

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ \* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENİZLİ ACI-GÖL ÇEVRESİNDEN İZOLE EDİLEN AEROBİK  
BAKTERİLERİN KÂĞIT SANAYİNDE KULLANILABİLİR  
KSİLANAZ ENZİMİ ÜRETİMLERİ AÇISINDAN İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Cem AZERİ**

**Anabilim Dalı: Biyoloji**

**Programı: Genel Biyoloji**

**MANİSA 2009**

**DENİZLİ ACI-GÖL ÇEVRESİNDEN İZOLE EDİLEN AEROBİK  
BAKTERİLERİN KÂĞIT SANAYİNDE KULLANILABİLİR  
KSİLANAZ ENZİMİ ÜRETİMLERİ AÇISINDAN İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Cem AZERİ**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 22/05/2009**

**Tezin Savunulduğu Tarih : 25/06/2009**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. A. Üsame TAMER ( C.B.Ü. )**

**Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ ( E. Ü. )**

**: Prof. Dr. İsmail KARABOZ ( E. Ü. )**

**:Yrd. Doç. Dr. Alev HALİKİ ( E. Ü. )**

**: Yrd. Doç. Dr. İhsan YAŞA ( E. Ü. )**

**TEŞEKKÜR**

Çalışmam boyunca her türlü desteğini esirgemeyen, beni yönlendiren, değerli bilgilerinden yararlandığım danışman Hocam Sayın Prof. Dr. A. Üsame Tamer'e, fırsat buldukça kıymetli vaktini bana ayırarak önerilerini aldığım diğer tez izleme komitesi üyeleri Hocalarım Sayın Prof. Dr. Sanver Ekmekçi ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Alev Haliki'ye, ayrıca çalışmam sırasında laboratuvar aşamalarında ve tezin yazımında değerli katkılarını gördüğüm meslektaşım Dr. Mustafa Oskay' a, Fakültemiz Biyoloji bölümünden Dr. Kamuran Aktaş'a, Fakültemiz Kimya Bölümü'nden; Sayın Prof. Dr. Ali Çelik, Doç Dr. Kenan Dost, Dr. Şerif Targan, Dr. Mesut Yavuz, Dr. Avni Arslan ve Araş. Gör. Mehmet Şeker'e, teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>I</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>II</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>V</b>
<b>ÇİZEGELER DİZİNİ</b>	<b>VII</b>
<b>KISALTMALAR</b>	<b>VIII</b>
<b>ÖZET</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>1.GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAKLARIN ÖZETİ</b>	<b>2</b>
2.1. Dünya'da ve Türkiye'de Kâğıt Üretiminin Durumu	<b>2</b>
2.2. Kâğıt Hammaddesi Olarak Lignoselüloz ve Odun	<b>3</b>
2.3. Kâğıt Yapımı	<b>5</b>
2.4. Kâğıt Endüstrisi İle İlgili Çevre Sorunları ve Yeni Teknoloji Arayışları	<b>10</b>
2.5. Kâğıt Endüstrisinde Ksilanazlar	<b>13</b>
2.6. Ksilan ve Ksilanazlar	<b>17</b>
2.7. Kâğıt Endüstrisinde Kullanılacak Ksilanazlarda Aranılan Özellikler	<b>28</b>
2.8. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmalar	<b>29</b>
<b>3. MATERYAL VE METOT</b>	<b>33</b>
<b>3.1. MATERYAL</b>	<b>33</b>
3.1.1. Çalışma Alanı ve Örneklem	<b>33</b>
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Çözeltiler ve Kimyasal Maddeler	<b>34</b>
3.1.2.1. Besiyerleri	<b>34</b>
3.1.2.1.1. İzolasyon ve Kültürel Besiyerleri	<b>34</b>
3.1.2.1.2. Biyokimyasal Test Ortamları	<b>36</b>
3.1.2.2. Çözeltiler ve Diğer Kimyasal Maddeler	<b>38</b>
3.1.2.2.1. Shirling and Gottlieb İz Tuzlar Solüsyonu	<b>38</b>
3.1.2.2.2. DNS Reaktifi	<b>39</b>
3.1.2.2.3. DNS Substratları	<b>39</b>
3.1.2.2.4. Tamponlar	<b>39</b>
3.1.2.2.5. Şeker Standartları	<b>39</b>
3.1.2.2.6. Kappa Numarası Belirleme İçin Gereken Kimyasallar	<b>40</b>
3.1.2.3. Biyokimyasal Test Çözeltileri	<b>40</b>
3.1.2.4. Kimyasallar	<b>41</b>
<b>3.2. METOTLAR</b>	<b>42</b>
3.2.1. Acı Göl Suyunun Tuz ve pH'sinin Belirlenmesi	<b>42</b>
3.2.2. İzolasyon	<b>42</b>
3.2.2.1. Seyreltme Plaka Metodu	<b>42</b>

<b><i>İçindekiler devamıdır.</i></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
3.2.2.2.Sıvı Zenginleştirme Tekniği	43
3.2.2.3..Katı Zenginleştirme Tekniği	43
3.2.3. Ksilanaz ve Selülaz Aktivitelerinin Ön Belirlenmesi	43
3.2.4. İkincil Selülaz Aktivite Belirlenmesi	43
3.2.5. Büyüme Eğrilerinin Belirlemesi	44
3.2.6. Fermantasyonlar	44
3.2.7.Tarımsal Atıkların Enzim Üretiminde Kullanılması	45
3.2.7.1. Bitkisel Karbon Kaynaklar İçin Ön İşlem	45
3.2.8. Enzim Analizleri	45
3.2.9. Ksilanaz Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi	46
3.2.10. Değişik Sıcaklıklarda Ksilanaz Aktivitelerinin Belirlenmesi	47
3.2.11. Ksilanaz Termal Stabilité Özelliklerinin Belirlenmesi	47
3.2.12. Kâğıt Hamuru Denemeleri	47
3.2.12.1. Kâğıt Hamurunun Hazırlanması	47
3.2.12.2. Enzimatik Ön İşlemin Optimizasyonu	47
3.2.12.3. Kromofor Salınımının Belirlenmesi	48
3.2.12.4. Enzimatik Ön İşlem	48
3.2.12.5. Kimyasal Beyazlatma	49
3.2.12.6. Kappa Numarası Belirlenmesi	49
3.2.12.7. Delignifikasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	51
3.2.12.8. Permanganat Çözeltisinin Standardize Edilmesi	51
3.2.12.9. Beyazlatmada Kullanılacak H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Çözeltisinin Standardizasyonu	52
3.2.12.10. Kâğıt Hamurlarının Kâğıt Haline Getirilmeleri	52
3.2.12.11. Beyazlık Ölçümü	54
3.2.13. İzolatların Tanılanması	54
3.2.13.1. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi	54
3.2.13.2. Taksonomik Analizler	56
<b>4. BULGULAR</b>	<b>58</b>
4.1. İzolasyon Sonuçları	58
4.2. Besiyeri 4'deki Pasajlarında Ksilan Hidroliz Zon Çapları	60
4.3. Seçilmiş İzolatların İlk İzolasyonları İle İlgili Bulgular	62
4.4. Büyüme Eğrileri	62
4.5. Fermantasyon Sonuçları	64
4.5.1. Seçilmiş İzolatların Farklı Sıcaklıklarda Ksilanaz Üretimleri	65
4.5.2. Bitkisel substratlarda ksilanaz üretimleri	73
4.5.3. Üretilen Ksilanaz Enziminin Optimum pH, Sıcaklık Değerleri ve Termal Stabilité Özellikleri	81
4.5.3.1. Optimum pH Değerleri	81
4.5.3.2. Optimum Sıcaklık ve 60°C'de Termal Stabilité Özellikleri	82

<i><b>İçindekiler devamıdır.</b></i>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.5.4. Selülaz Aktivitelerinin DNS Metodu İle Belirlenmesi	84
4.5.5. Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Enzim Aktivitelerine Etkisi	84
4.5.6. Kâğıt Hamuru Denemeleri	85
4.5.6.1. Enzimatik Ön İşlemin Optimizasyonu	85
4.5.6.2. Kromofor Salınımının Belirlenmesi	86
4.5.6.3. Enzimatik Ön İşlemlerin Kappa Sayısı ve Beyazlık Üzerine Etkisi	87
4.5.7. İzolatların Tanılanması	90
4.5.7.1. Morfolojik ve Biyokimyasal Testler	90
4.5.7.2. İzolatların Taksonomik Pozisyonlarının Değerlendirilmesi	91
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>96</b>
5. 1. İzolasyonlar	96
5.2. Fermentasyonlar ve Ksilanaz Üretimleri	99
5.3. Enzimatik Özellikler	106
5.4. Ksilanazların Kâğıt Hamurundaki Etkinliği	109
5.5. İzolatların Tanılanması	117
5.6. Sonuç ve Öneriler	120
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>121</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 2.1</b>	Ksilem hücrelerinin çeper ince yapısı	<b>4</b>
<b>Şekil 2.2</b>	Ksilem dokusundaki lifsel hücrelerinin düzenlenişi	<b>5</b>
<b>Şekil 2.3</b>	CHEHD aşamaları tipinde bir beyazlatma işleminde işlemlerin yürütülmesi	<b>10</b>
<b>Şekil 2.4</b>	Lignin ve polisakkaritler arasındaki değişik bağlar	<b>14</b>
<b>Şekil 2.5</b>	Ksilan'ın selüloz'a bağlanımı	<b>14</b>
<b>Şekil 2.6</b>	SEM mikroskobu görüntülerinde kâğıt hamuru lif yüzeylerinde ksilanaz uygulamasının etkileri	<b>16</b>
<b>Şekil 2.7</b>	SEM mikroskobu ile daha yüksek büyütmede kâğıt hamuru lif yüzeylerinde ksilanaz uygulamasının etkileri	<b>16</b>
<b>Şekil 2.8.</b>	Ksilanaz ile enzimatik ön işlemin uygulanışı	<b>17</b>
<b>Şekil 2.9.</b>	Ksilan yapısı, çeşitli yan dalları ve değişik mikrobiyal enzimlerin etki bölgeleri	<b>20</b>
<b>Şekil 2.10.</b>	<i>B. subtilis</i> 168 izolatının XynC ve XynA enzimlerinin $\beta$ -D-1,4 metilglukrano ksilan üzerine ortaklaşa etkileri	<b>21</b>
<b>Şekil 2.11.</b>	GH10 ve GH11 ailesinden ksilanazların genel yapısı	<b>22</b>
<b>Şekil 2.12.</b>	Bakteriyel ve fungal GH11 ksilanazlarda şekilsel benzerlik	<b>23</b>
<b>Şekil 2.13.</b>	<i>Bacillus circulans</i> 1XNB ( A ) ve <i>Trichoderma harzianum</i> 1XND ( B ) ksilanaz ailesi 11 enzimlerinin, organizmaların uzak genetik mesafelerine karşın çok benzer olan üç boyutlu görünüşleri	<b>24</b>
<b>Şekil 3.1.</b>	Acı Göl çevresinden örneklerin alındığı istasyonlar	<b>33</b>
<b>Şekil 3.2.</b>	Ksiloz standartları için örnek standart eğrisi	<b>46</b>
<b>Şekil 3.3.</b>	Kâğıt yapımı için düzenek	<b>53</b>
<b>Şekil 3.4.</b>	Kâğıt yapımı bitirme işleminin şematik gösterimi	<b>53</b>
<b>Şekil 4.1.</b>	Besiyeri 6 ( NA <sub>2</sub> ) besiyerinde yapılan izolasyonda görülen koloni tipleri ve bulunma oranları	<b>59</b>
<b>Şekil 4.2.</b>	Seçilmiş ve örnek izolatların Besiyeri 4'deki pasajlarında Ksilan Hidroliz Zon çapları	<b>61</b>
<b>Şekil 4.3.</b>	Ag1, Ag20 ve Ag35 İzolatlarının Besiyeri 8 ve 35°C'de büyüme eğrileri.	<b>63</b>
<b>Şekil 4.4.</b>	Ag12, Ag13 ve Ag8 İzolatlarının Besiyeri 8 ve 35°C'de büyüme eğrileri.	<b>63</b>
<b>Şekil 4.5.</b>	Ag2 ve Ag32 İzolatlarının Besiyeri 8 ve 35°C'de büyüme eğrileri.	<b>64</b>
<b>Şekil 4.6.</b>	Ag1 izolatının besiyeri 8'de değişik sıcaklıklarda ksilanaz üretimi	<b>65</b>
<b>Şekil 4.7.</b>	Ag2 izolatının besiyeri 8'de değişik sıcaklıklarda ksilanaz üretimi	<b>66</b>
<b>Şekil 4.8.</b>	Ag8 izolatının besiyeri 8'de değişik sıcaklıklarda ksilanaz üretimi	<b>67</b>
<b>Şekil 4.9.</b>	Ag12 izolatının besiyeri 8'de değişik sıcaklıklarda ksilanaz üretimi	<b>68</b>
<b>Şekil 4.10.</b>	Ag13 izolatının besiyeri 8'de değişik sıcaklıklarda ksilanaz üretimi	<b>69</b>
<b>Şekil 4.11.</b>	Ag20 izolatının besiyeri 8'de değişik sıcaklıklarda ksilanaz üretimi	<b>70</b>
<b>Şekil 4.12.</b>	Ag32 izolatının besiyeri 8'de değişik sıcaklıklarda ksilanaz üretimi	<b>71</b>
<b>Şekil 4.13.</b>	Ag35 izolatının besiyeri 8'de değişik sıcaklıklarda ksilanaz üretimi	<b>72</b>

**Şekiller dizini devamıdır.**

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Şekil 4.14.</b> Ag1 İzolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi	<b>73</b>
<b>Şekil 4.15.</b> Ag2 İzolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi	<b>74</b>
<b>Şekil 4.16.</b> Ag8 İzolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi	<b>75</b>
<b>Şekil 4.17.</b> Ag12 İzolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi	<b>76</b>
<b>Şekil 4.18.</b> Ag13 İzolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi	<b>77</b>
<b>Şekil 4.19.</b> Ag20 İzolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi	<b>78</b>
<b>Şekil 4.20.</b> Ag32 İzolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi	<b>79</b>
<b>Şekil 4.21.</b> Ag35 İzolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi	<b>80</b>
<b>Şekil 4.22.</b> Seçilmiş izolatların ksilan ve bitkisel substratlarla maksimum ksilanaz üretimleri.	<b>81</b>
<b>Şekil 4.23.</b> İzolatların optimum pH değerleri.	<b>82</b>
<b>Şekil 4.24.</b> İzolatlara ait enzim preparatları ile zamana karşı kağıt hamurunun gramı başına açığa çıkan şeker miktarları.	<b>85</b>
<b>Şekil 4.25.</b> Kağıt hamuru işleme sonuçlarının beraber gösterimi	<b>88</b>
<b>Şekil 4.26.</b> <i>Bacillus</i> türleri ile seçilmiş İzolatların % Benzerlik dendogramı	<b>94</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 2.1</b>	CEDED aşamaları tipinde bir beyazlatma örneğinde uygulanan şartlar	<b>9</b>
<b>Çizelge 2.2.</b>	Değişik kağıt ürünlerine ait % G.E. değerleri	<b>10</b>
<b>Çizelge 2.3.</b>	Bazı <i>Bacillus</i> 'larda ksilanazların optimum pH ve sıcaklık özellikleri	<b>31</b>
<b>Çizelge 2.4.</b>	Değişik mikroorganizmalarda ksilanazların optimum pH ve sıcaklık özellikleri	<b>32</b>
<b>Çizelge 3.1.</b>	' a ' değerine bağlı, d düzeltme faktörü.	<b>51</b>
<b>Çizelge 4.1.</b>	S <sub>z</sub> – K+ özellikteki izolatların, ilk izolasyonları ile ilgili bilgiler.	<b>62</b>
<b>Çizelge 4.2.</b>	Ag18, Ag 22, Ag25 nolu izolatların fermantasyonlarında enzim üretimleri.	<b>64</b>
<b>Çizelge 4.3.</b>	İzolatlara ait kültür filtratların 35 <sup>0</sup> C 'de optimum pH özellikleri.	<b>82</b>
<b>Çizelge 4.4.</b>	İzolatlara ait kültür filtratların pH 9.0 ve değişik sıcaklıklarda belirlenen optimum sıcaklık özellikleri.	<b>83</b>
<b>Çizelge 4.5.</b>	İzolatlara ait kültür filtratlarının 60 <sup>0</sup> C ve pH 9'da termal stabilite özellikleri	<b>83</b>
<b>Çizelge 4.6.</b>	İzolatlara ait kültür filtratlarında selülaz aktiviteleri	<b>84</b>
<b>Çizelge 4.7.</b>	İzolatlara ait kültür filtratlarında değişik NaCl konsantrasyonlarındaki ksilanaz aktiviteleri.	<b>85</b>
<b>Çizelge 4.8.</b>	Değişik izolatlarımıza ait kromofor salım sonuçlar	<b>86</b>
<b>Çizelge 4.9.</b>	Kağıt hamuru enzimatik ön işlemlerinin Kappa sayısı ve beyazlıkları üzerine etkisi	<b>89</b>
<b>Çizelge 4.10.</b>	Seçilen izolatların biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri	<b>90</b>
<b>Çizelge 4.11.</b>	Endospor oluşturan Gram pozitif bakteri genuslarının ayrımı	<b>91</b>
<b>Çizelge 4.12.</b>	İzolatların daha ileri seviyede tanımlanmasında kullanılan karakterler	<b>93</b>
<b>Çizelge 4.13.</b>	<i>Bacillus</i> Türleri ile seçilmiş İzolatlarımızın % Benzerliklerinin (Dendogramlarının) Oluşturulması İşleminde Minitab Programı, Orijinal İstatistik Sonuçları.	<b>95</b>
<b>Çizelge 5.1.</b>	.Seçilmiş izolatların BW-ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretim yüzdeleri.	<b>101</b>
<b>Çizelge 5.2.</b>	Muzarını ve ark. ( 2001 ) tarafından değişik habitatlardan izole edilen fungusların ksilanaz üretim miktarları	<b>105</b>
<b>Çizelge 5.3.</b>	Bazı bakteriyel ksilanazlarla kağıt hamuru ön işlemleri sonuçları (Khandaparker and Bhosle 2006b ).	<b>117</b>

**KISALTMALAR**

<b>AOX</b>	Adsorbe olabilir Organik ksenobiyotik bileşikler
<b>ECF</b>	Elementary Chlorine Free, Cl <sub>2</sub> kullanmadan kağıt hamuru beyazlatma yöntemleri.
<b>TCF</b>	Totally Chlorine Free, Hiç bir klorlu bileşik kullanmayan kağıt hamuru beyazlatma yöntemleri.
<b>S+ K+</b>	Selülaz ve Ksilanaz pozitif
<b>S<sub>z</sub></b>	CMC ortamında selüloz hidroliz zonu
<b>S<sub>d</sub></b>	DNS testinde selüloz aktivitesi
<b>GH</b>	Glikozit Hidrolaz "enzim ailesi"
<b>CMC</b>	Karboksimetil Selüloz ( Carboxy Methyl Cellulose )
<b>DX</b>	Defined Xylan ortamı, Besiyeri 4
<b>NA</b>	Nutrient Agar
<b>İU /ml veya U /ml</b>	Mililitrede " İnternational Ünit "enzim birimi cinsinden enzim miktarı.
<b>fk hamur</b>	Fırın kurusu hamur
<b>İU (U )</b>	" İnternational Ünit " enzim birimi. Bir dakikada bir mikro mol (1/1000 mol) ürün açığa çıkaran enzim miktarı.( 0,0599 IU = 1 nkat )
<b>BWX, BW-ksilan</b>	Birch Wood Xylan
<b>SEM</b>	Taramalı elektron mikroskobu ' Scanning Electron Microscopy '
<b>NSP</b>	Selüloz harici polisakkaritler. ' non-selüloz polisakkarid '
<b>CFU</b>	İngilizce ' Colony forming unit ' kısaltmasıdır.

**TÜRKÇE ÖZET**  
**DENİZLİ ACI-GÖL ÇEVRESİNDEN İZOLE EDİLEN AEROBİK BAKTERİLERİN**  
**KÂĞIT SANAYİNDE KULLANILABİLİR KSILANAZ ENZİMİ ÜRETİMLERİ**  
**AÇISINDAN İNCELENMESİ**

**Cem AZERİ**

Doktora Tezi, Genel Biyoloji Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdurrahman Ü. TAMER  
Haziran, 2009

Ksilanazların kâğıt endüstrisindeki etkinliği endüstriyel uygulamalarla gösterilmiştir. Kâğıt endüstrisinde özellikle, termoalkofilik ve selüloz aktivitesi içermeyen ksilanazlar tercih edilmektedir. Alkali ve tuzlu bir göl olan Acı Göl izolatları, Göl örneklerinden ksilan agar plaklarında ksilan hidrolizi ve daha sonra selüloz agar plaklarında selüloz hidrolizi açısından tarama ile izole edilmişlerdir. Sekiz ksilan hidroliz edici, selüloz hidroliz zonu oluşturmayan izolat denemeler için seçilmiştir. Morfolojik ve biyokimyasal karakterlere bağlı olarak; Ag1, Ag2, Ag8, Ag12, Ag13, Ag20 Ag32 ve Ag35 izolatlarının *Bacillus* genusu üyesi oldukları belirlenmiştir.

Optimum ksilanaz üretim sıcaklığı Ag1 izolatu için 40, diğer izolatlar için 35°C olarak belirlenmiştir. İzolatların ucuz tarımsal substratlarla ksilanaz üretimi de incelenmiştir. Tüm izolatlar için maksimum ksilanaz üretimi ticari birch wood ksilan ile elde edilmiştir. Ancak bu oran tarımsal substratlarla ksilanaz üretimleriyle karşılaştırıldığında aradaki farkın önemsenmeyecek derecede az olduğu görülmüştür.

Sekiz izolatuın ham kültür filtratlarında optimum ksilanaz aktiviteleri pH 9.0 ve 60°C olarak belirlenmiştir. İzolat Ag1 hariç diğer izolatların ham kültür filtratlarında ksilanaz aktivitesinin pH 9.0 ve 60°C'de bir saat sürede kayba uğramadığı görülmüştür. DNS testi ile Ag2, Ag8 ve Ag35 izolatlarının ham kültür filtratlarında düşük miktarda selüloz aktivitesi belirlenirken; Ag12, Ag13, Ag20 ve Ag32 izolatlarının ham kültür filtratlarında belirlenebilir düzeyde selüloz aktivitesi görülmemiştir. Ag12, Ag20 ve Ag32 izolatları, kâğıt hamuru beyazlatmadaki etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla kraft hamuru denemeleri için seçilmiştir. Kâğıt hamurlarının ksilanaz ön işlemleri pH 9.0, 60°C ve 10 IU ksilanaz /g fk-hamur şartlarında gerçekleştirilmiştir. Ksilanaz ön işlemlerinde Ag12 ve Ag13 izolatlarının ham kültür filtratları ile 1.8 mg / g fk-hamur indirgen şeker salımı, Ag32 ve Ag20 izolatlar için ise, sırası ile 2.7 ve 3.6 mg / g fk-hamur indirgen şeker salımı elde edilmiştir. Ksilanaz ile işlem görmüş kâğıt hamurları ve enzimatik işlem görmemiş kontrol hamuru EDTA-peroksit kimyasal beyazlatma işlemine tabi tutulmuştur. %1'lik EDTA işleminden sonra, kâğıt hamurları %1 NaOH, % 2.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, %5 hamur kesafetinde 70°C'de 80 dakika süreyle kimyasal beyazlatmaya tabi tutulmuşlardır. Kimyasal beyazlatma sonrasında Ag32, Ag20 ve Ag12 izolatları için kontrole kıyasla, sırası ile 7.32, 5.99, 2.67 kappa sayısı düşüşü, yine sırası ile kontrole göre beyazlık artışları 3.0, 1.5 ve % 1 ISO daha yüksek elde edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Ksilanaz, Selüloz, Kâğıt Hamuru, *Bacillus*, İzolasyon, Acı-Göl, Alkalifilik, Termofilik, Bitkisel Substrat.

**ABSTRACT**

**İNVESTİGATION OF AEROBİC BACTERİA THAT ISOLATED FROM DENİZLİ  
ACIGÖL LAKE IN TERMS OF THEIR PRODUCTIONS OF XYLANASES USEABLE  
IN PAPER INDUSTRY**

**Cem AZERİ**

Ph.D. Thesis in General Biology  
Supervisor: Prof. Dr. Abdurrahman Ü. TAMER  
June, 2009

The effectiveness of xylanases as a prebleaching agent in pulp and paper industry has been established on a commercial scale. Especially, thermoalkalophilic and cellulase-free microbial xylanases are preferred in the pulp and paper industry. The strains from samples of alkaline and salty Acı Göl lake, were isolated by screening for xylanolysis on xylan agar media and then screened for cellulase hydrolysis on solid media containing carboxy methyl cellulose. Eight xylan hydrolyzing and not cellulose hydrolysis zone producing isolates were selected. The selected bacterial strains Ag1, Ag2, Ag8, Ag12, Ag13, Ag20, Ag32 and Ag35 were characterized and identified based on morphological, biochemical and physiological characters as belonging to the genus *Bacillus*.

Optimum xylanase production temperatures evaluated as 40°C for Ag1 and 35°C for other seven isolates. Xylanase production of isolates in low-cost agriculture substrates, were also investigated. Maximum xylanase production of all isolates obtained by commercial birch wood xylan. Nevertheless, the xylanase productions by agriculture substrates were only negligible degree low, comparing the commercial xylan.

Optimum xylanase activities determined as 60°C and pH 9,0 for all eight isolates. Except isolate Ag1, crude culture filtrates of isolates were fully stable for one hour at 60°C and pH 9.0. By the DNS method, low amounts of cellulase activity determined in the crude culture filtrates of Ag2, Ag8 and Ag35, the crude culture filtrates of isolates Ag12, Ag13, Ag20 and Ag32 did not show any detectable cellulase activity by the DNS method. Isolates Ag12, Ag20 and Ag32 were selected for kraft pulp experiments to evaluate their efficiency in pulp bleaching. Xylanase pretreatment was carried out at pH 9.0, 60°C and 10 IU xylanase / g od-pulp conditions. In the Xylanase pretreatments, with crude culture filtrates of Ag12 and Ag13, equally 1,8 mg / od-pulp reducing sugar release obtained. And for Ag32 and Ag20, 2,7 and 3,6 mg / od-pulp educing sugar release obtained, respectively. Xylanase-treated samples and un-enzyme treated control pulp were bleached with EDTA-peroxide bleaching sequence. After EDTA ( %1 ) treatment, pulps were chemically bleached at %1 NaOH, %2,5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, %5 pulp consistency and 70°C for 80 minutes. After chemical bleaching, comparing the control, 7.32, 5.98, 2.67 kappa number reduction obtained for isolates Ag32, Ag20 and Ag12 respectively. The brightness of bleached pulps for isolates Ag32, Ag20 and Ag12 were 3.0, 15 and 1.0 % ISO higher than control pulp, respectively.

**Keywords:** Xylanases, Cellulase, Paper Pulp, *Bacillus*, Isolation, Salty Lake, Alkalophilic, Thermophilic, Waste Agricultural Substrates.

## 1. GİRİŞ

Farklı kullanım alanları için farklı tiplerde üretilen kâğıt gelişmiş toplumlar için vazgeçilmez bir üründür. Kâğıt endüstrisi önde gelen büyük sanayi kollarından birisidir ve kâğıt üretimi toplumun kültürel gelişimi ile sürekli artış göstermektedir.

Kâğıt yapımında önemli miktarda çevreye zararlı atıklar oluşmaktadır. Atık miktarı, kâğıt üretimindeki artış ile paralel olarak sürekli artmaktadır. Geleneksel kâğıt üretiminde, özellikle kâğıt hamuru beyazlatma aşamasında klorlu beyazlatıcı kimyasalların kullanılması sonucu açığa çıkan atıkların bir kısmı toksik, kanserojen, doğal ortamda kolay bozulmaya uğramayan ve canlı dokularda birikebilen maddelerdir. Son zamanlarda sürdürülebilir gelişmenin sağlanması ve çevrenin korunarak gelecek nesillere aktarılması konusunun önem kazanması sonucu oluşan toplumsal ve yasal baskılar nedeni ile kâğıt endüstrisi atıklarının azaltılması için değişik, yeni alternatif yöntemlerin geliştirilmesi konusunda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Önerilen alternatif yöntemlerden biri de kâğıt beyazlatma aşaması öncesinde ksilanaz enzimlerinin kullanılmasıdır. Bu konuda son zamanlarda bakteriyal ksilanazların kullanımı giderek önem kazanmaktadır.

Kâğıt yapımında özellikle yüksek sıcaklık ve alkali şartlarda etkinliğini koruyan ve selülaz aktivitesi içermeyen ksilanazlar aranmaktadır. Denizli Acı Göl gibi alkali göller, istenen bu özelliklere sahip ksilanaz üretici mikroorganizmaların izole edilebileceği Dünya'da az rastlanan özel habitatlardır. Bu nedenle çalışmamızda Denizli Acı Göl'den alkali şartlarda üreyebilen ve etkin ksilanaz enzimi üretici bakteri izolatlarının eldesi ve son olarak bunlara ait ksilanaz enzimlerinin özellikleri ile kâğıt hamuru üzerindeki etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Türkiye'de yer alan alkali göllerde benzer bir çalışmanın yapılmamış olduğu görülmüştür. Çalışmamız ile bu konudaki bilgi açığı giderilmeye ve ilgili konuda daha sonra yapılacak çalışmalar için ön bilgiler elde edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAKLARIN ÖZETİ

### 2.1. Dünya'da ve Türkiye'de Kâğıt Üretiminin Durumu

Kâğıt, kültürel ve sanayi alanındaki kullanımı ile günümüzün en önemli ihtiyaç maddelerinden biridir. Bu yönüyle kâğıt bir uygarlık ölçüsü ve kişi başına tüketilen kâğıt miktarı refah ve eğitim düzeyinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Elektronik kayıt sistemlerinin hızla yaygınlaşmış olmasına rağmen kâğıdın öneminde bir azalma olmamıştır. Kâğıt endüstrisi en eski endüstrilerden biri olup halen dünyanın en büyük 5 endüstrisi olan demir-çelik, tekstil, kâğıt, organik kimyasallar ve petrokimya endüstrileri içinde üçüncü sırayı almaktadır ( Gavcar ve diğerleri 1999, Rousu et al. 2002 ). Türkiye'de kişi başına yıllık kâğıt tüketimi 1936'da 1.8 kg iken 1995'de 21 kg'a çıkmıştır. 1994'de Dünya kâğıt üretimi yılda 269 milyon tona ulaşmıştır. Kişi başına yıllık kâğıt Avrupa'da 96.5 kg., Dünya ortalaması ise 47.7 kg'dır ( Arıt 1997 ). 1980 Yılında ABD'de kişi başına yıllık kâğıt ve karton tüketimi 272 kg, İngiltere'de ise 122 kg olmuştur ( Bostancı 1987 ).

Kâğıt üretimi büyük miktarda doğal kaynak tüketimine neden olmaktadır ( Rousu et al. 2002 ). Bu nedenle Zengin orman kaynağına sahip olan İskandinav ülkeleri gibi kuzey ülkeleri, Dünya kâğıt ürünleri pazarında egemen durumdadır.

1999 yılında, Türkiye'de 7'si kamu sektörüne, 33'ü özel sektöre ait olmak üzere toplam 40 kâğıt ve karton işletmesinin üretim faaliyetlerini sürdürmekte olduğu bildirilmiştir. 2005 yazında SEKA fabrikalarının özelleştirilmesinin tamamlanması, Türkiye'de kâğıt üretimi için bir dönüm noktası olmuştur. Bu ve gelişmeden sonra Türkiye'de kâğıt hamuru ve kâğıt neredeyse tamamen mamul olarak ithal edilir duruma gelmiştir. Türkiye kâğıt hammaddesi olan ağaç bakımından çok zengin değildir. Ancak kâğıt üretimi konusunda bazı gelişmeler olmaktadır. SEKA Dalaman fabrikasını alan ve yılda 12–13 milyon dolarlık okalıptüs odunu ithal etmekte olan Mopak A.Ş. Muğla'da yerli hammadde kaynakları geliştirme planı yapmaktadır. Bu amaçla her yıl 500 bin dolarlık kaynak ayrılması planlanmıştır ve 240 hektar alana okalıptüs fidanı dikimi için başvurulmuştur. Okalıptüs ağacı üretiminin Türkiye'de üretilen zeytin, pamuk gibi ürünlerine göre, dekar başına daha çok kazandırdığı belirtilmiştir ( Altundağ 2004 ).

Daha ileriki kısımlarda üzerinde durulacağı gibi, kâğıt endüstrisi atıklarının yol açtığı çevre ve insan sağlığını tehdit edici kirlilik karşısında kamunun tepkileri ve yeni kanuni zorlamalar nedeni ile ksilanaz enzimlerinin kullanımını da içeren yeni alternatif beyazlatma teknolojileri geliştirilmektedir. Türkiye'de yerli hammaddeye dayalı kâğıt üretimine dönme planları yapılmaktadır. Türkiye, çevre ile ilgili bazı uluslararası anlaşmalara taraf olmuştur. Ayrıca Avrupa Birliği çevre kriterlerine uyum çalışmaları yapılmaktadır. Bu nedenle kâğıt endüstrisinin yol açtığı çevre sorunlarını azaltıcı yeni teknolojilere önem verilmesi gerekmektedir.

## 2.2. Kâğıt Hammaddesi Olarak Lignoselüloz ve Odun

Günümüzde kâğıt ve karton üretiminde çam gibi iğne yapraklı, uzun elyafli ağaçlar ve kayın, kavak, okaliptüs gibi geniş yapraklı ve daha kısa elyafli ağaçlar ile keten, buğday samanı, mısır sapı, kamışlar gibi kısa elyafli yıllık bitkilerden hammadde olarak faydalanılmaktadır ( Tamerler 2001 ). Ancak, kâğıt endüstrisinde temel hammadde ağaç odunlarıdır ( Greil 2001 ). Dünya'daki kâğıt hamurunun % 5 – 11 kadarı ağaç olmayan bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir. Bu tip hamur üretimi genellikle orman kaynakları sınırlı olan gelişmekte olan ülkeler için önemlidir. Çin % 90, Hindistan % 48 kâğıt hamurunu ağaç olmayan bitkisel kaynaklardan elde etmektedir ( Stanley 1996 ). Odun; selüloz, hemiselüloz, lignin ve pektince oluşturulan lignoselülozik yapıdadır. Kâğıt endüstrisinde kullanılan odunlar, sert odun olarak adlandırılan geniş yapraklı Angiosperm odunları ve yumuşak odun olarak adlandırılan, genelde reçineli olan çam gibi iğne yapraklı Gymnosperm ağaç odunları olarak iki guruba ayrılmaktadır. Her iki gurup odunda bazı farklılıklara karşın selüloz % 40–50, lignin % 20–35, hemiselüloz % 25–35, pektin % 1–2 oranında bulunur ( Bostancı 1987 ). Dünya'daki biyomasın ve karbonun çoğunluğunu bu üç polimer oluşturmaktadır ( Greil 2001 ).

Bitki hücre duvarının, odunun ve kağıdın temel bileşeni olarak selülozu düşünmek gerekir. Selüloz, çok sayıda D-glikoz birimlerinin 180 derecelik dönüş ve komşu selüloz moleküllerinin 1.ve 4. karbonları arasındaki  $\beta$  bağlanımı ile oluşan bir polimerdir. Bu şekildeki bağlanım spiral şekilde olan amilozdaki  $\alpha$  bağlanımının tersine selülozun doğrusal bir şekle sahip olmasına neden olur. Paralel selüloz molekülleri hidrojen bağları ile demet şeklinde birleşerek selüloz mikrofibrillerini oluştururlar. Selüloz mikrofibrilleri birleşerek selüloz fibrillerini oluşturur. Selüloz fibrillerinin oluşturduğu ağ, bitki hücre duvarının en temel elemanıdır ( Bostancı 1987 ).

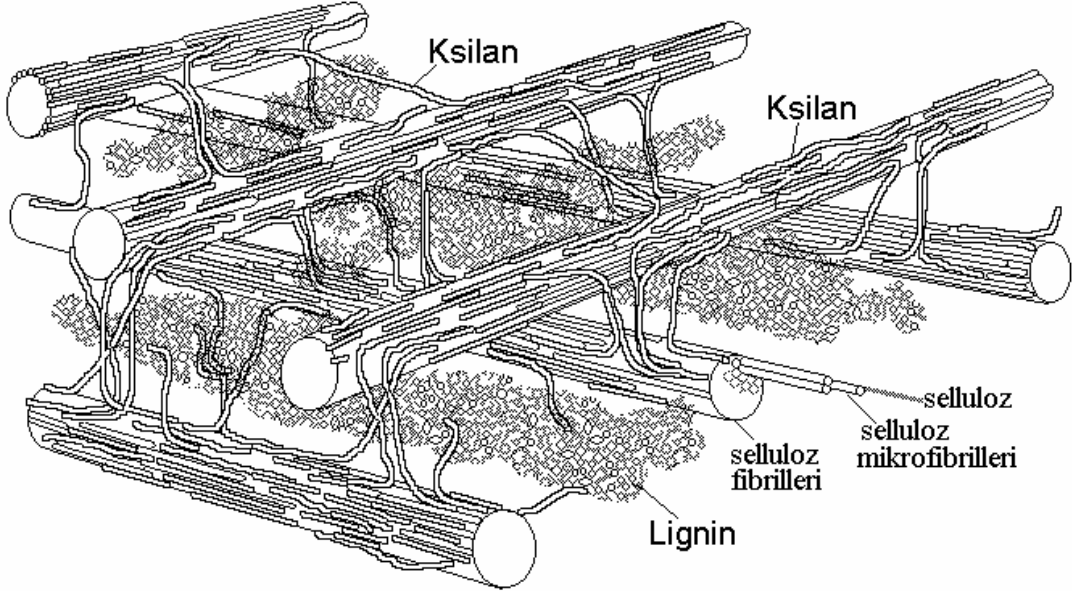
Odunlaşmış bitki dokularında hücre duvarı temel hemiselüloz tipi olan ksilan, hem ağaç odunlarında hem de otsu bitkilerde selüloz harici polisakkaritlerin en önemli ve en yüksek oranda bulunanıdır ( Bostancı 1987, Greil 2001 ). Ksilanı daha az oranda bulunan pektin izler ( Beg et al. 2001 ). Ksilanın Temel monomeri D-ksilozdur.  $\beta$ -1,4-glikozidik bağlantılı D - ksilopiranozil ünitelerden oluşan Ksilan ana omurgası değişik yan dalların bağlanması ile çeşitlenir. Değişik bitkisel kaynaklarda yan dalların farklılığına bağlı olarak farklı ksilan tipleri oluşmaktadır ( Shallom and Shoham 2003 ).

Monomerleri arasında  $\beta$  bağlanımı bulunan ksilan molekülleri de selüloz gibi doğrusal bir yapıdadır. Ksilan, selüloz mikrofibrillerine, genelde onlarla paralel doğrultuda olacak şekilde hidrojen bağları ile bağlanmaktadır. Ksilanlar bitki hücre duvarının morfogenezinde önemli role sahiptirler. Bitki hücre duvarı oluşumu sırasında, glukronik asit yan dalları içeren glukranoksilan tipindeki ksilanın, lignin oluşumu öncesinde selüloz mikrofibrillerinin üzerini sıkıca saracak şekilde olduğu, negatif yüklü olan glukronik asitlerin karboksilik asit gurupları arasındaki itmenin paralel selüloz mikrofibrillerinin birbiri üzerinde yığılmalarını engelleyerek, arada yeterli açıklığın kalmasına ve daha sonra oluşan lignin şekillenmesinde de rol oynadığı belirlenmiştir.

Değişik odunsu ve otsu bitkilerdeki arabinoksilanlar ile glukomannanlar gibi değişik dominant hemiselüloz tipleri de muhtemelen aynı modele uygun işlevlerde rol oynamaktadırlar (Srinivasan and Rele 1999, Reis and Vian 2004 ). Ksilan bitki hücre duvarının gerilmelere karşı esnek bir yapı göstermesinde de rol oynar ( Morris et al. 2004 ).

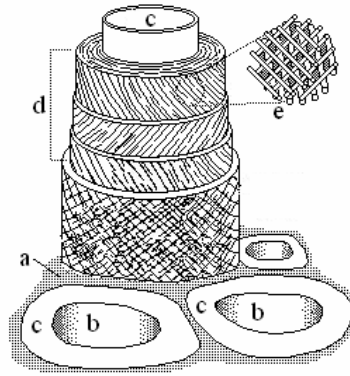
Lignin genel olarak fenolik yapıdaki temel birimlerden oluşan karışık bir yapıya sahiptir ( Greil 2001 ). Lignin oranı, bitki hücre duvarının iç kısmından en dışta yer alan orta lamel doğru artar ve orta lamelde en yüksek seviyeye erişir. Orta lamel bitki hücrelerinin birbiri ile temasta olduğu ve birbirine yapıştığı tabakadır ( Bostancı 1987 ). Lignin oduna sertlik ve direnç kazandırır. Karasal bitkilerin dik durabilmesini sağlar.

Ksilan ve diğer hemiselülozlar bitki hücre duvarında lignin ve selüloz Mikro fibrilleri arasındaki kısımlarda yer alırlar ( Beg et al. 2001 ). Ksilan molekülleri, yan daları üzerinden lignin ile kovalent bağlar aracılığı ile bağlantılıdır. Ksilan aynı zamanda selüloz mikro fibrilleri ile daha çok kovalent olmaya bağlantılar yapabilmesi nedeni ile bitki hücre duvarının bütünlüğünün korunmasında önemlidir ( Srinivasan and Rele 1999, Greil 2001 ). Altında kalan selüloz demetlerinin üstünde bir örtü oluşturan Ksilan, selüloz demetlerinin birbirleri ve lignin ile bağlantısını sağlamaktadır. Bu temel bileşenlerinin organizasyonu odunun özelliklerinin oluşmasına neden olur. Şekil 2.1'de kilem hücrelerinin hücre duvarındaki temel biyo-polimerlerin düzenlenişi gösterilmiştir. Ksilem dokusunda yer alan lifsel hücrelerin düzenlenişi ise Şekil 2.2'da gösterilmiştir.



**Şekil 2.1.** Ksilem hücrelerinin çeper ince yapısı. Ksilem hücresi çeperinin temel elemanı demet halinde selüloz polimerlerinin oluşturduğu selüloz mikro fibrilleridir. Her çeper tabakasının mikro fibrilleri birbirlerine paralel olup diğer komşu tabakaların mikro fibrilleri ile açı yapacak doğrultudadır. Ara kısımlar lignin ile doludur. Mikro fibrillerin üzerinde yoğun olarak ksilan bulunur. Ksilanlar mikro fibrilleri ve lignini birbirlerine bağlar. Pektin gibi az miktarda bulunan maddeler şekilde göz ardı edilmiştir ( orijinal )





**ŞEKİL 2.2.** Ksilem dokusundaki lifsel hücrelerinin düzenlenişi. Orta lamel ( a ), ksilem hücrelerinin lümeni ( b ) ve çeperleri ( c ). Ksilem hücrelerinin çeper tabakaları ( d ). Farklı doğrultudaki selüloz fibrillerinden oluşan çeper tabakalarının üst üste gelmesi ile oluşan örgüsel yapı ( e ). ( Atik ve diğerleri 2002'den ).

Yapısında yer alan temel biyo-polimerlerden farklı olarak odunlar, su içinde biyolojik yıkıma uğramadığı sürece bozulmadan uzun süreler yapısını korumaktadır. Bu durum odun yapısındaki temel biyo-polimerlerin mikro düzeydeki özel düzenlenişinin bir sonucudur. Ayrıca, bu yapılanma biyolojik parçalanmaya karşı direnç kazandırır ( Beg et al. 2001 ).

### 2.3. Kâğıt Yapımı

Kâğıt üretiminde enzimlerin kullanımı konusuna girmeden önce kâğıt üretim tekniklerinin tanınmasında fayda bulunmaktadır. Kâğıt, sulu çözelti halindeki kâğıt hamuru liflerinin kuruma sırasında kimyasal olmayan bağlarla birbirine bağlanması ile oluşan levha şeklinde bir üründür. Kâğıt yapmak için ilk önce hammaddenin kâğıt hamuru haline getirilmesi gerekir. Kâğıt hamuru bitkilerin odunsu kısımlarına ait hücresel liflerin sulu ortamda birbirinden bağısız halde bulunduğu ve yoğun iken hamur kıvamında olan bir yapıdır. Kaliteli bir Kâğıt, temel olarak ligninden arındırılmış selülozdan oluşur. Ancak buradaki selüloz, selüloz molekülleri veya selüloz mikrofibrilleri olmayıp tüp şeklindeki lifsel ksilem hücreleridir. Kâğıt hamurunu oluşturan lifsel ksilem hücrelerinin hücre çeperinde yer alan selüloz fibrillerinin oluşturduğu örgüsel yapı bozulmamış durumdadır. Kâğıt hamuru eldesi için önce hücresel liflerin serbest hale geçmesi gerekmektedir ( Bostancı 1987 ).

Kâğıt hamuru eldesi için değişik yöntemler uygulanmaktadır. Odun, rafinör denen aletlerde mekanik kuvvet uygulaması ile liflere ayrılabilir. Bu tip kâğıt hamuru elde işlemleri mekanik yöntemler olarak adlandırılır. Odunun 150 – 180°C sıcaklık ve kimyasal maddeler ile yumuşatılmasından sonra mekanik kuvvet uygulaması ile lifdirmenin yapıldığı yöntemler yarı kimyasal veya termomekanik kâğıt hamuru yapımı olarak adlandırılır. Sıcaklık ve alkali, hidrojen bağlarının zayıflamasına ve ligninin daha yumuşak bir hale gelmesine sebep olmaktadır. Bu tip yöntemlerde kâğıt hamurlarının lignin içeriği çok yüksek olduğundan liflerin birbirine yapışma

özellikleri zayıf olup yüksek derecede beyazlatılmaları da mümkün olmadığından bu tip hamurlar genelde karton ve mukavva gibi kaba ürünlerin yapımında kullanılabilir, belli oranda gazete kâğıtlarına katılabilirler. Geçmişte Balıkesir SEKA kâğıt fabrikası bu tip üretimde bulunmuştur. Ancak, bu tip ürünlerin yapımında beyazlatılmamış kraft hamuru kullanımı da yaygındır.

Kâğıt hamuru eldesinde en çok kullanılan yöntemler kimyasal kâğıt hamuru elde yöntemleridir. Bu yöntemler daha çok ligninin giderilmesine yöneliktir. Odunu oluşturan hücresel lifler büyük oranda ligninden oluşan orta lamel ile birbirlerine sıkıca bağlıdır. Lignin hem odunun hamur haline gelmesinde hem de kâğıt yaparken liflerinin birbirine bağlanmasında en büyük engeldir. Lignin ayrıca kâğıda sert ve kaba, kırılğan özellik kazandırır. Kimyasal kâğıt hamuru elde yöntemlerinde temel işlem, yongalar haline getirilmiş odunun kimyasal çözelti içerisinde basınç ve sıcaklık uygulanarak pişirilmesidir. Kimyasal yöntemlerle kâğıt yapımının önemli aşaması olan pişirme veya hamur elde etme “pulping” işleminde temel amaç ligninin hedeflenen belli bir derecede uzaklaştırılması olduğundan pişirme işlemine delignifikasyon da denmektedir. Ligninin uzaklaştırılması ile odun lifleri kendiliğinden serbest hale geçerek kâğıt hamuru ( İngilizce ‘ pulp ’ ) oluşur ( Bostancı 1987 ).

Kimyasal yöntemlerle kâğıt yapımı beş temel aşama olarak gururlandırılabilir Her aşama çok değişik şekillerde gerçekleştirilebilir.

1. Kabukların soyulması ve odunun ufak yongalar haline getirilmesi

2. Pişirme veya hamur eldesi ( pulping ) aşamasında, yongalar haline getirilmiş odun değişik kimyasallarla beraber ısıtılır. Bu aşamada asıl amaç ligninin çoğu kısmını uzaklaştırmaktır.

3. Beyazlatma, Pişirme ve sonrasında yapılan alkali yıkamadan sonra hala hamurda kalmış olan bir kısım ligninin giderilip istenilen bir beyazlatmanın elde edilmesi için yapılan işlemlerdir.

4. Yıkama ile hamur içindeki artık beyazlatıcı maddeler uzaklaştırılır. Yıkamada kullanılan sıvı genelde kostik ile alkalileştirilmiştir. Yıkama solüsyonu hamurdaki renkli maddeleri de giderir. Beyazlatma genelde aşamalar halinde yapıldığından her aşamadan sonra alkali bir yıkama yapılır ve bu yıkama aşamalarına alkali ekstraksiyon ( veya E aşaması ) denir.

5. Kâğıt hamurunun kâğıt haline dönüştürülme aşaması

Kimyasal kâğıt hamuru yapımı iki temel yöntem ile gerçekleştirilir. Bu yöntemler sülfat ve sülfat ( genelde kraft yöntemi olarak geçmektedir ) kimyasal yöntemleridir ( Muna and Sreerishnan 2001 ).

Sülfat kimyasal yöntemi ile kâğıt hamuru eldesinde odun yongaları SO<sub>2</sub> içeren çözeltilde, yüksek sıcaklık ve basınç altında pişirmeye tabi tutulur. Genelde SO<sub>2</sub> yanında Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> içeren pişirme çözeltisi kullanılır. Özellikle reçineli odunlar kullanılıyorsa işlem ilerledikçe önemli miktarda asitleşme gerçekleşir. Asit çok yüksek değerlere ulaşırsa hem selüloza hem de kazanlara zarar verir. Yöntem 1866'da bulunmuştur ancak halen yüksek beyazlıkta kâğıtların eldesinde çok kullanılan yöntemdir. Elde edilen hamur beyazlatılmaya tabi tutulmadan önce bile oldukça açık renklidir. Sülfat kimyasal yöntemi ile geniş yapraklı ağaçlardan kâğıt hamuru elde

edilebilir iken, yüksek asit oluşumu nedeni ile çam gibi reçineli ağaçlardan faydalanılamamaktadır. Selüloz kaybının ve pişirme süresinin yüksek olması, hamurun yapışkan olup zor işlenmesi, asit oluşması sonucu oluşan korozyon, tesislerin kurulmasının pahalıya mal olması, kimyasalların geri kazanılamaması, yöntemin önemli bazı dezavantajlarıdır. Sülfite kimyasal yöntemi Dünya çapında ikinci olarak en çok kullanılan kâğıt hamuru elde yöntemidir ( Bostancı 1987 ).

Sülfite yöntemi veya yaygın olan diğer adı ile kraft yöntemi, sülfite yönteminden daha sonra 1884 yılında bulunmuştur. Sülfite kimyasal yöntemi ile kâğıt hamuru eldesinde odun yongaları yüksek alkali ortamda sodyum sülfür (  $\text{Na}_2\text{S}$  ), sodyum hidroksit (  $\text{NaOH}$  ) ve  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  içeren çözeltide yaklaşık  $170^\circ\text{C}$ 'de 2 saat pişirmeye tabi tutulur. Yöntemin adı, pişirme çözeltisi için gerekli kimyasalların elde edildiği yakma fırınlarına eklenen sodyum sülfattan gelmektedir. Dünya'da en yaygın olarak kullanılan kimyasal kâğıt hamuru elde etme yöntemidir. Sülfite yönteminin sülfite yöntemine bir üstünlüğü, pişirme işlemi sonuca açığa çıkan ve siyah likör ( black liquor ) denen çözeltinin fırınlarında yakılması ile kullanılmış kimyasalların tekrar geri kazanılabilesidir. Bu şekilde geri dönüşümü sağlanmış kimyasalların çözüldüğü sıvıya beyaz likör denilir ve pişirme sırasında tekrar kullanılır. Ayrıca kraft hamurlarında selüloz kaybı sülfite yöntemine göre daha düşük olup mamulün direnç özellikleri de çok daha yüksektir. Lignin kalıntısı % 3,6 kalacak şekilde pişirilmiş sülfite hamurunda % 9,8 selüloz kaybedilmiş iken, aynı miktar lignin kalıntısı kalacak şekilde pişirilmiş sülfite hamurunda % 16,1 selüloz kaybedilmiş olmaktadır. Kraft yönteminin geliştirilmesi ile ilk defa çam gibi reçineli ağaç odunlarından kâğıt elde edilebilme olanağı doğmuştur. Ancak, kraft yöntemi ile elde edilen hamurların rengi sülfite hamuruna kıyas ile daha koyudur, buna karşın, kraft hamurları, sülfite yöntemine göre biraz daha fazla beyazlatma işlemi ile yüksek beyazlık derecelerine kadar beyazlatılabilmektedir ( Bostancı 1987 ).

Kraft hamuru edesinde hücrese lifleri bir arada tutan orta lamel ve primer çeper lignini, suda çözünen tiolignin gibi bileşiklere, sülfite hamuru pişirme işlemlerinde ise lignosülfanatlara dönüşür. Pişirme aşaması sonucunda oluşan suda çözünen bu gibi lignin kökenli maddeler ve polimerize taninler nedeniyle kâğıt fabrikası atıkları koyu renklidir ( Subramaniyan and Prema 2000 ). Normal bir kraft pişirme işlemi ile ligninin tamamı uzaklaştırılmaz ( Bostancı 1987 ). Yaklaşık toplam ligninin %90-95'i yıkıma uğrayıp çözüldükten sonra geri kalan ligninin çözülmesi azalmakta ve kalıntı lignin denilen bir kısım lignin kâğıt hamurunda kalmaktadır ( Archibald et al. 1997, Uner 2003 ). Değişik yöntemlerle ve en iyi şartlarda elde edilen hamurlar bile, her zaman bir miktar renklidir. Lignin kalıntıları ve pişirme sırasında değişime uğramış lignin yapıları, pişirme işleminden çıkan kâğıt hamurundaki koyu kahverenginin temel sorumlusu olarak kabul edilmektedir ( Bostancı 1987, Tamerler 2001 ). Kimyasal hamur elde etme yöntemlerindeki pişirme işlemi sonunda elde edilen hamurun rengi genelde, lignini uzaklaştırmadan gerçekleştirilen mekanik hamur elde etme yöntemlerinden daha koyudur. Bunun nedeni kimyasal hamur elde yöntemlerinde lignin çoğunun uzaklaştırılmasına karşın bir kısım kalıntı ligninin pişirme kimyasalları ile reaksiyona girip okside olarak ışığı şiddetle absorbe eden koyu renkli bileşikler oluşturmasıdır. Daha açık renkli olmalarına karşın, mekanik

yöntemlerle elde edilen hamurların beyazlatılması ekonomik değildir ve yüksek derecede beyazlıklara kadar ağartılamazlar. Bu nedenlerle beyaz kâğıt elde edebilmek için beyazlatma veya ağartma “ bleaching ” denilen işlemlere gerek duyulur. Ksilanazların kâğıt sanayinde kullanımı genelde ağartma işlemi ile ilişkili olduğundan ağartma konusu bu açıdan önem kazanmaktadır ( Bostancı 1987 ).

Beyazlatma veya ağartma, Pişirme sonrasında hala hamurda kalmış olan bir kısım ligninin ve renk oluşturu maddelerin giderilip istenilen bir beyazlatmanın elde edilmesi için yapılan ve hamur eldesi işlemine göre çok daha pahalı işlemlerdir ( Bostancı 1987 ). Kâğıt hamurunun beyazlığı, kalıntı ligninin miktar ve kimyasal yapısı ile ilişkilidir iyi kaliteli beyaz kâğıdın yapılması lignin ve lignin parçalanma ürünlerinin giderilmesi ile sağlanabilir ( Subramaniyan and Prema 2002 ).Kâğıt hamuru ağartma işlemlerinin selüloza zarar vermeden gerçekleştirilmesi gerekmektedir ( Üner 2003 ).

Beyazlatma, ağartıcı denilen kimyasallar kullanılarak yapılır. Ağartıcı kimyasalların başlıcalarını oluşturan klor temelli beyazlatıcılar, klor gazı ( $Cl_2$ ), hipoklorit ( $NaClO$ ), klorit ( $NaClO_2$ ), klor dioksit ( $ClO_2$ ) ile Oksijen temelli beyazlatıcılar olan sodyum peroksit ( $Na_2O_2$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve ozon ( $O_3$ ) gibi maddelerdir. ( Bostancı 1987, Tezel ve diğerleri. 2001 ). Beyazlatma aşamaları genelde kullanılan kimyasal maddeye göre adlandırılır. Beyazlatma aşamaları ile ilgili olarak kullanılan ve aşamaları simgeleyen başlıca kısaltmalar C, klor gazı ( $Cl_2$ ); D, klor dioksit ( $ClO_2$ ); E, alkali ekstraksiyon ( $NaOH$ ); H, hipoklorit ( $NaOCl$ ); CD, klor gazı ve klor dioksit; Eo, alkali ekstraksiyon ve oksijen kullanımı; O, oksijen gazı olarak; A, asit; P, hidrojen peroksit; X, ksilanaz uygulaması olarak verilebilir ( Bostancı 1987 ). Beyazlatma genelde aşamalar halinde yapıldığından her aşamadan sonra alkali bir yıkama ( alkali ekstraksiyon, E aşaması ) yapılır. Yıkama sıvıları genelde kostik ile alkalileştirilir. Yıkama ile hamurdaki renkli maddeler ve artık kimyasal maddeler uzaklaştırılır. Beyazlatmadan önceki pişirme işlemi sonunda da bir yıkama işlemi yapılır. ( Muna and Sreekrishnan 2001 ).

Ağartmada kullanılan kimyasalların genelde selüloz üzerine de konsantrasyon, pH ve sıcaklık gibi uygulama şartlarına da bağlı olarak az veya çok yıkıcı etkisi bulunmaktadır. Bu nedenle Tek bir aşama halinde ağartma yapılması selüloz üzerinde oldukça fazla yıkıma sebep olduğundan ağartma işlemleri genelde çok fazla alternatifi olan ve ard arda gelen birçok aşama halinde yapılır. Örneğin çok iyi bir beyazlatıcı olan klor gazı belli miktarlardan ve yoğunluktan fazla kullanıldığında selüloza da zarar verir. Ayrıca tek bir beyazlatıcı kullanılarak yüksek derecede beyazlıklar elde edilemez ( Bostancı 1987 ). Çoğu kâğıt fabrikalarında beyazlatma işlemlerinde, kurulum maliyeti biraz daha yüksek olan çok aşamalı işlemlerin tercih edilmesinin en önemli diğer sebepleri, düşük kimyasal tüketimi ve bariz bir esnekliğin oluşmasıdır. Beyazlatma aşamalarının sayısı azaldıkça işlemin kontrolü zorlaşmakta ve riskler de artmaktadır ( Anonim 5 2003 ). Beyazlatma aşamalarındaki farklılıklar nerdeyse işletmeye bağlı olarak değişecek kadar çoktur. Benzer aşama sıralarını izleyen işletmelerde bile en azından uygulama şartlarında farklılıklar görülebilmektedir ( Bostancı 1987 ).

Elementer klor ( $Cl_2$ ) kâğıt hamuru için en etkili beyazlatıcı maddedir. Klor, Lignin ile değişik şekillerde reaksiyona girer. Klorun aromatik halkaya substitusyonu halkaların

açılmasına neden olur. Oksidasyon reaksiyonu lignindeki eter bağlarını koparır, ayrıca, ligninin alkali ortamda daha kolay çözülmesini sağlayan karboksilik asit guruplarının oluşmasına neden olur. Klor ile kalıntı lignin büyük miktarda degrade edilir ( Uner 2003 ). Klorun, lignin ile reaksiyona girmesi ile oluşan ve suda çözünebilen klor lignin, lignine kıyasla daha koyu renkli olup alkali ekstraksiyon ile kâğıt hamurundan kolayca ayrılır. Bu nedenle beyazlatmadaki bir klor aşamasını genelde bir alkali ekstraksiyon aşaması izler. Klor ile beyazlatmada yüksek sıcaklık ve alkali şartlara gerek yoktur. NaClO ( hipoklorit ), NaClO<sub>2</sub> ( klorit ), ClO<sub>2</sub> ( klor dioksit ), ağartmada kullanılan diğer önemli klorlu bileşikleridir. Klor dioksitin selüloza zararı hipokloritten daha azdır. Klordioksit Lignin yanında reçineleri de iyi okside eder. Hipoklorit ise klor dioksitten daha iyi beyazlık sağlar. Kraft hamurlarının beyazlatmasında hamurun tonu için yaklaşık 40 Kg kadar klor tüketilebilir ( Bostancı 1987 ).

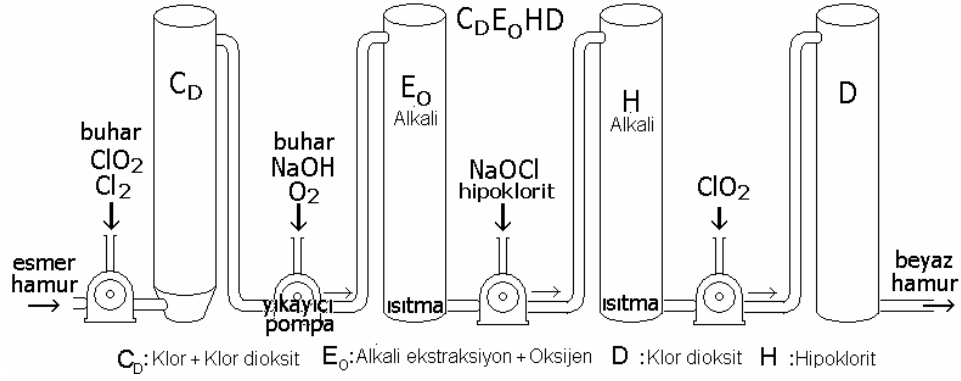
Hipoklorit ve hidrojen peroksit kuvvetli oksitleyici maddeler olup birçok renkli bileşiğin parçalanma ve renginin giderilmesine neden olan, evlerde de beyazlatıcı olarak kullanılan ve iyi tanınan maddelerdir. Oksijen gazı da kâğıt hamurlarına beyazlatıcı etkilidir, ancak bu amaçla kullanımında daha sonra bahsedileceği şekilde bazı sorunlar mevcuttur ( Bostancı 1987 ).

Bazı beyazlatma aşaması dizileri oldukça yaygınlaşmışlardır. Özellikle kraft hamurlarının beyazlatılmasında uygulanan CEDED aşamaları tipindeki beyazlatma, klasik olarak çok kullanılan beyazlatma tiplerinden biri olmuştur ( Bostancı 1987 ).

CEDED aşamaları tipinde bir beyazlatma işlemindeki uygulama şartları Çizelge 2,1'de, CHED aşamalarının işleyiş şeması ise Şekil 2.3' de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.1.** CEDED aşamaları tipinde bir beyazlatma örneğinde uygulanan şartlar (Bostancı 1987).

