçlü kombinasyonlar ve füzyon şeklinde muamele edilen kızılçam kraft ve atık kağıt hamurları Taramalı Elektron mikroskopunda (SEM) incelendi. Kraft hamur örnekleri altın film ile kaplandı. Daha sonra lifler 5 kV'de incelendi (Nagar vd., 2013).



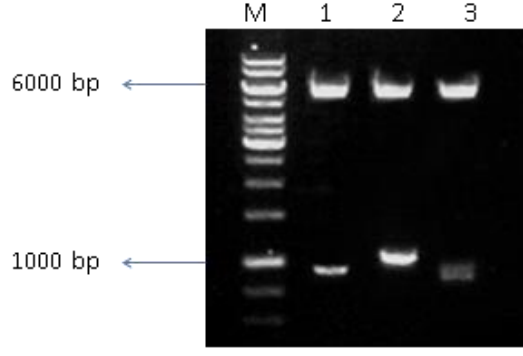
3. BULGULAR

3.1. Ligninolitik Genlerin PCR ile çoğaltılması ve pMA0911 Vektörüne Klonlanması

Ligninolitik proteinleri kodlayan GST, lakkaz ve lignin peroksidaz genlerini elde etmek amacıyla, PCR gerçekleştirildi. PCR sonucunda elde edilen DNA fragmentleri pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı. Genlerin dizi analizi, baz dizini otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla (Macrogen, Hollanda) gerçekleştirildi. Dizin analizi sonucunda, 868 bp'lik GST, 822 bp'lik lakkaz ve 1050 bp'lik lignin peroksidaz fragmentleri elde edildi.



Şekil 6. GST, lignin peroksidaz ve lakkaz genlerinin PCR sonucu oluşan ürünlerinin agaroz jel görüntüsü M: Marker



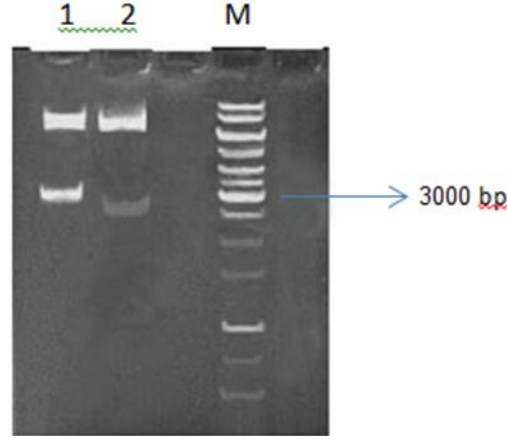
Şekil 7. pMA0911 ifade vektöründe oluşturulan klonların restriksiyon enzimleriyle kesilmesi sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü (*EcoRI-BamHI* kesimi), M: Marker; 1: GST klonu; 2: LiP klonu; 3: Lakkaz klonu

3.2. Ligninolitik Genlerin pMA0911 Vektörüne Füzyon Proteini Oluşturacak Şekilde Klonlanması

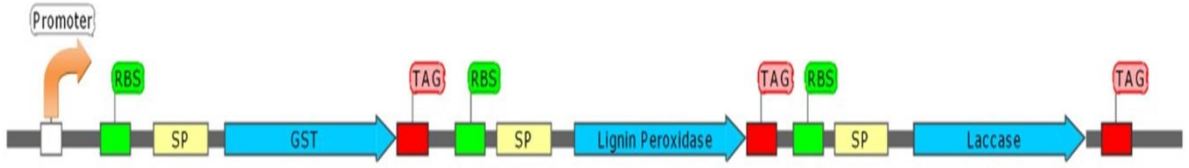
Füzyon proteini oluşturmak amacı ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonları sonucunda GST geni için 868, lignin peroksidaz geni için 1050 ve lakkaz geni için 822 bp uzunluğunda fragmentler elde edildi. Daha sonra yapılan LFH PCR sonucunda ilk gen GST, ikinci gen Lignin peroksidaz ve son gen lakkaz olacak şekilde yaklaşık olarak 2753 bp'lık fragment elde edildi. Yaklaşık olarak 2753 bp uzunluğunda olan füzyon fragmenti *EcoRI* ve *BamHI* enzimleri ile kesildi ve aynı enzimler ile kesilmiş pMA0911 vektörüne klonlandı, daha sonra da *Bacillus* WB800 hücresine transforme edildi (Şekil 8).

3.3. Ligninolitik Genlerin pMA0911 Vektörüne Operon Düzeninde Klonlanması

İlgili genlerin operon düzeninde klonlanmalarının yapılabilmesi için öncelikle her bir gen ayrı ayrı pMA0911 vektörüne klonlandı. pMA0911 klonları kalıp olarak kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonları sonucunda GST geni 1050, lignin peroksidaz geni 1110 ve lakkaz geni ise 993 bp uzunluğunda fragmentler olarak elde edildi. Daha sonra yapılan PCR sonucunda ilk gen GST, ikinci gen lignin peroksidaz ve son gen lakkaz olacak şekilde yaklaşık olarak 3153 bp'lık fragment elde edilmiştir. Her bir genin önünde proteinlerin hücre dışına taşınmasına olanak sağlayacak sinyal peptidini içerecek şekilde elde edilen bu fragment pMA0911 vektörüne klonlanarak *Bacillus* WB800 hücresine transforme edildi (Şekil 9).



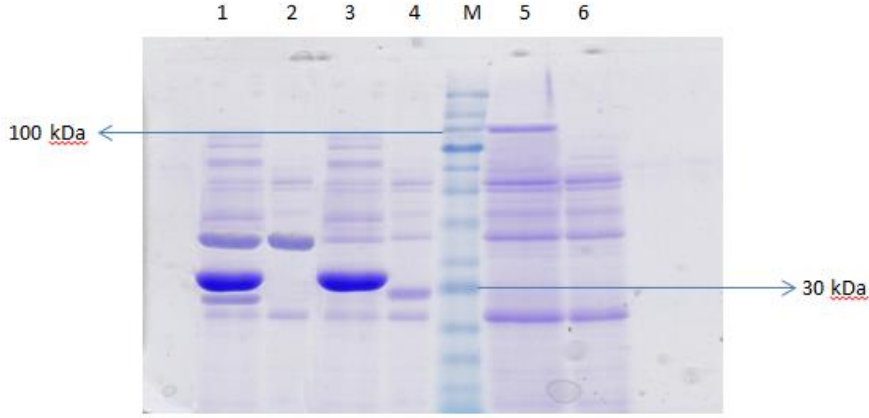
Şekil 8. Operon düzeninde ve füzyon şeklinde oluşturulan PCR fragmentinin pMA0911 klonlarının restriksiyon enzimleriyle kesilmesi sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü, 1; Operon klonu (*SbfI-NheI* kesimi) , 2; füzyon klonu (*EcoRI-BamHI* kesimi), M; marker



Şekil 9. Operon düzeninde elde edilen fragment RBS: Ribozom bağlanma bölgesi, SP: Sinyal peptidi, TAG: Stop kodonu

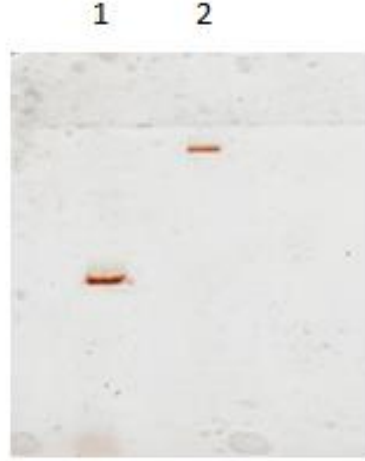
3.4. *Bacillus* WB800 Hücrelerine Transformasyon ve Gen İfadesi

Hem ayrı ayrı hem operon düzeninde hem de füzyon oluşturacak şekilde pMA0911 vektörüne klonlanan genler *Bacillus* WB800 hücrelerine tranforme edildi. Yapılan indüklemenin ardından söz konusu genler ifade edilerek protein bantları tespit edildi (Şekil 10). Elde edilen proteinler BmgLac, KpnGST, RjoLip olarak adlandırıldı. Elde edilen füzyon proteini ise Füzligninaz olarak adlandırılırken operon düzeninde klonlamadan elde edilen üçlü enzim için herhangi adlandırma yapılmadı.



Şekil 10. *Bacillus* WB800 hücresindeki çözümlü proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü, 1: üç enzimin operon düzeninde oluşturulan protein bantları; 2: Lignin peroksidaz; 3. GST; 4: Lakkaz; M: Marker; 5: Füzyon; 6: *Bacillus* WB800 kontrol hücresi

Füzligninaz proteininde yer alan her bir enzim için spektrofotometrik aktivite testleri yapıldı ve enzim aktiviteleri tespit edildi. Füzligninaz içinde yer alan ligninolitik enzimlerden lignin peroksidaz için zimogram testleri mevcut olduğundan ve ayrıca füzyon proteininin üç boyutlu yapısında ortada kalan lignin peroksidaz geninin aktivitesinde sıkıntı olabileceği ve aktif bölgesinin kapanabileceği düşünüldüğünden sıkıntılı olabilecek bu enzim için spektrofotometre de yapılan aktivite testinden sonra Füzligninaz ile zimogram PAGE deneyi gerçekleştirilerek jelde lignin peroksidaz aktivitesi test edildi ve yapılan test sonucunda lignin peroksidaz aktivitesi jelde gözlemlendi (Şekil 11).

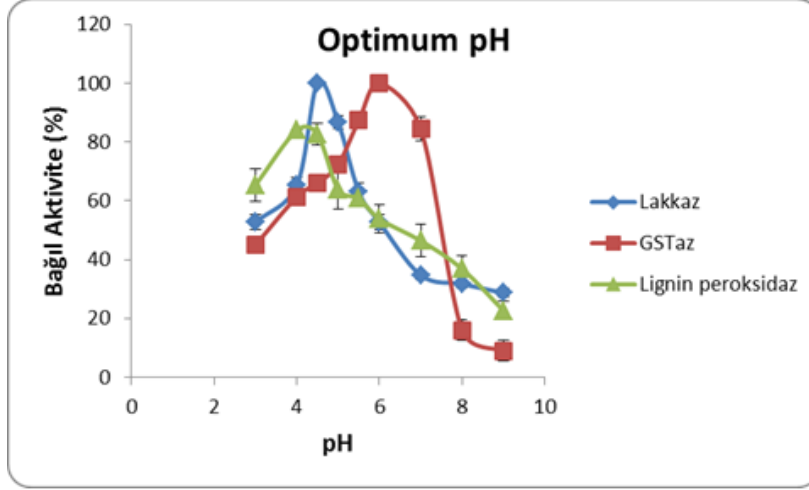


Şekil 11. Füzyon proteini içinde yer alan enzimlerden biri olan lignin peroksidazın zimogram görüntüsü. 1; LiP, 2; Füzyon proteini.

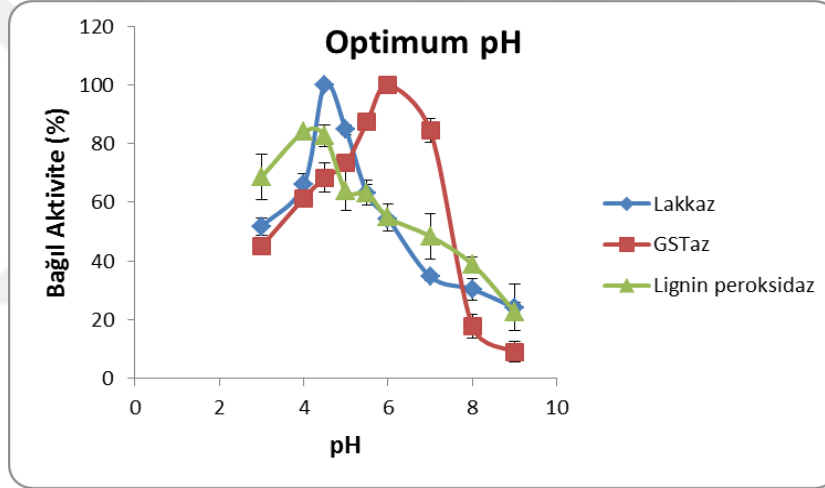
3.5. Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu

3.5.1. Optimum pH

RjoLip, KpnGST, BmgLac ve Füzligninaz proteinlerinin aktivitesine pH'nın etkisi, 50 mM sitrat tamponu (pH 3,0-6,0), 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0-8,0), 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0-9,0) ve 50 mM Glisin tamponu (pH 9,0) kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen verilere göre RjoLip enziminin optimum pH'sı 4, KpnGST enziminin optimum pH'sı 6 ve BmgLac enziminin optimum pH'sı ise 4,5 olarak belirlendi. Aynı enzimlerin oluşturulan Füzligninaz proteinindeki optimum pH değerleri ayrı ayrı belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre oluşturulan Füzligninaz proteinindeki enzimlerin optimum pH değerlerinin değişikliğe uğramadığı belirlendi (Şekil 12, 13).



Şekil 12. RjoLip, KpnGST ve BmgLac enzimlerinin optimum pH grafiği

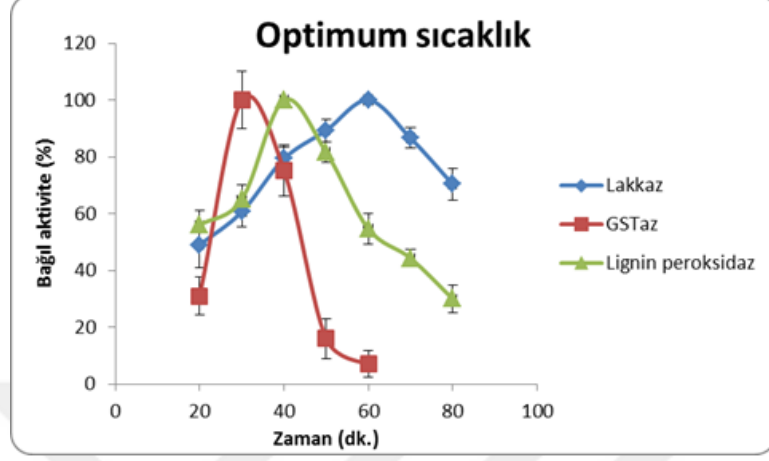


Şekil 13. Füzligninaz proteini içinde yer alan RjoLip, KpnGST ve BmgLac enzimlerinin optimum pH grafiği

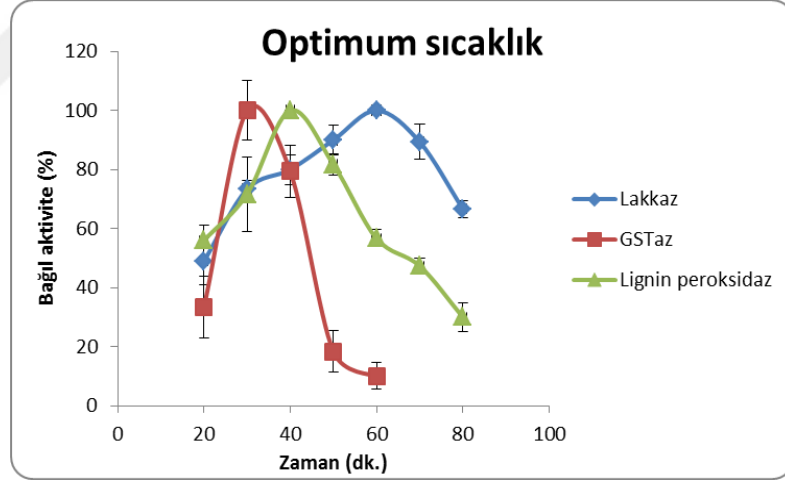
3.5.2. Optimum Sıcaklık

RjoLip, KpnGST, BmgLac ve oluşturulan Füzligninaz proteini içinde yer alan her bir enzimin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri, standart aktivite deneyi ile 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90°C'ye ayarlanmış ısıtıcılarda gerçekleştirildi ve bir seri reaksiyonlar ile belirlendi. Yapılan reaksiyon serilerinde enzimlerin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri RjoLip, KpnGST ve BmgLac için sırasıyla 35°C, 40°C ve 60°C olarak belirlendi. Aynı enzimlerin oluşturulan Füzligninaz proteinlerindeki optimum sıcaklık değerleri ayrı ayrı belirlendi. Elde edilen verilere göre optimum sıcaklıklarda bir değişme olmadığı

gözlemlendi (Şekil 14, 15). Belirlenen bu sıcaklıklar kağıt hamuru ağartılmasında reaksiyon sıcaklığı olarak kullanıldı.



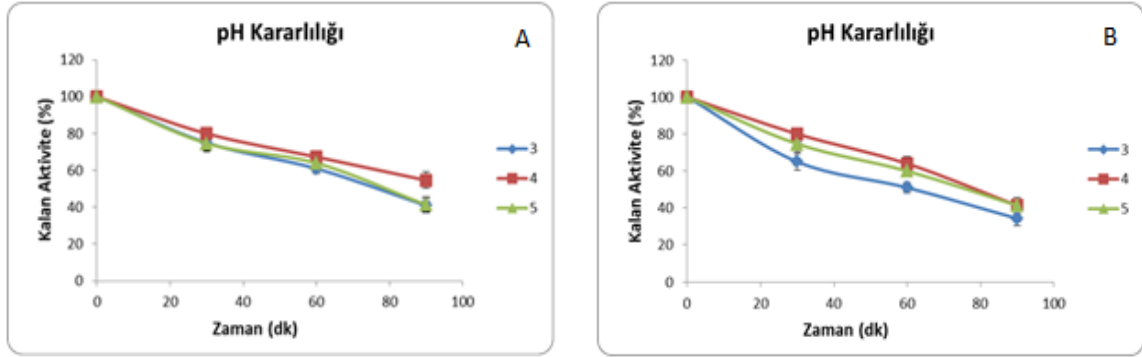
Şekil 14. RjoLip, KpnGST ve BmgLac enzimlerinin optimum sıcaklık grafiği



Şekil 15. Füzligninaz proteini içinde yer alan RjoLip, KpnGST ve BmgLac enzimlerinin optimum sıcaklık grafiği.

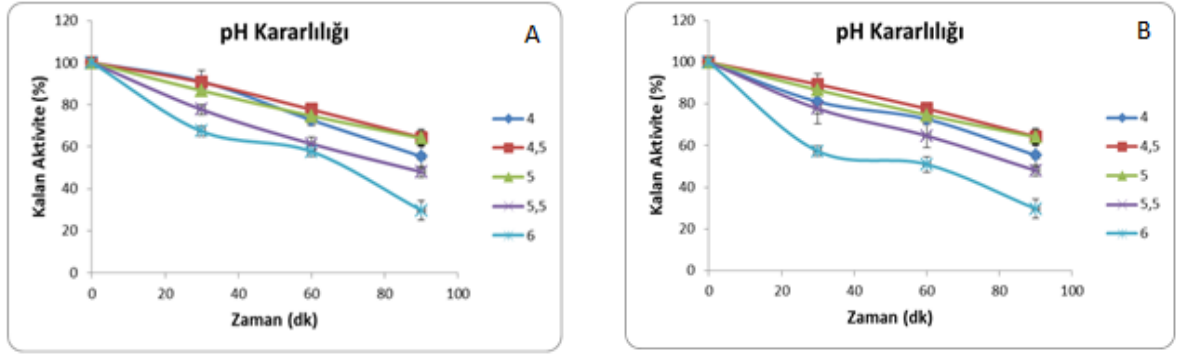
3.5.3. pH Kararlılığı

RjoLip enziminin pH 3,0-4,0 ve 5,0'da kararlı olduğu fakat en kararlı olduğu pH'ın pH 4,0 olduğu belirlendi. Zaten daha önceki çalışmalarda enzimin optimum pH'sında pH 4,0 olarak belirlenmişti. Yapılan ölçümler neticesinde 90 dakika sonunda enzimin aktivitesinde yaklaşık %50 düşüş olduğu belirlendi. Oluşturulan Füzligninaz proteinindeki RjoLip enziminin pH kararlılığına bakıldığında enzimin kararlılığının özellikle pH 3'de azaldığı belirlendi.



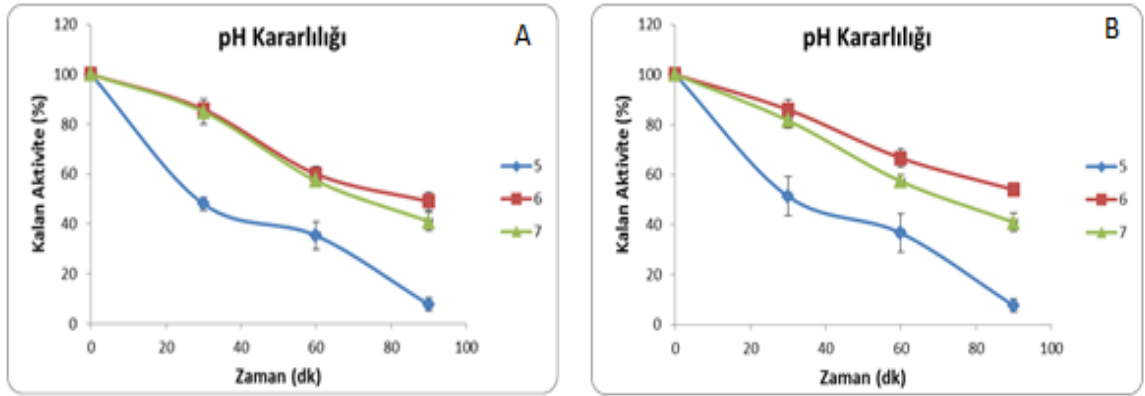
Şekil 16. RjoLip enziminin pH kararlılık grafiği, A; RjoLip, B; Füzligninaz proteini içindeki RjoLip

BmgLac enziminin optimum pH'ı olan 4,5'e yakın pH değerlerinde kararlı olduğu görüldü. pH 4 ve 4,5'de ilk 30 dakikada enzim aktivitesinde önemli bir düşüş olmadığı belirlendi. 30. dakikadan sonra enzimin aktivitesi kısmen azalarak ve 90 dakika sonunda enzim aktivitesinin yaklaşık % 68'e düştüğü tespit edildi. pH 5,5 ve 6,0'da diğer pH'larla karşılaştırıldığında enzimin kararlı olmadığı ve aktivitesinin yaklaşık %36'ya düştüğü belirlendi. Füzligninaz proteini içinde yer alan BmgLac enziminin pH kararlılık grafiğine incelendiğinde pH 4,5, 5 ve 5,5'de önemli bir değişiklik gözlenmezken, pH 4 ve pH 6'da düşüş olduğu belirlendi (Şekil 17).



Şekil 17. BmgLac enziminin pH kararlılık grafiği, A; BmgLac, B; Füzligninaz proteini içindeki BmgLac

KpnGST enziminin pH 5,0'da kararlı olmadığı belirlendi. pH 6,0 ve 7,0'da hemen hemen aynı kararlılıkta olduğu ve 90 dakika sonunda aktivitenin %50'ye düştüğü belirlenmiştir. Füzligninaz proteini içinde yer alan KpnGST enziminin pH kararlılığı incelendiğinde pH 6'daki kararlılığın arttığı diğer pH'lardaki kararlılığının ise düştüğü gözlemlendi (Şekil 18).

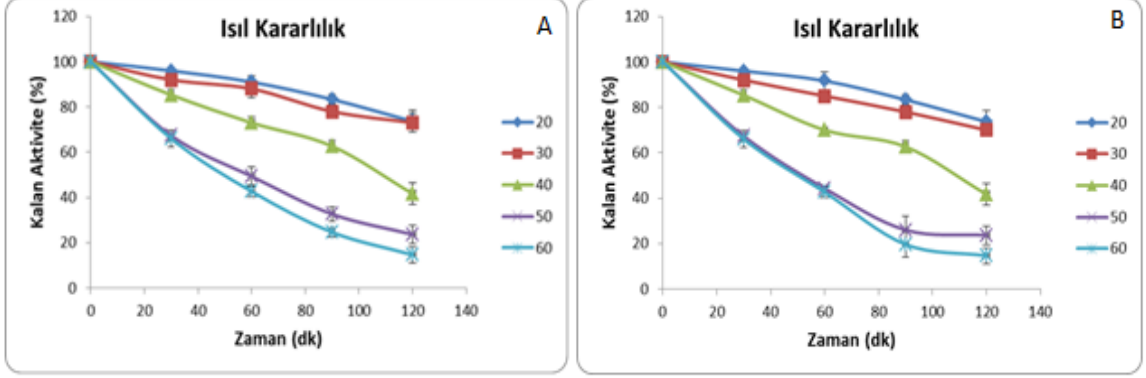


Şekil 18. KpnGST enziminin pH kararlılık grafiği, A; KpnGST, B; Füzligninaz proteini içindeki KpnGST

3.5.4. Isıl Kararlılık

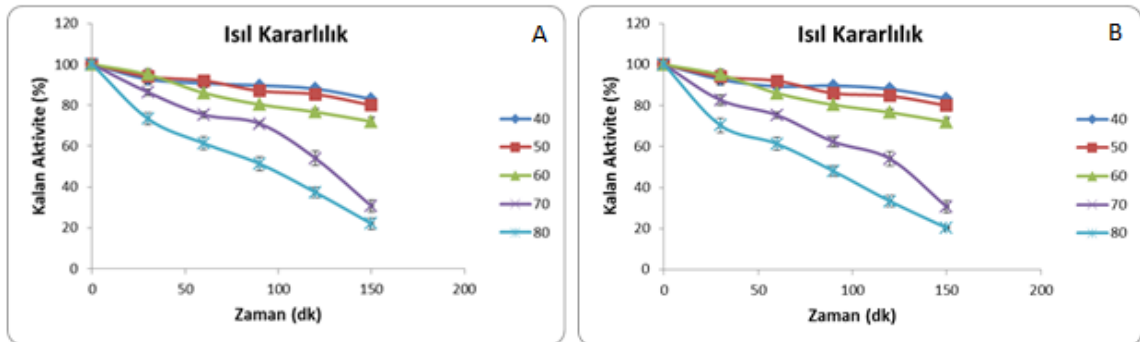
RjoLip enziminin ısıl kararlılık grafiğine bakıldığında 20 ve 30°C'de 2 saat boyunca aktivitesinin yaklaşık %80'ini koruduğu fakat diğer sıcaklıklarda 2 saatlik süre sonunda aktivitesinin neredeyse %85'ini kaybettiği belirlendi. Füzligninaz proteini içinde yer alan

RjoLip enziminin ısıl kararlılığı incelendiğinde 20 ve 30°C’deki aktivitenin çok değişmediği fakat diğer sıcaklıklardaki kararlılığının azaldığı belirlendi (Şekil 19).



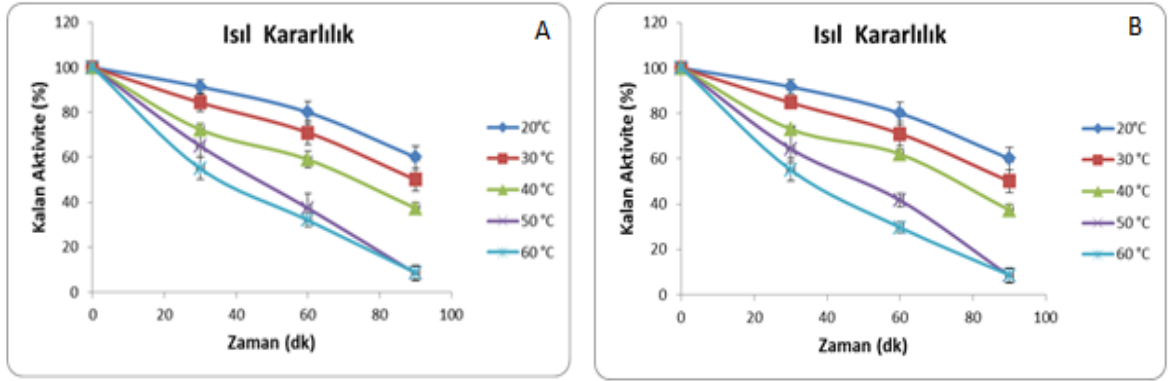
Şekil 19. RjoLip enziminin ısıl kararlılık grafiği, A; RjoLip, B; Füzligninaz proteini içindeki RjoLip

BmgLac enziminin ısıl kararlılık grafiğine incelendiğinde enzimin 40°C ve 50°C’de kararlı olduğu belirlendi. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 60°C’de 60. dakikadan sonra bir miktar düşüş olduğu 150. dakikada ise enzim aktivitesinin %74 olduğu tespit edildi. 70°C ve 80°C’de ise enzim aktivitesinde önemli bir düşüş olduğu, 80°C’de 150 dakika sonunda enzim aktivitesinin %20 olduğu tespit edildi. Füzligninaz proteini içinde yer alan BmgLac enziminin ısıl kararlılığı incelendiğinde 70°C ve 80°C’de enzim aktivitesinde düşüş olduğu ve kararlılığın daha da azaldığı belirlenirken diğer sıcaklıklarda kayda değer bir farklılık gözlenmedi (Şekil 20).



Şekil 20. BmgLac enziminin ısıl kararlılık grafiği, A; BmgLac, B; Füzligninaz proteini içindeki BmgLac

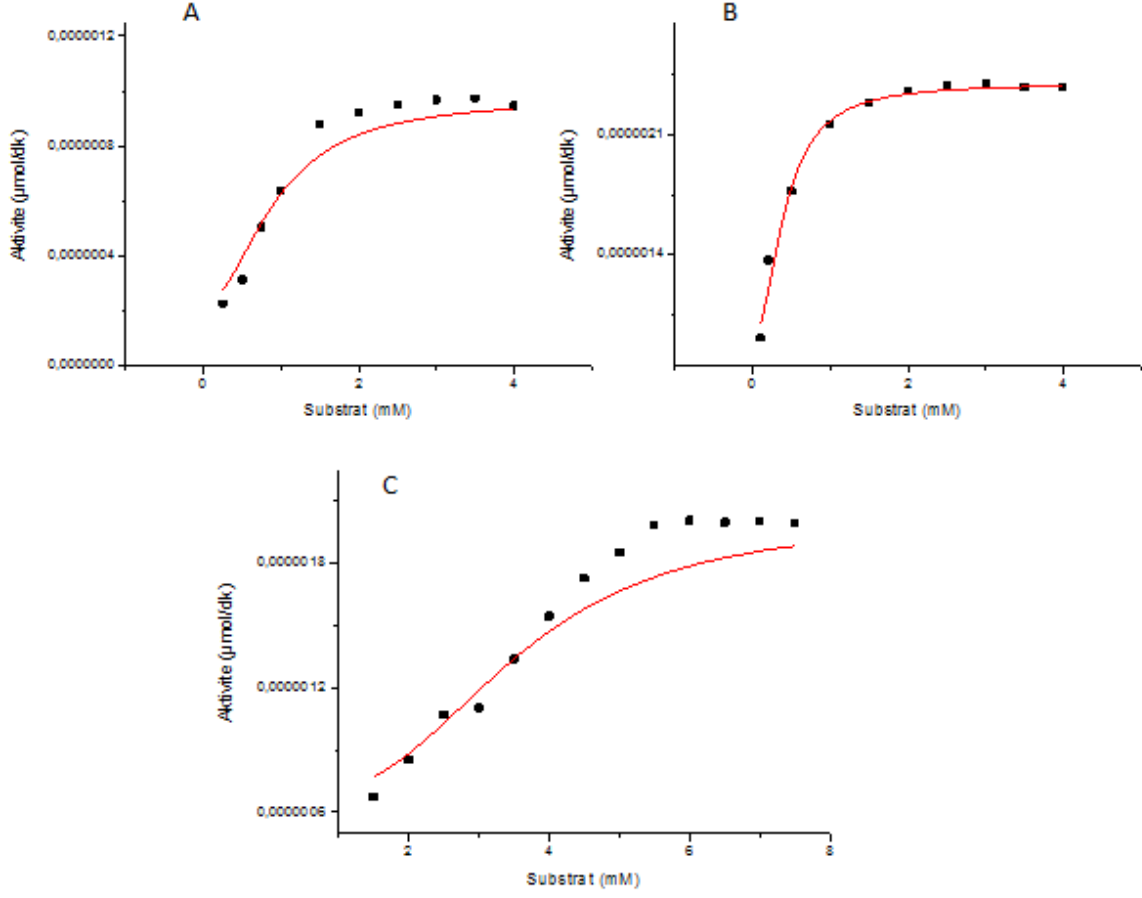
KpnGST enziminin ısıl kararlılık grafiğine bakıldığında enzimin 20°C ve 30°C’de kararlı olduğu, 40°C’de ise zamana bağlı olarak 90. dakikada aktivitesinin %50’sini kaybettiği görüldü. Enzimin 50°C ve 60°C’de ilk 30 dakika sonunda önemli ölçüde aktivite kaybettiği ve 90 dakika sonunda enzim aktivitesinin neredeyse tamamının kaybolduğu belirlendi. Füzligninaz proteini içinde yer alan KpnGST enziminin ısıl kararlılığında önemli bir değişiklik olmadığı tespit edildi (Şekil 21).



Şekil 21. KpnGST enziminin ısıl kararlılık grafiği, A; KpnGST, B; Füzligninaz proteini içindeki KpnGST

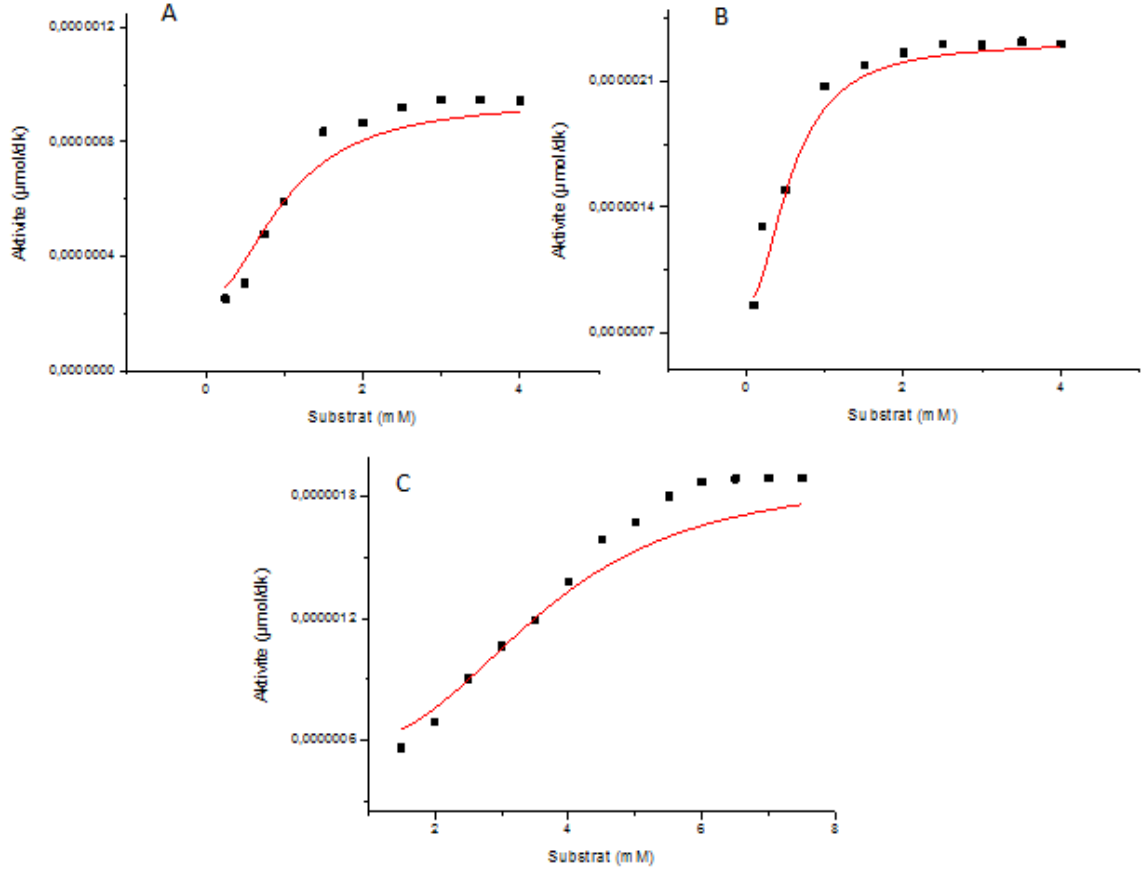
3.5.5. Enzim Kinetiği

Ligninolitik enzimlerden KpnGST, RjoLip ve BmgLac enzimlerinin kısmi kinetik verileri sırasıyla CDNB, veratril alkol ve ABTS substratlarının değişik konsantrasyonları ile gerçekleştirilen reaksiyonlar ile belirlendi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hazırlanan Lineweaver–Burk eğrisinde x ve y eksenlerini kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi. Elde edilen verilere göre KpnGST enziminin K_m değeri $0,93 \pm 0,23$ mM, RjoLip enziminin K_m değeri $3,5 \pm 0,18$ mM ve BmgLac enziminin K_m değeri ise $0,41 \pm 0,16$ mM olarak belirlendi (Şekil 22).



Şekil 22. Ligninolitik enzimlerin Michealis-Menten grafiği, A; KpnGST, B; BmgLac, C; RjoLip

Oluşturulan Füzligninaz proteininde her bir enzim için kısmi kinetik veriler CDNB, veratril alkol ve ABTS substratlarının değişik konsantrasyonları ile gerçekleştirilen reaksiyonlar ile belirlendi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hazırlanan Lineweaver–Burk eğrisinde x ve y eksenlerini kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi. Elde edilen verilere göre KpnGST enziminin K_m değeri $1,01 \pm 0,26$ mM, RjoLip enziminin K_m değeri $3,95 \pm 0,22$ mM ve BmgLac enziminin K_m değeri ise $0,58 \pm 0,19$ olarak belirlendi (Şekil 23).



Şekil 23. Oluşturulan Füzligninaz proteinindeki ligninolitik enzimlerin Michealis-Menten grafiği, A; KpnGST, B; BmgLac, C; RjoLip

3.6. Kraft Lignin Degredasyon Zonunun Belirlenmesi

Enzimlerin kraft lignin degradasyon zonlarının belirlenmesi için yapılan çalışmada aşağıdaki tabloda yer alan veriler elde edildi. Tablo 8’de verilen sonuçlara bakıldığında üçlü enzim kombinasyonu ile yapılan petri deneyindeki zonun diğerlerine göre daha fazla olduğu görüldü. Bu çalışma sonucunda enzimlerin bir arada çalışabilecekleri belirlendi.

Tablo 8. Ligninolitik enzimlerin kraft lignin degradasyon zonları

	KpnGST	RjoLip	BmgLac	KpnGST - RjoLip	RjoLac- BmgLac	KpnGST -BmgLac	KpnGST- RjoLip - BmgLac (operon düzeni klonlamasından elde edilmiş)	Füzligninaz
Zon yarıçapı (mm)	3 mm	5mm	2 mm	7mm	6 mm	5 mm	10 mm	8mm

3.7. Enzimlerin Kraft Lignin Degradasyon Oranının Belirlenmesi

Enzimlerin kraft lignin degradasyon oranlarının belirlenmesi için yapılan çalışmada aşağıdaki tabloda yer alan veriler elde edildi. Tablo 9’da verilen sonuçlara bakıldığında üçlü enzim kombinasyonu ile yapılan deneyde degradasyon oranının daha fazla olduğu belirlendi. Bu sonuçlardan yola çıkılarak enzimlerin birlikte daha etkili çalıştıkları belirlendi.

Tablo 9. Ligninolitik enzimlerin kraft lignin degradasyon oranları

	KpnGST	RjoLip	BmgLac	KpnGST - RjoLip	RjoLac- BmgLac	KpnGST- BmgLac	KpnGST- RjoLip - BmgLac	Füzligninaz
Degradasyon oranı	% 5	%9	%7	% 12	% 15	%10	% 18	% 16

3.8. Rekombinant Bakterilerin Kraft Lignin Degradasyon Oranının Belirlenmesi

Rekombinant bakterilerin kraft lignin degradasyon oranlarının belirlenmesi için yapılan çalışmada aşağıdaki tabloda yer alan veriler elde edildi. Tablo 10’da verilen sonuçlar incelendiğinde üçlü enzim kombinasyonunun en fazla degradasyon oranına sahip olduğu belirlenirken direkt enzim kullanımının daha efektif olduğu sonucuna varıldı.

Tablo 10. Rekombinant bakterilerin kraft lignin degradasyon oranları

	KpnGST	RjoLip	BmgLac	KpnGST - RjoLip	RjoLac- BmgLac	KpnGST- BmgLac	KpnGST- RjoLip - BmgLac	Füzligninaz
Degradasyon oranı	% 2	%4	%3	% 7	% 9	%5	%11	%10

3.9. Kağıt Hamurunun Enzimle Muamelesi ve Kappa Numarası Tayini

Enzimlerin kappa numarasını düşürme oranlarına enzimlerin tek başlarına muamelesi olarak bakıldığında, beklenildiği gibi en iyi düşüşün RjoLip enziminde gerçekleştiği belirlendi. Enzimlerin ikili ve üçlü kombinasyonları incelenmesi sonucu, birlikte kullanıldıklarında Kappa Numarasını düşürmede daha etkili oldukları tespit edildi.

Tablo 11. Kağıt hamurlarının ligninolitik enzimlerle muamelesi sonrası kappa numaraları

	Kappa Numarası		Kontrol ve Enzim muamelesi yapılmış hamurların Kappa numaraları arasındaki fark
	Enzimli	Kontrol	
KpnGST	43,3±0,12	44,1±0,13	0,8
RjoLip	41,2±0,17	43,9±0,19	2,7
BmgLac	42,4±0,22	44,2±0,15	1,8
KpnGST - RjoLip	41,8±0,21	43,88±0,16	2,08
RjoLip - BmgLac	41,3±0,18	43,9±0,11	2,6
KpnGST - BmgLac	42±0,1	44,1±0,16	2,1
KpnGST - RjoLip - BmgLac	40,2±0,2	44,1±0,17	3,9
Füzligninaz	41,3±0,17	44,2±0,25	2,9

3.10. Kağıt Hamurunun Rekombinant Bakteri ile Muamele Şartlarının Optimizasyonu

Elde edilen veriler incelendiğinde KpnGST genini içeren rekombinant bakterinin kappa numarasını en iyi düşürdüğü optimum koşulların 40°C ve pH 4,0 olarak, BmgLac genini içeren rekombinant bakterinin kappa numarasını en iyi düşürdüğü optimum koşulların 50°C ve pH 6,0 olarak, RjoLip genini içeren rekombinant bakterinin kappa numarasını en iyi düşürdüğü optimum koşulların 40°C, pH 4,0 ve 4 mM veratril alkol olarak, her üç enzimi operon düzeninde içeren ve genleri Füzligninaz şeklinde içeren rekombinant bakterinin kappa numarasını en iyi düşürdüğü optimum koşulların ise 40°C, pH 5,0 ve 4 mM veratril alkol olduğu belirlendi. Veratril alkol oranının KpnGST ve BmgLac genlerini içeren rekombinant bakteriler için etki etmediği tespit edildi. Elde edilen

sonuçların standart sapmaları dikkate alınarak oluşturulan tabloda elde edilen verilerin doğruluğu teyit edildi. Bu veriler doğrultusunda önceki çalışmada belirtildiği gibi kontrol grubu ve deney grubu arasında belirgin bir fark olmadığı belirlendi. Bu veriler doğrultusunda rekombinant bakterilerin kağıt hamurunun kappa numarasını fazla etkilemediği belirlendi. Bu sonuçlardan yola çıkarak kağıt hamurların ağartılmasına bakterilerle değil saf enzimlerle devam edildi.



Tablo 12. Kızılçam kraft hamurunun rekombinant bakterilerle muamelesi sonrasındaki elde edilen kappa numaraları

Rekombinant Bakteri	Sıcaklık	KAPPA NO.	pH	KAPPA NO.	Veratril alkol	KAPPA NO.
KpnGST Genini içeren Bacillus suşu	30°C Kontrol	43,69±0,06	4,0 Kontrol	44,85±0,10	2mM Kontrol	44,57±0,03
	30°C	43,54±0,17	4,0	44,67±0,08	2mM	44,53±0,23
	40°C Kontrol	44,17±0,03	5,0 Kontrol	44,56±0,16	4mM Kontrol	44,65±0,12
	40°C	43,13±0,05	5,0	44,55±0,17	4mM	44,64±0,09
	50°C Kontrol	44,62±0,29	6,0 Kontrol	44,34±0,10	6mM Kontrol	44,56±0,03
	50°C	44,45±0,17	6,0	44,30±0,22	6mM	44,52±0,15
	60°C Kontrol	44,23±0,05	7,0 Kontrol	44,65±0,12	8mM Kontrol	44,58±0,16
	60°C	44,18±0,10	7,0	44,63±0,13	8mM	44,54±0,09
BmgLac Genini içeren Bacillus suşu	30°C Kontrol	43,49±0,03	4,0 Kontrol	44,55±0,21	2mM Kontrol	44,46±0,28
	30°C	43,44±0,06	4,0	44,47±0,16	2mM	44,43±0,11
	40°C Kontrol	44,13±0,05	5,0 Kontrol	44,46±0,14	4mM Kontrol	44,64±0,05
	40°C	44,10±0,11	5,0	44,35±0,19	4mM	44,61±0,06
	50°C Kontrol	44,62±0,08	6,0 Kontrol	44,74±0,06	6mM Kontrol	44,57±0,11
	50°C	44,45±0,06	6,0	44,62±0,11	6mM	44,52±0,13
	60°C Kontrol	44,23±0,13	7,0 Kontrol	44,65±0,09	8mM Kontrol	44,24±0,12
	60°C	44,18±0,10	7,0	44,64±0,08	8mM	44,21±0,17
Rj0Lip peroksidaz Genini içeren Bacillus suşu	30°C Kontrol	44,12±0,07	4,0 Kontrol	44,65±0,12	2mM Kontrol	44,56±0,16
	30°C	43,94±0,14	4,0	44,53±0,14	2mM	44,36±0,08
	40°C Kontrol	43,96±0,16	5,0 Kontrol	44,56±0,13	4mM Kontrol	44,67±0,09
	40°C	43,75±0,05	5,0	44,53±0,03	4mM	44,37±0,10
	50°C Kontrol	44,87±0,22	6,0 Kontrol	44,48±0,07	6mM Kontrol	44,34±0,14
	50°C	44,77±0,22	6,0	44,45±0,15	6mM	44,28±0,16
	60°C Kontrol	44,98±0,32	7,0 Kontrol	44,65±0,16	8mM Kontrol	44,48±0,12
	60°C	44,95±0,10	7,0	44,61±0,17	8mM	44,43±0,11
Her üç geni operon düzeninde içeren Bacillus suşu	30°C Kontrol	43,89±0,11	4,0 Kontrol	44,67±0,06	2mM Kontrol	44,66±0,24
	30°C	43,64±0,02	4,0	43,68±0,07	2mM	44,63±0,27
	40°C Kontrol	44,75±0,04	5,0 Kontrol	44,36±0,12	4mM Kontrol	44,23±0,24
	40°C	43,78±0,08	5,0	44,24±0,13	4mM	44,11±0,08
	50°C Kontrol	44,23±0,01	6,0 Kontrol	44,44±0,12	6mM Kontrol	44,56±0,23
	50°C	44,20±0,04	6,0	44,30±0,11	6mM	44,53±0,19
	60°C Kontrol	43,78±0,07	7,0 Kontrol	44,56±0,08	8mM Kontrol	44,34±0,17
	60°C	43,71±0,04	7,0	44,53±0,19	8mM	44,28±0,16
Füzigninaz Şeklindeki Geni içeren Bacillus suşu	30°C Kontrol	43,87±0,12	4,0 Kontrol	44,69±0,06	2mM Kontrol	44,61±0,13
	30°C	43,56±0,11	4,0	43,61±0,11	2mM	44,58±0,15
	40°C Kontrol	44,65±0,12	5,0 Kontrol	44,32±0,17	4mM Kontrol	44,15±0,08
	40°C	43,67±0,15	5,0	44,21±0,11	4mM	43,33±0,21
	50°C Kontrol	44,31±0,14	6,0 Kontrol	44,33±0,09	6mM Kontrol	44,44±0,15
	50°C	44,25±0,16	6,0	44,30±0,15	6mM	44,32±0,14
	60°C Kontrol	43,75±0,14	7,0 Kontrol	44,42±0,21	8mM Kontrol	44,26±0,16
	60°C	43,75±0,12	7,0	44,38±0,14	8mM	44,17±0,15

3.11. Kağıt Hamurunun Enzimlerle Muamele Şartlarının Optimizasyonu

Kızılçam kraft hamuru ve atık kağıt hamurunun enzimlerle muamele şartları optimize edilerek her bir enzimin kağıt hamurlarında en iyi sonucu verdiği şartlar belirlendi. Kızılçam kraft hamuru için elde edilen sonuçlar Tablo 13, 14, 15 ve 16' da belirtildi. Tablo 13, 14, 15 ve 16' da verilen sonuçlara bakıldığında KpnGST enzimi için optimum şartların %5 hamur yoğunluğu ve 8 U/g enzim miktarı olduğu, BmgLac enzimi için optimum şartların % 5 hamur yoğunluğu, 6 U/g enzim miktarı ve 2 mM ABTS konsantrasyonu olduğu, RjoLip enzimi için optimum şartların %5 hamur yoğunluğu, 6 U/g enzim miktarı, 0,5 mM H₂O₂ konsantrasyonu ve 4 mM veratril alkol konsantrasyonu, Füzligninaz şeklinde oluşturulan protein için ise optimum şartların %5 hamur yoğunluğu, 8 U/g enzim miktarı, 0,1 mM H₂O₂ konsantrasyonu, 4 mM veratril alkol konsantrasyonu ve 2 mM ABTS konsantrasyonu olduğu belirlendi.