Hamur					
Aşamalar	yoğunluğu	Kimyasal	Sıcaklık	Süre	pH
1.C	% 3,5	% 0,17–0,25 Cl <sub>2</sub>	20	40 dk.	-
2.E	% 12	NaOH	70	2 saat	11
3.D	% 12	% 0,6 -1,2 ClO <sub>2</sub>	70	3 saat	3,5 – 4
4.E	% 12	% 0,5 NaOH	70	2 saat	Alkali
5.D	% 12	%0,36–0,6 ClO <sub>2</sub>	70	3 saat	5–6



**Şekil 2.3.** CHEHD aşamaları tipinde bir beyazlatma işleminde, işlemlerin yürütülmesi ( Bostancı 1987 ).

Ağartma işleminde oksijen kullanılması düşüncesi çok eskiye dayanmasına karşın, oksijenin selüloza da yüksek oranda yıkıcı etki göstermesi sebebi ile oksijenli beyazlatma işlemi ancak 1960 yılında SSCB'de uygulanmıştır. Ancak bu uygulamada da selüloz kaybı çok yüksek seviyede olmuştur. Daha sonra ilk olarak Fransa'da Mg tuzları ve silikatlar kullanıldığında oksijenin selüloza verdiği zarar azaltılabilmektedir. Oksijen kullanımı son zamanlarda çevreye çok zararlı olan klorlu beyazlatma işlemlerine bir alternatif olarak önem kazanmaktadır. Birçok değişik seçeneğe bir örnek olarak, kraft hamurlarına iyi sonuç verdiği için çok sık olarak uygulanmakta olan CEDED tipindeki bir beyazlatma serisi OCDED olarak geliştirilmiştir. Genelde sülfid hamurlarına veya İsviçre'de kraft hamurundan gazete kağıdı yaparken uygulanan CEH tipindeki beyazlatma, ön bir asit 'A' aşaması eklenerek, AOH şeklinde değiştirilebilmiştir. Oksijen ile ağartma basınçlı ve alkali şartlarda 90 – 120 C° de yapılmaktadır. Oksijen de tek beyazlatıcı olarak kullanılamamaktadır ( Bostancı 1987 ).

Ağartma sonucunda elde edilen kâğıt beyazlığı gözle ölçülebilir olmayıp, MgO beyazlığı standart ve %100 kabul edilerek aletsel olarak ölçülür. Genelde, Beyazlığın % G.E. değeri olarak belirlenmesi yaygındır. G.E. kısaltması beyazlık ölçer aletlerin üreticisi General Electric firmasının adından gelmektedir. Çizelge 2,2'de Değişik tip kâğıt ürünlerine ait % G.E. değerleri gösterilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Değişik kâğıt ürünlerine ait % G.E. değerleri ( Bostancı 1987 ).

Beyazlık derecesi ( % G.E. )	Ürün
95 – 99	Süper ağartılmış para kâğıtları vb.
87 – 93	Beyaz ince kâğıtlar, Beyaz defter kâğıtları vb.
70 – 85	Kuşelenmiş beyaz karton vb
55 – 65	Gazete vb.
40 – 50	Ambalaj, oluklu mukavva vb.
15 – 30	Kaba ambalaj.

Kâğıt yapımının en son aşaması olan kâğıt oluşturma aşamasında, liflerin yassılaştırarak bağlanma yüzeyinin artırılması için kâğıt hamuru ezilir ve bazı dolgu maddeleri ile karıştırıldıktan sonra hareketli elekler üzerine püskürtülerek istenilen kalınlıkta yayılarak suyu giderilir. Daha sonra liflerin birbirine sıkı bağlanması için yapılan sıkıştırma ve kurutulma işlemleri ile levha haline getirilir ( Muna and Sreerishnan 2001 )

#### **2.4. Kâğıt Endüstrisi İle İlgili Çevre Sorunları ve Yeni Teknoloji Arayışları**

Kâğıt endüstrisinin ksilanaz kullanımı gibi yeni beyazlatma teknolojilerine yönelmesinin temel sebebi klasik kâğıt beyazlatma işlemlerinde çevreye çok zararlı atıkların oluşmasıdır. Özellikle kimya ve kâğıt endüstrileri gibi birçok modern endüstri işlemlerinden çıkan atıklarda daha önce tabiatta bulunmayan ve ksenobiyotik olarak adlandırılan bileşikler bulunur. Bu bileşiklerin birçoğu canlılarda toksik etki oluşturan ve doğal olarak parçalanma süreleri çok uzun olan bileşiklerdir. Kâğıt endüstrisi atıklarında çok değişik tipte toksik maddeler olmasına karşın bunlardan özellikle beyazlatma işlemlerinde açığa çıkan ve önemli toksinler gurubunda yer alan klorlu fenolik bileşikler, kâğıt endüstrisi atıklarındaki en toksik maddelerdir ( Andretta et al. 2004 ). Çevreyi en çok kirletici sanayi kuruluşları sıralamasında Petrol, çimento, deri, tekstil ve çelik endüstrisinden sonra Kâğıt sanayi altıncı sırayı almaktadır. Kâğıt üretimi yapan sanayi kuruluşlarının değişik üretim aşamalarına ait atıklarından 250'den fazla kimyasal madde tanımlanmıştır. Özellikle klorlu lignin bileşiklerinin bir kısmı oldukça kanserojendir ( Raghukumar 2004, Pérez-Alzola and Santos 1997 ).

Kâğıt endüstrisi atıklarında bulunan klorlu fenolik bileşikler serbest ( hegzan ile ekstrakte edilebilen ) ve bağlı ( kuvvetli, alkaliler ile ekstrakte edilebilen ) olarak iki guruba ayrılmaktadırlar. Kanada çevre koruma yasaları ( Environment Canada and Health and Welfare Canada, 1991) bu gibi Kâğıt endüstrisi atıklarını ve ilgili kimyasalları toksik olarak belirtmektedir. Kâğıt endüstrisi atıklarındaki klorlu toksik maddeler ve özellikle poli-klorlu fenolikler akut ve kronik toksik etkiler oluşturma, canlılar ve besin zincirinde birikme özelliğindedir. Ligninin klorlu kimyasallarla parçalanması ile oluşan klorofenoller, klorokatekoller ve bazı kloroalifatikler gibi birçok klorlu lignin parçalanma ürünü bileşikler sedimentlerde ve besin zincirinde değişik seviyelerde birikim göstermektedir. Bu bileşiklerin detoksifikasyonu klasik bir biyolojik arıtım tesisi ile gerçekleşmemektedir ( Andretta et al. 2004 ). Düşük molekül ağırlıklı klorlu hidrofobik nötral bileşikler hücre zarlarına nüfus etme yeteneğindedir ( Muna ve Sreerishnan 2001 ). Elementer klor geleneksel kâğıt hamuru beyazlatma işlemlerinde, beyazlatmanın özellikle ilk aşamasında olmak üzere temel beyazlatıcı maddedir ( Reinstaller 2005 ). Klor beyazlatılması sırasında oluşan temel atık ürünler olan kloroligninler, üretilen her ton hamur başına 1 – 4 kilogram gibi yüksek miktarda oluşur ( Muna and Sreerishnan 2001). klorofenoller, canlılardaki oksidatif fotofosforilasyon, protein sentezi ve lipit biyo sentezi gibi faaliyetler üzerine toksik etkiler gösteren yüksek toksisiteye sahip bileşiklerdir. Klorofenollerle yapılan akut toksisite çalışmaları sonucunda, bu bileşiklerin ppm konsantrasyonlarında sudaki organizmalara yüksek oranda toksik olduğu görülmüştür ( Ünal 2005 ). Klorlu fenolik atıklar kâğıt fabrikası atık klorlu

bileşiklerinin %2'sini oluşturmalarına karşın toksisite ve kanserojenite de en önemli kısmı oluştururlar. Kâğıt fabrikası atıklarında bulunan dioksinler de bilinen en toksik kimyasal bileşiklerdendir. WHO, 1997 yılında kâğıt endüstrisi atıklarının DNA hasarı, genetik bozukluklar ve kansereneden sorumlu olduğunu açıklamıştır ( Muna and Sreekrishnan 2001 ). Kâğıt fabrikası atıklarına karşı oluşan 'klorofobi' zararlı atıkların azaltılması konusundaki baskıların oluşmasında temel rolü oynamıştır ( Dhillon et al. 2000b ). Bu gibi sorunlar sebebi ile çevreci örgütlerin yoğun bilgilendirme kampanyaları, ciddi toplumsal tepkiler ve yasal yaptırımlar sonucunda kâğıt sektörü alternatif beyazlatma teknolojileri araştırmalarına yöneltmiştir ( Anonim 4, 1996 ). 1980'lerin sonlarında Kuzey Amerika'dan çok önce, bazı akademik çalışmalar ve bilinçli tüketici etkinlikleri ile özellikle İsveç'te TCF tipi beyazlatma uygulanmaya başlamıştır. 1990'dan sonra kâğıt sektörü önemli değişikliklere gitmek zorunda kalmaya başlamıştır ( Reinstaller 2005 ). Ksilanazların kâğıt beyazlatmada kullanılması bu arayışlar sonucu önem kazanmıştır ( Altonen et al. 2000 ). Kraft hamurlarının klorlu beyazlatılması sonucu açığa çıkan dioksin miktarının azaltılması konusunda alternatif bir metot olarak, ksilanaz enzimlerinin kullanımı ile beyazlık artışı sağlanabileceğinin ilk olarak 1986'da bildirilmesinden sonra, kraft hamurları için endüstriyel ölçekte ksilanaz ön beyazlatma çalışmaları 1989'dan itibaren bildirilmeye başlanmıştır ( Yang et al. 1995 ). Bugün için kuzey ve batı Avrupa ülkelerinde kanuni zorunlulukların getirdiği düzenlemeler sonucu uygulanmaya başlanan yeni beyazlatma metotları yolu ile kâğıt fabrikalarından doğaya salınan organik klorlu bileşiklerin ( AOX, absorbed organic chlorine ) atılımı önemli ölçüde azalmıştır. Çoğu batı Avrupa kâğıt fabrikalarında beyazlatma işlemleri elementer klor uygulamadan yapılmaktadır. Kuzey Avrupa'da ise oksijenli ön beyazlatma işlemleri yaygınlaşmıştır. Yeni, kloruz veya elementer kloruz beyazlatma işlemlerin en önemli ve başlıca iki tipinin İngilizce kısaltmaları ECF ve TCF tipi beyazlatma işlemleridir. ECF ( elemental chlorine-free ) tipi beyazlatma işlemlerinde elementer klor kullanılmamaktadır. ECF tipi beyazlatmada kullanılan kimyasallar klor dioksit, çözülmüş lignin ekstraksiyonu için alkali maddeler, peroksit ve oksijendir ( Altonen et al. 2000 ). Klor dioksit uygulaması ile atıklarda bulunan toksik klorlu bileşikler azalır, bulunanların büyük kısmı da doğal ortamda bozulabilen yapıdadır. Yeni bir uygulama olan Ksilanazlar ile kâğıt hamuru ön beyazlatma işlemleri, klasik beyazlatma işlemlerinin yanı sıra ECF ve TCF gibi yeni tip beyazlatma işlemleri ile beraber de uygulanabilmektedir. TCF ve ksilanazın beraber uygulandığı bir uygulamada, elde edilebilen beyazlıkta önemli bir artış olmamasına karşın, ozonun selüloza zarar verici etkisinin azaldığı, hedeflenen beyazlığa daha az ozon kullanılarak ulaşılabildiği görülmüştür ( Roncero et al. 2005, Beg et al. 2001 ). Lignin gideriminin artırılması için klor yerine alternatif olarak sunulan arttırılmış pişirme işlemi, klor dioksit ağırlıklı ağartma, hidrojen peroksit, ozon ve oksijen kullanımı gibi alternatifler daha yüksek maliyetli olup geliştirilmeleri çalışmaları devam etmektedir ( Beg et al. 2001 ).

Daha çevreci uygulamalar olarak  $O_2$ ,  $O_3$ ,  $H_2O_2$  kullanılan oksijen temelli beyazlatma işlemleri ve ksilanazlar ile ön beyazlatma işlemlerinin kombine uygulamaları konusundaki çalışmalar devam etmektedir ( Bajpai and Bajpai 1992 ). Beyazlatmada yeni teknikler olan oksijen, ozon ve peroksit kullanımı, klora göre çok daha pahalıdır ( Tamerler 2001 ). Kâğıt



üretim işletmelerinin yatırım maliyetlerin yüksek, kar oranlarının ise düşük ( Kenealy and Jeffries 2003, Tulus 2004 ) ve klor ve bileşiklerinin ucuz ve beyazlatmada en etkili kimyasallar olması nedeniyle, işletmeler için oluşturduğu çevresel sorunlara karşın klorlu beyazlatma işlemlerinin terk edilmesi çok zor olmaktadır ( Bostancı 1987 ).

Kâğıt endüstrisinde öne çıkan biyolojik yöntem ksilanazlarla ön beyazlatma işlemleridir ( Sevastyanova 2005 ).Enzimler beyazlatma işlemlerinde ve tesislerde büyük değişiklikler gerektirmeden ve maliyetlerde fazla bir artışa neden olmadan uygulanabilirler ( Tamerler 2001 ).

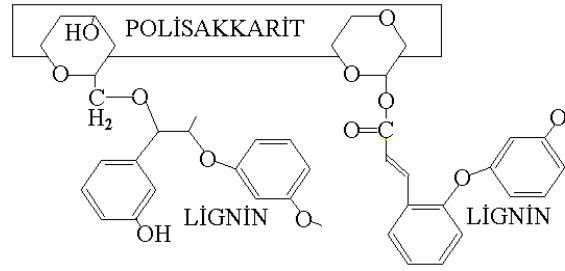
Kâğıt endüstri için diğer bir alternatif biyolojik yöntem de Biyolojik hamur üretimidir ( Akhtar et al.1999 ). Ancak, Ksilanazlar kullanılarak yapılan ön beyazlatma işlemleri, Biyolojik hamur üretimi işlemlerinden daha çok kabul görmektedir ( Subramaniyan and Prema 2000 ). Biyolojik hamur üretimi ( ' Biopulping ' ) hamur elde işlemi öncesinde odun yongalarının lignin parçalayıcı funguslarla işleme tabi tutulması işlemidir. Ancak bu tip uygulamalarda değişik fungusların odun tipine göre farklı etkinlik göstermesi ve odun yongalarının sık fungal kontaminasyona uğraması gibi sorunlar belirtilmiştir ( Akhtar et al.1998 ). Selüloz degradasyonu temel bir problem olarak görülen ve uzun süre gerektiren biyolojik hamur elde etme işlemlerinde genellikle beyaz çürüklük fungusları kullanılmaktadır ( Bajpai ve Bajpai 1999 ) Bu işlemlerde temel bir sorun da sürenin iki hafta gibi uzun olması ve bu arada kontaminasyon risklerinin bulunması gibi görünmektedir. Ayrıca bu işlemlerde kullanılacak fungal izolatların da selüloza zarar verici etki göstermemesi gerekmektedir. Biyo-hamur eldesi, özellikle mekanik kâğıt hamuru eldesinde enerji sarfiyatını önemli ölçüde düşürebilmektedir ( Akhtar et al 1996, Breen and Singleton 1999 ).

## 2.5. Kâğıt Endüstrisinde Ksilanazlar

Yeni kâğıt hamuru beyazlatıcı alternatifleri olan hidrojen peroksit, oksijen ve ozon yanında biyolojik beyazlatma işlemleri de önem kazanmaktadır. Özellikle selülaz aktivitesi içermeyen ( 'cellulase-free' ) ksilanazlar ( 1,4-B-D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8 ) başka biyo teknolojik kullanımlar yanında kâğıt hamuru beyazlatma işlemleri için de büyük öneme sahiptirler. Enzimlerin kâğıt endüstrisinde kullanılması konusundaki araştırmalar esasen 1980 sonrasında başlamıştır. Ksilanazların kâğıt endüstrisinde kullanılmaya başlaması ise 1990'dan sonraki yıllarda olmuştur. Kâğıt hamuru ve kâğıt sektörü Dünya çapında enzim uygulamalarının yaygınlaşabileceği büyük sektörlerden biri olarak ortaya çıkmaktadır ( Tamerler 2001 ). Kâğıt endüstrisinde enzimlerin kullanılmasına dair ilk araştırmalar liflerin birbirine bağlanma gücünün artırılması için selülazların kullanılması konusunda olmuştur. Selülazların bu amaçla kullanılmasında viskozitede düşme ve lif dayanıklılığında azalma olduğu görülmüştür. Bu sorun başka faydalarının yanı sıra kâğıt direncinde artışa da neden olan ksilanazların kullanılması ile aşılmıştır. Selülaz enzimleri su drenaj hızları düşük olan kullanılmış geri dönüşüm kâğıt hamurlarının, su drenaj hızının artırılması amacı ile Kanada, Japonya, Fransa gibi bazı ülkelerde kullanılmaktadır ( Tamerler 2001 ). Enzimler, kâğıt endüstrisinde yıkama,

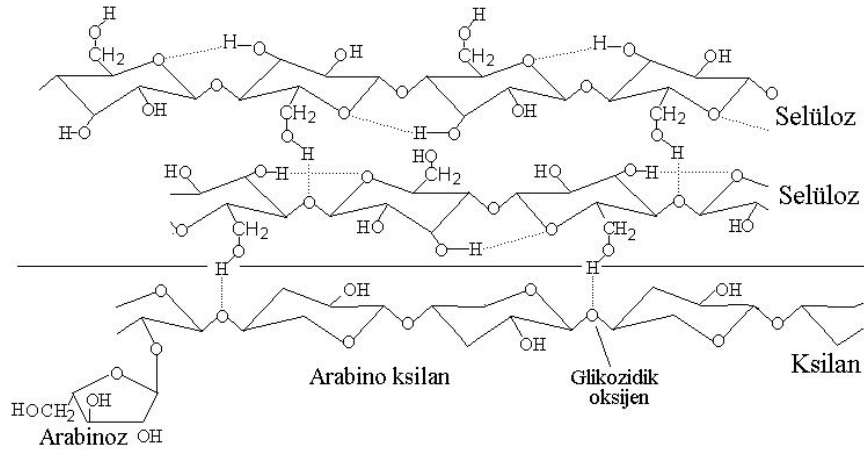
tıkanmalara yol açan yapışkan maddelerin giderimi, atık suları arıtımı gibi birçok işlem aşamasında faydalı olabilmektedir ( Kenealy and Jeffries 2003 ).

Kâğıt hamurundaki kromofor denen koyu renk verici maddeler ( kromofor ) esas olarak kalıntı ligninden oluşur. Kalıntı ligninin kâğıt hamurundan uzaklaştırılması ve uzaklaştırılmayan az bir kısmında olduğu yerde renginin giderilmesi kâğıt hamuru beyazlatma işlemlerinin temelidir. Bir kısım kromoforun ekstrakte edilerek hamurdan ayrılması zordur. Ayrıca, Kalıntı lignin hamur metriksinde yer alan ksilan ve diğer polisakkarit moleküllerine kovalent bağlarla bağlıdır ( Tamerler 2001 ). Lignin ve karbonhidratlar arasındaki bu gibi bağlar, pişirme ( 'pulping' ) işleminden önce odun yongalarında ve pişirme sonrasında oluşan kâğıt hamurunda bulunmaktadır. Bu tip bağların bir kısmı da pişirme sırasında oluşmaktadır ( Archibald et al.1997). Şekil 2,4'de Lignin ve polisakkaritler arasındaki değişik bağlar gösterilmiştir.



**Şekil 2.4.** Lignin ve polisakkaritler arasındaki değişik bağlar ( Archibald et al.1997, Krause et al. 2003 ).

Ksilanın ilginç bir özelliği selüloz fibrillerine kovalent olmayan bağlarla bağlanabilmesidir. Ksilanda, selülozdaki gibi  $-CH_2OH$  gruplarının olmaması, selüloz gibi ksilan zincirleri arası hidrojen bağlarının oluşmasına neden olmaz. Ancak, ksilan selüloz üzerine bağlanarak ' ko-kristalize ' olabilir. Bu bağlanma selülozdaki  $-CH_2OH$  grupları ile ksilandaki glikozidik oksijenler arasında gerçekleşir. Bu şekilde, selüloz üzerine sıkıca ancak kovalent olmayan şekilde bağlı bir ksilan tabakası oluşur ( Smith 1977 ). Şekil 2,5'de selüloz ve ksilan arasındaki bu bağlanım gösterilmiştir.



**Şekil 2.5.** Ksilan'ın selüloz'a bağlanımı

Kâğıt hamurunun elde edildiği pişirme işlemlerinde çözünen bir kısım ksilan sonradan tekrar selüloz lifleri üzerine çökelmektedir. Reabsorbe olan bu ksilanın oluşturduğu tabaka kimyasal beyazlatıcıların liflere nüfuzunu engelleyerek beyazlatma işlemini zorlaştırılmaktadır. Ayrıca lignin ve diğer istenmeyen renkli bileşik liflerden salınımı da engellemektedir ( Tamerler 2001, Rıfaat et al. 2005 ).

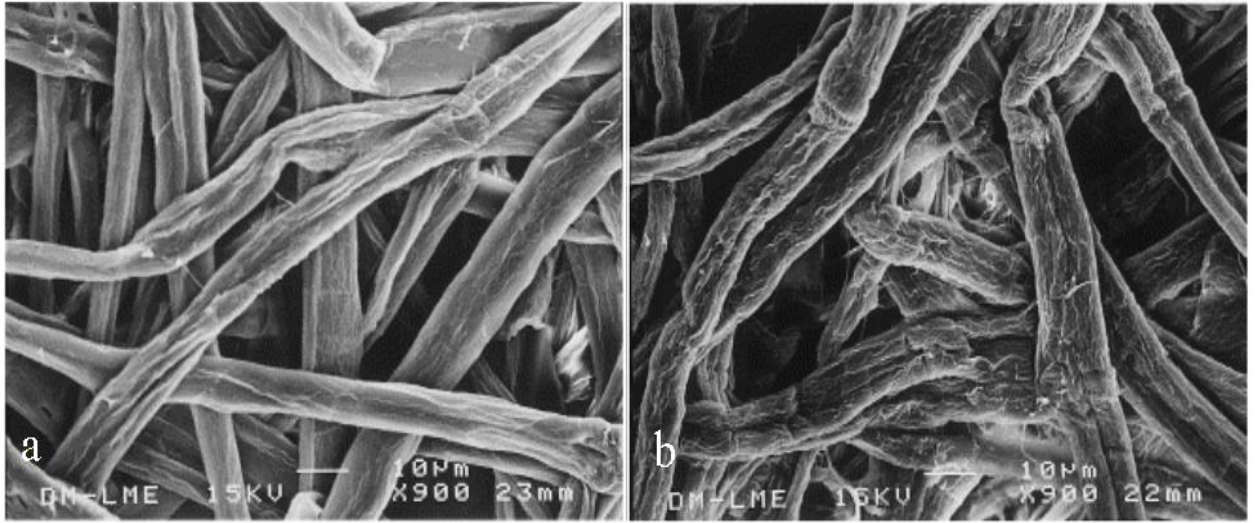
Kâğıt endüstrisinde başta ksilanaz olmak üzere hemiselülazların kullanılabilmesi düşüncesi ilk olarak 1986 ve 1987 yıllarında Viikari ve arkadaşlarının çalışmaları ile gündeme gelmiştir. ( Bhat 2000 ).

Kâğıt hamurlarının beyazlatma öncesinde ksilanaz kullanarak ön işleme tabi tutulması sonucunda kâğıt hamuru lif geçirgenliğinin artması ile ligninin serbestleşmesi ve sonraki aşamalarda daha az okside edici kimyasal ile ligninin uzaklaştırılabilmesi için yeterli olabilmektedir. Ayrıca bir kısım lignin de ksilanla olan kovalent bağlarının serbest kalması nedeni ile kolayca uzaklaştırılabilir ( Tamerler 2001, Rıfaat et al. 2005 ). Kâğıt hamuru lifleri üzerine absorbe olmuş ksilanın çok az bir kısmının parçalanmaya uğraması bu etki için yeterli olabilmektedir. Ksilanazlar hem lif yüzeylerindeki hem de porların iç yüzündeki ulaşılabilir lif ksilanı üzerinde çözücü etki gösterebilmektedir ( Schönberg et al. 2001 ). Bu işlemlerde en etkili olan enzimler özellikle endo-ksilanaz tipinde olan ksilanazlardır ( Techapun et al. 2003 ). Georis et al. ( 1999a ), *Streptomyces* sp. B-12-2 izolatı kökenli iki ksilanazın farklı beyazlık artırıcı etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Kraft hamuru beyazlatma ve delignifikasyonunda çok az veya hiç bir etki göstermeyen arabinofuranozidaz glukronidaz gibi yan dal kesici enzimlerle kıyaslandığında endo- $\beta$ -1,4-ksilanazlar, kraft hamuru beyazlatma ve delignifikasyonunda temel rol oynayan enzimlerdir. Ayrıca, değişik kâğıt hamuru beyazlatma işlemlerinde GH11 ailesinden ksilanazlar da GH10 ailesi ksilanazlarla kıyaslandıklarında çok daha etkindirler ( Georis et al. 1999a ). Clarke et al. ( 2000 ), Peroksit beyazlatması öncesinde enzim uygulaması yaptıkları denemede, aynı kâğıt hamuru yoğunluğu ve enzim dozları ile, tek başına  $\alpha$ -galaktozidaz kullanımına kıyas ile,  $\alpha$ -galaktozidaz ve mannanaz beraber kullanıldığında 4.5 kat, bu iki enzim yanında ksilanaz kullanıldığında ise kâğıt hamurundan 15.7 kat daha fazla indirgen şeker salımı olduğunu ve ksilanaz enzimi ile en etkin delignifikasyon elde ettiklerini belirtmişlerdir. Ksilanazlar ile kraft hamurundaki ksilanın %20 kadarı selektif olarak giderilebilmektedir ( Sevastyanova 2005 ).

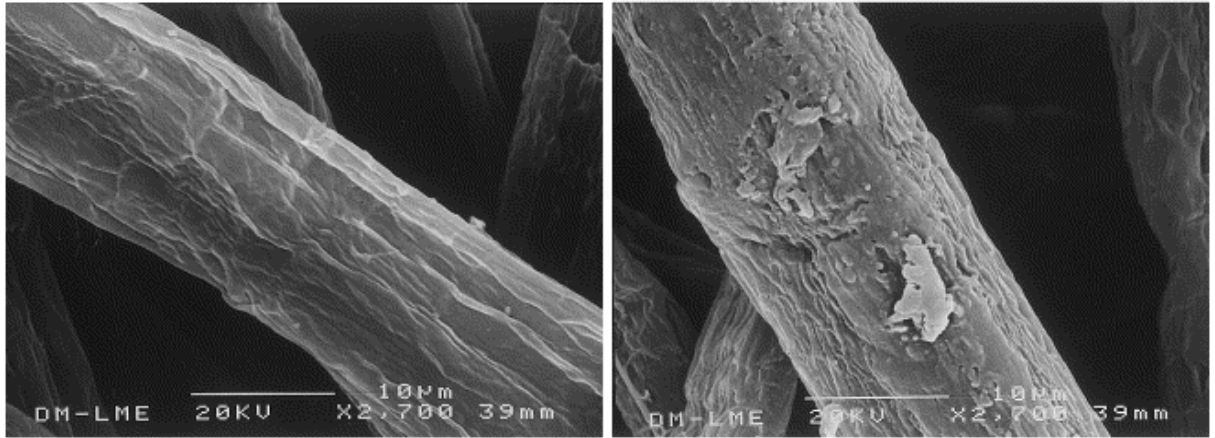
Ksilanazlar kâğıt endüstrisinde, kâğıt hamuru beyazlatma aşamasında kullanılmak amacıyla endüstriyel çapta üretilmeye başlanmıştır. Kâğıdın asıl maddesi olan selülaza zarar vermeyen bu işlemler oldukça basit olup kimyasal beyazlatıcılarla yapılan beyazlatma işlemleri gibi zararsız atıklar oluşumuna neden olmamaktadır ( Anonim 3 2001 ).

Yapılan SEM (taramalı elektron mikroskobu ) incelemelerinde ksilanaz ile ön işlem görmüş kâğıt hamuru lifleri yüzeyinde birikmiş ksilan tabakasının uzaklaştırılması ile porlar oluştuğu görülmektedir. Bu porlar hem beyazlatıcı kimyasalların life nüfusunun artmasını, hem de ligninin liflerden daha kolay uzaklaştırılabilmesini açıklamaktadır ( Rıfaat et al. 2005 ). Aynı durum başka araştırmacılar tarafından da gözlenmiştir ( Tamerler 2001, Techapun et al. 2003 ).

Şekil 2,6 ve 2,7'de, SEM incelemelerinde ksilanaz ile ön işlem görmüş kâğıt hamuru lifleri yüzeyinde meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir.



**Şekil 2.6.** SEM mikroskobu görüntülerinde kâğıt hamuru lif yüzeylerinde ksilanaz uygulamasının etkileri, (a), Oksijen beyazlatma yapılmış *Eucalyptus* kraft hamuru (O-Pulp); (b), ksilanaz ve Oksijen beyazlatması uygulanmış *Eucalyptus* kraft hamuru (XO-Pulp) ( Roncero et al. 2000 ).

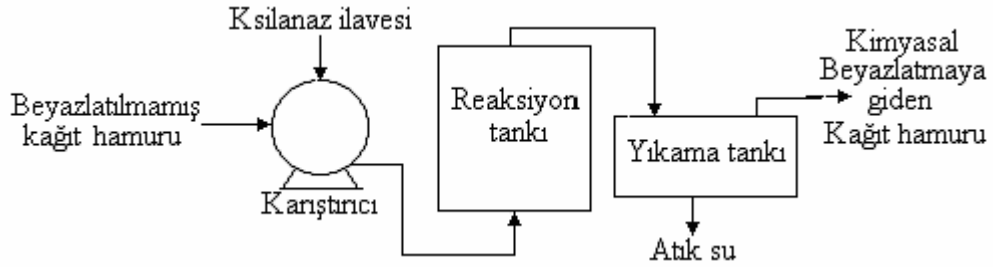


**Şekil 2.7.** SEM mikroskobu ile daha yüksek büyütmede kâğıt hamuru lif yüzeylerinde ksilanaz uygulamasının etkileri, (a), sadece oksijen beyazlatması uygulanmış *Eucalyptus* kraft hamuru (O-Pulp); (b), ksilanaz ve oksijen beyazlatması uygulanmış *Eucalyptus* kraft hamuru (XO-Pulp) ( Roncero et al. 2000 ).

Ksilanaz uygulaması, çeşitli bağlar ile liflerle sıkı ilişki içinde olan ligninin gideriminde de faydalı olmaktadır ( Tamerler 2001 ). Lignin ve polisakkaritler arasındaki kovalent bağlarla oluşan yapılar lignin-karbonhidrat kompleksleri ( LKK ) olarak bilinir. Kâğıt hamuru beyazlatmada karşılaşılan zorluklardan genelde LKK yapıları sorumlu tutulmaktadır. Enzimatik hidrolizler yolu ile elde edilen ligninin % 5–10'luk kısmı LKK tipindedir. LKK'lerin benzil ester ve fenil glikozidik bağlanımlarla oluştuğu belirtilmektedir. Benzil ester bağları alkali şartlarda dirençli değildir. Fenil glikozidik bağlar ise bu şartlarda oldukça dayanıklı olup kâğıt hamuru

pişirme işleminde giderilemezler. Ayrıca, pişirme işleminde değişik ve yeni bazı LKK yapıları oluşmaktadır. Kraft kâğıt hamurlarındaki kalıntı ligninin en az % 90'ının karbonhidratlarla bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür. Bunun % 92'lik kısmı ksilan ve glukomannan ( diğer bir hemiselüloz tipi) ile % 8'lik kısmın ise selüloz ile bağlantılı olduğu belirtilmektedir ( Lawoko et al. 2003 ).

Kimyasal beyazlatma işlemleri öncesi Ksilanaz ile enzimatik ön işlemin yapılması enzim uygulaması için en uygun yerdir ( Srinivasan and rele 1999 ). Özellikle sonraki beyazlatma işlemlerinin etkinliğini arttırdığı için, pişirmeden çıkmış ve henüz beyazlatılmamış hamura ksilanaz uygulaması çok uygun görünmektedir ( Tamerler 2001 ). Peroksit beyazlatması öncesi ksilanaz uygulaması ile beyazlık artışına elde edilebilmektedir. Peroksit beyazlatması sonrası ksilanaz uygulaması ise daha az delignifikasyon ve kromofor salınımına neden olmaktadır ( Wong et al. 1997 ). Şekil 2.8'de ksilanaz ile enzimatik ön işlem şematize edilmiştir.



**Şekil 2.8.** Ksilanaz ile enzimatik ön işlemin uygulanışı ( Srinivasan and rele,1999 ).

Ksilanazlar, beyazlatma için gereken okside edici beyazlatıcı kimyasal ihtiyacını %20–40 azaltabilmektedir ( Beg et al. 2001 ). Özellikle büyük proteinlerin bitki sekonder hücre duvarı arasına girişte bazı engellerin olması enzimlerin etkinliğini sınırlandırıcı bir etki oluşturmaktadır. Bu engelleme özellikle lignin yıkıcı enzimler için daha belirgindir ( Archibald et al. 1997 ). Ksilanaz ile % 4–5'lik beyazlık artışı, beyazlatıcı klor gereksinimini %20–30 azaltabilmektedir ( Zhao et al. 2006 ). Beg et al. ( 2001 ), bu oranı %20–40 olarak belirtmiştir. Enzimler beyazlatma işlemlerinde ve tesislerde büyük değişiklikler gerektirmeden ve maliyetlerde fazla bir artışa neden olmadan uygulanabilirler ( Tamerler 2001 ).

Ksilanazın kâğıt üretim kuruluşu bünyesinde üretilmesi ekonomik ve pratik açıdan çok faydalı olmaktadır. Kâğıt fabrikası bünyesinde kendi ksilanazını üretme işlemi ( homemade xylanase ) ilk olarak, Japon Oji kâğıt, Yonago fabrikasında gerçekleştirilmiştir. Burada, ksilanaz enzimi, günlük 1300 tonluk oksijen işlemi görmüş sert ağaç kraft hamuruna uygulanmakta ve %85,5 ISO beyazlık derecelerine ulaşılmaktadır. Enzimin elde edildiği bakteri *Bacillus* sp. olup Japonya'da topraktan izole edilmiştir. Enzim uygulama şartları %10 kâğıt hamuru yoğunluğu, 1,5 Unit/g kuru hamur, 50–70°C ve iki saattir. Burada enzimatik işlem ile klor bileşiklerinin kullanımı %35, toksik organik klorlu bileşik çıkışı % 40 azalmıştır ( Anonim 3, 2001 ).

## 2.6. Ksilan ve Ksilanazlar

Ksilan, seyreltik alkaliler ile bitkisel materyalden ekstrakte edilebilen, selüloz benzeri, renksiz dallanmış veya doğrusal, oldukça fazla çeşitliliğe sahip bitki hücre duvarı polimerleri olan hemiselüloz gurubu polisakkaritlerdendir. Hemiselülozlar içerdikleri ksiloz, mannoz, galaktoz ve arabinoz gibi değişik monomerlere göre ksilan, mannan, galaktan ve arabinan gibi değişik tiplere ayrılırlar ( Beg et al. 2001, Shallom and Shoham 2003 ). Ksilanlar ve galaktoglukomannanlar sert ve yumuşak ağaç odunu hemiselülozlarının temel elemanlarıdır ( Gomes et al. 2000 ). Ksilan, karasal bitki hemiselulozik materyalin en yaygın tipidir ve genel olarak 30%–35% kuru ağırlığı oluşturur. Ksilan çam gibi yumuşak odunlu ağaçlarda, geniş yapraklı ağaç dunlarına kıyasla daha fazla oranda bulunur ( Beg et al. 2001 )

Ksilanlar alkali çözeltide çözünür, doğrusal veya dallanmış yapıdadır. Sulu çözeltilerinde alkol ile çöktürülebilirler. Mineral asitlerle selüloza göre çok daha kolay hidrolize olurlar. Doğrusal halde polimerleşmiş olan ksiloz şekerlerinden oluşan ksilan omurgası, ksilanların temel kısmıdır ( Uffen 1997 ). Ksilan ana omurgası  $\beta$ -1,4 glikozidik bağları ile bağlı ortalama 70 -130  $\beta$ -ksilopiranoz D-ksilopiranozil ünitelerinden oluşur ve yumuşak odunlu ağaçlarda sert odunlu ağaç odunlarına kıyasla daha kısadır ( Gomes et al. 2000 ). Ksilanın yapısı daha çok dallanmış heteropolisakkarit yapısındadır. Doğrusal yapıda olan ksilan omurgası C–2, C–3 ve C–5 pozisyonlarından bitki türü ve bitki gelişme aşamasına bağlı olarak çeşitli derecelerde dallanmalar gösterirler ( Uffen 1997 ). Homopolimerik Ksilan ana omurganın değişik derecede glukranopiranozil, 4-O-metil-D- glukranopiranozil,  $\alpha$ -L-arabinofuranozil, asetil, feruloil ve/veya p-kummaroil yan zincirler alması ile karmaşık ve çok dallanmış heteropolisakkarit yapıları oluşur. Yan dal almamış ve Sadece ksiloz birimlerinden oluşan liner ksilan, tütün ve çok yaygın olmayan “esparto grass”gibi bazı bitkiler ile bazı algler gibi nadir örneklerde görülebilir ( Collins et al. 2005 ). Ksilan, sert odunlu ağaçlarda genel olarak 0-asetil-4–0-metilglukuronoksilan tipindedir ( Gomes et al. 2000 ). Sert odunlu ağaçlarda ksilan çok sayıda asetil gurubu içerir. Normalde her on ksiloz ünitesi ara ile, ksilozun C-2 veya C-3 pozisyona 4-0-metilglukuronik asit bağlanmıştır. Huş ağacında ksilanın iki ksiloz ünitesine bir asetik asit düşmektedir. Asetillenme molekülün suda çözünme özelliği ile ilişkilidir. ( Gomes et al. 2000 ). Monokotil bitkilerde, C–2 pozisyonlarında 1→2-bağlantılı  $\alpha$ -D-glukuronik asit veya 4-0-metil- $\alpha$ -D-glukuronik asit dallanışları, C-3 pozisyonunda ise ksilopiranoz bulunabilir. Özellikle sert ağaçlarda olmak üzere bazı bitkilerde C–2 pozisyonu, daha çoklukla da C–3 pozisyonunda bağlı olan ksilopiranoz üniteleri 0-asetilleşmiş durumdadır. İlave olarak az ama önemli oranda, ferulik asit ve p-kumarik asit gibi fenolik guruplar bulunur. Bu gibi fenolik üniteler genelde lignin ile de bağlantılı olup karboksil gurupları üzerinden esterleşme ile ksilanın arabinoz dallarının C–5 pozisyona bağlanmışlardır ( Uffen 1997a ).

Çok nadir bir ksilan tipi *Palmeria palmata*'da olduğu gibi bazı alglerde belirlenmiş olan  $\beta$ -1,3 bağlantılı Ksilan tipidir ( Beg et al. 2001 ).

Ksilanın genelde dallanmış karmaşık ve heterojen yapıda olması, hidrolizinde farklı hidrolitik enzimleri gerektirmektedir ( Beg et al. 2001 ). Bu enzimlerin beraber etkisi olmadan belli bir enzimin bitki hücre duvarında yer alan substratlarına ulaşması çok zordur ( Shallom and Shoham 2003 ). Bu nedenle ksilan kullanan mikroorganizmaların farklı ksilan hidrolize edici

enzimleri sentezlemesi supriz değildir. Bu enzimlerin başlıcaları  $\beta$ -1,4-endoksilanaz,  $\beta$ -ksilozidaz,  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz,  $\alpha$ -glukuronidaz, asetil ksilan esteraz ve ferulik asit ( ferulik ve p-koumarik asit ) esterazlardır ( Beg et al. 2001 ). Bu gibi çok fonksiyonlu enzimatik sistemler birçok fungus, aktinomiset ve bakteride bulunmaktadır. Bu enzimler polisakkaritlerdeki glikozidik bağları kesen enzimleri içeren glikozid hidrolaz enzim ailelerinde ( GH ) yer alırlar. ksilanaz olarak adlandırılan enzimler aslen  $\beta$ -1,4-endoksilanazlar ve  $\beta$ -ksilozidazlardır. Yan dalların parçalanması için gereken diğer ksilanolitik enzimler ise hemiselulolitik enzimlerden kabul edilir ( Puchart and Biely 2008 ). Çoğu bitki patojeni fungus konukçu bitkinin dokularına nüfuz edebilmek ve bitki hücre duvarlarını eritebilmek için diğer hidrolitik enzimler yanında bu gibi ksilanolitik enzimleri de içermektedir. ( Subramaniyan and Prema 2002 ):

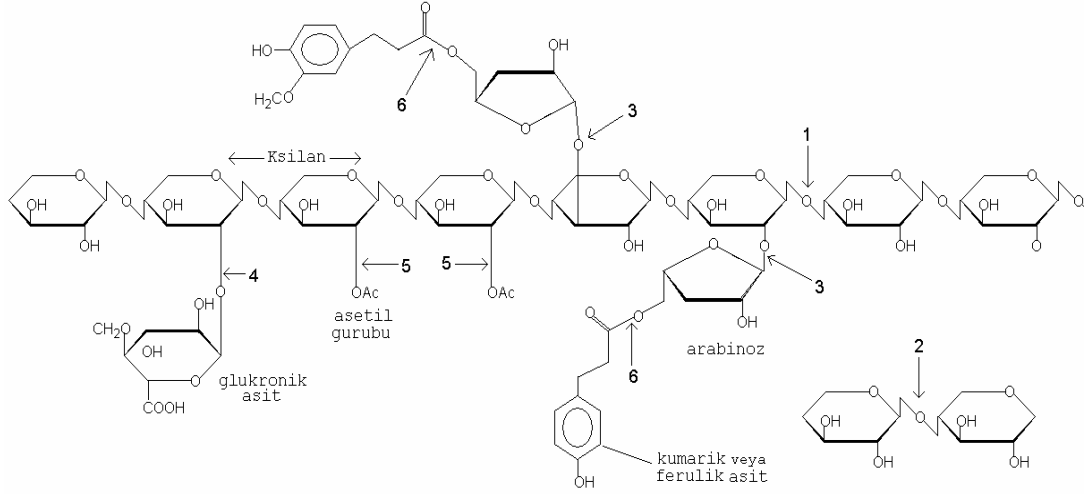
Ksilanaz olarak adlandırılan enzimler, ksilan ana omurgasındaki ksilan monomerleri arasındaki  $\beta$ -1,4 glikozidik bağların hidrolizini gerçekleştiren  $\beta$ -1,4-endoksilanazlardır. ( Srinivasan and Rele 1999, Beg et al. 2001 ). polisakkarit ana omurgalarındaki glikozidik bağlarını hidrolize eden enzimlerin başına ' endo ' ön eki getirilmektedir. ' exo ' ön eki ise, disakkarit gibi kısa polimerleri hidrolize eden enzimlerin başına da getirilmektedir. Bu şekilde Endo-glikozit hidrolazlar ve Exo-glikozit hidrolazlardan bahsedilmektedir ( Shallom and Shoham, 2003 ).

1961'de International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) komitesince ksilanazlar için enzim kodu EC 3.2.1.8. resmi isim olarak da endo-1,4- $\beta$ -ksilanaz kabul edilmiştir ( O-glycoside hydrolases; EC 3.2.1.8 ), Ancak bu enzimler için endo ksilanaz, 1,4- $\beta$ -D-ksilan-ksilanohidrolaz, endo-1,4- $\beta$ -D-ksilanaz,  $\beta$ -1,4- ksilanaz and  $\beta$ - ksilanaz gibi isimler de kullanılmaktadır ( Collins et al. 2005 ).

Glikozit hidrolaz enzim ailesi 11 ( GH-11 ) ve GH-10'da yer alan endo- $\beta$ -1,4-ksilanazlar gerçek ksilanazlar olarak ifade edilmektedirler. Bu enzim aileleri G/11 ve F/10 gibi değişik şekillerde de belirtilirler ( Liu et al. 2004 ). Ksilanaz dendiğinde bu iki aileden enzimler akla gelmelidir. Mikroorganizmalarca oluşturulan ksilanazlar, büyük oranda GH10 ve GH11 ailelerinde yer alan enzimlerdir. Ancak, az sayıda GH 5, 8 ve 43 ailesinden ksilanazlar da belirlenmiştir. GH10 ve11 ailesi ksilanazlardan 300 kadar enzimin, Buna karşın, GH 5, 8 ve 43 ailesi ksilanazlardan sadece 20 kadar ksilanaz enziminin yapısı incelenmiştir ( Shallom and Shoham 2003 ).  $\beta$ -ksilozidazlar ( EC 3.2.1.37 ) ise ksilan ana omurgasının parçalanması ile oluşan kısa ksilooligomerleri ksiloz ünitelerine kadar hidrolize eden exo-tip glikozidazlar olup bu nedenle ksilanazlardan kabul edilirler ve GH 3, 39, 43, 52 VE 54 enzim ailelerinde bulunurlar ( Rohman et al. 2007 ).

Ksilanın, asetil yan bağlantılarını hidrolize eden enzimlerden asetil ksilan esterazlar ( EC 3.1.1.72 ) ve lignin ile ksilan arası bağlantıda rol oynayan yan dallardan olan arabinoz ve ferulik asit arası ester bağlarını hidrolize eden feruloyl esterazlar ( EC 3.1.1.73 ) ise Hemiselulolitik esterazlar olarak adlandırılır ( Shallom and Shoham, 2003 ). Asetilasyon geniş getiren hayvanların ksilanı sindirmesinde önemli bir engel olup ksilanın % 22-50 ksiloz rezudeleri bu şekilde 0-2 ve 0-3 pozisyonunda asetillenmişlerdir ( Krause et al. 2003 ). Arabinoksilanlar da, Arabinoz yan dallarının ester bağları ile bağlı p-koumarik ve ferulik asitlere,

ayrıca ferulik asitler üzerinden lignine bağlandığı görülmüştür ( Krause et al. 2003 ). Şekil 2.9'de Ksilan yapısı, çeşitli yan dalları ve değişik mikrobiyal enzimlerin etki bölgeleri gösterilmiştir.



**Şekil 2.9.** Ksilan yapısı, çeşitli yan dalları ve değişik mikrobiyal enzimlerin etki bölgeleri. 1: endoksilanazlar; 2:  $\beta$ -ksilozidazlar 3:  $\alpha$ -L-arabinofuranozidazlar; 4: glukronidazlar; 5: asetill ksilan esterazlar; 6: feruloil ve kumaroil esterazlar. Birleştirerek yeniden çizilmiştir. ( Srinivasan and Rele 1999, Beg et al. 2001, Chavez et al. 2006 ).

Şekil 2.9'de gösterilen ksilan ve yan dallarına etkili başlıca enzimler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

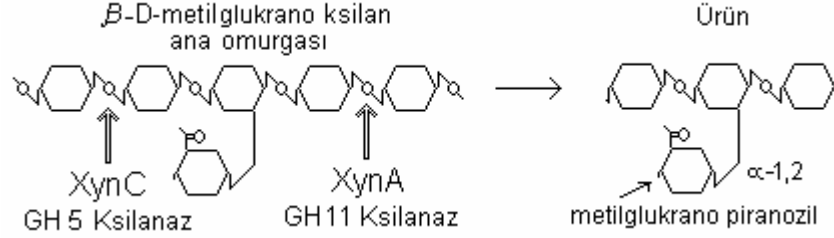
1. Endoksilanazlar ( E.C. 3.2.1.8 ); ana ksilan zincirini ksilooligosakkaritler oluşturarak rasgele parçalarlar.
2.  $\beta$ -ksilozidazlar ( E.C. 3.2.1.37 ); kısa ksilooligosakkaritlerden ksiloz salınımna yol açarlar.
3.  $\alpha$ -L-Arabinofuranozidazlar ( E.C. 3.2.1.55 ), yan dallardaki L-arabinozları ayırırlar..
4.  $\alpha$ -D-glukronidazlar ( E.C. 3.2.1.139 ), metil glukronat birimlerini hidroliz ederler.
5. Asetill ksilan esterazlar ( E.C. 3.1.1.72 ), asetat guruplarını ayırırlar.
6. Feruloil ( E.C. 3.1.1.73 ) ve kumaroil esterazlar ( E.C. 3.1.1.-), arabinofuranozid birimlerine bağlı aromatik asitleri ayırırlar.

Ksilan yan dalarında yer alan ester bağlarını hidroliz eden Asetil ksilan esterazlar ile Feruloil ve kumaroil esterazlar, GH enzimlerinden farklı olarak karbon hidrat esterazlar ( CE ) enzim ailelerinde yer alır ( Shallom and Shoham 2003 ).

GH-11 ve GH10 ksilanazı ailesi haricindeki bazı ksilanazlar da incelenmişlerdir. Az sayıda örneği bildirilmiş olan GH 5 enzim ailesinden ksilanazlara örnek olarak *B. subtilis* 168 izolatının GH 5 enzim ailesinden XynC endoksilanaz enzimi verilebilir. *B. subtilis* XynC ksilanazı ksilan ana omurgasını belli yan dalların olduğu kısımlardan kesmektedir. *B. subtilis* XynC enziminin yine aynı izolatın GH 11 enzim ailesinden XynA enzimi ile beraber ksilan hidrolizinde rol aldığı görülmektedir ( Franz et al. 2006 ). Ksilan ana omurgasını az yan dal almış ( substitute olmuş ) kısımlardan kesen temel ksilanazlar olan endo- $\beta$ -1,4-ksilanazlardan farklı olarak ( Puchart and Biely 2007 ), XynC enzimi, XynA enziminden farklı substrat seçiciliğine sahip olup  $\beta$ -1,4-xylan omurgasına metilglukranozil (  $\alpha$ -1,2-bağlı 4-O-methyl-D-glucuronopyranosyl; MeGA



) yan dallarının bulunduğu kısımlar üzerinden etki etmektedir. Bu yan dal tipinin, hemiselülozun biyolojik dönüşümünü sınırlamada en önemli engellerden olduğu bildirilmiştir. *B. subtilis* XynC enzimi daha önce yapısı belirlenmiş olan *Erwinia chrysanthemi* D1'in, GH 5 ailesi ksilanazına da yüksek yapısal homoloji göstermektedir ( Franz et al. 2006 ). Şekil 2.10'da *B. subtilis* 168 izolatının XynC ve XynA enzimlerinin metilglukorano ksilan üzerine ortaklaşa etkileri gösterilmiştir.



**Şekil 2.10.** *B. subtilis* 168 izolatının XynC ve XynA enzimlerinin  $\beta$ -D-1,4 metilglukorano ksilan üzerine ortaklaşa etkileri ( Franz et al. 2006 ).

Collinse et al. ( 2002 ), Antarktika'dan izole edilen *Pseudoalteromonas haloplanktis*'den, düşük sıcaklıklarda aktif, psikrofilik bir GH8 ksilanaz izole etmişlerdir. Antarktika'da substrat olarak ksilanın çok eser miktarda bulunması ve bu enzimin bakterinin şeker metabolizmasında rol almaması nedeni ile söz konusu enzimin bakteri tarafından alglerin hücre duvarını gevşetme ve enzimlerin alg çeper selülozuna ulaşmasını kolaylaştırdığı düşünülmüştür ( Collins et al. 2002 ). GH 43 enzim ailesinden ksilanazlara örnek olarak, termofilik *Geobacillus thermoleovorans*'dan elde edilmiş glikozid hidrolaz ailesi 43'da yer alan IT-08  $\beta$ -ksilozidazı verilebilir. Bu enzim endo-1,4- $\beta$ -ksilanazlar tarafından Ksilan ana omurgasının hidrolizi sonucu oluşan kısa ksilo-oligosakkaritleri ksiloz monomerlerine kadar parçalarlar ( Rohman et al. 2007 ). Söz konusu enzim bu bakımdan  $\beta$ -ksilozidazlara benzemektedir.

Gerçek ksilanazlar olan ve ksilanazların çoğunluğunu içeren GH 10 ve GH11 ailesinden ksilanazlar, uzun ksilan zincirleri üzerinde aktiftir ( Collins et al. 2002 ). Ksilan ana omurgasını parçalayarak kısa ksilooligomerleri oluştururlar ( Puchart and Biely 2008 ). Ksilan ana omurgası bu enzimler tarafından genelde yan dalların az olduğu kısımlardan 'endo' tarzda rasgele hidrolize edilerek kesilir ( Puchart and Biely 2007, Collins et al. 2005 ). Glikozit hidrolaz aile GH11 ksilanazlar G10 ksilanazlara kıyasla daha ufak boyutlara sahiptir. ( Collins et al. 2005 ). Bu nedenle hemiselülozik materyalin daha ince aralıklarına girebilirler. GH 11 ksilanazlar D-ksiloz içeren uzun polimer substratlara etkilidirler. GH 11 ksilanazlar oluşturduğu hidroliz ürünleri daha sonra GH 10 ksilanaz enzimlerince daha ufak birimlere parçalanmaktadır ( Collins et al. 2005 ).  $\beta$ -ksilozidazlar da, oluşan çok kısa ksilooligomerleri ksiloz ünitelerine kadar hidrolizinde rol alırlar ( Rohman et al. 2007 ).

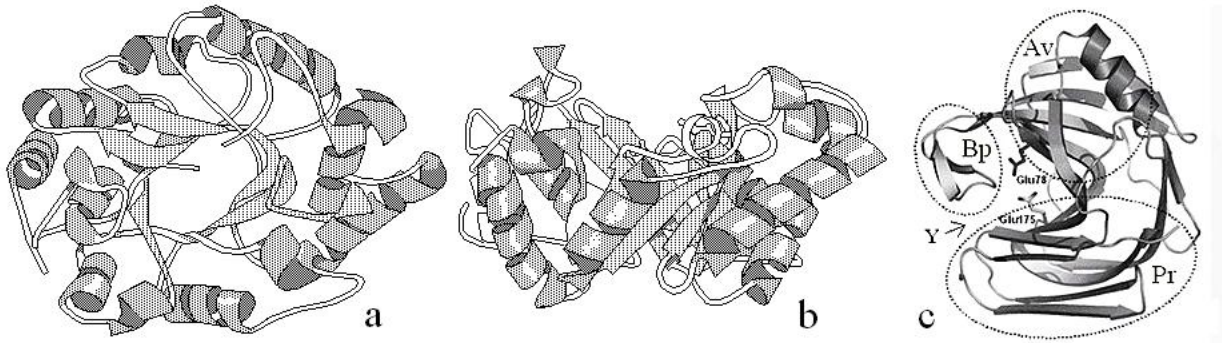
Kural olarak GH-11 ksilanazlar ksilan ana omurgasının indirgen ucunda, dallanmamış ardışık 3 ksiloz monomere gereksinim duymaktadır. Hidroliz sonunda da bir indirgen uç oluşmaktadır. Ksilanın en çok rastlanan tipi olan arabinoksilanların hidrolizinde, GH-11 ksilanazların oluşturduğu bilinen en kısa hidroliz ürünü, internal ksiloz rezidüsüne arabinoz bağlı

olan arabinoksilotriozlardır. ( GH-10 ) ksilanazlar ise en kısa hidroliz ürünü olarak arabinoksilobioz oluşturmaktadırlar ( Puchart and Biely 2008 ).

Ksilanazlar ile ksilanın hidrolizi sonucu ksiloz, ksilobioz, ksilotrioz gibi düşük ağırlıklı moleküller ile diğer oligosakkaritleri açığa çıkar. Bu moleküller karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıldıkları bakteri hücresine kolayca girebilirler. Ksiloz, ksilanaz sentezini uyarabilmektedir. Ksilooligomerler gibi daha büyük ksilan hidroliz ürünü moleküllerin değişik taşıyıcı moleküller aracılığı ile hücre içine alındıktan sonra parçalandığı veya Hücre içine taşınım sırasında hidrolitik taşıyıcı moleküller tarafından taşınım esnasında parçalandığı düşünülmektedir. *Bacillus thermoalkalophilus*'da ve diğer çoğu *Bacillus sp.* izolatında görüldüğü gibi ksiloz aynı zamanda ksilanaz salgılanışını katabolik baskılama yolu ile azaltabilmektedir ( Subramaniyan and Prema 2002 ). Birçok araştırmacı, kültür ortamına ksiloz veya glukoz gibi şekerler ilave edildiğinde, ksilanaz üretiminin önemli ölçüde düştüğünü bildirmiştir ( Pham et al. 1998 ).

Yan dallara sahip, parçalanma ürünü ksilooligomerlerin hidrolizinde rol alan enzimler de mikroorganizmaların gelişimi açısından önemlidir. Başlıca ksilanolitik enzim olarak GH-11 ksilanaz üretilen, belirlenebilecek düzeyde extracellular  $\beta$ -ksilozidaz,  $\alpha$ -glukuronidaz ve  $\alpha$ -l-arabinofuranozidaz üretmeyen *Thermomyces lanuginosus* ( *Humicola lanuginosa* ) izolatları, Substrat olarak buğday arabinoksilanı içeren ortamda geliştirildiklerinde, oluşan liner  $\beta$ -1,4-ksilooligosakkaritler hızlıca hücre içine alınıp metabolize edilmişlerdir. Buna karşın karbon kaynağı olabilecek diğer yan dal almış hidroliz ürünlerinin kültür ortamında biriktiği görülmüştür. Bu gibi son ürünlerin parçalanmasında başka enzimlere gereksinim bulunmaktadır ( Singh et al. 2003 ).

Benzer aminoasit dizilimi, üç boyutlu yapı ve katalitik kısımlara sahip glikozit hidrolaz enzimleri bir aile içinde gruplandırılmaktadır ( Collins et al. 2002 ). GH10 ve GH11 ailesinden ksilanazlarda, aile içi benzerlik yüksek derecededir. Şekil 2.11'de GH10 ve GH11 ailesinden ksilanazların genel yapısı gösterilmiştir.



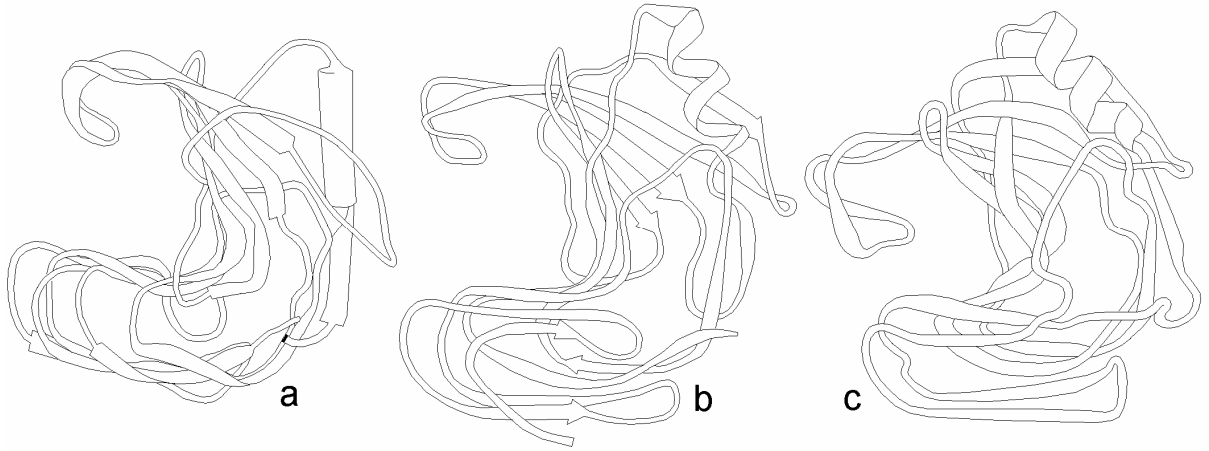
**Şekil 2.11.** GH10 ve GH11 ailesinden ksilanazların genel yapısı. Ksilanaz ailesi 10'a ait bir enzimin üstten ( A ) ve yandan ( B ) görünümü. *Bacillus subtilis* strain 168 örneğinde ksilanaz ailesi 11 enzimlerinin genel görünümü ( C ) ( Liu et al. 2004 ). Bu aileden enzimlerde tipik olan başparmak (Bp) , avuç ( Av ) ve parmaklar ( Pr ) olarak adlandırılmakta olan domainler ile substrat bağlanımı ve katalitik aktivitenin gerçekleştiği bir yarık ( Y ) görülmektedir ( Murakami et al. 2005 ). Şekillerde enzimlerin  $\alpha$ -heliks ve  $\beta$ -tabaka yapıları kurdela tarzında gösterilmiştir.

Ksilanaz ailesi 11 enzimlerinin avuç ( Av ) domainlerinde tipik olarak bir adet  $\alpha$ -heliks yapısı görülmektedir. Ksilanaz ailesi 10'da ise çok sayıda  $\alpha$ -heliks yapısı görülmektedir.

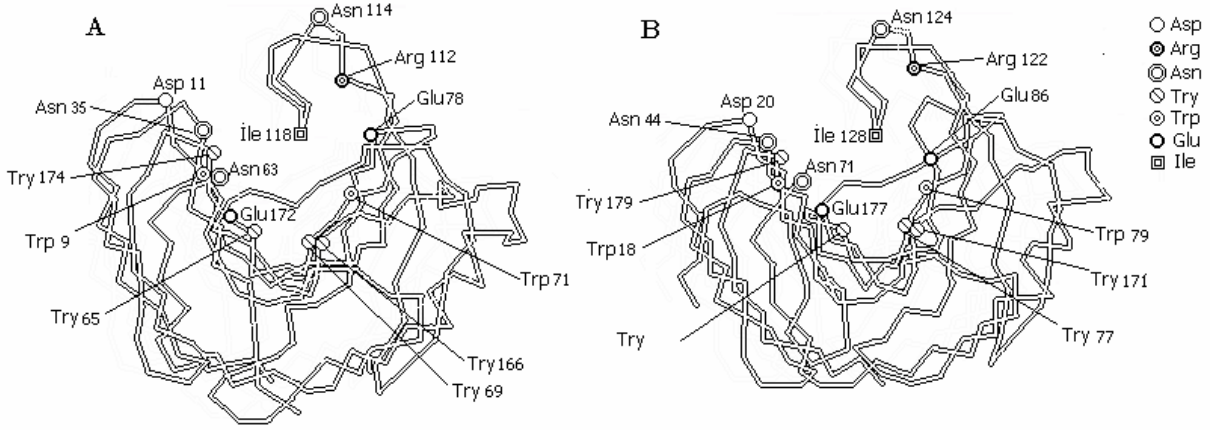
GH 11 ailesinden ksilanazlar enzimleri sadece ksilanaz aktivitesi gösteren enzimlerdir ( Puchart and Biely 2008 ). Fungal ve bakteriyel GH 11 enzimlerinin genel üç boyutlu yapıları şaşırtıcı derecede benzer olup çok sayıda  $\beta$ -pileli yapı ve bir  $\alpha$ -heliks yapısı içerirler ( Collins et al. 2005 ). GH10 ksilanazlar ise aile 11 ksilanazlardan daha büyük yapıda olup yapılarının genel formülü  $(\beta/\alpha)_8$  şeklindedir ( Liu et al. 2002 ).

Birçok fungal ksilanaz ile *Cellulomonas fimi* bakterisinin GH11 ksilanazında amino asit dizilimi açısından %30 oranında benzerlik görülmüştür ( Sato et al. 1999 ). Liu et al. (2002), GH11 ksilanazlarda % 40 – 90 arasında değişen sekans özdeşliği bulunabileceğini belirtmiştir. Değişik bakterilerde ksilanaz benzerliği bazen çok yüksektir. *Bacillus firmus* izolatından elde edilen GH11 aile ksilanazı olan Xyn11A, *Bacillus halodurans* GH11 ksilanazına oldukça benzer olup sadece bir amino asit farklı olduğu belirlenmiştir ( Chang et al. 2004 ).

Benzerlik enzim üç boyutlu yapısında da çok çarpıcıdır ( Sato et al. 1999 ). Şekil 2.12'de Bakteriyel ve fungal GH11 ksilanazlarda üçboyutlu yapıdaki benzerlik gösterilmiştir. Şekil 2.13 'de ise *Bacillus circulans* bakterisi ve ökaryotik *Trichoderma harzianum* izolatlarının GH11 ksilanazlarda üç boyutlu ve bazı amino asitler açısından benzerlik gösterilmiştir.



**Şekil 2.12.** Bakteriyel ve fungal GH11 ksilanazlarda şekilsel benzerlik. *Aspergillus niger* ( a ), ( Asano et al. 2006 ); *Trichoderma reseei* ( b ), ( Törrönen et al. 1994 ) ve *Bacillus subtilis* ( C ), ( Murakami et al. 2005 ) türlerinden bazı izolatlara ait G/11 ksilanazların üç boyutlu yapıdaki benzerlikleri



**Şekil 2.13.** *Bacillus circulans* 1XNB ( A ) ve *Trichoderma harzianum* 1XND ( B ) ksilanaz ailesi 11 enzimlerinin organizmaların uzak genetik mesafelerine karşın çok benzer olan üç boyutlu görünüşleri. Ayrıca, dizilim sıraları farklı olmasına karşın üç boyutlu yapıda benzer pozisyonlarda yer alan bazı amino asitler görülmektedir ( Jeffries 1996 ).

GH11 ailesi ksilanazlardaki büyük benzerliğe karşın, başta optimum sıcaklık ve pH özelliklerinde olmak üzere, enzim IP değerleri, substrat seçiciliği gibi özelliklerde farklılıklar görülmektedir. GH11 aile ksilanazlarda IP değerleri, optimum pH ve sıcaklıkları farklı çok sayıda enzim bildirilmiştir ( Sapag et al. 2002 ). GH11 ksilanazlarda başparmak, alfa heliksin karboksil ucu ve katalitik bölgenin bulunduğu substrat bağlanma yarığında önemli derecede benzerliklere rastlanılmaktadır. Enzim primer yapısının iki ucunda olduğu gibi bazı bölgelerde ise büyük farklılıklar bulunabilmektedir. Genelde 100. Amino asit civarı optimum pH açısından önemli görülmektedir. Birçok alkalifilik GH11 ksilanazda pH açısından önemli görülen 100. aminoasit civarında görülen asparajinin yerini, asidik şartlarda etkin ksilanazlarda aspartik asit almaktadır. A. *Kawachii*'de bu pozisyondaki Asp nin yerini Asn aldığı optimum pH değerinin 2 den 5'e kaydığı görülmüştür. 167. Amino asit civarında ise katalitik aktiviteden sorumlu amino asitler bulunur. Ksilanazların özelliklerinin geliştirilmesi için rasgele ve yönlendirilmiş mutagenesis çalışmaları gibi yöntemlerle çalışmalar yapılmaktadır ( Sapag et al. 2002 ). GH11 Ksilanazlarda benzerlik oranı çok yüksek ( korunmuş ) bazı pozisyonlardaki amino asit residülerinin üç boyutlu yapının korunması, optimum pH gibi enzim fonksiyonu için önemli oldukları görülmüştür. Bu enzim ailesinden alkali aktif enzimlerde *Bacillus pumilis* A-30 izolatı GH11 ksilanazı örneğinde olduğu gibi optimum Ph açısından çok önemli olan Asn-71 görülürken asidik olanlarda burada aspartat bulunur ( Liu et al. 2004 ).

Damaso et al. ( 2002 ), değişik enzim ailelerinden çoğu termofilik proteinde, hidrojen bağları ve tuz köprülerinin yüksek oranda bulunduğunu tespit etmiş olduklarını belirtmiştir. Hidrojen bağları ve tuz köprülerinin yüksek oranda bulunmasının, enzimi ve aktivitesini deforme edici şartlardan koruduğunu belirtmiştir. Ksilanazlarda termostabilitede birçok yapısal faktörün rol aldığı belirtilmiştir ( Connerton et al. 1999 ). Nokta mutasyonları ile ksilanazların değişik özelliklerin mekanizmaları araştırılmaktadır. B. *circulans* GH10 ksilanazında disülfid köprüsü ilavesi ile yapısal değişiklik ile termal stabilite artışı belirlenmiştir ( Davoodi et al. 2006 ). Disülfid köprüsü sokulması ile B. *stearothermophilus* No. 236 XynA ksilanaz aile 11 enziminde

termostabilitede 5<sup>0</sup>Clik artış belirlenmiştir ( Paës and O'Donohue 2006 ). Ancak, Birçok termofilik ksilanazda disülfid bağlarının termal stabilite de yeterli bulunmamıştır. Genelde termofiliklik çok farklı yollarla gerçekleşebilmektedir. Örneğin, birçok termofilik ksilanazda disülfid bağı oluşumunda rol alan sistein bulunmadığı görülmüştür ( Sapag at al. 2002 ). G11 ksilanazlarında karşılaştırmalı yapısal analizlerde genel olarak hidrofobik paketlenme ve internal hidrojen bağlarında artış ile termostabilite artışı arasında genel bir doğru orantı gözlenmiştir. Termofilik ve mezofilik G11 ksilanaz enzimleri üzerinde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda, özellikle katalitik merkezin civarında bulunanlar başta olmak üzere, termostabilitede önemli olabileceği düşünülen bazı amino asitler ve yüzey aromatik rezidülerdeki ufak farklılıkların termostabilitede önemli rol oynadığı görülmüştür ( Collins et al. 2005 ).

Değişik G11 ksilanazlarda pH 2–11 arasında aktivite görülebilir. Ksilanazlar üzerinde yapılan çalışmaların sonucunda alkali ve yüksek sıcaklıklara dayanma özelliğinin benzer moleküler yapı ve mekanizmalara bağlı olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca, enzimdeki ufak değişiklikler optimum değerler ve direnç özelliklerinin değişmesine sebep olabilmektedir. Mutagenesiz çalışmaları ile asidik şartlarda aktif ksilanazlarda asidik amino asitlerin önemli rol oynadığı , alkali şartlarda etkin ksilanazlarda ise asidik rezüdelerin azlığı ve artan arginin oranı gibi bazı farklılıklar gözlenmiştir ( Collins et al. 2005 ).

Ksilanazların substrat tercihi ve parçalanma ürünlerinde de farklılıklar görülmektedir. Sunna et al. ( 1997 ), izole ettikleri iki *Bacillus sp.* izolatın ksilanazları ile BW-ksilan hidrolizinde farklı degradasyon ürünleri oluşturduklarını belirlemişlerdir. K-3d izolatının ksilanazı ile temel ksilan parçalanma ürünleri ksilotrioz, ksilotetroz ksilopentaoz ve daha büyük ksilooligomerler olurken LB3A izolatı ksilanazı ile temel ksian parçalanma ürünü ksilotetroz olmuştur. Dhillon et al. ( 2000a ), *B. circulans* AB 16 izolatından saflaştırdıkları Xyl A ve Xyl B ksilanaz enzimlerinin ksilanı hidrolizi ile açığa çıkan hidroliz ürünlerini, Xyl A için başlıca ksilobioz, az oranda da ksilooligosakkaritler ve ksiloz olduğunu, Xyl B enzimi için ksilan hidroliz ürünlerinin ise başlıca ksilooligosakkaritler ve az oranda ksilobioz ile çok az oranda ksilozdan oluştuğunu belirlemişlerdir.

Ksilan yan dallarının özellikleri ve substrat polimer uzunluğu gibi özelliklere bağlı olarak farklı ksilanazlar farklı ksilanlara farklı afinite göstermektedir. *Trichoderma longibrachiatum*'a ait bir ksilanaz da substrat polimer uzunluğundan ziyade yan dal yoğunluğuna bağlı olarak aktivitede belirgin düşüş gözlenmiştir ( Liab et al. 2000 ). Farklı ksilanazların beraber çalışmaları ile lignoselülozdaki ksilanın hidrolizinin arttığı bildirilmiştir. Bu durumun bir mikroorganizmada farklı ksilanaz izoformlarının bulunmasını açıkladığı düşünülmektedir ( Badhan et al. 2004 ). *Bacillus subtilis* izolatına ait endoksilanaz daha çok buğday kepeğinin su ile ekstrakte edilemeyen arabino ksilanlara etkili olurken, *Aspergillus aculeatus* endoksilanazı daha çok su ile ekstrakte edilebilen arabinoksilanlara etkili görülmüştür ( Maes et al. 2004 ).

Birçok fungusta kültür ortamı bileşenlerine bağlı olarak bir mikroorganizmaca kültür ortamına salgılanan farklı ksilanazların ve ksilanaz izoformlarının salgılanma miktarının değişebildiği görülmüştür. Farklı ksilanaz izoformlarının substrat seçiciliğinde de farklılıklar olmaktadır. Ksilan hidrolizinde temel rol oynayan ve mikroorganizma tarafından daha yüksek

miktarda salgılanan ksilanazlar, Major ksilanazlar olarak tanımlanmaktadır. Çok daha düşük miktarda salgılanan ve ksilan hidrolizinde yardımcı rol oynayan ksilanazlar ise minor ksilanazlar olarak tanımlanmaktadır. Değişik ksilanaz izoformlarının substrat tercihi ksilanların yan dalların varlığına ve yan dal çeşidine göre farklılık göstermektedir ( Badhan et al. 2004 ).

Ksilanazların kâğıt hamurunda etkinliğini sınırlandıran bir etken de enzimlerin ksilana ulaşabilmesinde görülen sınırlamalardır ( Schönberg et al. 2001 ). Hemiselulozik materyalin lignin, selüloz ve ksilandan oluşan mikro yapısı lignin parçalayıcı enzimler ve diğer birçok enzim için girilmesi zor ve 10nm'den dar aralıklara sahiptir ( Archibald et al. 1997 ). Kâğıt endüstrisinde kullanılacak ksilanazların kâğıt hamuruna daha iyi diffüze olabilmesi için düşük moleküler ağırlık sahip olması istenilen diğer bir özelliktir ( Yavuz 2003 ). Bu özelliğe sahip ksilanazlar ise genelde GH enzim ailesi 11 ksilanazlardır. Ksilanazların yapısı genel olarak sıkı paket şeklinde olmadığı için substrata ulaşma kabiliyetleri de birçok hidrolitik enzimden yüksektir. Ksilanazların spesifik aktiviteleri, kristalin selüloz gibi substratları hidrolize eden enzimlerden 2 – 4 kat daha yüksektir ( Subramaniyan and Prema 2002 ). *Bacillus firmus* izolatu kökenli GH10 ve GH11 aile ksilanazlar olan Xyn11A ve Xyn10A enzimleri örneğinde olduğu gibi GH10 ksilanazlar yaklaşık 396 amino asitlik ve 45 kDa'luk, GH11 ksilanazlar ise yaklaşık 210 amino asitlik ve 23 kDa'luktur ( Chang 2004 ). *Trichoderma reesei* GH11 enzim ailesi xylanase II proteini 190 amino asit içermektedir ( Törrönen et al. 1994 ). Yapı olarak GH10 ksilanazlardan daha ufak olan GH11ksilanazlar, bu nedenle hemiselulozik materyaldeki ksilanın hidrolizinde daha etkindir.

Genom içinde birçok ksilanaz izoenzim genleri bulunabilir ( Collins et al. 2005 ). *S. halstedii*'den klonlanan ksilanaz geninin iki farklı ksilanaza transkribe olduğu görülmüştür. Bir kısım multiple enzimlerin, gen ürünlerinin proteoliz ve glikozilasyonu ile post-translasyonel modifikasyonlar ile oluştuğu, bu durum karşılaşılabilecek değişik tipte ksilanların hidrolizinde faydalı olabileceği düşünülmektedir. *T. reesei*'de. pI değerleri 5,2 ve 9,0 olan iki farklı ksilanaz belirlenmiştir ( Uffen 1997 ). *Streptomyces* sp. B-12-2'nin substrat olarak oat-spelt-xylan'da gelişirken 5, *Aspergillus niger*'in 15, and *Trichoderma viride*'nin ise 13 farklı ksilanaz ürettikleri belirlenmiştir. Avicel substrat olarak kullanıldığında *Phanerochaete chrysosporium*'un 30 farklı ksilanaz ürettiği belirlenmiştir. Benzer şekilde çok sayıda farklı ksilanaz üretimlerine dair çok örnek bulunduğu bildirilmiştir. Bu durum ksilan hidrolizinin bir biri ile uyumlu ancak farklı özellikte ksilanazlar gerektirmesi olarak yorumlanmaktadır ( Subramaniyan and Prema 2002 ). Ökaryotik organizmalar olan Fungusların ksilanaz genlerinde ve özellikle katalizden sorumlu kısımların çevresinde değişik modül organizasyonlarında görev alan bir çok intron kısmı bulunmaktadır. Bir türde neden bu kadar çok intron kısmı bulunduğu anlaşılamamıştır. ( Sato et al. 1999 ). Değişik fungal ve bakteriyel mikroorganizmaların moleküler ağırlıkları, optimum sıcaklık ve pH'ları farklı ksilanazlar ürettikleri görülmektedir. Gessesse ( 1998 ), alkalifilik *Bacillus* sp. strain AR-009'den, 23 kDa'luk (XylA) ve 48 kDa'luk (XylB); Raghukumar ( 2004 ), ise fakültatif denizel *Aspergillus niger* izolatından optimum sıcaklık ve pH'ları farklı iki ksilanaz izole etmişlerdir. Elegir et al. ( 1995 ), *Streptomyces* B- 12-2 izolatında bazik pH değerine sahip 2

ksilanaz, asidik pH değerine sahip 3 ksilanaz olmak üzere iki sınıfa ayrılan farklı grup ksilanaz enzimleri izole etmişlerdir.

Organizmaların sahip olduğu farklı ksilanazlar, ksilan hidrolizinde birbirini desteklemektedir. *Bacillus firmus* izolatından elde edilen saflaştırılmış 45 kDa'luk ve 23 kDa'luk ksilanaz enzimleri beraber ksilan hidrolizinde kullanıldığında açığa çıkan hidroliz ürünlerinin, söz konusu ksilanazların ayrı ayrı kullanıldığında açığa çıkanlardan farklı olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar iki enzimin birlikte etkisi ile ksilan hidrolizinin daha ufak ürünler verdiği görülmüştür. Bu iki enzimin optimum pH değerlerinin 45 kDa ksilanaz için pH 6-8, 23 kDa'luk ksilanaz için pH 6-7 olarak birbirinden az farklı olduğu görülmüştür ( Tseng et al. 2002 ).

Bazı GH10 ve GH11 enzimlerinde ilave selüloz bağlanma alt birimleri ( CBD ) belirlenmiştir ( Sapag et al. 2002 ). Subramaniyan and Preme ( 2000 ) , Black et al. ( 1997 )'a dayanarak ksilanazlarda CBD birimlerinin bulunmasının muhtemel sebebini, bitki hücre duvarı hidrolize edici enzimler için selülozun genel bir reseptör işlevi görmesi olarak belirtmiştir. Ksilanaz CBD'leri *Cellulomonas fimi*, *Clostridium stercorarium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces halstedii* JM8, *Fusarium oxysporum* F3'da belirlenmiştir ( Subramaniyan et al. 2000 ).

Ksilanazlar başta kâğıt endüstri olmak üzere birçok endüstri alanında kullanım olanağına sahiptir. Selülazlar ve polisakkaridazlarla ilgili çalışmalar lignoselülozun besin ve enerji kaynaklarına dönüştürülme düşüncesi ile 1950'lerde başlamıştır. Yoğun çalışmaların sonucunda enzim yoluyla yapılacak bu dönüşümlerin çok zor ve pahalı olduğu düşüncesi oluşmuştur. Selülazlar ve hemiselülazlar ile ilgili çalışmalar 1980'lerin başında başta hayvan yemi ve gıda endüstrisinde kullanılma konuları üzerinde olmak üzere tekrar yoğunlaşmıştır ( Bhat 2000 ). Ksilanazlar, tekstil sanayinde ( Dhiman et al. 2008 ), Kâğıt, fırıncılık, hayvan yemi, meyve ve sebze işleme, Şarap ve bira yapımı, nişasta gibi değişik endüstriyel alanlarda ( Shrivastava et al. 2007 ), viskoz rayon ve diğer selüloz türevlerinin yapımında hammadde olarak kullanılan ve Yüksek saflık ve beyazlık gerektiren 'Sulfite dissolving pulp' eldesinde rezidual ligninin giderilmesi için ( Christov et al. 2000 ), yapay ipek ( rayon ) yapımında kullanılmak üzere selülozun saflaştırılmasında ( Srinivasan ve rele 1999 ), Kâğıt, fırıncılık, hayvan yemi, meyve ve sebze işleme, Şarap ve bira yapımı, nişasta, tekstil gibi değişik endüstriyel alanlarda ( Shrivastava et al. 2007 ) kullanım alanı bulmuşlardır. Lignoselülozik materyaller şeker, biyo yakıt, alkol gibi ürünlerin eldesinde ucuz hammadde kaynaklarıdır ( Oliveira et al. 2006 ). Yeryüzündeki biyolojik maddenin büyük bir kısmını oluşturan Hemiselülozun önemli kısmını ksilan fraksiyonundan oluşmaktadır. Ksilanın parçalanması ile oluşan ve temel monomeri olan ksiloz geliştirilecek yeni teknolojilerle asetat, laktat, suksinat, propionat ayrıca metan, biyogaz ve biyoyakıt oluşumu gibi birçok değerli maddenin oluşumu için de büyük miktarda hammadde olma potansiyeline sahiptir ( Uffen 1997 ). Bazı *Bifidobacterium*'larda endoksilanaz tespit edilememiş olmasına karşın, kısa ksilan parçalanma ürünleri ve ksilan yan dallarının parçalanmasında rol alan ksilozidaz, arabinozidaz varlığını tespit edilmiştir. *Bifidobacterium*'ların sindirim sisteminde diğer bakterilerin ksilan parçalanma ürünlerinden faydalandığı düşünülmektedir. Ksilanın ksilanazlarca parçalanması ürünü olarak

oluşan ve *Bifidobacteria* gelişimini destekleyen ksilooligosakkaritler son zamanlarda etkili prebiyotik gıda katkısı olarak önem kazanmıştır ( Zeng et al. 2006 ).

## 2.7. Kâğıt Endüstrisinde Kullanılacak Ksilanazlarda Aranan Özellikler

Enzimatik kâğıt hamuru beyazlatmada temel değişkenler enzim ve hamur yoğunlukları, pH sıcaklık ve uygulama süresidir. Hamur yoğunluğu, genel olarak, g / hacim ve % g kuru hamur ( veya % g fırın kurusu hamur, fk hamur ) olarak belirtilmektedir. Uygulanan enzim yoğunluğu ise IU/g fk-hamur olarak belirtilmektedir. Değişik araştırmacıların enzimlerin, değişik köken ve işlemlerle elde edilmiş hamur tipleri üzerindeki etkilerini 1 – 15 IU/g kuru hamur Enzim yoğunluğu, 40 – 70°C sıcaklık, 0.5 – 24 saat süre ve pH 3.5 – 9 değerleri arasında denemişlerdir (Jiménez et al. 1999, Srinivasan and Rele 1999, Beg et al. 200,1Tamerler 2001 ). Kraft pişirme işlemi ile elde edilen kâğıt hamuru sıcak ve alkalidir. Pişirme işlemi takip eden alkali ekstraksiyon ve beyazlatma aşamaları da sıcak, alkali işlemlerdir. Ksilanazların kullanımı için en uygun yer bu aşamaların arasında olduğundan endüstriyel olarak kâğıt hamuru beyazlatmada kullanılacak ksilanazların yüksek sıcaklıklarda ( yaklaşık 60°C ) etkinliğini kaybetmemesi önemlidir.

Endüstriyel açıdan sıcaklıkta yapılacak değişiklikler önemli sayılabilecek maliyet gerektirmektedir. ( Srinivasan and Rele 1999, Beg et al. 2001 ). Kâğıt üretiminde pH ayarlama Endüstriyel açıdan nispeten daha kolay ve daha az maliyetlidir ( Srinivasan and rele 1999 ). Ancak, eğer asidik şartlarda etkin bir enzim kullanılacak ise, enzim eklenmeden önce asit kullanarak alkaliliğin düşürülmesi daha sonraki işlemler için pH'nın tekrar yükseltilmesi gerekecektir. ( Tamerler 2001 ). Kâğıt beyazlatma açısından tercih edilen enzimler, yüksek alkali ve sıcaklıkta aktif olan enzimlerdir. Bu tip enzimler, büyük miktarda kâğıt hamurunun pH ayarlaması için gereken kimyasallardan ve soğutma ve tekrar ısıtma yolu ile kaybedilen enerji açısından önemli zaman ve para kazancına sebep olmaktadır ( Gessesse 1998 ). Bakteriyel ksilanazların optimum pH değerleri genelde funguslarınkilerden yüksektir. Kâğıt endüstrisinde ve özellikle kraft hamuru üretiminde düşük optimum pH değerlerine sahip enzimlerin kullanılması, ilave işlem aşamalarının oluşturulmasını gerektirir ( Subramaniyan and Prema 2000 ).

Kâğıt beyazlatma işlemleri için ilk ticari ksilanaz preparatları ve ksilanazlar üzerine yapılan çalışmalar fungal kökenli izolatlarla gerçekleştirilmiştir. 1996 yılında ksilanaz üretiminde önde gelen 15 firmanın ürettiği ksilanaz preparatlarının fungal kaynaklı ve optimum aktivitelerinin < pH 5.5 olduğunu bildirmiştir. Çoğu fungal ksilanaz pH 2–9 arasında stabil olmalarına karşın optimum aktiviteleri pH 5 civarındadır. İstisnalar hariç, genel olarak kâğıt yapımı işlemleri için fungal ksilanazların optimum pH dereceleri, optimum aktiviteleri çoğu kez alkali pH derecelerinde olan bakteriyel ksilanazlar kadar uygun değildirler ( Subramaniyan and Prema 2000 ). Bakteriyel kökenli ksilanazların stabil ve etkili oldukları pH değerleri daha çok 6 – 9 arasında, fungal kökenli olanların ise 4 – 6 arasında değişmektedir. ( Tamerler 2001 ).



Bakteriyel ksilanazlar için temel sorun üretim miktarlarının genelde düşük olması gibi görünmektedir ( Subramaniyan and Prema 2000 ).

Ksilanaz saflaştırma işlemlerinin selektif bağlayıcı kolonlar kullanılarak ( affinity purification ) daha ekonomik olabileceği gibi bazı çözümler önerilmiş olmasına karşın, enzim saflaştırma işlemleri ve saflaştırılmış ksilanazlar maliyetleri sebebi ile endüstriyel olarak kullanıma pek uygun değildir ( Pham et al. 1998, Ito et al. 2004 ).

Ksilanaz preparatlarının selülaz aktivitesi içermemesi de istenen önemli bir özelliktir. Fungusların çoğunda, ksilanaz yanında selülaz aktivitesinin de bulunması fungusların kâğıt endüstrisinde kullanılabilmesi açısından dezavantajların başında gelmektedir ( Subramaniyan and Prema 2000 ). Ksilanaz uygulaması ile kâğıt hamuru liflerinde belirgin bir bozulmaya rastlanmamaktadır ( Subramaniyan and Prema 2002 ). Selülazlar ise kâğıt yapımında temel madde olan selülozun hidrolizine neden olmaktadır. ( Subramaniyan and Prema 2000 ). Ancak düşük seviyede selülaz içeren enzim preparatları, özellikle yüksek ksilanaz aktivitesi içeriyorlarsa, düşük seviyede selüloz kaybına ile kâğıt endüstrisinde kullanılabilirler. Bu arada, beyazlatmada kullanılan kimyasalların da selüloz üzerinde her zaman bir miktar etkisi olduğunu belirtmek yerinde olur. Mikroorganizmalarca selülaz aktivitesiz 'cellulase-free' ksilanaz üretimi birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir ( Srinivasan and Rele 1999 ). Kâğıt hamuru selülozunun selülazlarca zarar görmesi viskozite artışı ile belirlenir.

Ayrıca bu amaçla kullanılacak ksilanazların kâğıt hamuruna daha iyi diffüze olabilmesi için düşük moleküler ağırlık ve özelliğe sahip olması istenilen diğer bir özelliktir ( Yavuz 2003 ). Bu özelliğe sahip ksilanazlar ise genelde GH enzim ailesi 11 ksilanazlardır.

Endüstriyel enzim üretiminde maliyetlerinin önemli bir kısmını da mikroorganizmaların gelişmesinde kullanılan ortamların maliyetleri oluşturmaktadır ( Dhillon et al. 2000c ). Ekonomik açıdan, saflaştırılmış ksilan substratları ksilanaz üretimi için çok pahalıdır ( Pham et al. 1998 ). Bu nedenle düşük fiyatlı gelişme substratlarının kullanılması maliyetin düşürülmesi açısından çok önemli görülmektedir. Tarımsal faaliyetler sonucu açığa çıkan saman, kepek gibi yan ürünler ucuz gelişme substratları tanımı için en uygun ürünlerdir ( Dhillon et al. 2000c ). Kâğıt üretiminde kullanılacak bu tip ham maddeler, özellikle tarıma dayalı bölgelerde yan ürün olarak yıllık 2,5 milyar ton gibi büyük miktarlarda elde edilmektedir. ( Rousu and Anttila 2002 ). Techapun et al. ( 2003 )'a göre ise, Tarımsal faaliyetler sonucu açığa çıkan ve ksilanazlar için substrat olarak kullanılacak hemiselülozik madde içerdiğinin, yıllık bitki atıklarının %20-40'ını oluşturmakta ve yıllık olarak 500 milyon tonu bulunduğu tahmin edilmiştir.

## 2.8. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmalar

Ksilanazlar, fungus ve bakteriler gibi mikroorganizma guruplarında yer alan çok sayıda farklı mikroorganizma tarafından üretilmektedir. Ksilan hidroliz edici bakteriler, Gram-negatif, Gram-pozitif, aerobik veya anaerobik, normal veya ekstrem şartlarda gelişenler gibi büyük çeşitlilik gösterirler. Birçok bakteri ve fungus selüloz ve hemiselülozu parçalama kabiliyetindedir. Bunlardan önemli kısmı saprofitik, serbest, toprak veya su ortamına uyumlu mezofilik,

termofiliktir, aerobik veya anaerobik organizmalardır. Bazıları ise geniş getiren hayvanların, bitki veya odun yiyici böceklerin sindirim sisteminde bulunurlar ( Uffen 1997a ). GH 10 ve11 ailesinden ksilanazlar, bakteri, alg, fungus, protozoa, gastropod ve arthropodlar gibi birçok canlı gurubunca oluşturulmaktadır. Bu ksilanaz üretici canlılar termofilikler ve alkalofiliklerden asidofiliklere kadar değişen özelliktedirler ( Shrivastava et al. 2007 ).

Gram pozitif boyanma özellikli endosporlu bakteriler bitkisel maddenin döngüsünde önemli rol alan toprak bakterileridir. Genelde bu bakteriler aerobik veya anaerobik olarak ksilanı parçalayıp asit ürünler ve gaz oluştururlar. Bu bakterilerden aerobik veya fakültatif anaerobik olarak ksilanı parçalayan bakteriler olarak *Bacillus subtilus*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. polymixa*, *Streptomyces* spp. gibi mikroorganizmalar bildirilmiştir. Anaerobik olan bakteriler olarak değişik *Clostridium* sp. izoatları bildirilmiştir. *Pseudomonas floescens* subsp *cellulose*, ksilanaz üreten Gram negatif boyanma özellikli ve sporsuz bakterilere örnektir. Diğer birçok Gram negatif boyanma özellikli ksilan kullanıcı bakteri rumende yerleşmiş görünmektedir. Ksilanı parçalayabilen anaerobik termofilik bakteriler ve sporlu bakterilerden *Clostridium thermocellum*, *C. thermohydrosulfiricum*, *C. thermosaccharlyticum*, spor oluşturmayan *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *T. acetigenum*, *Thermoanaerobacterium brockii*, *Thermbacteroides* türleri gibi bakterileri içermektedir ( Uffen 1997a ).

Çok tanınan bazı aile 11 ksilanaz üreticileri, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus niger*, *Bacillus circulans*, *Trichoderma reesei* ve *Trichoderma harzianum* olarak verilebilir. *Thermomyces lanuginosus* ( önceki adıyla *Humicola lanuginose* ) önemli ksilanaz üretici bir fungustur. Bu türün bir çok izolatu çok farklı ortamlardan izole edilebilmekte olup, 50°C - 80°C sıcaklıklar ve pH 3 -12 arasında değişen şartlarda stabil ksilanazların üretimi bildirilmiştir. Fungusun birçok selüloz negatif izolatu da bildirilmiştir ( Shrivastava et al. 2007 ). *Trichoderma*, *Penicillium*, and *Aspergillus* gibi çok rastlanan funguslar genelde selülaz da üretmektedir ( Srinivasan and rele 1999 ). *Thermoascus*, *Cephalosporium*, *Sclerotium*, antarktika'dan izole edilmiş, *maya Cryptococcus alcliae* gibi birçok başka fungus genusunda ksilanaz üretimi görülmektedir. *Aspergillus* sp. 2M1, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium canescens*, *Penicillium janthinellum*, gibi bazı fungal izolatlara aktinomisetlerden *Streptomyces lividans*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces* sp. Ab106, *Thermoactinomyces thalophilus* izolatlarında kâğıt endüstrisi için aranan bir özellik olan selülaz negatif ksilanaz üretimi tespit edilmiştir (Techapun et al. 2003 ). *Bacillus* türlerinin selülaz pozitif ve negatif izolatlarına rastlanabilmektedir. Örnek olarak, Nakamura et al. ( 1991 ), *Bacillus subtilis*'in selülaz pozitif, Khanongnuch et al. ( 1991 ) ise *Bacillus subtilis*'in selülaz negatif, ksilanaz üretici izolatlarını bildirmişlerdir. Lee et al. ( 2008 ) tarafından *B. licheniformis*., *B. circulans* ve *Bacillus pumilus*'in Selülaz pozitif izolatları bildirilmiştir. Dhillon and Khanna ( 2000 ), *Bacillus circulans*'ın İhmal edilebilir düzeyde selülaz üreten AB 16 izolatını; Duarte et al. ( 2000 ), selülaz negatif üç *B. Pumilus* izolatını; Archana ( 1997 ), selülaz negatif ksilanaz üretici *Bacillus licheniformis* A99 izolatını bildirmişlerdir.

Bazı mikroorganizmalar çok sayıda farklı ksilanaz ( multiple xylanases ) üretirken, bazılarında ksilanaz çeşitliliği azdır. Çok sayıda farklı hidroliz enzimi üreten mikroorganizmaların

oluşumuna sebep olduğu mono ve disakkaritler genelde çevredeki mikroorganizmalarca alınır. Bazı mikroorganizmalar ise farklı bir strateji uygulayarak az çeşitlilikte hidroliz enzimi salgırlar ve polisakkaritleri tam olarak parçalamazlar. Polisakkaritlerin monomerlere kadar parçalanımı hücre içinde gerçekleşir. Bu durumda çevredeki rekabetçi non-selüloolitik mikroorganizmalar, mono ve disakkaritleri elde edemez ( Shallom and Shoham, 2003 ). Mikroorganizmalar farklı özellikte ksilanazlar üretebilir. Georis et al. ( 1999a ), *Streptomyces* sp. strain S38'den kraft kâğıt hamuru beyazlatma yeteneğinde farklı üç farklı ksilanaz belirlemişlerdir. Aynı çalışmada izole edilen dört farklı *Bacillus pumilus* izolatu ile yapılan bir çalışmada, izolatların morfolojik, bazı biyokimyasal testler ve ksilanaz aktiviteleri açısından bazı farklılıklar göstermişlerdir ( Duarte et al. 2000 ). İki farklı *Bacillus polymyxa* izolatının, ksilanaz üretimlerinin incelediği diğer bir çalışmada, ksilanaz optimum sıcaklık değerleri ve optimum pH değerlerinin farklı olduğu ( pH 7,0 ve pH 5,5 ) görülmüştür ( Pham et al. 1998 ). ksilanazlarda Kâğıt endüstrisinde kullanılma açısından ksilanazların optimum pH ve sıcaklık Özellikleri çok önemlidir. Değişik kaynaklara göre, bazı *Bacillus* izolatlarından elde edilen ksilanazların enzimatik özellikleri Çizelge 2.3'de gösterilmiştir. Değişik kaynaklardan, Bazı mikrobiyal izolatlara ait ksilanazların enzimatik özellikleri Çizelge 2.4.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.3.** Bazı *Bacillus*'larda ksilanazların optimum pH ve sıcaklık özellikleri

Mikroorganizma	Optimum		Kaynak	Mikroorganizma	Optimum		Kaynak
	pH	Sıcaklık ( °C )			pH	Sıcaklık ( °C )	
<i>Bacillus</i> sp. 42 M1	9	50	b	<i>Bacillus pumilus</i>	6.5	45–60	b
<i>Bacillus</i> sp. AR 009	9–10	60–75	a	<i>Bacillus</i> sp. W1	6	65	a
<i>Bacillus</i> sp. NG–27	8.5	70	a	<i>Bacillus</i> sp. T6	6.5	55	a
<i>Bacillus</i> sp. 41 M1	9.0	50	b	<i>Bacillus</i> sp. BP 23	5.5	50	a
<i>Bacillus</i> sp. strain a	8.0	50	c	<i>Bacillus</i> sp. D3	6	75	b
<i>Bacillus</i> sp. strain b	9.0	55	c	<i>Bacillus firmus</i>	5-11	35	n
<i>Bacillus</i> sp. strain c	9.0	55	c	<i>Bacillus polymyxa</i> S	7.0	40–50	e
<i>Bacillus</i> sp. strain d	8.5	55	c	<i>Bacillus polymyxa</i> B	5.5	50	e
<i>Bacillus pumilus</i>	9.0	50	d	<i>Bacillus polymixa</i>	6.5	50	i
<i>Bacillus</i> sp. Sam3	8.0	60	k	<i>Bacillus</i> sp. 91	7.0	60	m
<i>Bacillus</i> sp. strain TAR–1	9.0	70	j	<i>B. stearothermophilus</i> T-6	6.5	55	i
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5.5	70	i	<i>B. stearothermophilus</i> SDX	6-12	37–85	h
<i>Paenibacillus</i> sp. BP–23 ( s+ )	5.5	50	g	<i>Bacillus</i> sp. ( v 1–4)	6.5	70	m
<i>Bacillus circulans</i> AB–16	6.0-7.0	80	k	<i>Bacillus polymyxa</i> CECT 153	6.5	50	a
<i>Bacillus circulans</i>	7.0-8.0	45	i	<i>Bacillus</i> sp. YC–335	6.0	55	i

( s+ ), selüla pozitif; a, Beg at al. 2001; b, Sapag at al. 2002; c, Roy ve Belaluddin 2004; d, Bim and Franco 2000; e, Pham at al.1998; g, Sánchez at al. 2003; h, Dhiman ve ark. 2008; i, Srinivasanve Rele 1999, değişik araştırmacıardan; j, Nakamura ve ark 1995; k, Techapun at al. 2003 değişik araştırmacıardan ; m, Srinivasan ve rele,1999 değişik araştırmacıardan.; n, Tseng at al. 2002.

**Çizelge 2.4.** Bazı mikroorganizmalarda ksilanazların optimum pH ve sıcaklık özellikleri

Mikroorganizma	Optimum		Kaynak	Mikroorganizma	Optimum		Kaynak
	pH	Sıcaklık (°C)			pH	°C	
<b>Bakteriler</b>				<b>Funguslar ( devam )</b>			
<i>Aeromonas</i> sp. 212, Xyl-3	5.0 -7,0	40 – 60	a	<i>A. sydowii</i> MG49	5.5	60	a
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	5.6	45	a	<i>Cephalosporum</i> sp.	8.0	40	a
<i>Enterobacter</i> sp. MTCC 5112	9.0	100	b	<i>Cephalosporum</i> sp. RYM–202, Xyl cx1	7.5	50	a
<i>Micrococcus</i> sp.DG10	7.5	50	c	<i>Cephalosporum</i> sp. RYM–202, Xyl cx2	8.0	50	a
<i>Nocardiosis dossonvillei</i>	7.0	50–60	a	<i>Cephalosporium</i> sp. NCL 87–11–9	6.5–9,0	40	a
<i>Rhodothermus marinus</i>	7.5	50	c	<i>Fusarium oxysporum</i>	6.0	55	a
<i>Streptomyces</i> sp. VP-5	4.8–10,0	50	a	<i>Geotrichum candidum</i>	4.0	50	a
<i>S. viridosporus</i> T7A	7.0–8,0	60	a	<i>Penicillium canescens</i> CP10	5.5	55	c
<i>S. olivaceoviridis</i> E86	6.0	60	d	<i>Penicillium janthinellum</i>	5.5	45	c
<i>Staphylococcus</i> sp. SG 13	7.5 -9,2	50	a	<i>Thermomyces lanuginosus</i> SSBP	6.5	70 –75	a
<b>Funguslar</b>				<i>T. lanuginosus</i> DSM 5826	7.0	60 - 70	a
<i>Aspergillus fischeri</i> Fxn-1	6.5	60	a	<i>Trichoderma reesei</i> RUT-C 30	3.4	60	c
<i>A. kawachii</i> IFO 4308	2–5,5	50–60	a	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	4 – 4,5	70– 75	c
<i>Aspergillus niger</i>	5.5	45	a	<i>Sclerotium rolfsii</i>	5	55	c
<i>A. nidulans</i>	5.4	55	a				

Xyl, ksilanaz; a, değişik kaynaklara dayanarak Srinivasanve Rele 1999; b, Khandeparkar and Boshle 2006c; c, değişik kaynaklara dayanarak Techapun et al. 2003; d, Jiang et al. 2005.

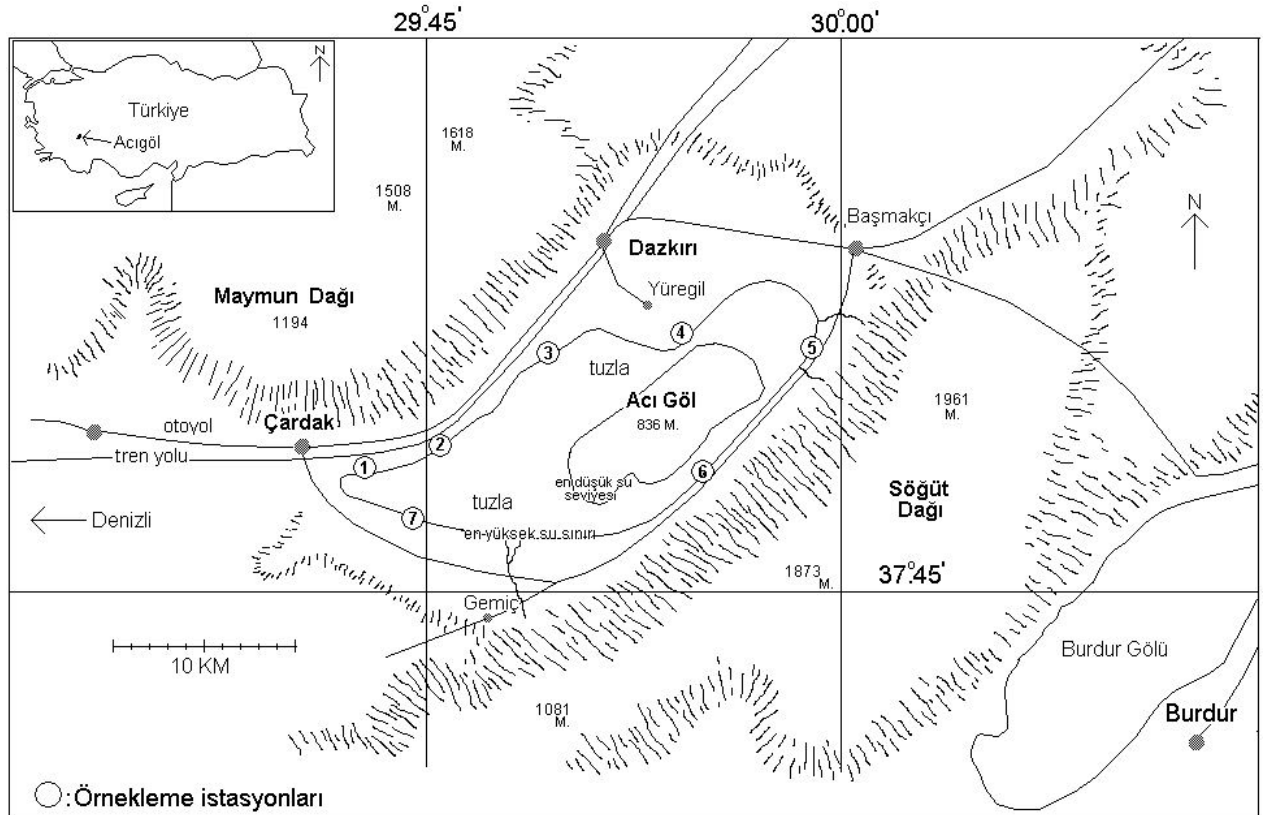
### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Çalışma Alanı ve Örneklemeye

Çalışmamızda kullanacağımız örnekler Denizli ili sınırları içinde ve ilin doğusunda yer alan Acı Göl'den alınmıştır. Acı Göl, Acıgöl şeklinde de yazılabilmektedir.

Örnek alınımında özellikle göl suyunun etkisinde kalmış kıyı şeridi ve 10 cm. su derinliğine kadar olan kısımlar üzerinde durulmuştur. Gölün batı kısmındaki 1 ve 2 nolu istasyonlar organik madde içeriği bakımından zengin görülmüştür. Diğer istasyonlar ise dik veya çok az eğimli olduğundan bu bakımlardan çok daha fakir görünmüştür. Alınan örnekler temelde çürümekte olan odun ve bitki parçaları içeren topraklar, kıyıya yakın göl taban toprağı ve göl su örneklerini içermektedir. Örneklemeye Şekil 3.1'de gösterilen yedi istasyonda yapılmıştır.



Şekil 3.1. Acı Göl ve çevresinden örneklerin alındığı istasyonlar

Toprak örneklerinin alınmasında bazı ufak değişiklikler yapılarak Parkinson et al. ( 1971 )'in vermiş olduğu yöntem takip edilmiştir. Toprak örnekleri, alkolle temizlenmiş bir çapa ile açılan toprak profillerinden, örnek alınacak yüzey yine alkolle temizlenmiş bir spatül ile hafifçe kazındıktan sonra kâğıtlara sarılarak steril edilmiş kaşıklarla 5–15 cm arasındaki derinliklerden alınmıştır. 1 ve 2 nolu istasyonlardan 10'ar diğer istasyonlardan 5'er örnek alınmıştır. Örnekler otoklavda steril edilmiş sıcaklığa dayanıklı naylon esaslı ticari fırın torbalarına konularak etiketlenmiş, buz torbaları içeren termosalarla laboratuara getirildikten sonra kullanılabilecek kadar 4 °C'deki buz dolabında saklanmıştır.

### 3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Çözeltiler ve Kimyasal Maddeler

#### 3.1.2.1. Besiyerleri

##### 3.1.2.1.1. İzolasyon ve Kültürel Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerleri içerikleri distile suda çözünüp, gerektiğinde pH ayarlaması yapıldıktan sonra, otoklavda 1,5 atmosfer basınç ve 121°C sıcaklıkta 15 dakika süre ile steril edilmişlerdir. katı ortamlar için pH ayarlaması NaCO<sub>3</sub> ile yapıldığında pH ayarlamasında kullanılacak %2'lik NaCO<sub>3</sub> ayrıca steril edilmiştir. Besiyerlerine katılan Ksiloz gibi otoklavda sterilizasyonla bozulabilecek maddeler metinde belirtildiği şekilde 0.4 µm por çaplı Milipor filtreler kullanılarak, filtrasyonla steril edilmiştir.

Ksilanın erimesindeki düzensizlik ve iyice erimemiş olması durumunda sonradan besiyerlerinin pH'sında düşmeye neden olmasından dolayı besiyerlerine katılacak ksilanın ayrıca eritilmesi gerekmektedir. Bunun için besiyerine ilave edilecek ksilanın % 5'lik süspansiyonu hazırlanmış, pH'sı NaOH ile 8.5'e ayarlandıktan sonra yaklaşık 80°C'de manyetik karıştırıcı ile karıştırarak iyice eritilmiş daha sonra besiyerleri hazırlamada kullanılmıştır. ksilan içeren besiyerlerinin pH ayarlaması ve sterilizasyonu bu işlemten sonra yapılmıştır. pH ölçümleri kalibrasyonu yapılmış Hanna pH 211 marka dijital pH metre ile gerçekleştirilmiştir.

#### **Besiyeri 1: İzolasyon Besiyeri 1 ( İB 1 )**

Horikoshi ortamlarının ( Horikoshi 1999 ), %1 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> içermeyen şeklidir, Ayrıca, Karbon kaynağı olarak Horikoshi ortamlarındaki %1 glukoz ( Horikoshi-I ) veya çözünür nişasta ( Horikoshi-II ) yerine ksilan ( Birchwood xylan ) ilave edilmiştir.

%0.5g, maya ekstraktı; %0,5, pepton; %0,1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; %0.025, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; %0,025, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; %1 ml iz elementler solüsyonu (Shirling and Göttlied 1966); %0,7, ksilan (Birchwood xylan ); %2,5, NaCl; %1,8, agar içeren Besiyeridir. 1 M' lık NaOH ile pH 9'a ayarlanmıştır.

#### **Besiyeri 2: İzolasyon Besiyeri 2 ( İB 2 )**

İB 2 ortamı, ilk izolasyonlarda soruna yol açan ve ksilanaz üretmeyen proteolitik mikroorganizmaların gelişmesini azaltmak amacıyla İB 1 ortamının organik azot kaynağı içeriği azaltılarak elde edilmiştir.

%0.01g, maya ekstraktı; %0,01g, pepton; %0,1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; %0.025, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; %0,025, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; % 1ml iz elementler solüsyonu; %0,5, ksilan ( Birchwood xylan ) %2,5 NaCl, %1,8 agar, içeren besiyeridir. 1 M' lık NaOH ile pH 9'a ayarlanmıştır.

#### **Besiyeri 3: İzolasyon Besiyeri 3, DX Besiyeri ( DXo )**

Orijinal DX besiyeridir ( Horikoshi 1999, Yang et al. 1995 ). Bu besiyerinde organik azot kaynağı gereksinimi bulunmayan, ksilan kullanıcı bakteriler izole edilebilmektedir. İçeriğinde, % 1, Birch-wood xylan; % 0,1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; % 0,1, NaCl; % 0,2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>; % 0,2, CaCO<sub>3</sub>; % 1,8 agar bulunmaktadır.

#### **Besiyeri 4: İzolasyon Besiyeri 4, Modifiye DX Besiyeri ( DX )**

Orjinal DX besiyerinden ( Yang et al. 1995 ) farklı olarak tuz içeriği, %0,1'den %2,5'a çıkarılmış, ayrıca, %1 ml oranında iz elementler solüsyonu ilave edilmiştir.  $\text{CaCO}_3$  ise ilave edilmemiştir. DX besiyeri, inkübasyon sonunda, ksilanaz aktivitesi gösteren kolonilerin çevresinde berraklaşma görünümünde olan ksilan hidroliz zonu oluşumu gözlenmesi ile izolatların ksilanaz enzim aktivitesinin ilk belirlenmesinde de kullanılmıştır (Yang et al. 1995, Horikoshi 1999 ).

Besiyeri, litrede  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1g; NaCl, 25g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2g; Birch-wood xylan,10g; agar, 18 g, iz elementler solüsyonundan 1ml bulunacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra ortamın pH'sı ayrıca steril edilmiş %2'lik  $\text{NaCO}_3$  ile pH 9'a, gerektiğinde pH 10'a ayarlanmıştır.

#### **Besiyeri 5: Nutrient Agar ( NA<sub>1</sub> )**

Standart, hazır, Nutrient Agardır. Üreticinin tarifine göre hazırlanmıştır.

#### **Besiyeri 6: Nutrient Agar<sub>2</sub> ( NA<sub>2</sub> )**

Standart Nutrient Agar'da ( Sigma S-4681 ) bazı değişiklikler yapılarak hazırlanmıştır. Nutrient Agar'a % 2,5 NaCl ve % 0,5, ksilan ( Birchwood xylan ) ilave edilmiştir. Ayrıca, izolatların tuz-gelişme özelliklerinin incelenmesi için %1, %5, %7,5, %10'luk NaCl'li olarak da hazırlanmıştır. % 2.5 NaCl içeren ve 1 M' lık NaOH ile pH 8,5'a ayarlanmış NA, stoklarının saklanması için kullanılmıştır. İzolasyon için kullanıldığında 1 M' lık NaOH ile pH9 ve 10'a ayarlanmıştır.

#### **Besiyeri 7: CMC Agar**

Yang et al. ( 1995 ) tarafından tarif edilen DX ( Besiyeri 4 ) ortamına, Birch-wood xylan yerine aynı oranda ( %1 g ) karboksimetil selüloz ( CMC ) ilave edilerek hazırlanmıştır. İnkübasyon sonunda, CMC Agar besiyerinde selülaz aktivitesi gösteren kolonilerin çevresinde selülaz hidroliz zonu oluşumu gözlenmesi ile izolatların selülaz enzim aktivitesinin ilk belirlenmesi yapılmıştır.

#### **Besiyeri 8: Fermentasyon Ortamı 1 ( FO1 )**

İzolasyon besiyeri 1'in ( İB 1 ) agar içermeyen 'broth' şeklindedir. Ortamın pH'sı 1 M' lık NaOH ile pH 8,5'a ayarlanmıştır. FO1 ortamı, izolatların değişik sıcaklıklarda enzim üretim özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

#### **Besiyeri 9: Fermentasyon Ortamı 2, Karbon Kaynakları Fermentasyon ortamı (FO2)**

100 ml. FO2 Fermentasyon ortamı, 0.3 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.05 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.02 g, NaCl; % 1,5 g işlem görmüş ve kurutulmuş bitkisel substratlar veya % 1 ksilan ve % 1 ml iz elementler solüsyonu bulunacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra ortamın pH'sı 1 M' lık NaOH ile pH 8,5'a ayarlanmıştır.

FO2 ortamı, DX ( Besiyeri 4 ) ortamının agarsız 'broth' şeklindedir. FO2 ortamı, izolatların substrat olarak ksilan ( BW- Ksilan ) ve ucuz bitkisel substratları kullanarak ksilanaz üretiminin incelenmesi için de kullanılmıştır. Bitkisel substratlar kullanıldığında, FO2 ortamına, ksilan yerine % 2,0 oranında, işlem görmüş bitkisel substratlar ilave edilmiştir.

#### **Besiyeri 10: PCA ( Plate Count Agar )**

Ticari, hazır Plate Count Agar ( Difco ) üreticinin tarifine göre hazırlanmıştır. İlave olarak % 2,5 NaCl ilave edilmiş, pH'sı 1 M' lık NaOH ile pH 9'a ayarlanmıştır.

#### **3.1.2.1.2. Biyokimyasal Test Ortamları**

Biyokimyasal test ortamı içerikleri hazırlandıktan sonra 1,5 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmişlerdir.

#### **Besiyeri 11: Egg-Yolk Agar**

Bakteriyolojik Pepton	1 g
Glukoz	1 g
NaCl	1.5 g
Yeast Ekstrakt	0,5 g
Agar	1,2 g
Egg Yolk Emülsiyonu	% 5 (v/v)
Toplam hacim	100 ml

Besiyeri içerikleri homojen bir şekilde çözülerek pH 7.0 'a ayarlanmış, 121 °C' de, 1.5 atmosfer basınçta 20 dakika otoklavlanmıştır. Daha sonra steril olarak %5 oranında egg-yolk ilavesi yapılan ortam lesitinaz testi için kullanılmıştır ( Williams et al. 1983'den modifiye ).

#### **Besiyeri 12 : Simmon Sitrat Agar**

Ticari Simmon Sitrat Agar ( Merck ) besiyerinin içeriği üreticinin tarifine göre distile suda çözüldükten sonra % 2.5 g olacak şekilde NaCl ilave edilmiş, 10'ar ml olacak şekilde tüplere dağıtılmış ve otoklavda 1.5 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmişlerdir. Sterilizasyondan sonra besiyeri, tüpler yatık tutularak soğutulmuştur.

#### **Besiyeri 13 : Nitrat Broth**

Pepton	2.0 g
KNO <sub>3</sub>	0.4 g
NaCl	4.0 g
Agar	0.6 g.
Distile su	200 ml

pH'sı 7.5'e ayarlanıp tüplere taksim edilmiş, otoklavda steril edilmiştir ( Williams et al. 1983, Yücel 1993 ).



**Besiyeri 14: Nişasta Agar**

Meat ekstrakt	3 g
Çözünür Nişasta	10 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml
pH	8.0

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1,5 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiş ve 50°C'ye soğutulduktan sonra steril Petri kaplarına dağıtılmıştır ( Özdemir 1997 ).

**Besiyeri 15: Şeker Fermentasyon Brothları**

Şeker	0.7 g
Nutrient Broth	1 g
NaCl	2.0 g
Fenol Red	0.018 g
Distile su	100 ml

Fermentasyon ortamları tüplere dağıtıldıktan sonra otoklavda steril edilmiştir. Ksiloz içeren fermentasyon ortamı ise filtre edilerek steril edildikten sonra steril pipetlerle daha önce steril edilmiş kapaklı tüplere aktarılmıştır.

Glukozdan gaz oluşumunun gözlemlenmesi için, glukoz içeren fermentasyon ortamı tüplerinin içerisine içinde hava kalmayacak şekilde ters olarak durham tüpleri konulmuştur.

Şeker Fermentasyon ortamları glukoz, laktöz, ksiloz ve mannitoldan asit oluşturma yeteneklerinin gözlenmesi için kullanılmıştır. Sarı renk, asit oluşumu olarak değerlendirilmiştir. İnoküle edilmemiş tüpler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

**Besiyeri 16: MR-VP Broth ( Metil Red-Voges Proskauer Broth )**

Pepton	7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g
Glikoz	5 g
NaCl	20 g
Distile su	1000 ml
Ph	7.0

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 10'ar ml olacak şekilde tüplere dağıtılmış ve otoklavda 1.5 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmişlerdir. ( Özdemir 1997 ). MR-VP Broth, MR-VP ( Metil Red, Glukozdan asit oluşturma ve VP, diasetil + asetoin oluşturma ) testleri için kullanılmıştır.

**Besiyeri 17: Hareketlilik Belirleme Ortamı**

Nutrient Broth ( Merck 5443 )	1.3 g
Bakteriyolojik Agar	0,35 g
NaCl	2,5 g
Distile su	100 ml
pH	8.0

İzolatların hareketlilik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan Hareketlilik Belirleme ortamı, Yücel ( 1993 )'in kullandığı SİM ortamı modifiye edilerek hazırlanmıştır.

**Besiyeri 18: Nutrient Jelatin**

Nutrient Broth ( Merck 5443 )	3 g
Jelatin ( Fluka 48120 )	4 g
NaCl	2,5 g
Distile su	100 ml
pH	8.0

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra 10'ar ml olacak şekilde tüplere dağıtılmış ve otoklavda 1.5 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmişlerdir. Sterilizasyondan sonra besiyeri tüpleri eğik tutularak soğutulmuştur ( Tamer ve diğerleri 1989'den modifiye edilmiştir ).

**Besiyeri 19: Tripton Broth**

Tripton	1 g
NaCL	2,5 g
Distile su	100 ml

Tripton distile suda çözünerek tüplere dağıtılmış ve otoklavda 1.5 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika süre ile steril edilmiştir ( Tamer ve diğerleri 1989 'den modifiye edilmiştir ).

**3.1.2.2. Çözeltiler ve Diğer kimyasal Maddeler****3.1.2.2.1. Shirling and Gottlieb İz Tuzlar Solüsyonu**

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (Horasan Kimya)	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Horasan Kimya)	0,1 g
Distile su	100ml

İz Tuzlar Solüsyonu, gerektiğinde besiyerlerine 1ml/L oranında katılır ( Shirling and Gottlieb 1966 )

### 3.1.2.2.2. DNS Reaktifi

20 ml 0.2 N NaOH ( % 8 ) içerisine 1 g 3,5-dinitrosalisilik asit ( DNS ) ilave edilip manyetik karıştırıcıda ve hafif ısıda iyice erimesi sağlandıktan sonra hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. 30 g sodyum potasyum tartarat ilave edilmiştir. Çözelti hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcıda hafif ısıda iyice erimesi sağlanmıştır. Çözelti oksijenden etkilendiği ağzı hava almayacak şekilde sıkıca kapatılarak saklanmıştır ( Dashek 2002 ).

### 3.1.2.2.3. DNS Substratları

DNS testi ile ksilanaz aktivitesi ölçümleri için substrat olarak ksilan ( birchwood xylan; BW- xylan ), selülaaz aktivitesinin ölçümü için ise CMC ( Carboxy-Methyl Cellulose ) kullanılmıştır. Substratlar uygun tampon çözeltileri içine % 1g olacak şekilde ilave edildikten sonra ısıtmalı manyetik karıştırıcıda ısıtılarak, dipte çökelme olmayıncaya kadar iyice erimeleri sağlanmıştır ( Dashek 2002 ). Substrat tamamen eriyince, özellikle glisin / NaOH tamponu için ve deneme sıcaklığında, pH tekrar kontrol edilmiştir.

### 3.1.2.2.4. Tamponlar

Normal DNS testlerinde substratı için kullanılan pH 8,5 tamponu olarak, tris ( tris hidroksimetil amino metan ) tamponu kullanılmıştır. Tris tamponu DNS testlerinde 0,1M olarak hazırlanmıştır. Tris tamponu, istenilen molaritede hazırlandıktan sonra derişik HCL ile pH istenilen değere getirilerek hazırlanmıştır, Optimum pH belirlemelerde kullanılan tamponlar, pH 6, 7, 8 için  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$  ( Taneja et al 2002 ), pH 9, 10 için ise glisin / NaOH tamponlarıdır. pH ölçümleri çözeltinin kullanılacağı sıcaklıkta, ısı problu ve kalibrasyonu yapılmış Hanna pH 211 marka dijital pH metre ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.1.2.2.5. şeker Standartları

DNS testi ile ksilanaz aktivitesi ölçümleri için standart olarak ksiloz, selülaaz aktivitesinin ölçümü için ise glukoz kullanılmıştır. 1 İU / ml lik bir enzim miktarının, 5 dakikalık inkübasyon süresinde substrattan 5  $\mu$ mol/ml indirgen şeker veya ona denk indirgen uç açığa çıkaracağı göz önüne alınarak, 1 İU / ml lik enzim miktarının dengi olan şeker standardı, DNS testindeki inkübe süresinin 5 dakika olduğu göz önüne alındığında 0,75 mg/ml ksiloz olacak şekilde hazırlanmıştır. Diğer standartlar da bunun katları olarak hazırlanmıştır. % 0,75'lik ksilozdan x ml alınarak su ile 10 ml'ye tamamlanırsa x IU / ml'lik enzime denk standart hazırlanmış olur. Aynı yaklaşım selülaaz testinde kullanılacak glukoz standartları içinde uygulanmıştır. Selülaaz testi için 1 İU / ml'lik enzim miktarının dengi olan standardı 0,90 mg / ml D-glukoz olacak şekilde hazırlanmıştır.

### 3.1.2.2.6. Kappa Numarası Belirleme İçin Gereken Kimyasallar

Kappa numarası belirleme için gereken kimyasallar, Doğan ( 2004 ) ve Bostancı ( 1987 )'ya göre hazırlanmıştır.

- a- **KMnO<sub>4</sub>, potasyum permanganat çözeltisi** ( 0.02 M ) 0,1 N  $\pm$  0,0005 ( yaklaşık 3.25 g / L ). Permanganat çözeltisi, kısım 3.2.14.8'de belirtildiği şekilde, permanganometri ile standardize edilerek hazırlanmıştır.
- b- **Sodyum tiosülfat** çözeltisi: 0.2N  $\pm$  0,0005 ( Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O ). Kullanılacak Sodyum tiosülfat kristalleri sert, ufalanmamış, renklenmemiş ve kuru olup, hiç yapışma ve nem göstermemelidir.
- c- **Potasyum iyodür:** ( KI ) 0,1 M
- d- **Sülfürik asit:** ( H<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> ) 0,4 N

### 3.1.2.3. Biyokimyasal Test Çözeltileri

#### Kovaks Reaktifi

İndol testi için kullanılan kovaks reaktifi hazırlamak için, 5 g para-dimetilaminobenzaldehit, 75 ml butil alkolde iyice eridikten sonra 25 ml % 37'lik HCL yavaşça ilave edilmiştir ( Tamer ve diğerleri 1989 )

#### Gram-İyodür Çözeltisi

Nişasta hidrolizi belirleme için kullanılan gram-iyodür çözeltisinin hazırlanması için, 1 g iodin ile 2 g KI cam havanda iyice ezildi. Üzerine 300 ml su ilave edilerek karıştırılmıştır ( Tamer ve Oskay 2001 ).

#### Nitrat Redüksiyonu Reaktifleri

**Reaktif A:** 0,8 g Sülfanilik asit, 100 ml, 5 N Asetik asitte eritilerek hazırlanmıştır

**Reaktif B:** 0,5 g  $\alpha$ -naftilamin ( Carlo Erba,444973, N,N-dimethyl- $\alpha$ -naftilamin ), 100 ml 5N Asetik asitte eritilerek hazırlanmıştır ( Yücel 1993 )

#### Kovaks'ın Oksidaz Reaktifi

Kovaks'ın Oksidaz reaktifi Yücel ( 1993 )'e göre, 1g Tetra-methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ( Merck ), 100 ml Distile suda eritilerek hazırlanmıştır.

#### Metil Kırmızısı Solüsyonu

MR-VP testi için metil kırmızısı solüsyonundan ( Özdemir 1997 ). 0.040 g metil kırmızısı 100 ml % 95'lik etanolde iyice eritildi. Üzerine 100 ml distile su ilave edilerek hazırlandı.

**3.1.2.4. Kimyasallar**

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ( Horasan Kimya )

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ( Horasan Kimya )

( NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( Atabay )

NaCl ( Atabay )

CaCO<sub>3</sub> ( Atabay )

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( Merck )

NaNO<sub>3</sub> ( Horasan Kimya )

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( Carlo Erba, 7722-84-1 )

Diğer kimyasallar metin içinde geçtikleri yerlerde verilmiştir.

## 3.2. METOTLAR

### 3.2.1. Acı Göl Suyunun Tuz ve pH'sının Belirlenmesi

Ağız kapalı olarak, içi distile su ile yıkanmış pet şişeye alınmış göl suyunun pH'sı ve tuz oranının ( % g ) ölçümü TOA ( Wac-20A ) marka su kalite ölçün cihazı ile ölçülmüştür. Göl suyunun pH'sı ayrıca, derhal labrotuvaya getirilmiş su örneğinden ısı proflu pH metre ile ölçüm yapılarak belirlenmiştir.

### 3.2.2. İzolasyon

#### 3.2.2.1. Seyreltme Plaka Metodu

Toprak örnekleri için seçilen örneklerin organik maddece zengin olmasına dikkat edilmiştir. İzolasyonda bazı ufak değişikliklerle Tamer ve diğerleri ( 1989 )'a göre seyreltme plaka metodu kullanılmıştır.

10 g toprak örneği üzerine 90 ml steril % 0.85 NaCl içeren fizyolojik su ilave edilmiş ve 30 dakika karıştırılmıştır bu şekilde elde edilen 1/10 oranında sulandırılmış toprak örneği süspansiyonundan steril bir pipet yardımı ile 1 ml alınarak, içinde 9 ml steril fizyolojik su bulunan tüpe aktarılmış, vorteks yardımı ile homojen şekilde karıştırılarak  $10^{-2}$ 'lik toprak süspansiyonu elde edilmiştir. Aynı işlem  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ 'lik seyreltmelerin eldesi için tekrarlanmıştır.