Tablo 13. Kızılçam kraft hamuruna KpnGST enzimi uygulamasının optimizasyon verileri

	Hamur konsantrasyonu	Kappa No.	Enzim miktarı	Kappa No.
KpnGST	%3 Kontrol	44,81±0,12	Kontrol	44,45±0,06
	%3	44,34±0,18	4 U/g	44,23±0,1
	%5 Kontrol	44,67±0,21	6 U/g	43,67±0,09
	%5	43,21±0,09	8 U/g	43,15±0,15
	%7 Kontrol	43,98±0,1	10 U/g	44,26±0,13
	%7	43,45±0,11		
	%10 Kontrol	44,25±0,13		
	%10	43,97±0,16		

Tablo 14. Kızılçam kraft hamuruna BmgLac enzimi uygulamasının optimizasyon verileri

BmgLac	Hamur konsantrasyonu	Kappa No.	Enzim miktarı	Kappa No.	ABTS konsantrasyonu	Kappa No.
	%3 Kontrol	44,46±0,16	Kontrol	44,78±0,14	1 mM Kontrol	44,45±0,28
	%3	44,33±0,12	4 U/g	44,11±0,13	1 mM	43,56±0,26
	%5 Kontrol	44,34±0,11	6 U/g	42,12±0,15	2 mM Kontrol	44,55±0,14
	%5	42,55±0,14	8 U/g	43,21±0,11	2 mM	42,11±0,17
	%7 Kontrol	43,89±0,08	10 U/g	43,45±0,23	3 mM Kontrol	44,45±0,13
	%7	42,97±0,22			3 mM	43,67±0,19
	%10 Kontrol	44,13±0,13			4 mM Kontrol	44,32±0,15
	%10	43,87±0,2			4 mM	43,57±0,07

Tablo 15. Kızılçam kraft hamuruna RjoLip enzimi uygulamasının optimizasyon verileri

RjoLip	Hamur kon.	Kappa No.	Enzim mik.	Kappa No.	VA mik.	Kappa No.	H ₂ O ₂ mik.	Kappa No.
	%3 Kontrol	44,45±0,13	Kontrol	44,22±0,06	1 mM Kontrol	44,69±0,13	0,1 mM Kontrol	44,15±0,14
	%3	43,5±0,14	4 U/g	43,7±0,09	1 mM	44,6±0,18	0,1mM	43,8±0,17
	%5 Kontrol	44,56±0,15	6 U/g	40,9±0,12	2 mM Kontrol	44,33±0,13	0,5 mM Kontrol	43,85±0,16
	%5	41,6±0,06	8 U/g	42,7±0,1	2 mM	43,4±0,17	0,5mM	41,2±0,07
	%7 Kontrol	44,23±0,05	10 U/g	43,8±0,14	3 mM Kontrol	44,35±0,12	1 mM Kontrol	44,45±0,1
	%7	42,9±0,11			3 mM	43,5±0,11	1 mM	43,3±0,13
	%10 Kontrol	44,78±0,2			4 mM Kontrol	44,34±0,14	3 mM Kontrol	44,86±0,1
	%10	44,6±0,21			4 mM	42,2±0,11	3 mM	44,8±0,16

Tablo 16. Kızılçam kraft hamuruna Füzligninaz proteini uygulamasının optimizasyon verileri

Füzligninaz	Hamur konsantrasyonu	Kappa No.	Enzim miktarı	Kappa No.	VA miktarı	Kappa No.	H ₂ O ₂ miktarı	Kappa No.	ABTS konsantrasyonu	Kappa No.
	%3 Kontrol	44,54±0,23	Kontrol	44,32±0,06	1 mM Kontrol	44,56±0,12	0,1 mM Kontrol	44,2±0,2	1 mM Kontrol	44,18±0,18
	%3	43,34±0,14	4 U/g	44,1±0,13	1 mM	44,52±0,16	0,1mM	42,79±0,14	1 mM	43,75±0,15
	%5 Kontrol	44,54±0,15	6 U/g	42,9±0,115	2 mM Kontrol	44,37±0,17	0,5 mM Kontrol	43,94±0,13	2 mM Kontrol	43,79±0,13
	%5	40,54±0,16	8 U/g	41,78±0,13	2 mM	43,29±0,22	0,5mM	42,38±0,16	2 mM	40,76±0,17
	%7 Kontrol	44,34±0,15	10 U/g	43,78±0,2	3 mM Kontrol	44,45±0,17	1 mM Kontrol	44,33±0,14	3 mM Kontrol	44,42±0,1
	%7	43,89±0,13			3 mM	43,61±0,13	1 mM	43,41±0,15	3 mM	43,56±0,2
	%10 Kontrol	44,84±0,14			4 mM Kontrol	44,38±0,17	3 mM Kontrol	44,46±0,1	4 mM Kontrol	44,72±0,1
	%10	44,71±0,17			4 mM	42,13±0,2	3 mM	44,1±0,14	4 mM	43,79±0,26

Atık kağıt hamuru için elde edilen sonuçlar Tablo 17, 18, 19 ve 20’de belirtildi. Tablo 17, 18, 19 ve 20’de verilen sonuçlara bakıldığında KpnGST enzimi için optimum şartların %7 hamur yoğunluğu ve 6 U/g enzim miktarı olduğu, BmgLac enzimi için optimum şartların % 7 hamur yoğunluğu, 6 U/g enzim miktarı ve 2 mM ABTS konsantrasyonu olduğu, RjoLip enzimi için optimum şartların %7 hamur yoğunluğu, 8 U/g enzim miktarı, 0,5 mM H₂O₂ konsantrasyonu ve 4 mM veratril alkol konsantrasyonu olduğu, Füzligninaz şeklinde oluşturulan protein için ise optimum şartların %7 hamur yoğunluğu, 8 U/g enzim miktarı, 0,1 mM H₂O₂ konsantrasyonu, 4 mM veratril alkol konsantrasyonu ve 2 mM ABTS konsantrasyonu olduğu belirlendi. Her bir enzim için belirlenen optimum şartlar tespit edildikten sonra kağıt hamurlarına ağartma dizini uygulandı ve ardından fiziksel ve optik özellikleri tespit edildi. Ağartma dizini sonunda kullanılan enzimin etkisinin sağlıklı bir şekilde belirlenebilmesi için ağartma basamaklarında enzimli ve enzimsiz olmak üzere çalışma 2 grup üzerinden sürdürüldü.

Tablo 17. Atık kağıt hamuruna KpnGST enzimi uygulamasının optimizasyon verileri

KpnGST	Hamur konsantrasyonu	Kappa No.	Enzim miktarı	Kappa No.
	%3 Kontrol	24,82±0,15	Kontrol	24,43±0,16
	%3	24,23±0,13	4 U/g	24,21±0,11
	%5 Kontrol	24,47±0,22	6 U/g	23,19±0,19
	%5	23,25±0,18	8 U/g	23,59±0,15
	%7 Kontrol	24,98±0,1	10 U/g	24,27±0,21
	%7	23,46±0,21		
	%10 Kontrol	24,24±0,13		
	%10	23,92±0,13		

Tablo 18. Atık kağıt hamuruna BmgLac enzimi uygulamasının optimizasyon verileri

BmgLac	Hamur konsantrasyonu	Kappa No.	Enzim miktarı	Kappa No.	ABTS konsantrasyonu	Kappa No.
	%3 Kontrol	24,66±0,13	Kontrol	24,88±0,18	1 mM Kontrol	24,45±0,19
	%3	24,43±0,11	4 U/g	24,17±0,13	1 mM	23,77±0,16
	%5 Kontrol	24,35±0,11	6 U/g	22,16±0,15	2 mM Kontrol	24,49±0,19
	%5	23,67±0,12	8 U/g	23,32±0,15	2 mM	23,65±0,14
	%7 Kontrol	23,91±0,12	10 U/g	23,51±0,17	3 mM Kontrol	24,41±0,16
	%7	22,84±0,16			3 mM	23,69±0,21
	%10 Kontrol	24,16±0,13			4 mM Kontrol	24,33±0,13
	%10	23,92±0,18			4 mM	23,87±0,14

Tablo 19. Atık kağıt hamuruna RjoLip enzimi uygulamasının optimizasyon verileri

RjoLip	Hamur kons.	Kappa No.	Enzim mik.	Kappa No.	VA mik.	Kappa No.	H₂O₂ mik.	Kappa No.
	%3 Kontrol	24,47±0,11	Kontrol	24,32±0,12	1 mM Kontrol	24,56±0,12	0,1 mM Kontrol	24,17±0,11
	%3	23,45±0,16	4 U/g	23,83±0,19	1 mM	24,43±0,19	0,1mM	23,83±0,08
	%5 Kontrol	24,46±0,19	6 U/g	22,54±0,16	2 mM Kontrol	24,33±0,19	0,5 mM Kontrol	23,76±0,21
	%5	23,79±0,17	8 U/g	21,23±0,16	2 mM	23,51±0,23	0,5mM	21,26±0,09
	%7 Kontrol	24,23±0,15	10 U/g	23,91±0,23	3 mM Kontrol	24,56±0,17	1 mM Kontrol	24,74±0,23
	%7	22,85±0,14			3 mM	23,66±0,12	1 mM	23,45±0,21
	%10 Kontrol	24,76±0,24			4 mM Kontrol	24,39±0,24	3 mM Kontrol	24,78±0,16
	%10	24,62±0,22			4 mM	23,17±0,22	3 mM	24,64±0,13

Tablo 20. Atık kağıt hamuruna Füzligninaz proteini uygulamasının optimizasyon verileri

Füzligninaz	Hamur konsantrasyonu	Kappa No.	Enzim miktarı	Kappa No.	VA miktarı	Kappa No.	H ₂ O ₂ miktarı	Kappa No.	ABTS konsantrasyonu	Kappa No.
	%3 Kontrol	24,48±0,16	Kontrol	24,28±0,11	1 mM Kontrol	24,63±0,11	0,1 mM Kontrol	24,23±0,15	1 mM Kontrol	24,121±0,2
	%3	23,34±0,18	4 U/g	23,76±0,11	1 mM	24,58±0,15	0,1mM	22,63±0,16	1 mM	23,69±0,11
	%5 Kontrol	24,49±0,6	6 U/g	22,9±0,16	2 mM Kontrol	24,41±0,14	0,5 mM Kontrol	23,86±0,13	2 mM Kontrol	23,82±0,14
	%5	23,61±0,17	8 U/g	21,81±0,13	2 mM	23,32±0,17	0,5mM	22,45±0,15	2 mM	21,82±0,14
	%7 Kontrol	24,43±0,6	10 U/g	23,83±0,21	3 mM Kontrol	24,39±0,18	1 mM Kontrol	24,39±0,18	3 mM Kontrol	24,5±0,14
	%7	22,21±0,17			3 mM	23,61±0,2	1 mM	23,45±0,15	3 mM	23,53±0,16
	%10 Kontrol	24,91±0,18			4 mM Kontrol	24,42±0,17	3 mM Kontrol	24,53±0,1	4 mM Kontrol	24,69±0,19
	%10	24,75±0,18			4 mM	22,22±0,17	3 mM	24,23±0,18	4 mM	23,82±0,13

3.12. Kağıt Hamuru Ağartma Çalışmaları

Kızılçam kraft ve atık kağıt hamuru ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilere bakıldığında tekli enzim kullanımında en yüksek delignifikasyon derecesinin lignin peroksidaz enzimiyle muamele edilen kağıt hamurlarında olduğu belirlendi. KpnGST ve BmgLac enzimleri ligninin sadece yan gruplarını parçaladığı için RjoLip kadar delignifikasyona katkı sağlayamadıkları tespit edildi. İkili ağartmalara bakıldığında RjoLip-BmgLac enzim ikilisinin en yüksek delignifikasyon oranına sahip olduğu tespit edildi. Üçlü enzim kombinasyonu ve Füzligninaz proteini kullanılarak yapılan ağartma sonuçları karşılaştırıldığında üçlü enzim kombinasyonunun delignifikasyon derecesinin daha yüksek olduğu belirlendi. Elde edilen veriler hem kızılçam kraft hamuru hem de atık kağıt hamuru için aşağıda yer alan tablolarda ayrı ayrı belirtildi.

Tablo 21. Kızılçam kraft hamurunun rekombinant enzimlerle tekli olarak yapılan ağartma sonuçları

	Ağartma tipi	Kappa no.	Delignifikasyon derecesi (%)
KpnGST	X kontrol	44,97±0,59	% 4,13±0,97
	X	43,11±0,18	
	O kontrol	23,43±0,16	% 26, 03±0,3
	O	17,33±0,18	
	P kontrol	16,23±0,19	%18,61±0,75
	P	13,19±0,05	
	BmgLac	X kontrol	44,34±0,12
X		42,10±0,17	
O kontrol		23,33±0,08	% 27,77±1,18
O		16,85±0,27	
P kontrol		16,11±0,05	% 19,49±0,49
P		12,97±0,04	
RjoLip	X kontrol	44,67±0,24	% 7,88±0,56
	X	41,15±0,03	
	O kontrol	23,21±0,18	% 30,59±0,31
	O	16,11±0,06	
	P kontrol	15,89±0,17	% 25,99±0,74
	P	11,76±0,22	
X: enzimatik delignifikasyon, O: Oksijen delignifikasyonu, P: Hidrojen peroksit ağartması			

Tablo 22. Rekombinant enzimlerin ikili kombinasyonlarının kızılçam kraft hamuru ağartma sonuçları

	Ağartma tipi	Kappa no.	Delignifikasyon derecesi (%)
KpnGST-BmgLac	X kontrol	44,88±0,43	% 5,90±0,83
	X	42,23±0,19	
	O kontrol	23,34±0,19	% 33,3±0,28
	O	15,55±0,15	
	P kontrol	15,36±0,21	%23,76±0,38
	P	11,71±0,15	
	KpnGST-RjoLip	X kontrol	44,58±0,13
X		42,21±0,19	
O kontrol		23,22±0,15	% 31,7±93
O		15,85±0,21	
P kontrol		15,81±0,18	% 27,76±0,35
P		11,42±0,14	
RjoLip-BmgLac	X kontrol	44,77±0,24	% 6,54±0,65
	X	41,84±0,12	
	O kontrol	23,25±0,15	% 34,92±0,31
	O	15,13±0,11	
	P kontrol	15,09±0,13	% 30,01±0,45
	P	10,56±0,16	
X: enzimatik delignifikasyon, O: Oksijen delignifikasyonu, P: Hidrojen peroksit ağartması			

Tablo 23. Rekombinant Füzligninaz ve üçlü enzim kombinasyonunun kızılçam kraft hamuru ağartma sonuçları

	Ağartma tipi	Kappa no.	Delignifikasyon derecesi (%)
Füzligninaz	X kontrol	44,72±0,17	% 7,69±0,27
	X	41,28±0,21	
	O kontrol	23,21±0,13	% 38,17±0,31
	O	14,35±0,19	
	P kontrol	14,26±0,27	%32,32 ±0,26
	P	9,65±0,16	
KpnGST-RjoLip-BmgLac	X kontrol	44,67±0,17	% 9,96±0,33
	X	40,22±0,26	
	O kontrol	23,16±0,19	% 40,5±0,38
	O	13,78±0,26	
	P kontrol	13,51±0,21	% 38,04±0,29
	P	8,37±0,18	
X: enzimatik delignifikasyon, O: Oksijen delignifikasyonu, P: Hidrojen peroksit ağartması			

Tablo 24. Atık kağıt hamurunun rekombinant enzimlerle tekli olarak yapılan ağartma sonuçları

	Ağartma tipi	Kappa no.	Delignifikasyon derecesi (%)
KpnGST	X kontrol	26,14±0,17	%1,02±0,23
	X	25,87±0,12	
	O kontrol	16,48±0,19	%13,6±0,13
	O	14,23±0,13	
	P kontrol	10,34±0,22	%14,02±0,32
	P	8,89±0,11	
	BmgLac	X kontrol	26,23±0,15
X		24,89±0,12	
O kontrol		16,87±0,14	%16,36±0,15
O		14,11±0,15	
P kontrol		10,14±0,14	%17,75±0,22
P		8,34±0,13	
RjoLip	X kontrol	25,98±0,15	%8,46±0,18
	X	23,78±0,11	
	O kontrol	15,88±0,12	%15,99±0,29
	O	13,34±0,16	
	P kontrol	10,11±0,13	%20,67±0,11
	P	8,02±0,19	
X: enzimatik delignifikasyon, O: Oksijen delignifikasyonu, P: Hidrojen peroksit ağartması			

Tablo 25. Rekombinant enzimlerin atık kağıt hamurundaki ikili ağartma sonuçları

	Ağartma tipi	Kappa no.	Delignifikasyon derecesi (%)
KpnGST-BmgLac	X kontrol	26,77±0,22	%14,53±0,21
	X	22,88±0,14	
	O kontrol	16,15±0,13	%19,19±0,15
	O	13,05±0,16	
	P kontrol	10,09±0,21	%32,80±0,19
	P	6,78±0,13	
KpnGST-RjoLip	X kontrol	26,18±0,12	%14,78±0,15
	X	22,31±0,13	
	O kontrol	15,87±0,13	%20,28±0,13
	O	12,65±0,18	
	P kontrol	10,44±0,14	%34,67±0,14
	P	6,82±0,22	
RjoLip-BmgLac	X kontrol	26,79±0,16	%15,45±0,16
	X	22,65±0,15	
	O kontrol	16,78±0,12	%27,17±0,15
	O	12,22±0,19	
	P kontrol	10,66±0,13	%37,42±0,17
	P	6,67±0,13	
X: enzimatik delignifikasyon, O: Oksijen delignifikasyonu, P: Hidrojen peroksit ağartması			

Tablo 26. Rekombinant Füzligninaz ve üçlü enzim kombinasyonu atık kağıt hamuru ağartma sonuçları

	Ağartma tipi	Kappa no.	Delignifikasyon derecesi (%)
Füzligninaz	X kontrol	26,55±0,12	%17,66±0,14
	X	21,86±0,16	
	O kontrol	16,15±0,15	%22,10±0,16
	O	12,58±0,13	
	P kontrol	10,12±0,22	%43,18±0,23
	P	5,75±0,14	
	KpnGST-RjoLip-BmgLac	X kontrol	26,16±0,12
X		21,31±0,15	
O kontrol		16,21±0,12	%29,36±0,17
O		11,45±0,17	
P kontrol		10,23±0,15	%47,01±0,16
P		5,42±0,12	
X: enzimatik delignifikasyon, O: Oksijen delignifikasyonu, P: Hidrojen peroksit ağartması			

3.13. Kağıtlara Uygulanan Fiziksel ve Optik Testler

Tablo 27 ve 28’de verilen bulgulara göre kontrol ve enzim ilaveli ağartmalar karşılaştırıldığında, enzim kullanılan her iki hamur tipinde de kopma uzunluğu kontrole göre artış göstermiştir. Buna bağlı olarak belirlenen çekme indisi de aynı oranda artmıştır. Patlama indisi enzim ilavesi ile azalma göstermiş ve yırtılma indisi değerlerinde bir değişim meydana gelmemiştir. Hacimlilik ve yoğunluk değerlerinde de önemli derecede bir değişim belirlenmemiştir. Bu tabloya genel olarak bakılacak olursa enzim kullanımının fiziksel özelliklerde önemli bir değişikliğe sebep olmadığı görülmektedir.



Tablo 27. Enzimle muamele edilen kızılçam kraft hamurlarının fiziksel özellikleri

Enzim adı		Çekme indisi (Nm/g)	Patlama indisi (kPa.m ² .g)	Yırtılma indisi (mN.m ² /g)	Kopma uzunluğu (km)	Kalınlık (mikron)	Gramaj (g/m ²)	Yoğunluk (g/cm ³)	Hacimlilik (cm ³ /g)
KpnGST- BmgLac	<i>Kontrol</i>	2,62±0,14	4,18±0,14	2,75±0,13	2,63±0,11	136,27±0,11	71,33±0,23	0,55±0,12	1,85±0,22
	<i>Enzim</i>	2,69±0,22	4,11±0,14	2,46±0,18	2,75±0,18	136,51±0,18	71,65±0,18	0,54±0,16	1,79±0,11
KpnGST- RjoLip	<i>Kontrol</i>	2,67±0,14	4,15±0,24	2,76±0,14	2,68±0,12	135,32±0,17	70,56±0,16	0,54±0,15	1,87±0,16
	<i>Enzim</i>	2,73±0,18	3,99±0,13	2,43±0,15	2,81±0,18	135,23±0,21	72,31±0,18	0,58±0,14	1,85±0,11
RjoLip- BmgLac	<i>Kontrol</i>	2,75±0,13	4,21±0,11	2,86±0,14	2,65±0,16	134,28±0,21	71,64±0,12	0,53±0,17	1,89±0,13
	<i>Enzim</i>	2,86±0,17	3,94±0,23	2,13±0,18	2,88±0,24	136,17±0,17	75,12±0,16	0,55±0,16	1,83±0,16
Füzligninaz	<i>Kontrol</i>	2,59±0,15	4,12±0,11	2,72±0,13	2,56±0,18	136,22±0,21	72,87±0,21	0,52±0,16	1,88±0,23
	<i>Enzim</i>	2,62±0,23	4,02±0,18	2,11±0,17	2,77±0,17	134,76±0,23	73,81±0,23	0,55±0,16	1,82±0,32
KpnGST- RjoLip- BmgLac	<i>Kontrol</i>	2,61±0,18	4,17±0,2	2,78±0,3	2,55±0,18	135,55±0,13	70,14±0,15	0,56±0,16	1,83±0,12
	<i>Enzim</i>	2,91±0,21	3,62±0,12	2,12±0,2	2,99±0,21	136,32±0,16	72,93±0,17	0,59±0,13	1,75±0,17
KpnGST	<i>Kontrol</i>	2,61±0,09	4,13±0,07	2,95±0,14	2,61±0,25	135,23±0,13	69,83±0,4	0,53±0,13	1,92±0,24
	<i>Enzim</i>	2,64±0,12	4,09±0,05	2,35±0,15	2,76±0,18	137,58±0,14	71,82±0,13	0,55±0,16	1,89±0,21
BmgLac	<i>Kontrol</i>	2,69±0,13	4,11±0,21	2,89±0,18	2,74±0,14	134,33±0,1	70,57±0,15	0,52±0,11	1,88±0,15
	<i>Enzim</i>	2,83±0,08	3,98±0,23	2,33±0,11	2,82±0,09	135,88±0,28	73,33±0,19	0,55±0,17	1,87±0,12
RjoLip	<i>Kontrol</i>	2,65±0,15	4,14±0,18	2,90±0,14	2,76±0,1	133,25±0,2	70,67±0,16	0,51±0,17	1,91±0,11
	<i>Enzim</i>	2,89±0,17	3,75±0,19	2,29±0,15	2,92±0,21	137,13±0,07	75,81±0,12	0,54±0,1	1,82±0,17

Tablo 28. Enzimle muamele edilen atık kağıt hamurlarının fiziksel özellikleri

Enzim adı		Çekme indisi (Nm/g)	Patlama indisi (kPa.m ² .g)	Yırtılma indisi (mN.m ² /g)	Kopma uzunluğu (km)	Kalınlık (mikron)	Gramaj (g/m ²)	Yoğunluk (g/cm ³)	Hacimlilik (cm ³ /g)
KpnGST- BmgLac	<i>Kontrol</i>	2,68±0,11	4,12±0,13	2,66±0,14	2,54±0,16	136,33±0,11	70,88±0,17	0,56±0,11	1,76±0,13
	<i>Enzim</i>	2,73±0,12	4,08±0,22	2,53±0,15	2,62±0,15	136,43±0,15	71,02±0,15	0,53±0,12	1,74±0,14
KpnGST- RjoLip	<i>Kontrol</i>	2,65±0,24	4,18±0,18	2,68±0,15	2,72±0,12	136,24±0,14	71,21±0,16	0,52±0,14	1,78±0,16
	<i>Enzim</i>	2,69±0,15	4,02±0,16	2,51±0,15	2,81±0,15	136,28±0,08	72,11±0,16	0,55±0,14	1,76±0,14
RjoLip- BmgLac	<i>Kontrol</i>	2,66±0,16	4,18±0,13	2,78±0,18	2,67±0,15	135,88±0,14	72,43±0,16	0,53±0,21	1,75±0,22
	<i>Enzim</i>	2,69±0,17	3,98±0,18	2,35±0,22	2,73±0,18	135,43±0,16	72,56±0,16	0,57±0,12	1,71±0,15
Füzligninaz	<i>Kontrol</i>	2,64±0,21	4,14±0,13	2,65±0,17	2,63±0,15	136,55±0,14	72,22±0,18	0,55±0,14	1,82±0,17
	<i>Enzim</i>	2,68±0,17	4,08±0,14	2,43±0,19	2,75±0,11	136,66±0,18	72,23±0,18	0,58±0,19	1,79±0,11
KpnGST- RjoLip- BmgLac	<i>Kontrol</i>	2,64±0,14	4,12±0,24	2,66±0,21	2,63±0,16	135,54±0,13	71,45±0,17	0,53±0,15	1,79±0,16
	<i>Enzim</i>	2,87±0,23	3,74±0,18	2,32±0,26	2,85±0,15	136,12±0,15	71,78±0,12	0,57±0,17	1,73±0,13
KpnGST	<i>Kontrol</i>	2,48±0,15	4,09±0,14	2,89±0,21	2,62±0,21	136,18±0,19	70,54±0,21	0,52±0,15	1,84±0,16
	<i>Enzim</i>	2,58±0,23	4,02±0,13	2,75±0,16	2,69±0,09	136,53±0,15	71,11±0,16	0,53±0,13	1,81±0,16
BmgLac	<i>Kontrol</i>	2,67±0,15	4,15±0,14	2,56±0,13	2,62±0,16	135,46±0,15	71,67±0,18	0,54±0,16	1,79±0,13
	<i>Enzim</i>	2,72±0,16	4,10±0,22	2,44±0,16	2,71±0,17	135,39±0,2	72,12±0,21	0,55±0,21	1,76±0,11
RjoLip	<i>Kontrol</i>	2,68±0,14	4,18±0,16	2,65±0,16	2,68±0,13	136,21±0,15	71,55±0,13	0,55±0,15	1,77±0,14
	<i>Enzim</i>	2,77±0,23	4,02±0,13	2,34±0,14	2,75±0,16	136,87±0,13	72,09±0,15	0,56±0,15	1,74±0,13

3.14. Deneme Kağıtlarına Uygulanan Optik Testler

Deneme kağıtlarına uygulanan optik testlerden sonra kızılçam kraft hamurunun parlaklığındaki en etkili değişim beklenildiği üzere operon klonlanmasından elde edilen üçlü enzim kombinasyonunda tespit edildi. Elde edilen veriler Tablo 29’de belirtilmektedir. Yine Tablo 30’da görüldüğü gibi, azalan kappa numarasıyla doğru orantılı olarak ISO parlaklık değerlerinde artış belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında parlaklıktaki en fazla artışın üçlü enzim kombinasyonu ile muamele edilen kağıt hamurlarında görüldüğü tespit edildi. Elde edilen verilere göre enzim ilavesi ile kağıtlardan yüksek parlaklık elde edilebileceği belirlendi.

Tablo 29. Rekombinant enzimlerle muamele edilen kızılçam kraft hamurunun ağartma sonrası optik verileri

	ISO Parlaklık (%)	
	Enzimli XOQP	Kontrol OQP
KpnGST	53,51±0,25	51,15±0,22
BmgLac	56,86±0,21	51,17±0,12
RjoLip	61,72±0,15	52,21±0,08
KpnGST-RjoLip	62,88±0,14	52,13±0,17
KpnGST-BmgLac	63,12±0,25	51,87±0,2
RjoLip- BmgLac	63,98±0,21	52,14±0,15
KpnGST-RjoLip- BmgLac	66,45±0,17	51,78±0,16
Füzligninaz	65,14±0,18	51,97±0,19

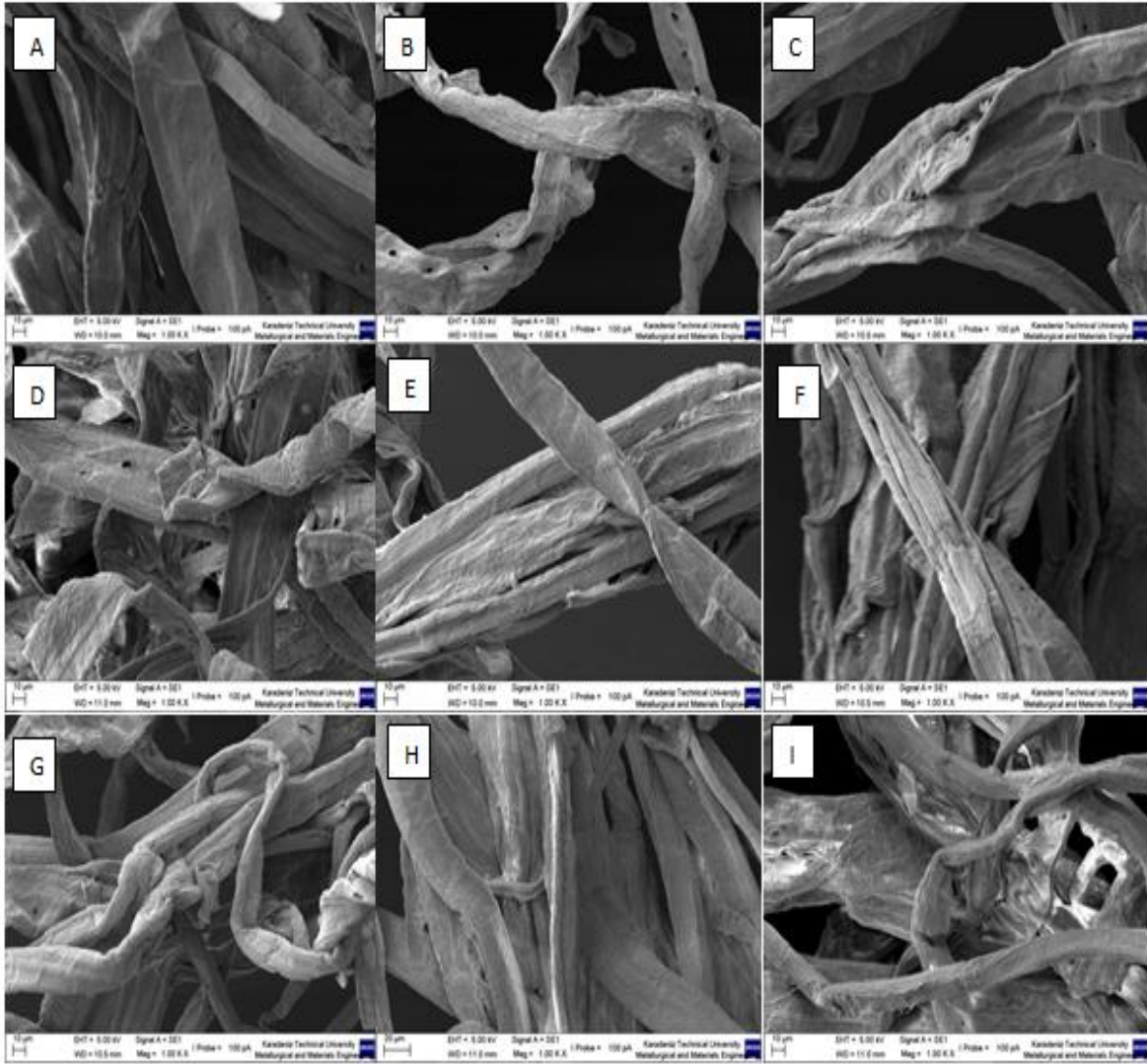
Tablo 30. Rekombinant enzimlerle muamele edilen atık kağıt hamurunun ağartma sonrası optik verileri

	ISO Parlaklık (%)	
	Enzimli XOQP	Kontrol OQP
KpnGST	56,89±0,21	54,32±0,17
BmgLac	56,77±0,12	53,21±0,16
RjoLip	58,74±0,16	52,15±0,15
KpnGST-RjoLip	59,23±0,13	52,11±0,13
KpnGST-BmgLac	61,16±0,14	54,92±0,15
RjoLip- BmgLac	62,23±0,18	54,45±0,19
KpnGST-RjoLip- BmgLac	64,67±0,21	53,89±0,21
Füzligninaz	63,56±0,12	53,85±0,15

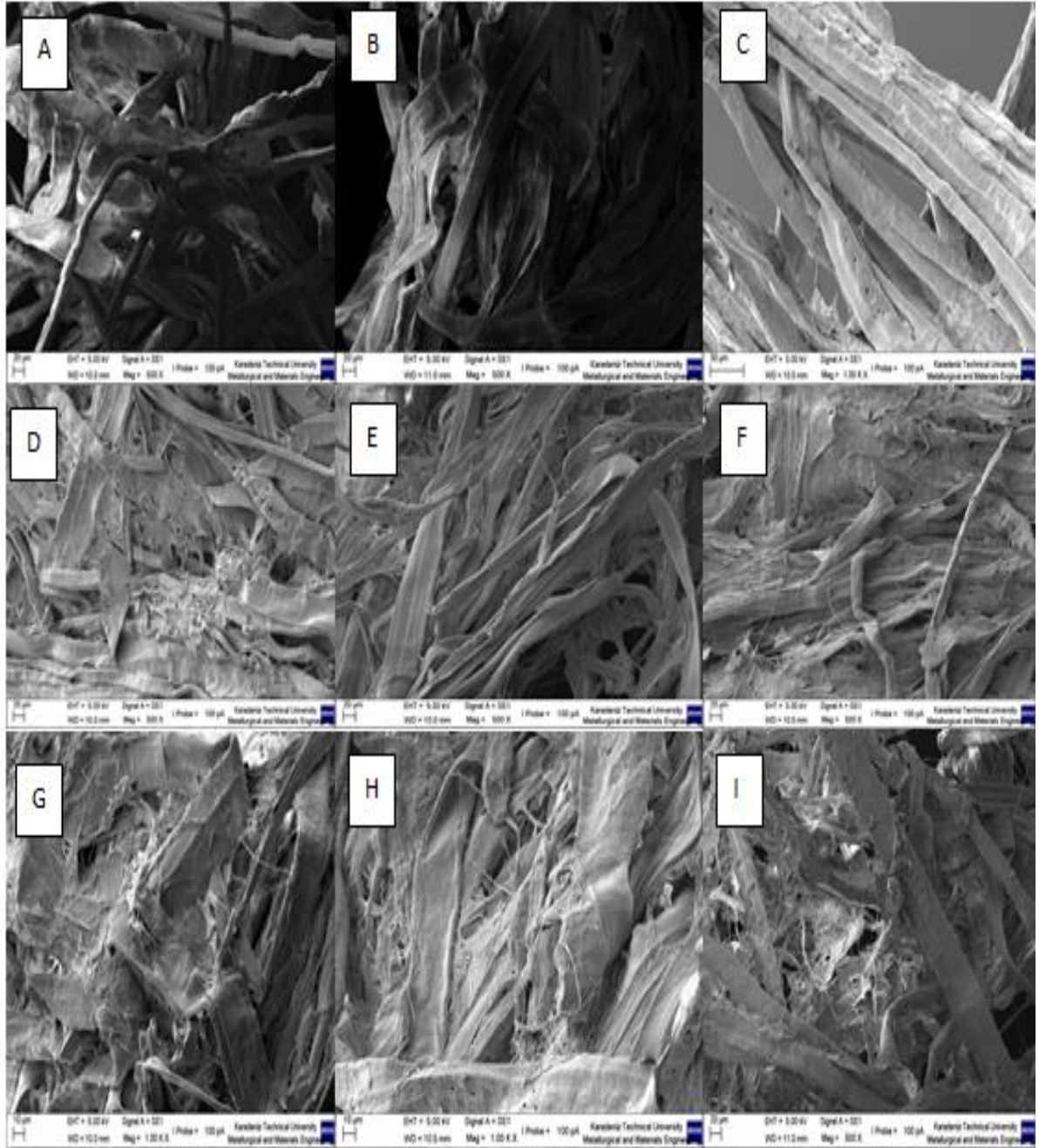
3.15. SEM Analizinin Değerlendirilmesi

Kızılcım kraft ve atık kağıt hamurları ile optimum koşullar altında yapılan enzimatik ağartma sonucu hamuların lif yapıları SEM mikroskobunda incelendi. Hamur liflerindeki değişimlerin karşılaştırılabilmesi için kontrol gruplarının da incelenmesi yapıldı. Elde edilen bulgularda her iki hamur türü için liflerin yapısında morfolojik değişimler meydana geldiği belirlendi.

Şekil 24 ve 25’de verilen Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntülerine bakıldığında her iki hamur türünde enzim muamelesi yapılmış liflerin boyutlarında daralma meydana geldiği ve bazı liflerde ise lignin difüzyonu nedeniyle oluşan delikler göze çarpmaktadır. Enzim uygulanan lifler incelendiğinde, kağıt hamur liflerinin enzim muamelesi ile yüzeylerinde pürüzlerin meydana geldiği ve bazı liflerde saçaklanmalar olduğu tespit edildi.



Şekil 24. Kızılçam kraft hamuru liflerinin SEM görüntüsü, A; Kontrol, B; KpnGST, C; BmgLac, D; RjoLip, E; KpnGST-BmgLac, F; KpnGST-RjoLip, G; RjoLip-BmgLac, H; Füzligninaz, I; KpnGST-RjoLip-BmgLac



Şekil 25. Atık kağıt hamuru liflerinin SEM görüntüsü, A; Kontrol, B; KpnGST, C; BmgLac, D; RjoLip, E; KpnGST-BmgLac, F; KpnGST-RjoLip, G; RjoLip-BmgLac, H; Füzligninaz, I; KpnGST-RjoLip-BmgLac

4. TARTIŞMA

Ligninolitik enzimler genel olarak lignin liyazlar olarak adlandırılırlar ve lignin degradesyonunda görev yaparlar. Ligninolitik enzimlerin kullanım alanlarına bakıldığında kağıt endüstrisinden kozmetik ve gıda alanına kadar bir çok sektörde kullanıldığı göze çarpmaktadır. Bakterilerin ligninolitik enzimlerinin araştırılması ve bunların kağıt endüstrisinde, polisiklik aromatik maddelerin biyoremediasyonunda, boyaların gideriminde ve sanayinin diğer alanlarında kullanılması ile ilgili günümüze kadar yapılan çalışma sayısı çok azdır. Bu tip çalışmalar genellikle mantarlar ile yapılmıştır ve yapılmaktadır. Yapılan alternatif çalışmalarda lignin degrades eden mikroorganizmalardan yararlanılmaya çalışılmaktadır. Mantarların lignini degrades edebilen bu türlü güçlü enzim sistemleri bulunmaktadır. Fakat mantarlar yüksek pH, sınırlı oksijen gibi ekstrem çevre ve substrat şartlarında yararlı olamamaktadır. Bu yüzden günümüzde adaptasyon yetenekleri güçlü olan bakteriler dikkat çekmeye başlamıştır ve bakterilerin lignin degrades eden sistemleri üzerindeki çalışmalarda artış olmuştur. Son zamanlarda çalışılan ligninolitik enzimlere bakıldığında bu enzimlerden üçü lignin peroksidaz (EC 1.11.1.14), lakkaz (EC 1.10.3.2) ve son yıllarda yapılan çalışmalarda öne çıkmaya başlayan glutatyon-S-transferazdır. Literatürler incelendiğinde bakteriyal kaynaklı bu tip enzimler üzerinde fazla miktarda çalışmanın olmadığı görülmekte olup bakteriyal kaynaklı bu tip enzimlerin klonlanması ile ilgili çalışmalar ise yok denecek kadar azdır.

Yapılan bu çalışmada, *Klebsiella pneumonia* ve *Bacillus megaterium* sırasıyla GST ve lakkaz kaynağı olarak kullanıldı. Yapılan literatür araştırmalarında, *Rhodococcus jostii*'nin lignin peroksidaza sahip olduğu, sahip olduğu genin mutasyon çalışmaları ile kesinlikle lignin peroksidaz olduğu belirlenmiş tek bir çalışmaya rastlanmıştır (Ahmad vd., 2011). Bu nedenle *Rhodococcus jostii* (Q0SE24) bakterisi DSMZ bakteri deposundan satın alınarak lignin peroksidaz kaynağı olarak kullanıldı. Ligninolitik genler mekik vektör olan pMA0911 vektörüne hem ayrı ayrı hem de operon düzeni ve füzyon oluşturacak şekilde klonlandı. Ligninolitik genlerin günümüze kadar çok çeşitli gen ifade sistemlerine klonlanması yapılmıştır. Bu gen ifade sistemleri dikkate alındığında daha çok *E. coli* ifade sisteminin kullanıldığı göze çarpmaktadır. Fakat bu ifade sistemi incelendiğinde bir indükleyici varlığında çalışmaları göze çarpmaktadır. Gen ifade sistemlerinin en önemli elementi promotordur. Rekombinant genlerin ifadesi (i) konstitütif, (ii) oto-indüklenebilen

ve (iii) indüklenebilen olmak üzere üç tip promotor geliştirilmiştir. Yukarıda da bahsedildiği gibi *E. coli* ifade sistemleri indüklenebilir promotorlar içermektedir. Oto-indüklenebilir ve konstitütif promotorlar ise herhangi bir indükleyiciye ihtiyaç duymazlar.

Rekombinant proteinlerin bakteriyel sistemlerde yüksek seviyede ifade edilmesi genellikle ifade edilen protein moleküllerinin inklüzyon cisimcikleri halinde hücre sitoplazmasında birikmesine neden olabilmektedir. Gen ifadesi sırasında, yüksek sıcaklık kullanımı, yüksek indükleyici konsantrasyonu ve güçlü promotor sistemleri altında ifade, genellikle arzu edilen proteinin yüksek translasyon oranıyla sonuçlanır. Bu durum, protein üretimi sırasında “bakteriyel protein kalite kontrol sistemini” sekteye uğratar ve sonuçta kısmen katlanmış ve yanlış katlanmış protein moleküllerinden oluşan inklüzyon cisimcikleri hücre içinde biriktirilir (Carrio ve Villaverde, 2005). Bu duruma ilaveten, gittikçe daralan bakteriyel sitoplazma ortamı, ökaryotik şaperonların ve post-translasyonel sistemin translasyon ürünlerinin katlamadaki eksikliği ya da yetersiz kalması da inklüzyon cisimciklerinin oluşumuna katkı sağlamaktadır (Singh vd., 2015).

Bu nedenle, bu çalışma çerçevesinde farklı gen ifade sistemleri denenerek ilgili proteinlerin *Bacillus* sisteminde (konstitütif promotora sahip pMA0911 mekik vektörü içeren) ifadesine karar verildi. Ayrıca yine gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus*'un tek bir membrana sahip olması bu sistemi, organik moleküllerin salınması için ideal bir aday haline getirmektedir.

Ligninolitik genlerin klonlanması ve *Bacillus* WB800 konak hücresinde protein ifadesinin ardından ligninolitik enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla protein aktivitesinin optimum pH'sı ve sıcaklığı, ısı ve pH kararlılığı belirlendi. Bunun yanında proteinin kısmi kinetik parametreleri de belirlenerek aynı işlemler füzyon proteini içindeki herbir enzim içinde tekrar edildi.

RjoLip aktivitesi pH 3,0 ve 9,0 arasında test edildi. RjoLip enziminin veratril alkolün substrat olarak kullanıldığı reaksiyonlarda en yüksek aktiviteyi gösterdiği pH 4,0 olarak belirlendi. Bazı durumlarda RjoLip optimum pH değerinin kullanılan substrata göre değişiklik gösterebileceği bilinmektedir. Literatüre bakıldığında bir mantar olan *Irpex lacteus*'dan elde edilen lignin peroksidaz enziminin optimum pH değerinin veratril alkol kullanıldığında pH 2,0 fakat 2,6-dimetoksifenol ve Reaktif Blue 19 kullanıldığında bu değer sırasıyla pH 3,0 ve pH 4,0 olarak değiştiği rapor edilmiştir (Salvachua 2013). *Rhodococcus jostii*'den elde edilen lignin peroksidazın ABTS için optimum pH değeri pH

5,0 olarak belirlenmiştir (Ahmad vd. 2011). *Thermobifida fusca*, *Pseudomonas putida* MET94, *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Bacillus subtilis*'dan elde edilen lignin peroksidaz enzimlerinin veratril alkol kullanılarak yapılan reaksiyonları sonucunda optimum pH değerleri sırasıyla pH 3,5, 5,0, 1,0 ve 3,0 olarak belirlenmiştir (van Bloois vd. 2010; Santos vd. 2014; Ghodake vd. 2009). RjoLip enziminin optimum sıcaklığı 35°C olarak belirlendi. Bakteriye lignin peroksidazlara bakıldığında birkaç istisna dışında (*Acinetobacter calcoaceticus* ve *Bacillus subtilis* için 50°C) optimum sıcaklık değerlerinin 25°C -35°C arasında olduğu belirtilmiştir (van Bloois vd. 2010; Santos vd. 2014; Ghodake vd. 2009; Kyoungseon vd. 2015).

RjoLip enziminin pH kararlılığını belirlemek amacıyla enzim pH'sı 3,0, 4,0 ve 5,0 olan sitrat tamponunda 35°C'de 90 dakika bekletildi ve süre sonunda hemen hemen bütün pH değerlerinde aktivitesinin %50'sini kaybettiği görüldü. Isıl kararlılığının belirlenmesi için ise enzim, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda enzimin 20 ve 30°C'de 2 saat sonra aktivitesinin neredeyse %75'ini koruduğu fakat diğer sıcaklıklarda %50'sini kaybettiği görüldü.

Rhodococcus jostii bakterisi lignin peroksidaz proteininin kısmi kinetik parametreleri incelendiğinde veratril alkol için K_m değerinin 3,5 mM olduğu belirlendi. Daha önce Ahmad vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada *Rhodococcus jostii* bakterisine ait lignin peroksidaz enziminin kraft lignin için K_m değeri 0,02 mM olarak belirlenmiştir. Fakat bu değer ihmal edilebilir bir değerdir çünkü kullanılan substrat heterojen bir yapıya sahiptir ve enzim ligninin bu yapısından dolayı tamamıyla değil sadece bir kısmıyla reaksiyona girebilmiştir.

BmgLac enzime pH'ın etkisi pH 3,0 ve pH 9,0 arasında test edildi. ABTS'nin substrat olarak kullanıldığı reaksiyonlarda söz konusu enzimin optimum pH'sı pH 4,5 olarak belirlendi. Literatürler incelendiğinde genellikle lakkaz enzimi, ABTS substratının kullanıldığı reaksiyonlarda, optimum aktiviteyi pH 4,0 civarında vermektedir (Koschorreck, 2008). Bu verilerden yola çıkarak elde edilen optimum pH değerinin literatürle uyumlu olduğu söylenebilir. BmgLac enzim aktivitesine sıcaklığın etkisine bakıldığında optimum sıcaklık değeri 60°C olarak belirlendi. Yapılan literatür çalışmalarına bakıldığında özellikle *Bacillus* cinsi bakterilerden elde edilen lakkaz enzimlerinin yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterdiği görülmektedir (Koschorreck, 2008). Bu çalışmalar incelendiğinde Martins vd. 2002 yılında *Bacillus subtilis*'den elde edilen

lakkaz enziminin çalışma sıcaklığını 75°C, Roberts vd. (2002) ise yaptıkları çalışmada yine bir başka *Bacillus* cinsinden elde edilen lakkaz enziminin çalışma sıcaklığını 55°C olarak belirtmişlerdir.

BmgLac enziminin pH kararlılığını belirlemek amacıyla enzim pH'sı 4,0- 4,5-5,0-5,5 ve 6,0 olan 50 mM sitrat tamponunda 60°C'de 150 dakika boyunca inkübe edildi. BmgLac enziminin optimum pH olan 4,5'e yakın olan pH değerlerinde kararlı olduğu görüldü. Bu pH değerlerinde enzim aktivitesinin 90 dakika sonunda yaklaşık %68 civarına düştüğü, diğer pH değerlerinde ise kararlı olmadığı tespit edildi. Isıl kararlılığa bakıldığında ise BmgLac enziminin 40°C ve 50°C gibi düşük sıcaklıklarda kararlı olduğu belirlendi. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 60°C'de ilk bir saat sonunda düşüş olduğu 150. dakikada ise enzim aktivitesinin %74 olduğu tespit edildi. 70°C ve 80°C'de ise enzim aktivitesinde önemli bir düşüş olduğu, 80°C'de 150 dakika sonunda enzim aktivitesinin %20 olduğu tespit edildi.

BmgLac enziminin kısmi kinetik parametrelerine bakıldığında ABTS substratı için K_m değeri 0,41 mM olarak belirlendi. Literatüre bakıldığında bu K_m değerinin yüksek olduğu göze çarpmaktadır. Önceki çalışmalar incelendiğinde *Bacillus subtilis*'den elde edilen lakkaz enziminin K_m değeri 0,124 mM, *Bacillus licheniformis*'den elde edilen lakkaz enziminin K_m değeri ise 0,065 mM olarak belirlenmiştir (Duraio vd.,2008).

Diğer bir ligninolitik enzim olan KpnGST enzime pH'ın etkisi pH 3,0 ve pH 9,0 arasında test edildi ve enzimin en yüksek aktiviteyi pH 6,0'da gösterdiği görüldü. Literatüre bakıldığında Shi vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada *Pseudoalteromonas* sp. bakterisinden elde edilen GST enziminin optimum pH değeri pH 7,0 olarak belirlenmiştir. Çalıştığı optimum pH bakımından *Klebsiella pneumonia* GST'nin literatürdeki diğer GST'lara benzediği görülmektedir. KpnGST enzime sıcaklığın etkisi incelendiğinde enzimin en iyi çalıştığı sıcaklığın 40°C olduğu belirlendi. *Pseudomonas* sp DJ77, *E.coli* JM83 ve *P. mirabilis* bakterilerine ait GST enziminin optimum sıcaklıkları sırasıyla 30°C, 35°C ve 50°C'dir (Jung vd. 1996, Arca vd. 1990, Federici vd. 2010).

KpnGST enziminin pH kararlılığını belirlemek amacıyla enzim, pH'sı 5,0 ve 6,0 olan 50 mM sitrat tamponunda; pH'sı 7,0 olan 50 mM fosfat tamponunda 40°C'de 90 dakika boyunca inkübe edildi. KpnGST enziminin pH 5,0'da kararlı olmadığı fakat pH 6,0 ve 7,0'da ilk 40 dakikada aktivitesinin yaklaşık %40'ını koruduğu, 90 dakika sonra ise aktivitenin %50'ye düştüğü belirlendi. *Pseudoalteromonas* sp. bakterisine ait GST

enziminin pH 5,0'da aktivitesinin %47'sini koruduğu *Pseudomonas* sp DJ77 bakterisine ait GST enziminin ise pH 6,0 ve 9,0 arasında kararlı olduğu belirtilmiştir. *Pseudoalteromonas* sp. bakterisine ait GST enziminin 40°C'de 40 dakika sonra aktivitesinin %50'sini kaybettiği *E. coli* B bakterisine ait GST enziminin ise 50°C'de hızla aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir (Jung vd. 1996, Arca vd. 1990, Federici vd. 2010). *Klebsiella pneumonia*'ya ait GST enziminin ısı kararlılığı incelendiğinde enzimin 20 ve 30°C'de kararlı olduğu, 40°C'de ise zamana bağlı olarak 90. dakikada aktivitesinin %50'sini kaybettiği görüldü. Bu verilere bakıldığında *Klebsiella pneumonia*'ya ait GST enziminin literatürdeki diğer bakteriyel GST'lara göre daha kararlı olduğu görülmektedir.

KpnGST enziminin kısmi kinetik parametreleri incelendiğinde CDNB substratı için K_m değeri 0,93 mM olarak belirlendi. *Pseudoalteromonas* sp bakterisine ait GST enziminin K_m değeri 0,22 mM olarak, *P. mirabilis* bakterisine ait GST enziminin K_m değeri 0,73 mM olarak, *Streptomyces griseus* bakterisine ait GST enziminin K_m değeri ise 1,26 mM olarak belirlenmiştir. Bu verilere bakıldığında yapılan bu çalışmada elde edilen K_m değerinin literatürle uyumlu bir değer olduğu görülmüştür.