Hazırlanan  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ 'lik seyreltmelerden 0.5'er ml steril pipet ile alınarak steril petrilere ilave edilmiştir. Üzerine  $45^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulmuş Besiyeri 2, Besiyeri 4, Besiyeri 6 ilave edilmiştir. Besiyerleri ile toprak seyreltmelerinin homojen karışması için rotasyon hareketi yaptırıldıktan sonra besiyerleri donmaya bırakılmıştır. Her toprak örneği süspansiyonunun söz konusu farklı üç seyreltmesinden her bir besiyeriyle ve her inkübasyon sıcaklığı için toplam 20 petri kabı hazırlanmıştır. İzolasyon çalışmalarına Besiyeri 1 ve Besiyeri 3 ile başlanmıştır. Ancak daha sonra izolasyona daha uygun oldukları düşünülen Besiyeri 2, Besiyeri 4 ve Besiyeri 6 ile devam edilmiştir. Selülaz negatif izolatların az bulunması nedeniyle izolasyonlar çok tekrarlı olarak yapılmıştır. Bazı izolasyonlar, petrillerdeki steril besiyerleri üzerine  $10^{-4}$ 'lük seyreltmelerden steril pipet yardımı ile 0.5'er ml ilave edildikten sonra, steril baget ile yayılarak inokülasyon yapılması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan petrilere 35, 45,  $50^{\circ}\text{C}$ 'lerde, yeterli olduğu görülen 3 gün inkübasyona bırakılmıştır.  $50^{\circ}\text{C}$ 'de yapılan izolasyonlar bir haftaya kadar uzatılmıştır. Petrilere gelişmelerin belirlenmesi için birinci günden itibaren gözlenmiştir.

Özellikle çevresinde geniş ksilan hidroliz zonu oluşturan koloniler başta olmak üzere, 1mm kadar ufak olduğu için ksilan hidroliz zonu vermediği düşünülen koloniler dahil, değişik tipte koloniler seçilerek Besiyeri 4 veya Besiyeri 6'da çizgi plaka yöntemi ile tekrar saflaştırma yapılmıştır ( Tamer ve diğerleri 1989 ). Saflaştırılmış izolatlar numara verilerek yatık, steril Besiyeri 6 içeren tüplere aşılansız olarak izolatın izole edildiği sıcaklıkta 3 gün gelişmeye bırakıldıktan sonra buzdolabında  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmışlardır.

### 3.2.2.2. Sıvı Zenginleştirme Tekniği

Sıvı zenginleştirme tekniği, Yamaç ( 1997 )'in kullandığı metot modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Acıgöl istasyon 1 ve 2'den alınmış 1 g toprak örnekleri 99 ml steril Besiyeri 9 ( FO2 ) ortamına ilave edilmiş ve 35 ve 45°C'lerde bir hafta sabit çalkalama ile inkübe edilmiştir. İnkübasyona alınan kültür ortamından günlük aralıklarla alınan örneklerden hazırlanan 10<sup>-4</sup>'lük seyreltmelerden 0.5'er ml alınarak Besiyeri 4 içeren petrilere inoküle edilmiştir. İzolatların saflaştırılması için de aynı besiyeri kullanılmıştır

### 3.2.2.3. Katı Zenginleştirme Tekniği

Örneklerin alındığı istasyonlardan alınmış ve %1 ( g / g ) CaCO<sub>3</sub> ilave edilmiş 10 g toprak örnekleri kâğıt zarflar içine konularak otoklavda steril edilmiştir. Bir gece 40°C'de kurutulduktan sonra steril boş petrilere dökülmüş ve üzerine 5 ml %2 ksilan içeren Besiyeri 9 ( FO2 ) ortamı döküldükten sonra 1 g örnek toprağı ilave edilip steril baget ile iyice karıştırılmışlardır. Daha sonra 35 ve 45°C'lerde bir hafta inkübe edilmişlerdir. 4. ve 7. günlerde steril fizyolojik su ( % 0,85 NaCl ) ile ıslatılan öze ile örnek alınarak Besiyeri 4'e ( DX ) çizgi plaka yöntemi ile zikzak çizerek izolasyon yapılmıştır.

### 3.2.3. Ksilanaz ve Selülaz Aktivitelerinin Ön Belirlenmesi (Birincil İzolasyon)

Ksilanaz aktiviteleri ilk izolasyon ( primer screening ) ortamlarında kolonilerin çevresinde beliren berrak ksilan hidroliz zonları ile belirlenir. İnkübasyon sonunda ksilan içeren izolasyon ortamlarında ksilanaz aktivitesi gösteren kolonilerin çevresinde berraklaşma görünümünde olan ksilan hidroliz zonu oluşumu, ksilanaz enzim aktivitesinin belirtisi olarak kabul edilmiştir. İzolatlar, daha sonra bu açıdan Besiyeri 4 ( DX ) besiyerinde tekrar incelenmiştir ( Dashek 2002 ). Selülaz aktivitelerinin ön belirlemesi için izolatların Besiyeri 4'de saflaştırması yapılmış ve aktif kolonilerinden öze ucu dolusu alınarak Besiyeri 7'ye ( CMC besiyeri ) inokülasyon yapılmış ve 35 °C de inkübe edilmişlerdir. 36 saat sonunda kolonilerin etrafındaki selülaz hidroliz zonlarının belirlenmesi amacıyla besiyeri üzerine %96'lık etil alkol dökülerek bir gece buzdolabında bekletilmişlerdir ( Taneja et al 2002 ). İşlem her izolat için iki kez gerçekleştirilerek izolatların ksilanaz ve selülaz aktivitelerinin ön belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde selülaz negatif, ksilanaz pozitif olarak bulunan izolatlar S<sub>2</sub>- K<sup>+</sup> şeklinde kısaltılarak belirtilmiştir.

### 3.2.4. İkincil Selülaz Aktivite Belirlenmesi

CMC besiyerinde selülaz negatif olarak belirlenen izolatların selülaz aktiviteleri açısından ikincil incelemeleri kısım 3.2.8'de verilen DNS testi ile 60 °C'de, ve pH'ları 7.4 ile 9.0'a ayarlanmış %1 'lik CMC ( Carboxy-Methyl Cellulose ) substrat olarak kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Substrat pH'ları, pH 7,4 için K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 9,0 için glisin / NaOH

tamponu ile ayarlanmıştır ( Taneja et al. 2002 ). DNS testi ile selülaz negatif olma özelliği  $S_d$  şeklinde kısaltılarak belirtilmiştir.

### 3.2.5. Büyüme Eğrilerinin Belirlenmesi

Örnekler steril olarak belli sürelerde alınarak bekletilmeden hazırlanan  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ 'lik dilüsyonlarından, 0,5 ml'lik kısımlar çift tekrarlı olarak steril boş petri kaplarına ilave edilmiş üzerlerine  $45^{\circ}\text{C}$  'ye kadar soğutulmuş steril besiyeri 11 ( PCA, Plate Count Agar ) ortamı dökülerek  $35^{\circ}\text{C}$  'de inkübasyona alınmışlardır. 1,5 gün sonunda petrilere koloni sayımları yapılmıştır. İki petrideki ortalama koloni sayısı belirlenmiş zamana bağlı olarak ml'de mikroorganizma miktarı ( CFU ) belirlenerek grafiği oluşturulmuştur ( Tamer ve diğerleri 1989 ).

### 3.2.6. Fermentasyonlar

Fermentasyon inokulumlarını hazırlamak için ilk olarak stok kültürler, tüp içindeki Besiyeri 6'ya aşılılarak 36 saat  $35^{\circ}\text{C}$ 'de geliştirilmiştir. Daha sonra gelişen kültürlerden bir öze dolusu alınarak 250 ml'lik erlenlerdeki steril edilmiş 25 ml'lik fermentasyon ortamlarına inoküle edilmişlerdir. 24 saat'te 150 rpm çalkalama hızında gelişmeye alınıp aktive edilmiş inokulum kültürlerinden, hacimce %5 oranında alınarak fermentasyon ortamlarının inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. İnokülasyon yapılmayan ayrı bir fermentasyon ortamı, aynı işlemlerden geçirilerek negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Fermentasyonlar 500 ml'lik erlenlerdeki 200 ml fermentasyon ortamı ile gerçekleştirilmiştir. Aşılınmış fermentasyon ortamları  $35^{\circ}\text{C}$ 'de ve dönüş hızı 150 rpm'e ayarlanmış orbital-horizontal çalkalayıcı üzerinde inkübasyona alınmıştır. Ayrıca, seçilen izolatlar FO1 ortamında 25, 30, 35 40, 45, 50  $^{\circ}\text{C}$ 'lerde de ayrı ayrı fermentasyona alınarak, izolatların, değişik sıcaklıklarda enzim üretim kabiliyetleri belirlenmiştir. Fermentasyon ortamlarından değişik sürelerde, steril olarak alınan örnekler, 14000 devirde ve 10 dakika santrifüjlendikten sonra, elde edilen süpernatantlar ( ham kültür filtratları ), enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. İzolatlara ait enzim örneklerinin bir sefer için  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de önemli aktivite kaybına uğramadığı denemelerle tespit edildiğinden, kültür filtratı örnekleri  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklanmıştır. Kullanılmaları gerektiğinde ksilanaz aktiviteleri tekrar ölçülmüştür.

İzolatların, organik azot kaynağı bulunmayan şartlarda, ksilanı karbon kaynağı olarak kullanarak ksilanaz üretme kabiliyetleri ise, karbon kaynağı olarak ksilanın kullanıldığı FO2 ortamında gerçekleştirilen fermentasyon ile belirlenmiştir. İzolatlarımız tuzlu ortamlarda daha iyi gelişebildiği için besiyerine % 1.5 NaCl ilave edilmiştir. Ortamların pH'sı 1 M NaOH ile 8.5'e ayarlanmıştır. Fermentasyonlar, daha önce FO1 ortamında farklı sıcaklıklarda yapılan denemelerle optimize edilen şartlarda belirlenen optimum enzim üretim sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.



### 3.2.7. Tarımsal Atıkların Enzim Üretiminde Kullanılması

Enzim üretiminde kullanılacak tarımsal substrat olarak, mısır koçanı, saman ve buğday kepeği kullanılmıştır. İzolatların, ön işlem görmüş ve kurutulmuş olan söz konusu bitkisel materyaller kullanılarak enzim üretme potansiyellerinin belirlenmesi için, % 1,5 NaCl ve % 1,5 ön işleme tabi tutulmuş söz konusu substratları içeren karbon kaynakları fermentasyon ortamına ( FO2 ) ilave edilmiştir. Fermentasyonlar önceki fermentasyon çalışmalarımızda uyguladığımız miktar ve hacimlerde, 150 rpm'e ayarlanmış çalkalayıcı üzerinde ve daha önce FO1 ortamında değişik sıcaklıklarda yapılan fermentasyonlar sonunda belirlenen optimum enzim üretim sıcaklığında inkübasyona alınarak gerçekleştirilmiştir. İnokülasyonlar FO1 ortamında yapıldığı gibidir. Ortamların pH'sı 1 M NaOH ile pH 8,5'e ayarlanmıştır.

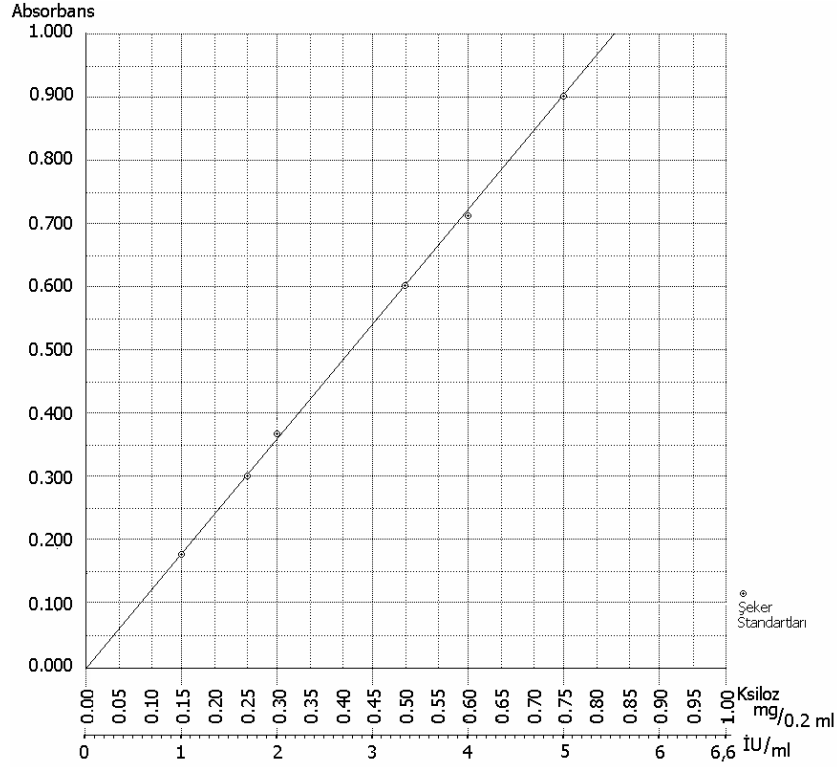
#### 3.2.7.1. Bitkisel Karbon Kaynaklar İçin Ön İşlem

Tarımsal substratlar olarak mısır koçanı, saman ve buğday kepeği kullanılmıştır. Çalışmamızda enzim üretiminde substrat olarak kullanılacak, lignoselülozik materyal 0,5–1 cm'lik parçalara ayrıldıktan sonra % 1'lik NaOH içinde ( materyalin üstünü örtecek kadar ) ön işlemden geçirilerek 121°C'de, 20 dakika otoklavlanmıştır. Daha sonra pH'ları nötral seviyeye düşüncüye kadar elek üzerinde çeşme suyu ile yıkanmış ve fırında kurutulmuştur. Kurutulmuş materyal daha sonra 0,5 cm açıklıklı elekten geçirilerek hazır hale getirilmiştir ( Pham at al 1998 ). İşlem görmüş ve kurutulmuş bitkisel substratlar, karbon kaynakları fermentasyon ortamına ( FO2 ) %1,5 miktarında ilave edilmişlerdir. Karbon kaynakları ön işlemden geçirilirken köpüklenme olduğundan ve sıcaklığın iyi etki edebilmesi için, işlem sırasında 500'lük erlenlere 100 g materyalden fazla konulmaması gerekmektedir.

#### 3.2.8. Enzim Analizleri

Kültürlerin ksilanaz aktiviteleri DNS ( Dinitrosalisilik asit ) metodu kullanılarak belirlenmiştir. Enzim içeren kültür süpernatantlarından veya şeker ( ksilanaz için ksiloz, selülaz için glukoz ) standartlarından 0.5 ml alınarak standart test tüpleri içinde, 2 ml pH 9,0 olan substrat bulunan tampon çözeltisine ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan karışım 60 °C'de 5 dakika reaksiyona bırakılmıştır. Bu durumda, enzim aktivasyonu ile substrat parçalanarak serbest ksiloz şekerleri veya indirgen ksilooligomer uçları oluşmaktadır. Süre sonunda 3 ml DNS reaktifi eklenip reaksiyona son verilmiştir. Tüpler 90°C sabit sıcaklıktaki kaynar su banyosuna alınarak renk değişimi için 5 dakika beklemeye alınmıştır. Kaynar su banyosunda indirgen şeker içeriği miktarına bağlı olarak kıvılcık kahverengi renk gelişmektedir. Test sonuçları dalga boyu 540 nm'ye ayarlanmış spektrofotometre ( Optima phototech 301-D model ) kullanılarak, absorbans değerlerinin okunması ile renk yoğunluğu ölçülerek belirlenmiştir. Kör olarak kullanılan kültür örnekleri; aynı kültür süpernatantlarının 20 dakika 100°C'de bekletilerek inaktive edilmiş ksiloz standartları için distile su kullanılmıştır. Ölçümler öncesinde, kör çözelteleri

ile spektrofotometrenin transmisyon değeri %100'e, absorbans değeri 0.00'a ayarlanmıştır. Absorbans değerlerinin kültür süpernatantındaki enzim ünitesi / ml ( IU/ml )' ye çevrilmesinde Şekil 3.2'de görüldüğü gibi ksiloz standart eğrisinden faydalanılmıştır ( Dashek 2002 ). DNS testlerinde kullanılacak substratlar kısım 3.1.2.2.3'de, şeker standartları ise kısım 3.1.2.2.5'de belirtilmiştir.



Şekil 3.2. Ksiloz standartları için örnek standart eğrisi

### 3.2.9. Ksilanaz Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi

Kâğıt beyazlatmada kullanılacak ksilanazların ( pH 8–10 ) alkali şartlarda aktivesini kaybetmemesi aranan bir özelliktir ( Techapun et al. 2003 ). Çalışmamızda izolatları kültür sıvısı süpernatantlarının optimum ksilanaz aktivitesi gösterdiği pH değerlerinin belirlenmesi amacıyla, farklı tamponlar kullanılarak pH değerleri 6–10 arasında ayarlanmış %1'lik ksilan ( birch-wood xylan ) substrat ve DNS metodu ile ve 35<sup>0</sup>C'de enzim aktivitelerinin ölçümü yoluyla belirlenmiştir. pH 6 – 8 için fosfat tamponu, pH 9 – 10 için ise glisin / NaOH tamponu kullanılmıştır. Glisin tamponu tuz yoğunluğundan ( Cl nedeni ile ) etkilendiği için tampondaki tuz oranı enzim örneklerine göre ayarlanmıştır. Hazırlanan tamponlanmış substratların pH değerleri pH-metre (Hana pH metre 211) ile kontrol edilmiştir.

### 3.2.10. Değişik Sıcaklıklarda Ksilanaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzolatlara ait kültür sıvısı süpernatantlarının optimum ksilanaz aktivitesi gösterdiği sıcaklık değerlerinin belirlenmesi, farklı sıcaklık aralıklarında ( 35°C - 80°C) ve pH 9'da, kısım 3.2.8'de verilen DNS metodu ile enzim aktiviteleri ölçülerek gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.11. Ksilanaz Termal Stabilite Özelliklerinin Belirlenmesi

Endüstriyel olarak kâğıt hamurunda ksilanaz kullanımı genelde 60°C'de gerçekleştirilmektedir ( Subramaniyan and Prema 2000, Beg et.al. 2001 ). İzolatların kültür filtratlarındaki ksilanaz aktivitelerinin 60°C'de uzun süreli olarak bir kayba uğramaması önemli bir özellik olarak görülmektedir. İzolatların ksilanaz termal stabilite özelliklerinin belirlenmesi amacıyla değişik sürelerde 60°C'de bekletilen enzim örneklerinin ksilanaz aktiviteleri DNS metodu ile 60°C ve pH 9'da, substrat olarak %1'lik ksilan kullanılarak belirlenmiştir.

### 3.2.12. Kâğıt Hamuru Denemeleri

#### 3.2.12.1. Kâğıt Hamurunun Hazırlanması

İzolatlara ait enzimlerin kâğıt hamuruna etkilerinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmak üzere kâğıt hamuru hazırlanmıştır. Beyazlatılmamış kraft kâğıdı ( Çaycuma AŞ. ) öncelikle çeşme suyunda daha sonra distile suda ıslatıldı ve el ile suyu sıkıldı yaklaşık 1 cm'lik kısımlara parçalandı. Kâğıt parçaları bir kap içindeki 70°C'lik distile suda 10 dakika kadar bekletildikten sonra aynı su içinde uçları kesici olmayan ev tipi elektrikli bir çırpıcı ile serbest lifler haline getirilerek iyice desintegre (liflere ayırmak) edildi. 2 mm aralıklı bir elekten süzüldü. Elek üzerinde kalan düğümlü kısımlar en son olarak tekrar çırpıcıdan geçirilmek üzere toplandı. Desintegre edilmiş lifler yaklaşık 0,5 mm por açıklıklı olan plastik esaslı bir tül kumaşta süzülerek tutuldu. Hafifçe sıkıldı. 1 cm'lik parçalara ayrıldıktan sonra bir gece 50°C etüvde kurutulularak fırın kurusu hamur ( fk hamur ) elde edildi. Daha sonraki işlemlerde kullanılması gerektiğinde, uygun miktarda fk hamur tartıldıktan sonra uygun büyüklükteki bir erlendeki 70°C'lik distile su içine alınarak manyetik karıştırıcı kullanılarak iyice liflendirilmiş, 0,5 mm por açıklıklı plastik esaslı tül kumaşta süzülerek hazırlanmıştır.

#### 3.2.12.2. Enzimatik Ön İşlemin Optimizasyonu

Kâğıt hamurlarının seçilmiş izolatlara ait ksilanaz preparatları ile ön işlemleri için optimizasyonu Khandeparkar and Bhosle ( 2006 )'ya benzer şekilde, kâğıt hamurlarının izolatlara ait ksilanaz preparatları ile ön işlemlerde uygulanması düşünülen şartlarda işleme tutulması sırasında belli sürelerde alınan örneklerin şeker içerikleri belirlenerek yapılmıştır. Bunun için DNS yöntemi ile selülaz negatif olduğu belirlenmiş olan Ag 12, Ag13, Ag20, Ag32 izolatlarına ait enzim preparatları kullanılmıştır. %0.5'lik NaOH ile enzim preparatları ve işlem

sıvılarının ön pH ayarlaması yapılmıştır. Tartıldıktan sonra distile suda liflendirilmiş ve süzölmüş kâğıt hamurunun işlem sıvısına ilavesini takiben, pH 9,0, 60°C, 10 IU enzim/g fk-hamur ve toplam 3g fk-hamur / 60 ml ( %5 fk-Hamur ) şartlarında 2.5 saat süre ile enzimatik ön işlem uygulanmıştır. İşlem sırasında her denemeden 0, 30, 60, 90, 120 ve 150'nci dakikalarda alınan 1.5'er ml'lik örneklerin içerdiği ve ksilan hidrolizi sonucu açığa çıkmış olan şeker miktarları DNS metodu ile belirlenmiştir. Ayrıca, enzim preparatı yerine su kullanılan bir deneme de kontrol olarak aynı işlemlere tabi tutulmuştur. İşlem sırasında alınan örneklerden DNS yöntemi ile belli süreler için İU/ml olarak elde edilen şeker miktarı değerleri, aşağıdaki formüle göre, hamurun gramı başına açığa çıkan mg cinsinden şeker değerlerine dönüştürüldükten sonra, zamana karşı kâğıt hamurunun gramı başına açığa çıkan şeker grafiği oluşturulmuştur. Kâğıt hamurunun gramı başına açığa çıkan şeker miktarının hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\frac{\text{Topam indirgen şeker ( mg )}}{\text{Toplam fk kâğıt hamuru ( g )}} = \frac{\text{ml'de indirgen şeker ( mg ) x Topam İşlem hacmi ( ml )}}{\text{Toplam fk kâğıt hamuru ( g )}}$$

$$= \frac{\text{IU/ml x 0.14 mg}^* \text{ x Topam İşlem hacmi ( ml )}}{\text{Toplam fk kâğıt hamuru ( g )}}$$

\* ; 1µmol Ksiloz, 0.14 mg

Ayrıca, enzim preparatlarının kâğıt hamurundaki etkinliklerinin sınırlarına ulaşip ulaşmadığının belirlenebilmesi için, ilk işlemler sonunda işlemde kullanılmış olan kâğıt hamurları distile su ile yıkanıp süzöldükten sonra, aynı izolata ait taze enzim preparatları kullanılarak aynı şartlarda aynı işleme tekrar tabi tutulmuş ve indirgen şeker salınımları belirlenmiştir.

### 3.2.12.3. Kromofor Salınımının Belirlenmesi

Enzimatik ön işlemin optimizasyonu işlemi sonunda, işlem uygulanmış hamurun bir kısmı sıkılarak akan sıvı temiz bir cam kaptaki toplanmış Whatman no:1 filtre kâğıdından süzöldükten sonra kromofor belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır ( Chauhan et al. 2006 ). Her izolat için kontrol olarak, kaynatma sıcaklığında 15 dakika bekletilerek inaktive edilen enzim preparatları, aynı şartlarda işleme alınmıştır ( Jiang et al 2005 ). Süzöntülerde, açığa çıkan bileşiklerden fenolik bileşiklerin yoğunluğu 237 nm'de, hidrofobik bileşiklerin yoğunluğu 465 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçümleri ile belirlenmiştir. Kör olarak enzim ilave edilmemiş kâğıt hamuru örneği kullanılmıştır ( Yang et al. 1995, Dashek 2002 ).

### 3.2.12.4. Enzimatik Ön İşlem

Kimyasal beyazlatma işlemi öncesinde kâğıt hamurları enzimatik ön işleme tabi tutulmuştur. Bu işlem bazen enzimatik ön işlem ( Zhao et al 2005 ), bazen de enzimatik ön beyazlatma gibi değişik şekillerde adlandırılmaktadır. Kısım 3.2.12.2'de belirtildiği şekilde

yapılan enzimatik ön işlemin optimizasyonu ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi sonucunda Ag12, Ag20, Ag32 izolatlarına ait enzim preparatları ile kâğıt hamurları işleme tabi tutularak gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak enzim kullanılmadan aynı işlemlere tabi tutulan kâğıt hamuru kullanılmıştır. İşlem kimyasal beyazlatma işlemi sonrasında bir kısım kâğıt hamuru kappası hesaplamada kullanılacak, diğer bir kısım kâğıt hamuru da beyazlık ölçümü için yetecek boyutlarda, toplam 7,5 g fk-hamur için gerçekleştirilmiştir. Enzimatik ön işlemler pH 9,0, 60°C, 10 IU enzim/g fk-hamur ile toplam 7,5 g fk-hamur / 150 ml ( kesafet % 5 fk-Hamur ) şartlarında ve yine daha önce yeterli olduğu belirlenmiş olan 120 dakikalık süre ile sıcak su banyosu ve naylon torbalar içinde 10 dakika aralıklarla cam baget ile karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. İşlemler sonrasında kâğıt hamurları, kâğıt hamuru hazırlama ve kimyasal beyazlatma işlemlerinde de kullanılan bir elek üzerinde distile su ile pH'ları 7.8 civarına düşüncüye kadar iyice yıkanmıştır.

### 3.2.12.5. Kimyasal Beyazlatma

Kâğıt hamurlarının kimyasal beyazlatması için, önce EDTA, daha sonra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> işlemi olmak üzere ardışık iki aşamalı beyazlatma uygulanmıştır. İşlemden seçilmiş izolatlara ait enzim preparatları ile ön işlem görmüş kâğıt hamurları ve kontrol olarak enzimatik ön işlem uygulanmamış kâğıt hamurları kullanılmıştır. Kimyasal beyazlatma işlemi, daha sonra işlemler olarak kappası testi için yaklaşık 4 g fk-hamur, beyazlık belirlenmesi için gereken kâğıdın yapılması için ise 3,2 g fk-hamur olmak üzere toplam 7.2 g fk-hamur için, Atik ve diğerleri ( 2006 )'ne göre bir ön EDTA işlemi ilavesi ile ( Chauhan et al. 2006 )'na benzer şekilde, aşağıdaki şekilde ve sırada gerçekleştirilmiştir.

1. EDTA uygulaması, %1 EDTA, %1 fk-hamur kesafetinde, 50°C'de 30 dakika süre ile uygulanmıştır ( Atik ve diğerleri 2006 ). İşlem sonunda kâğıt hamurları yaklaşık 0,5 mm por açıklıklı olan plastik esaslı bir tül kumaş üzerinde 50°C'deki sıcak distile su ile yıkanarak süzümüştür.
2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beyazlatması, Atik ve diğerleri ( 2006 )'den modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beyazlatması, kâğıt hamurlarına EDTA uygulamasını takiben %1 NaOH, %2,5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, %5 fk-hamur kesafetinde, 70°C'de 80 dakika süre ile uygulanmıştır. İşlem sonunda kâğıt hamurları yaklaşık 0,5 mm por açıklıklı olan plastik esaslı bir tül kumaş üzerinde 60°C sıcaklıktaki distile su ile yıkanarak süzümüştür.

### 3.2.12.6. Kappa Numarası Belirlenmesi

Belli zaman, sıcaklık ve asitlikte, 1 gram ham kuru hamur tarafından tüketilen 0,1 M potasyum permanganatın ml cinsinden miktarına o hamurun kappası denmektedir. Kappa numarası belirlenmesi Bostancı ( 1987 ) ve Doğan ( 2004 ) 'na göre yapılmıştır. Kappa numarası belirlenmesinde kullanılan kimyasal çözeltiler kısım 3.1.2.2.6'de verilmiştir.

Bu işlem için öncelikle, kâğıt hamuru örneği, sulu hamur süspansiyonu halinde ise, süzülerek yıkanır, oda sıcaklığında kurutulur ve ufak parçalara ayrılır. Örnekte kıymıklar ve budak parçaları varsa temizlenmelidir. Bu temizleme işlemi süzme yöntemi ile sağlanabilir.

Kullanılan potasyum permanganat çözeltisinin %30 -70'ini tüketecek miktar ( bu miktar önceden deneme ile belirlenebilir ) 3-4 g aralığında kuru kâğıt hamuru hassas terazide tartıldıktan sonra 500 ml distile su içinde lifler birbirinden iyice ayrılincaya kadar desintegre edilir. Desintegre edilmiş hamur süspansiyonu 1500 ml'lik reaksiyon beherine dökülür. Hamur süspansiyonu beherinde hiç lif kalmaması için boşaltılarak beher 295 ml distile su konularak iyice çalkalanır ve yıkama sıvısı reaksiyon beherine eklenir. Reaksiyon beheri  $25 \pm 1$  C<sup>0</sup>'lik su banyosuna konularak ve karıştırılır. 250 ml'lik başka bir beher ( reaktif beheri ) içine 100'er ml önceden hazırlanmış potasyum permanganat ve sülfürik asit çözeltilerinden 100'er ml konular. Böylece elde edilen kimyasal reaktif çözeltisi sıcak su banyosuna alınır. Reaksiyon kabı ve reaktif beheri  $25 \pm 1$  C<sup>0</sup> sıcaklığa ulaşınca, reaktif çözeltisi reaksiyon kabına eklenir. Bu andan itibaren kesin 10 dakikalık reaksiyon süresi tutulmaya başlanır. Süre tutma işleminin başlarında 250 ml'lik reaktif erleninde kalan kimyasal madde kalıntıları da 50 ml distile su ( 25 C<sup>0</sup> ) ile çalkalanıp, yıkama suyu reaksiyon kabına dökülür. Bu şekilde reaksiyon kabında 1 L çözelti hacmi oluşmuş olur. Reaksiyon  $25 \pm 1$  C<sup>0</sup> sıcaklıkta devam ettirilmelidir.

$25 \pm 1$  C<sup>0</sup>'de 10 dakikalık reaksiyon süresi dolunca, reaksiyon kabına 20 ml potasyum iyodür çözeltisinden katılarak reaksiyon durdurulur. Bu işlemden sonra reaksiyon beheri 10 dakika ışıktan uzak tutulur. Reaksiyon beheri su banyosundan alınır, oda sıcaklığında sodyum tiyosülfat çözeltisi ile titre edilir. Titrasyonda permanganatın rengi kaybolup ortam açık sarı olmaya başlayınca, ortama kaynatılarak iyice eritilmiş ve süzölmüş çözümlü nişasta solüsyonundan bir miktar ilave edilir. Reaksiyonun sonu, indikatör nişasta ile oluşan mavi rengin ani renksizleşmesi ile belirlenir. Bu renksizleşme 20 saniye kadar geri dönmemelidir. Harcanan sodyum tiyosülfat çözeltisi miktarı ( ml ) oldukça hassas şekilde ölçülerek kaydedilmelidir. Aynı işlem kâğıt hamuru kullanılmadan yapılan boş deneme olarak tekrarlanır. Harcanan sodyum tiyosülfat çözeltisi miktarı kaydedilir. Testin değerlendirilmesi aşağıdaki formüle göre yapılır.

$$K = \frac{a \times d}{m} \quad a = \frac{(b - c) \times n}{0.1}$$

Formüldeki semboller:

**K**= Kappa numarası

**a** = Permanganat tüketimi ( ml ). Formüle göre bulunacaktır (  $a = a'$  ).

**b** =Boş ( kâğıt hamuru içermeyen ) denemedeki Sodyum tiyosülfat tüketimi ( ml. )

**c** = Hamurlu denemedeki sodyum tiyosülfat tüketimi ( ml )

**n** = Sodyum tiyosülfat'ın normalitesi

**d** =  $a'$  değerine bağlı olarak düzeltme faktörü ( Çizelge 3.1'den alınan değerlerdir. )

**m** = Hamur kuru ağırlığı ( gram cinsinden fırın kurusu hamur ağırlığıdır )

Örnek olarak, a değeri 32 ise, Çizelge 3.1' deki 30 ve 2 değerlerinin kesişimi olan 0.962 sayısı düzeltme faktörü (d) olarak alınır. a' değeri 30' dan az ise standart Çizelge kullanılmaz. Bu durumda d, 1 olarak alınır.

**Çizelge 3.1.** ' a ' değerine bağlı, d düzeltme faktörü tablosu ( Bostancı 1987)

a	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
30	0.958	0.960	0.962	0.964	0.966	0.968	0.970	0.973	0.975	0.977
40	0.979	0.981	0.983	0.985	0.987	0.989	0.992	0.994	0.996	0.998
50	1.000	1.002	1.004	1.006	1.009	1.011	1.013	1.015	1.017	1.019
60	1.022	1.024	1.026	1.028	1.030	1.033	1.035	1.037	1.091	1.042
70	1.044									

### 3.2.12.7. Delignifikasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Kappa testinden elde edilecek sonuçlara göre delignifikasyon etkinliğinin belirlenmesi aşağıdaki denkleme göre belirlenmiştir ( Duarte et al. 2003 ).

$$\% \text{ Delignifikasyon etkinliği} = \frac{\text{Başlangıçtaki kappa numarası} - \text{kimyasal beyazlatma sonrası kappa numarası}}{\text{Başlangıçtaki kappa numarası}}$$

### 3.2.12.8. Permanganat Çözeltisinin Standardize Edilmesi

Kappa testinde kullanılacak katı veya çözelti halindeki  $\text{KMnO}_4$  stokları bir kısım aktivitesini bozulma nedeni ile kaybettiği için kullanılmadan önce standardize edilmesi yani gerçek konsantrasyonunun belirlenmesi gerekmektedir. Standardize edilen ve uygun şekilde saklanan çözeltiler nispeten uzun süre kullanılabilirler. Permanganat standardizasyonu, Jeffery et al. ( 1991 )'na göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

Sodyum oksalat  $105 - 120^\circ\text{C}$ 'de fırında 8 saat süre tutulmuş ve nem çekmemesi için kapalı bir kap içinde soğuması beklenmiştir. Sodyum oksalattan 0,3 g' lik kısım çok hassas olarak tartılmış üzerine 240 ml yeni hazırlanmış distile su, daha sonra da 12,5 ml yoğun  $\text{H}_2\text{SO}_4$  veya daha tercihen 250 ml 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ilave edilerek sodyum oksalat tamamen eriyinceye kadar karıştırılmıştır. Daha sonra hazırlanan oksalat - asit çözeltisi  $55 - 60^\circ\text{C}$ 'de permanganat çözeltisi ile titre edilmiştir. Bu amaçla reaksiyonun tamamlanmasına yetecek permanganat çözeltisinin % 90 – 95' lik kadar kısmı sodyum oksalat çözeltisine ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra, çözeltinin  $55 - 60^\circ\text{C}$  sıcaklığa alınarak titrasyonuna devam edilmesi tavsiye edilmektedir. Titrasyonun sonu pembe renk dönüşümü ile belirlenmiştir ( permanganatın renginin kaybolmayıp kaldığı ilk an ). 30 saniye beklenecek renge geri dönmediğinden emin olunmuştur. Titrasyon sırasında çözelti devamlı olarak karıştırılmalıdır. Permanganat çözeltisi dakikada 25 – 35 ml hızında ilave edilmelidir. Renk dönüşümü

gerçekleştğinde bir kaç damla fazladan permanganat çözeltisi ilavesi uygun olur.  $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$  formülüyle permanganatın gerçek molaritesi belirlenir. Buradan yola çıkılarak kappa testinde kullanılacak, normalitesi kesin olarak ayarlanmış permanganat çözeltisi elde edilir. Çok temiz bir cam kap içinde karanlıkta saklanan permanganat çözeltisi birkaç iki gün içinde kullanılmalıdır ( Jeffery et al. 1991 ).

### 3.2.12.9. Beyazlatmada Kullanılacak $H_2O_2$ Çözeltisinin Standardizasyonu

Kâğıt hamuru beyazlatmada kullanılan ticari  $H_2O_2$  ve stok çözeltileri bozulma nedeni ile sürekli değişim ( azalma ) gösterebildiğinden kullanım öncesi kesin konsantrasyonlarının belirlenmesi ( standardizasyonu ) gerekmektedir.

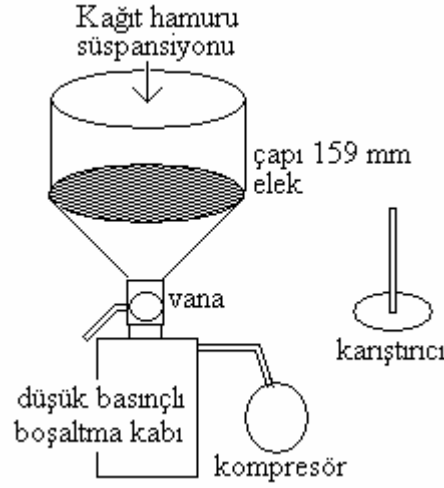
Seyreltilmiş ve konsantrasyonu bilinmeyen  $H_2O_2$  stokundan ( Ticari şişeler yüksek konsantrasyonda  $H_2O_2$  içerdiğinden 100 kez seyreltilmesi yerinde olur ) 1 ml alınarak üzerine 20 ml distile su ve 1 ml %10'luk  $H_2SO_4$  çözeltisinden ilave edilmiştir. Daha sonra permanganatın rengi kaybolana dek 0,02 Molar  $KMnO_4$  çözeltisi ile titre edilmiştir. 5 mol  $H_2O_2$ 'nin 2 mol  $KMnO_4$  tüketeceğinden yola çıkarak  $H_2O_2$ 'nin konsantrasyonu bulunmuştur ( Jeffery et al. 1991 ).

### 3.2.12.10. Kâğıt Hamurlarının Kâğıt Haline Getirilmeleri

Beyazlıklarının aletsel olarak ölçülebilmesi için kâğıt hamurlarının kâğıt haline getirilmeleri gerekmektedir. Bunun için, hamurlar eğer kurutulmuş ise Tappi T 205 sp-95 standardına uygun olarak 3.2 g'lık kuru kâğıt hamuru ( fk-hamur ) de-iyonize su ile ıslatıldıktan sonra 3x3 cm'lik kare şeklinde kısımlara ayrıldı. Dört saat suda ıslatıldı. Örnek  $20 \pm 2$  °C'de distile veya deiyonize su ile 400 ml'ye dilüe edildi ( %1,2 yoğunluk ). Mikserde yaklaşık 3000 rpm ( 50/sn ) dönüş hızı ile lif düğümleri kalmayınca kadar liflendirildi. Daha sonra bu 400 ml'lik stok 1,6 L'ye seyreltildi ( % 0,3 yoğunluk ).

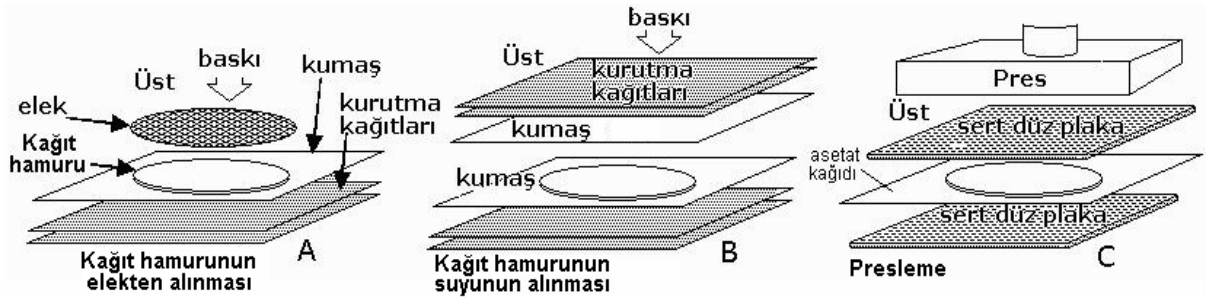
Elde edilen kâğıt hamuru süspansiyonu ile ham kâğıt "handsheet" yapımı için, yine Tappi T 205 sp-95 standardına uygun olan Şekil 3.3'deki el yapımı alet kullanılmıştır. Bunun için eleğin altındaki konik kısma elek yüzeyine kadar su ilave edildi. Üzerine kullanılacak hacimde hamur süspansiyonu ilave edilir. Son hacim yüksekliği su ile 350 mm'ye tamamlandı. Hamur süspansiyonuna daldırılan karıştırıcı yavaşça, çevirme hareketi yapmadan 6 saniyelik sürelerde beş defa aşağı yukarı hareket ettirilerek hamur süspansiyonunun homojenliği sağlandı. Karıştırıcı yavaşça hamur süspansiyonundan çıkarıldı. Sıvı yüzeyi hareketsiz olduğunda drenaj vanası açılarak vakumla sıvının hızla aşağı akması sağlandı. Liflerin elek yüzeyinde düzgün tabaka oluşturacak şekilde kalması için drenaj 3,5 sn olacak şekilde hızlı yapılmıştır ( Anonim 1 T 205 sp-95 Standard Practice 1995 ).





**Şekil 3.3.** Kâğıt yapımı için düzenek

Sonraki aşama "couching" adı verilen kâğıt yapımı bitirme işlemidir. Bunun için sert bir zemin üzerindeki üst üste konulmuş dört kurutma kâğıdı üzerine düz yüzeyli, ince naylon esaslı perdelik kumaş konuldu. Aletten çıkarılan elek, kâğıt hamuru tabakası aşağı bakacak şekilde ters çevrilerek kumaşın üzerine yerleştirildi. Eleğin üst kısmına elle düzgünce baskı uygulandı. Elek kaldırıldığında ham kâğıt tabakası alttaki kumaşın üzerinde kaldı. Ham kâğıdın üst kısmına da diğer bir naylon esaslı bez yerleştirilip üzerine dört kurutma kâğıdı yerleştirildi. Oluşan yapının en üzerine düz bir tahta plaka yerleştirildi ve üzerine takriben 15 kg'lık bir ağırlık yerleştirilip beş dakika süre ile fazla suyun alınması için beklendi. İşlemi kurutma kâğıtları yenilenerek tekrarlandı. En son olarak ham kâğıdın üstündeki bez ve kurutma kâğıtları alındı. Bunların yerine kâğıtta düz bir yüzey elde etmek için, yüzeyleri düz ve parlak sert plastik "pleksi-glass" tabakası yerleştirildi ve vakit geçirmeden preslendi. Presleme, Tappi T 205 sp-95 sıtandardında ( Anonim 1 1995 ) belirtildiği gibi 3,87 kg /cm<sup>2</sup> basınçta 5 dakika süre kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan kâğıtlar baskıdan alınarak üzerine 15 kg'lık bir ağırlık yerleştirilip gölge bir yerde kurumaya bırakılmıştır. Şekil 3.4'de kâğıt yapımı bitirme işlemi şematik olarak gösterilmiştir.



**Şekil 3.4.** Kâğıt yapımı bitirme işleminin şematik gösterimi

### 3.2.12.11. Beyazlık Ölçümü

Denemeye alınan kâğıt hamurlarından elde edilen kâğıtların beyazlığı 457 nm dalga boyunda ve MgO beyazlığı %100 alınarak ( Johnston et al. 1996 ) kalibre edilmiş beyazlık okuma aleti ( Elrepho 3300 DataColor—Switzerland ) ile % ISO beyazlık değeri olarak ölçülmüştür.

### 3.2.13. İzolatların Tanılanması

#### 3.2.13.1. Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

Biyokimyasal test besiyerlerine aksi belirtilmediği sürece % 2,5 NaCl ilave edilmiştir. Testler iki tekrarlı olarak yapılmış, inoküle edilmemiş negatif kontrol kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır.

Gram ve spor boyama, Tamer ve Oskay ( 2001 )'a göre yapılmıştır. Gram boyamada karşılaştırma amacı ile kullanılan ve Bölümümüzde bulunan Gram negatif boyanma özellikli *Salmonella typhimurium* CCM 5445 ve Gram pozitif boyanma özellikli *Bacillus subtilis* ATCC 6683 strainleri, Dr. Mustafa Oskay'dan temin edilmiştir. Endospor boyama, Tamer ve Oskay ( 2001 )'e göre, Malaşit yeşili ve safranin boyalarının kullanıldığı Schaeffer – Fulton metodu ile yapılmıştır. Gram ve endospor boyama çözeltileri ve işlemleri ile ilgili bilgilerin çok yer tutması, yaygın kullanılan rutin bilinen uygulamalar olmaları; ayrıca, birçok kaynaktan kolayca bulunabilmeleri nedeni ile burada ayrıntılı olarak verilmemişlerdir.

Seçilmiş izolatların glukoz, mannitol, ksiloz ve laktoz kullanma ve bu şekerlerden asit oluşturma özelliğinin incelenmesi, Tamer ve ark. ( 1989 )'na göre modifiye edilerek yapılmıştır. Yatık nutrient agar ( Besiyeri 6 ) tüplerinde 35 °C'de 36 saat gelişmiş kültürlerden, tüplerdeki şeker fermentasyon brothlarına bir öze dolusu inokülasyon yapılmıştır. 35 °C'de 48 saat gelişmiş kültür tüplerinin metil kırmızısı ile kırmızı renk oluşumu asit oluşturma için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Karbon kaynağı içeren ortamda durham tüpleri içinde gaz birikmesi gaz oluşumu için pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

Seçilmiş izolatların değişik tuz konsantrasyonlarında gelişebilme özelliklerinin incelenmesi, Besiyeri 6 ( NA ) ortamına gerekli oranda tuz katılarak gerçekleştirilmiştir. Yatık nutrient agar ( Besiyeri 6 ) tüplerinde 35 °C'de 36 saat gelişmiş kültürlerden, petrilerdeki Besiyeri 6 ( NA ) ortamına öze dolusu inokülasyon yapılmıştır. 35 °C'de inkübasyon sonunda 48. saatte gelişme görülmesi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

Kazein hidrolizi Tamer ve Oskay ( 2001 )'e göre yapılmıştır.

H<sub>2</sub>S oluşturma özelliklerinin belirlenmesi, hazır, ticari Triple Sugar İron Agar ( TSİ ) besiyeri kullanılarak, Tamer ve diğerleri ( 1989 )'e göre yapılmıştır. Besiyerine %2 olacak şekilde NaCl ilave edilmiştir. Yatık nutrient agar ( Besiyeri 6 ) tüplerinde 35 °C'de 36 saat gelişmiş kültürlerden, tüplerdeki yatık TSİ Agar besiyerlerine igne öze ile önce yüzeye zig zag çizgiler sonra daldırma ekim yapılmış, 35 °C'de 48 saat gelişmiş kültürlerde, oluşan siyah renk H<sub>2</sub>S oluşumu için pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

İndol testleri ( Triptofan'dan indol oluşturma ) ve ilgili para-dimetil aminobenzaldehit içeren kovaks reaktifinin hazırlanması Tamer ve diğerleri ( 1989 )'e göre yapılmıştır. Kültürlerin inoküle edildiği Tripton Broth ( Besiyeri 19 ) tüplerinin 35 °C'de 48 saat inkübasyonları sonunda, tüplere 0.25 ml kovaks reaktifi dökülmüştür. Kırmızı renkte (çürük vişne kırmızısı) halka oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Nişasta hidrolizi testleri Özdemir ( 1997 )'e göre yapılmıştır. Test edilecek kültürlerden, petrillerdeki Nişasta Agar'a ( Besiyeri 14 ) kısa çizgiler halinde inoküle edilmiştir. 35 °C'de 48 saat inkübasyonları sonunda, petrilere koloni yüzeylerini örtecek kadar gram-iyodür çözeltisi dökülmüş, koyu mavi renk alan besiyerinde gelişmiş kültürlerin çevresinde renksiz nişasta hidroliz zonu görülmesi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

Tiyoglikolat ( thioglycollate ) ortamında aerobik / anaerobik gelişebilme özelliğinin incelenmesi Tamer ve Oskay ( 2001 )'a göre yapılmıştır. Yatık nutrient agar ( Besiyeri 6 ) tüplerinde 35 °C'de 36 saat gelişmiş kültürlerden, %2.5g NaCl ilave edilmiş ve otoklavlanmış steril edilmiş ticari hazır Tiyoglikolat Broth ( Oxoid ) içeren tüplere öze yardımı ile inokülasyon yapılmıştır. İnoküle edilen tüpler 35 °C'de inkübe edilmiş ve 24. ve 48. saatlerde incelenmiş, besiyeri yüzeyinde gelişme aerobik, dip kısımlarda gelişme anaerobik gelişme özelliği olarak, besiyerinin tümüne dağılmış üreme fakültatif gelişebilme özelliğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir.

Nitrat indirgenme testi, Williams et al. ( 1983 ) ve Yücel ( 1993 )'e göre yapılmıştır. Nitrat redüksiyonu, Besiyeri 13 'e inoküle edilen kültürlerin 35 °C'de inkübasyonu ile 3. ve 7. gün sonunda, 0.5'şer ml kısım 3.1.2.3'de verilen nitrat redüksiyonu reaktifleri olan Griess-Hosvay reaktifleri A ve B ilavesiyle, 30 dakika içinde pembe-kırmızı renk görülmesiyle saptanmıştır. Steril edilmiş sıvı parafinle kapatılan ve inokülasyon yapılmamış iki tüp negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Her izolattan iki test tüpü hazırlanmıştır. Aynı ortama iz miktarda çinko tozu ilavesi ve tüplerin karıştırılması sonucu oluşan kırmızı rengin görülmesi ( ortamdaki nitrat varlığını gösterir ) negatif reaksiyondur.

Sitrat kullanma özelliklerinin belirlenmesi, Simmon's Citrate Agar besiyeri kullanılarak. Tamer ve diğerleri ( 1989 )'e göre yapılmıştır. Yatık nutrient agar ( Besiyeri 6 ) tüplerinde 35 °C'de 36 saat gelişmiş kültürlerden, tüplerdeki yatık Simmon Sitrat Agar ( Besiyeri 12 ) besiyerlerine öze ile önce yüzeye zig zag çizgiler çizdikten sonra 35 °C'de 48 saat gelişmiş kültürlerin brom timol mavisinin yeşil renginin maviye dönüşmesi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

Lesitinaz aktivitelerinin belirlenmesi için, seçilen izolatların Egg Yolk Agar'a ( Besiyeri 11 ) nokta ekimi ve 25°C'de inkübasyonu sonucunda 48. ve 72. saatlerde kuvvetli ışık altında koloniler etrafında opak, krem-sarı presipitat görülmesi, pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir ( Williams et al. 1983'den modifiye )

Jelâtin kullanımı testi Tamer ve diğerleri ( 1989 )'e göre yapılmıştır. Tüplerdeki Nutrient Jelatin ortamlarına ( Besiyeri 18 ), Yatık nutrient agar ( Besiyeri 6 ) tüplerinde 35 °C'de 36 saat gelişmiş kültürlerden iğne öze ile daldırma ekim yapılmıştır. 35 °C'de 48 saat gelişmiş kültürlerin

besiyeri yüzeyinde veya diğer kısımlarında farklı sınıflandırma tipleri göstermesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Oksidaz testleri ( Merck, Tetra-methyl-p-phenylenediamine dihydrochlorit reaktifi kullanılarak ) Yücel ( 1993 )'e göre yapılmıştır. Yatık Nutrient Agar ( Besiyeri 6 ) tüplerinde 35 °C'de 36 saat gelişmiş kültürlerden bir öze dolusu alınarak Whatman no:1 filtre kâğıdı üzerine konulmuştur. Üzerine kısım 3.1.2.3'de verilen Kovaks'ın oksidaz reaktifinden dökülmüştür. 1–2 dakikaya kadar mavi-mor renk oluşumu pozitif, renk oluşmaması veya pembe renk oluşumu negatif sonuç olarak kabul edilmiştir.

Katalaz aktivitelerinin belirlenmesi için, Yatık nutrient agar ( Besiyeri 6 ) tüplerinde 35 °C'de 36 saat gelişmiş kültürlerden bir öze dolusu alınarak lam üzerine konulmuştur. Üzerine 2,- 3 damla %3' lük, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi ( Carlo Erba, 7722–84–1 ) dökülmüş, gaz kabarcıkları oluşumu pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

Hareketlilik belirleme testi, % 0.35 agar içeren SIM ortamında, Yücel 1993'e göre yapılmıştır. Tüpteki hareketlilik belirleme ortamına ( Besiyeri 17 ), Yatık nutrient agar ( Besiyeri 6 ) tüplerinde 35 °C'de 36 saat gelişmiş kültürlerden iğne öze ile daldırma ekim yapılmış, 35°C'de 48 saatlik inkübasyon sonunda ekim çizgisinden etrafa doğru sık ince çizgiler şeklinde yayılma görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Metil Red-Voges Proskauer ( MR-VP ) testleri için, Yatık nutrient agar ( Besiyeri 6 ) tüplerinde 35 °C'de 72 saat gelişmiş kültürlerden 1–2 öze dolusu alınarak MR-VP Broth'a ekilerek 35 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplerdeki kültürün 1 ml 'lik bir kısmı ( Voges Proscauer ) VP testi için boş olan başka bir tüpe alınmış, tüpte kalan kısmın üzerine 5–6 damla metil kırmızısı solüsyonundan eklenmesi sonucunda parlak kırmızı renk oluşması pH'nın 4.4 veya daha aşağıya inmiş olduğunu yani glukozdan asit ürünler oluşturulduğunu belirtir olup Metil Red ( MR ) testi için pozitif sonuç tur. Kırmızısı portakal renk zayıf pozitif, sarı veya portakal renk negatif sonuç olarak kabul edilmiştir. MR-VP Broth'da 35 °C'de 72 saat inkübe edilmiş kültürlerden boş tüpe alınan 1 ml'lik kısım üzerine 0,6 ml %5'lik ( g / ml ) α-naftol çözeltisi eklenerek karıştırıldıktan sonra 0.2 ml % 40'lık KOH eklenerek iyice çalkalanmış ve yarı yatık pozisyonda bekletilmiştir. 15–60 dakika sonunda ortam yüzeyinde kırmızı renk oluşumu VP testi için pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir ( Tamer ve diğerleri 1989, Özdemir 1997 ). İnoküle edilmemiş tüpler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Tirozin hidrolizi için Yang et al. ( 1995 ) tarafından tarif edilen izolasyon besiyeri 4'e ( DX ) BW-Xylan yerine Oskay ( 2006 )'in belirttiği oranda ( % 0,5 ) Tirozin ( Fluka 93830 ) ilavesi sonrasında, aşılardan besiyerinde gelişen kolonilerin çevresinde inkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde açık hidroliz zonu gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.13.2. Taksonomik Analizler

Besiyeri 7; CMC Agar'da selülaz hidroliz zonu oluşturmadığı için seçilen izolatların genus düzeyinde identifikasyonu yapılmıştır. Bunun için izolatlar için elde edilen morfolojik ve

biyokimyasal test sonuçları Bergeys Manual of Determinative Bacteriology' e ( Holt et al. 1994 ) göre değerlendirilmiştir.

Holt et al. ( 1994 )'a göre *Bacillus* genusu üyesi olduğu belirlenen seçilmiş izolatlarımız yer aldıkları muhtemel türlerin belirlenmesi için, izolatlara ait morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları, ilgili literatürler ışığında, Minitab programı ( versiyon 13.20, Minitab Inc., 2000 ) kullanılarak istatistiksel analize alınmıştır. Multivariable cluster, 'Correlation Coefficient Distance, Complete Linkage' analiziyle, izolatlarımızın ve literatürlerde verilmiş olan yaygın ve standart *Bacillus* türlerinin % benzerlikleri ortaya çıkarılmıştır.

Bunun için, ilk olarak Priest and Alexander ( 1988 ), Bergey' Manual of Systematic Bacteriology ( Sneath 1986 ) ve Fritze et al. ( 1990 )'dan yararlanarak farklı *Bacillus* taksonları için olasılık matrisi oluşturulmuştur. Priest and Alexander ( 1988 )'de ( frequency matrix for probabilistic identification of some bacilli ) 33 *Bacillus* taksonu için verilmiş olan toplam 561 karakterden, 20–80 arası değişen olasılık ihtimali ile verilen 58 tanesi ihmal edilmiştir. Geri kalan karakterlerden 1–20 arası değişenler negatif, 80–99 arası değişenler ise pozitif olarak alınmıştır.

Bergey' Manual of Systematic Bacteriology'den ( Sneath 1986 ), Priest and Alexander ( 1988 )'de yer almayan 8 *Bacillus* türü için sadece % 90 ve daha fazla strain pozitif ve % 90 ve daha fazla strain negatif olarak belirtilmiş değerler negatif ve pozitif olarak alınmıştır. Fritze et al. ( 1990 )'den, biri tip straini olmak üzere morfolojik ve fizyolojik özellikleri belirlenmiş olan iki *B. alkalophilus*, ayrıca *B. circulans* ve *B. marinus*'un tip strainleri için ( + ) ve ( - ) olarak belirtilmiş değerler alınmıştır.

% benzerliklerinin oluşturulması amacıyla; öncelikle, Priest and Alexander ( 1988 ), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ( Sneath 1986 ) ve Fritze et al. ( 1990 )'de yer alan *Bacillus* türlerinin ve seçilmiş izolatlarımıza ait pozitif olasılık matrisleri, programa bire bir girilerek yakınlıklarını veren % benzerlik dendogramı oluşturulmuştur. Matris oluşturulurken, seçilmiş izolatlarımıza ait test sonuçlarından pozitif (+) olanlar için "2" değeri, negatif ( - ) olanlar için "0" değeri, zayıf pozitif olanlar ve literatürlerde değişken olarak verildiği için alınmayan veya belirtilmemiş değerler için "1" değeri verilerek bir dengeleme işlemi gerçekleştirilmiştir. En son olarak değerler beraberce programa işlenerek, % benzerlik dendogramı şekillendirilmiştir. Ancak ilk oluşan dendogramda çok sayıda *Bacillus* taksonu yer aldığı için, seçilmiş izolatlarımıza en yakın olarak bulunan 11 *Bacillus* takson'u ile bunlar arasında yer alan *B. alkalophilus* ve *B. circulans* türlerine diğer örnekler olan *B. alkalophilus* DMS2528, *B. alkalophilus* 4851 ve *B. circulans* DMS11'a ait ( Priest and Alexander 1988 ) veriler de eklenerek, seçilmiş izolatlarımızla beraber tekrar daha ufak dendrogram oluşturulmuştur.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İzolasyon Sonuçları

Örnek alınması sırasındaki göl suyunun içerdiği tuz oranı TOA wqc-20A su kalite ölçüm cihazı ile 1L'lik göl suyunda % 9,90 g., pH ise 8.12 olarak ölçülmüştür.

İzolasyonlara %0,5'er gram pepton ve maya ekstraktı içeren Besiyeri 1 ve Besiyeri 3 ( orijinal DX Besiyeri, DXo ) ile başlanmıştır. Ancak, Besiyeri 1'de, sonraki pasajlarında ve incelemelerde ksilanaz zonu oluşturmayan, muhtemelen besiyerinin protein kökenli içeriklerine bağlı olarak gelişmekte olan koloniler yoğun olarak geliştiğinden Besiyeri 1, içerdiği pepton ve maya ekstraktı miktarları %0.01g'a düşürülerek Besiyeri 2 şekline modifiye edilmiştir. Besiyeri 3'ün ( Orjinal DX besiyeri, DXo ) % 0,1, olan tuz ( NaCl ) içeriği Acı gölün tuz içeriğinin yüksek olduğu göz önüne alınıp %2,5'a yükselttilerek Besiyeri 4 ( İzolasyon besiyeri 4, Modifiye DX Besiyeri, DX ) oluşturulmuştur. İzolasyonlarda kullanılan Besiyeri 6'da ( NA<sub>2</sub> ) ksilanaz zonu oluşturmayan koloniler gelişebilmesine karşın izolasyon için genelde iyi bir besiyeri olduğu görülmüştür.

Acı Göl istasyon 2'den elde edilen toprak örneklerinden, toprağı sulandırma yöntemi ile elde edilen 10<sup>-3</sup>'lük süspansiyonlardan Besiyeri 6'ya seyreltme plaka tekniği ile yapılan 0.5 ml'ik inokülasyonlar sonrasında 55 °C'de yapılan inkübasyonlar sonunda 72 saatte 20 petri ortalaması olarak petri başına 8 adet koloni gelişimi tespit edilmiştir. Bu sayı örnek toprağının gramında 16000 cfu/ g'a denk mikroorganizma sayısına denk gelmektedir.

Acı Göl istasyon 2'den elde edilen toprak örneklerinden, toprağı sulandırma yöntemi ile elde edilen 10<sup>-4</sup>'lük süspansiyonlardan Besiyeri 6'ya seyreltme plaka tekniği ile yapılan 0,5 ml'ik inokülasyonlar sonrasında 35 °C'de yapılan inkübasyonların 48. saatinde 20 petri için petri ortalaması 95 adet koloni gelişimi ile 1900000 cfu/ g-toprak 'a denk gelen koloni gelişimi tespit edilmiştir. 45 °C'de izolasyonlarda elde edilen koloni yoğunluğu göreceli olarak 35 °C'de elde edilen gibidir.

Besiyeri 6'da ( NA<sub>2</sub> ) yapılan izolasyonlarda gelişen koloni tipleri 'T' harfi ile belirtilen 7 tipe ayrılmıştır.. T4, T5, T6, T7 tip koloniler ksilan hidroliz zonu oluşturmamaktadır. T3 tipinde koloniler ise en yaygın olarak görülmüştür. Besiyeri 6'da ( NA<sub>2</sub> ) yapılan izolasyonlarda elde edilen koloni tipleri ve genel özellikleri aşağıdaki gibidir.

T1: Düzensiz şekilli, düzensiz ksilan hidroliz zonlu, kirli beyaz renkte,

T2: Düz kenarlı, 0,5–1,5 cm çapta, geniş ksilan hidroliz zonlu,

T3: Düz kenarlı, 0,5 cm'ye kadar çapta, değişik tonda kirli beyaz, ksilan hidroliz zonu yok veya 1 cm'den ufak ve değişik çaplarda,

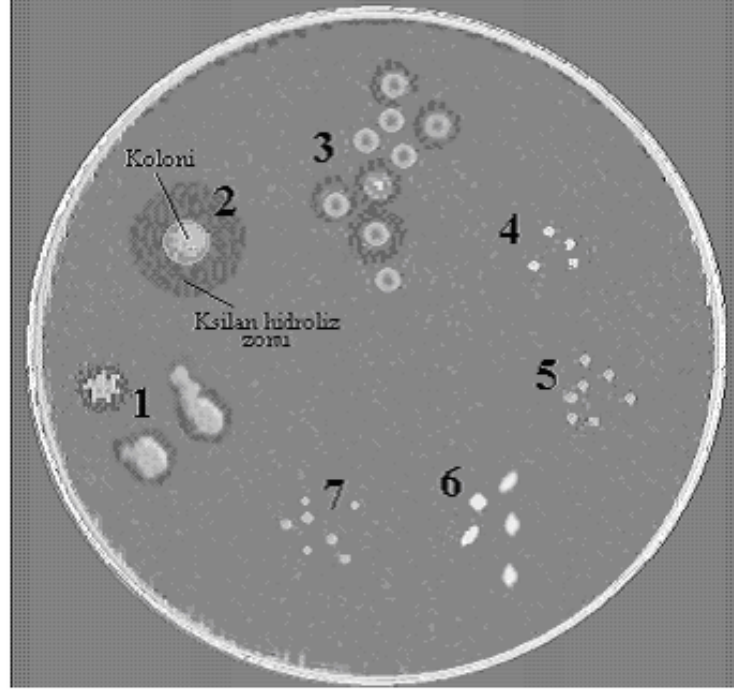
T4: Düz kenarlı, 2 mm'ye kadar çapta, beyaz, opak, ksilan hidroliz zonu belirlenemiyor,

T5: Düz kenarlı, 2 mm'ye kadar çapta, koyu kirli beyaz, opak, ksilan hidroliz zonu belirlenemiyor,

T6: Düz kenarlı, 2 mm'ye kadar çapta, sarımsı, opak, ksilan hidroliz zonu belirlenemiyor,

T7: Düz kenarlı, 2 mm'ye kadar çapta, pembe, opak, ksilan hidroliz zonu belirlenemiyor.