Oluşturulan Füzligninaz proteini içinde yer alan her bir enzim için optimum pH, optimum sıcaklık, pH ve ısı kararlılık ve kısmi kinetik parametreler ayrı ayrı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, Füzligninaz proteinindeki enzimlerin optimum sıcaklık ve pH değerlerinde bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi. pH kararlılık verileri incelendiğinde RjoLip enziminin özellikle pH 3,0'daki kararlılığının, BmgLac enziminin ise pH 4,0 ve 6,0'daki kararlılığının azaldığı, KpnGST enziminin ise pH 6,0'daki kararlılığının arttığı, ısı kararlılıklarının ise tüm enzimler için azaldığı tespit edildi. Kısmi kinetik parametreler göz önüne alındığında ise Füzligninaz proteini içerisinde yer alan enzimlerin K_m değerlerinde artış olduğu belirlendi. Literatür çalışmaları incelendiğinde füzyon proteini oluşturulduktan sonra enzimlerin biyokimyasal verilerinde değişme olmayan başka çalışmalara da rastlanmaktadır. β -glukanaz geniyle ksilanaz geninin füzyon yapıldığı bir çalışmada glukanaz ve ksilanaz enzimlerin optimum sıcaklık ve pH değerlerinde önemli bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Buna karşın bu enzimlerin K_m değerlerinin arttığı katalitik aktivitelerinin ise azaldığı görülmüştür (Lu vd., 2006). Ksilanaz ve lakkaz genleriyle oluşturulan bir başka füzyon proteininde enzimlerin optimum pH değeri 0,5 birimden daha az bir değişiklik gösterirken optimum sıcaklık 5°C değişmiştir (Ribeiro vd., 2011). *Aspergillus niger*'in karbohidrat bağlanma modülü

Pycnopus cinnabarinus lakkazı ile füzyon yapılmış ve bu çalışma sonucunda enzimin optimum pH ve K_m değerlerinde hiçbir değişiklik olmazken ısı kararlılığının azaldığı belirtilmiştir (Ravalason vd., 2009). Yine bir başka çalışmada *Trichoderma reesei* HFBI'i ile *Melanocarpus albomyces* lakkazı füzyon yapılmış ve oluşturulan füzyon proteinin biyokimyasal ve kinetik parametreleri incelenmiştir (Kiiskien vd., 2004). Kiiskien vd. tarafından 2004 yılında yapılan bu çalışma sonunda rekombinant ve yaban tip lakkaz enziminin optimum pH, ısı kararlılık ve K_m değerlerinin benzer oldukları belirtilmiştir. Bu veriler ve bu çalışmada elde edilen füzyon proteininin özellikleri dikkate alındığında gerçekleştirilen bu çalışmada da benzer durumlarla karşılaşıldığı görülmektedir.

Biyokimyasal özellikleri tespit edilen enzimlerin kraft lignin degradesyon oranları Tablo 9'da verildiği gibidir. Bu oranlara göre enzimlerin üçlü kombinasyon şeklinde kullanımının en yüksek degradesyon oranını verdiği görülmektedir. Tabloda veriler değerler incelendiğinde enzimlerin ayrı ayrı oluşturdukları degradesyon oranının toplamının üçlü kombinasyonda oluşan degradesyon oranından fazla olduğu göze çarpmaktadır. Fakat lignin molekülünün yapısı ve enzimlerin etki ettikleri bağlar düşünüldüğünde bu oranın normal olduğu düşünülmektedir. Ligninin yapısına bakıldığında kimyasal olarak heterojen, fenilpropanoid ara birimlerinin değişik tipteki kovalent bağlanmalarını (aril-eter, aril-aril, karbon-karbon gibi) içeren optik olarak inaktif bir polimer olduğu görülmektedir (Brunow, 2001). Ligninin bu heterojen ve kompleks yapısı onun güçlükle degrades olmasına sebep olur. Lignin degrades eden enzimlere bakıldığında bunlardan lakkazın, ligninin yan gruplarındaki aromatik bileşikler okside edebildiği bilinmektedir. Lakkaz fenolik bileşikler okside edebilirken fenolik olmayan bileşikler okside edemez. Sadece lignin peroksidaz fenolik olmayan bileşikler direkt olarak okside edebilir (Wong, 2009, del Pilar Castillo vd., 1997). Lakkazın degrades ettiği bağlara bakıldığında karbon-karbon ve β -aril bağları bunların içindedir (Bourbonnais vd., 1995; Kawai vd., 1999). GST'in da β -aril bağlarını parçaladığı belirlenmiştir (DeAngelis vd., 2011). Yine lignin peroksidazın da β -aril bağlarını parçaladığı bilinmektedir (Umezawa ve Higuchi, 1987). Tüm bunlar göz önüne alındığında her üç enziminde keşiştiği noktaların olduğu ve aynı bağ üzerine etki ettikleri belli durumlar olduğu görülmektedir. Bu nedenle enzimlerin ayrı ayrı oluşturdukları degradesyon oranının toplamının üçlü kombinasyonda oluşan degradesyon oranından fazla oluşu, üç enzimin de

aynı bağ üzerine etki etmesinden kaynaklanmaktadır. Aynı şekilde rekombinant bakterilerin de kraft lignin degradasyon oranları tespit edilmiş fakat elde edilen veriler incelendiğinde direk enzim kullanımının daha efektif olduğu tespit edilmiştir. Rekombinant bakteriler tarafından kültür ortamına salınan enzimlerin çalışma şartlarının kültürasyon ortamıyla birebir uyuşmamasının bakterilerin direkt kullanımını kısıtladığı düşünülmektedir.

Enzimlerin biyokimyasal özellikleri incelendiğinde kağıt endüstrisinde kullanılabilir özellikte oldukları sonucuna varılmıştır. Kağıt endüstrisinde ligninin uzaklaştırılması en önemli problemlerden biridir. Kağıt endüstrisinde kraft kağıt hamuru üretilirken hamurda kalan lignin kraft kağıt hamurunun kahve rengine neden olmaktadır. Bu durum kağıt sanayisinde tercih edilen bir durum olmamakla birlikte bu güne kadar yapılan çalışmalar göstermiştir ki kalan ligninin uzaklaştırılmasında kullanılan klasik metotlar klor tabanlı kimyasalların kullanılmasına yöneliktir. Ancak bu kimyasallar toksik ve mutajenik kloroorganik bileşiklerin oluşmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle klor kullanımına alternatif olarak geliştirilen elementel kloruz ağartma anlamına gelen ECF yöntemi geliştirilmiştir (EPA, 2003). Bu yöntemle klorlu organik bileşiklerin oranı önemli ölçüde azaltılmış fakat tamamıyla bertaraf edilememiştir. Daha sonra TCF yöntemi adı verilen klor içeren herhangi bir ağartıcı kullanılmadan gerçekleştirilen ağartma tekniği geliştirilmiştir. Bu yöntemde oksijen, peroksit, ozon ve peroksi asitler gibi oksijen bazlı ağartıcılar kullanıldığı için atık su bileşiminde klorlu organiklerin oluşumu tümüyle bertaraf edilmektedir (EPA, 2003).

Bu çalışmada öncelikle kağıt hamuru ağartılmasında kullanılan kimyasal miktarını azaltmak ve çevreye duyarlı bir ağartma gerçekleştirmek amacıyla enzim uygulaması TCF yöntemi ile birlikte yapıldı. Yöntem daha önceki çalışmalar dikkate alınarak "XOQP" olarak belirlendi (Okan, 2010). Yapılan "XOQP" ağartması sonunda kızılçam kraft hamuru ve atık kağıt hamurlarından deneme kağıtları üretilerek bu kağıtların fiziksel ve optik özellikleri incelendi. Enzim uygulamasına geçilmeden önce oluşturulan rekombinant bakteriler kağıt hamurlarına direkt olarak uygulandı. Elde edilen veriler incelendiğinde KpnGST genini içeren rekombinant bakterinin optimum reaksiyon koşulları 40°C ve pH 4,0 olarak, BmgLac genini içeren rekombinant bakterinin optimum reaksiyon koşulları 50°C ve pH 6,0 olarak, RjoLip genini içeren rekombinant bakterinin optimum reaksiyon koşulları 40°C, pH 4,0 ve 4 mM veratril alkol olarak ve her üç enzimi operon düzeninde

içeren rekombinant bakterinin optimum reaksiyon koşullarının ise 40°C, pH 5,0 ve 4 mM veratril alkol olduğunu belirlendi. Tablo 12’de verilen rekombinant bakterilerle kağıt hamurlarının muamelesi sonrasında oluşan sonuçlara bakıldığında kappa numaralarında yaklaşık 1 birimlik bile değişim olmadığı tespit edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda kontrol grubu ve deney grubu arasında belirgin bir fark olmadığı belirlendiğinden rekombinant bakterilerin kağıt hamurunun kappa numarasını fazla etkilemediği sonucuna varılmıştır. Kağıt hamurlarının rekombinant bakterilerle muamelesi kültür ortamında yapılmaktadır. Bakteri kültür ortamının pH’sı metabolik atıklar nedeni ile değişmektedir (Besiyerinde değişik pH’lar kullanılmış fakat bakteri büyümesi sırasında pH nötrü doğru kaymıştır). Enzimler değişen bu pH ortamında düzgün olarak çalışmamaktadır. Halbuki kağıt hamurlarının enzimlerle direkt olarak muamelesi sırasında enzimlerin optimum olarak çalışabileceği ve pH’ı sabit tutacak tampon sistemleri kullanılmaktadır. Bu nedenle kağıt hamurlarının rekombinant bakterilerle direkt olarak muamelesi sonucu elde edilen veriler enzimlerle elde edilen veriler kadar etkili değildir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak kağıt hamurların ağartılmasına bakterilerle değil, saf enzimlerle devam edilmesine karar verildi. Literatürler incelendiğinde, kağıt hamurunda daha çok mantarların kullanıldığı direkt bakterilerin kullanıldığı çalışmaların ise nadir olduğu görülmektedir.

Adel ve El-Mougy (2007) yaptıkları çalışmada, baggase kağıt hamurlarını *Pseudomonas fluorescens* ve *Bacillus subtilis* bakterileri ile 10, 20 ve 40 gün muamele etmiş ve bu kağıtlarda parlaklık ve dayanıklılık özelliklerinde iyileşme tespit etmişlerdir. Sharma vd. (2015) ökaliptus hamurunu ksilanaz üreten *Bacillus halodurans* bakterisi ile muamele etmişler ve kappa numarasında belirgin bir düşüş tespit etmişlerdir. Bu çalışmalara, genel olarak bakıldığında bakterilerin kağıt hamurlarıyla muamele sürelerinin oldukça uzun olduğu ve kullanılan kağıt hamuru türünün ise kappa numarasının 16 civarında olduğu ve lignin içeriğinin çok düşük olduğu göze çarpmaktadır. Bakterilerle uzun süre muamele edilen hamurlarda görülen delignifikasyon derecesinin enzimlerle daha kısa sürede elde edildiği göz önünde bulundurulursa, enzim muamelesinin daha efektif olduğu düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmada, enzimlerin en aktif olarak ağartma yaptığı koşulların belirlenmesi için, kızılçam kraft hamuru ve atık kağıt hamuru ile optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Optimizasyon her bir enzimin optimum pH ve sıcaklık şartlarında, ikili ve üçlü kombinasyonlarda ise, enzimlerin birlikte en iyi çalışabileceği pH ve sıcaklık

şartlarında gerçekleştirildi. Günümüzde var olan ticarileşmiş enzimlerin kullanılabilirlikleri pH ve sıcaklık aralıklarına bakıldığı zaman; Cartazyme için pH 5 – 7 ve 45 – 55 °C; Irgazyme için pH 7 – 8 ve 50 – 60 °C; Ecopulp için pH 7 – 8 ve 50 °C, Pulpzyme için pH 6 – 8 ve 50 – 55 °C; Resinase için pH 7 ve 45 – 50 °C; Bleachzyme, Amano90 ve XylanaseGS35 için pH 4.5 – 7.0 ve 30 – 40 °C olduğu görülmektedir (Techapun vd., 2003). Bu değerlere bakıldığında bu çalışmada kullanılan ligninolitik enzimlerin ticari enzimlerle hemen hemen aynı şartları sağladığı görülmektedir.

Kızılçam hamuru için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda KpnGST enzimi için optimum şartların %5 hamur yoğunluğu ve 8 U/g enzim miktarı olduğu, BmgLac enzimi için optimum şartların % 5 hamur yoğunluğu, 6 U/g enzim miktarı ve 2 mM ABTS konsantrasyonu olduğu, RjoLip enzimi için optimum şartların %5 hamur yoğunluğu, 6 U/g enzim miktarı, 0,5 mM H₂O₂ konsantrasyonu ve 4 mM veratril alkol konsantrasyonu, Füzligninaz şeklinde oluşturulan protein için ise optimum şartların %5 hamur yoğunluğu, 8 U/g enzim miktarı, 0,1 mM H₂O₂ konsantrasyonu, 4 mM veratril alkol konsantrasyonu ve 2 mM ABTS konsantrasyonu olduğu belirlendi.

Atık kağıt için yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda ise KpnGST enzimi için optimum şartların %7 hamur yoğunluğu ve 6 U/g enzim miktarı olduğu, BmgLac enzimi için optimum şartların %7 hamur yoğunluğu, 6 U/g enzim miktarı ve 2 mM ABTS konsantrasyonu olduğu, RjoLip enzimi için optimum şartların %7 hamur yoğunluğu, 8 U/g enzim miktarı, 0,5 mM H₂O₂ konsantrasyonu ve 4 mM veratril alkol konsantrasyonu, Füzligninaz şeklinde oluşturulan protein için ise optimum şartların %7 hamur yoğunluğu, 8 U/g enzim miktarı, 0,1 mM H₂O₂ konsantrasyonu, 4 mM veratril alkol konsantrasyonu ve 2 mM ABTS konsantrasyonu olduğu belirlendi.

Bu sonuçlar incelendiğinde enzimlerin optimum çalışma şartlarının önemli bir değişiklik göstermediği tespit edildi. Atık kağıt hamuru uygulamasında hamur içeriğindeki lignin miktarının farklı olması sebebiyle kullanılan optimum hamur ve enzim konsantrasyonunun arttığı belirlendi. Lignin peroksidaz enzimi H₂O₂ bağımlı bir enzimdir ve katalizi başlatabilmek için bu maddeye gereksinim duyar. Yapılan optimizasyon deneylerinde bu enzimin en iyi 0,5 mM H₂O₂ konsantrasyonunda çalıştığı belirlenirken füzlyon proteini için bu konsantrasyonun 0,1 mM'a düştüğü belirlendi. Oluşturulan Füzligninaz proteininde lignin peroksidaz geni ortada olduğundan bu enzimin çalışma şartlarında değişiklik olabileceği beklenen bir sonuçtu. Lignin peroksidaz uygulamasındaki

bir diğerk önemli faktör veratril alkol miktarıdır. Veratril alkol fazla H₂O₂ konsantrasyonunda enzimi dengeleyerek substrat ve enzim arasındaki reaksiyonda yardımcı olarak görev yapar. Yapılan deneylerde optimum veratril alkol miktarı 4 mM olarak belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında lignin peroksidaz için kullanılan veratril alkol miktarının 2,5-4 mM arasında değıştiğı görölmektedir (Faison vd. 1986; Arbeola et al. 1992).

Lakkaz enziminin çalışma mekanizması incelendiğinde aktivitesinin artması için yardımcı olarak bilinen ve aracı olarak, adlandırılan birtakım küçük sentetik efektörelere ihtiyaç duyduğı belirlenmiştir (Bourbannis vd., 1995; Bourbannis vd., 1997; Call ve Mucke 1997). Bu çalışmada aracı sistem olarak 2 mM konsantrasyonunda ABTS, enzimin çalışması için optimum değer olarak belirlendi. Yapılan çalışmalar incelendiğinde lakkaz enziminin böylesi düşük konsantrasyonlardaki aracı sistemlerle çalıştığı görölmektedir. Bu aracı maddeler maliyeti arttırdığından, büyük ölçekli ağartmalar için dezavantaj oluşturmaktadırlar.

GST enzimi çalışmak için lignin peroksidaz ve lakkazın aksine herhangi bir aracı maddeye ihtiyaç duymaz. Bu nedenle bu enzimin optimizasyonunda sadece hamur ve enzim konsantrasyonu baz alınmıştır. Literatürler incelendiğinde GST enziminin lignin değredasyonunda görev aldığı belirlendiğı fakat herhangi bir kağıt ağartma çalışmasında kullanılmadığı görölmüştür. Bu nedenle, bu çalışmada GST enziminin kağıt ağartmasındaki potansiyeli belirlenerek endüstriyel kullanım kapasitesi tespit edilmiştir. Her bir enzim için belirlenen optimum şartlar tespit edildikten sonra kağıt hamurlarına ağartma dizini uygulanarak ardından fiziksel ve optik özellikleri tespit edildi. Ağartma dizini sonunda kullanılan enzim etkisinin sağlıklı bir şekilde belirlenebilmesi için ağartma basamaklarında enzimli ve enzimsiz olmak üzere çalışma 2 grup üzerinden sürdürüldü.

Kağıt hamurlarının ağartılmasında enzimlerin kullanımına yönelik literatürde pek çok çalışma mevcuttur. Literatürde yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, bu çalışmada kullanılan ligninolitik enzimlerin kraft kağıt hamurları üzerinde etkinliğinin yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan kızılçam, ülkemizde kraft yöntemine uygun olan, en yaygın ve en fazla yetişen ağaç türüdür fakat enzimatik ağartma uygulaması bakımından litaretürde sık rastlanmamakla birlikte lignin içeriğı yüksek, kappa numarası yüksek ve ağartılması zor olan kağıt hamuru türüdür. Atık kağıt hamuru ise geri dönüşüm açısından büyük bir pazar payı olan ve kızılçam kraft hamurlarına nazaran daha düşük

lignin içeriğine sahip ve kappa numarası daha düşük bir hamurdur. İki hamur arasındaki farklılıklar göz önüne alındığında bu çalışma sayesinde ligninolitik enzimlerin farklı hemiselüloz ve lignin içerikli hamurlarda da enzimatik olarak etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 23-Tablo 26).

Literatür çalışmalarına bakıldığında genellikle bu çalışmada kullanılan kızılçam kraft ve atık kağıt hamurlarına göre çok daha düşük lignin içeriği ve kappa numarasına sahip olan okalıptüs kraft hamurunun kullanıldığı göze çarpmaktadır. Arias vd. (2003) lakkaz enzimi kullanarak yaptıkları bir çalışmada enzimle muamele edilen okalıptüs kağıt hamurlarının kappa numaralarında 2,3 birimlik bir düşüş olduğunu rapor etmişlerdir. Antonopoulos vd. (2001) *Streptomyces albus* ATCC 3005'den elde ettikleri ksilanaz ve peroksidaz aktivitesi tespit ettikleri hücre dışı enzim solüsyonuyla muamele ettikleri okalıptüs kraft hamurunda 2,85 birimlik bir düşüş belirlemişlerdir. Carvalho vd. (1998) *P. cryosporium* mantarından elde ettikleri lignin peroksidaz enzimini 2-5 U/g arasında değişen konsantrasyonlarda okalıptüs hamuruna uygulamışlar ve bu çalışma sonucunda %48-70 arasında değişen delignifikasyon oranları elde etmişlerdir. Karışık kraft hamurunun (kappa numarası 16,2) kullanıldığı bir başka çalışmada bakteriyel kaynaklı ksilanaz, mannaz ve lakkaz enzimleri kombineli olarak kullanılmış ve kappa numarasında %40,7'lik bir düşüş belirlenmiştir (Woldesenbet vd., 2013).

Yapılan bu tez kapsamında üçlü enzim kombinasyonu ile muamele edilen kızılçam kraft hamurunun kappa numarasında %9 (3,9 birim) oranında bir düşüş meydana gelmiştir. Fakat kullanılan bu hamur türü, kappasının yüksek olması nedeniyle ağartılması zor bir hamur türüdür. Yukarıda bahsedilen çalışmalarda kullanılan hamurlar ise daha önce de belirtildiği üzere kappa numarası düşük ve ağartılması kolay olan hamurlardır. Ayrıca enzimlerin kağıt ağartılmasında kullanımların optimizasyonları yapıldıktan sonra tabii tutuldukları ağartma dizini sonrasında kappa numarasını düşürme kapasitelerinde bir artış meydana gelmiştir.

Daha önceki çalışmalar göz önüne alınarak TCF ağartma dizini aşamaları "XOQP" olarak belirlenmiştir. TCF ağartması sonucunda kızılçam kraft hamurlarının KpnGST, BmgLac ve RjoLip enzimleri için kontrol ile karşılaştırıldığında delignifikasyon derecesinin sırasıyla %63,9'dan %69,4'e, %63,7'den %69,1'e ve %63,9'dan %71,4'e yükseldiği belirlendi. Yine bir diğer hamur türü olan atık kağıt hamurlarının TCF ağartması sonucunda KpnGST, BmgLac ve RjoLip enzimleri için kontrol ile

karşılaştırıldığında delignifasyon derecesinin sırasıyla %60,4'den %65,63'e, %61,3'den %66,49'a ve %61,08'den %66,27'e yükseldiği belirlendi. Bu sonuçlar incelendiğinde delignifikasyon derecesi en yüksek olan enzimin beklenildiği gibi RjoLip olduğu tespit edildi. Çünkü lignin peroksidaz enzimi lakkaz ve GST'in aksine lignini sadece yan gruplardan değil ana omurgadan da parçalamaktadır. Yapılan ağartma sonunda BmgLac enziminin KpnGST enzimine göre delignifikasyon derecesinin daha yüksek olacağı beklenilmekteydi fakat sonuçlar incelendiğinde hemen hemen aynı oranda delignifikasyon derecesine sahip oldukları görüldü. Bu da KpnGST enziminin kağıt ağartmasında iyi bir potansiyelinin olduğunu ve lakkazın aksine aracı sistem ihtiyacı olmadığından daha düşük maliyetle ağartma yaptığını göstermektedir ve bu özelliğiyle lakkaza göre avantaja sahiptir. Literatürler incelendiğinde GST enziminin delignifikasyon özelliği veriliyor olmasına rağmen herhangi bir kağıt ağartma prosedüründe bununla ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışma ile bu enzimin hem bu aktivitesi ortaya çıkarılmış hemde kağıt ağartmada etkisinin lakkaz enzimi ile yarışabilecek seviyede olduğu tespit edilmiştir.

Enzimlerin tekli ağartma dizinlerinden sonra KpnGST ve BmgLac'ın RjoLip'e yardımcı olarak kullanılacağı ikili ve üçlü ağartma kombinasyonlarıyla birlikte oluşturulan füzyon proteininin ağartma dizini yapılmıştır. Literatür çalışmaları incelendiğinde pek çok enziminin ikili kombinasyonlar şeklinde kağıt hamurlarına uygulandığı görülmektedir. Bunların başında özellikle ksilanaz ve lakkaz enzimleri gelmektedir. Fakat lakkaz, lignin peroksidaz ve GST kombinasyonlarıyla ilgili bir çalışmaya rastlanmadığından yapılan bu çalışmanın literatüre önemli bir katkı yapacağı düşünülmektedir. İkili ve üçlü enzim kombinasyonlarında yardımcı olarak uygulanan KpnGST ve BmgLac enzimlerinin kağıt liflerinde bulunan ligninin yan gruplarını uzaklaştırarak lignin peroksidaz için substrat yüzeyini genişleterek çalışmasını kolaylaştıracağı düşünülmüştür.

Kızılçam kraft hamuruna uygulanan TCF ağartma dizini sonunda delignifikasyon derecesi Füzligninaz proteininde %68,11'den %76,62'ye, KpnGST-RjoLip-BmgLac (üçlü enzim kombinasyonunda) %69,75'den %79,18'e, KpnGST-BmgLac kombinasyonunda %65,77'den %72,27'ye, KpnGST-RjoLip kombinasyonunda %64,53'den %72,94'e ve RjoLip-BmgLac kombinasyonunda %66,29'dan %74,76'ya yükseldiği tespit edildi. Bu sonuçlar karşılaştırıldığında en yüksek delignifikasyon oranının üçlü enzim kombinasyonunda olduğu görülmektedir. İkili enzim kombinasyonlarının hepsi tekli enzim ağartmasından daha yüksek delignifikasyon derecesine sahiptir. Bunlar arasında en iyi

delignifikasyon derecesi RjoLip-BmgLac kombinasyonudur. En az delignifikasyon kombinasyonu ise KpnGST-BmgLac kombinasyonudur. Daha öncede belirtildiği üzere en yüksek delignifikasyon yapan enzim lignin peroksidaz olduğundan bu enzimle yapılan ikili kombinasyonlar daha yüksek delignifikasyon derecesine sahiptir.

Atık kağıt hamuruna yapılan TCF ağartma dizini sonunda delignifikasyon derecesi Füzligninaz proteininde %61,88'den %73,69'a, KpnGST-RjoLip-BmgLac (üçlü enzim kombinasyonunda) %60,89'dan %74,65'e, GST-Lakkaz kombinasyonunda %62,30'dan %70,3'e, KpnGST-RjoLip kombinasyonunda %60,12'den %69,43'e ve RjoLip-BmgLac kombinasyonunda %60,20'den %70,55'e yükseldiği tespit edildi. Bu sonuçlar karşılaştırıldığında enzimlerin özellikle birlikte kullanımlarının atık kağıt hamurundaki delignifikasyon derecesini yükseltmede daha etkili oldukları tespit edildi. Bunun, atık kağıt hamurundaki lignin miktarının düşük olması sebebiyle enzimlerin daha kolay degradasyon yapmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ligninolitik enzimlerle muamele edilen kızılçam kraft hamurlarından elde edilen kağıtların ISO parlaklık değerlerinde KpnGST, BmgLac, RjoLip, KpnGST-RjoLip, KpnGST-BmgLac, RjoLip-BmgLac, Füzligninaz ve KpnGST-RjoLip-BmgLac (üçlü enzim kombinasyonu) için sırasıyla % 4,41, %10, %15,4, %17,09, %17,8, %18,5, %20,21 ve %22, atık kağıt hamurlarından elde edilen kağıtların ISO parlaklık değerlerinde ise KpnGST, BmgLac, RjoLip, KpnGST-RjoLip, KpnGST-BmgLac, RjoLip-BmgLac, Füzligninaz ve KpnGST-RjoLip-BmgLac (üçlü enzim kombinasyonu) için sırasıyla %4,5, %6,2, %11,2, %12, %10,2, %12,5, %15,2 ve %16,66 oranında artış meydana geldiği belirlendi. Bu verilere bakıldığında parlaklık oranındaki en fazla artışın her iki kağıt hamur türü içinde üçlü enzim kombinasyonunda olduğu görülmektedir. Kağıtlarda parlaklık oranındaki artış delignifikasyon oranıyla orantılıdır. Önceki sonuçlar da göz önüne alındığında en fazla delignifikasyon oranı üçlü enzim kombinasyonunda belirlendiğinden parlaklık artışının da beklenildiği gibi bu değerlere orantılı olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre enzimlerle muamele edilen ağartma dizini kontrol ile karşılaştırıldığında kızılçam kraft ve atık kağıt hamurlarının son kappa değerlerinde düşüş belirlenmesiyle birlikte tek bir istisna hariç kalan bütün kağıt parlaklıklarında da orantılı olarak iyileşme meydana geldiği görüldü. Kızılçam kraft hamuruyla KpnGST ve BmgLac enzimleri kullanılarak yapılan ağartma sonrası her iki enziminin de eşit derecede delignifikasyon derecesine sahip olduğu belirlenmesine rağmen lakkaz enzimi kullanılan

kağıt hamurunda parlaklık artışı daha fazla olmuştur. Diğer veriler incelendiğinde en fazla parlaklık artışının üçlü enzim kombinasyonunda olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan ağartma dizinlerinde kimyasalı en az düzeyde kullanarak kappa numarası düşürülürken aynı zamanda parlaklığı arttırmak tercih edilen bir durumdur. Yapılan literatür çalışmalarına bakıldığı zaman; *Streptomyces thermoviolaceus* bakterisinden elde edilen ksilanaz enzimiyle muamele edilen kraft kağıt parlaklığında %6,9 artış meydana gelmiştir (Garg vd., 1998). Başka bir çalışmada *Bacillus* sp. NCIM 59 bakterisinden elde edilen ksilanaz enzimi kullanılarak şeker kamışından elde edilen kraft kağıt parlaklığında %2,5 artış meydana gelmiştir (Kulkarni ve Rao, 1996). *T. versicolor* mantarından elde edilen lakkaz enzimi kullanılarak yapılan bir çalışmada parlaklığın %24 oranında arttığı görülmüştür (Camarero, 2003). *Bacillus tequilensis* SN4 bakterisinden elde edilen lakkazın kraft kağıt parlaklığını %7,6 oranında arttırdığı aracı sistem kullanılarak bu değer en fazla %12'ye çıkarılabildiği rapor edilmiştir (Sondhi, 2014). *Phanerochaete chrysosporium* mantarından elde edilen lignin peroksidaz enzimiyle yapılan bir ağartma dizini sonucunda hamur parlaklığının %73 oranında arttığı bildirilmiştir (Carvalho, 1998). Fakat bu çalışmada kullanılan kağıt hamuru çok düşük bir lignin içeriğine sahiptir ve ağartma dizininde kağıt parlaklığını arttıran ama bunun yanında da çevre kirletici bir ajan olan klor kullanılmıştır. İkili enzim kombinasyonu olarak ksilanaz ve mangan peroksidazın birlikte kullanıldığı bir ağartma dizini sonrasında kraft hamur parlaklığının yaklaşık %54 oranında artış gösterdiği bildirilmiştir (Bermek, 2000). Fakat bu çalışmada da enzimler kağıt hamurlarıyla 24 saat muamele edilmiştir. Saleem vd. (2018) yaptıkları bir çalışmada kağıt hamurunun ağartılmasında ksilanaz, lakkaz ve mangan peroksidaz enzimlerini ardışık olarak kullanmışlar ve parlaklık değerinde %29'luk bir artış belirlemişlerdir. Söz konusu çalışmada kullanılan kağıt hamuru buğday sapından elde edildiği için ağartılmasının nispeten daha kolay olması ve düşük lignin içeriğine sahip olması göz önüne alındığında şu an ki çalışmada kullanılan enzimlerin ağartmada daha etkin oldukları düşünülebilir. Comlekcioglu vd., (2014) tarafından yapılan çalışmada, TCF ağartması sonucunda, kızılçam kraft hamuru için son parlaklık değeri %54,77 olarak elde edilirken yapılan bu tez kapsamında son parlaklık değeri üçlü enzim kombinasyonu sonucu %66,45 olarak belirlenmiştir.

Fiziksel özelliklere ait bulgulara bakıldığında kızılçam kraft ve atık kağıt hamurlarının ligninolitik enzimlerle muamelesi sonucunda patlama indisi, yırtılma indisi,

kopma uzunluğu ve çekme indisi gibi direnç özelliklerinde önemli derece bir değişim olmadığı belirlendi. Litaretürde enzimlerle muamelesi sonucunda fiziksel özelliklerde değişim olmayan çalışmalar mevcuttur (Kim ve Paik., 2000; Saleem vd., 2009; Bissoon vd., 2002; Comlekcioglu vd., 2014). Bunun yanında fiziksel özellikleri iyileştiren enzim çalışmalarında bulunmaktadır (Sharma,2014). Yapılan çalışmalar incelendiğinde enzim uygulamalarında kappa numarasındaki düşüşle parlaklık değerlerindeki artışın daha çok dikkate alındığı ve kayda değer olduğu görüldüğünden, bu çalışmada fiziksel özelliklerdeki belirgin olmayan değişiklikler göz ardı edilmiştir.

Kağıt hamurları ile yapılan enzimatik çalışmalarda enzim, hamur lifleri üzerine etki etmektedir. Liflerde meydana gelen morfolojik değişimleri belirlemek için taramalı elektron mikroskobu kullanılarak inceleme yapılmaktadır (Paice vd., 1995; Wang vd., 1997; Roncero vd., 2000; 2003; 2005; Nagar vd., 2012). Enzim muamelesinden kaynaklanan bu değişimler, çatlaklar, pul, delik ve ipliklenme gibi morfolojik bozulmalardır. Aynı zamanda enzimler hamur liflerinin hücre duvarlarında gözenekler açmaktadır. Bu gözenek ve çatlaklar, büyük lignin makromoleküllerinin difüzyonundan oluşmaktadır (Roncero vd., 2000a; Paice vd., 1995; Wang vd., 1995). Lignin parçalarının bu şekilde dışa doğru hareketi hamurlara ağartıcı kimyasalların erişebilirliğini artırmaktadır (Roncero, 2005).

Bu çalışma kapsamında yapılan enzim muamelesinden sonra elde edilen hamur lifleri SEM ile incelenmiştir. Kızılçam kraft ve atık kağıt hamurları kontrol hamur örnekleri ile karşılaştırıldığında enzim muamelesi yapılmış olan hamurların morfolojilerinde değişimler meydana geldiği görüldü. Hamur liflerinde fibrillenme, bazı bölgelerde porların meydana gelmesi, gevşek dizilmeler gibi oluşan morfolojik değişimler ligninin uzaklaştırıldığı yerlerde görülmektedir. Yapılan bu çalışma ile belirlenen SEM bulgularına göre enzim ile hamurların muamele edilmesi sonucu enzimin hamurda lignini uzaklaştırmaya yönelik bir etki gösterdiği belirlendi.

Yapılan bu çalışma ile birlikte ligninolitik enzimler olan KpnGST, BmgLac ve RjoLip hem tekli hem de ikili ve üçlü kombinasyonlar ve füzyon formunda kağıt hamuru ağartmada etkili bir biçimde kullanılabileceği belirlenmiştir. Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinin çevreyi büyük ölçüde kirlettiği göz önüne alındığında kimyasallar yerine enzimlerle çevre dostu ağartma teknolojilerinin geliştirilmesinin oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Yukarıda da bahsedildiği gibi bu tez kapsamında elde edilen veriler

ışığında söz konusu enzimlerin çevre dostu biyolojik ağartma sistemlerinde etkin olarak kullanılabilceği belirlenmiştir.



5. SONUÇLAR

“Bakteriyel Kaynaklı Ligninolitik Üç Enzimin Eş Zamanlı veya Füzyon Olarak Üretimi ve Kağıt Hamurunun Ağartılmasında Kullanımlarının Optimizasyonu” başlıklı bu çalışmadan şu sonuçlar elde edilmiştir.

1. Ligninolitik üç enzim olan KpnGST, BmgLac ve RjoLip genleri ayrı ayrı, füzyon ve operon düzeni oluşturacak şekilde klonlanmış ve ifade edilerek kısmi karakterizasyonları yapılmış ve enzimler tek tek, ikili ve üçlü kombinasyonlar şeklinde iki farklı kağıt hamuruna uygulanarak ağartma dizini yapılmıştır. Ağartma dizini yapılan kağıtların fiziksel ve optik özellikleri belirlenerek karşılaştırma yapılmıştır.
2. Yapılan kısmi karakterizasyon çalışmaları sonrasında RjoLip enzimin optimum pH'sı 4, KpnGST enziminin optimum pH'sı 6 ve BmgLac enziminin optimum pH'sı ise 4,5 olarak belirlenmiştir. Yapılan reaksiyon serilerinde enzimlerin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri RjoLip, KpnGST ve BmgLac için sırasıyla 35°C, 40°C ve 60°C olarak belirlenmiştir. Oluşturulan Füzligninaz proteininde ise enzimlerin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin değişmediği tespit edilmiştir.
3. RjoLip enziminin pH 3,0-4,0 ve 5,0'da kararlı olduğu fakat en kararlı olduğu pH'ın pH 4,0 olduğu belirlenmiştir. BmgLac enziminin optimum pH olan 4,5'e yakın olan pH değerlerinde kararlı olduğu belirlenmiştir. KpnGST enziminin pH 5,0'da kararlı olmadığı, pH 6,0 ve 7,0'de kısmen daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. Oluşturulan Füzligninaz proteininde enzimlerin kararlılıklarının nispeten azaldığı belirlenmiştir.
4. RjoLip enziminin ısı kararlılık grafiğine bakıldığında 20 ve 30°C'de 2 saat boyunca aktivitesinin yaklaşık %80'ini koruduğu, BmgLac enziminin ısı kararlılık grafiğine bakıldığında enzimin 40°C, 50°C'de kararlı olduğu ve KpnGST enziminin ısı kararlılık grafiğine bakıldığında ise enzimin 20 ve 30°C'de kararlı olduğu, 40°C'de ise zamana bağlı olarak kararlılığın azaldığı belirlenirken Füzligninaz şeklinde oluşturulan proteinde yer alan enzimlerin ısı kararlılıklarında düşüş olduğu belirlenmiştir.
5. Ligninolitik enzimlerden KpnGST, RjoLip ve BmgLac enzimlerinin kısmi kinetik verileri sırasıyla CDNB, veratril alkol ve ABTS substratlarının değişik

konsantrasyonları ile gerçekleştirilen reaksiyonlar ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, KpnGST enziminin K_m değeri $0,93 \pm 0,23$ mM, RjoLip enziminin K_m değeri $3,5 \pm 0,18$ mM ve BmgLac enziminin K_m değeri ise $0,41 \pm 0,16$ mM olarak belirlenmiştir. Füzligninaz proteini ile yapılan kısmi kinetik çalışmalar sonucunda ise KpnGST enziminin K_m değeri $1,01 \pm 0,26$ mM, RjoLip enziminin K_m değeri $3,95 \pm 0,22$ mM ve BmgLac enziminin K_m değeri ise $0,58 \pm 0,19$ olarak belirlenmiştir.

6. Biyokimyasal özellikleri belirlenen enzimler kağıt hamurlarına uygulanarak çalışma şartları optimize edilmiştir. Kızılçam kraft hamuruna uygulanan enzimlerden KpnGST enzimi için optimum şartların %5 hamur yoğunluğu ve 8 U/g enzim miktarı olduğu, BmgLac enzimi için optimum şartların % 5 hamur yoğunluğu, 6 U/g enzim miktarı ve 2 mM ABTS konsantrasyonu olduğu RjoLip enzimi için optimum şartların %5 hamur yoğunluğu, 6 U/g enzim miktarı, 0,5 mM H_2O_2 konsantrasyonu ve 4 mM veratril alkol konsantrasyonu, Füzligninaz şeklinde oluşturulan protein için ise optimum şartların %5 hamur yoğunluğu, 8 U/g enzim miktarı, 0,1 mM H_2O_2 konsantrasyonu, 4 mM veratril alkol konsantrasyonu ve 2 mM ABTS konsantrasyonu olduğu belirlenmiştir. Atık kağıt hamuruna uygulanan enzimlerden KpnGST enzimi için optimum şartların %7 hamur yoğunluğu ve 6 U/g enzim miktarı olduğu, BmgLac enzimi için optimum şartların % 7 hamur yoğunluğu, 6U/g enzim miktarı ve 2 mM ABTS konsantrasyonu olduğu RjoLip enzimi için optimum şartların %7 hamur yoğunluğu, 8 U/g enzim miktarı, 0,5 mM H_2O_2 konsantrasyonu ve 4 mM veratril alkol konsantrasyonu, Füzligninaz şeklinde oluşturulan protein için ise optimum şartların %7 hamur yoğunluğu, 8 U/g enzim miktarı, 0,1 mM H_2O_2 konsantrasyonu, 4 mM veratril alkol konsantrasyonu ve 2 mM ABTS konsantrasyonu olduğu belirlenmiştir.
7. Kağıt hamurlarına uygulanacak olan optimum şartlar belirlendikten sonra enzimlerin tekli, ikili ve üçlü ağartma kademeleri yapılmıştır. İkili ve üçlü kombinasyonlarda her enzim için çalıştığı optimum değer baz alınmıştır.
8. Kızılçam kraft hamuruna uygulanan TCF ağartma dizini sonunda delignifikasyon derecesi Füzligninaz proteininde %68,11'den %76,62'ye, üçlü enzim kombinasyonunda %69,75'den %79,18'e, KpnGST-BmgLac kombinasyonunda %65,77'den % 72,27'ye, KpnGST-RjoLip kombinasyonunda %64,53'den %72,94'e ve RjoLip - BmgLac kombinasyonunda %66,29'dan %74,76'ya

yükseldiği tespit edilmiştir. Atık kağıt hamuruna yapılan TCF ağartma dizini sonunda delignifikasyon derecesi Füzligninaz proteininde %61,88'den %73,69'a, üçlü enzim kombinasyonunda %60,89'dan %74,65'e, KpnGST-BmgLac kombinasyonunda %62,30'dan %70,3'e, KpnGST-RjoLip kombinasyonunda %60,12'den %69,43'e ve RjoLip - BmgLac kombinasyonunda %60,20'den %70,55'e yükseldiği tespit edilmiştir.

9. Ligninolitik enzimlerle muamele edilen kızılçam kraft hamurlarından elde edilen kağıtların ISO parlaklık değerlerinde KpnGST, BmgLac, RjoLip, KpnGST - RjoLip, KpnGST-BmgLac, RjoLip-BmgLac, Füzligninaz ve üçlü enzim kombinasyonu için sırasıyla %4,41, %10, %15,4, %17,09, %17,8, %18,5, %20,21 ve %22, atık kağıt hamurlarından elde edilen kağıtların ISO parlaklık değerlerinde ise KpnGST, BmgLac, RjoLip, KpnGST-RjoLip, KpnGST-BmgLac, RjoLip-BmgLac, Füzligninaz ve üçlü enzim kombinasyonu için sırasıyla %4,5, %6,2, %11,2, %12, %10,2, %12,5, %15,2 ve %16,66 oranında artış meydana geldiği belirlenmiştir.
10. Ağartma dizini uygulanan kağıt hamuru lifleri SEM ile görüntülenmiştir. Elektron mikroskobu taraması (SEM) görüntüleri incelendiğinde her iki hamur türünde enzim muamelesi yapılmış liflerin boyutlarında daralma meydana geldiği ve bazı liflerde ise lignin difüzyonu nedeniyle oluşan delikler görülmüştür. Enzim uygulanan lifler incelendiğinde, kağıt hamur liflerinin enzim muamelesi ile yüzeylerinde pürüzlerin meydana geldiği ve bazı liflerde saçaklanmalar olduğu görülmüştür.

6.ÖNERİLER

1. Ligninolitik enzimlerin birlikte daha iyi çalışabilmeleri için üç enzimin üzerinde mutasyon yapılarak enzimlerin çalışma şartları iyileştirilebilir.
2. Füzyon şeklinde oluşturulan gen ifadesi seviyesini ve aktivitesini arttıracak kuyruklar eklenebilir.
3. Enzimlerin özellikleri iyileştirildikten sonra patentleri alınarak ticarileştirilebilir.
4. Enzimlerin kağıt endüstrisinde kullanım kapasitelerinin tam olarak belirlenebilmesi için bir kağıt fabrikasında küçük ölçekli pilot bir çalışma yapılabilir.
5. Operon sistemi ile eş zamanlı olarak üretilen enzimler ökaliptus gibi lignin içeriği daha düşük olan kağıt hamurlarında optimize edilerek farklı kağıt hamurlarındaki ağartma etkinlikleri daha geniş ölçekli olarak belirlenebilir.
6. Optimum karakterleri aynı veya yakın üç enzim operon düzeninde klonlanıp etkisi incelenebilir.
7. Enzimlerin hamur viskozitesi üzerindeki etkileri incelenmelidir.

7. KAYNAKLAR

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A. ve Gübitz, G. M., 2000. Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*, Applied and Environmental Microbiology, 66, 3357-3362.
- Abraham, W.R., Nogales, B., Golyshin, P. N., Pieper, D. H. ve Timmis, K.N., 2002. Polychlorinated-Biphenyl-Degrading Microbial Communities in Soils and Sediments, Current Opinion in Microbiology, 5, 246-253.
- Abbot, J. ve Hobbs, G.C., 1991. Peroxide Bleaching Under Acidic and Alkaline Conditions: The Role of Transition Metal Ions, Wood Pulping Chem, 6, 579-586.
- Abd-Elsalam, H.A. ve El-Hanafy, A.A., 2009. Lignin biodegradation with ligninolytic bacterial strain and comparison of *Bacillus subtilis* and *Bacillus* sp. isolated from Egyptian soil, American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science, 5,1, 39-44.
- Abrantes, S., Amaral, E., Costa, A. P., Shatalov, A.A. ve Duarte, A. P., 2007. Hydrogen Peroxide Bleaching of *Arundo donax* L. Kraft-Anthraquinone Pulp-Effect of a Chelating Stage, Industrial Crops and Products, 25, 288-293.
- Achnine, L., Blancaflor, E. B., Rasmussen, S. ve Dixon, R. A., 2004. Colocalization of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase and Cinnamate 4-Hydroxylase For Metabolic Channeling in Phenylpropanoid Biosynthesis, Plant Cell, 16, 3098-3109.
- Adel, A.M. ve El-Mougy, N.S., 2007. Effects of a bacterial treatment on the brightness and strength properties of kraft bagasse pulp, Quarterly Journal of Indian Pulp and Paper Technical Association, 19, 81-84.
- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry; Production and Applications, Sayfa 484, Wiley-Vch Verlag GwbH & Co. KgaA, Weinheim, Netherlands.
- Ahmad, M., 2011. Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase, Biochemistry, 50, 5096-5107.
- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M. ve Di Ilio, C., 2009. Glutathione transferases in bacteria, FEBS Journal, 276, 58-75.
- Anderson, J.R., 1992. Hydrogen Peroxide Use in Chemical Pulp Bleaching. In Tappi Bleach Plant Operations Short Course Notes, Tappi Press, Atlanta.
- Anderson, J.R. Amini, B., 1996. Hydrogen Peroxide Bleaching. Editorler: Dence, C.W. ve Reeve, D. W., Sayfa 411, Pulp Bleaching Principles and Practice, Tappi Press, Atlanta.

- Anonim-1, 2009. Selüloz ve Kağıt Sanayii Vakfı (SKSV), Türkiye Kağıt-Karton Sanayininin 2008 yılı Yıllık Raporu.
- Antonopoulus, V.T., Hernandez, M., Arias, M.E., Mavkaros, E. ve Ball, A.S., 2001. The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp, Applied Microbiology and Biotechnology, 57, 92-97.
- Andrews, D.H. ve Singh, R.P., 1979. The Bleaching of Pulp, Tappi Press, Atlanta.
- Arca, P., Garcia, P., Hardisson, C. ve Suarez, J.E., 1990. Purification and study of a bacterial glutathione S-transferase, FEBS Letters, 263, 77-79.
- Arbeloa, M., 1992. An evaluation of the potential of lignin peroxidases to improve pulps, Tappi Journal, 75, 215-221.
- Archibald, F. S., Bourbannis, R., Jurasek, L., Paice, M. G. ve Reid, I. D., 1997. Kraft Pulp Bleaching and Delignification by *Trametes vesicolor*, Journal of Biotechnology, 53, 215-236.
- Argyropoulos D.S. ve Menachem S.B., 1997. Lignin, Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 57, 127-158.
- Arias, E., Arenas, M. ve Rodrigez, J., 2003. Kraft Pulp Biobleaching and Mediated Oxidation of a Nonphenolic Substrate by Laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, Applied and Environmental Microbiology, 69, 1953-1958.
- Armstrong, R.N., 2000. Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily, Biochemistry, 39, 13625–13632.
- Atchinson, J.E., 1993. World Wide Capacities for Non-Wood Plant Fiber Pulping-Increasing Faster than Wood Pulping Capacities, Nonwood Plant Fiber, Progress Report No. 19, TAPPI.
- Atchinson, J.E., Data on Non-Wood Plant Fibers In: Pulp and Paper Manufacture, Editör: Kocurek M.J., Stevens C.F.B. CPPA., Sayfa 157-169, Montreal, Canada, 1997.
- Backman, L. ve Gellerstedt, G., 1993. Reactions of Kraft Pulp with Alkaline Hydrogen Peroxide, Proceedings of the 7th International Symposium Wood and Pulping Chemistry, Mayıs, Çin, Bildiriler Kitabı 1: 223.
- Bajpai, P., 2006. Environmentally Benign Approaches for Pulp Bleaching, 1. Basım, Elsevier, Amsterdam.
- Bajpai, P., 2012. Brief Description of the Pulp and Paper Making Process, Springer Science Business Media, Berlin.

- Bakır, U., Ögel, Z. ve Ersayın Yaşınok, A., 2007. Toprak İzolatı *Bacillus* sp. M-13 Ksilanaz'ının Saflaştırılması, Karakterize Edilmesi ve Ksilanaz Geninin İzolasyonu, Temel Bilimler Araştırma Grubu, TÜBİTAK.
- Bamforth, S. M. ve Singleton, I., 2005. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Current Knowledge and Future Directions, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 80, 726-736.
- Banci, L., Ciofi-Baffoni, S. ve Tien, M., 1999. Lignin and Mangan Peroksidaz Catalyzed Oxidation of Phenolic Lignin Oligomers, Biochemistry, 38, 3205-3210.
- Barbosa, E.S., Perrone, D., Vendramini, A.L.A. ve Leite, S.G.F., 2008. Vanillin Production By *Phanerochaete chrysosporium* Grown On Green Coconut Agro-Industrial Husk in Solid State Fermentation, BioResources, 3, 1042-1050.
- Barr, D. P. ve Aust, S. D., 1994. Mechanisms White Rot Fungi Use to Degrade Pollutants, Environmental Science and Technology, 28, 2, 78-87.
- Barroca, M.J.M.C., Seco, I.M., Fernandes, P.M.M., Ferreira, L.M.G.A. ve Castro A. A.M., 2001. Reduction of AOX in the Bleach Plant of a Pulp Mill, Environmental Science and Technology, 21, 4390-4393.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. ve Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review, Applied Microbiology and Biotechnology, 56, 326-338.
- Bermek, H., 2000. Pulp bleaching with manganese peroxidase and xylanase: a synergistic effect, Tappi Journal, 83, 69-79.
- Bertrand, T., Jolivalt, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C. ve Mougın, C., 2002. Crystal Structure of Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics, Biochemistry, 41, 7325-7333.
- Biely, P. ve Petrakova, E., 1984. Novel inducers of the xylan-degrading enzyme system of *Cryptococcus albidus*, Journal of Bacteriology, 160, 408-412.
- Bissoon, S., Christov, L. ve Singh, S., 2002. Bleach-enhancing effects of purified xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp, Process Biochemistry, 38, 571, 577.
- Bloom, J.D. ve Arnold, F.H., 2009. In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences. 106, 9995-10000
- Boerjan, W., Ralph J. ve Baucher, M., 2003. Lignin Biosynthesis, Annual Review of Plant Biology, 54, 519–546.

- Bostancı, Ş., 1987. Kağıt Hamuru Üretimi ve Ağartma Teknolojisi, 13. Basım, KTÜ Basımevi, Trabzon.
- Bourbannis, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P. ve Yaguchi, M., 1995. Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator ABTS In Kraft Lignin Depolymerization, Applied and Environmental Microbiology, 61, 1876-1880.
- Bourbannis, R. ve Paice, G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates An expanded role for laccase in lignin biodegradation, FEBS Letters, 267, 1, 99-102.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Leech, D. ve Freiermuth, B., 1997. Reactivity and Mechanism of Laccase Mediators for Pulp Delignification, Tappi Proceedings, 335-338.
- Cai, D. ve Tien, M., 1989. On the Reactions of Lignin Peroxidase Compound III (Isozyme H8), Biochemical and Biophysical Research Communications, 162, 464-469.
- Call, H.P. ve Mucke, L., 1997. History, Overview and Applications of Mediated Lignolytic Systems, Especially Laccase-Mediator-Systems (Lignozym Process), Journal of Biotechnology, 53, 163-202.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., del Rio, J.C., Gutierrez, A., Gras, J.M., Monie, R., Martinez, M. ve Martinez, A.T., 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system, Enzyme and Microbial Technology, 35, 113-120.
- Can˜o-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M. ve Bevan, M., 2003. Reduced Cellulose Synthesis Invokes Lignification and Defense Responses in *Arabidopsis thaliana*, Plant Journal, 34, 351-362.
- Cardona-Barrau, D., Lachenal, D. ve Chirat, C., 2001. Affinity of Metal Ions for Kraft Pulps Studied by ESR. Inhibition of Their Catalytic Action in Oxygen bleaching, Journal Wood Chemical Technology, 21, 3, 247-261.
- Carrio, M.M. ve Villaverde, A., 2005. Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies, Journal of Bacteriology, 187,10, 3599-3601.
- Carvalho, M.E., 1998. Production and characterization of *Phanerochaete chrysosporium* lignin peroxidases for pulp bleaching, Applied Biochemistry and Biotechnology, 70-72, 955-966.
- Chen, J., Fu, G., Gai, Y., Zheng, P., Zhang, D. ve Wen, J., 2015. Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic gene overexpression, Microbial Cell Factories, 14,92.