Acıgöl istasyon 1'den alınan toprak örneğinin,  $10^{-4}$ lük seyreltmelerden 0.5 ml alınarak Besiyeri 6'ya ( $NA_2$ ) yapılan yayma inokülasyonlar sonrasında,  $35\text{ }^\circ\text{C}$ 'de inkübasyon ile gerçekleştirilen izolasyonda, 15 petride sayılan 1412 koloninin, tiplerine göre bulunma oranları Şekil 4.1.' de gösterilmiştir.



Koloni tipi	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	Toplam
Koloni sayısı	15	32	1004	37	20	221	83	1412
Toplam (%)	1	2.3	71.1	2.6	1.4	15.7	5.9	100

**Şekil. 4.1.** Besiyeri 6 ( $NA_2$ )' da yapılan izolasyonda görülen koloni tipleri ve bulunma oranları

Besiyeri 2'de ( İzolasyon besiyeri 2, İB 2 ) yapılan izolasyonlardaki koloni tipleri de genelde Besiyeri 6' daki ( $NA_2$ ) gibidir.

DX besiyerinde yapılan izolasyonlar sırasında nerdeyse tamamen Besiyeri 6'da yapılan izolasyonlardakilere benzeyen T2 ve T3 tip koloniler gelişmiştir. Bunun yanında rizoid gelişen bazı koloniler gelişmiştir. Bu tip kolonilerin mikroskopik incelemelerinde sporlu, Gram ( + ) basiller görülmüştür. Rizoid gelişen tipte koloniler, sonraki pasajlarında, Besiyeri 6 ( $NA_2$ ), Besiyeri 1 ve 2 (İB 1 ve İB 2 ) de T1 ve T2 tip benzeri koloniler oluşturmuştur. Bu tip kolonilerden selüloz hidroliz zonu oluşturmayan ( $S_2^-$ ) bulunamamıştır.  $S_2 + K+$  özellikte olan İzolat Ag22, rizoid gelişen kolonilere örnek olarak seçilmiştir..

DX besiyerine ( Besiyeri 4 ) toprak zenginleştirmelerinden yapılan izolasyonlarda, büyük oranda T3 tipi koloniler yanında koloniler ufak 1mm kadar çapta, ksılan hidroliz zonu belirlenemeyen renksiz transparant koloniler, siyah 1-2 mm çapında mercekle deniz kestanesi gibi fırça kenarlı olup mikroskopik olarak kısa filamentlere veya basillere parçalanmış hifsi yapılar oluşturan siyahı renkli koloniler ile gözle ve mikroskopik olarak aktinomiset benzeri sporulasyon

oluşturduğu gözlenen koloniler gelişmiştir. Bu tip izolasyonda sadece 1mm kadar çapta, ksilan hidroliz zonu belirlenemeyen, transparant koloniler arasından olan Ag32 izolatu, selülaz hidroliz zonu oluşturmaz ksilanaz üretici (  $S_z -$  ) izolat olarak elde edilmiştir. Ag32 izolatu, daha sonraki DX besiyerine yapılan pasajlarında ilk izole edilmişinde belirlenen koloni görünümünden farklı olarak T3 tipi koloniler benzeri gelişme ve ksilan hidrolizi göstermiştir.

DX besiyerine broth zenginleştirmelerinden yapılan izolasyonlar sonucunda hemen hemen tamamen, Besiyeri 6'ya (  $NA_2$  ) yapılan izolasyonlarda görülen T3 tip koloniler gelişmişlerdir. Bu tip kolonilerin ilk izolasyonlarında ve sonraki incelemelerde  $S_z + K+$  özelliğe oldukları görülmüştür.

50 °C sıcaklıklarda yapılan izolasyonlarda selülaz negatif (  $S_z-$  ) izolat elde edilememiştir. Ayrıca genelde tip 3 görünümünde ve çok az koloni gelişimi görülmüştür. Koloniler istasyon 1 ve 2 örneklerinden toprağı sulandırma yöntemi ile elde edilen  $10^{-3}$  lük seyreltmelerden Besiyeri 6'ya (  $NA_2$  ) yapılan 0.5 ml'lik inokülasyonlardan sonra 50 °C'de 72 saatlik inkübasyon sonunda 10 petri ortalaması 8 adet koloni olarak görülmüştür. Bu sayı 16.000 CFU/g toprak'a denk gelmektedir.

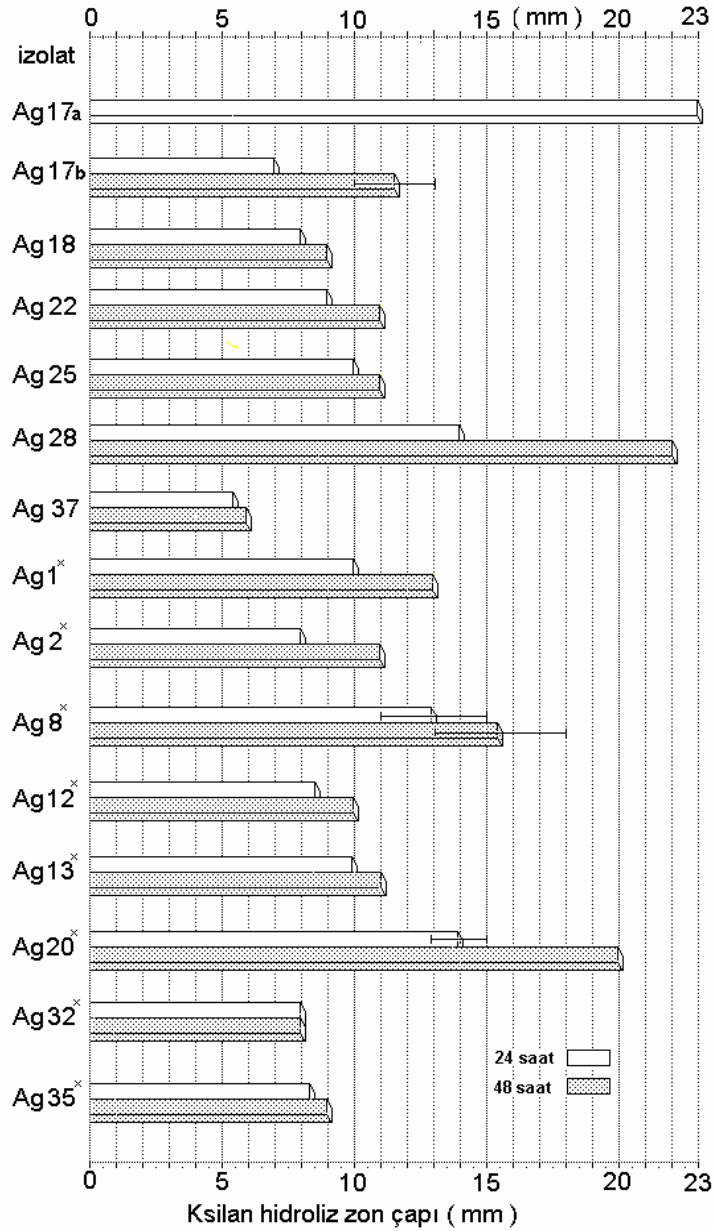
Seçilmiş izolatlarımız olan Ag1, Ag2, Ag8, Ag12, Ag13, Ag20, Ag32 ve Ag35, katı besiyerlerinde ( Besiyeri 6'da ) 50 °C'de inkübasyonla çok zayıf gelişirken, sıvı Besiyeri 6 besiyerlerinde 24. saatten itibaren bulanıklık oluşumu ile gözlenen şekilde gelişebilmektedir. Ag2, Ag8 ve Ag32 katı besiyerlerinde 50 °C'de inkübe edilen ve aynı besiyerine yapılan çoğu pasajlarında hiç gelişmemiştir.

#### 4.2. Besiyeri 4'deki Pasajlarında Ksilan Hidroliz Zon Çapları

Besiyeri 7'de ( CMC Agar ) selüloz hidroliz zonu oluşturmadığı tespit edilmiş (  $S_z -$  ) olan selülaz negatif sekiz izolat ile Selülaz pozitif değişik tip kolonileri temsilen seçilen izolatlar, Besiyeri 4'e ( DX ) yapılan inokülasyonlarında, 24. ve 48. saatlerde oluşturdukları ksilan hidroliz zonu çapları açısından incelenmişlerdir. İzolat Ag17a ve Ag28, Sırası ile T1 tip koloni oluşturan Selülaz pozitif kolonileri temsilen seçilmiştir. Ag22, Besiyeri 4'de ( DX ) yapılan izolasyonlarda rizoid tip gelişme gösteren kolonileri temsilen, Ag17b Ag18 ve Ag37 izolasyonlarda en sık karşılaşılan, Selülaz pozitif T3 tip kolonileri temsilen seçilmişlerdir. Bu İzolatlardan Ag17a ve Ag28 en büyük ksilan hidroliz zonlarını oluşturmalarına karşın istenmeyen bir özellik olarak Selülaz pozitiflerdir. Selülaz negatif (  $S_z -$  ) izolatlardan Ag20 en geniş ksilan hidroliz zonu oluşturmuştur. En ufak ksilan hidroliz zonu oluşturan Selülaz negatif izolatlar Ag32 ve Ag35 olmuştur.

Şekil 4.2'de Selülaz pozitif izolatları temsilen seçilmiş bazı izolatlar ve selülaz negatif izolatların Besiyeri 4'deki ( DX Besiyeri ) pasajlarındaki 35 °C 'de inkübasyon ile 24. ve 48. saatlerde ölçülen Ksilan Hidroliz zon çapları verilmiştir.





ksılan hidroliz zon çapları ( mm )					
İzolat	24 saatte	24 saatte	İzolat*	24 saatte	48 saatte
Ag17a	23	24	Ag1*	10	13
Ag17b	7	13 ve 10	Ag2*	8	11
Ag18	8	9	Ag8*	15 ve 11	13 ve 18
Ag22	9	11	Ag12*	8.5	10
Ag25	10	11	Ag13*	10	11
Ag28	14 ve 22		Ag20*	13 ve 15	20
Ag37	5.5	8	Ag32*	8	8.5
			Ag35*	8.5	9

Şekil 4.2. Seçilmiş ve örnek izolatların Besiyeri 4'deki pasajlarında ksılan hidroliz zon çapları.

\* , Besiyeri 7'de selülaz hidroliz zonu oluşturan (  $S_2-$  ) izolatlardan. Tüm izolatlar Besiyeri 4'de ( DX Besiyeri ) ve 35°C 'de inkübe edilmişlerdir.

### 4.3. Seçilmiş İzolatların İlk İzolasyonları ile İlgili Bulgular

48 saatte selülaz hidroliz zonu oluşturmayan ( $S_z^-$ ) izolatlar olan Ag1, Ag2, Ag8, Ag12, Ag13, Ag20, Ag32, Ag35'nolu izolatlar Besiyeri 7 ( CMC Agar ) ortamında selülaz hidroliz zonu oluşturmamaları nedeni ile önemli görülerek seçilmişlerdir. Bu şekilde 8 adet selülaz negatif ( $S_z^-$ ) izolat elde edilmiştir.  $S_z^-$  K+ izolatların izolasyonları ile ilgili bilgiler Tablo Çizelge 4.1'de verilmiştir. Ag32 ve Ag35 izolatları ilk izolasyonlarında ksilan hidroliz zonu oluşturmamışlardır.

**Çizelge 4.1.**  $S_z^-$  K+ özellikteki izolatların, ilk izolasyonları ile ilgili bilgiler.

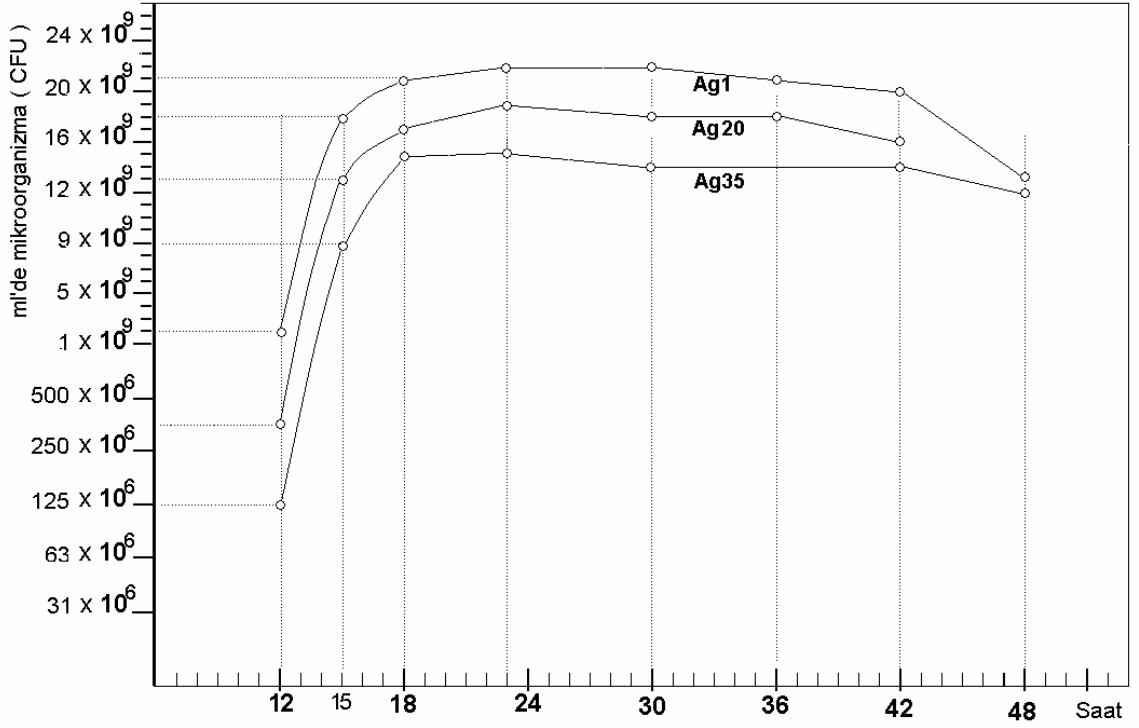
İzolat	Ag1	Ag2	Ag8	Ag12	Ag13	Ag20	Ag32	Ag35
İlk izolasyon besiyeri	Bes.6	DX	DX	Bes.6	Bes. 6	DX	DX	DX
İlk izolasyonda. Koloni tipi	T1	T3	T3	T2	T2	T1	T3	FT
İlk izolasyonda ksilan hidroliz zonu	+	+	+	+	+	+	-	-
İzolasyon yöntemi	tsy	tsy	Top. Zeng.	tsy	tsy	tsy	Top. Zeng.	tsy
İzolasyon şartları	45°C pH 9	35°C pH 10	35°C pH 10	35°C pH 9	35°C pH 9	45°C pH 10	35°C pH 9	35°C pH 10
Acı Göl İstasyon no.	2	2	2	1	2	2	2	1

Top. Zeng. Toprak zenginleştirme yöntemi.; Bes. 6, Besiyeri 6; DX , Besiyeri 4 ; tsy, toprağı sulandırma yöntemi; FT, farklı tipte ( 1mm kadar çapta transparant koloni ); +, pozitif; -, negatif.

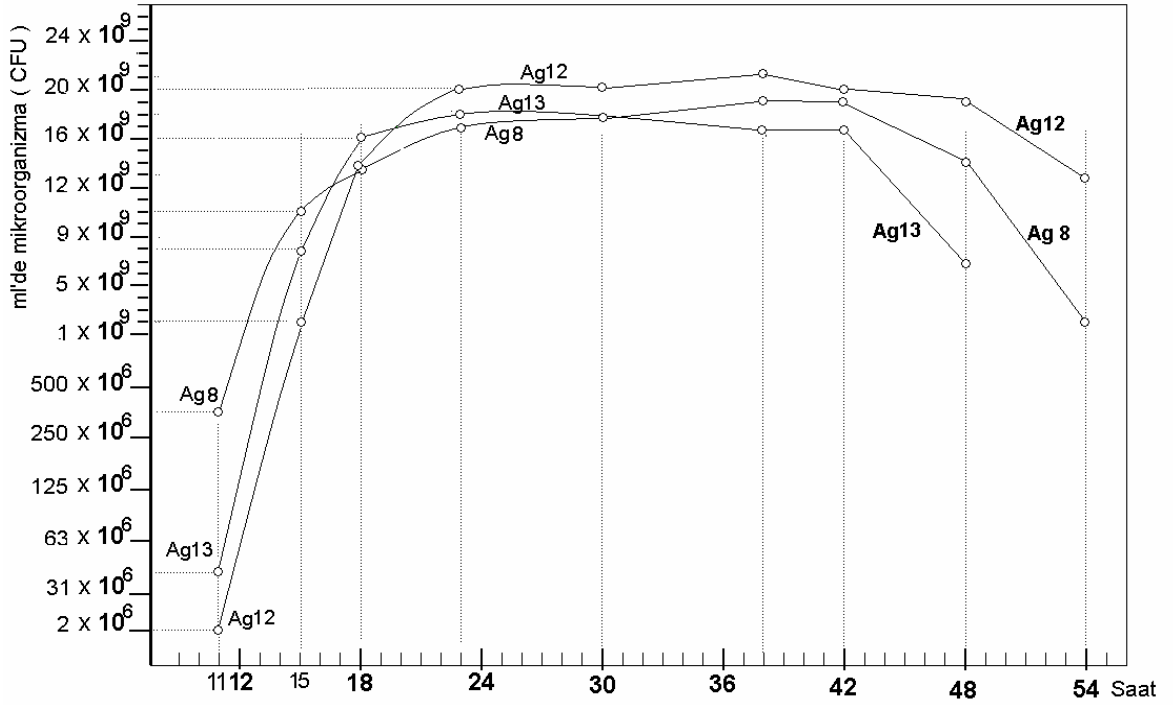
### 4.3. Büyüme Eğrileri

$S_z^-$  K+ özellikte oldukları için seçilen Ag1, Ag2, Ag8, Ag12, Ag13, Ag20, Ag32, Ag35'nolu izolatların Besiyeri 8'de ( FO1 ) ve 35°C'de fermentasyonlarıyla büyüme eğrileri çıkarılmıştır.

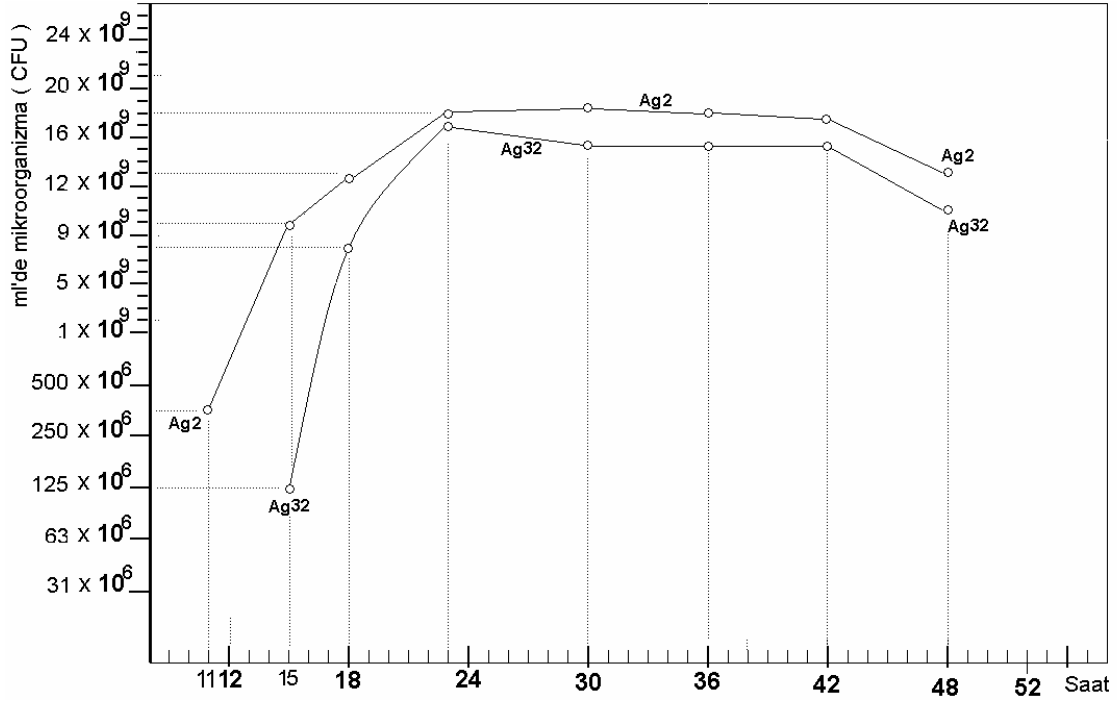
Şekil 4.3'de Ag1, Ag20 ve Ag35 izolatlarının, Şekil 4.4'de Ag12, Ag13 ve Ag8 izolatlarının, Şekil 4.5'de Ag2 ve Ag32 izolatlarının büyüme eğrileri gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Ag1, Ag20 ve Ag35 izolatlarının Besiyeri 8 ve 35°C'de büyüme eğrileri



Şekil 4.4. Ag12, Ag13 ve Ag8 izolatlarının Besiyeri 8 ve 35°C'de büyüme eğrileri



Şekil 4.5. Ag2 ve Ag32 izolatlarının Besiyeri 8 ve 35°C'de büyüme eğrileri

İzolatlar için büyüme eğrileri sonuçlarına göre Ag12, Ag13, Ag8, Ag2 ve Ag32 izolatlarının logaritmik gelişme fazından stationer faza geçişi 18. - 24. saatler arasında olup, 42. saat civarında mikroorganizma yoğunluğunda azalma başlamıştır. Ag1, Ag20 ve Ag35 izolatlarının logaritmik gelişme fazından stationer faza geçişi 15 -18. saatler arasında olup, yine 42. saat civarında mikroorganizma yoğunluğunda azalma başlamıştır. Bu izolatlar, bu bakımdan diğer izolatlardan daha önce stationer faza girmişlerdir. Tüm izolatlar için maksimum hücre yoğunlukları Ag35 izolatı için elde edilen  $12 \times 10^9$  lük ve Ag1 ile Ag12 izolatları için elde edilen  $20 \times 10^9$  CFU/ ml değerleri arasında bulunmuştur.

#### 4.4. Fermentasyon Sonuçları

Karşılaştırma amacıyla, Besiyeri 7'de ( CMC Agar ) selüloz hidroliz zonu oluşturan izolatları temsilen seçilen Ag18, Ag22, Ag25 nolu izolatlar, Besiyeri 8 ( FO1 ) ortamında 35°C'de fermentasyona alınmışlardır. Bu izolatların 24 ve 48 saatlik kültürlerindeki enzim üretimleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Ag18, Ag 22, Ag25 nolu izolatların fermentasyonlarında enzim üretimleri

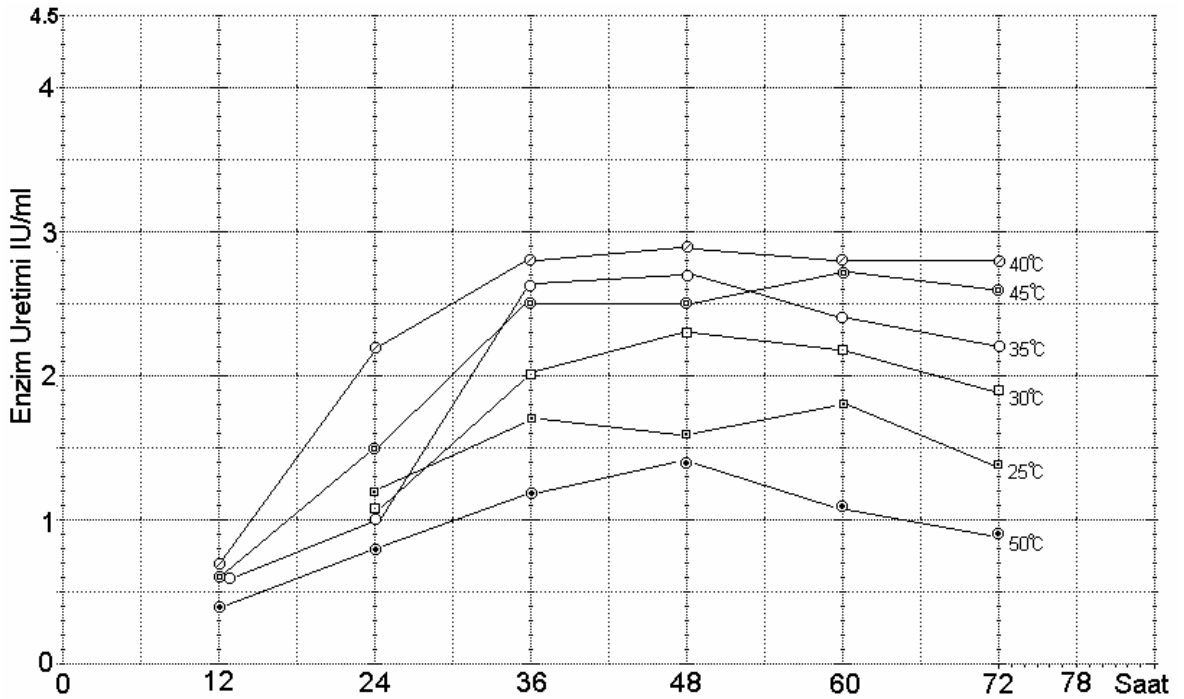
İzolat No	24 saatlik kültür			48 saatlik kültür		
	DNS testinde Absorbans	Enzim üretim değerleri ( İ U / ml. )	Kültür ortamının pH değeri	DNS testinde Absorbans	Enzim üretim değerleri ( İ U / ml. )	Kültür ortamının PH değeri
Ag18	0,120	0,6	6,9	0,230	1,3	5,3
Ag 22	0,300	1,6	8,5	0,308	1,6	8,5
Ag 25	0,340	1,8	8,1	0,406	2,2	7,5

Fermentasyonlar Besiyeri 9'da ve 35°C'de gerçekleştirilmiştir.

#### 4.5.1. Seçilmiş İzolatların Farklı Sıcaklıklarda Ksilanaz Üretimleri

Besiyeri 7'de ( CMC Agar ) selülaz hidroliz zonu vermemeleri ile (  $S_z$  - ) seçilmiş Ag1, Ag2, Ag8, Ag12, Ag13, Ag20, Ag32, Ag35 izolatların Besiyeri 8'de ( FO1) ve değişik sıcaklıklarda ksilanaz üretimleri (  $\text{IU/ml}$  ,  $\pm 0.1$  ) Şekil 4.6 – 4.13'de verilmiştir. DNS yöntemi ile enzim analizlerinde şekil 3.1'de görüleceği gibi 0.1  $\text{IU/ml}$ 'lik bir hata oranı olabildiğinden, enzim analizlerinde sonuçlar  $\pm 0.1$  şeklinde değerlendirilmiştir.

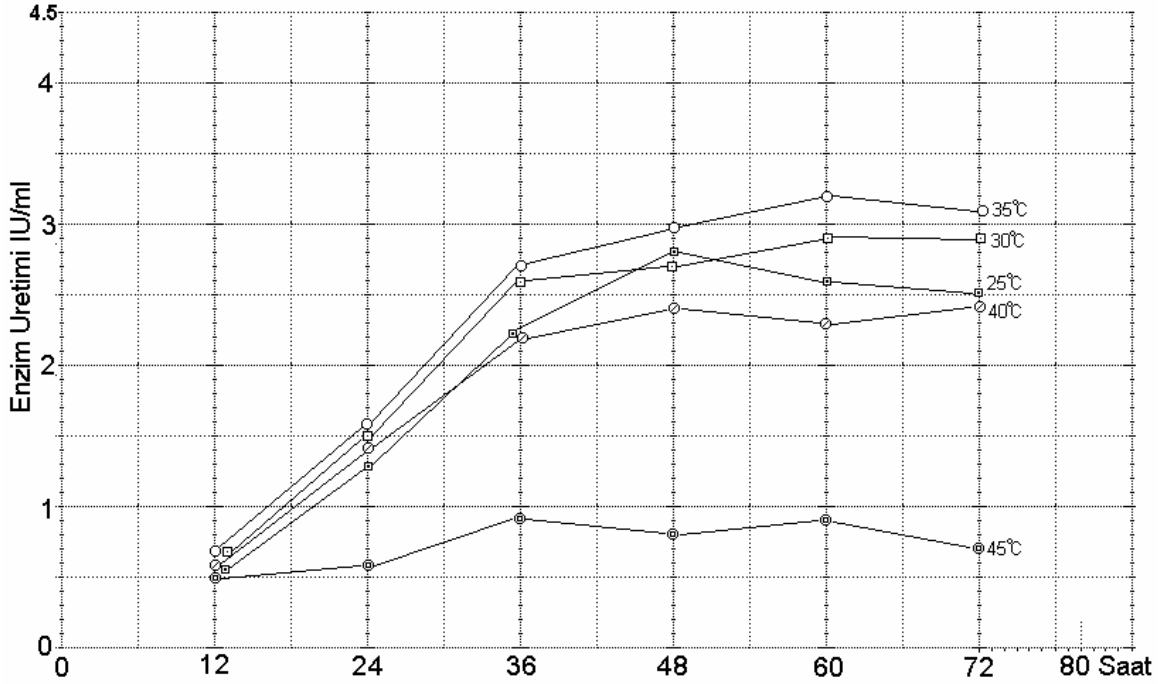
Ag1 izolatının Şekil 4.6'de verilen Besiyeri 8'deki maksimum ksilanaz üretimi 3.4  $\text{IU/ml}$  ile 40°C'de gerçekleşmiş olup, bu değer 35°C'de elde edilen maksimum 3.2  $\text{IU/ml}$ 'lik değere çok yakındır. 50°C'de ksilanaz üretimi 1.4  $\text{IU/ml}$  ile en düşük olarak gerçekleşmiştir.



Sıcaklık (°C)	sembol	Saat →	12	24	36	48	60	72
50°C	⊙		0.5	0.9	1.4	1.7	1.3	1.0
45°C	⊕		0.8	1.8	3.0	3.0	3.2	3.1
40°C	⊘		0.8	2.6	3.5	3.4	3.3	3.3
35°C	○		0.8	2.6	3.4	3.8	2.8	2.6
30°C	□			1.3	2.4	2.7	2.6	2.2
25°C	⊠			1.4	2.1	1.9	2.1	1.6

Şekil 4.6. Ag1 izolatının besiyeri 8'de farklı sıcaklıklarda ksilanaz üretimi (  $\text{IU/ml}$  ,  $\pm 0,1$  )

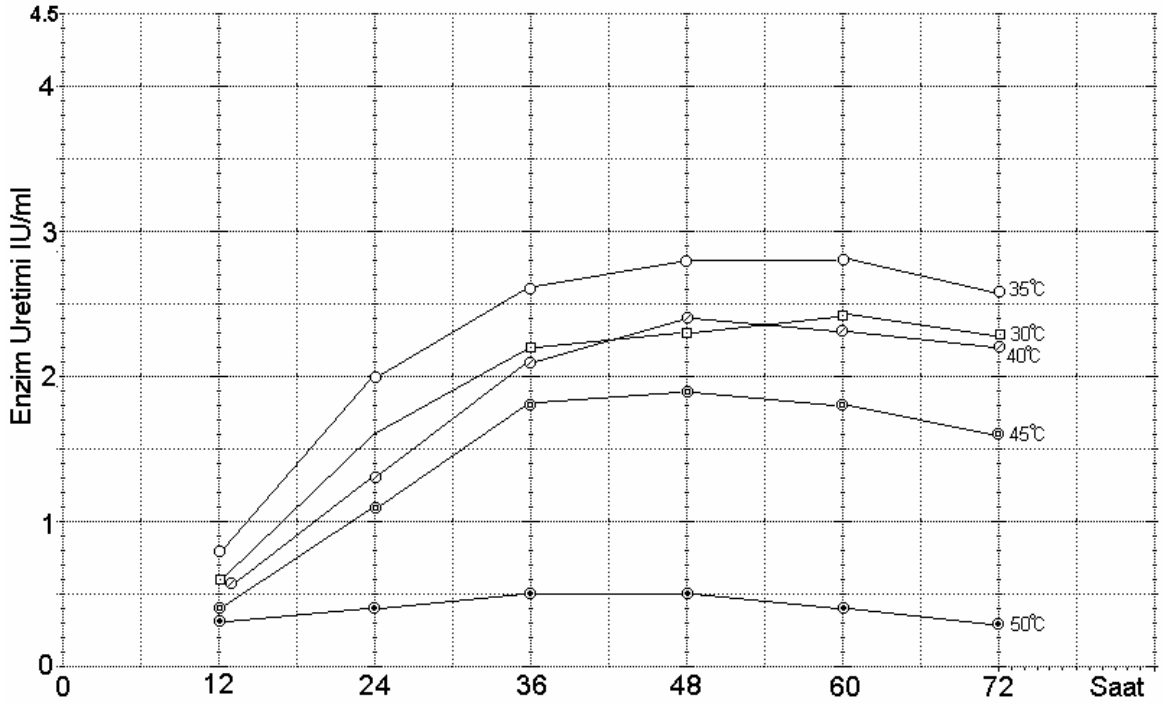
Ag2 izolatinın Şekil 4.7'de verilen Besiyeri 8'deki maksimum ksılanaz üretimi 3.2 IU/ml ile 35°C'de elde edilmiş olup, bu değer 30°C'de elde edilen maksimum 2.9 IU/ml'lik değere ile. 25°C'de elde edilen maksimum 2.8 IU/ml ksılanaz üretimi değerlerine çok yakın gerçekleşmiştir. 40°C ve 40°C'de maksimum ksılanaz üretimleri, sırası ile 2,4 ve 0.9 IU/ml ile ile düşüş göstermiştir.



Sıcaklık (°C)	sembol	Saat →	12	24	36	48	60	72
45°C	⊗		0.5	0.6	0.9	0.8	0.9	0.7
40°C	∅		0.6	1.4	2.2	2.4	2.3	2.4
35°C	○		0.7	1.6	2.7	2.9	3.2	3.1
30°C	◻		0.7	1.5	1.6	2.7	2.9	2.9
25°C	◼		0.6	1.3	2.2	2.8	2.6	2.5

Şekil 4.7. Ag2 izolatinın besiyeri 8'de farklı sıcaklıklarda ksılanaz üretimi ( IU/ml, ± 0,1 )

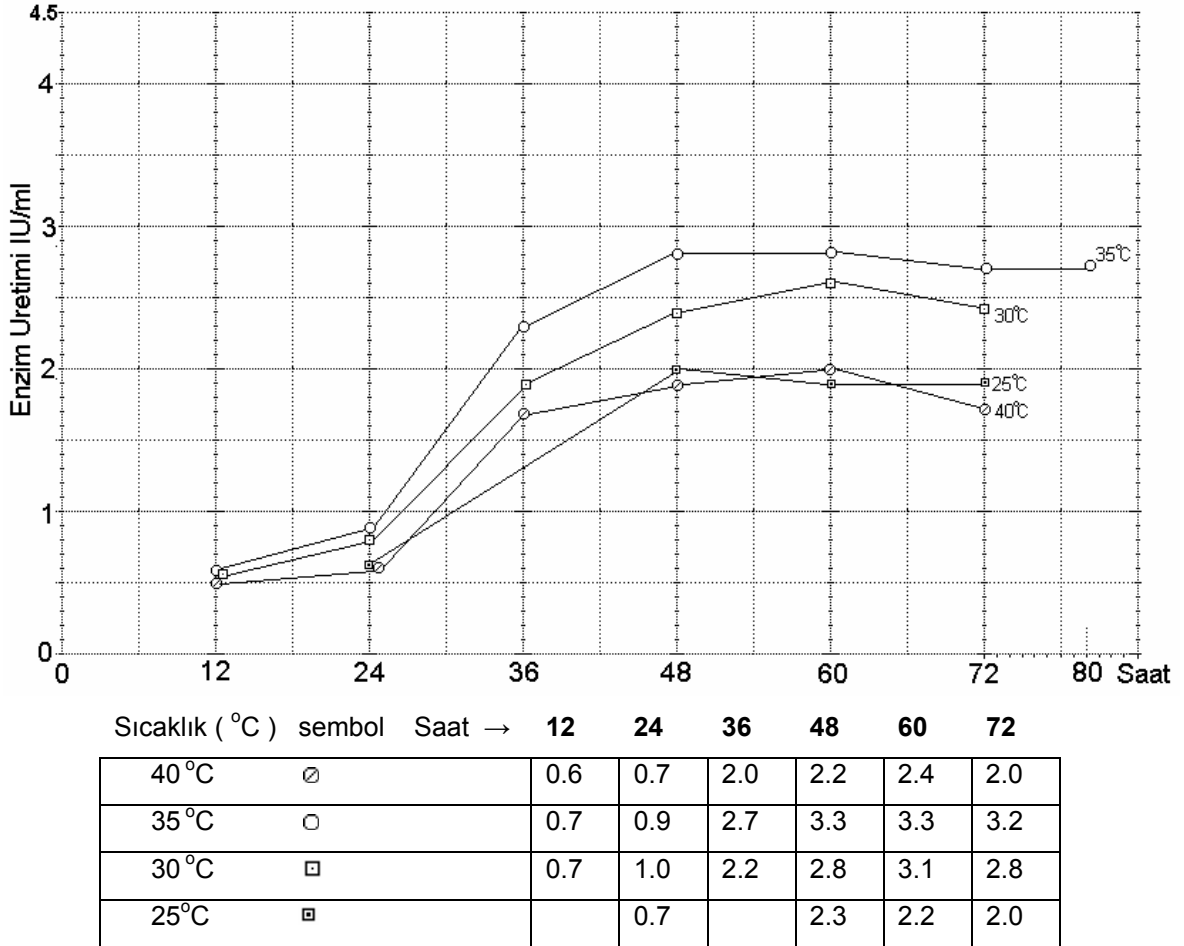
Ag8 izolatinın Şekil 4.8'de verilen Besiyeri 8'deki maksimum ksilanaz üretimi 3.1 IU/ml ile 35°C'de elde edilmiştir. Bu değer 30°C ve 40°C'de elde edilen maksimum ksilanaz üretim değerleri 2,6 IU/ml olarak gerçekleşmiştir. 45°C'de maksimum ksilanaz üretim 2,1 IU/ml olarak düşüş göstermiştir. 50°C'de maksimum 0.6 IU/ml ile çok düşük ksilanaz üretim görülmüştür.



Sıcaklık (°C)	sembol	Saat →	12	24	36	48	60	72
50°C	⊙		0.4	0.4	0.5	0.5	0.4	0.3
45°C	⊗		0.4	1.2	2.0	2.1	2.0	1.8
40°C	⊘		0.7	1.7	2.4	2.7	2.6	2.4
35°C	○		0.8	2.2	2.9	3.1	3.1	2.8
30°C	⊠		0.7	1.8	1.9	2.0	2.7	2.6

Şekil 4.8. Ag8 izolatinın besiyeri 8'de farklı sıcaklıklarda ksilanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0,1$  )

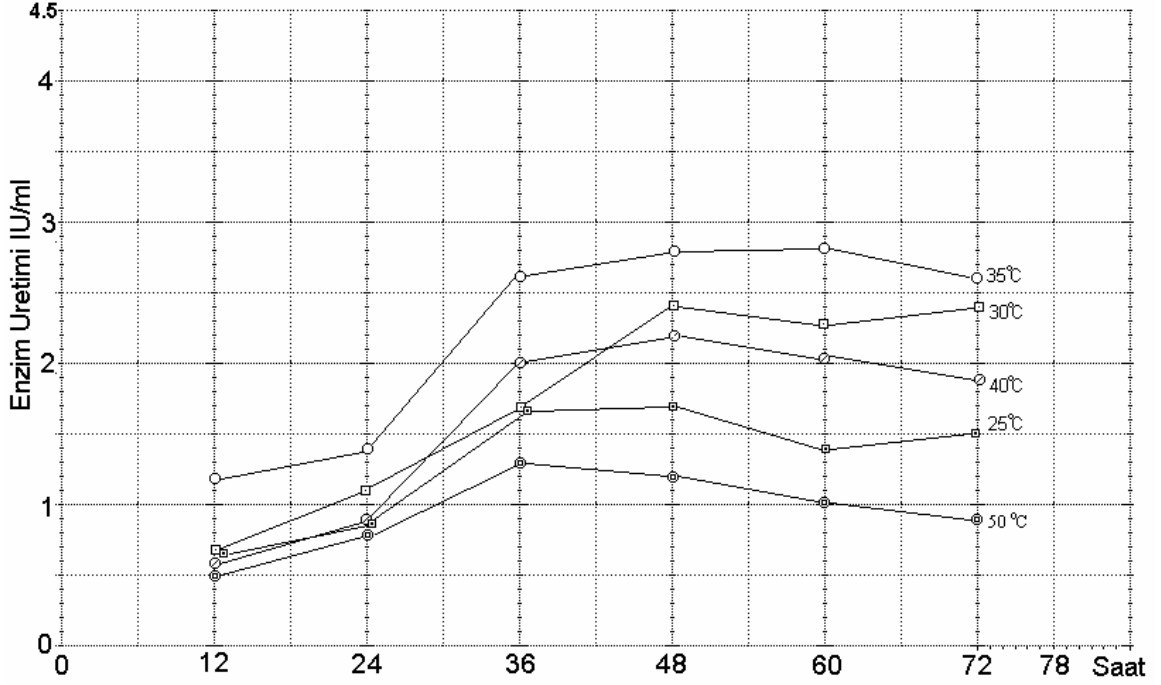
Ag12 izolatının Şekil 4.9'de verilen Besiyeri 8'deki maksimum ksılanaz üretimi, Ag8 izolatına benzer şekilde 3.3 IU/ml ile 35°C'de elde edilmiştir. Bu değeri 30°C'deki 3,1 IU/ml'lik ksılanaz üretim takip etmiştir. 25°C ve 40°C'de elde edilen maksimum 2,4 IU/ml'lik ksılanaz üretim değerleri, 35 ve 30°C'deki değerlerden daha düşük olarak gerçekleşmiştir. Maksimum ksılanaz üretimleri 48. ve 60. saatler arasında gerçekleşmiştir.



Şekil 4.9. Ag12 izolatının besiyeri 8'de farklı sıcaklıklarda ksılanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0,1$  )



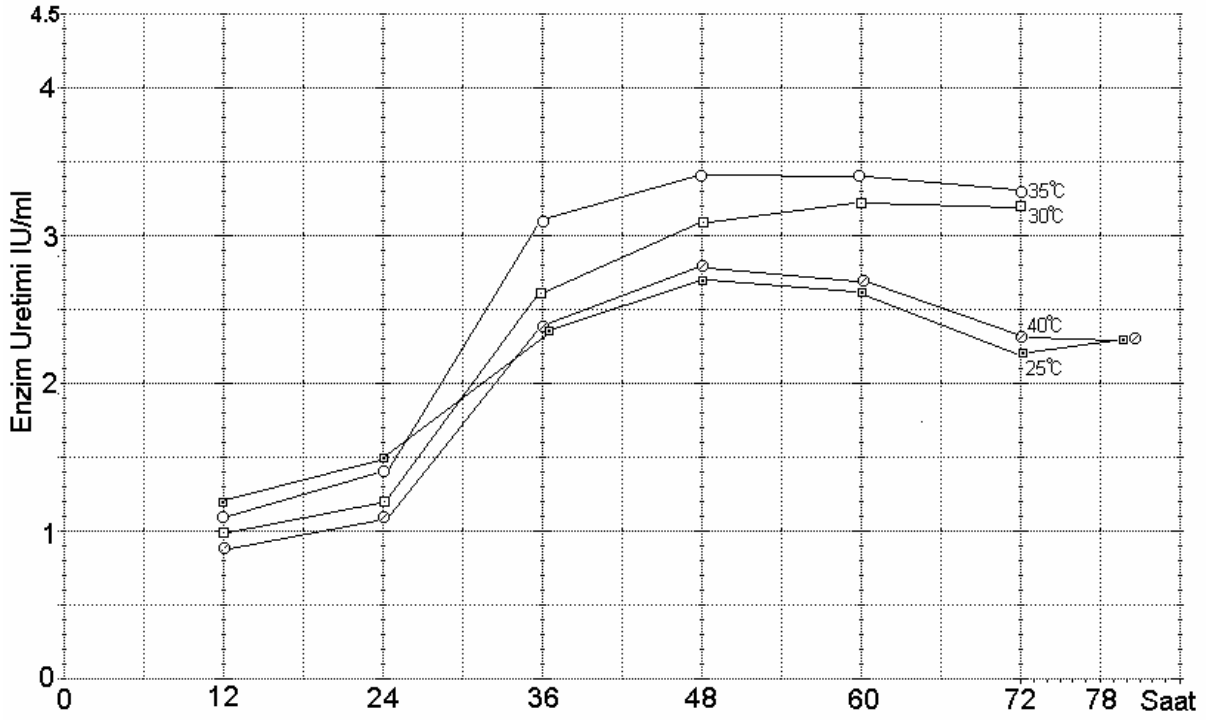
Şekil 4.10'de verilmiş olan Ag13 izolatının Besiyeri 8'deki maksimum ksilanaz üretimi, 35°C ile 3,5 IU/ml ile olmuştur. 30°C ve 40°C'de elde edilen maksimum ksilanaz üretim değerleri sırası ile 3,0 ve 2,7 IU/ml olmuştur. En düşük ksilanaz üretimi, 25°C'de elde edilen maksimum 2,1 IU/ml lik degerden daha düşük olarak, 1,6 IU/ml ile 45°C'de görülmüştür.



Sıcaklık (°C)	sembol	Saat →	12	24	36	48	60	72
50°C	⊙		0.6	0.8	1.4	1.3	1.2	1.1
40°C	⊘		1.1	1.9	2.0	2.2	2.0	1.9
35°C	○		1.5	1.7	3.3	3.5	3.5	3.2
30°C	□		0.7	1.4	2.1	3.0	2.8	3.0
25°C	▣		0.7	1.1	2.1	2.1	1.7	1.9

Şekil 4.10. Ag13 izolatının besiyeri 8'de farklı sıcaklıklarda ksilanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0,1$  )

Şekil 4.11'de verilmiş olan Ag20 izolatinin Besiyeri 8'deki maksimum ksilanaz üretimi, 4,1 IU/ml'lik değer ile 35°C'de elde edilmiştir. 30°C'de elde edilen maksimum ksilanaz üretim değeri 3,8 IU/ml olmuştur. 40°C ve 25°C'de elde edilen, maksimum ksilanaz üretimleri, sırası ile 3,3 ve 3,2 IU/ml olup birbirine çok benzer ve en düşük değerler olmuştur.

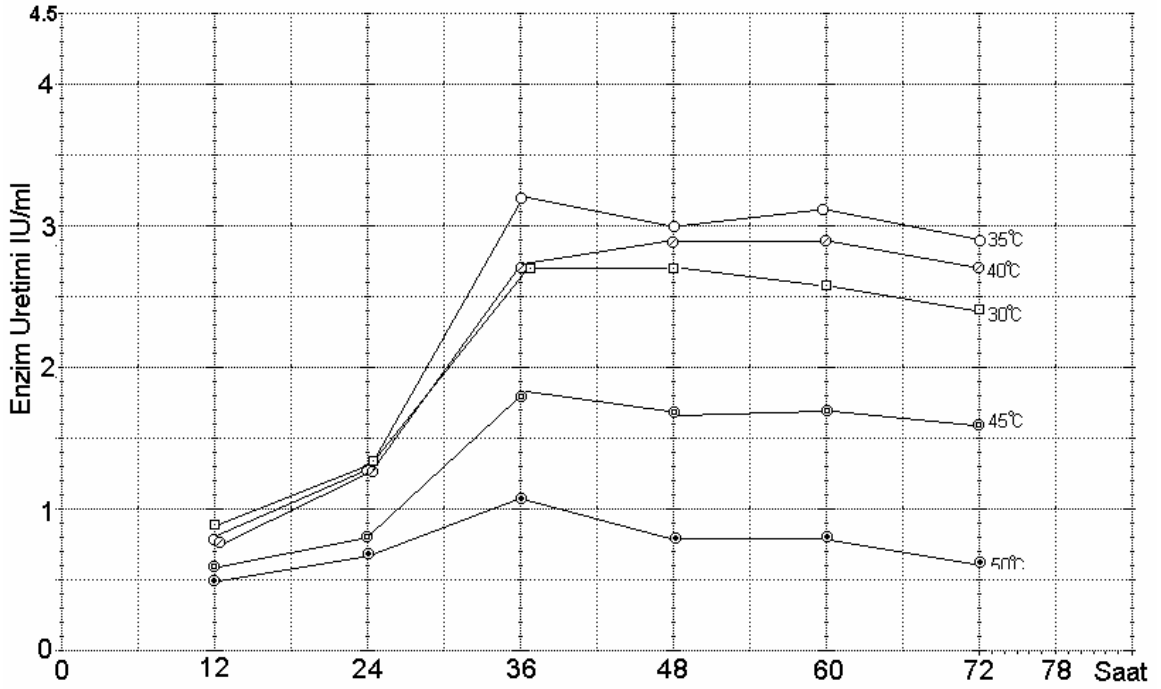


Sıcaklık (°C)	sembol	Saat →	12	24	36	48	60	72	80
40°C	∅		0.9	1.3	2.7	3.3	3.2	2.7	2.7
35°C	○		1.1	1.6	3.6	4.1	4.1	3.8	
30°C	□		1.0	1.6	3.0	3.7	3.9	3.7	
25°C	▪		1.2	1.8	2.7	3.2	3.1	2.6	2.7

Şekil 4.11. Ag20 izolatinin besiyeri 8'de farklı sıcaklıklarda ksilanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0,1$  )

Ag32 izolatinın Besiyeri 8'deki maksimum ksilanaz üretimi, 3,5 IU/ml'lik değer ile 35°C'de elde edilmiştir. 35°C'de elde edilen en yüksek ksilanaz üretimini, bir birine yakın ve sırası ile 3,1 ve 2,8 IU/ml'lik maksimum ksilanaz üretim değerleri ile 40°C ve 30°C'de elde edilen değerler izlemiştir.

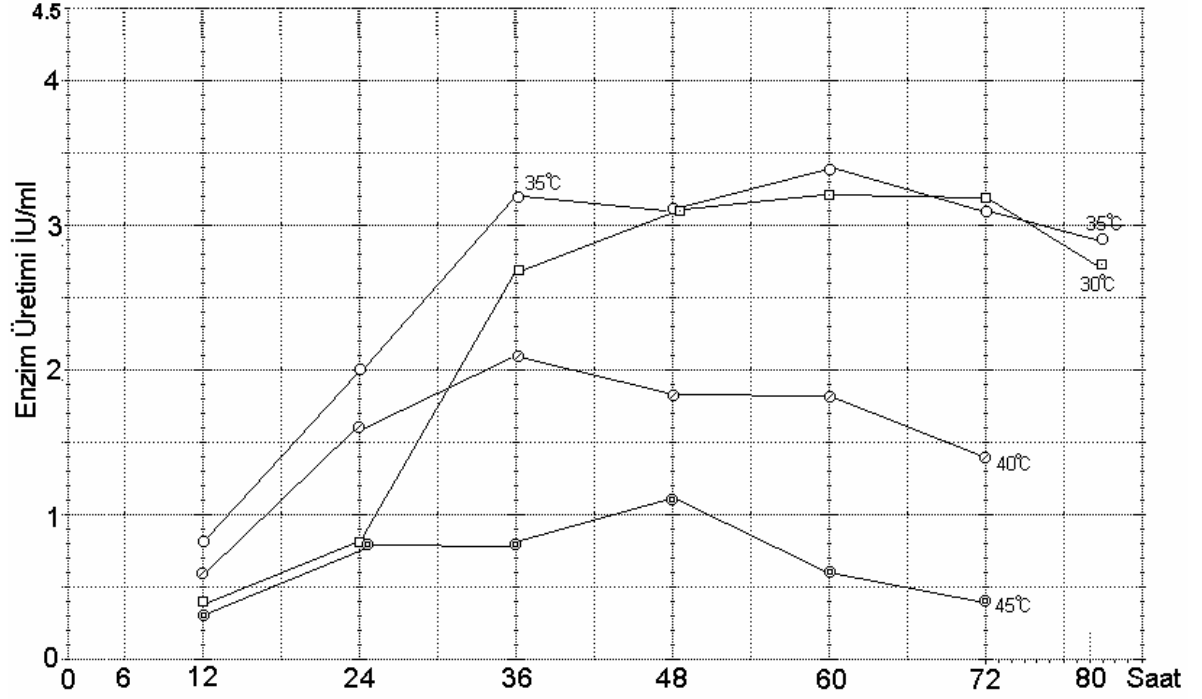
45°C ve 50°C'de elde edilen, maksimum ksilanaz üretimleri, sırası ile maksimum 1,8 ve 1,2 IU/ml ile en düşük olmuşlardır. Ag32 izolatinın Besiyeri 7'deki ksilanaz üretimi değerleri Şekil 4.12'de verilmiştir.



Sıcaklık ( °C )	sembol	Saat →	12	24	36	48	60	72
50°C	●		0.5	0.7	1.2	0.9	0.9	0.7
45°C	⊗		0.6	0.9	1.9	1.8	1.8	1.7
40°C	⊙		0.8	1.4	2.9	3.1	3.1	3.9
35°C	○		0.9	1.9	3.5	3.3	3.5	3.1
30°C	⊠		0.8	1.4	2.9	2.9	2.7	2.5

Şekil 4.12. Ag32 izolatinın besiyeri 8'de farklı sıcaklıklarda ksilanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0,1$  )

Ag35 izolatinın Besiyeri 8'deki maksimum ksılanaz üretimi, 3.6 IU/ml'lik değer ile 35°C'de elde edilmiştir. 30°C'de elde edilen en yüksek ksılanaz üretimi 3,4 IU/ml ile 35°C'de elde edilen değere çok yakın olmuştur. 40°C'de maksimum 2,1 IU/ml'lik ksılanaz üretimi tespit edilmiştir. 45°C'de ksılanaz üretimi 1.1 IU/ml ile en düşük olmuştur. Ag35 izolatinın Besiyeri 8'de değişik sıcaklıklardaki ksılanaz üretimi değerleri Şekil 4.13'de verilmiştir.



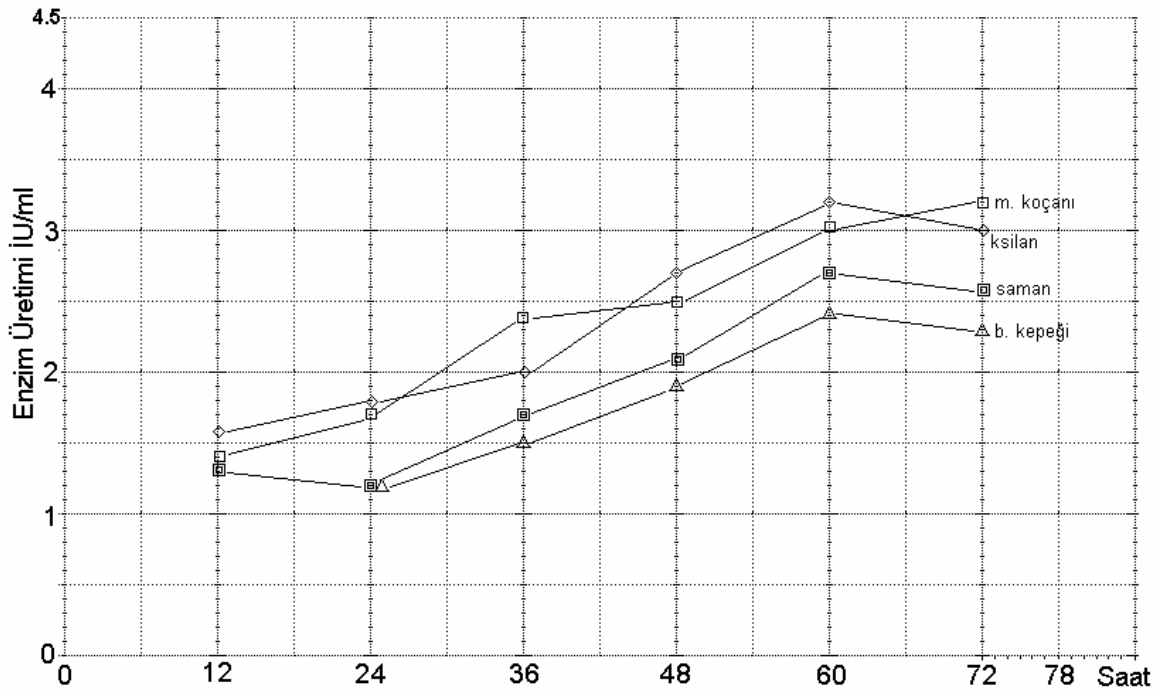
Sıcaklık (°C) sembol	Saat →	12	24	36	48	60	72	80
45°C ⊙		0.3	0.8	0.8	1.1	0.6	0.4	
40°C ⊘		0.6	1.6	2.1	1.7	1.7	1.4	
35°C ○		0.8	2.0	3.3	3.3	3.6	3.2	2.9
30°C □		0.4	0.8	2.7	3.2	3.4	3.3	2.7

Şekil 4.13. Ag35 izolatinın besiyeri 8'de farklı sıcaklıklarda ksılanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0,1$  )

#### 4.5.2. Bitkisel Substratlarda Ksilanaz Üretimleri

Seçilmiş (  $S_z$  - ) izolatların Besiyeri 9'de ( Fermentasyon Ortamı 2, FO2 ) ön işlem görmüş değişik bitkisel substratlar ( Buğday samanı, Buğday kepeği ve Mısır koçanı ) ve substrat olarak ksilan ( ticari Birch Wood Xylan, BW- Ksilan ) kullanılarak yapılan fermentasyonlarında, ksilanaz üretimleri Şekil 4.14 – 4.21'de verilmiştir. Fermentasyonlar, her izolat için Besiyeri 8'de ( FO1 ) ve değişik sıcaklıklarda ksilanaz üretimleri ile belirlenen optimum enzim üretim sıcaklıklarında gerçekleştirilmiştir.

Ag1 izolatının en yüksek ksilanaz üretimi 60–72. saatlerde işlem görmüş mısır koçanı ve ile 3.2 IU/ml'lik enzim üretimi ile olmuştur. Buğday samanı ile en yüksek ksilanaz üretimi 2,7 IU/ml, Mısır koçanı substrat olarak kullanılarak ise 2,4 IU/ml olmuştur. Ag1 izolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretim grafiği Şekil 4.14'de verilmiştir.

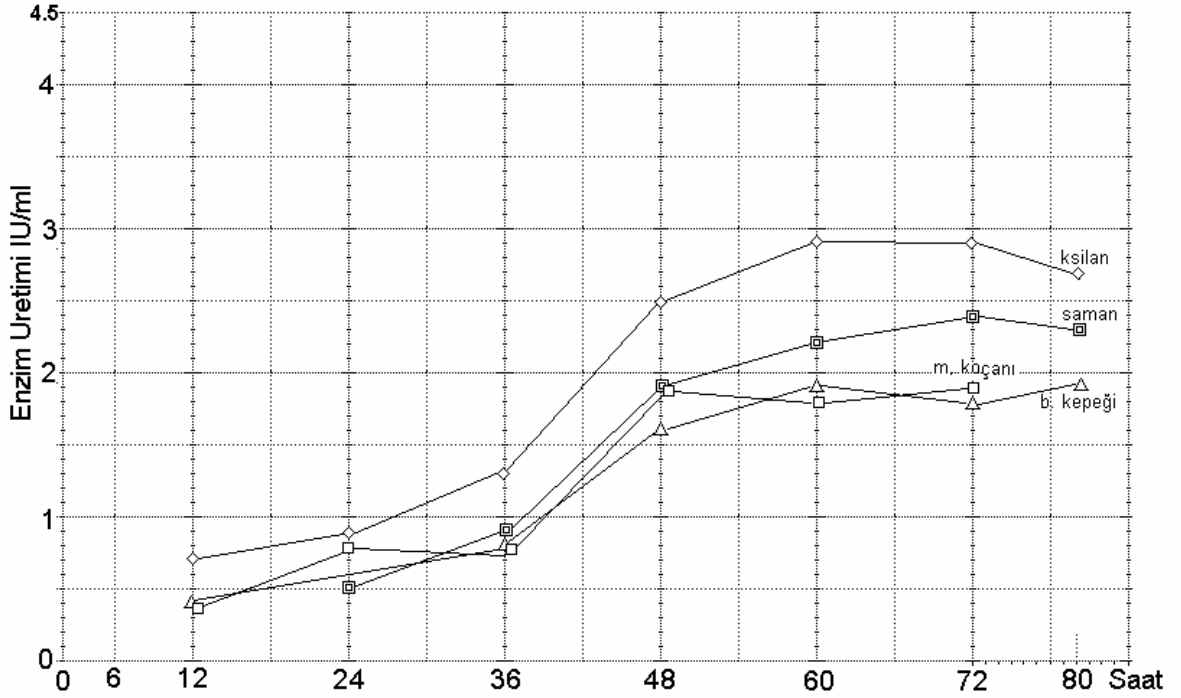


Substrat      sembol      Saat →    12    24    36    48    60    72

Ksilan ( BWX )	◇		1.6	1.8	2.0	2.7	3.2	2.8
Buğday samanı	▣		1.3	1.2	1.7	2.1	2.7	2.6
Buğday kepeği	△			1.2	1.5	2.4	2.4	3.0
Mısır koçanı	□		1.4	1.7	2.4	2.5	3.0	3.2

Şekil 4.14. Ag1 izolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0,1$  )

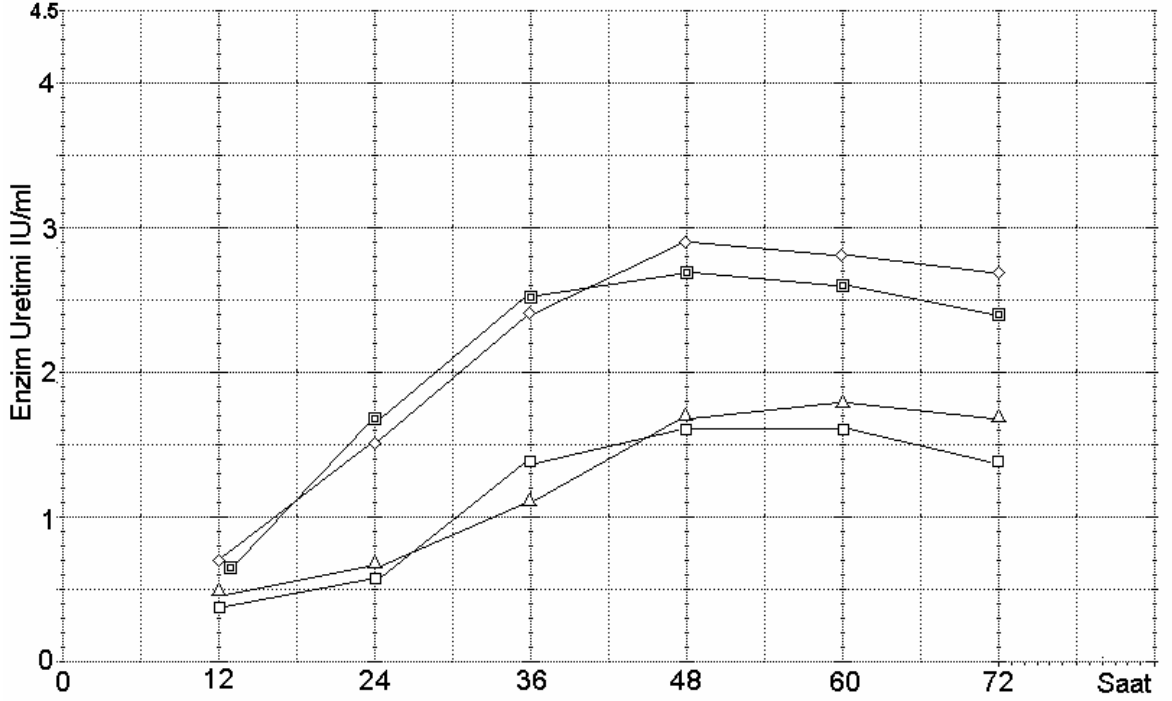
Ag2 izolatının en yüksek ksilanaz üretimi 60–72. saatlerde BW- Ksilan substrat olarak kullanılarak 2,9 IU/ml olarak elde edilmiştir. İşlem görmüş Buğday samanı ile en yüksek ksilanaz üretimi 72. saatte 2,4 IU/ml olmuştur. Mısır koçanı ve Buğday kepeği substrat olarak kullanılarak sırası ile 60. ve 72. saatlerde 1,9 IU/ml'lik ksilanaz üretimi elde edilmiştir. Ag 2 izolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretim grafiği Şekil 4.15'de verilmiştir.



Substrat	sembol	Saat →	12	24	36	48	60	72	80
Ksilan ( BWX )	◇		0.7	0.9	1.3	2.5	2.9	2.9	2.7
Buğday samanı	▣			0.5	0.9	1.9	2.2	2.4	2.3
Buğday kepeği	△		0.4		0.8	1.6	1.9	1.8	1.9
Mısır koçanı	□		0.4	0.8	0.8	1.9	1.8	1.9	

Şekil 4.15. Ag2 izolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0,1$  ).

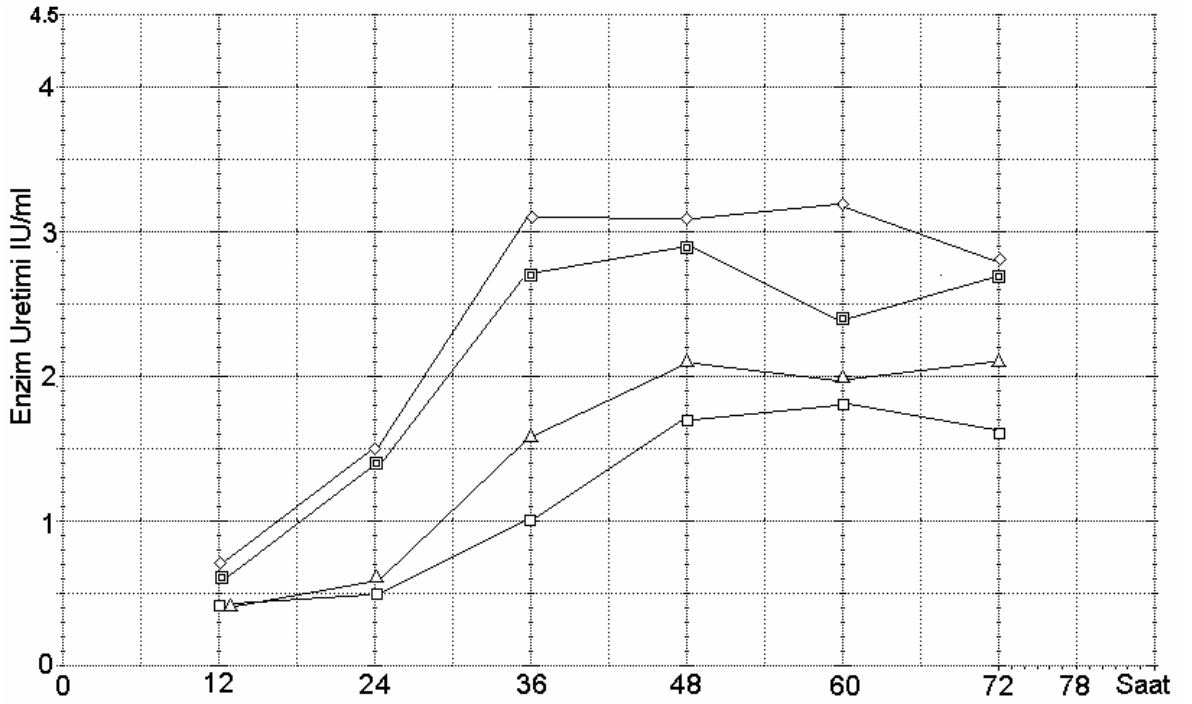
Ag8 izolatının en yüksek ksilanaz üretimi 48. saatte ve substrat olarak BW- Ksilan ile 3.2 IU/ml'lik enzim üretimi ile olmuştur. Buğday samanı ile en yüksek ksilanaz üretimi 2,7 IU/ml, Mısır koçanı substrat olarak kullanılarak ise 2,4 IU/ml olmuştur. Ag8 izolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretim grafiği Şekil 4.16'da verilmiştir.



Substrat	sembol	Saat →	12	24	36	48	60	72
Ksilan ( BWX )	◇		0.7	1.5	2.4	2.9	2.8	2.7
Buğday samanı	▣		0.6	1.7	2.5	2.7	2.1	2.4
Buğday kepeği	△		0.5	0.7	1.1	1.7	1.8	1.7
Mısır koçanı	□		0.4	0.6	1.4	1.6	1.6	1.4

Şekil 4.16. Ag8 izolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0,1$  )

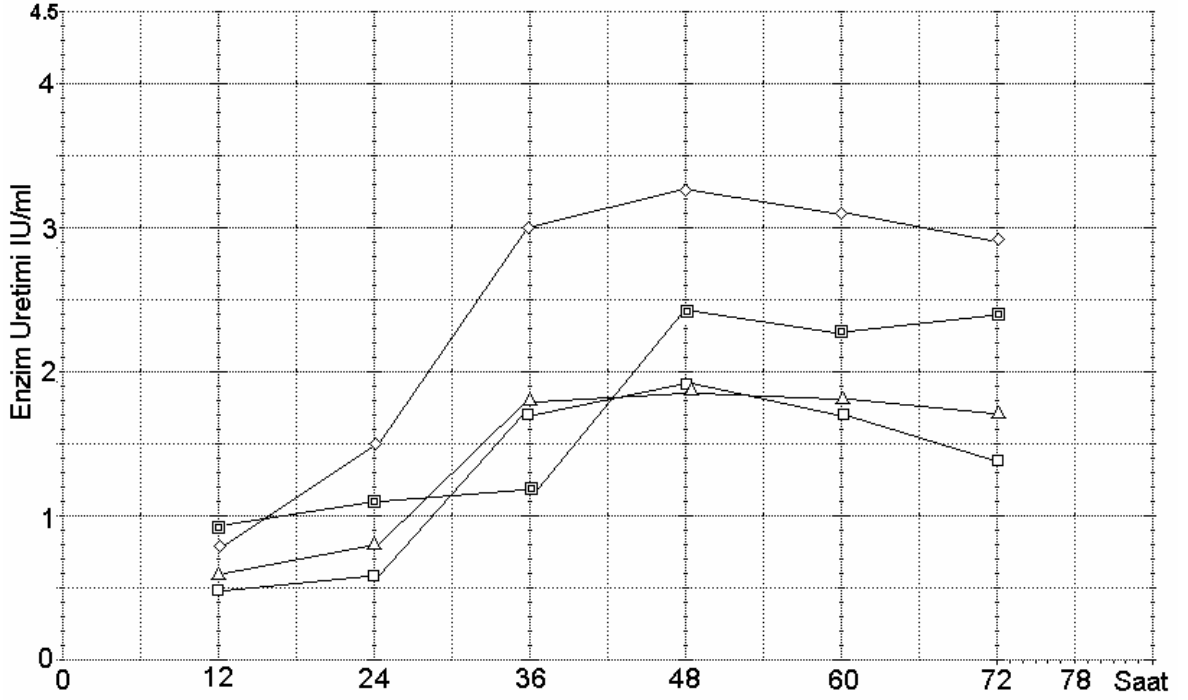
Ag12 izolatının en yüksek ksilanaz üretimi, 60. saatte ve BW- Ksilan ile 3,2 IU/ml'lik enzim üretimi ile olmuştur. Ancak 36. ve 48. saatlerdeki ksilanaz üretimleri de enzim miktarını ölçmekte kullandığımız DNS testinin yanılma payı içinde olan 0,1 IU/ml'lik daha düşük değer ile 60. saatte elde edilen ksilanaz üretim miktarına çok yakın olmuştur. Buğday samanı ile elde edilen ikinci en yüksek ksilanaz üretimi 48. saatte 2.7 IU/ml olarak elde edilmiştir. Buğday kepeği ile en yüksek ksilanaz üretimi 48. saatte 2.1 IU/ml olarak elde edilmiştir. En düşük ksilanaz üretiminin elde edildiği substrat olan Mısır koçanı kullanılarak maksimum ksilanaz üretimi 60. saatte 1.8 IU/ml olmuştur. Ag12 izolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretim grafiği Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.17. Ag12. izolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0,1$  )



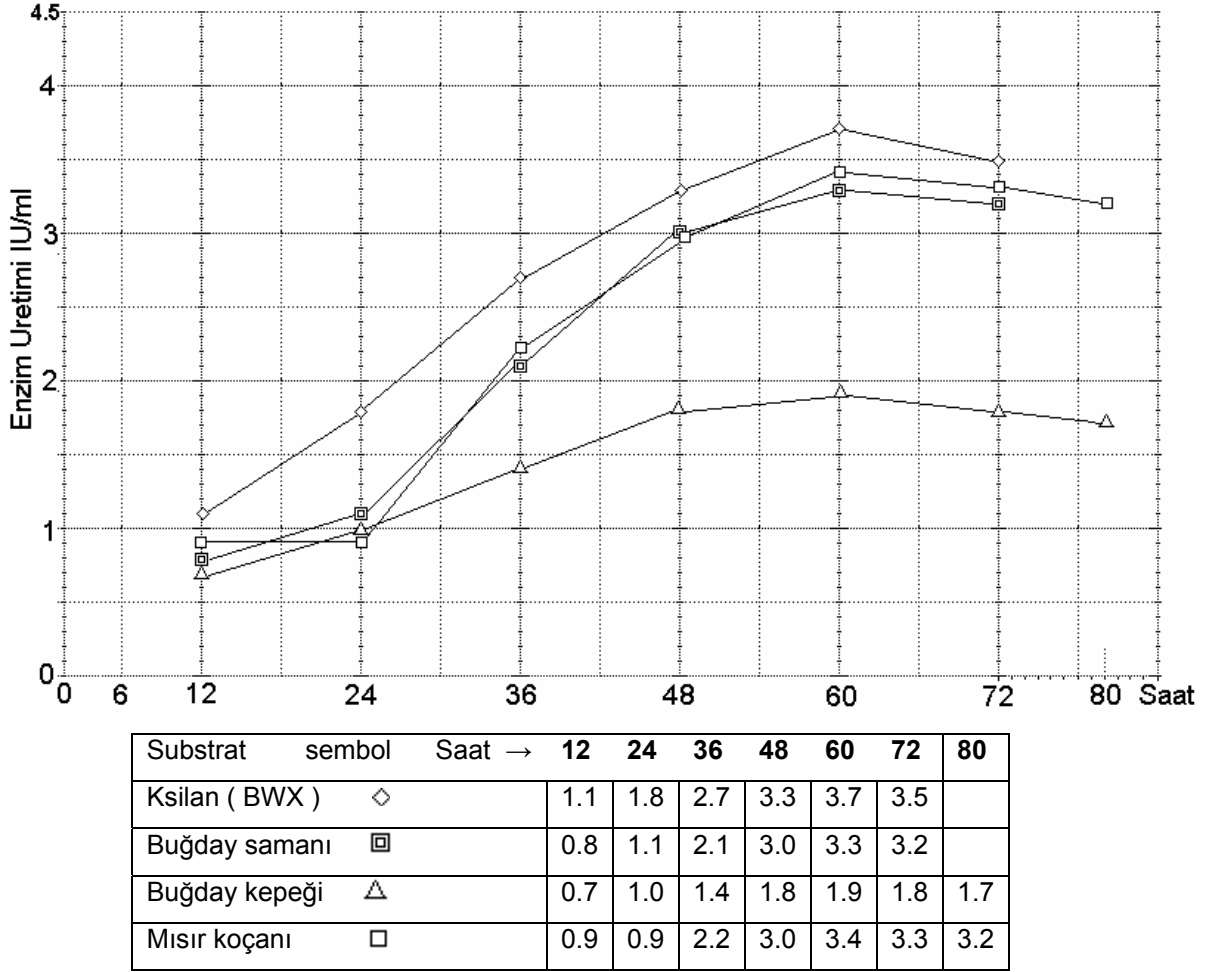
Ag13 izolatının en yüksek ksilanaz üretimi, 48. saatte ve BW- Ksılan ile 3.3 IU/ml'lik enzim üretimi ile olmuştur. Buğday samanı ile elde edilen ikinci en yüksek ksilanaz üretimi 48. saatte 2,4 IU/ml olarak elde edilmiştir. Buğday samanı için aynı enzim miktarı 72. saatte de elde edilmiştir. Daha düşük ksilanaz üretiminin elde edildiği substratlar olan Mısır koçanı ve Buğday kepeği kullanılarak maksimum ksilanaz üretimleri, 48. saatte maksimum olarak 1,9 IU/ml olmuştur. Ag13 izolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretim grafiği Şekil 4.18'de verilmiştir.



Substrat	sembol	Saat →	12	24	36	48	60	72
Ksılan ( BWX )	◇		0.8	1.5	3.0	3.3	3.1	2.9
Buğday samanı	▣		0.9	1.1	1.2	2.4	2.3	2.4
Buğday kepeği	△		0.6	0.8	1.7	1.9	1.9	1.7
Mısır koçanı	□		0.5	0.6	1.8	1.9	1.7	1.4

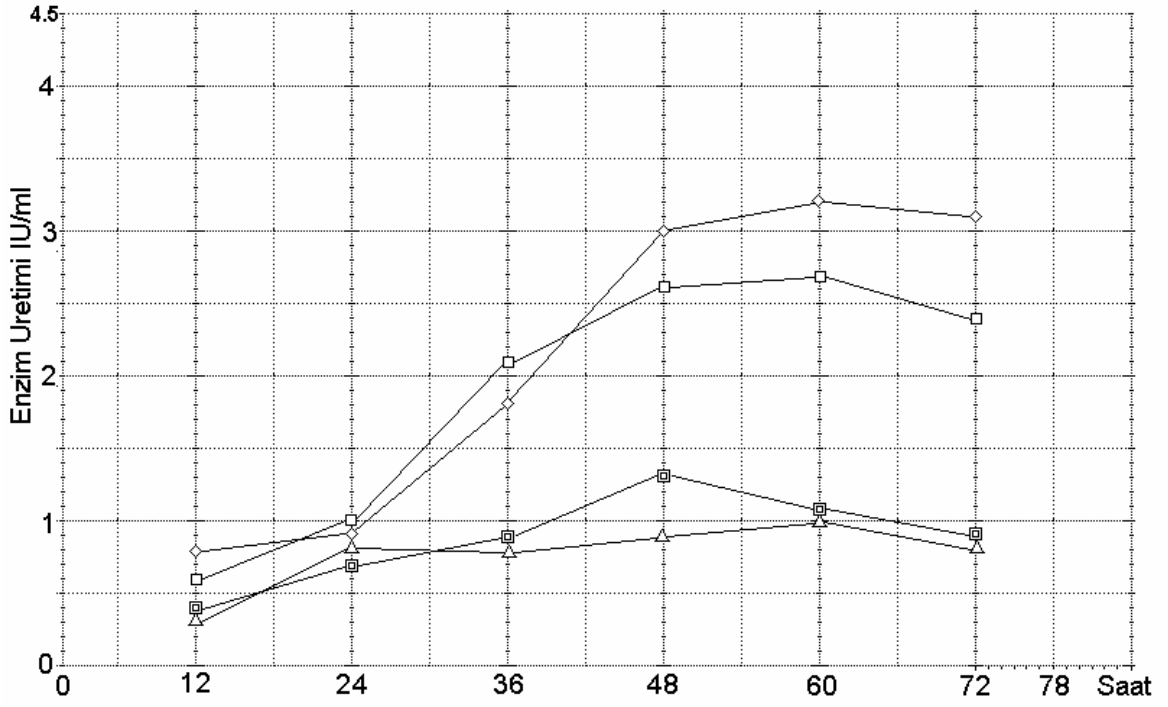
Şekil 4.18. Ag13 izolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0,1$  )

Ag20 izolatinın en yüksek ksilanaz üretimi, 60. saatte ve BW- Ksilan ile 3,7 IU/ml'lik enzim üretimi ile olmuştur. Mısır koçanı ile elde edilen ikinci en yüksek ksilanaz üretimi yine 60. saatte 3,4 IU/ml olarak elde edilmiştir. Buğday samanı için elde edilen en yüksek ksilanaz üretimi, Mısır koçanı ile elde edilen miktara çok yakın olarak 60. saatte ve 3.3IU/ml olarak elde edilmiştir. Daha düşük ksilanaz üretiminin elde edildiği buğday kepeği için en yüksek ksilanaz üretimi 60. saatte 1,9 IU/ml olmuştur. Ag20 izolatinın ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretim grafiği Şekil 4.19'de verilmiştir.



Şekil 4.19. Ag20 izolatinın ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0,1$  )

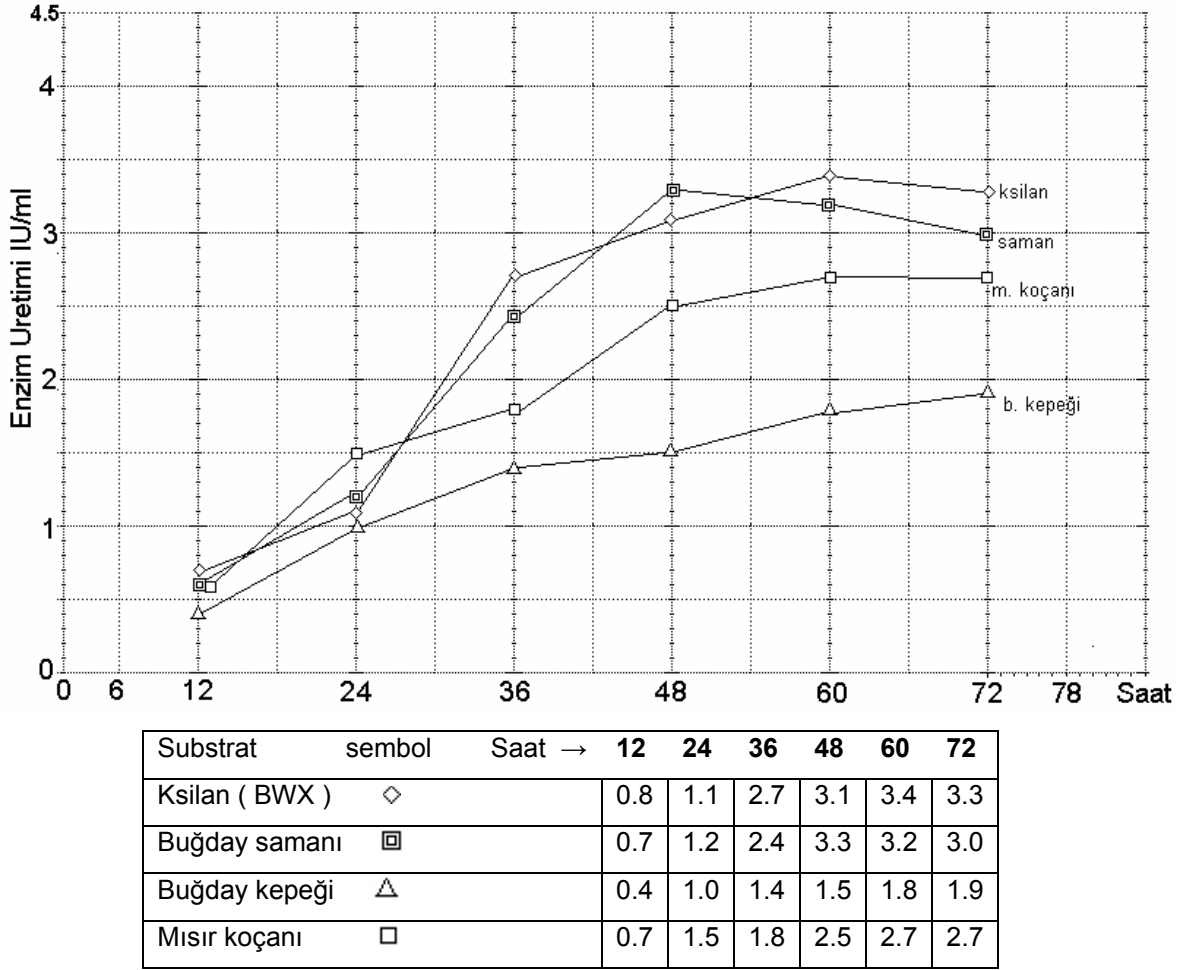
Ag32 izolatinın en yüksek ksilanaz üretimi, 60. saatte ve substrat olarak BW-Ksilan ile 3,2 IU/ml'lik enzim üretimi ile olmuştur. Mısır koçanı ile elde edilen ikinci en yüksek ksilanaz üretimi yine 60. saatte 2,7 IU/ml olarak elde edilmiştir. Buğday samanı ve buğday kepeği ile en yüksek ksilanaz üretimleri sırası ile 48. saatte 1,3 IU/ml ve 60. saatte 1,0 IU/ml olarak düşük değerlerde elde edilmiştir. Ag32 izolatinın ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretim grafiği Şekil 4.20'de verilmiştir.



Substrat	sembol	Saat →	12	24	36	48	60	72
Ksilan ( BWX )	◇		0.8	0.9	2.1	3.0	3.2	3.1
Buğday samanı	▣		0.4	0.7	0.9	1.3	1.1	0.9
Buğday kepeği	△		0.3	0.8	0.7	0.9	1.0	0.8
Mısır koçanı	□		0.6	1.0	2.1	2.6	2.7	2.4

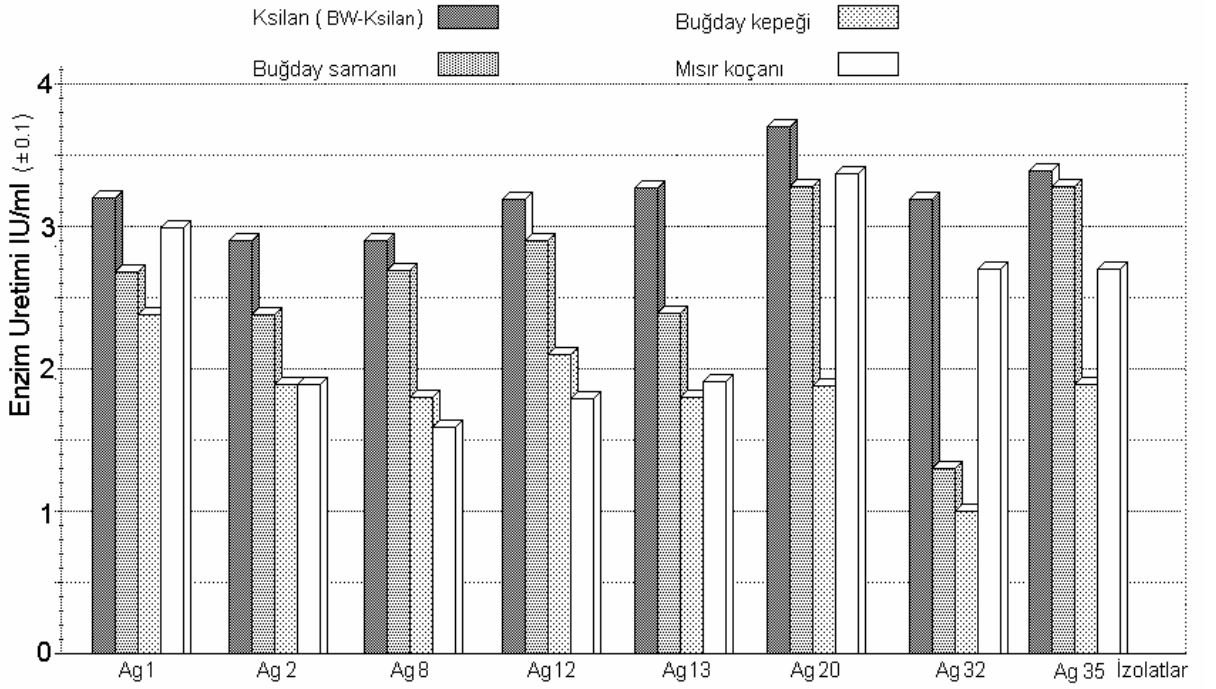
Şekil 4.20. Ag32 izolatinın ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0,1$  )

Ag35 izolatının en yüksek ksilanaz üretimi, 60. saatte ve BW- Ksilan ile 3,4 IU/ml'lik enzim üretimi ile olmuştur. Buğday samanı ile elde edilen ikinci en yüksek ksilanaz üretimi, BW-Ksilanın substrat olarak kullanılması ile elde edilenden 0,1 IU/ml'lik daha düşük değer ile 48. saatte 3.4 IU/ml olmuştur. Mısır koçanı ile en yüksek ksilanaz üretimi 60. ve 72. saatlerde 2,6 IU/ml olmuştur. En düşük ksilanaz üretiminin elde edildiği buğday kepeği ile en yüksek ksilanaz üretimi 72. saatte 1,9 IU/ml olarak elde edilmiştir. Ag35 izolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretim grafiği Şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.21..Ag35 izolatının ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretimi ( IU/ml,  $\pm 0.1$  )

Seçilmiş izolatlarımız olan Ag1, Ag2, Ag8, Ag12, Ag13, Ag20, Ag32, Ag35 ile ksilan ve bitkisel substratlar kullanılarak maksimum ksilanaz üretimleri Şekil 4.22'de topluca gösterilmiştir.



**Şekil 4.22.** Seçilmiş izolatların BW-ksılan ve bitkisel substratlarla maksimum ksılanaz üretimleri

Şekil 4.22'de görüldüğü gibi, incelenen izolatlarının hepsimde maksimum ksılanaz üretimi substrat olarak BW-ksılan ile elde edilmiştir. Bitkisel substratlardan en fazla ksılanaz üretimleri Ag20 izolatı hariç diğer izolatlar için buğday samanı ile gerçekleşmiştir. Ag20 izolatı ile bitkisel substratlardan en yüksek ksılanaz üretimi mısır koçanı ile elde edilmiştir. Mısır koçanı ve buğday kepeği ile ksılanaz üretimleri izolatlar arasında farklılık göstermiştir.

#### 4.5.3. Üretilen Ksılanaz Enziminin Optimum pH, Sıcaklık Değerleri ve Termal Stabilite Özellikleri

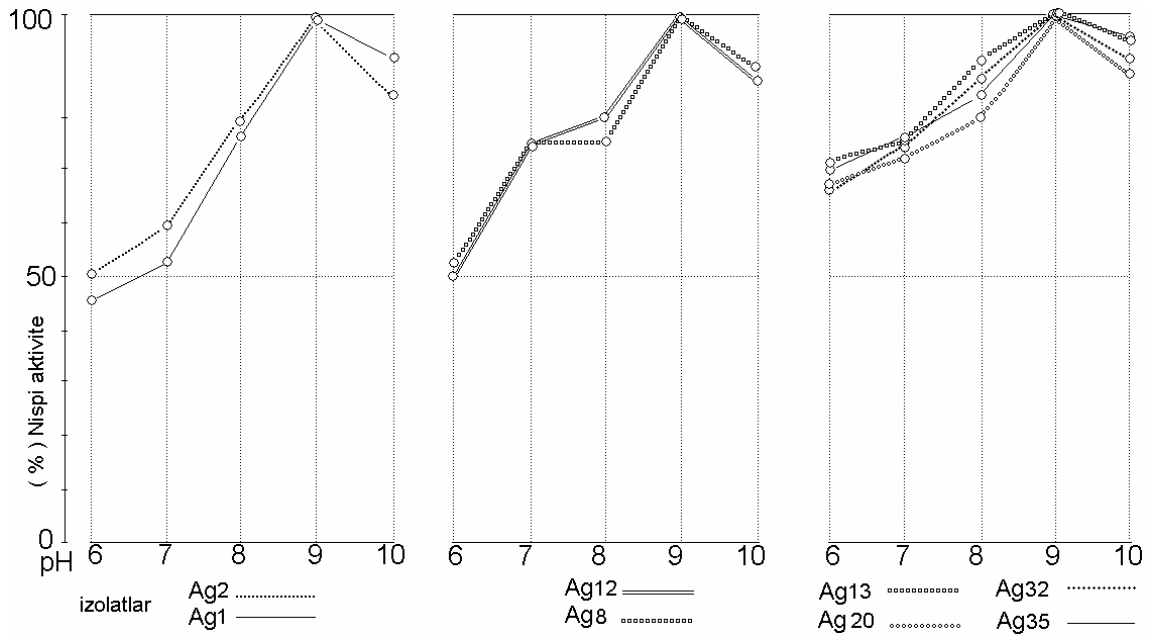
##### 4.5.3.1. Optimum pH Değerleri

İzolatların ksılanaz aktivitesi için optimum pH değerleri, DNS testinde, değişik tamponlarla değişik pH değerlerinde ( pH 6.0 – 10.0 ) hazırlanmış BW-ksılan substrat kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNS testinde enzim-substrat inkübasyonu 35°C'de gerçekleştirilmiştir. İzolatların ksılanaz aktivitesi için optimum pH' nın 9 olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelge 4.3'de verilen değerler kullanılarak, her izolat için en yüksek değerler %100 kabul edilerek hazırlanan, izolatlara ait ksılanaz preparatlarının değişik pH değerlerindeki % ksılanaz aktiviteleri, Şekil 4.23'de beraberce verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** İzolatların 35<sup>0</sup>C 'de optimum pH değerleri [(İU/ml ( ±0.1 )]

İzolat	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,0	pH 10,0
<b>Ag1</b>	2,3	2,6	2,8	3,4	3,0
<b>Ag8</b>	1,7	2,5	2,6	3,3	3,0
<b>Ag12</b>	2,0	3,0	3,2	4,0	3,5
<b>Ag13</b>	2,4	2,5	3,0	3,3	3,1
<b>Ag20</b>	2,6	2,8	3,0	3,6	3,3
<b>Ag32</b>	1,9	2,2	2,5	2,9	2,7
<b>Ag35</b>	2,3	2,4	2,7	3,2	3,0
<b>Ag2</b>	0,9	1,1	1,5	1,8	1,6

Her izolat için, ayrı, tek bir enzim örneği kullanılmıştır ( İU/ml ).



**Şekil 4.23.** İzolatların optimum pH değerleri. Nispi aktivite değerleri orantılı olarak çakıştırılmıştır.

#### 4.5.3.2. Optimum Sıcaklık ve 60<sup>0</sup>C'de Termal Stabilite Özellikleri

İzolatların DNS metodu ile pH 9.0 ve %1'lik ksilan substrat kullanılarak, değişik sıcaklıklar ve 5 dakikalık enzim-substrat inkübasyonu sonucunda belirlenen optimum sıcaklık değerleri Çizelge 4.4'da verilmiştir. Testlerde her izolatin Besiyeri 8'de ( FO1 ) besiyerindeki kültürlerine ait tek bir kültür filtrat örneği kullanılmıştır. Sonuçlara göre izolatlarımızın enzim aktiviteleri için optimum pH değeri kâğıt hamuru enzimatik ön işlemleri için çok uygun olan pH 9.0'dır.

**Çizelge 4.4.** İzolatlara ait kültür filtratlarının pH 9.0 ve değişik sıcaklıklarda belirlenen optimum sıcaklık özellikleri [(İU/ml ( ±0.1 )]

İzolat	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
<b>Ag1</b>	3.9	3.9	4.0	2.6	2.5
<b>Ag2</b>	0.3	0.3	0.4	0.3	0.2
<b>Ag8</b>	3.2	3.1	3.2	3.1	3.1
<b>Ag12</b>	2.1	2.7	2.8	2.7	2.5
<b>Ag13</b>	2.3	2.6	2.7	2.7	1.9
<b>Ag20</b>	2.4	2.6	2.7	2.3	2.2
<b>Ag32</b>	2.6	3.1	3.2	3.0	2.4
<b>Ag35</b>	2.2	2.8	2.7	2.7	2.6

İzolatların kültür süpernatantlarının optimum sıcaklık ve pH değerleri olduğu belirlenmiş olan 60°C sıcaklıkta ve pH 9'da değişik sürelerde bekletilmesi ile belirlenen termal stabilite değerleri Çizelge 4.5'de verilmiştir. Enzim aktiviteleri DNS metodu ile pH 9.0 ve %1'lik ksilan substrat kullanılarak 60°C'de belirlenmiştir. Testlerde her izolatın Besiyeri 8'de ( FO1) besiyerindeki kültürlerine ait 36. veya 48. saatlik tek bir kültür filtrat örneği kullanılmıştır. Sonuçlara göre Ag1 izolatu hariç, diğer izolatlarımızın enzim aktiviteleri 60°C'de bir saat sürede önemli bir kayba uğramamaktadır. Bu aşamada elde edilen sonuçlara göre Ag1 izolatu kâğıt hamuru işlemlerine uygun görülmemiştir.

**Çizelge 4.5.** İzolatlara ait kültür filtratlarının 60°C ve pH 9'da termal stabilite özellikleri İU/ml ( ± 0,1 )

Süre	5 dakika	25 dakika	45 dakika	60 dakika
İzolat	( IU/ml )	( IU/ml )	( IU/ml )	( IU/ml )
<b>Ag1</b>	4,0	3,8	3,4	2,35
<b>Ag2</b>	1,3	1,3	1,4	1,3
<b>Ag 8</b>	3,5	3,4	3,5	3,5
<b>Ag 12</b>	3,2	3,2	3,2	3,2
<b>Ag13</b>	2,8	2,8	2,8	2,8
<b>Ag20</b>	3,1	3,1	3,1	3,1
<b>Ag32</b>	2,1	2,1	2,0	2,1
<b>Ag35</b>	2,3	2,3	2,3	2,3

#### 4.5.4. Selülaz Aktivitelerinin DNS Metodu İle Belirlenmesi

İzolatlar a ait kültür filtratlarındaki selülaz aktiviteleri, DNS yöntemi ile tamponla pH 7,4 ve 9,0'a ayarlanmış %1'lik CMC substratları kullanılarak glukoz standartlarına karşı 60°C'de belirlenmiştir. Ayrıca, testte kullanılan kültür filtratlarının ksilanaz aktiviteleri de pH 9,0 ve 60°C'de, ksilan substrat ile ve ksiloz standartlar kullanılarak ölçülmüştür. Testlerde her izolatin Besiyeri 8'de ( FO1) besiyerindeki 36 veya 48 saatlik kültürlerine ait tek bir kültür filtrat örneği kullanılmıştır. İzolatların kültür filtratlarındaki selülaz aktivite değerleri, Çizelge 4.6'da verilmiştir. Tesler sonunda kültür filtratlarında selülaz aktivitesi belirlenen izolatlar DNS testi ile selülaz pozitif anlamında S<sub>d</sub> ( + ) olarak belirtilmiştir. Çizelge 4.6.'da verilmiş olan sonuçlara göre Ag2, Ag8 ve Ag35 izolatları S<sub>d</sub> ( + ) özellikte olup kâğıt hamuru işlemlerine uygun bulunmamışlardır. Ag12, Ag13, Ag20 ve Ag32 izolatları ise kâğıt hamuru işlemlerine uygun bulunarak seçilmişlerdir.

**Çizelge 4.6.** İzolatlar a ait kültür filtratlarında selülaz aktiviteleri. İU/ml ( ±0.1 )

İzolat	Ag 2	Ag 8	Ag 12	Ag 13	Ag 20	Ag 32	Ag 35
<b>Ksilanaz</b>	2.1	2.3	2.1	2.0	2.2	2.4	2.6
60°C, pH 9,0							
<b>Selülaz</b>	0.3	0.9	0	0	0	0	1,3
60°C, pH 7,4							
<b>Selülaz</b>	0.3 – 0,4	0.9	0	0	0	0	1.6
60°C, pH 9,0							
<b>Sonuç</b>	S <sub>d</sub> ( + )	S <sub>d</sub> ( + )	S <sub>d</sub> ( - )	S <sub>d</sub> ( - )	S <sub>d</sub> ( - )	S <sub>d</sub> ( - )	S <sub>d</sub> ( + )

S<sub>d</sub>, DNS testi ile selülaz aktivitesi

#### 4.5.5. Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Enzim Aktivitelerine Etkisi

%1, 5 ve 10 NaCl içeren, pH'sı tampon ile 9,0'a ayarlanmış %1'lik ksilan substratları kullanılarak, DNS testi ve CMC Agar plaklarında selülaz aktivitesi görülmeyen Ag12, Ag13, Ag20 ve Ag32 izolatları ile Ag8 ve Ag35 izolatların Besiyeri 8'de ( FO1) besiyerindeki kültürlerine ait tek bir kültür filtratı örneklerinin, DNS testi ile 60°C'deki ksilanaz aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre izolatlar a ait kültür filtratlarında en yüksek ksilanaz aktiviteleri %5'lik NaCl konsantrasyonunda gerçekleşmektedir. Ancak, %5'lik NaCl konsantrasyonu ile %1 ve %10 NaCl konsantrasyonlarındaki ksilanaz aktiviteleri arasındaki farkın önemsenmeyecek seviyede olduğu düşünülmüştür. İzolatlar a ait kültür filtratlarında değişik NaCl konsantrasyonlarındaki ksilanaz aktiviteleri. Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.



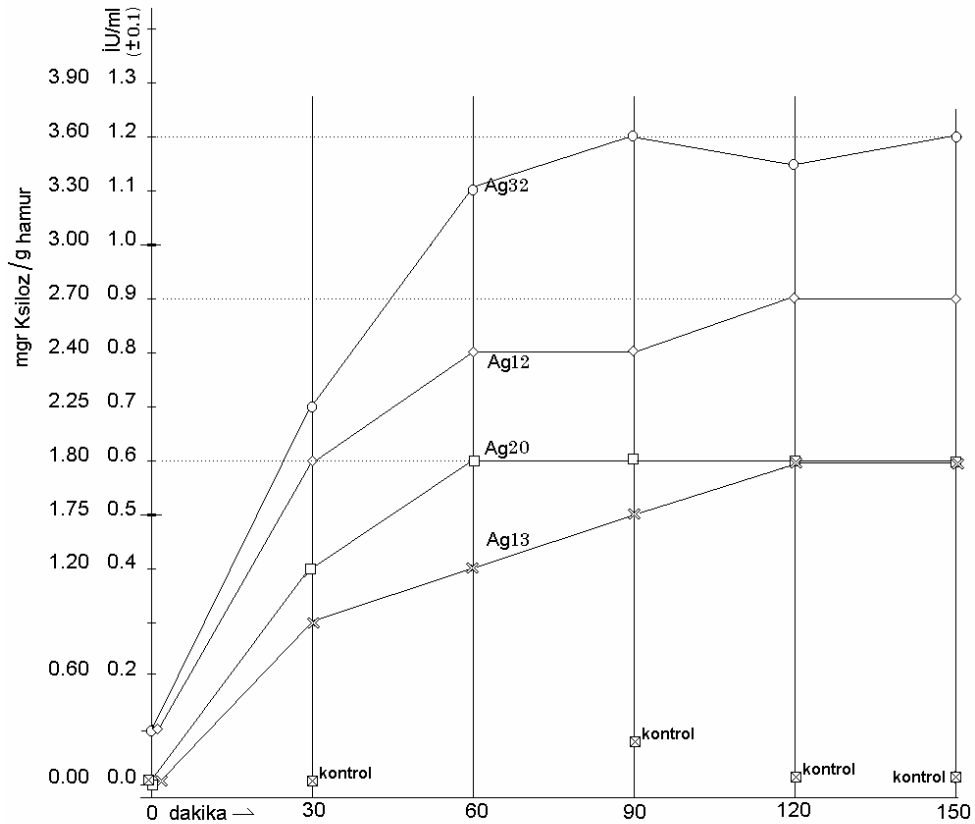
**Çizelge 4.7.** İzolatlara ait kültür filtratlarında değişik NaCl konsantrasyonlarındaki ksilanz aktiviteyi. İU/ml ( ± 0,1 )

İzolat	Ag8	Ag12	Ag13	Ag20	Ag32	Ag35
%1 NaCl	1.8	1.3	1.1	1.8	1.9	1.75
%5 NaCl	2.1	1.6	1.1	1.7	2.2	1.6
%10 NaCl	2.1	1.5	1.1	1.7	2	1.7

#### 4.5.6. Kâğıt Hamuru Denemeleri

##### 4.5.6.1. Enzimatik Ön İşlemin Optimizasyonu

DNS testi ile selüloz negatif oldukları belirlenen dört izolata ait enzim preparatlarının kâğıt hamuruna etkilerinin belirlenmesi için ilk olarak izolatlara ait kültür filtratları ile Khandeparkar and Bhosle ( 2006 )'ya benzer şekilde, uygulanacak enzimatik ön işlemin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon işlemi pH 9,0, 60°C, 10 IU enzim/g fk-hamur, %5 fk-Hamur şartlarında gerçekleştirilmiştir. Belli süreler için İU/ml olarak elde edilen şeker miktarı değerleri aşağıdaki formüle göre, hamurun gramı başına açığa çıkan mg cinsinden şeker değerlerine dönüştürülmüştür. Zamana karşı kâğıt hamurunun gramı başına açığa çıkan şeker grafiği Şekil 4.24'de verilmiştir.



**Şekil 4.24.** İzolatlara ait enzim preparatları ile zamana karşı kâğıt hamurunun gramı başına açığa çıkan şeker miktarları

İzolatlar için enzim preparatları için, Şekil 4.24'de verilmiş olan zamana karşı kâğıt hamurunun gramı başına açığa çıkan şeker sonuçlarına göre 1–1,5 saatlik süre, pH 9,0, 60°C, 10 IU enzim/g fk-hamur uygulama şartlarında enzimatik işlem için yeterlidir. Enzimatik ön işlemin optimizasyonu ile aynı şartlarda işleme tabi tutulan bir diğer denemede deneme sonunda, işlemde kullanılmış olan kâğıt hamurları distile su ile yıkayıp süzöldükten sonra, aynı izolatlar için taze enzim preparatları kullanılarak, yine aynı şartlarda tekrar işleme tabi tutulmuştur. Ancak, izolatların hiç biri için kâğıt hamurundan 0,2 IU/ g fk-hamur miktarına denk gelenden fazla şeker açığa çıkışı belirlenmemiştir. Bu nedenle, uygulanan şartlarda ilk 120 dakika sonrasında izolatlar için enzim preparatlarının kâğıt hamuru üzerinde daha fazla bir etkisinin olmadığı teyit edilmiştir. Bu şekilde gerçekleştirilen optimizasyon işlemi ile, yapacağımız enzimatik işlemin enzim miktarı ve süre açısından yeterliliği incelenmiş ve işlem şartlarının uygun olduğu belirlenmiştir. Bu aşamada Ag 12, Ag 20 ve Ag 32 izolatları sonraki kâğıt hamuru enzim ön işlemleri, beyazlık ve kappa sayısı ölçüm işlemleri için seçilmişlerdir.

#### 4.5.6.2. Kromofor Salınımının Belirlenmesi

İzolatlar için kültür filtratları kullanılarak yapılan enzimatik ön işlemin optimizasyonu bitiminde, her izolat için, işlem sonu filtratlarında bulunan lignin temelli fenolik bileşiklerin yoğunluğu 237 nm'de, hidrofobik bileşiklerin yoğunluğu 465 nm'de Absorbans ölçülerek belirlenmiştir. Kör olarak enzim işlemi görmeden aynı işlemden geçmiş kâğıt hamurundan elde edilen süzöntü kullanılarak spektrofotometrede Absorbans ön sıfırlaması yapılmıştır. Elde edilen kromofor salım sonuçları Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. İşlem, bilgi edinmek amacıyla, kâğıt beyazlatma denemesinde kullanılmak üzere seçilmemiş olan Ag8, Ag 13, Ag 35 izolatları içinde gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4.8.** Değişik izolatlarımıza ait kromofor salım sonuçları

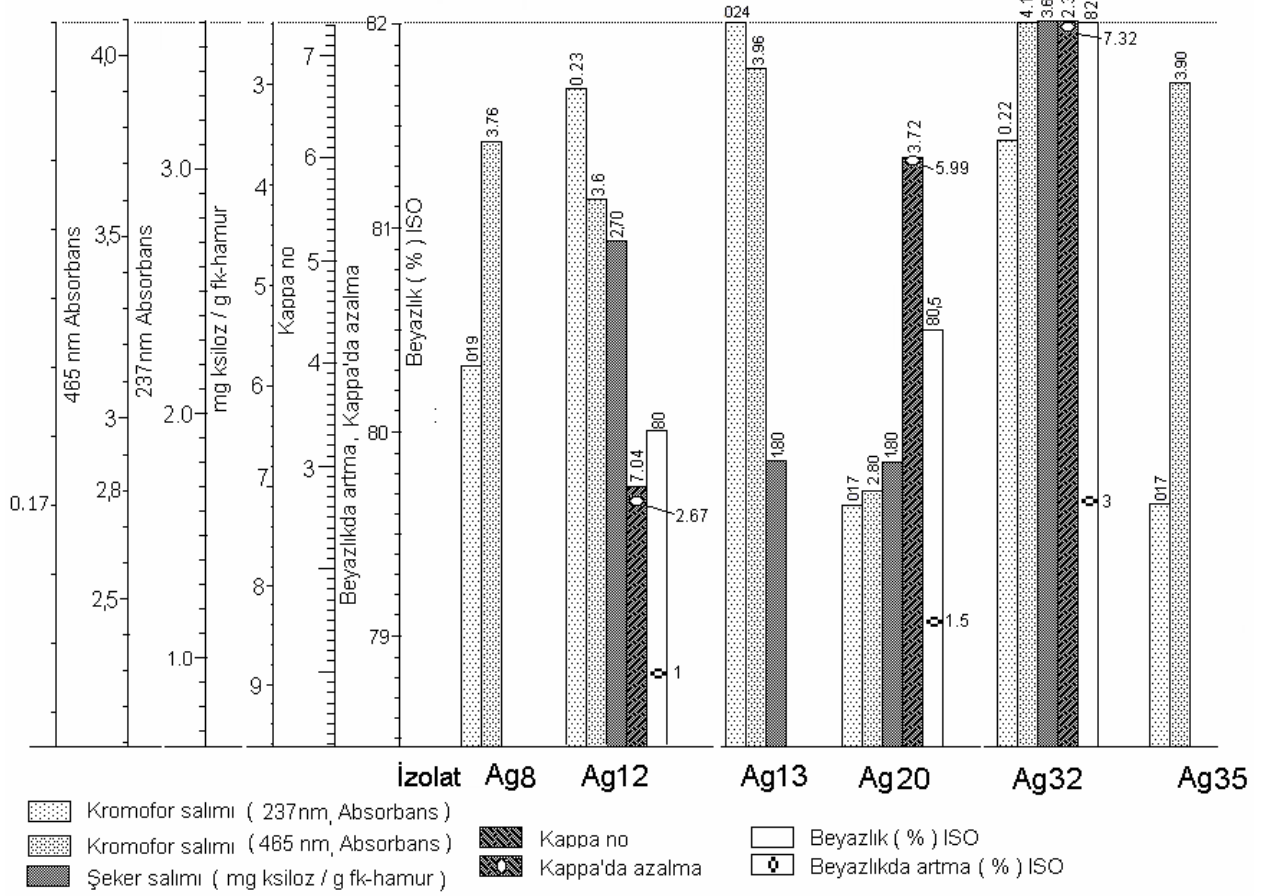
İzolat	237 nm'de absorbans	465 nm'de absorbans
<b>Ag8</b>	3.76	0,19
<b>Ag12</b>	3,6	0,23
<b>Ag 13</b>	3.96	0,24
<b>Ag 20</b>	2.80	0.17
<b>Ag32</b>	4.1	0.22
<b>Ag 35</b>	3.90	0.17

En yüksek beyazlık ve kappa sayısı düşüğe elde edilen Ag32 izolatı ile 237 nm'de 4.1 Absorbans ile, diğer izolatlarla kıyaslandığında en yüksek, 465 nm'de 0,22 Absorbans değeri ile ikinci en yüksek değer olmuştur.

#### 4.5.6.3. Enzimatik Ön İşlemlerin Kappa Sayısı ve Beyazlık Üzerine Etkisi

Seçilmiş izolatlara ait enzim preparatları ile kâğıt hamuru enzimatik ön işlemlerinin beyazlık ve kapa sayısı üzerine etkisi belirlenmiştir. Bunun için ilk olarak kâğıt hamurları pH 9,0, 60°C, 10 IU enzim/g fk-hamur, %5 fk-Hamur şartlarında 120 dakikalık ön beyazlatma işlemine alınmıştır. Daha sonra kâğıt hamurları kimyasal beyazlatma işlemine alınmıştır. En son olarak kappa sayısı ölçümleri ve kâğıt hamurlarının kâğıt haline getirilmeleri sonrasında beyazlık değerleri ölçülmüştür. Kontrol olarak, enzim kullanmadan enzimatik işlemlerdeki şartlardan geçirilmiş kâğıt hamuru kullanılmıştır. Hiç bir işlemde geçmemiş kâğıt kraft hamurunun kappa ve beyazlık değerleri de ayrıca ölçülmüştür.

Kappa testinde, sonuçların hesaplanabilmesi için gereken ve kâğıt hamuru kullanılmadan yapılan boş denemede harcanan tiosülfat miktarı 64,25 ml bulunmuştur. Denemede kullanılan işlem görmemiş Çaycuma kraft kâğıdının kappa no'su 19.93, beyazlığı 51 olarak ölçülmüştür. Kontrol olarak işlemde geçirilen kâğıt hamurunun kappa no'su 9.71, beyazlığı 79 olarak ölçülmüştür. Enzim preparatları kullanılan Ag12, Ag 20 ve Ag32 izolatları için elde edilen kappa değerleri sırası ile 7.04, 3.72 ve 2.39, elde edilen beyazlık değerleri de, yine sırası ile, 80, 80,5 ve 82 olmuştur. Ag32 izolatu ile en yüksek kappa sayısı düşüşü ve beyazlık artışı elde edilmiştir. Ag12, Ag 20 ve Ag32 izolatları ile kontrole göre kappa sayısı düşüşleri sırası ile, 2.67, 5.99 ve 7.32 olmuştur. Beyazlık artışları ise yine sırası ile, % 1, 1.5 ve 3 olmuştur. Ag32 izolatu ile karşılaştırıldığında, Ag12, Ag 20 izolatları ile elde edilen kappa sayısı düşüşü ve beyazlık artışı değerleri daha düşüktür. Çizelge 4.9'da Kâğıt hamuru enzimatik ön işlemlerinden elde edilen Kapa sayısı ve beyazlık değerleri gösterilmiştir. Şekil 4.25'de Kâğıt hamuru işlemleri sonucu elde edilen kromofor salımı, şeker salımı, kappa ve beyazlık değerleri, en yüksek değerler %100 olarak alınıp karşılaştırılarak beraberce gösterilmiştir.



**Şekil 4.25.** Kâğıt hamuru işleme sonuçlarının beraber gösterimi

En yüksek değerler %100 olarak alınıp karşılaştırılarak gösterilmiştir. Kâğıt beyazlatma işlemlerinde kullanılmak için seçilmeyen izolatlar için sadece kromofor salım sonuçları gösterilmiştir.

**Çizelge 4.9.** Kâğıt hamuru enzimatik ön işlemlerinin kapa sayısı ve beyazlıkları üzerine etkisi

Ham kâğıt ( Beyazlatılmamış )	Ham kâğıt ( Beyazlatılmış ) ( Kontrol )	Enzimatik ön işlem görmüş ve Beyazlatılmış kâğıt	Enzimatik ön işlem görmüş ve Beyazlatılmış kâğıt	Enzimatik ön işlem görmüş ve Beyazlatılmış kâğıt	
-	-	<b>Ag12</b>	<b>Ag 20</b>	<b>Ag 32</b>	Enzimatik ön işlem ( izolat )
3.751 g 28.5 ml	3.7565 g 45.5 ml	3.7600 g 51.00 ml	3.7575 g 57.25 ml	3.7590 g 59.75 ml	K. hamur ( g ) Harcanan tiosülfat ( ml )P <sup>a</sup>
$a = \frac{(64.25 - 28.5) \times 0.2}{0.1}$	$a = \frac{(64.25 - 45.5) \times 0.2}{0.1}$	$a = \frac{(64.25 - 51.0) \times 0.2}{0.1}$	$a = \frac{(64.25 - 57.25) \times 0.2}{0.1}$	$a = \frac{(64.25 - 59.75) \times 0.2}{0.1}$	a sayısı hesaplama
a 71.5 d 1.046	a 37.5 d 0.973	a 26.05 d alınmadı	a 14.0 d alınmadı	a 9.0 d alınmadı	a değeri d değeri
<b>19.93</b>	<b>9.71</b>	<b>7.04</b>	<b>3.72</b>	<b>2.39</b>	<b>Kappa No</b>
	10.22 <sup>b</sup>	2.67	5.99	7.32	Kappa'da azalış ( Kontrol'den fark )
<b>51</b>	<b>79</b>	<b>80</b>	<b>80.5</b>	<b>82</b>	Beyazlık ( % İSO )
	51	64	82	88	Delignifikasyon etkinliği ( % )

<sup>a</sup>, kâğıt hamuru kullanılmadan yapılan boş denemede harcanan tiosülfat miktarı 64.25 ml'dir.; <sup>b</sup>, Beyazlatılmamış ham kâğıt hamuru ile fark.

Delignifikasyon etkinliği, Duarte et al. ( 2003 )'e göre [ ( başlangıç kapa no - final kapa no ) / başlangıç kapa no ] formülüne göre hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1'e göre, kapa no'ları belirlenirken 30'dan daha düşük a değerleri için d düzeltme faktörü kullanılmamıştır.

#### 4.5.7. İzolatların Tanılanması

##### 4.5.7.1. Morfolojik ve Biyokimyasal Testler

Çizelge 4.10'da Seçilmiş izolatlara ait biyokimyasal test sonuçları verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** Seçilmiş izolatların biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri

Özellikler	İzolatlar							
	Ag1	Ag2	Ag8	Ag12	Ag13	Ag20	Ag32	Ag35
Gram ( + ) sporlu basil	+	+	+	+	+	+	+	+
%0 NaCl'li NA'da gelişme <sup>a</sup>	+	- / çz	+	+	+	+	-	-
%2.5 NaCl'li NA'da gelişme <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
%5 NaCl'li NA'da gelişme <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
%10 NaCl'li NA'da gelişme <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukozdan asit oluşturma	+	- <sup>b</sup>	+	+	+	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	+
Glukozdan gaz oluşturma	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitolden asit oluşturma	+	-	+	+	+	+	+	+
Laktozdan asit oluşturma	-	-	-	-	-	-	-	-
Ksilozdan asit oluşturma	+	-	+	+	+	+	+	-
TSİ – asit	+	-	+	+	- / çz	-	-	-
TSİ – H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-
Nişasta hidrolizi	-	-	- / çz	-	- / çz	+	+	+
Kazein hidrolizi	-	-	-	-	-	-	-	-
Lesitinaz	-	-	-	-	-	-	-	-
Tirozin hidrolizi	-	-	-	-	-	-	-	-
triptofandan İndol oluşturma	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat kullanımı	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	çz	çz	-	+	-	-
VP	+	+	çz	çz	-	+	-	-
Nitrat indirgenmesi	-	+	-	+	-	-	-	+
Jelatinaz	+	+	+	-	+	-	+	- <sup>g</sup>
Thioglukolat broth'da gelişme	üstte	üstte	üstte	üstte	üstte	üstte	üstte	üstte
Oksidaz	+	-	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 10'da gelişme <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
55°C'de gelişme <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
50°C'de gelişme <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+

Kullanılan semboller. çz, çok az veya belirsiz; -, negatif; +, pozitif; <sup>g</sup>, gelişme var; <sup>a</sup>, Besiyeri 6'da. <sup>b</sup>, vişne rengi, alkali; <sup>c</sup>, zayıf asit, portakal rengi.

İzolatlarımızın hepsi 55°C'de gelişme, sitrat kullanımı, triptofandan indol oluşturma, kazein ve tirozin hidrolizi, lesitinaz, TSİ besiyerinde H<sub>2</sub>S oluşturma, glukozdan gaz ve Laktozdan asit oluşturma bakımından negatiftir. İzolatlarımızın pH'sı 8.5 olan NA ortamında en iyi geliştiği tuz konsantrasyonları %2,5–5 NaCl olarak gözlenmiştir. İzolatlarımızın hepsi %2,5–10 NaCl içeren NA'da gelişme açısından pozitifdir. Ancak, Ag2, Ag32 ve Ag35 izolatları NaCl içermeyen NA'da gelişememeleri ile diğer beş izolattan farklıdır. Ag2 izolatu, diğer izolatlardan farklı olarak oksidaz negatiftir. İzolatlarımızın hepsi laktozdan asit oluşturmamaktadır. Ag2, izolatu diğer izolatların tersine mannitolden asit oluşturmamıştır. Besiyeri 17 'de seçilmiş izolatların hepsinin hareketli olduğu belirlenmiştir.

#### 4.5.7.2. İzolatların Taksonomik Pozisyonlarının Değerlendirilmesi

İzolatlarımızın genus düzeyinde tanımlanması Çizelge 4.11'de standart genuslar için verilmiş karakterlerden faydalanarak Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'ye ( Holt 1994 ) göre yapılmıştır.

**Çizelge 4.11.** Endospor oluşturan Gram pozitif bakteri genuslarının ayrımı ( Holt 1994 ).

Genus	Test karakterleri									
	<i>Bacillus</i>	<i>Amphibacillus</i>	<i>Sulfidobacillus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Sporolactobacillus</i>	<i>Sporohalobacter</i>	<i>Desulfomaculatum</i>	<i>Oscillospira</i>	<i>Sporosarcina</i>	<i>Syntrophospora</i>
Endospor oluşturma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Basil ( genç kültürde )	+	+	+	+	+	+	+	+ <sup>b</sup>	—	+
Kok ( tetrat-paket )	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Gran + boyanma <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
Hücr çapı 2,5 µm'dem büyük	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Flament oluşturma	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Sıki anaerobik	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
Sıki aerobik	D	-	+	-	-	-	-	B	-	-
Fakültatif anaerobik	D	+	-	-	+	-	-	B	+	-
Oksidaz	D	- <sup>k</sup>	B	-	B	-	B	B	+	B
Katalaz	+	-	B	-	-	-	-	B	+	B
Haraketlilik	+	+	-	+	+	+	+	+	+	B
Glukozdan asit oluşturma <sup>c</sup>	+	+	B	D	+	+	-	B	-	B
Nitrat indirgenmesi	D	-	B	D	-	B	B	B	D	B
Sülfattan sülfite oluşturma	-	B	-	-	-	B	+	B	-	-
Gelişme için en az % 3-12 tuz gereksinimi	D	-	-	-	-	+	-	-	D	-

B, belirlenmemiş; D, değişici; a, en azından genç kültürde; b, disk şeklinde hücreler ve kültürü yapılamamış; k, kesin; + ; %90 veya daha fazla oranda strain pozitif; - , %90 veya daha fazla oranda strain negatif. Ayırt etme açısından önemli görülen bazı karakterler koyu gösterilmiştir.

Çizelge 4.11'de standart genuser için verilmiş karakterlerden faydalanarak, izolatlarımızın *Bacillus* genusu üyesi olduğu sonucuna varılmıştır.

Sneath ( 1986 )'a göre *Bacillus* genusu üyesi olduğu belirlenen seçilmiş izolatlarımız yer aldıkları muhtemel türlerin belirlenmesi için, izolatlara ait morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları ilgili literatürler ışığında değerlendirilmiştir.

Priest ve Alexander ( 1988 )'den *Bacillus aneurinilyticus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. apiarius*, *B. azotoformans*, *B. badius*, *B. carotarum*, *B. cascainensis*, *B. circulans sensu stricto*, *B. cereus sensu stricto.*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flexus*, *B. fusiformis*, *B. kaustophilus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. psychrophilus*, *B. pumilis*, *B. simplex*, *B. smithii*, *B. sphaericus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis ssp. subtilis*, *Brevibacillus brevis*, *B. laterosporus*, *Paenibacillus pabuli*, *P. alvei*, *B. macerans*, *B. amylolyticus*, *B. polymyxa*, *B. thiaminolyticus*, *B. larvae ssp. Pulvifaciens*, *Virgibacillus pantothenicus* olmak üzere 33 takson; *Bergey' Manual of Systematic Bacteriology*'den ( Sneath 1986 ) *B. fastidious*, *B. globisporus*, *B. lentimorbus*, *B. mycoides*, *B. pasteurii*, *B. papilliae*, *B. pantothenicus*, *B. subtilis*, *B. marinus*, *B. circulans*, *Paenibacillus larvae* olmak üzere 11 takson; Fritze et al. ( 1990 )'den tip strain'leri olan *B. alkalophilus* DMS485, *B. circulans* DMS11, *B. marinus* DMS1297, *Bacillus* genusu türleri ve yakın taksonlar olarak alınmıştır. Bu taksonlar ve seçilmiş sekiz izolatımız, Çizelge 4.10'da de verilmiş olan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri açısından Minitab programı ( sürüm 13.20, Minitab Inc. 2000 ) kullanılarak, kısım 3.2.13'de belirttiğimiz şekilde istatistiksel analize alınmış ve 'Correlation Coefficient Distance, Single Linkage % benzerlik dendogramı şekillendirilmiştir.

Ancak ilk oluşturulan dendrogramda çok sayıda *Bacillus* taksonu yer aldığı için, seçilmiş izolatlarımıza en yakın olarak bulunan 9 *Bacillus* taksonu olan *Bacillus alkalophilus*, *B. firmus*, *B. globisporus*, *B. subtilis*, *sphaericus*, *B. pumilis*, *B. pastouri*, *B. lentus*, *Paenibacillus alvei* ile bunlar arasında yer alan *B. alkalophilus* ve *B. circulans* ve *B. subtilis* türlerine diğer örnekler olarak *B. alkalophilus* DMS2528, *B. alkalophilus* 4851 ve *B. circulans* DMS11 ( Fritze et al.. 1990 ) ve *B. subtilis ssp. Subtilis* ( Priest and Alexander 1988 ) eklenerek, seçilmiş izolatlarımızla beraber Çizelge 4.12'de verilen yeni bir matriks oluşturulmuştur. En son olarak değerler, aynı şekilde beraberce programa işlenerek % benzerlik dendogramı şekillendirilmiştir.