- Chandra, R., Raj, A., Purohit, H. J. ve Kapley, A., 2007. Characterisation and Optimization of Three Potential Aerobic Bacterial Strains for Kraft Lignin Degradation from Pulp Paper Waste, Chemosphere, 67, 839-846.
- Chapple, C., 1998. Molecular Genetic Analysis Of Plant Cytochrome P450- Dependent Monooxygenases, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49, 311–343.
- Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K.H. ve Piontek, K., 1999. The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C^β of tryptophan 171: A novel radical site formed during the redox cycle, Journal of Molecular Biology, 286,3, 809-827.
- Colodette, J.L., Rothenberg, S. ve Dence, C.W., 1989. Factors Affecting Hydrogen Peroxide Stability in the Brightening of Mechanical and Chemi-Mechanical Pulps, Part III: Hydrogen Peroxide Stability in the Presence of Magnesium and Combinations of Stabilizers, The Journal of Pulp and Paper Science, 15, 2, 45-51.
- Cömlekcioglu, U., Tutus, A., Cicekler, M., Gunes, M. ve Aygan, A., 2014. Application of recombinant xylanase from *Orpinomyces* sp. in elemental chlorine-free bleaching of kraft pulps, Romanian Biotechnological Letters, 19, 8941–8950.
- Cripps, C., Bumpus, J. A. ve Aust, S. D., 1990. Biodegradation of Azo And Heterocyclic Dyes by *Phanerochaete chrysosporium*, Applied and Environmental Microbiology, 56, 1114-1118.
- Dahl, O., 1999. Evaporation of Acidic Effluent from Kraft Pulp Bleaching Reuse of the Concentrate and Further Processing of the Concentrate, Akademik Tez, Faculty of Technology, Oulu.
- Datta, R., Kelkar, A., Baraniye, D., Molaei, A., Moulick A., Meena, R.S. ve Formanek, P., 2017. Enzymatic Degradation of Lignin in Soil: A Review, Sustainability, 9,7, 1163.
- DeAngelis, K. M., D'Haeseleer, P., Chivian, D., Fortney, J. L., Khudyakov ve J., Simmons, B., 2011. Complete genome sequence of *Enterobacter lignolyticus* SCF1, Standards in Genomic Sciences, 5, 69–85.
- del Pilar Castillo, M., Ander, P. ve Stenstorm, J., 1997. Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentations, Biotechnology Techniques, 11, 701-706.
- De la Rosa, A., Ferrús, R., Colom, J.F. ve Vidal, T., 2002. Effect of Metal Ions on TCF Bleaching of Kenaf Chemical Pulp In: Proceedings of the Seventh European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, Turku, Finland, 363–366.
- Dence, C.W. ve Reeve, D.W., Pulp Bleaching-Principles and Practicles, Tappi Press, USA, 1996.

- Deniz, İ., 2011. Odun Kimyası Ders Notları, KTÜ, Orman Fak., Trabzon.
- Duarte, A.P. ve Lachenal, D., 2002. Hydrogen Peroxide Production During Oxygen Bleaching of *Eucalyptus globulus* Kraft Pulp-origin of Cellulose Degradation, Paperi ja Puu-Paper and Timber, 84, 4, 275–277.
- Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S., Brown S.H., Østergaard P., Schneider P., Yaver D.S., Pedersen A.H. ve Davies, G.J., 1998. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2Å^o resolution, Nature Structural Biology, 5, 310–316.
- Duran, O., 1997. AB ile Gümrük Birliği İçinde Baskı Sektörü ve Kağıt Sanayi ile İlişkilerindeki Değişmeler, SEKA Kağıtçılık Dergisi, 59, 12-15.
- Durao, P., Chen, Z., Silva, C.S., Soares, C.M., Pereira, M.M., Todorovic, S., Hildebrandt, P., Bento, I., Lindley, P.F. ve Martins, L.O., 2008. Proximal mutations at the type 1 copper site of CotA laccase: spectroscopic, redox, kinetic and structural characterization of I494A and L386A mutants, Biochemistry Journal, 412, 2, 339-346.
- El-Gammal, A. A., Kamel, Z., Adeeb, Z. ve Helmy, S. M., 1998. Biodegradation of Lignocellulosic Substances and Production of Sugars and Lignin Degradation Intermediates by Four Selected Microbial Strains, Polymer Degradation and Stability, 61, 535-542.
- English, A.M. ve Tsaprailis, G., 1995. Catalytic Structure Function Relationship in Heme Peroxidases, Advances in Inorganic Chemistry, 43, 79-125.
- Erden, E., Uçar, C. M., Gezer, T. ve Pazarlıoğlu, N. K., 2009. Screening for Lignolytic Enzymes from Autochthonous Fungi and Applications for Decolorization of Remazole Marine Blue, Brazilian Journal of Microbiology, 40, 346-353.
- Eroğlu, H., 1980. O₂-NaOH Yöntemiyle Buğday Saplarından Kağıt Hamuru Elde Edilmesi, K.T.Ü. Orman Fakültesi Dergisi, 2,2, 544-47.
- Eroğlu, H., 1981. Sülfat Yöntemiyle Kağıt Hamuru Elde Edilmesi, K.T.Ü. Orman Fakültesi Dergisi, 65-68.
- Fahey, R.C. ve Sundquist, A.R., 1991. Evolution of glutathione metabolism, Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 64, 1–53.
- Faison, B.D.T., Kirk, K. ve Farrell, R.L., 1986. Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*, Applied and Environmental Microbiology, 52, 251-254.
- Fan, Z., Wagschal, K., Chen, W., Montross, M.D., Lee, C.C. ve Yuan, L., 2009. Multimeric hemicellulases facilitate biomass conversion. Applied and Environmental Microbiology, 75,6, 1754-1757.

- Federici, L., Masulli, M., Di Ilio, C. ve Allocati, N., 2010. Characterization of the hydrophobic substrate-binding site of the bacterial beta class glutathione transferase from *Proteus mirabilis*, Protein Engineering, Design and Selection, 23, 743-750.
- Ferrer, I., Dezotti, M. ve Durán, N., 1991. Decolorization of Kraft Effluent by Free and Immobilized Lignin Peroxidases and Horseradish Peroxidase, Biotechnology Letters, 13, 577-582.
- Flander, L., Rouau, X., Morel, M. H., Autio, K., Seppänen-Laakso, T., Kruus, K. ve Buchert, J., 2008. Effects of Laccase and Xylanase on the Chemical and Rheological Properties of Oat and Wheat Doughs, Journal of Agricultural Food and Chemistry, 56, 5732–5742.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2009. Forest Products Annual Market Review, Chapter 8, ISBN: 978-92-1-117007-8, ISSN: 1020-2269, 2008 Geneva.
- Garg, A. P., Roberts, J. C. ve McCarthy, A. J., 1998. Bleach boosting effect of cellulase-free xylanase of *Streptomyces thermoviolaceus* and its comparison with two commercial enzyme preparations on birchwood kraft pulp, Enzyme and Microbial Technology, 18, 594-598.
- Gayazov, R. ve Rodakiewicz-Nowak, J., 1996. Semi-Continuous Production of Laccase by *Phlebia radiata* in Different Culture Media, Folia Microbiologica, 41, 480-484.
- Gellerstedt, G., 2007. Chemistry of Bleaching of Chemical Pulp, Wood Chemistry and Wood Biotechnology, 3, 2-37.
- Gellersted, G. ve Petterson, I., 1982. Chemical aspects of hydrogen peroxide bleaching, part II: The bleaching of kraft pulps, Journal of Wood Chemistry Technology, 2,3,231-250.
- Ghindilis, A. L., 2000. Direct Electron Transfer Catalysed by Enzymes: Application for biosensor development, Biochemical Society Transactions, 28, 84-89.
- Ghodake, G.S., Kalme, S.D., Jadhav, J.P. ve Govindwar, S.P., 2009. Purification and partial characterization of lignin peroxidases from *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890 and its application in decolourization of textile dyes, Applied Biochemistry and Biotechnology, 152, 6–14.
- Gianfreda, L., Xu, F. ve Bollag, J. M., 1999. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes, Bioremediation Journal, 3, 1-26.
- Gierer, J., Jansbo, K., Yang, E., Yoon, B.H. ve Reitberger, T., 1991. On The Participation of Hydroxyl Radicals in Oxygen and Hydrogen Peroxide Bleaching Processes, Wood and Pulping Chemistry, 5, 93–97.

- Gilbert, M., Bayer, R., Cunnigham, A.M., DeFrees, S., Gao, Y., Watson, D.C., Young, N.M. ve Wakarchuk, W.W., 1998. The synthesis of sialylated oligosaccharides using a CMP-Neu5Ac synthetase/sialyltransferase fusion. Nature Biotechnology, 16,8, 769-772.
- Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M. ve Gold, M. H., 1983. An Extracellular H₂O₂-Requiring Enzyme Preparation Involved in Lignin Biodegradation by the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 114, 1077-1083.
- Gochev, V. K. ve Krastanov, A. I., 2007. Isolation of Laccase Producing *Trichoderma* spp., Bulgarian Journal of Agricultural Science, 13, 171-176.
- Gold, M. H. ve Alıç, M., 1993. Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Microbiological Reviews, 57, 3, 605-622.
- Gomes, E., Aguiar, A. P., Carvalho, C. C., Bonfá, M. R. B., Da Silva, R. ve Boscolo, M., 2009. Ligninases Production by Basidiomycetes Strains on Lignocellulosic Agricultural Residues and Their Application in the Decolorization of Synthetic Dyes, Brazilian Journal of Microbiology, 40, 31-39.
- Hatakka, A., 1994. Lignin-Modifying Enzyme from Selected White-Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation, FEMS Microbiology Reviews, 13, 125-135.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U. ve Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases, Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45, 51-88.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P. ve Anke, T., 1998. Characterization of Laccases and Peroxidases from Wood-Rotting Fungi (Family Coprinaceae), Applied and Environmental Microbiology, 64, 1601-1606.
- Heuts, L. ve Gellerstedt, G., 1998. Oxidation of Guaiacylglycerol- β -guaiacyl Ether with Alkaline Hydrogen Peroxide in the Presence of Kraft Pulp, Nordic Pulp Paper Resource Journal, 13, 107.
- Hobbs, G. ve Abbot, J., 1992. The role of radical species in peroxide bleaching processes, Appita Journal, 45,5, 344-348.
- ISO 2470, 1977. International Organization for Standardization, International Standard, Paper and Board Measurement of Diffuse Blue Reflectance Factor (ISO Brightness), ISO, İsviçre.
- ISO/DIS 2470, 1977. Paper, Board and Pulps-measurement of Diffuse Blue Reflectance Factor (ISO Brightness), ISO, İsviçre.
- Jeyasingam, J. T., 1987b. Industrial Experience in the Semi-chemical Pulping of Straw, Non-wood Plant Fiber Pulping, Progress Reports, 17, 127-131.

- Jung, U., Cho, Y.S., Seong, H.M., Kim, S.J., Kim, Y.C. ve Chung, A.S., 1996. Characterization of a novel glutathione S-transferase from *Pseudomonas* sp. DJ77, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2, 111-115.
- Kalyoncu, E.E., 2004. Endüstriyel Kraft Hamurunun Ağartılmasında Yeni Yaklaşımlar, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kalyoncu, E. E., 2011. Buğday Saplarından (*Triticum aestivum*) Çeşitli Yöntemlerle Elde Edilen Hamurların Ağartılma Karakteristiklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Karademir, A., Akgül, M. ve Tutuş, A., 2002. Kağıt endüstrisinde enzim kullanımına genel bir bakış. K.S.Ü. Fen ve Mühendislik Dergisi, 5,1.
- Kawai, S., Nakagawa, M. ve Ohashi, H., 1999. Aromatic Ring Cleavage of a Nonphenolic β -O-4 Lignin Model Dimer by Laccase of *Trametes versicolor* in the Presence of 1-Hydroxybenzotriazole, FEBS Letters, 446, 355-358.
- Kersten, P.J., Stephens, S.K. ve Kirk, T.K., 1990. Glyoxal oxidase and the extracellular peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture, 41, 457-463.
- Khristova, P., Kordsachia, O. ve Khider, T., 2003. Pulping potential of doum palm rachis from Sudan, Tropical Science, 43,3, 109-115.
- Kırcı, H., 2000. Kağıt Hamuru Endüstrisi Ders Notları, Sayfa 63-274, K.T.Ü. Orman Fakültesi Yayınları, Trabzon.
- Kırcı, H., 2006. Kağıt Hamuru Endüstrisi Ders Notları. K.T.Ü. Orman Fakültesi Yayınları, Yayın No: 86, Trabzon.
- Kiiskien, L.L. ve Saloheimo, M., 2004. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a laccase gene from ascomycete *Melanocarpus albomyces*, Applied and Environmental Microbiology, 70, 137-144.
- Kirk, T. K., Tien, M., Kersten, P. J., Mozuch, M. D. ve Kalyanaraman, B., 1986. Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* mechanism of its Degradation of the Nonphenolic Arylglycerol B-aryl Ether Substructure of Lignin, Biochemistry Journal, 236, 279-287.
- Kirk, T.K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E. ve Farrel, R., 1986. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: Effect of selected growth conditions and use of a mutant strain, Enzyme and Microbial Technology, 8, 27-32.
- Kirk, T. K. ve Farrell, R. L. 1987. Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin, Annual Review of Microbiology, 41, 465-501.
- Kleppe, P.J., 1970. Kraft pulping, Tappi, 53,1, 35-47.

- Koroljova-Skorobogat'ko, O.V., Stepanova, E.V. ve Gavrilova, V.P., 1998. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis, Biotechnology and Applied Biochemistry, 28,1,47–54.
- Koschorreck, K., Richter, S.M., Swierczek, A., Beifuss, U., Schmid, R.D. ve Urlacher, V.B., 2008. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs, Archives of Biochemistry and Biophysics, 474,1, 213–219.
- Köller, G., Möeder, M. ve Czihal, K., 2000. Peroxidative Degradation of Selected PCB: A Mechanistic Study, Chemosphere, 41, 1827-1834.
- Kulkarni, N. ve Rao, M., 1996. Application of xylanase from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59 in biobleaching of bagasse pulp, Journal of Biotechnology, 51, 167–173.
- Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F. J. ve Alcalde, M., 2008. Decolorization of Synthetic Dyes by Laccase Immobilized on Epoxy-Activated Carriers, Process Biochemistry, 43, 169-178.
- Kurtulmuş, M., 2010. Lignoselülozik Materyallerden Termokatalitik İşleme Suda Çözündürülen Polisakkaritlerin Moleküler Yapılarının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Kutney, G.W. ve Evans, T.D., 1985. Peroxide Bleaching of Mechanical Pulps; Part 1. Alkali Darkening—the Effect of Caustic Soda, Svensk Papperstidn, 88, 78-82.
- Kyoungseon, M., 2015. A dye-decolorizing peroxidase from *Bacillus subtilis* exhibiting substrate-dependent optimum temperature for dyes and β -ether lignin dimer, Scientific Reports, 5,1-8.
- Lachenal, D., Fernandes J.C. ve Froment, P., 1994. Behaviour of residual lignin in kraft pulp during bleaching, International Pulp Bleaching Conference, Haziran 1994, Vancouver Canada, Bildiriler kitabı, 41-45.
- Lapierre, L., Berry, R. ve Bouchard, J., 2003. The Effect of Magnesium Ions and Chelants on Peroxide Bleaching, Holzforschung, 57, 627–633.
- Leithe-Eriksen, R., 2001. Pulp Bleaching Around The Baltic Sea. Progress Report For Greenpace International, April, Gothenburg Sweden.
- Leontievsky, A. A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J. K., Pozdnyakova, N. N., Myasoedova, N. M., Kalkkinen, N., Golovleva, L. A., Cammack, R., Thurston, C. F. ve Hatakka, A., 1997. Blue and Yellow Laccases of Ligninolytic Fungi, FEMS Microbiology Letters, 156, 9-14.
- Lesage-Meessen, L., Delattre, M., Haon, M., Thibault, J. F., Ceccaldi, B. C., Brunerie, P. ve Asther, M., 1996. A Two-Step Bioconversion Process for Vanillin Production

from Ferulic Acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*, Journal of Biotechnology, 50, 107-113.

- Li J., Yuan H. ve Yang J., 2008. Bacteria and Lignin Degradation, Frontiers in Biology, 4,1, 29-38.
- Li, K., Xu, F. ve Eriksson, K.E.L., 1999. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. Applied and Environmental Microbiology, 65, 2654–2660.
- Linden, J. ve Ohman, L.O., 1997. Redox stabilisation of iron and manganese in the +II oxidation state by magnesium precipitates and some anionic polymers. Implications for the use of oxygen based bleaching chemicals, Journal of Pulp and Paper Science, 23,5, 193-199.
- Lomascolo, A., Stentelaire, C., Asther, M. ve Lesage-Meessen, L., 1999. Basidiomycetes as New Biotechnological Tools to Generate Natural Aromatic Flavours for the Food Industry, Trends in Biotechnology, 17, 282-289.
- Lopez, M.J., Guisado, G., Vargas-Garcia, M.C., Suarez Estrella, F. ve Moreno, J., 2006. Decolorization of industrial dyes by ligninolytic microorganisms isolated from composting environment, Enzyme and Microbial Technology, 40, 42-45.
- Lu, P., Feng, M.G., Li, W.F. ve Hu, C.X., 2006. Construction and characterization of a bifunctional fusion enzyme of *Bacillus* –sourced β -glucanase and xylanase expressed in *Escherichia coli*, FEMS Microbiology Letters, 261, 224-230.
- Mansfield, S.D., 2009. Solutions for Dissolution Engineering Cell Walls for Deconstruction, Current Opinion in Biotechnology, 20, 286–294.
- Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G.H. ve Henriques, A.O., 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat, Journal of Biological Chemistry, 277, 18849-18859.
- Masai, E., Katayama, Y., Nishikawa, S. ve Fukuda, M., 1999. Characterization of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 genes involved in degradation of lignin-related compounds, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 23, 364–373.
- Mayer, A.M. ve Staples, R.C., 2002. Laccase: new functions for an old enzyme, Phytochemistry, 60, 551–565.
- Mester, T. ve Tien, M., 2000. Oxidation Mechanism of Ligninolytic Enzymes Involved in the Degradation of Environmental Pollutants, International Biodeterioration and Biodegradation, 46, 51-59.
- Michel, F.C., Dass, S.B., Grulke, E.A. ve Reddy, C.A., 1991. Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the

decolorization of kraft bleach plant effluent, Applied and Environmental Microbiology, 57,8, 2368-2375.

- Minussi, R. C., Pastore, G. M. ve Durán, N., 2002. Potential applications of laccase in the food industry, Trends in Food Science and Technology, 13, 205–216.
- Mocchiutti, P., Zanuttini, M. ve Saparrat, M.C.N., 2005. Improvement of Recycled Unbleached Pulp Properties by Laccase Mediator System, Periódico o Papel da ABTCP, 66, 54-58.
- Moreira, M. T., Feijoo, G., Canaval, J. ve Lema, J. M., 2003. Semipilot-Scale Bleaching of Kraft Pulp with Manganese Peroxide, Wood Science and Technology, 37, 117-123.
- Nagar, S., Jain, R.K., Thakur, V.V. ve Gupta, V.K., 2013. Biobleaching application of cellulase poor and alkali stable xylanase from *Bacillus pumilus* SV-85S, 3 Biotech, 3,4, 277–285.
- Novo Uzal, E., Gomez Ros, L. V., Pomar, F., Bernal, M. A., Paradela, A., Albar, J. P. ve Ros Barcelo, A., 2009. The Presence of Sinapyl Lignin in *Ginkgo biloba* Cell Cultures Changes Our Views of the Evolution of Lignin Biosynthesis, Physiol Plant, 135, 196–213.
- Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gübitz, G.M., Zvauya, R., Read, J. ve Steiner, W., 2001. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*, Water Research, 36, 1449-1456.
- Oh, Y.K., Seol, E.H., Park, S. ve Park, S., 2011. Decolorization of synthetic dyes by *Citrobacter amalonaticus* Y19, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42, 492-497.
- Okan, O.T., 2010. Kraft Yöntemiyle Üretilen Bambu (*phyllostachys bambusoides*) ve Melez Kavak (*Populus x euramericana* (Dode) Guinier) Kağıt Hamurlarının Ağartılması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Oyadomari, M., Shinohara, H., Johjima, T., Waruishi, H. ve Tanaka, H., 2003. Electrochemical Characterization of Lignin Peroxidase from the White-Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 21, 291-297.
- Paice, M.G., Bourbonnais, R., Reid, I.D., Archibald, F.S. ve Jurasek, L., 1995. Oxidative bleaching enzymes - a review, Journal of Pulp and Paper Science. 21, 280–284.
- Piontek, K., Antorini, M. ve 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.

- Piontek, K., Glumoff, T. ve Winterhalter, K., 1993. Low pH Crystal Structure of Glycosylated Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å Resolution, FEBS Letters, 315, 119-124.
- Piontek, K., Smith, A.T. ve Blodig, W., 2001. Lignin peroxidase, Biochemical Society Transactions, 29, 111-116.
- Pointing, S.B., 2001. Feasibility of Bioremediation by White-Rot Fungi, Applied Microbiology and Biotechnology, 57, 20-33.
- Poulos, T. L., Edwards, S. L., Wariishi, H. ve Gold, M. H. 1993. Crystallographic Refinement of Lignin Peroxidase at 2Å, Jornal of Biological Chemistry, 268, 4429-4440.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Ralph, S. A. ve Christensen, J. H., 2004. Lignins: Natural Polymers from Oxidative Coupling of 4-Hydroxyphenylpropanoids, Phytochemistry Reviews, 3, 29–60.
- Rasmussen, S. ve Dixon, R.A., 1999. Transgene-Mediated and Elicitor-Induced Perturbation of Metabolic Channeling at the Entry Point into the Phenylpropanoid Pathway, Plant Cell, 11, 1537–1552.
- Ravalason, H., Herpoel-Gimbert, I., Record, E., Bertaud F., Grisel, S., de Weert, S., van den Hondel, C.A., Asther, M., Petit-Conil, M. ve Sigoillot, J.C., 2009. Fusion of a family 1 carbohydrate binding module of *Aspergillus niger* to the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase for efficient softwood kraft pulp biobleaching, Journal of Biotechnology, 142, 220-226.
- Renganathan, V. ve Gold, M.H., 1994. Purification of A 1,2,4-Trihydroxybenzene 1,2-Dioxygenase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Journal of Bacteriology, 176, 4838- 4844.
- Ribeiro, L.F., Furtado, G.P. ve Lourenzoni, M.R., 2011. Engineering Bifunctional Laccase-Xylanase Chimeras for Improved Catalytic Performance, The journal of biological chemistry, 266, 43026–43038.
- Ro, D.K., Mah, N., Ellis, B. E. ve Douglas, C. J., 2001. Functional Characterization and Subcellular Localization of Poplar (*Populus trichocarpa* , *Populus deltoides*) Cinnamate 4-Hydroxylase, Plant Physiology, 126, 317–329.
- Roberts, S.A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K. ve Hazzard, J.T., 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*, Proceedings of the National Academsy of Sciences, 99, 2766–2771.
- Robinson, A., Huttley, G.A., Booth, H.S. ve Board, P.G., 2004. Modelling and bioinformatics studies of the human kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-

hydroxychromene-2-carbox-ylate isomerases, Biochemistry Journal, 379, 541–552.

Rodríguez, S. ve Toca, J. L., 2006. Industrial and Biotechnological Applications of Laccases: A review, Biotechnology Advances, 24, 500-513.

Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. ve Vidal, T., 2005. The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps, Bioresource Technology, 96, 21–30.

Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. ve Vidal, T., 2003. TCF bleaching of wheat straw pulp using ozone and xylanase. Part A: Paper quality assessment, Bioresource Technology, 87, 305–314.

Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. ve Vidal, T. 2000. Effects of xylanase treatment on fibre morphology in totally chlorine free bleaching (TCF) of *Eucalyptus* pulp, Process Biochemistry, 36, 45–50.

Rousu, P., Rousu, P. ve Anttila, J., 2002. Sustainable Pulp Production from Agricultural Waste Resources, Conservation and Recycling, 35, 85-103.

Sağiroğlu, A.K., 1999. Enzim Teknolojisi, Bilim ve Teknik, 383, 74-80.

Saleem, M., Aslam, F., Akhtar, M.S., Tariq, M. ve Rajoka, M.I., 2012. Characterization of a thermostable and alkaline xylanase from *Bacillus* sp. and its bleaching impact on wheat straw pulp, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28, 513–522.

Saleem, M., Tabassum, M.R., Yasmin, R. ve Imran, M., 2009. Potential of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. XTR-10 in biobleaching of wood kraft pulp, Biodeterioration and Biodegradation, 63, 1119–1124.

Saleem, R., Khurshid, M. ve Ahmed, S., 2018. Laccases, Manganese Peroxidases and Xylanases Used for the Bio-bleaching of Paper Pulp: An Environmental Friendly Approach, Protein and Peptide Letters, 25, 180-186

Salvachua, D., 2013. Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw, Applied and Environmental Microbiology, 79, 4316-4324.

Sambrook, J., Maccallum, P. ve Rusell, D., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York.

Santos, A., Mendes, S., Brissos, V. ve Martins, L., 2014. New dye-decolorizing peroxidases from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* MET94: towards biotechnological applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 98, 2053–2065.