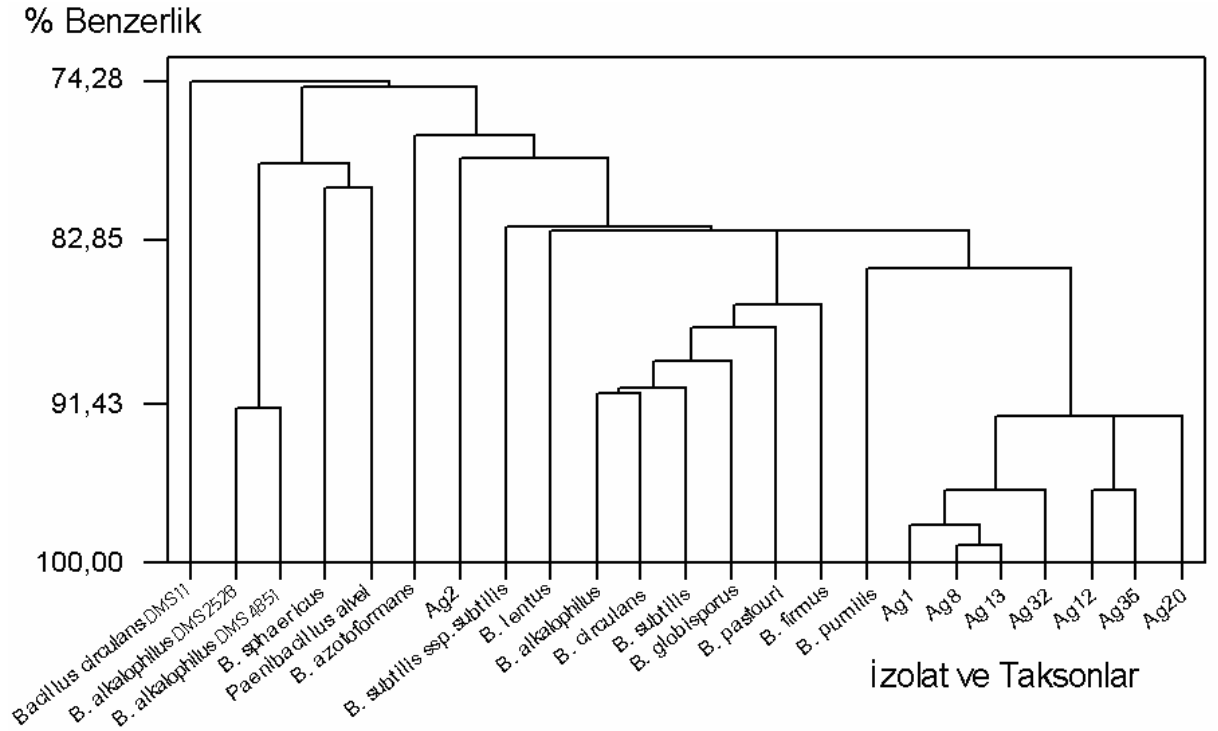
Çizelge 4.12. İzolatların daha ileri seviyede tanımlanmasında kullanılan karakterler

Özellikler	Tanımlanmış türler														Acıgöl izolatları									
	<i>Bacillus alkalophilus</i> <sup>a</sup>	<i>B. alkalophilus</i> DMS485 <sup>b, t</sup>	<i>B. alkalophilus</i> DMS2528 <sup>b</sup>	<i>B. azotoformans</i> <sup>a</sup>	<i>B. circulans</i> <sup>a</sup>	<i>B. circulans</i> DMS11 <sup>b, t</sup>	<i>B. firmus</i> <sup>a</sup>	<i>B. globisporus</i> <sup>a</sup>	<i>B. subtilis</i> <sup>c</sup>	<i>B. subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> <sup>a</sup>	<i>B. sphaericus</i> <sup>a</sup>	<i>B. pumilus</i> <sup>a</sup>	<i>B. pastourei</i> <sup>a</sup>	<i>B. lentus</i> <sup>a</sup>	<i>Paenibacillus alvei</i> <sup>a</sup>	Aa 1	Aa 2	Aa 8	Aa 12	Aa 13	Aa 20	Aa 32	Aa 35	
Boy > 3 µm	0	1	1	0	0	1	2	1	1	2	0	2	1	0	0	2	0	2	2	2	2	2	2	2
Spor oval	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	0	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Spor sentral	1	1	1	0	1	1	2	1	1	2	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glukozdan gaz oluşturma	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glukozdan asit oluşturma	2	2	2	0	2	1	2	1	2	1	0	2	1	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2
Laktozdan asit oluşturma	1	1	1	0	2	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mannitolden asit oluşt.	2	0	0	0	2	0	2	1	2	1	0	2	1	2	0	2	0	2	2	2	2	2	2	2
Ksilozdan asit oluşturma	1	0	2	0	1	2	0	1	1	2	0	2	1	0	0	2	0	2	2	2	2	2	2	2
Nişasta hidrolizi	2	1	1	0	2	2	2	1	2	2	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
Kazain hidrolizi	2	2	2	0	1	0	2	1	2	2	2	2	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tirozin hidrolizi	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jelatin hidrolizi	2	2	2	0	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	0	2	0	2	0	0
Lesitinaz ( egg yolk )	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sitrat kullanma	0	1	1	0	1	1	0	1	2	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
İndol oluşturma	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Voges-Proscauer	0	1	1	0	1	1	0	1	2	2	0	2	0	0	2	2	2	1	0	0	2	0	0	0
Nitrat redüksiyonu	0	0	0	2	1	1	0	1	2	2	0	0	1	2	0	0	2	0	2	0	0	0	0	2
%10 NaCl'de gelişme	1	0	0	1	1	0	1	1	1	2	0	2	1	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2
%5 NaCl'de gelişme	1	0	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
45 <sup>0</sup> C'de gelişme	1	0	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Anaerobik gelişme	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oksidaz	1	1	1	2	0	1	0	1	1	0	2	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Katalaz	1	1	1	0	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2

2, % 80-99 strain için pozitif karakterler; 0, % 20 yada daha az strain için pozitif karakterler; 1, verilmemiş veya değişken karakterler. Acıgöl izolatları için 2, pozitif; 0, negatif; 1, zayıf pozitif. <sup>t</sup>, tip strain'i; <sup>a</sup>, Priest and Alexander ( 1988 ) 'den; <sup>b</sup>, Fritze et al. ( 1990 ) 'den; <sup>c</sup>, Sneath ( 1986 ) 'den.

Benzerlikleri veren dendrogram, Minitab programı (versiyon 13.20, Minitab Inc., 2000) kullanılarak izolatlarımıza en yakın bulunan 11 *Bacillus* takson'unu ve Fritze ve ark. (1990)'den alınan numaralı suşlar ve Acıgöl izolatlarımıza ait karakterler kullanılarak oluşturulmuştur.

İzolatlarımız ve izolatlarımıza yakın bulunmuş olan literatürde belirtilmiş türlere ait Çizelge 4.12 'de verilmiş olan matris, Minitab programı kullanılarak istatistiksel analize alınmış ve 'Correlation Coefficient Distance, Single Linkage'% benzerlik dendogramı şekillendirilmiştir. Oluşturulan benzerlik dendogramı Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.26. *Bacillus* türleri ile seçilmiş izolatların % benzerlik dendogramı

**Çizelge 4.13.** *Bacillus* türleri ile seçilmiş izolatlarımızın % benzerliklerinin (Dendogramlarının) oluşturulması işleminde Minitab Programı, orijinal istatistik sonuçları

Step	Number of clusters	Similarity level	Distance level	Clusters joined		New cluster	Number of obs. in new cluster
1	22	99,02	0,020	18	20	18	2
2	21	97,92	0,042	16	18	16	3
3	20	96,16	0,077	19	23	19	2
4	19	96,16	0,077	16	22	16	4
5	18	92,13	0,157	19	21	19	3
6	17	92,13	0,157	16	19	16	7
7	16	91,75	0,165	2	3	2	2
8	15	90,91	0,182	1	5	1	2
9	14	90,66	0,187	1	13	1	3
10	13	89,24	0,215	1	8	1	4
11	12	87,44	0,251	1	10	1	5
12	11	86,21	0,276	1	7	1	6
13	10	84,30	0,314	11	16	11	8
14	9	82,22	0,356	1	11	1	14
15	8	82,22	0,356	1	9	1	15
16	7	82,14	0,357	1	14	1	16
17	6	80,00	0,400	12	15	12	2
18	5	78,69	0,426	2	12	2	4
19	4	78,38	0,432	1	17	1	17
20	3	77,16	0,457	1	4	1	18
21	2	74,66	0,507	1	2	1	22
22	1	74,28	0,514	1	6	1	23

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. İzolasyonlar

Kâğıt endüstrisi için uygun özellikte enzim üreten mikroorganizma gereksinimi, araştırmacıları değişik ortamlardan izolasyon çalışmalarına yöneltmiştir ( Kenealy ve Jeffries 2003 ). Acı Göl'den yaptığımız izolasyonlarda bölüm 2.7'de belirtildiği gibi, kâğıt hamuru beyazlatmada kullanılacak ksilanazlarda aranan özellikler olan alkali ve nispeten yüksek sıcaklıklarda etkin ksilanaz üreten, selüloz negatif aerobik bakterilerin izolasyonu amaçlanmıştır. Çalışmamızda örnekleme alanı olarak Acı Göl'ü seçmemizin nedeni, Acı Göl'ün alkali ve kendine has özellikleri olan bir göl olması Acı Göl'de çalışmamız ile aynı konuda başka bir çalışma yapılmamış olmasıdır.

Çalışmamızda kullandığımız izolasyon besiyerlerinde ksilan hidroliz zonu oluşturan değişik tipteki izolatlar saflaştırma işlemlerinden sonra Besiyeri 7 ( CMC Agar ) ortamında selüloz hidroliz zonu oluşturmaları açısından incelenmişlerdir. Bu şekilde, selüloz hidroliz zonu oluşturmayan (  $S_z$  - ) Ag1, Ag2, Ag8, Ag12, Ag13, Ag20, Ag32, Ag35'nolu izolatlar seçilmişlerdir. Bunlardan Ag12, Ag13, Ag20 ve Ag32'in, substrat olarak CMC kullanılarak DNS testi ile selüloz negatif (  $S_d$  - ) oldukları belirlenmiştir. Ag12, Ag20 ve Ag32 izolatlarına ait ksilanaz preparatları kullanılarak yapılan kâğıt hamuru beyazlatma çalışmaları ile, kontrol ile kıyaslandıklarında %1 – 3 arası değişen beyazlık artışları ve kappası sayısında 2.67 ile 7.32 arasında değişen düşüş elde edilmiştir. Değişik substratlar kullanılarak izolatların fermentasyonlarda ksilanaz üretimleri incelenmiş en yüksek enzim üretimleri 3–4 IU/ml civarında gerçekleşmiştir.

Çalışmamızda istenen özellikte bakterilerin izolasyonu için alkali ve tuzlu besiyerleri kullanılmıştır. Ayrıca, bazı izolasyon besiyerlerinin laboratuvar şartlarına göre modifikasyonları yapılmıştır.

Alkali bir göl olduğu belirtilen ( Dalay 2002 ) Acı Göl'den aldığımız su örneklerimizin pH'sı 8,2 olarak ölçülmüştür. Etkin ksilanaz üretici mikroorganizmaların alkali şartlarda izole edilebileceği fikrinden yola çıkılarak izolasyonlara pH'ları 8.5'e ayarlanmış besiyerleri ile başlanmıştır. Ancak, pH'ları 8.5'e ayarlanmış besiyerlerinde gelişen izolatların, pH'ları 9.0'a ayarlanmış izolasyon besiyerlerinde de gelişebildiği gözlemlendiğinden, izolasyonlara kâğıt hamurunun enzimatik ön işleme için de uygun pH olan, 9.0'a ayarlanmış besiyerleri kullanarak devam edilmiştir.

Acı Göl su örneklerinin tuz oranı % 9.90 g olarak ölçülmüştür. İzolasyon ve kültürlerde kullandığımız besiyerlerindeki tuz miktarının izolatlarımızın gelişmesi için pH'dan daha önemli bir faktör olduğu görülmüştür. Tuzluluğun, tuzlu ve alkali ortamlardan izole edilen mikroorganizmalar için, pH'dan daha önemli olabileceğini gösteren bulgular vardır. Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi, Acı Göl'ün pH'sı çok yüksek olmamasına karşın izolatlarımız pH 10'da gelişebilmektedirler. Yine Çizelge 4.8'de belirtildiği gibi, seçilmiş izolatlarımızdan Ag2, Ag32 ve

Ag35 nötral pH'da gelişebilmelerine karşın tuz içermeyen ortamlarda gelişmemektedir. Diğer taraftan, seçilmiş izolatlarımız en iyi gelişmeyi, gölün ölçülen tuz oranından daha düşük olan %5 ve % 2.5 NaCl içeren besiyerlerinde gerçekleştirmişlerdir. % 2 NaCl miktarının da gelişme için uygun olduğu görülmüştür. Bundan dolayı, alkalifilik organizmaların izolasyonunda kullanılan ancak, tuz içermeyen Horikoshi ortamı ve tuz içeriği % 0.1 olup ksilanolitik organizmaların izolasyonunda kullanılan orijinal DX besiyerinin tuz içerikleri % 2.5'a çıkarılarak modifiye edilmişlerdir. Bir çok tuzcul mikroorganizma, optimum olarak geliştikleri orta derecede tuzlu ( % 5 – 10 NaCl ) ortamlardan izole edilebilirken daha düşük tuz ( % 0.5 – 2 NaCl ) konsantrasyonlarında da gelişebilirler. Denizel ve orta derecede tuzcul bakteriler genelde %3 ve 30% tuz konsantrasyonlarından izole edilebilir. % 2.04 – 24.8 g gibi yüksek tuzlu ortamlarda *Bacillus halodenitrificans* gibi bazı bakteriler izole edilebilir ( Ventosa at al. 1998 ). Berber ve Yenidünya ( 2005 ), tuzluluğu % 2.17 ile Acı Göl'den az, ancak pH'sının 9.7–9.8 oluşu ile Acı Göl'den çok daha alkali olan Van Gölü'nden izole ettikleri 17 *Bacillus* sp. izolatının hepsinin % 5 NaCl oranında gelişebildiğini, söz konusu izolatların hiç birisinin % 7 ve % 10 NaCl oranında gelişemediğini göstermişlerdir. Aynı araştırmada varılan diğer bir sonuç ise, Van Gölü'nün yüksek pH'sına karşın, izolatların hepsi pH 6.8'de gelişebilmiştir.

İzolasyon besiyerlerimiz hazırlanırken literatürlerde verilmiş olan orijinal besiyerlerinin tuz ve pH'dan başka içeriklerinde de modifikasyonlar yapılmıştır. İzolasyonlara Besiyeri 1 ve Besiyeri 3 ( orijinal DX Besiyeri ) ile başlanmıştır. Besiyeri 1, Alkalifilik bakterilerin izolasyonunda kullanılan tanınmış bazal bir besiyeri olan Horikoshi I ve II ortamlarının değiştirilmesiyle oluşturulmuştur. Orijinal Horikoshi ortamlarında karbon kaynakları glukoz ve nişastadır ( Horikoshi 1999 ). Glukoz ve nişasta, ksilan hidrolize edebilen izolatların izolasyonu için uygun substratlar olmadığı için, çalışmamızda Horikoshi besiyerinin karbon kaynağı BW-ksilan ( Birch Wood Xylan ) olarak değiştirilmiştir. Enzim analizlerinde ve besiyerlerinde substrat olarak kullandığımız BW-ksilan, asit ve alkali işlemlerle yan dallarını neredeyse tamamen kaybetmiş ticari ve teknik bir substrat olup kâğıt hamurundaki çözülmeyen ksilana çok benzediği için ksilanaz aktivitesi ölçümleri için de çok uygun bir substrattır ( Sunna 1997 ).

Alkalifilik mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılmakta olan Horikoshi ortamları ( Horikoshi 1999 ) %0.5 g maya ekstraktı ve % 0.5 pepton içermekte olup ksilan hidrolizi gerçekleştirmeyen ancak organik azot kaynaklarını kullanarak gelişebilecek mikroorganizmaların gelişmesine uygundur. Bu nedenle Horikoshi ortamlarının glukoz ve nişasta olan karbon kaynaklarının BW-ksilan ile değiştirilmesi ile elde ettiğimiz izolasyon besiyeri 1'de ( Besiyeri 1, İB 1 ) yaptığımız ilk izolasyonlarda yüksek oranda ksilan hidroliz zonu vermeyen mikroorganizma gelişmesi görülmüştür. Bunun üzerine izolasyon besiyeri 1'in maya ekstraktı ve pepton içerikleri %0.01g'a kadar azaltılarak izolasyon besiyeri 2 ( Besiyeri 2, İB 2 ) hazırlanmıştır. İzolasyon besiyeri 4 ( Besiyeri 4, Modifiye DX Besiyeri, DX ) ise organik azot kaynakları içermemektedir. Bunun yanında, ksilanaz hidroliz zonu oluşturmayan kolonilerin de

gelişebilmesine karşın, Standart Nutrient Agar besiyerinde bazı değişiklikler yapılarak hazırladığımız Besiyeri 6'nın ( NA<sub>2</sub> ) izolasyonlarımız için genelde iyi bir besiyeri olduğu görülmüştür. Besiyeri 4'te ( DX ) yapılan izolasyonlarda ise, ince ve çok yayılıcı gelişerek sorun oluşturan kolonilere sık rastlanılmıştır.

Besiyeri 6 ( NA<sub>2</sub> )' da yapılan izolasyonda gelişen koloniler Şekil. 4.1'de gösterilen şekilde temel tiplere ayrılmıştır. İzolasyonlarda genel olarak en sık karşılaşılan koloniler, T3 tipinde koloniler olmuştur. Şekil. 4.1'de gösterildiği gibi Besiyeri 6 besiyerinde yapılan izolasyonda T3 tipindeki koloniler % 71,1 ile en yüksek oranda izole edilen kolonilerdir. T3 tip koloniler gözle incelendiğinde düz kenarlı, 0.5 cm kadar çapta, koloni ortasına doğru koyulaşan değişik tonlarda kirli beyaz, opak kolonilerdir. T2 ve T3 tip kolonilerin Gr ( + ), sporlu basiller oldukları görülmüştür. İzolasyonlarda T3 tip koloniler, ksilan zonu oluşturmamayanlardan oluşturanlara kadar değişen, farklı büyüklüklerde, geniş bir dağılım göstermişlerdir. Ancak, çoğunlukla selülozu kullanabilmekte oldukları görülmüştür. Buna karşın, Besiyeri 7'de ( CMC Agar ) selülaz hidroliz zonu oluşturmamayan ve daha sonra DNS testi ile selülaz negatif olduğu teyit edilen Ag32 izolatımız, ilk izolasyonda ksilan hidroliz zonu belirsiz T3 tip koloni olarak gelişmiştir. Besiyeri 7'de selülaz hidroliz zonu oluşturmadığı için seçilen, ancak DNS testi ile selülaz ürettiği belirlenmiş olan Ag2 ve Ag8 izolatları da ilk izolasyonlarında, ksilan hidroliz zonu oluşturan T3 tip koloni olarak izole edilmişlerdir.

pH 10 ve %10 tuz içeren broth zenginleştirmelerinden yapılan izolasyonlar sonucunda, hemen hemen tamamen T3 tip koloniler gelişmiştir. Bu bakımdan T4 tip koloni oluşturan mikroorganizmaların Acı Göl'de en yüksek oranda buldukları ve buradaki yüksek tuz ve alkali şartlara iyi uyum gösterdikleri düşünülebilir.

Ksilan içeren besiyerlerinde yapılan izolasyonlarda izolatların geniş ksilan hidroliz zonu oluşturmaması genelde daha yüksek seviyede ksilanaz üretiminin göstergesi olarak düşünülmektedir. Ancak, selülaz negatif izolatlarımızdan Ag32 ilk izolasyonunda belirgin bir ksilan hidroliz zonu oluşturmamasına karşın Besiyeri 6'da ( DX besiyeri ) yapılan sonraki pasajlarında 24. ve 48. saatlerde 9 mm çapında ksilan hidroliz zonu oluşturmuştur. Besiyeri 6'da yapılan izolasyonlarda ksilan hidroliz zonu belirlenemeyen 1 mm kadar çaptaki transparant kolonileri temsilen seçilmiş olan Ag32 izolat aynı besiyerinde yapılan sonraki denemelerde farklı tipte ( T3 tipinde ) koloni oluşturmuş ve 24. ve 48. saatlerde 8.5 – 9.0 mm çapında ksilan hidroliz zonu oluşturmuştur. Bu nedenle, ilk izolasyonlarda küçük ksilan hidroliz zonu oluşturan ve muhtemelen iyi gelişemedikleri için ksilan hidroliz zonu oluşturmamayan kolonilerin de göz ardı edilmemesi doğru bir yaklaşım olarak görülmektedir.

İlk izolasyonlarda izolatlar için belirlenen ksilan hidroliz zonu büyüklükleri ile izolatların sonraki besiyeri pasajlarındaki ksilan hidroliz zonu büyüklükleri ve fermentasyonlardaki enzim üretimleri arasında direkt bir bağlantı bulunmamaktadır. Örnek olarak; Ag8, Ag20, Ag25, Ag18 no'lu izolatlar ilk izolasyonlarında, 48. saatte sırası ile 6.0, 10.0, 8.0 ve 9.0 mm çapta ksilan

hidroliz zonu oluştururken, daha sonraki Besiyeri 4 (DX Besiyeri ) pasajlarında aynı sıcaklıkta yapılan inkübasyonun 48. saatinde sırası ile 20.0, 13.0, 18.0 ve 6.0 mm çapta ksilan hidroliz zonu oluşturmuşlardır. Bu izolatlar Besiyeri 8'de ve 35°C'deki fermentasyonlarında, 48. saatte sırası ile, 2.8, 3.4, 2.4 ve 1.3 İU/ml ( ± 0.1 ) ksilanaz üretmişlerdir.

## 5.2. Fermentasyonlar ve Ksilanaz Üretimleri

Besiyeri 7'de ( CMC besiyeri ) yapılan selülaz aktivitelerinin ön belirlenmesi denemelerinde selülaz negatif ( S<sub>z</sub>- ) ve ksilan hidrolizi gerçekleştirdikleri için seçilmiş olan ( S<sub>z</sub> – K+ ) Ag1, Ag2, Ag8, Ag12, Ag13, Ag20, Ag32, Ag35'nolu izolatların Besiyeri 8'de ( FO1) 35°C'de fermentasyona alınarak büyüme eğrileri çıkarılmıştır. Büyüme eğrilerinin çıkarılmasında değişik yöntemler kullanılabilir. Sunna et al. ( 1997 ), *Bacillus thermoleovorans* ve *Bacillus flavothermus* türlerinin ksilanaz üretimini inceledikleri çalışmada, büyüme eğrilerini Neubauer sayım lamı ile belirlemiştir. Seçilmiş izolatların büyüme eğrilerinin çıkarılmasında spektrofotometrik yöntemler de uygulanabilir. Ancak, sıvı fermentasyon ortamlarında bulunan ksilanın bir miktar bulanıklığa sebep olması ve zamanla ksilanın kullanılmasına bağlı olarak da bulanıklıkta değişiklikler olması nedeniyle hücre sayımlarının seyreltme plaka yöntemi ile yapılmasının daha uygun olacağı düşünülmüştür. Büyüme eğrilerini çıkarılması izolatların maksimum ksilanaz üretimini hangi gelişme evresinde gerçekleştirdiğinin belirlenmesi açısından önemli görülmektedir. İzolatlar ile yaptığımız fermentasyonlarda, izolatların maksimum ksilanaz üretimlerinin, logaritmik gelişme fazından sonra, stationer fazın sonlarına doğru olduğu belirlenmiştir. İzolatlarının logaritmik gelişme fazından stationer faza geçişi 15.- 24. saatler arasında olup, yine 42. saat civarında mikroorganizma yoğunluğunda azalma başlamıştır. Tüm izolatlar için maksimum hücre yoğunlukları 12x10<sup>9</sup> ve 20x10<sup>9</sup> cfu / ml değerleri arasında olmuştur.

Acı Göl istasyon 2'den elde edilen toprak örneklerinden besiyeri 6'ya yapılan izolasyonlarda, 50 °C'de yapılan inkübasyonlar sonunda örnek toprağının gramında 16000 cfu/g'a, 35 °C'de yapılan inkübasyonlar sonunda ise 1900000 cfu / g'a denk gelen koloni gelişimi tespit edilmiştir. 45 °C'de izolasyonlarda elde edilen koloni yoğunluğu göreceli olarak 35 °C'de elde edilen gibidir. Çizelge 4.8'de verilmiş olan seçilmiş 8 izolatımız, pH'sı 8.5 ve %2.5 NaCl içeren besiyeri 6'da, 55 °C'de inkübe edildiklerinde gelişmemişlerdir. Buna dayanarak Acı Göl ortamında termofilik veya termotolerant gelişebilen mikroorganizmaların daha az oranda bulunduğu sonucuna varılabilir. Bunun yanında, 50 °C sıcaklıklarda yapılan izolasyonlarda gelişen izolatların Besiyeri 7'de ( CMC besiyeri ) yapılan selülaz aktivitelerinin ön belirlenmesi incelemelerinde selülaz negatif ( S<sub>z</sub>- ) izolat elde edilememiştir.

Seçilmiş izolatların değişik sıcaklıklarda ksilanaz üretimleri sonuçları kısım 4.5.1'de verilmiştir. Şekil 4.6 – 4.13'de verilmiş olan Ag1, Ag2, Ag8, Ag12, Ag13, Ag20, Ag32, Ag35

izolatlarının Besiyeri 7'de değişik sıcaklıklarda yapılan fermentasyonlarındaki en yüksek ksilanaz üretimleri sonuçlarına göre, Ag1 izolatının en yüksek ksilanaz üretimi 40 °C'de, diğer izolatların en yüksek ksilanaz üretimleri ise 35 °C'de geręekleşmiştir. Ag1 izolatının 3.4 İU/ml ile 40 °C'de geręekleşen en yüksek ksilanaz üretimi ile 45 ve 35 °C'de geręekleşen 3.2 İU/ml'lik en yüksek ksilanaz üretimi arasında önemli bir fark olmamasına karşın, 50 °C'deki 1.7 İU/ml'lik en yüksek ksilanaz üretimi, 40 °C'de geręekleşen ksilanaz üretiminin yaklaşık yarısı kadardır. Bunlara dayanarak seçilmiş izolatlarımızın mezofilik özellikte olduğu görülmektedir.

Seçilmiş ( S<sub>Z</sub> - ) izolatlarımızın Besiyeri 8'de ( Fermentasyon Ortamı 1, FO1 ) ön işlem görmüş değişik bitkisel substratlar ( Buğday samanı, buğday kepeği ve mısır koçanı ) ve ksilan BW-ksilan kullanılarak yapılan fermentasyonlarda ksilanaz üretimleri incelenmiştir. Fermentasyonlar, her izolat için daha önce belirlenmiş olan optimum ksilanaz üretim sıcaklıklarında geręekleştirilmiştir. Seçilmiş ( S<sub>Z</sub> - ) izolatlarımızın değişik substratlarla Şekil 4.14 – 4.21'de verilmiş olan ksilanaz üretimlerinin en yüksek değerleri, Şekil 4.22'de topluca verilmiştir. İzolatların hepsinde maksimum ksilanaz üretimi substrat olarak BW-ksilan ile elde edilirken, bitkisel substratlardan en fazla ksilanaz üretimleri Ag20 izolatı hariç diğer izolatlar için buğday samanı ile geręekleşmiştir. Buğday samanı ile elde edilen en yüksek ksilanaz üretim değerleri, pahalı ticari substrat olan BW-ksilan ile elde edilen değerlere çok yakındır ( % 97-41 ). Ag1 izolatının en yüksek ksilanaz üretimi BW-ksilan ve işlem görmüş mısır koçanı ile 3.2 İU/ml'lik eşit değerde enzim üretimi ile olmuştur ( Şekil 4.14 ). Diğer taraftan, Ag2 izolatının BW-ksilan ve buğday samanı ile maksimum ksilanaz üretimi, sırası ile 2.9 ve 2.4 İU/ml, Ag8 izolatının için ise yine sırası ile 3.2 ve 2.7 İU/ml, Ag12 izolatı için 3.2 ve 2.7 İU/ml, Ag13 izolatı için 3.3 ve 2.4 İU/ml, Ag20 izolatı için 3.7 ve 3.4 İU/ml, Ag32 izolatı için 3.2 ve 2.7 İU/ml, Ag35 izolatı için 3.4 ve 3.3 İU/ml olarak bulunmuştur. En yüksek ksilanaz üretimi Ag20 izolatı ile 3.7 İU/ml ile substrat olarak BW-ksilan ile elde edilmiştir. Tüm izolatlar için elde edilen ikinci en yüksek ksilanaz üretim değerleri olan 3.4 İU/ml, Ag20 izolatı ile substrat olarak mısır koçanı ve Ag35 izolatı için substrat olarak buğday samanı ile elde edilmiştir. izolatlar için elde edilen üçüncü en yüksek ksilanaz üretim değerleri olan 3.3 İU/ml'lik üretim değerleri, Ag35 izolatı için substrat olarak buğday samanı, Ag13 izolatı için substrat olarak BW-ksilan ile elde edilmiştir. Seçilmiş izolatların her biri için BW-ksilan ile ksilanaz enzim üretimi % 100 kabul edildiğinde (pozitif kontrol), bitkisel substratlarla en yüksek ksilanaz üretimleri belirlenerek yüzdeler değerleri Çizelge 5.1'de özetlenmiştir.



**Çizelge 5.1.** Seçilmiş izolatların BW-ksilan ve bitkisel substratlarla ksilanaz üretim yüzdeleri.

İzolat	Ag1	Ag2	Ag8	Ag12	Ag13	Ag20	Ag32	Ag35
<b>Ksilanaz üretimleri</b>	X, 100	X, 100	X, 100	X, 100	X, 100	X, 100	X, 100	X, 100
<b>( % )</b>	M, 93	S, 82	S, 92	S, 90	S, 73	M, 91	M, 84	S, 97
	S, 83	M, 65	K, 62	K, 65	M, 68	S, 88	S, 41	K, 80
	K, 74	K, 65	M, 55	M, 51	K, 65	K, 50	K, 32	M, 55

X, BW- ksilan; S, buğday samanı; K, buğday kepeği; M, mısır koçanı ile fermentasyon. Sayılar %'lik değerleridir. En yüksek ksilanaz üretim değeri % 100 olarak kabul edilmiştir.

Enzim üretimi çalışmalarında kullanılacak mikroorganizmaların pahalı gelişme substratlarına ihtiyaç duymadan kolayca gelişebilmeleri enzim üretiminin ekonomik olması açısından çok önemlidir. Ksilanaz üretimi için substrat olarak kullanılabilen birchwood ksilan gibi saflaştırılmış substratlar da çok pahalı olup endüstriyel çapta enzim üretiminde kullanılması ekonomik olmaktan çok uzaktır ( Pham et al. 1998 ). Tarımsal atıklar kuru ağırlıklarının % 25 – 35'i oranlarında mikroorganizmalar için substrat olabilecek hemiselüloz içerebilmektedir. Tarımsal atıklar mikroorganizmaların gelişmesi için önemli miktarda besinsel değere sahiptirler. Örneğin, buğday kepeği büyük oranda nişasta harici polisakkaritlerden (non-starch polysaccharides; NSP ) oluşmaktadır. Buğday kepeğinin içeriği % 41–60 NSP, % 10–20 nişasta ve % 15–20 proteindir ( Maes et al. 2004 ). Mısır koçanı kuru ağırlıkça % 34.8 oranında ksilan içermektedir ( Yang et al. 1995 ). Bu nedenle, denemeye aldığımız izolatlarımızın, bu substratların içerdiği azot ve karbon kaynaklarını etkili şekilde kullanabilen mikroorganizmalar olduğu belirlenmiş ve ticari ksilan substratına göre avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Kültür ortamlarında mikroorganizmaların lignoselülozik materyalin temel bileşenlerinden daha iyi faydalanabilmesi için, bu materyalin bazı ön işlemlerden geçirilerek, hücre duvarının enzimler için engel oluşturan direncinin zayıflatılması önerilmektedir ( Wyman et al. 2005 ). Bu nedenle çalışmamızda enzim üretiminde substrat olarak kullanılacak lignoselülozik materyaller %1'lik NaOH içinde 121°C'de ön işlemden geçirilmiştir.

Ksilan ile bitkisel substratlardan daha fazla ksilanaz üretimi başka araştırmacılarca da karşılaştırılarak belirlenmiştir. Srinivasan et al. ( 1999 ), tarafından *Chainia* sp. NCL 82–5 ( aktinomiset)'in, karbon kaynağı olarak tahıl kepekleri ile 8–10 IU/ml ksilanaz üretimi, karbon kaynağı olarak ksilan içeren sıvı fermentasyon ortamında ise 26 IU/ml'ye kadar ksilanaz üretimi bildirilmiştir. Buradaki farkın iki kattan fazla olduğu dikkati çekmektedir. Chauhan et al. ( 2006 ), *B. coagulans* izolatı ile ksilanaz üretimi için %1 BW-ksilan ve buğday samanı ile % 0.5 pepton ve mineraller içeren fermentasyon ortamını kullanmıştır. Bocchini et al. ( 2005 ), *Bacillus circulans* D1 ile fermentasyonda, ticari ksilan ( % 0,5 g ) ile ksilanaz üretimi 7.0 İU/ml, ot hidrolizatı ( % 0.3 g ) ile daha az, ticari ksilan ile elde edilene çok yakın olan 6.2 İU/ml'lik ksilanaz üretimi elde etmişlerdir. Dhillon et al. ( 2000b ), değişik bitkisel substratlarla *B. circulans*

AB 16 izolatının ksilanaz üretimini incelemişlerdir. pH 8.0 ve 55°C'de gerçekleştirdikleri fermentasyonlarla 72. saatte, substrat olarak %2 mısır koçanı ile 1.2 İU / ml, % 3 buğday kepeği ile 8.45 İU / ml, % 3 pirinç samanı ile 20.6 İU / ml, buğday samanı ile 21.3 İU / ml, ksilan ile 19.2 İU / ml ksilanaz üretimi elde etmişlerdir. Burada, izolatlarımızla elde ettiğimiz sonuca benzer olarak ticari ksilan ile elde edilen ksilanaz üretiminin, buğday samanı ile elde edilen 21.3 İU/ml'lik en yüksek ksilanaz üretim değerine çok yakın olduğu görülmektedir.

Özellikle pepton, maya ekstraktı gibi büyüme faktörleri enzim üretiminde maliyetin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Enzim üretiminde pepton, maya ve et ekstraktı gibi gelişme maddeleri kullanılması üretim maliyetinin artmasında en önemli faktörlerden olduğu belirtilmiştir. Damaso et al. ( 2002 )'nin de belirttiği gibi, birçok yayında bildirilen yüksek ksilanaz üretiminin de çoğu kez pahalı maddeleri içeren ortamlarda gerçekleştirilmiş olduğu görülmektedir. İzolasyonlarda seçilmiş izolatlarımız ve incelediğimiz diğer izolatların, nadir durumlar hariç hepsinin, pepton ve maya ekstraktı gibi organik azot kaynağı olan gelişme faktörleri içermeyen ortamlarda da gelişebildiği görülmüştür. Seçilmiş izolatlarımızın enzim üretimi için pahalı organik gelişme faktörleri içermeyen Besiyeri 4 ( DX ) gibi temel ortamlarda gelişebilmesi önemli bir avantajdır. Dhillon at al. ( 2000b ), farklı bitkisel substratlara ilaveten vitamin, mineraller ekleyerek oluşturdukları ortamda *B. circulans* AB 16 izolatı ile gerçekleştirilen fermentasyonlarda ksilanaz üretimini inceledikleri çalışmada en yüksek ksilanaz üretimini buğday samanı ile 21,3 İU/ml olarak elde etmişlerdir. % 3 pirinç samanı ve % 0,5 – 1 g'lık değerlerde protein temelli değişik organik bileşikler içeren ortamda gerçekleştirdikleri fermentasyonda ise en yüksek ksilanaz üretimi, bitkisel substratlar kullanarak elde edilen en yüksek ksilanaz üretim değerinin iki kat kadar yüksek olarak, 47 İU/ml ile tripton ilave edilmiş fermentasyon ortamında elde edilmiştir. Aynı araştırmacılar *B. circulans* AB 16 ile elde edilen en yüksek ksilanaz üretimi bulgularının tersine, *B. polymyxa* CECT 1532 ile en yüksek ksilanaz üretiminin, azotlu organik gelişme faktörlerinden maya ekstraktı kullanılan fermentasyonda elde edildiğini bildirmişlerdir.

Seçilmiş izolatlarımızın değişik sıcaklıklarda ksilanaz üretimlerini incelemeye kullandığımız Besiyeri 8 (Fermentasyon Ortamı 1, FO1 ), izolasyon besiyeri 1'in ( İB 1 ) agar içermeyen, 'broth' şekli olup BW-ksilan yanında %0.5 maya ekstraktı; %0,5 pepton içermektedir. Besiyeri 9 ( Fermentasyon Ortamı 2, FO2 ) ise, Besiyeri 4 ( DX ) ortamının agarsız 'broth' şekli olup, organik azot kaynakları içermemektedir. Bu nedenle. substrat olarak BW-ksilan içeren Besiyeri 8 ve Besiyeri 9'da yapılan fermentasyonlardan elde edilen ksilanaz üretim değerleri, izolatların organik azot kaynakları ile ksilanaz üretim ilişkisini değerlendirmemizi sağlayabilir. Bu açıdan, Şekil 4.6 – 4.13'de verilmiş olan Besiyeri 8'de ( FO1) ve değişik sıcaklıklarda maksimum ksilanaz üretimleri ile Şekil 4.14 – 4.21'de verilmiş olan Besiyeri 9'da ( FO2 ) substrat olarak ksilan kullanarak elde edilen maksimum ksilanaz üretim sonuçları karşılaştırıldığında, seçilmiş izolatlarımız ile organik azot kaynakları içeren Besiyeri 8'de yapılan fermentasyonlarda yaklaşık

0.2 – 0.3 IU/ml daha fazla ksilanaz üretimleri elde edildiği görülmektedir. Ancak bu farkların önemli olmayacak derecede az olduğu düşünülmektedir. Seçilmiş izolatlarımızla elde ettiğimiz bu sonuca benzer şekilde, Gupta et al. ( 2001 ), haloalkalofilik *Staphylococcus* sp. SG–13 izolatı ile % 0,5 pepton ve maya özütü içeren Horikoshi ortamında yapılan fermentasyonlarda elde edilen en yüksek ksilanaz üretimi ile %1 bitkisel materyal katılmış özellikle pepton, maya ekstraktı gibi büyüme faktörleri enzim üretiminde maliyetin önemli bir kısmını oluşturduğunu savunmuşlardır. Damaso et al. ( 2002 ) iyonize suda yapılan fermentasyonlardaki en yüksek ksilanaz üretimleri arasında belirgin bir fark elde edilmediğini, ayrıca, bu iki ortamda 1% (w/v) den fazla bitkisel materyal olmasının da ksilanaz üretiminin de belirgin fark göstermediği belirtmişlerdir. Nascimento et al. ( 2002 ), Brezilya savan (yarı kurak düzlük alan) toprağından ( cerrado soil ) izole edilen ve genus seviyesinde tanımlanan *Streptomyces* sp. strain AMT–3 izolatının değişik substratlar kullanılarak pH 7 ve 30°C'de 10 günlük fermentasyonu sonunda ksilanaz ve selüloz üretimleri sırası ile, Birchwood Xylan substratı için 10.3 ve 0.02 IU/ml, buğday kepeği için 28.4 ve 0.20 IU/ml, selüloz ile 1.6 ve 0.45 IU/ml olarak belirlemişlerdir. Ancak, bu çalışmada, substrat olarak buğday kepeği ile Birchwood Xylan'dan daha fazla ksilanaz üretimi elde edilmiş olduğu görülmektedir.

( S<sub>z</sub> – K<sup>+</sup> ) özellikteki Seçilmiş izolatlarımız olan Ag1, Ag2, Ag8, Ag12, Ag13, Ag20, Ag32, Ag35 no'lu izolatlar ile yaptığımız fermentasyonlarda ksilanaz üretimlerinin genelde düşük olduğu görülmektedir. İzolatlarımızın maksimum ksilanaz üretim değerleri 4.0 IU / ml'nin altında kalmıştır. Besiyeri 7'de ( CMC besiyeri ) yapılan selüloz aktivitelerinin ön belirlenmesi incelemelerinde selüloz hidroliz zonu oluşturan izolatları temsilen seçilmiş Ag18, Ag 22, Ag 25 nolu izolatların Çizelge 4.2'de verilmiş olan ksilanaz üretimleri de düşük olduğu görülmektedir.

İzolatlarımızla elde ettiğimiz ksilanaz üretimleri düşük olmasına karşın düşük seviyede ksilanaz içeren enzim preparatları, substrat olarak tarımsal atıklar kullanıldığında oldukça ekonomik olabilirler. Ag32 izolatımız örnek olarak alındığında, FO2 ortamında %1.5' lik buğday kepeği ile 2.5 IU/ml'lik ksilanaz üretimi sağlanabilmektedir. 10 IU/ gr fk-hamurluk bir enzimatik ön işlem için kâğıt hamurunun her gramı için 4 ml fermentasyon sıvısı gerekeceğinden 1000 g kâğıt hamuru için 60 g, 1 tonluk hamur için 60 kg buğday kepeği gerekecektir. Ayrıca, katı sistem fermentasyon ( ssf ) yöntemi ile gereken substrat miktarı ve maliyet daha da aşağı çekilebilir ( Archana and Satyanarayana 1997, Virupakshi et al. 2005 ).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzer düşük sayılabilecek seviyede ve sürelerde ksilanaz üretim sonuçları değişik çalışmalarla da belirlenmiştir. Pham et al. ( 1998 ), *Bacillus polymyxa*'nın selüloz negatif iki izolatının 36. ve 42. saatlerde maksimum üretim değeri olan 24 nanokat/ml ( 1 nanokat = 1.43 IU/ml ) gibi düşük seviyede ksilanaz ürettiklerini belirlemişlerdir. Bocchini et al. ( 2005 ), termofilik ve alkalifilik, selüloz negatif ksilan üretici *Bacillus circulans* D1 izolatının, ucuz karbon kaynakları olarak belirtilen şeker kamışı ( *Saccharum affinarum* ) ve otlardan ( *Paspalum notatum* ) elde edilen hidrolizatlarda ksilanaz

üretimini incelemişlerdir. En yüksek ksilanaz üretimi değerleri şeker kamışı hidrolizatı için 8.4 İU/ml, ot hidrolizatı için ise 7.5 İU/ml olarak belirtmiştir. Araştırmacılar bu değerlerin, ksilan kullanılarak elde ettikleri 7.0 İU/ml değerine çok yakın olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar, *B. circulans* D1 izolatı ile karbon kaynağı olarak ksilan kullandıkları fermentasyonda 24 saate kadar bakteriyel biyomass ve enzim miktarında artış olduğunu, 24. saatte ksilanaz üretimi 5.50 İU/ml ile maksimum değere yakın olarak belirlemişlerdir. Bu sürenin sonunda bakteriyel biyomassda düşüş başlamasına karşın enzim üretiminde artış devam etmiştir. Maksimum ksilanaz üretimini 6,5 İU/ml ile 48. saatte elde edilmiştir. 48. saatten sonra enzim miktarı yavaşça düşmeye başlamıştır. Aynı durum bitkisel substratlar için de tespit edilmiştir. Çalışmada, bitkisel filtratlar ile enzim üretiminde en üst seviyeye 48. saatte ulaştığı belirlenmiştir. Bu bakımdan Bocchini et al. ( 2005 )'ın elde ettiği sonuçların çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara çok benzediği görülmektedir. *Staphylococcus* sp. SG-13 izolatı ile maksimum ksilanaz üretim seviyesine 36-48 saatte ulaşılmıştır. Aynı izolatla katı faz fermentasyon denemesinde maksimum ksilanaz üretim seviyesine 60. saatte ulaşılmıştır ( Gupta et al. 2001 ). Subramaniyan et al. ( 2000 ), alkalifilik *Bacillus* SSP-34 izolatının, kültürde duraklama fazına 36. saatte ulaştığı, ayrıca bu süreye kadar ksilanaz üretiminin düşük miktarda olduğunu belirlemişlerdir. Archana and Satyanarayana ( 1997 ), komposttan izole ettikleri termofilik *Bacillus licheniformis* A99 izolatı ile substrat olarak buğday samanı kullanılarak yapılan SSF tipi fermentasyonda enzim üretimi 22. saate kadar hızla artmış, 72. saatte maksimum seviyeye ulaşmıştır. Değişik araştırmacılar düşük seviyede ksilanaz üretimi bildirmişlerdir. Bataillon et al. ( 1998 ), Portekiz'de sıcak su kaynağından izole ettikleri *Bacillus* izolatı ile substrat olarak buğday kepeği arabinoksilanı ile çok düşük sayılabilecek 2.9 İU/ml ksilanaz üretimi elde etmişlerdir. Techapun et al. ( 2003 ), değişik araştırmacıların çalışmalarına dayanarak *B. subtilis* izolatları ile substrat olarak % 1 oat-spelt ksilan kullanılarak 4.9 ve 12 İU/ml, % 1 buğday kepeği ile 3.6 İU/ml; *Bacillus* sp. SPS-O izolatı ile substrat olarak % 0,5 buğday kepeği kullanarak 3.0 İU/ml; *Bacillus* sp. BP-23 izolatı ile substrat olarak BW-ksilan kullanarak 1.1 İU/ml; *Bacillus firmus* izolatı ile % 0.5 BW-ksilan substrat kullanarak 1.75 İU/ml'lik ksilanaz üretimi elde edildiğini bildirmişlerdir. Subramaniyan and Prema ( 2002 ), de değişik araştırmacıların çalışmalarına dayanarak *B. stearothermophilus* strain T-6 izolatı ile 2.33 İU/ml, *Micrococcus* sp. DG10 izolatı ile 3.3 İU/ml'lik düşük seviyede ksilanaz üretimi elde edildiğini bildirmişlerdir. Archana and Satyanarayana ( 1997 ), *Bacillus licheniformis* A99 izolatını kullanarak, katı durum fermentasyonu ( SSF ) ile üretiminde ve ucuz bitkisel substrat olarak buğday samanı ile 16.3 İU / g kuru substratlık ksilanaz üretimi elde etmişlerdir. Subramaniyan and Prema ( 2002 ) ile Techapun et al. ( 2003 ), değişik araştırmacıların çalışmalarına dayanarak mililitrede yüz ünitenin üzerinde ksilanaz üreten *Bacillus* izolatları da bildirmiştir. *Bacillus circulans* izolatı ile optimum pH'sı 7.0 olan, 400 İU/ml gibi yüksek seviyede ksilanaz üretimi elde edilmiştir ( Subramaniyan et al.2000 ).

Değişik ortamlardan elde edilen izolatların ortalama ksilanaz üretim seviyeleri izole edildikleri ortamın özellikleri ile yakın ilişkili olabilir. Acı Göl, Tuz gölünden sonra Türkiye'deki en tuzlu göldür. Yüksek miktarda sodyum sülfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) içerir ( Altınış ve Mezquita 2008 ). Göldeki yüksek tuzluluk ve alkalilik gibi şartlar nedeniyle gölde yaşayan organizmalar sınırlı sayı ve çeşittir. Ancak gölde belli zamanlarda *Spirulina* sp. gibi bazı siyanobakterilerin gelişebildiği görülmektedir ( Dalay 2002 ). Gölde nadir de olsa su bitkilerine de rastlanmamaktadır, göldeki yüksek tuz oranı, sülfat ve alkali şartlar bitki yaşamına uygun değildir. Göl çevresi de ksilanaz üretimi için substrat sağlayabilecek otsu ve odunsu bitkiler açısından zengin görülmemektedir. Ancak, değişik bitkisel materyallerin çevreden göle ulaşabildiği göz ardı edilmemelidir. Ayrıca örnek istasyonlarımız 1 ve 2'nin yer aldığı gölün batı kısımlarındaki göl suyunun etkisi altında kalan kıyı şeridi nispeten bol bitkisel materyal içermektedir. İzolatların düşük ksilanaz üretimi Acı Göl için genel bir durum olabilir. Gölde bitkisel ve diğer gelişme substratlarının az olması nedeni ile Acı Göl'ün minimal şartlara uyumlu mikroorganizmaların bulunmasına uygun olduğu, ayrıca, Acı Göl izolatlarımızın ksilanaz üretimlerinin genelde düşük olmasının sebebinin de bu substratların kısıtlı olduğu şartlara uyumlu olmaları olarak düşünülebilir. Çizelge 4.2.'de verilmiş olan ve selülaz pozitif izolatları temsilen seçilmiş olan izolatların da ksilanaz üretimlerinin yüksek olmadığı görülmektedir. Değişik habitatlarda yapılan izolasyon çalışmalarında, izolatların ortalama ksilanaz üretimlerinde izole edildikleri habitatla ilişkilendirilebilecek şekilde farklılıklar görülebilmektedir. Çizelge 5.2'de belirtildiği gibi, Muzarırı et al. ( 2001 )'nin Afrika'da özellikleri farklı üç habitattan yaptıkları izolasyon çalışmalarının sonucunda değişik ortam kökenli izolatların ortalama ksilanaz üretimlerinin oldukça farklı olduğu, nemli habitat odunlarından elde edilen izolatların ortalama ksilanaz üretimlerinin, sıcak su kaynaklarından ve kuru habitat odunlarından elde edilen izolatlarla kıyasla daha yüksek seviyede olduğu görülmektedir. Çizelge 5.2'de, özellikle kuru habitat odunlarından elde edilen izolatlarda çok düşük seviyede ksilanaz üretimi belirlenmiştir.

**Çizelge 5.2.** Muzarırı et al. ( 2001) tarafından değişik habitatlardan izole edilen fungusların ksilanaz üretim miktarları

Ksilanaz üretimi (IU/ml)	0.0-0.5	0.5-1.0	1.0-1.5	1.5-2.0	2.0-2.5	2.5-3.0	3.0-4.0	4.0-5.0	5.0-10	10-20	20-30	> 30
Kuru habitat odunları	22	8	7	10	4	-	-	-	-	-	-	-
Sıcak su kaynakları	-	2	3	11	15	-	-	1	-	-	-	-
Nemli habitat odunları	-	-	6	5	11	11	16	15	43	-	-	-

Tablodaki sayılar fungal izolat sayılarını göstermektedir.

### 5.3. Enzimatik Özellikler

İzolatların ksilanaz aktivitesi için optimum pH değerleri, DNS testinde, değişik tamponlarla değişik pH değerlerinde ( pH 6.0 – 10.0 ) hazırlanmış BW-ksilan substrat kullanılarak gerçekleştirilmiştir. (  $S_z - K^+$  ) özellikteki seçilmiş 8 izolatın ksilanaz aktivitesi için optimum pH 9 olarak belirlenmiştir. pH 10'da enzim aktivitelerinde ani düşüş olmuştur. Ancak bu düşüş pH 8.0'de görülen aktivitelerden daha düşük değerdir. İzolatların kültür filtratlarındaki en yüksek optimum pH değerleri % 100 olarak alınıp üst üste karşılaştırıldığında Şekil 4.23'de görüldüğü gibi büyük benzerlik olduğu göze çarpmaktadır. Bu şekilde elde edilen grafiksel benzerlikleri yüksek olan izolatlar Şekil 4.23'de beraberce ayrı bir grup olarak gösterilmiştir.

Seçilmiş 8 izolatın kültür filtratlarındaki ksilanaz aktiviteleri için optimum sıcaklık değerleri ( 40 – 80 °C ), ksilanaz aktiviteleri için optimum pH 9.0'da ve substrat olarak %1'lik ksilan kullanılarak DNS metodu ile ve 5 dakikalık enzim-substrat inkübasyonu sonucunda belirlenmiştir. Belirlenen optimum sıcaklık değerleri Çizelge 4.4'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 8 izolatımızın ksilanaz aktiviteleri için optimum pH ve sıcaklık değerleri kâğıt hamuru enzimatik ön işlemleri için çok uygun olan pH 9.0 ve sıcaklık 60°C'dir.

Ksilanazlarda benzer optimum sıcaklık ve pH değerleri bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Roy and Belaluddin ( 2004 ), Bengadeş, Rajshahi'de, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle *Bacillus* sp. olduğunu belirledikleri, aerobik, alkalifilik ve ksilan parçalayıcı dört bakteri izolatu elde etmiş, optimum aktivite gösterdikleri pH değerleri sırası ile 8.0, 9.0, 9.0, 8.5; optimum aktivite sıcaklıkları ise yine sırası ile 50, 55, 55 ve 55°C olarak, bu sıcaklıklardan sonra aktivitede azalma görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Çizelge 4.5'de verilmiş olan ve seçilmiş sekiz izolatımızın kültür filtratlarının 60°C sıcaklıkta ve pH 9'da değişik sürelerde bekletilmesi ile elde edilmiş termal stabilite sonuçlarına göre, Ag1 izolatu hariç, diğer izolatlarımızın enzim aktiviteleri 60°C'de bir saat sürede önemli bir kayba uğramamaktadır. Bu sonuca göre, 60°C'de 1.5 – 2 saat kadar sürecek olan bir kâğıt hamuru enzimatik ön işlemleri için Ag1 izolatına ait enzim preparatları uygun görülmemektedir. Daha sonra belirtileceği gibi kâğıt hamurlarının enzimatik ön işleminde uyguladığımız şartların da kullandığımız enzim preparatlarının aktivite kaybına bağlı bir sorun oluşturmadığı görülmüştür.

$S_z - K^+$  özellikli seçilmiş izolatlarımızın hepsi için kültür filtratlarındaki ksilanaz aktivitesi optimum sıcaklığı olan 60°C, izolatlarımızın hepsi için fermentasyonlardaki en yüksek gelişme sıcaklığı olarak belirlenen 50 °C'den ve en yüksek ksilanaz üretim sıcaklıklarından yüksektir. Optimum ksilanaz pH değeri olan pH 9.0 ise, izolatların gelişebildikleri pH 10.0 değerinden daha düşüktür.

Yüksek optimum pH ve sıcaklık değerlerine sahip mikroorganizmalar değişik araştırmacılar tarafından farklı ortamlardan izole edilmişlerdir. Ancak, termofilik ve sıcak

habitatlardan izole edilen mikroorganizmalara ait ksilanazlar genelde asidik optimum pH değerlerine sahiptir. Ayrıca, Sunna et al. ( 1997 )'nin bildirdiği gibi, çoğu fungal izolat ksilanazlarının optimum pH değerlerinin asidik, optimum sıcaklık değerlerinin ise 50°C civarı olduğunu görülmüştür. Kâğıt endüstrisi için istenen özellikte ksilanazlar eldesi için hipertermofilik bakteriler araştırılmıştır. Hipertermofilik bir bakteri olan; *Thermotoga* sp. izolatından elde edilen ksilanaz, 95°C'de kraft kâğıt hamuruna etkili olmasına karşın, bu enzim optimum pH değeri 6.3 civarında olup tercih edilen pH 9.0 değerinin çok altındadır. Başka birçok hipertermofilik bakteri ksilanazı için de benzer durum gözlenmiştir ( Uffen 1997 ). Termofilik *Chaetomium thermophile* NIBGE izolatının optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri pH 6.5 ve 70 °C olarak belirlenmiştir ( Latif et al. 2006 ). Li et al. ( 2005 ), *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 izolatlarının pH 6.5–10.0 arasında stabil olan saflaştırılmış ksilanaz enziminin, optimum pH'sının 7.0 – 7.5, optimum sıcaklığının da 70–75 °C olduğunu bildirmiştir. Sunna et al. ( 1997 ), Japonya Kobe'de sıcak su kaynağından izole ettikleri *Bacillus thermoleovorans* K-3d, K-4 ve K-1 izolatları ile Kenya Bogoria alkali gölünden izole ettikleri sarı pigmentli *Bacillus flavothermus* strain LB3A izolatının ksilanaz aktivitelerinin aktif olduğu pH ve sıcaklık değerlerinin, sırasıyla 5.0 – 9.0 ve 40 - 90°C olduğunu, optimum ksilanaz aktivitelerini ise pH 7.0 olarak bildirmişlerdir. Carlos et al. ( 2002 ) tarafından topraktan izole edilen ve rRNA analizi ile *B. caldolyticus*'a yakın bulunan termofilik *Bacillus* izolatının optimum enzim üretimi değerleri pH 6.5 – 7.0 olarak bildirilmiştir. Kitreechavanich et al. ( 1984 ), termofilik funguslar olan, β-ksilosidaz üretici olarak seçilmiş *Aspergillus fumigatus* ve ksilanaz üretici *Humicola lanuginosa* izolatlarının, buğday samanı substrat kullanarak, katı durum fermentasyonu ile söz konusu enzimleri üretme optimum sıcaklıklarını sırası ile, 40 ve 45 °C olarak belirlemişlerdir. İki enzimin optimum sıcaklık değeri 65 °C, optimum pH değerleri β-ksilosidaz için 4.5, ksilanaz için 5.5 olarak bildirilmiştir. Damaso et al. ( 2002 ), Brezilya'da topraktan izole ettikleri *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145 fungal izolatı için ksilanaz aktivitesi için optimum şartların pH 6.0 ve sıcaklığın 75°C olduğunu belirtmişlerdir. Yavuz (2003), değişik kaynaklara dayanarak *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *subtilis*, *Fusarium*, *Thermotoga*, *Teheromyces* ve *Thermotoga*'ya ait bir çok strainde optimum sıcaklığı 60°C'den yüksek ancak, optimum aktivite gösterdikleri pH değerleri 7.0 ve altı olan ksilanazların varlığını bildirmiştir. Dhillon et al. ( 2000a ), *B. circulans* AB 16 izolatından saflaştırdıkları Xyl A ve Xyl B enzimlerinin optimum pH ve sıcaklık değerlerini ile sırası ile, pH 6.0 ve 75 – 80 °C ile pH 6.0 ve 65 – 70 °C olarak belirlemişlerdir. Xyl A enziminin pH 9.0, 65 °C, 2 saat süreyle % 70 aktivitesini koruduğunu, optimum pH ve sıcaklık değerleri pH 6.0 ve 65 - 70°C olan Xyl B enziminin ise aynı şartlar ve sürede sadece % 34 aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Lama et al. ( 2004 ), Antarktika'da sıcak su kaynağından izole edilen ve yeni bir tür olan *Bacillus thermantarcticus* için ksilanaz aktivitesinin optimum şartların pH 5.6 ve sıcaklığın 70°C olduğunu belirtmişlerdir. Chauhan et al. ( 2006 ), *B. coagulans* izolatı ksilanazının optimum pH'sının 7.0 olduğunu, pH 8 ve 55 °C'de 60

dakikada %20 aktivitesini koruduğunu belirlemiştir. Khandeparkar and Bhosle ( 2006c ), Hindistan'da bir deniz halicinden izole ettikleri termoalkalifilik *Enterobacter* sp. MTCC 5112 izolatının, *Enterobacter*lerde ksilanaz üretimi açısından ilk örneği oluşturduğunu belirtmişlerdir. Bu izolata ait ksilanazın optimum özellikleri de başka araştırmalar ile kıyaslandığında oldukça yüksektir. İzolata ait ksilanaz aktivitesi için optimum pH'nın 9, optimum sıcaklığın ise 100 °C olduğu belirtilmiştir. pH 9 ve 80 °C'de 40 dakika süre sonunda enzim aktivitesinin % 90 oranında korunduğu tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklık ve alkali şartlarda etkin ksilanaz üretici mikroorganizmaların sıcak ortamlardan ziyade alkali ortamlardan izole edilme olasılığı daha yüksek görülmektedir.

Birçok araştırmada geniş pH aralıklarında aktif ksilanaz üreten izolatlar elde edilmiştir. Pham et al. ( 1998 ), *Bacillus polymyxa*'nın selülaz negatif iki izolatının ksilanaz optimum pH değerlerinin sırası ile, 7.0 ve 6.0 – 7.0 ( pH 5.5 – 8.0 arası aktif ) ve optimum sıcaklık değerlerinin 45 – 50°C olduğunu belirlemiştir. Dhillon and Khanna ( 2000 ), Optimum ksilanaz aktivite şartları pH 6–7 ve 60 °C olan ve ihmal edilebilir düzeyde selülaz üreten *Bacillus circulans* AB 16 izolatı ksilanaz aktivitesinin 60 °C'de tamamen korunduğunu. pH 8, 70 °C ve 2.5 saat sürede % 62, pH 9 için ise % 45 aktivitenin korunduğunu bildirmiştir. pH 8 ve 75 °C bir saat sonunda sadece % 22.2 aktivite kalmıştır.

Besiyeri 7'de ( CMC besiyeri ) yapılan selülaz aktivitelerinin ön belirlemesi incelemelerde selülaz negatif (  $S_{2-}$  ) ve ksilan hidrolizi gerçekleştirdikleri için seçilmiş olan izolatlardan Ag2, Ag8 ve Ag35 izolatlarının DNS testi ile selülaz pozitif (  $S_{d+}$  ) özellikte oldukları belirlendiğinden kâğıt hamuru işlemlerine uygun olmadıkları sonucuna varılmıştır. Buna karşın, bu izolatlarla yaptığımız fermentasyon çalışmaları diğer izolatların sonuçlarının değerlendirilmesi açısından önemli olmuştur. Bu izolatların sahip olduğu düşük seviyede selülaz üretim kabiliyeti, selülaz aktivitelerinin ön belirlenmesinde kullanılan Besiyeri 7'de ( CMC Agar ) selülaz üretiminin ön belirlenmesinde kullanılan hidroliz zonu oluşumuna neden olmamıştır. Bu sonuca göre selülaz hidroliz zonu oluşumuna bağlı tarama çalışmalarında, zon oluşturmayan izolatların 1.0 İU / ml ve altındaki düşük seviyede selülaz oluşturuyor olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Ag12, Ag13, Ag20 ve Ag32 izolatları ise selülaz oluşturmadıkları için kâğıt hamuru işlemlerine uygun bulunarak seçilmişlerdir. Ksilanaz preparatlarının selülaz aktivitesi içerip içermemesi kâğıt endüstrisi işlemleri açısından önemlidir. Duarte et al. ( 2000 ), izole ettikleri dört farklı *Bacillus pumilus* izolatının enzim üretimlerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, ksilanaz preparatlarındaki selülaz aktivitesinin lif direncinde azalmaya neden olmasına karşın düşük miktardaki selülaz aktivitesi içeren ksilanaz preparatlarının ayrıca bir saflaştırma işlemine gerek olmadan kâğıt hamuru uygulamalarında kullanılabileceği belirtmişlerdir. Düşük seviyede selülaz aktivitesi ksilanaz preparatlarının kâğıt beyazlatma ön işlemlerinde kullanılması açısından fazla sorun oluşturmamasına rağmen; Ag2, Ag8 ve Ag35 izolatlarının selülaz aktiviteleri zaten düşük olan ksilanaz aktiviteleri yanında önemli kabul edilebilir.