- Saparrat, M. C. N., Mocchiutti, P., Liggieri, C. S., Aulicino, M. B., Caffini, N. O., Balatti, P. A. ve Martínez, M. J., 2008. Ligninolytic Enzyme Ability and Potential Biotechnology Applications of the White-Rot Fungus *Grammothele subargentea* LPSC no. 436 strain, Process Biochemistry, 43, 368-375.
- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A. ve Autio, K., 2006. Effects of Laccase, Xylanase and Their Combination on the Rheological Properties of Wheat Doughs, Journal of Cereal Sciences, 43, 152–159.
- Sharma, A., 2014. Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents: a pilot scale study, Bioresources Technology, 169, 96-102.
- Shatalov, A.A. ve Pereira, H., 2005. *Arundo donax* L. reed: New perspectives for pulping and bleaching. Part 4. Peroxide bleaching of organosolv pulps, Bioresources Technology, 96,8, 865-872.
- Shi, Y., Wang, Q., Hou, Y., Hong, Y., Han, X., Yi, J., Qu, J. ve Lu, Y., 2013. Molecular cloning, expression and enzymatic characterization of glutathione S-transferase from Antarctic sea-ice bacteria *Pseudoalteromonas* sp. ANT506, Microbiological Research, 169, 179-184.
- Shin, K. S. ve Lee, Y.J., 2000. Purification and Characterization of a New Member of the Laccase Family from the White-Rot Basidiomycete *Coriolus hirsutus*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 384, 109-115.
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Pérez-Boada, M., Martínez, M. J., Asther, M. ve Colom, J. F., 2005. Comparison of Different Fungal Enzymes for Bleaching High-Quality Paper Pulps, Journal of Biotechnology, 115, 333-343.
- Singh, G., Ahuja, N., Batish, M., Capalash, N. ve Sharma, P., 2008. Biobleaching of Wheat Straw-Rich Soda Pulp with Alkalophilic Laccase from *Gammaproteobacterium* JB: Optimization of Process Parameters Using Response Surface Methodology, Bioresources Technology, 99, 7472–7479.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A.K., Singh, S.M. ve Panda, A.K., 2015. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process, Microbial Cell Factories, 14, 41.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M. ve Machonkin, T. E., 1996. Multicopper Oxidases and Oxygenases, Chemical Reviews, 96, 2563-2606.
- Sondhi, S., Sharma, P., Saini, S., Puri, N. ve Gupta, N., 2014. Purification and Characterization of an Extracellular, Thermo-Alkali-Stable, Metal Tolerant Laccase from *Bacillus tequilensis* SN4, PLOS One, 9,5.

- Steven, L. E., Reeta, R., Hiroyuki, W., Michael, H. G. ve Thomas, L. P., 1993. Crystal Structure of Lignin Peroxidase, Proceedings of the National Academy of Sciences 90, 750- 754.
- Sticklen, M.B., 2008. Plant Genetic Engineering for Biofuel Production:Towards Affordable Cellulosic Ethanol, Nature Reviews Genetics, 9, 433–443.
- Strebotnik, E. ve Hammel, K.E., 2000. Degradation of Nonphenolic Lignin by the Laccase/1-Hidroxybenzotriazole System, Journal of Biotechnology, 81, 179-188.
- Suchy, M. ve Argyropoulos, D.S., 2002. Catalysis and Activation of Oxygen and Peroxide Delignification of Chemical Pulps, Tappi Journal, 1, 1-18.
- Swain, P.S., 2004. Efficient attenuation of stochasticity in gene expression through post-transcriptional control. Journal of Molecular Biology 344,4, 965-976
- Tabor, J.J., Bayer, T.S., Simpson, Z.B., Levy, M. ve Ellington, A.D., 2008. Engineering stochasticity in gene expression. Molecular Biosystems. 4,7, 754-761.
- TAPPI Standarts, 1992. Official Test Methods Association of The Pulp and Paper Industry, U.S.A.
- Techapun, C., 2002. Thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106, Journal of Bioscience and Bioengineering, 93,431–433.
- Telefoncu, A., 1986. Enzimolojiye genel bakış, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, İzmir.
- Thurston, C. F. 1994. The Structure and Function of Fungal Laccases, Microbiology, 140,19-26.
- Topal, Ş., Pembeci , C. ve Borcaklı, M., 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz, Turkish Journal of Biology, 24, 79-93.
- Tronchet, M., Balague, C., Kroj, T., Jouanin, L. ve Roby, D., 2010. Cinnamyl Alcohol Dehydrogenases C and D, Key Enzymes in Lignin Biosynthesis, Play an Essential Role in Disease Resistance in *Arabidopsis*, Molecular Plant Pathology, 11, 83–92.
- Troughton, N.A. ve Sarot, P., 1992. The Efficient Use of Hydrogen Peroxide as a Chemical Pulp Delignification Agent: The MACROX™ Process, Sayfa 519-535, Tappi Pulping Conference Proceedings, Tappi Press, Atlanta.
- Tuncer, M., 2010. Lakkaz, Kısım 1: Yapısı, Katalitik Özellikleri ve Dağılımları, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 22, 19-63.

- Tutuş, A., Kırıcı, H., Alma, M.H., Deniz, İ ve Karademir, A., 2009. Buğday Saplarından Kraft-Sodyumborhidrür Yöntemiyle Kağıt Hamuru Üretimi ve Oksijen-Sodyum Perborat Monohidrat ile Ağartılması, Ulusal Bor Araştırmalar Enstitüsü Projesi Sonuç Raporu, Proje No: BOREN-2006-Ç-01, Ankara, 116.
- Tutuş, A., 2000. Buğday (*Triticum aestivum* L.) Saplarından Kağıt Hamuru Üretiminde Kullanılan Soda-Oksijen, Soda-Antrakınon ve Soda Yöntemlerinin Silis Problemi ve Diğer Yönlerden Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Z.K.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Bartın.
- Umuzawa, T. ve Higuchi, T., 1987. Mechanism of aromatic ring cleavage of β -O-4 lignin substructure models by lignin peroxidase, FEBS Letters, 218, 255-260.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. ve Boerjan, W., 2010. Lignin Biosynthesis and Structure, Plant Physiology, 153, 895-905.
- van Belien, J. ve Li, Z., 2002. Enzyme technology: an overview, Current Opinion in Biotechnology, 13, 338-344.
- van Bloois, E., 2010. A robust and extracellular heme-containing peroxidase from *Thermobifida fusca* as prototype of a bacterial peroxidase superfamily, Applied Microbiology and Biotechnology, 86, 1419–1430.
- Vuilleumier, S. ve Pagni, M., 2002. The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes, Applied Microbiology and Biotechnology, 58, 138-146.
- Wach, A., 1996. PCR-synthesis of marker cassettes with long-flanking homology regions for disruptions in *S. Cerevisiae*, Yeast, 12, 259-265.
- Wang, S., 1995. Delignification and Bleaching with Peracids, Akademik Tez, North Carolina State University, Raleigh.
- Wariishi, H. ve Gold, M. H., 1990. Lignin peroxidase Compound III: mechanism of formation and decomposition, Journal of Biological Chemistry, 265, 2070-2077.
- Wen, X., Jia, Y. ve Li, J., 2009. Degradation of Tetracycline and Oxytetracycline by Crude Lignin Peroxidase Prepared from *Phanerochaete chrysosporium* a White-Rot Fungus, Chemosphere, 75, 1003-1007.
- Weng J.K., Li X., Bonawitz N.D. ve Chapple C., 2008. Emerging Strategies of Lignin Engineering and Degradation for Cellulosic Biofuel Production, Current Opinion in Biotechnology, 19, 166–172.
- Wong, D.W., 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes, Applied Biochemistry and Biotechnology, 157,2, 174-209.

- Wong, Y. ve Yu, J., 1999. Laccase-Catalysed Decolorization of Synthetic Dyes, Water Research, 33, 16, 3512-3520.
- Yaropolov, A. I., Skorobogatko, O. V., Vartanov, S. S. ve Varfolomeyev, S.D., 1994. Laccase: Properties, Catalytic Mechanism and Applicability, Applied Biochemistry and Biotechnology, 49, 257-280.
- Yoshida, H., 1883. Chemistry of Lacquer (Urushi) part I, Journal of the Chemical Society, 43, 472-486.
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Nimtz, M. ve Berger, R.G., 2003. A Peroxidase from *Lepista irina* Cleaves β,β -Carotene to Flavor Compounds, Biological Chemistry, 384, 1049-1056.



8. EKLER

Ek 1. GST gen dizini

ATGTCAGAGCAAAAACCTACCAAGCCACCAAAAAGTGTGGAATGGAAGCAAAACAGCGGGCGGCGGTTCGCCAACA
TCAACCCGTCCCCTTTCCGGCGCGACTCATGAACGCGTCCTGCCGGTAGGAACCCATCCGCTCCAGCTATACT
CACTCGGTACACCCAACGGCCAGAAGGTGACGATCATGCTGGAGGAGCTGCTGGCGCTGGGCGTCAGCGGCGC
GGAGTACGACGCCTGGCTGATACGCATTGGCGAAGGGGATCAGTTTTCCAGCGGCTTTGTGAGATCAACCCG
AACTCGAAGATCCCAGGCCCTCAGCGACCATTCACCACGCGCCGACCCGGGTATTTGAGTCCGGCAACATTC
TTCTCTATCTGGCGAAAAATTTGGTTTTCTTCCCTGCCGAAAAGATCCTGCCGGTCGCACCGAAACCCTCAACTG
GCTGTTCTGGCTGCAGGGCGCGGCGCGCTTCCCTCGGCGGCGGCTTCGGCCACTTCTATAACTATGCGCCAGTG
AAGATCGAGTACGCGATCGACCGCTTTACGATGGAAGCTAAACGCCAGCTCGACGTGCTGGACAAACAGCTCG
CCCGCGGTGCTATGTGGCCGGCGAGGAGTACACCATCGCCGATATGGCTGTCTGGCCGTGGTATGGCAACGT
AGTGCTGGGCAATGTCTATAACGCGGCGGAGTTCCCTCGACGCGGGAGCTATAAAAACGTGCTGCGCTGGGCG
CAGGATGTGCGCAACCGCCCGCGCTCAAGCACGGACGCATCGTCAACCGCACCAACGGCCCGCTCAATGAGC
AGCTGCATGAGCGCCATGACGCCCAGGACTTTGACACCCAAACGGAAGATAAGCGCCAGGCGTAA

Ek 2. Lakkaz gen dizini

ATGAATCCTGAGCCATTAATAAAAAAGCCATCACGAGTCGTTTTATGTGGCTGAGCCCTTGGGTAGAAAAGAATG
ATATGCTTGTGCTGGTTTTACCACAAAAAATGGTGGCGTGAGTAAACGTCCATTTGCTTCTTTTAACCTAGG
GCTTCACGTAAACGATAACGTAGAAGATGTTATTACAAATAGAAAAATTTTAGCAGCCGAACCTAGACATGTCT
TTTGAAAGCTTTGTATGTGCTGAACAAGTACATGAAGCAACTGTTCAAAAAGTAACAAAAGCCGACTGTGCAA
AAGGACTCTACAAGTATGAAGAGGGCATAAAAAGCAACGGATGGCATTATACAAATGAATCTGATATTTTGT
AGCTTTATGTTATGCAGATTGTGTTCCGCTGTACTTCTATGCGCCAGATCACCATTTAGTTGGTCTTGCTCAT
GCTGGGTGAAAAGCACAGTAAAAGATATTGCAGGAAATATGATTCGACGTTGGGTAGAACAAGAAAATGTTT
CAGTTGAAGATATTTACGTGGCGATTGGCCCTTCGATTGAAGATTGCTGTTATGTTGTCGATAACCGCGTCAT
TACACAAGTAAACGAAGTAGTTGGCCAAAATGGATATCAAGAAGTAAGCCCTGGACAATACGCGCTTAATTTA
AAAAAGTCAATAAGCTGCTGATTCAACACGCAGGCGTATTGCCGGAACGAATTTTAACATCGTCGTATTGTA
CAAGCTGTGAAGATGACCTGTTCTTCTCACATCGCCGCGACCAAGGGAAAACAGGACGCATGTTTAACCTCAT
AGGCTTTAAGGAGGAGTAA

Ek 4. Füzyon şeklinde oluşturulan gen dizini

ATGTCAGAGCAAAACTACCAAGCCACCAAAAGTGTGGAATGGAAGCAAAACAGCGGCGGCGCTTCGCCAACA
TCAACCCGTCCCCTTCCGGCGCGACTCATGAACGCGTCCTGCCGGTAGGAACCCATCCGCTCCAGCTATACT
CACTCGGTACACCCAACGGCCAGAAGGTGACGATCATGCTGGAGGAGCTGCTGGCGCTGGGCGTCAGCGGCGC
GGAGTACGACGCCTGGCTGATACGCATTGGCGAAGGGGATCAGTTTTCCAGCGGCTTTGTTCGAGATCAACCCG
AACTCGAAGATCCCAGCCCTCAGCGACCATCCACCACGCCGCCGACCCGGGTATTTGAGTCCGGCAACATTC
TTCTCTATCTGGCGAAAAATTTGGTTTCTTCCCTGCCGAAAGATCCTGCCGGTCGCACCAGAACCCCTCAACTG
GCTGTTCTGGCTGCAGGGCGCGGCCGCTTCCCTCGGCGGCGGCTTCGGCCACTTCTATAACTATGCGCCAGTG
AAGATCGAGTACGCGATCGACCCGCTTTACGATGGAAGCTAAACGCCAGCTCGACGTGCTGGACAAACAGCTCG
CCCGCGGTGCTATGTGGCCGGCGAGGAGTACACCATCGCCGATATGGCTGTCTGGCCGTGGTATGGCAACGT
AGTGCTGGGCAATGTCTATAACGCGGCGGAGTTCCCTCGACGCCGGGAGCTATAAAAACGTGCTGCGCTGGGCG
CAGGATGTGCGCAACCCGCCCGGCGTCAAGCACGGACGCATCGTCAACCGCACCAACGGCCCGCTCAATGAGC
AGCTGCATGAGCGCCATGACGCCCCGCGACTTTGACACCCAAACGGAAGATAAGCGCCAGGCG**GATG**CCAGGCC
AGTCGCGAGATTGGCACCACAAGCAGTCCCTCACTCCGCCAGCGCCGCTCCCTCTTCCCTGGTGTCTGCTGCC
GGGACTCCGACGACGACCCGCGCGACGGTGTGCGACGTGATCTCCGGGATCGACGGACCCTCAAGGCGGTGG
GATTCGCGAACTCGCCGGTTCCCTGTCTGCGTGGTTCGGTGTGCGGTGCGCAGTTCTGGGACCCTGAGCGC
GTCGTGCAAGCCGGCGCACCTGCATCCGTTCTGTCGCCGCTGTCCGGGCCGGTCCACAGCGCGCCCTCCACGCCG
GGTGACCTCCTGTTCCACATCAAGGCCGCCCGCAAGGATCTGTGCTTCGAACTGGGCCGCCAGATCGTCTCCG
CGCTGGGCTCCGCCGCCACCGTGGTGCAGGAGTGCACGGCTTCCGCTATTTGACTCCCGCGACCTCCTCGG
ATTGCTGACGGCACCGAGAATCCACCCGACGACGACGCCGCGGACTCCGCCCTGATCGGCGACGAGGACCCC
GACTTCCGGGGCGGCAGTTACGTGATCGTGCAGAAGTACCTGCACGACATGAGCGCGTGAACACGCTGAGCA
CCGAGGAACAGGAACGGGTTCATCGGGCGCACCAAGCTCGAGAACGTGCAACTCGACGACGACGCCAGCCCAG
CAATTCGCACGTCAACCTCAACACCATCGTTCGACGACGACGGCGTGAACACGACATCCTCCGCGACAACATG
GCATTCGGCAGCCTCGGGCAGGCGGAATACGGCACCTACTTCATCGGGTACGCCAAGGACCCCGCCGTACCCG
AGCTGATGTTGCGACGCATGTTTCTCGGCGAGCCGCCCGGCAACTACGACCGCGTCCCTCGACTTCTCCACGGC
GGCCACCGGCACATTGTTCTTCGTGCCGAGCCGGGACGTGCTCGAATCGCTCGGCGACGAGCCGGCCGGCGCG
GAGTCGGCACCCGAAGACCCGTCGAGCCCGCGGCGGCCCGTACGACCTGTCCCTGAAAATCGGTGGTC
TCAAAGGAGTATCGCAA**ATGA**ATCCTGAGCCATTAATAAAAAAGCCATCACGAGTCGTTTTATGTGGCTGAGCCC
TTGGGTAGAAAAGAATGATATGCTTGTGCTGGTTTACCACAAAAAATGGTGGCGTGAATAACGTCCATTT
GCTTCTTTAACCCTAGGGCTTACGTAACGATAACGTAGAAGATGTTATTACAAATAGAAAAATTTTAGCAG
CCGAAC TAGACATGCTTTTAAAAGCTTTGTATGTGCTGAACAAGTACATGAAGCAACTGTTCAAAAAGTAAC
AAAAGCCGACTGTGCAAAAAGGACTCTACAAGTATGAAGAGGGCATAAAAAGCAACGGATGGCATTATACAAAT
GAATCTGATATTTTGTAGCTTTATGTTATGCAGATTGTGTTCCGCTGTACTTCTATGCGCCAGATCACCATT
TAGTTGGTCTTGCTCATGCTGGGTGAAAAGGCACAGTAAAAGATATTGCAGGAAATATGATTGACGTTGGGT
AGAACAAGAAAATGTTCCAGTTGAAGATATTTACGTGGCGATTGGCCCTTCGATTGAAGATTGCTGTTATGTT
GTCGATAACCGCTCATTAACACAAGTAAACGAAGTAGTTGGCCAAAATGGATATCAAGAAGTAAGCCCTGGAC
AATACGCGCTAATTTAAAAAAGTCAATAAGCTGCTGATTAACACGCAGGCGTATTGCCGGAACGAATTTT
AACATCGTTCGATTTGTACAAGCTGTGAAGATGACCTGTTCTTCTCACATCGCCGCGACCAAGGGAAAACAGGA
CGCATGTTAACTTCATAGGCTTTAAGGAGGAGTAA

*Her bir genin başlangıç kodunu koyu ve altı çizili yazılmıştır.

Ek 5. Operon düzeninde oluşturulan gen dizini

AGGAGCGATTACATATGAAAAAAGAAAGAGGCGAAACTTTAAAAGGTTTCATTGCAGCATTTTTAGTGTGG
CTTTAATGATTTTCATTAGTGCCAGCCGATGTACTAGCAAAATCTACAGAATTCATGTCAGAGCAAAACTACCA
 AGCCACCAAAAGTGTGGAATGGAAGCAAAACAGCGGCGGCGGTTTCGCCAACATCAACCCGTCCCCTTTCCGG
 CGCGACTCATGAACCGCTCCTGCCGGTAGGAACCCATCCGCTCCAGCTATACTCACTCGGTACACCCAACGGC
 CAGAAGGTGACGATCATGCTGGAGGAGCTGCTGGCGCTGGGCGTCAGCGGCGGGAGTACGACGCCTGGCTGA
 TACGCATTGGCGAAGGGGATCAGTTTTCCAGCGGCTTTGTGAGATCAACCCGAACCTCGAAGATCCCAGCCCT
 CAGCGACCATTCCACCACGCCGCCGACCCGGGTATTTGAGTCCGGCAACATTTCTTCTATCTGGCGAAAAA
 TTTGGTTTTCTTCTGCCGAAAGATCCTGCCGGTCGCACCGAAACCCCTCAACTGGCTGTTCTGGCTGCAGGGCG
 CGGCGCCGTTCTCGGCGGCGGCTTCGGCCACTTCTATAACTATGCGCCAGTGAAGATCGAGTACGCGATCGA
 CCGCTTTACGATGGAAGCTAAACGCCAGCTCGACGTGCTGGACAAACAGCTCGCCCGGGTTCGCTATGTGGCC
 GCGGAGGAGTACACCATCGCCGATATGGCTGTCTGGCCGTGGTATGGCAACGTAGTGTGGCAATGTCTATA
 ACGCGGCGGAGTTCTCGACGCCGGGAGCTATAAAAACGTGCTGCGCTGGGCGCAGGATGTCCGCAACCGCCC
 GGCCGTCAAGCACGGACGCATCGTCAACCCGCACCAACGGCCCGTCAATGAGCAGCTGCATGAGCGCCATGAC
 GCCCAGGACTTTGACACCCAAAACGGAAGATAAGCGCCAGGCGTAAGGATCCGTGCCACC**TAAAAAGGA**GCGAT
TTACATATGAAAAAAGAAAGAGGCGAAACTTTAAAAGGTTTCATTGCAGCATTTTTAGTGTGGCTTTAATGA
TTTCATTAGTGCCAGCCGATGTACTAGCAAAATCTACAGAATTCATGCCAGGCCAGTTCGCGAGATTGGCACC
 ACAAGCAGTCTCCTCACTCCGCCAGCGCCGCTCCCTCTTCTGGTGTCTCGTCCCGGGGACTCCGACGACGAC
 CGCGCGACGGTGTGCGACGTGATCTCCGGGATCGACGGACCGCTCAAGGCGGTGGGATTCGCGCAACTCGCCG
 GTTCCCTGTCTCGGTGGTCCGTGCGTCCGTGCGCAGTTCTGGGACCGCGTGAGCGCGTTCGTAAGGCGGCA
 CCTGCATCCGTTCCGTCGCGTGTCCGGGCGGTTCCACAGCGCCCTCCACGCGGGTGACCTCTGTTCAC
 ATCAAGGCCCCCGCAAGGATCTGTGCTTCGAACTGGGCGCCAGATCGTCTCCGCGCTGGGCTCCGCCGCCA
 CCGTGGTCGACGAGGTGCACGGCTTCCGCTATTTGACTCCCGCGACCTCCTCGGATTTCGTCGACGGCACCGA
 GAATCCCAACGACGACGACGCCCGGACTCCGCCCTGATCGGCGACGAGGACCCCGACTTCCGGGGCGGCGAGT
 TACGTGATCGTGCAGAAGTACCTGCACGACATGAGCGCGTGGAAACACGCTGAGCACCGAGGAACAGGAACGGG
 TCATCGGGCGCACCAAGCTCGAGAACGTCGAACTCGACGACGACGCCAGCCAGCAATTCGCACGTACCCT
 CAACACCATCGTTCGACGACGACGGCGTCGAACACGACATCCTCCGCGACAACATGGCATTCCGGCAGCCTCGGC
 GAGGCGGAATACGGCACCTACTTTCATCGGGTACGCCAAGGACCCCGCGTACCAGCTGATGTTGCGACGCA
 TGTTTCTCGGCGAGCCCGCCGCAACTACGACCGCTCCTCGACTTCTCCACGGCGGCCACCGGCACATTGTT
 CTTCTGTCGCGAGCCGGGACGTGCTCGAATCGTTCGGCGACGAGCCGGCCGGCGGAGTCCGGCACCCGAAGAC
 CCGGTGAGCCCGCCGCGCCGGCCGTTACGACCTGTCCCTGAAAATCGGTGGTCTCAAAGGAGTATCGCAAT
 GAGGATCCGTGCCACC**TAAAAAGGA**GCGATTTACAT**ATGAAAAAAGAAAGAGGCGAAACTTTAAAAGGTTCA**
TTGCAGCATTTTTAGTGTGGCTTTAATGATTTTCATTAGTGCCAGCCGATGTACTAGCAAAATCTACAGAATT
CATGAATCCTGACCCATTAATAAAAAAGCCATCACGAGTCTGTTTATGTGGCTGAGCCCTGGGTAGAAAAGAAAT
 GATATGCTTGTGCTGGTTTACCACAAAAAATGGTGGCGTGAGTAAACGTCCATTTGCTTCTTTAACCTAG
 GGCTTACGTAAACGATAACGTAGAAGATGTTATTACAAATAGAAAAATTTTAGCAGCCGAACCTAGACATGTC
 TTTTGAAAGCTTTGTATGTGCTGAACAAGTACATGAAGCAACTGTTCAAAAAGTAACAAAAGCCGACTGTGCA
 AAAGGACTCTACAAGTATGAAGAGGGCATAAAAAGCAACGGATGGCATTATACAAATGAATCTGATATTTTGT
 TAGCTTTATGTTATGCAGATTGTGTTCCGCTGTACTTCTATGCGCCAGATCACCATTTAGTTGGTCTTGCTCA
 TGCTGGGTGGAAAGGCACAGTAAAAGATATTGCAAGGAAATATGATTCGACGTTGGGTAGAACAAGAAAATGTT
 CCAGTTGAAGATATTTACGTGGCGATTGGCCCTTCGATTGAAGATTGCTGTTATGTTGTCGATAACCGCGTCA
 TTACACAAGTAAACGAAGTAGTTGGCCAAAATGGATATCAAGAAGTAAGCCCTGGACAATACGCGCTTAATTT
 AAAAAAAGTCAATAAGCTGCTGATTCAACACGCGAGGCGTATTGCCGGAACGAATTTTAACATCGTCTGATTGT
 ACAAGCTGTGAAGATGACCTGTTCTTCTCACATCGCCGCGACCAAGGGAAAACAGGACGCATGTTAACTTCA
 TAGGCTTTAAGGAGGAG**TAA**

*Herbir genin başlangıç ve sonlanma kodunu, sinyal dizisi ve ribozom bağlanma bilgisi koyu ve altı çizili yazılmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğrenimini Trabzon İskenderpaşa İlkokulu'nda, Orta ve Lise öğrenimini Trabzon Kanuni Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2004-2005 öğretim yılında K.T.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2009 yılında bu bölümden mezun oldu. 2009 yılında K.T.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı ve aynı yıl K.T.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. 2012 yılında yüksek lisans öğrenimini tamamlayıp aynı yıl K.T.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında doktora öğrenimine başladı. Araştırma görevlisi kadrosu 16.07.2018 tarihinde bitmiş olup iyi derecede İngilizce bilmektedir.

Tezden Üretilmiş SCI kapsamındaki Dergilerde Yayınlanmış (veya kabul yazısı almış) Makaleler:

Ozer, A., Uzuner, U., Guler, H.I., Ay Sal, F., Belduz, A.O., Deniz, I. Ve Canakci, S., 2018. Improved pulp bleaching potential of *Bacillus subtilis* WB800 through overexpression of three lignolytic enzymes from various bacteria, Biotechnol. Appl. Biochem. 65(4), 560-571.