Kâğıt endüstrisindeki enzimatik işlemlerde tuz kullanılması, çevresel ve ekonomik sakıncalar taşıyan bir durum olarak görünmektedir. Çizelge 4.7'de görüldüğü gibi Acı Göl'den izole edilen izolatlarımızın %10 civarında tuz içeren kültür filtratlarında en yüksek ksilanaz aktivitesi %5 ve %10 NaCl içeren ortamlarda belirlenmiştir. İzolatlar için bu tuz konsantrasyonlarındaki ksilanaz aktivitesi farkı, Ag32 izolatu örneğinde görülen 0.2 İU/ml'lik önemsenmeyecek ölçüdedir. %1 NaCl konsantrasyonundaki ksilanaz aktiviteleri de genelde daha düşük olmakla beraber fark yine önemsenmeyecek seviyededir. Bu bakımdan izolatlarımıza ait enzim preparatları kullanılarak yaptığımız kâğıt hamuru enzimatik işlemlerinde tuz kullanılmasına gerek olmayacağı sonucuna varılmıştır.

#### 5.4. Ksilanazların Kâğıt Hamurundaki Etkinlikleri

Ksilanazların kâğıt hamurundaki etkinliği, kâğıt hamurundan enzim uygulanması ile şeker salınımı ve beyazlık artışı ile belirlenebilir ( Khandeparkar and Bhosle 2006b ). Ancak, kâğıt hamurundan şeker salınımı tek başına bir değer taşımamaktadır. Ayrıca, değişik araştırmacıların elde ettiği sonuçlar karşılaştırılırken, kâğıt hamurlarının üretimlerindeki farklılıklara bağlı olarak kâğıt hamuru lifleri üzerinde birikecek olan ksilan oranlarında da değişiklikler olacağı göz önünde bulundurulmalıdır.

Ag12, Ag13, Ag20 ve Ag32 izolatları DNS testi ile selülaz negatif oldukları belirlenmesi nedeni ile kâğıt denemeleri için seçilmişlerdir. Seçilen izolatlara ait enzim preparatlarının kâğıt hamuruna etkilerinin belirlenmesi için ilk olarak izolatlara ait kültür filtratları ile Khandeparkar ve Bhosle 2006'ya benzer şekilde, pH 9.0, 60°C, 10 IU enzim / g fk-hamur ve % 5 fk-hamur şartlarında, uygulanması planlanmış olan enzimatik ön işlemin optimizasyonu yapılmıştır. Denemeler, her izolata ait enzim preparatları için aynı özellikteki farklı kâğıt hamurlarında ve aynı şartlarda gerçekleştirilmiştir. Enzimatik ön işlemin optimizasyonu işleminde belli süreler için kâğıt hamurundan salınan şeker miktarı sonuçları Şekil 4.24'de grafik olarak verilmiştir. Ag32 izolatına ait enzim preparatı, işlem sonunda kâğıt hamurunun gramı başına maksimum 3.6 mg şeker açığa çıkışı ile kâğıt hamurundan en yüksek şeker açığa çıkışı elde edilen enzim preparatı olmuştur. Ag32 izolatına ait enzim preparatı ile elde edilen kâğıt hamurundan şeker salımı sonucunu kâğıt hamurunun gramı başına 2.7 mg'lık şeker açığa çıkışı sonucu ile ikinci en yüksek sonucun elde edildiği Ag12 izolatına ait enzim preparatı izlemiştir. Ag20 ve Ag13 izolatlarına ait enzim preparatları, kâğıt hamurunun gramı başına 1.8 mg ile eşit miktarda şeker açığa çıkararak en düşük şeker salınımına yol açan enzim preparatları olmuşlardır. İzolatlara ait enzim preparatlarının kâğıt hamurundan en yüksek şeker salınımına yol açtıkları süre 120 dakika olduğu için aynı şartlarda uygulanacak kâğıt hamuru enzimatik ön işlemi için 2 saat sürenin yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Paralel olarak yürütülen diğer denemede 120 dakikalık ilk enzimatik işlemin sonrasında, enzimatik ön işlemin optimizasyonu işlemlerinde

kullanılmış olan kâğıt hamurları distile su ile yıkanıp süzöldükten sonra, kâğıt hamurunun enzimatik işleme tabi tutulmalarında kullanılmış aynı izolatlara ait taze enzim preparatları kullanılarak, yine aynı şartlarda enzimatik işleme tabi tutulduklarında izolatların hiç biri için kâğıt hamurundan 0.2 İU/ g fk-hamur değeriinden fazla şeker açığa çıkışı olmamıştır. Bu sonuca göre, izolatların kâğıt hamurundan daha fazla şeker salınımına neden olmadıkları, uygulama için 120 dakikalık sürenin yeterli olduğu ve enzim uygulamada kullanılmış olan şartların izolatlara ait enzim preparatlarının kâğıt hamuru üzerindeki etkinliklerinde sınırlamaya neden olabilecek aktivite kaybına neden olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır.

İzolatlara ait enzim preparatları kullanılarak elde edilen kâğıt hamurundan şeker salımı miktarları işlemde kullanılan kâğıt hamurunun toplam ağırlığı yanında çok düşük değerler olarak görünmektedir. Ancak, kâğıt hamurundan açığa çıkan şeker miktarları; kâğıt hamuru liflerinin üzerini kaplayan çok ince ksilan tabakasının az bir kısmının hidrolizinden kaynaklanması nedeniyle düşük olarak değerlendirilmemelidir. Kâğıt hamurlarının ksilanaz kullanarak enzimatik işleme tabi tutulması ile başlangıçtaki kâğıt hamuru ksilanının % 6.1 gibi çok az bir kısmının parçalanmaya uğraması kâğıt hamuru beyazlatmada iyi sonuçlar alınması için yeterli olabilmektedir ( Schönberg et al. 2001 ). *Trichoderma viride*, *Aureobasidium pullulans* ve *Thermomyces lanuginosus* izolatlarının kâğıt hamurundaki etkinliklerinin incelendiği bir çalışmada, bitkisel kâğıt hamurunun ( 'baggase pulp ' ) gramı başına izolatlar için sırasıyla, 0.32, 0.27 ve 0.22 mg şeker açığa çıkışı bildirilmiştir. Bu şekilde kimyasal beyazlatmada aktif klor tüketiminden 28.3%'e varan kazanç elde edilmiştir ( Anonim 2 2003 ). Yang et al. ( 2005 ), *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 izolatı ile 5 U/ml ksilanaz, 5% hamur yoğunluğu, pH 7.5, sıcaklık 60 °C ve süre 6 saat olarak uyguladıkları ksilanaz ön işlemi sonunda kâğıt hamurunun gramı başına 120 dakikada 0.367 µmol/g, 240 dakikada 0.479 µmol/g şeker açığa çıkışı bildirmişlerdir. Elegir et al. ( 1995 ), *Streptomyces* B-12-2 izolatından saflaştırılmış ksilanaz enzimleri ile pH 7.0, sıcaklık 60°C, süre 3 saat ve fk-hamur 3 IU/g ile gerçekleştirdikleri enzimatik işlem sonunda Xyl la, Xyl 1b, Xyl 3 enzimleri için, kâğıt hamurunun gramı başına sırası ile, 11.3, 15.8 ve 17.3 mg şeker açığa çıktığını belirlemişlerdir. Xyl la ile yapılan işlemde kâğıt hamurundan açığa çıkan 11.3 mg ksilanın, kâğıt hamurunun başlangıçtaki ksilan içeriğinin % 11.4'üne denk geldiği belirtilmiştir.

Seçilmiş izolatlarımıza ait kültür filtratları kullanılarak yapılan enzimatik ön işlemin optimizasyonu bitiminde, her izolat için, işlem sonu filtratlarında bulunan kromofor salımları belirlenmiştir. Lignin temelli fenolik bileşiklerin yoğunluğu 237 nm'de, hidrofobik bileşiklerin yoğunluğu 465 nm'de absorbands ölçülerek belirlenmiştir. ( Khandeparkar et al. 2006b ). Çalışmamızda, değişik izolatlara ait ksilanaz preparatları için kullanılan kâğıt hamurlarının özellikleri, uygulanan enzim dozları ve enzimatik işlem şartları aynı olduğu için kromofor salımı sonuçları açısından izolatlar arasında bir kıyaslama yapılabilir. Ag32 izolatı, 237 nm'de 4.1'lik absorbands değeri ile en yüksek kromofor salımı sonucunu vermiştir. 3.5'den fazla olan yüksek

kromofor salımı sonucu elde edilen Ag8 ve Ag35 izolatları DNS testinde selüloz pozitif olarak belirlendikleri için sadece karşılaştırma açısından ele alınmışlardır. 237 nm'de kromofor salım değerleri Ag20 izolatu için 2.80, birbirine yakın kromofor salım sonucu veren Ag12 ve Ag 13 izolatları için sırası ile 3.6 ve 3.96 olmuştur. Buna göre Ag32 izolatu kâğıt hamuru üzerinde etkinliği en yüksek olan izolat olarak görünmektedir. Ag32 izolatinin enzimatik ön işlemlerin optimizasyonu çalışmasında da kâğıt hamurundan en yüksek şeker salımına neden olması bunu desteklemektedir. Elegir et al. ( 1995 ), *Streptomyces* B-12-2 izolatından saflaştırılmış ksilanaz enzimleri ile pH 7.0, 60°C, 3 saat, 3 IU/g fk-hamur ve %10 hamur yoğunluğu şartlarında gerçekleştirdikleri enzimatik işlem sonunda, Xyl 1a, Xyl 1b, xyl 3 enzimleri için 237 nm'de, yumuşak ağaç ( ladin ve değişik çamlar karışımı ) kâğıt hamurunun gramı başına sırası ile, 9.5, 70.0 ve 78.0, sert ağaç (*Populus tremuloides*, Apsen ) kâğıt hamurunun gramı başına sırası ile, 66.4, 77.0 ve 87.8 (  $A_{237}$ / g hamur ) kromofor salımı elde etmiştir. Elegir et al. (1995), kromofor salımını farklı bir birimde ifade ettiklerinden dolayı, enzimatik işlemi %10 kâğıt hamuru kesafetinde yapılmış oldukları göz önüne alınmalıdır. Bu durumda Elegir ve arkadaşlarının ( 1995 ) verdiği sonuçlar ml'de absorbans olarak değerlendirilmek için 10'a bölünmelidir. Dhillon et al. ( 2000a ), *B. circulans* AB 16 izolatından saflaştırdıkları Xyl A ve Xyl B enzimleri ile, 3 saat, 7 IU/g fk-hamur, 55 °C şartlarında gerçekleştirdikleri kâğıt hamuru enzimatik ön işlemi sonrasında, Xyl A ve Xyl B enzimleri için, sırası ile, 0.11 ve 0.07 kromofor absorbansı elde ederken, saflaştırılmamış kültür filtratı için 0.36 ile daha yüksek absorbans ölçmüşlerdir. Araştırmacılar kâğıt hamuru işlemleri için, saflaştırılmış enzim preparatlarının, saflaştırılmamış ham kültür filtratlarından daha az etkin olduğunu bildirmişlerdir. Değişik araştırmacılarla bildirilen kromofor salınım sonuçları, farklı işlem şartlarında ve farklı kâğıt hamurları ile yapılan işlemlerden elde edildikleri için direkt olarak kıyaslanamazlar. Genel olarak bu sonuçların yüksek olması enzimin kâğıt hamurundaki etkisinin yüksekliğini ifade edebilir. Ksilanazların kâğıt hamurundan şeker ve kromofor salımları ile elde edilecek beyazlık ve kappa sonuçları arasında kesin bir bağlantı bulunmamaktadır. Ancak, Elegir et al. ( 1995 ) belli bir hamur tipinde ve belli bir ksilanazın, belli şartlar için değişik dozları ile yapılan işlemlerde elde edilen kromofor salım sonuçları ile elde edilen beyazlık sonuçları arasında doğrusal bir ilişkinin mevcut olduğunu bildirmiştir.

Ksilanazların kâğıt beyazlatma çalışmalarındaki etkinlikleri konusunda en değerli sonuçlar kappa sayısı ve beyazlık değerleridir. Bunun yanında az da olsa selüloz aktivitesi içeren ksilanaz preparatları için, selülozın kâğıda verdiği zararın belirlenmesi için kâğıdın fiziksel değerlerinin ölçümü de önem kazanır.

Değişik araştırmalarda kullanılan kâğıt hamurlarının farklı özellikte olduğu görülmektedir. Ham bir kâğıt hamurunun özelliklerine örnek olarak, Ibarra ve ark. (2005), ham okaliptüs ( *E. globulus* ) kraft hamurunun yaklaşık %52.2'lik lignin içeriği ile %40 ISO beyazlık ve 15.2'lik kappa değerine sahip olduğunu bildirmiştir. Shatalov and Pereira ( 2007 ), ağırlıkça

% 3.4 oranında lignin içeren ve kağıt fabrikası (Portucel mill, Setúbal, Portugal)'nda üretilmiş ham okaliptüs (*E. globulus* L.) kraft hamurunun % 41.3 beyazlık değerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bim and Franko ( 2000 ) çalışmalarında, kappa sayısı 10.5, beyazlık derecesi % 49.2 olan okaliptüs kraft hamuru kullanmıştır. Bu değerler çalışmamızda kullandığımız ve kappa sayısını 19.93, beyazlık derecesini % 51 olarak ölçtüğümüz ham kâğıt hamuruna yakın değerler olarak görülmektedir.

Kâğıt hamurlarının kappa değerlerinin nasıl yorumlanması gerektiği önemli bir konudur. Değişik tür ağaçlardan ve hammaddelerden, değişik yöntemlerle veya aynı yöntemle değişik şartlarda elde edilen kâğıt hamurlarının kappa sayıları aynı olsa bile bunların beyazlığı genelde farklı olabilmektedir. Bunun nedeni mevcut ligninin kimyasal yapısında doğal olarak bulunan veya uygulanan işlemler sonucu oluşmuş olan kimyasal farklılıklardır. Diğer bir ifadeyle, her lignin aynı renk koyuluğa sahip değildir. Ancak değişik alternatif değerlendirme yöntemleri araştırılmasına rağmen bugün için kâğıt fabrikalarında pişirme ve beyazlatma işlemlerinin kontrolü, delignifikasyonun derecesini belirlemesi için halen en uygun ve yaygın metot olarak kappa testi uygulanmaktadır ( Bostancı 1987, Li and Gellerstedt 1997 ). Düşük kappa sayısı düşük lignin içeriği veya yüksek delignifikasyon anlamına gelir ( Bim and Franco 2000c ). Kappa sayısı ve beyazlık değerleri 1-100 arası değişir. Ham ağaç odunları için kappa sayısı 10 – 70 arasında değişmektedir.

Ksilanazların kullanıldığı kâğıt hamuru beyazlatma işlemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesinde temel bir sorun, değişik çalışmalarda standart yöntemlerin uygulanmamasıdır. Araştırmacıların kullandıkları kâğıt hamurlarının özelliklerinde farklılıklar bulunmaktadır. Değişik araştırmacıların kullandıkları kâğıt hamurları farklı şartlarda elde edilmiş olup saman, sert ve yumuşak ağaç odunları, okaliptüs ve çam odunları gibi farklı hammaddeden yapılmış olmaları gibi farklılıklar göstermektedirler. Ayrıca, araştırmalarda kullanılan ham kâğıt hamurları farklı kappa ve beyazlık derecelerine sahiptir. Farklı çalışmalarda uygulanan enzimatik ön işlem şartları da farklılık göstermektedir. Enzimatik işlem sonrası uygulanan kimyasal beyazlatma işlemlerinde de farklılık bulunmaktadır. Değişik araştırmacılar kappa sayısı 16.9 ( Khandeparkar and Bhosle, 2006b ), kappa sayısı 10.5 ve beyazlık derecesi %49.2 ( Bim and Franko 2000 ), beyazlık derecesi % 42.4 olan *E. globulus* kraft hamuru ( Shatalov and Pereira 2007 ); kappa sayısı 19.93, beyazlık derecesi %51 ( Khandeparkar and Bhosle 2006b ); Kappa sayısı 17.8 olan saman hamuru ( Zhao et al. 2005 ) gibi farklı kâğıt hamurları kullanmışlardır. Elegir et al. ( 1995 ), ksilanazlarla ön işlem uyguladıkları kâğıt hamuru beyazlatma çalışmalarında kullandıkları sert ağaç ( *Populus tremuloides*, *Apsen* ) kraft hamurunun kappa numarasının 9, yumuşak ağaç ( ladin ve değişik çamlar karışımı ) kraft hamurunun kappa numarasının 26 olduğunu bildirmiştir. Saman gibi 'baggase pulp' olarak adlandırılan otsu bitkilerden kâğıt hamuru ve kâğıt yapımı bazı ülkelerde yaygın olmasından dolayı, çalışmalarda ağaç harici kaynaklardan elde edilen kâğıt hamurlarının kullanılmasına da

oldukça sık rastlanılmaktadır. Christopher et al. ( 2005 ), *Thermomyces lanuginosus* ksilanazı ile yaptıkları çalışmada kappa sayısı 8.8, beyazlık derecesi % 39.3 olan otsu bitki soda hamuru kullanmışlardır. Chauhan et al. ( 2006 ), “open hot digestion” yöntemi ile elde ettikleri buğday samanı kâğıt hamuru ile *B coagulans* izolatına ait ksilanaz preparatının kâğıt beyazlatmaya etkisini araştırmışlardır. Khandaparker and Bhosle ( 2006 ), değişik araştırmacıların sert ağaç, saman, okaliptüs ve huş krafttı gibi değişik hamurları kullandığını belirtmiştir. Kâğıt hamurlarının ksilanazlarla enzimatik ön işleme tabi tutulma şartları farklı çalışmalarda değişik şartlarda yapılmıştır. Fungal ksilanazlarla enzimatik ön işlemler asidik pH değerlerinde yapılabilmektedir. Zhao ve ark. (2005), *Penicillium decumbens* A10 ve *Aspergillus aculeatus* L22 izolatlarına ait ham enzim preparatları ile saman hamuru enzimatik ön beyazlatma işlemlerini 3 IU/g hamur, pH 6.7, sıcaklık 40 °C ve süre 90 dakika şartlarında gerçekleştirmişlerdir. Yang et al. ( 1995 ), *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 izolatı ksilanazı ile saman hamuru enzimatik ön beyazlatma işlemlerini 5 IU/g hamur, pH 7,5, 60 °C, 6 saat şartlarında gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarda uygulanan kâğıt hamuru kimyasal beyazlatma şartları ve aşamaları farklılık göstermektedir. Atik ve diğerleri ( 2006 ), O,EDTA, P ( O, oksijen; P, Peroksit ) aşamalarını takip etmiştir. Zhao et al. ( 2005 ) ve Christopher et al. ( 2005 ), CEH ( Klor, Ekstraksiyon, Hipoklorür ); Ninawe and Kuhad ( 2005 ), *Streptomyces cyaneus* SN32 ile yaptıkları çalışmada CEHH; Chauhan et al. ( 2006 ), EDTA, P ( Peroksit ) beyazlatma aşamalarını takip etmiştir. El-Sakhawy ( 2005 ) şelatör olarak DTPA ilaveli hidrojen peroksit ( P ) beyazlatma işlemi gerçekleştirmiştir. Zhao et al. ( 2002 ) *Aspergillus niger* An-76 ksilanazı ile yaptıkları enzimatik ön işlem sonrasında HP ( hipoklorit, peroksit ) dizisi şeklinde kimyasal beyazlatma uygulamışlardır. Benzer kimyasal beyazlatma işlemlerinin kullanıldığı çalışmalarda da farklılıklar görülmektedir. Bissoon et al. ( 2003 ), CEH dizisindeki kimyasal beyazlatma işlemindeki H aşamasını %1.5 hipoklorit, 135 dakika, 70 °C, %12 kesafet; C aşamasını % 4.75 klor, 45 dakika, 45 °C, %3.2 kesafet şartlarında gerçekleştirirken, Zhao ve ark. (2005), CEH dizisindeki kimyasal beyazlatma işlemindeki H aşamasını 90 dakika, 38–40 °C, %5 kesafet; C aşamasını 60 dakika, %3 kesafet şartlarında gerçekleştirmiştir. Ninawe and Kuhad ( 2005 )'in kullandıkları CEHH dizisindeki kimyasal beyazlatma işlemindeki şartlar da farklılık göstermektedir.

Farklı ksilanaz enzimlerinin belli bir kâğıt hamurlarındaki ksilanı çözme yetenekleri de farklılık gösterir. Bunlara ek olarak belli bir enzimin farklı kâğıt hamurlarındaki ksilanazı çözme yeteneği de farklılık gösterecektir. Ayrıca, farklı ksilanazlar farklı tip ksilanlar üzerinde değişik aktivite gösterebilmektedir. Ksilanazlar arasındaki bu farklılıklar, farklı beyazlatma sonuçlarının elde edilmesine neden olur. Li et al. ( 2005 ), *Thermomyces lanuginosus* CBS 288,54 izolatına ait saflaştırılmış ksilanazın, %100 olarak alınan Birchwood xylan'a kıyasla, Beechwood xylan'a % 65, Oat-spelt xylan'a % 102, insouble oat-spelt xylan'a % 56, çözümlü oat-spelt xylan'a % 128.1 substrat seçiciliği gösterdiğini belirlemişlerdir. Elegir et al. ( 1995 ), *Streptomyces* B-12-2 izolatından saflaştırılmış Xyl 1a ve xyl 3 ksilanaz enzimleri ile sert ağaç odunlarında 237 nm de

ölçülen kromofor salımı daha yüksek olmuştur. Bu enzimlerden xyl 1b, her iki tip hamurdan da daha fazla kromofor açığa çıkarmıştır. İki enzimin kombinasyonu ile açığa çıkan kromofor miktarı enzimlerin tek başına kullanılmasına kıyasla daha yüksek olmuştur. Bu durum, kâğıt hamurlarında ksilanazların etkisini sınırlandıran ve farklı hamurlarda farklılık gösteren bazı doğal engellerin bulunduğu şeklinde yorumlanabilir.

Khandeparkar and Bhosle ( 2006b ), ksilanazların kâğıt hamurundaki etkinliğinin, kâğıt hamurundan şeker salınımı ve beyazlık artışı ile belirlenebileceğini bildirmiştir. Ancak, ksilanazların kâğıt hamuru etkileri değerlendirmesinde ve değişik araştırmaların sonuçları kıyaslanırken, elde edilen kappa ve beyazlık değerleri ile beyazlık artışı ve kappa sayısında düşüş değerleri üzerinde durulması önemli görülmektedir.

Kappa numarası veya kappa sayısı ölçümü kâğıt hamurundaki lignin miktarının kimyasal olarak ölçüldüğü bir yöntemdir. Kappa numarası yerine bazen permanganat sayısı terimi de kullanılmaktadır. Kappa numarasının belirlenmesi pişirme işleminin temel amacı olan lignin giderilme oranının, başka bir deyişle, kâğıt hamurundaki kalıntı ligninin ölçülmesini sağlar. Kappa numarasının belirlenmesi, pişirme şartlarının kontrolünde ayrıca sonraki beyazlatma aşamalarının kontrolü ve gerekli beyazlatıcı miktarlarının hesaplanmasında önemli ve kolay bir ölçümdür. Kappa sayısı sadece hamurun ağartılabilme durumunu değil, aynı zamanda delignifikasyon derecesinin belirlenmesinde de kullanılır. Kolay ağartılabilir bir hamurun kappa sayısı 6–10 arasında veya daha düşüktür. Zor ağartılabilecek bir hamurun kappa sayısı 14'den yukarıdadır. Bu durum pişirmenin artırılması gerektiği veya yetersiz olduğu şeklinde yorumlanabilir. Kappa sayısı 20'den yukarı olan bir hamur ticari olarak ağartılamaz. Bu durumdaki lignin içeriği fazla olan hamurlara sert hamur denilir. Diğer bir ifadeyle, pişirme yetersiz ve delignifikasyon derecesi düşüktür. Ayrıca, hamurda hemiselüloz oranı düşükse dövülerek liflenmesi zorlaşır. 10–14 gibi orta derecede kappa sayısına sahip hamurlar liflenme ve beyazlatma için idealdir ( Doğan 2004, Bostancı 1987 )

Kappa ve beyazlık derecelerinin belirlenmesi için ilk olarak DNS testi ile kültür filtratlarında hiç selüloz aktivitesi belirlenememiş olan Ag12, Ag20 ve Ag32 izolatlarına ait enzim preparatları ile işlem görmüş, daha sonra kimyasal beyazlatma uygulanmış kâğıt hamurları kullanılmıştır. Ag20 ve Ag13 izolatlarına ait enzim uygulamasında kâğıt hamurundan iki saatlik sürede aynı miktar indirgen şeker açığa çıkmış olmasına karşın, Ag20 izolatı fermentasyonlarda daha fazla enzim ürettiği için kâğıt beyazlatma aşaması için Ag13 izolatına tercih edilmiştir. Kimyasal beyazlatmalar sonunda bir kısım hamur yıkanıp kurutulduktan sonra kappa testinde kullanılırken, diğer bir kısım hamur da beyazlığın ölçülebilmesi için kâğıt haline getirilmiştir. İşlem her izolat için ayrı ve iki tekrarlı uygulanmıştır. Enzim preparatları kâğıt beyazlatma işlemlerinde kullanılan Ag12, Ag20 ve Ag32 izolatları için elde edilen kappa değerleri sırası ile 7.04, 3.72 ve 2.39, elde edilen beyazlık değerleri de, yine sırası ile, 80, 80.5 ve 82 olmuştur. Ag12, Ag20 ve Ag32 izolatları için elde edilen bu beyazlık dereceleri enzimatik işlem görmemiş

ve aynı şartlarda peroksit beyazlatmasına alınan kontrol ile kıyaslandığında sırası ile % 1, % 1.5 ve % 3'lük beyazlık artışı sağlanmıştır. Ag32 izolatu ile kontrole kıyasla en yüksek kappa sayısı düşüşü ve en yüksek beyazlık artışı elde edilmiştir. Ag12, Ag20 ve Ag32 izolatları ile kontrole göre kappa sayısı düşüşleri sırası ile 2.67, 5.99 ve 7.32 olmuştur. Beyazlık artışları ise yine sırası ile %1, %1.5 ve %3 olmuştur.

Kâğıt hamuru beyazlatma çalışmamızda kullandığımız Ag12, Ag20 ve Ag32 izolatları için elde edilen beyazlık artışı ve kappa sayısı değerleri başka araştırmacılarla kıyaslandığında, beyazlık artışı değerleri düşük olmasına karşın birçok araştırmacının elde ettiği sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Christopher et al. ( 2005 ), *Thermomyces lanuginosus* ATCC 36350 ve ATCC 46882 kültürleri ile CEH kimyasal beyazlatma serisinde %0.5 ve %0.4'lük düşük beyazlık artışına karşı %20'lik bir klor tüketimi kazancı sağlanabildiğini, klor tüketimi kazancı sağlanmadan uygulanacak uzatılmış bir işlemle ise %1–1.5 arası beyazlık artışı elde edilebildiğini bildirmiştir. Khandeparkar and Bhosle ( 2006b ), *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 izolatu ksilanazı ile kappa numarası 16.9 olan kraft kâğıt hamuruna, 20 IU/g fk-hamur, 70 °C, pH 9.0 şartlarında enzimatik ön işlem uygulamıştır. Daha sonraki HC ( Peroksit ve NaOCl ) kimyasal beyazlatma işleminde 3.9 kappa numarasın, %83.9 beyazlık elde edilmiştir. Enzim uygulaması hariç aynı işlemler uygulanmış olan kontrol ile 5.3 kappa, %79.11 beyazlık değerleri elde edilmiştir. Zhao et al. ( 2005 ), kappa sayısı 17.8 olan saman kâğıt hamuruna, *Penicillium* ve *Aspergillus* izolatlarına ait ham ksilanaz preparatları ile 4 IU ksilanaz /g pulp, pH 6.7, 40°C, 90 dakika ve %5 hamur kesafeti şartlarında enzimatik ön işlem uygulamışlardır. Saman kâğıt hamurunun CEH ( Klor, ekstraksiyon, hipoklorit ) aşamalarını izleyen kimyasal beyazlatması ile son beyazlık % 80.2 olurken, *A. niger* An76 izolatu ksilanaz preparatı ile ön işlem ve kimyasal beyazlatmanın uygulandığı XCEH ( Ksilanazla ön işlem, klor, ekstraksiyon, hipoklorit ) işlemi ile son beyazlık % 84.7 olmuştur. Araştırmacılar fungal izolatlara ait ham ksilanaz preparatları ile saman kâğıdı hamuru ön işlemleri ile kappa sayısında %6.29 – 12.07% azalma, 4–5% ISO beyazlık artışı, kimyasal beyazlatmadaki klor gereksiniminin de ise % 20–30 azalma sağlamışlardır. Kulkarni and Rao ( 1996 ), alkalotermofilik *Bacillus* sp. izolatinın selülaz negatif ksilanaz preparatı ile işlemden sonra peroksit beyazlatması uyguladıkları otsu bitki kâğıt hamurunda, kontrole kıyasla, %2.5 beyazlık artışı ve kappa sayısında 10 ünite düşüş elde etmişlerdir. Chauhan et al. ( 2006 ), *B. coagulans* izolatına ait kültür filtratı ile buğday samanı kâğıt hamuruna 20 IU ksilanaz /g fk-hamur, % 6 hamur yoğunluğu, 55 °C, pH 8.5 ve 3 saat şartlarında gerçekleştirdikleri enzimatik ön işlemin ardından, kâğıt hamurlarını % 2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; % 1, NaOH; 70 °C; 2 saat şartlarında kimyasal beyazlatmaya almışlardır. Enzimatik işlem ile kontrole göre 2.2 mg / ml şeker salımı belirlemişlerdir. Kimyasal beyazlatma sonunda kappa sayısında kontrole göre 2.6 artış ve % 3.4 ( % İSO ) beyazlık artışı elde edilmiştir. Zhao et al. ( 2002 ), *Aspergillus niger* An–76 ile buğday samanı enzimatik ön işlemini, işlem için uygun şartlar olarak belirttikleri 4 IU/g, 48°C, 6 - 8 saat ve pH 5.0 şartlarında gerçekleştirerek, sonraki kimyasal

beyazlatma işlemi sonrasında, kontrole kıyasla %3 beyazlık artışı elde etmişlerdir. Shatalov and Pereira ( 2007 ), ticari Pulpzyme HC xylanase ( Novozymes A/S, Denmark ) ve Ecopulp® TX-200A ( AB Enzymes, Germany ) ksilanaz preparatları ile % 41.3 beyazlık ve % 3.4 kalıntı lignin içeren *E. globulus* kraft hamurunda ksilanaz enzimatik ön işleminin ardından kimyasal beyazlatma yapmışlardır. Enzimatik işlem pH 7.0, 60 °C ve 180 dakika şartlarında uygulanmıştır. Daha sonra, XQP sırasında ( X, ksilanaz; Q, şelatör; P, 3,0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ) kimyasal beyazlatma uygulanmıştır. enzimatik ön işlem ( X aşaması ) hariç aynı işlemlerden geçirilmiş kâğıt hamuru, kontrol olarak kullanılmıştır. İşlem sonrasında kontrol hamurunda % 1.87 ( g / g ) lignin, % 74,8 ( ISO ) beyazlık, Ecopulp enzim denemesi hamurunda % 1.57 lignin, % 77.9 beyazlık; Pulpzyme enzim denemesi hamurunda % 1.6 lignin, % 76.9 beyazlık elde edilmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında Ecopulp enzim denemesinde % 3.1, Pulpzyme enzim denemesinde ise % 2.1 beyazlık kazancı sağlanmıştır. Dhillon et al. ( 2000b ), *B. circulans* AB 16 izolatının fermentasyonunda elde edilen ham ksilanaz preparatı kullanılarak 3 saat, 7 IU/g fk-hamur ve 55 °C şartlarında gerçekleştirdikleri kâğıt hamuru enzimatik ön işlemi sonrasında CEH aşamaları dizisinde kimyasal beyazlatma uygulamışlardır. C aşamasında % 3.6'lık, kimyasal uygulama sonrasında kontrolde % 45, enzimatik işlem görmüş hamurda % 35 beyazlık elde edilmiştir. Kimyasal beyazlatma sonunda kontrole kıyasla % 5 beyazlık artışı ve yaklaşık 2.5 kappa sayısı düşüşü elde edilmiştir. Khandeparkar and boshe ( 2006b ), değişik kaynaklara dayanarak beyazlatma çalışmalarında kullanılan *Streptomyces thermoviolaceus* ksilanazı ile %16 ( kappa sayısında % 25 düşme ) , *Bacillus pumilus* ksilanazı ile % 14, *Bacillus* sp. NCIM 59 ksilanazı ile % 2.5, diğer bir *B. pumilus* izolatının ksilanazı ile % 6.5, kendi çalışmalarında ise *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 ksilanazı ile % 9.6 kâğıt hamuru beyazlık artışı elde edildiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacıların farklı kaynaklardan elde ettikleri bilgilere dayanarak; bazı bakteriyel ksilanazların kullanıldığı kâğıt hamuru enzimatik işlem şartları ve sonuçları Çizelge 5.3'de verilmiştir. Aynı çizelgede yüksek kappa ve beyazlık oranları elde edilmiş bazı çalışmaların sonuçları da görülmektedir.



**Çizelge 5.3.** Bazı bakteriyel ksilanazlarla kâğıt hamuru ön işleme sonuçları ( Khandaparker and Bhosle 2006b )

Organizma	Enzimatik ön işlem şartları					Kapa num. (Düşüş (%))	Beyazık artışı (%)	Hamur tipi
	IU/g-fk hamur	pH	Sıcaklık °C	Süre (saat)				
<i>Bacillus</i> sp.	10 - 40	7	50	4	-	2.5	Saman	
<i>B. circulans</i> AB 16	7	-	55	3	-	-	Okalıptüs Kraft	
<i>B. pumilus</i>	20	9	50	3	14	6.5	Okalıptüs Kraft	
<i>B. pumilus</i> CBMAİ 008	150	7	60	3	-	4.5	Saman	
<i>Arthrobacter</i> sp. MTCC	10	9	60	1.5	-	-	Okalıptüs Kraft	
<i>Streptomyces</i> SP. QG-11	10	6	65	3	16	6.9	Huş Kraft	
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	3.5	8.5	50	2	25	9.6	Okalıptüs Kraft	
<i>Thermomyces longuinensis</i>	20	9	70	2	19.6	9.6	Sert Ağaç	

### 5.5. İzolatların Tanılanması

Seçilmiş izolatlarımızın mikroskopik incelemelerde spor oluşturan basiller olduğu görülmüştür. İzolatlarımızın genus seviyesinde tanımlanmaları, aerobik, gram pozitif, endospor oluşturan basiller olmasından yola çıkarak ve Çizelge 4.11'de endospor oluşturan standart genuslar için verilmiş karakterlerden faydalanarak Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'e ( Holt 1994 ) göre yapılmıştır. İzolatlarımızın *Bacillus* genusu üyesi olduğu sonucuna varılmıştır. Catia et al. (2008), denizden izole ettikleri *Bacillus* izolatlarının genus seviyesinde tanısını Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'ye ( Sneath 1986 ) göre yapmışlardır. *Bacillus* genusu üyelerinin Çizelge 4.11'de verilen diğer endospor oluşturan gram pozitif bakteri genuslarından ayırıcı önemli karakterleri söz konusudur. *Oscillospira*, kültürde geliştirilememiş, anaerobik, 2.5 µm'den büyük çapta hücreler ve sadece bir türe sahip olmakta; Nutrient Agar besiyerinde krem-kavuniçi koloniler oluşturan *Sporosarcina*, tetrat-paket şeklinde düzenlenen kok formunda hücrelerden oluşmasıyla diğer endosporlu bakteri genuslarından kolayla ayrılmaktadır. *Sporohalobacter*, *Desulfomaculatum*, *Syntrophospora*, *Oscillospira* ve *Clostridium* üyeleri, zorunlu anaerobik olmasıyla *Bacillus* üyelerinden kolayca ayrılabilirler. zorunlu anaerobik *Desulfomaculatum* üyelerinin doğal habitatı rümendir ( Sneath 1986 ). Az sayıda türe ayrılmış olan *Amphibacillus* üyeleri, fakültatif anaerobik, mezofilik, alkalifilik ve soda göllerinden izole edilen ksilan hidrolize edici izolatlara sahip olup bu özellikleri ile izolatlarımıza benzemektedirler ( Garnova et al. 2001 ). Ancak, *Amphibacillus* üyeleri oksidaz ve katalaz negatif olmakla *Bacillus* üyelerinden ayrılabilirler. Ayrıca, Garnova et al. ( 2001 ), *Amphibacillus*

izolatlarının nişastayı hidrolize edebildiğini belirtmiştir. *Sulfidobacillus* ( sinonim; *Sulfobacillus* ) üyeleri sıkı aerobik olmalarına ilave olarak, optimum pH 1.9–2.5 ve sıcaklık 50 C<sup>o</sup>de, asidik şartlarda, sülfürü okside ettikleri pirit madenlerinden izole edilmektedir ( Sneath 1986 ).

Seçilmiş izolatlarımızın biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri verilmiş olan Çizelge 4.8'de, mannitol, ksiloz ve glukozdan asit oluşturma testleri ile yine karbonhidratlardan asit oluşturma ile ilgili testler olan TSİ ve MR testlerinde hem her izolata ait sonuçlarda hem de izolatlarımızın arasında farklılıklar olduğu dikkati çekmektedir. Bunun nedeni olarak izolatların bu testlerde asit oluşturma açısından zayıf olması düşünülmüştür. Şekerler ve glukozdan asit oluşturma testleri ile TSİ besiyerinin pH indikatörü olan fenol red'in pH 6.6 altında pozitif sonuç olarak değerlendirilen sarı rengi almasına karşın, pH indikatörü metil red pozitif sonuç olarak değerlendirilen kırmızı rengi pH 4.4 altında almaktadır. Glukozdan asit oluşturma incelenmesinde portakal rengi veya pembe renk sonuçlar pH 6,6 – 8.0 arası zayıf asit oluşumunu göstermektedir. The Prokaryotes'de ( Slepecky and Hemphill 1992 ) *Bacillus* genusunun non-medikal bazı yaygın türleri için glukozdan asit oluşturma testinde pozitif ve negatif olarak farklı sonuçlar olabileceği gösterilmiştir. Çizelge 4.10'deki verilere göre Ag2 izolatının diğer seçilmiş izolatlardan farklı olarak asidik ürün oluşturmamakta olduğu görülmektedir.

İzolatlarımızın biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri, başka araştırmacıların alkali ortamlardan izole ettiği *Bacillus* sp. izolatlarından elde ettiği sonuçlarla kıyaslanabilirler. İzolatlarımızın, lesitinaz, nişasta ve kazein hidrolizi açısından genelde negatif oldukları görülmektedir. Berber ve Yenidünya ( 2005 )'nin, tuzluluğu %2.17 ve pH'sı 9.7–9.8 olan Van Gölü'nden izole ettikleri ve hepsi oksidaz ve katalaz pozitif olan endosporlu, gram pozitif 17 *Bacillus* sp. izolatından sadece 2 tanesi nişasta hidrolizi pozitif bulunmuştur, izolatların hepsi mannitol ve ksilozdan asit oluşturma, V-P, tirozin kullanımı , %7 ve 10 NaCl'de, 50 °C'de gelişme negatif bulunmuştur. 45 °C'de sadece 5 izolat gelişmiştir. Sadece 2 izolat H<sub>2</sub>S, bir izolat sitrat pozitif bulunmuştur. Berber ve Yenidünya ( 2005 ), Van gölü suyu ve çevresi topraklardan izole ettikleri *Bacillus* izolatlarını, izolatlarımıza benzer şekilde geniş pH aralığında, pH 6,8 ve 10,5 arasında gelişebildikleri için fakültatif alkalifilik olarak tanımlamıştır. Benzer şekilde seçilmiş sekiz izolatımız fakültatif alkalifilik olarak tanımlanabilmektedir. Berber ve Yenidünya ( 2005 )'nin incelediği izolatların bu açılarından seçilmiş izolatlarımıza benzerlikler taşıdığı görülmektedir. İzolatlarımızın hiç biri 55°C'de ve daha yüksek sıcaklıklarda gelişmediği için termofilik ve termotolerant olmadıkları düşünülmüştür. Tuz ( NaCl ) içermeyen NA'da gelişemeyen Ag2, Ag32 ve Ag35 izolatları hariç, İzolatlarımızın hepsinin % 0 -10 NaCl içeren NA'da gelişebilmeleri ve pH'sı 8.5 olan NA ortamında en iyi geliştiği tuz konsantrasyonlarının % 2 – 5 NaCl olarak gözlenmesi, izolatlarımızın tuzcul ortamda gelişmeye uyumlu olduklarını göstermektedir. İzolatlarımızın %10 NaCl'de gelişebilmeleri, Bu açıdan Berber ve Yenidünya ( 2005 )'nin Van gölünden izole ettikleri *Bacillus* sp. izolatlarından farklı olduklarını göstermektedir. Uçar ve

Şentürk ( 1995 ), farklı ortamlardan aldıkları 14 toprak ve 6 su örneğinden alkalifilik bakterilerin izolasyonunu ve tanısını gerçekleştirdikleri çalışmada elde ettikleri 20 izolattan 12 tanesini *Bacillus* genusu üyesi olarak belirlemişlerdir. Elde ettikleri *Bacillus* izolatlarının hepsinin seçilmiş izolatlarımıza benzer şekilde, hem pH 7 ve pH 10'da, hem de %10 NaCl'de gelişebildiğini belirlemişlerdir. %15 NaCl'de gelişebilmiş olan. bir izolat ise araştırmacılar tarafından *Halobacterium* türüne uygun bulunmuş olup Bornova botanik bahçesi toprağından izole edilmiştir.

*Bacillus* genusu üyelerinin tür seviyesinde tanımlaması çok zordur. Gram-pozitif, endospor oluşturan aerobik veya fakültatif anaerobik basillerden oluşan *Bacillus* genusu filogenetik ve fenotipik olarak oldukça yüksek çeşitliliğe sahiptir ( Freitas et al. 2008 ). Birçok çalışmada *Bacillus* genusunun, diğer bakteriyal genoslardan çok daha fazla fenotipik çeşitliliğe sahip olduğu öne sürülmüştür ( Berber ve Yenidünya 2005 ). Ksilanazlar ve kâğıt beyazlatmada kullanımları konusundaki birçok yayında *Bacillus* izolatlarının sadece genus düzeyinde tanımlanmış oldukları görülmektedir ( Yang et al. 1995, Nakamura et al. 1995, Kulkarni and rao 1996, Carlos et al. 2002, Sánchez at al. 2003, Roy and Belaluddin 2004, Virupakshi et al. 2005 ). Alkali ortamlarda bulunan *Bacillus*ların değişik gurupları bulunmaktadır. Özellikle alkalifilik *Bacillus* genusu üyeleri geniş çeşitliliğe sahip strainler içerir. Fritze et al. ( 1990 ), *Bacillus alcalophilus*, *B. marinus* ve *B. pantothenicus* tip strainleri ve değişik kültür koleksiyonlarından, tanımlanmış 78 alkalifilik *Bacillus* izolatını biyokimyasal ve moleküler tekniklerle inceledikleri çalışma sonunda birçok alkalifilik *Bacillus* izolatı için yeni türler oluşturulması gerektiğini belirtmişlerdir. 16S rRNA gen sekansları bakımından identik bulunan birçok *Bacillus* izolatı da genetik ve fenotipik heterojeniteye sahiptir. Ancak, klasik testler *Bacillus* izolatların genus seviyesinde, bazen de tür seviyesinde identifikasyonunda kullanılabilir ( Freitas et al. 2008 ). Berber ve Yenidünya ( 2005 ), fenotipik testler, DNA hibridizasyonu, rRNA analizleri ile incelenmelerine karşın alkalifilik *Bacillus* izolatlarının tanımlanmasında sorunlar olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, Van Göl'ünden izole ettikleri 17 *Bacillus* izolatının biyokimyasal testler ve ekstra hücresel protein profillerini inceleyerek, bazı izolatlarının yeni türlerin temsilcileri olabileceğini belirtmişlerdir. *Bacillus* türleri içinde tarihsel olarak farklı türler olarak bilinen bazı organizmaların gerçekte aynı tür olarak ele alınabileceği belirtilmiştir. *B. cereus* grup olarak adlandırılan *Bacillus* gurubu içinde yer alan *B. thuringiensis*, *B. anthracis* ve *B. cereus* türlerinin tüm genom DNA hibridizasyonu ve rRNA genleri açısından tek bir tür olarak ele alınmalarını gerektirecek kadar benzer oldukları belirtilmiştir ( Priest et al. 2004 ). *Bacillus* genusu son yıllarda yoğun taksonomik değişikliklere gitmiştir (Catia at al. 2008). *Bacillus* genusunda 222'den fazla tür tanımlanmış bulunmaktadır ( Ki et al. 2009 ). Ancak, yeni türlerin büyük çoğunluğu nadir bulunan izolatlardır.

Kısım 3.2.13. ve 4.5.7.2'de belirtildiği şekilde, seçilmiş izolatlarımızın yaygın olarak izole edilebilen *Bacillus* türlerine benzerlik olasılıkları incelenmiştir. Priest and Alexander ( 1988 ),

Bergey' Manual of Systematic Bacteriology ( Sneath 1986 ) ve Fritze at al. ( 1990 )'in verdiği standart, yaygın *Bacillus* türlerinin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri ne ait olasılık bilgileri ile kısım 3.2.13'de anlatıldığı şekilde, Çizelge 4.12'de verilmiş olan matriks hazırlanmıştır. Oluşturulan matriks, Minitab programı kullanılarak istatistiksel analize alınmış ve Şekil 4.26'da verilmiş olan 'Correlation Coefficient Distance, Complete Linkage' % benzerlik dendogramı şekillendirilmiştir. Şekil 4.24'de verilmiş olan benzerlik dendogramında seçilmiş izolatlarımız Ag2, Ag8, Ag12, Ag13, Ag20, Ag32, Ag35 % 80 – 85 olasılıkla *B. pumilis*' e yakın bulunmuştur. İzolatların *B. pumilis* olması konusunda şüphe uyandırıcı bir durum, *B. pumilis*'in oksidaz negatif olmasıdır. Ag2 izolatu, Çizelge 4.8'de görülebileceği gibi, glukozdan asit oluşturma testinde alkali ürünler oluşumunun göstergesi olarak vişne rengi sonuç elde edilmesi, diğer karbonhidratlardan asit oluşumu testleri ve oksidaz negatif olması ile diğer izolatlardan farklıdır. Bunun yanında, yine diğer izolatlarımızdan farklı olarak tuzsuz besiyerlerinde gelişmemektedir.

### 5.6. Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda Acı Göl (Denizli – Türkiye)'den elde ettiğimiz izolatların ksilanaz üretimlerinin genelde çok yüksek olmadığı, ancak ucuz bitkisel substratlarla ve pahalı gelişme faktörlerine gereksinim duymadan ksilanaz üretiminde kullanılabilirleri tespit edilmiştir. Kâğıt beyazlatma işlemleri için seçtiğimiz izolatlarımız ile kâğıt hamuru işlemleri sonunda elde ettiğimiz kappa ve beyazlık sonuçları literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında, çok yüksek değerlerde olmamalarına karşın bir çok çalışma ile uyumlu oldukları görülmektedir. Ayrıca bu araştırmada, kâğıt endüstrisinde kullanılabilir özellikte ksilanaz üreten mikroorganizmaların mikrobiyal flora içinde az oranda bulunduğu ve bu tip mikroorganizmaların aranmasının çalışmaların önemli kısmını oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Diğer taraftan, bu çalışmada kullanılan Besiyeri 3, 4 ve 6'nın benzer konudaki çalışmalarda istenen özellikteki mikroorganizmaların izolasyonu için uygun olduğu belirlenmiştir.

Kâğıt sektöründe çevresel kirliliğin azaltılması tüm Dünya ülkelerinin önemli bir sorunu haline gelmiştir ve bu konuda çevreci toplumun da gittikçe baskıları artmaktadır. Ayrıca, enzimlerin ithal edilmesi önemli bir ekonomik yük oluşturmaktadır. Ksilanazlar fazla ekonomik yük oluşturmaktan, karışık donanım ve teknikler gerektirmeden kâğıt beyazlatma işlemlerinde kullanılabilirler. Böylece, beyazlatıcı kimyasallarda bir miktar azalma ve tasarruf sağlanabilmesi yanında, klasik tip beyazlatma işlemlerinde toksik madde atılımında düşüş sağlanabilir. Ayrıca, ksilanazların başka alanlarda da kullanım imkânı bulunduğu unutulmamalıdır. Bu bakımdan konuyla ilgili olarak yabancı tip mikroorganizma strainleriyle ucuz bitkisel hammaddeler ya da endüstriyel atıklar kullanılarak, ucuz yoldan enzim üretiminin elde edilebileceğinin, ülkemize özgü kaynakların oluşturulabileceğinin bilinmesi gerekmektedir. Çalışmamızın yapılacak benzer araştırmalara özellikle metod ve verilerin değerlendirilmesi aşamalarında katkıda bulunarak ön kaynak teşkil edebileceğini düşünmekteyiz.

## 6. KAYNAKLAR

1. **Akhtar, M., Kirk, T.K., Blanchette, R.A.,1996.** Advances in Applied and Fundamental Research. Biopulping: An overview of consortia. in the pulp and paper industry, in: Srebotnik, E. Messner K., ( editör ), Biotechnology in the pulp and paper industry - recent advances in applied and fundamental research:. Proceedings of the 6th international conferance on Biotechnology in the pulp and paper industry; Vienna, Austria: Facultas-Universitätsverlag. pp. 187–192.
2. **Altınsoç S., Mezquita F., 2008 .** Ostracod fauna of salt Lake Acıgöl. Journal of Natural History. 42 ( 13–14 ), 1013–1025.
3. **Altonen T M., J., El., Salo H.M., Markkula S.E., Lammi R., 2000.** Modulation of immune parameters of roach, *Rutilus rutilus*, exposed to untreated ECF and TCF bleached pulp effluents, *Aquat. Toxicol.* 47(3-4), 277-289
4. **Altundağ Ş., 2004.** Sanayi İçin Alternatif Ormanlar, Aksiyon Dergisi, Sayı: 510, 13–14
5. **Andretta C.W.S., Rosa R.M., Tondo E.C., Gaylarde C.C., Henriques J.A.P., 2004.** Identification and molecular characterization of a *Bacillus subtilis* IS13 strain involved in the biodegradation of 4,5,6-trichloroguaiacol, *Chemosphere*, 55 ( 4 ), 631–639.
6. **Andretta C.W.S., Rosa R.M., Tondo E.C., Gaylarde C.C., Henriques J.A.P., 2004.** Identification and molecular characterization of a *Bacillus subtilis* IS13 strain involved in the biodegradation of 4,5,6-trichloroguaiacol, *Chemosphere*, 55 ( 4 ), 631–639.
7. **Anonim 1. T 205 sp-95. TAPPI STANDARD PRACTICE – 1995.** The procedure for forming handsheets for determining the optical properties of pulp is described in TAPPI T 218 “Forming Handsheets for Reflectance Tests of Pulp.” TAPPI Information Resources Center. Effective date of issue: December 18, 1995.
8. **Anonim 2. Bissoon ve ark. Bissoon S., Singh S., Christov L., March 2003.** Synergistic Interactions Of Purified Xylanases On Bagasse Pulp Hemicellulose. TAPPSA J.. March 2003 ( [http://tappsa.co.za/archive/Journal\\_papers/journal\\_papers.html](http://tappsa.co.za/archive/Journal_papers/journal_papers.html)'den son erişim mart 2009 ) .
10. **Anonim 3. Grant R., Grant J., 2001.** Biotechnology research continues at a rapid pace, *Pulp & Paper International Magazine ( PPI )* , August, 2001. ( [paperloop.com/db\\_area/archive/ppi\\_mag/2001/0108/ppi6.htm](http://paperloop.com/db_area/archive/ppi_mag/2001/0108/ppi6.htm)'den son erişim mart 2009 ) .
11. **Anonim 4. 1996** Johnston PA., tringe R.L., Santillo D., Stephenson A.D., Labounskaia I., McCartney H.M.A., Towards Zero-Effluent Pulp and Paper Production, Green Peace Technical Report 7/96, November 28, 1996, Greenpeace International, Amsterdam
12. **Anonim 5. Suess U., Moodley C., 2003.** The Evolution In Eucalyptus Kraft Market Pulp Bleaching From Four To Two Stages - A Comparison Of Options. TAPPSA Journal. January 2003. ( [http://tappsa.co.za/archive/Journal\\_papers/journal\\_papers.html](http://tappsa.co.za/archive/Journal_papers/journal_papers.html) üzerinden son erişim Mart 2009 ) .
13. **Archana A.; Satyanarayana T., 1997.** Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology.* 21 ( 1 ), 12-17

- 14. Archibald, F. S., Bourbonnais R., Jurasek, L., Paice M. G., and Reid I. D., 1997.** Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*. 53 ( 2–3 ), 215–236
- 15. Arıt S., 1997.** Uygarlığın Hamuru Kâğıt, **TÜBİTAK, Bilim ve Teknik Dergisi**. 356, 54-57
- 16. Asano S. K., Gobsuk J., Tanapongpipat S., 2006,** Champreda V., Eurwilaichitr. L., İmproved of Thermostability of Fungal xylanase by using site-directed mutagenesis. *Journal of Biotechnology*. 126 ( 4 ), 454–462
- 17. Atik C., Imamoglu S., Bermek H., 2006** Impact of xylanase pre-treatment on peroxide bleaching stage of biokraft pulp., *International Biodeterioration & Biodegradation*. 58 ( 1 ), 22-26
- 18. Badhan A.K., Chadha B.S., Sonia K.G., Saini H.S., Bhat M.K., 2004.** Functionally diverse multiple xylanases of thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Enzyme and Microbial Technology*, 35 ( 5, 6 ), 460–466.
- 19. Bajpai B., Bajpai P.K., 1992.** Biobleaching of kraft pulp. *Process Biochemistry*, 27 ( 6 ), 319–325
- 20. Bataillon M., Cardinali A.P.N., Duchiron F., 1998.** Production of xylanases from a newly isolated alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp.. *Biotechnology Letters*. 20 ( 11 ), 1067–1071
- 21. Beg Q. K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G. S., 2001.** Microbial xylanases and their industrial applications: a review , *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 326–338
- 22. Berber Ü., Yenidünya E., 2005.** Identification of Alkaliphilic *Bacillus* Species Isolated from Lake Van and Its Surroundings by Computerized Analysis of Extracellular Protein Profiles. *Turk J Biol.*, 29, 181–188
- 23. Bhat M.K., 2000.** Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnol. Adv.*, 18, 355–383
- 24. Bim M. A., Franco T.T., 2000.** Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching. *Journal of Chromatography B.*, 743, 349–356.
- 25. Black G.W., Rixon J.E., Clarke J.H., Hazlewood G.P., Ferreira L.M.A., Bolam D.N., Gilbert H.J., 1997.** Cellulase binding domains and linker sequences potentiate the activity of hemicellulases against complex substrates. *J. Biotechnol.*, 57, 59–69
- 26. Bocchini D.A., Damiano V.B., Gomes E, Da Silva R., 2003,** Effect of *Bacillus circulans* D1 Thermostable Xylanase on Biobleaching of Eucalyptus Kraft Pulp, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 106 ( 1–3 ), 393–402
- 27. Bocchini D.A., Oliveira O.M.M.F, Gomes E., Da Silva R., 2005.** Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 40 ( 12 ), 3653–3659.
- 28. Bostancı, Ş., 1987.** Kâğıt Hamuru Üretimi ve Ağartma Teknolojisi, Karadeniz Üniv. Basım Evi, Genel yayın no:114, Trabzon. 380 sf.

- 29. Breen A., Singleton F.L., 1999,** Fungi in Lignocellulose Breakdown and Biopulping, , Curr. Opin. Biotechnol., 10 ( 3 ), 252 – 258
- 30. Carlos A. M. C., Meire L. L. M., Angelica B. L., Roberta F. S., 2002.** Production and properties of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. ( Journal ) Brazilian Archives of Biology and Thecnology, 45 ( 4 ), 413 –418.
- 31. Catia A. C. M., Orlando B. M., and Maysa M. C.,2008.** Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. Antonie van Leeuwenhoek. 93 ( 3 ), 297–304.
- 32. Chang P., Tsai W.-S., Tsai C.-L., Tseng M.-J., 2004.** Cloning and charact two thermostab xyl from alk *B firmus* Cloning and characterization of two thermostable xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 319 ( 3, 2 ), 1017–1025
- 33. Chauhan S., Choudhury B., Singh S.N., Ghosh P., 2006.** Application of xylanase enzyme of *Bacillus coagulans* as a prebleaching agent on non-woody pulps. Process Biochemistry, 41 ( 1 ), 226–231
- 34. Chávez R., Bull P., Eyzaguirre J., 2006.** The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. Journal of Biotechnology, 123 ( 4 ), 413–433
- 35. Christopher L., Bissoon S., Singh S., Szendefy J., Szakacs G., 2005.** Bleach-enhancing abilities of *Thermomyces lanuginosus* xylanases produced by solid state fermentation. Process Biochemistry, 40 ( 10 ), 3230–3235
- 36. Christov L., Biely P., Kalogeris E., Christakopoulos P., Prior B. A., Bhat M. K., 2000.** Effects of purified endo-  $\beta$  -1,4-xylanases of family 10 and 11 and acetyl xylan esterases on eucalypt sulfite dissolving pulp. Journal of Biotechnology, 83 ( 3 ), 231-244
- 37. Clarke J. H., Davidson K., Rixon J. E., Halstead J. R., Fransen M. P., Gilbert H. J., Hazlewood G. P., 2000.** comparison of enzyme bleaching . Appl Microbiol Biotechnol, 53, 661–667
- 38. Collins T., Gerday C., Feller G., 2005.** Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, FEMS Microbiology Reviews, 29 ( 1 ), 3–23
- 39. Collins T., Meuwis M.-A., Stals I., Claeysens M., Feller G., Gerda C., 2002 .** A Novel Family 8 Xylanase, Functional and Physicochemical Characterization J. Biol. Chem., 277 ( 38 ), 35133–35139
- 40. Connerton I., Cummings N., Harris G.W., Debeire P., Breton C.. 1999.** A single domain thermophilic xylanase can bind insoluble xylan: evidence for surface aromatic clusters. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. 1433 ( 1–2 ), 110–121.

- 41. Dalay M.C., 2002.** *arthrospira maxima* (= *spirulina maxima* (stiz.) Geitl.,1930 ) acı lake strain . ( acı göl'de denizli acýgöl'de ilk kez tespit edilen siyanobakteri arthrospira maxima ) E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences. 19 ( 1–2 ): 241 – 245.
- 42. Damaso M.C.T., Andrade C.M.M.C., Pereira Jr. N., 2002.** Production And Properties Of The Cellulase-Free Xylanase From *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. Brazilian Journal of Microbiology, 33, 333–338.
- 43. Dashek W., 2002,** Biyoteknolojide Termofilik ve Halofilik Bakteriler Sempozyumu. 27 Şubat – 01 Mart 2002. Ege Üniversitesi Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bornova İzmir. sf. 3–4.
- 44. Davoodi J., Wakarchuk W.W., Carey P.R., Surewicz W.K., 2006.** Mechanism of stabilization of *Bacillus circulans* xylanase upon the introduction of disulfide bonds. Biophysical Chemistry. 125 ( 2–3 ), 453–461.
- 45. Dhillon A., Gupta J. K., S. Khanna, 2000a.** Enhanced production, purification and characterisation of a novel cellulase-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16. Process Biochemistry, 35 ( 8 ), 849-856.
- 46. Dhillon A., Gupta JK., Jauhari BM., and Khanna S.,2000b.** A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp, Bioresour. Technol., 73, ( 3 ), 273–277
- 47. Dhillon A., Khanna S., 2000c.** Production of a thermostable alkali-tolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16 grown on wheat straw. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 27( 3 ), 325–327
- 48. Dhiman S.S., Sharma J., Battan B.,2008.** Pretreatment processing of fabrics by alkalothermophilic xylanase from *Bacillus stearothermophilus* SDX. Enzyme and Microbial Technology, 43 ( 3 ), 262–269
- 49. Doğan İ., 2004.** Mass Transfer and Kinetics in Oxygen Delignification, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University. degree of Doctor of Philosophy in Chemical Engineering, November 2004 Appendix A – Standards, A.1 Kappa number of pulp ( Tappi T236 ). Yök tez merkezi, Tez no 153114, 2004
- 50. Duarte M.C.T., da Silva E. C., Gomes I.M.B., Gomes I. M.B., Ponezi A. N., Portugal E. P., Vicente J. R., Davanzo E., 2003.** Xylan-hydrolyzing enzyme system from *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 and its effects on *Eucalyptus grandis* kraft pulp for pulp bleaching improvement. Bioresource Technology. 88 ( 1 ), 9–15
- 51. Duarte M.C.T., Pellegrino A.C.A., Princi E., Ponezi A.N., Franco T.T., 2000.** Characterization of Alkaline Xylanases From *Bacillus pumilus*, Brazilian Journal of microbiology, 2000, 31 (2 ), 28-32
- 52. Elegir G., Sykes M., and Jeffries T.W., 1995.** Mechanism of *Streptomyces* xylanases in the prebleaching of kraft pulp, Proceedings of the Sixth International Conference on



Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Advances in Applied and Fundamental Research, Vienna, Austria: Facultas-Universitätsverlag, 87 – 92

**53. El-Sakhawy M., 2005.** Effect of Bleaching Sequence on Paper Aeging. Polymer Degradation and Stability, 87 ( 3 ), 419–423

**54. Franz J.S.J., Rice J.D., Preston J.F., 2006.** Characterization of XynC from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* Strain 168 and Analysis of Its Role in Depolymerization of Glucuronoxylan. J. Bacteriol., 188 ( 24 ), 8617–8626

**55. Freitas D.B., Reis M.P., Lima-Bittencourt C.I., Costa P.S., Assis P.S., Chartone-Souza E., Nascimento A.M.A., 2008.** Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. BMC Research Notes. 1 ( 92 ), 1–11

**56. Fritze D., Flossdorf J., Claus D., 1990.** Taxonomy of alkaliphilic *Bacillus* strains. International journal of systematic bacteriology 40 ( 1 ), 92-97

**57. Garnova E.S., Krasil'nikova E.N., 2003.** Carbohydrate metabolism of the saccharolytic alkaliphilic anaerobes Halonatronum saccharophilum, Amphibacillus fermentum, and Amphibacillus tropicus Microbiology. 72 ( 5 ), 558–563

**58. Gessesse A., 1998.** Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases from an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Applied and Environmental Microbiology, 64 ( 9 ), 3533–3535.

**59. Gavcar E., Şen S., Aytekin A., 1999.** Türkiye’de Kullanılan Kâğıt-Karton Türlerinin Talep Tahminlerinin Belirlenmesi . Tr. J. of Agriculture and Forestry. 23, 203–211.

**60. Georis J., Giannotta F., De Buyl E., Granier B., Marie J., 1999.** Purification and properties of three endo- $\beta$ -1,4-xylanases produced by Streptomyces sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. Enzyme and Microbial Technology, 26 ( 2–4 ), 178–186

**61. Gomes J., Gomes I., Terler K., Gubala N., Ditzelmüller G., Steiner W., 2000.** Optimisation of culture medium and conditions for  $\alpha$ -l-Arabinofuranosidase production by the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*, Enzyme Microb. Technol., 2000, 27 ( 6 ), 414-422

**62. Greil P., 2001.** Biomorphous ceramics from lignocellulosics, J. Eur. Ceram. Soc., 21 (.2 ), 105–118

**63. Gupta S., Kuhad R.C., Bhushan B., Hoonda G.S., 2001.** Improved xylanase production from a haloalkaliphilic Staphylococcus sp. SG–13 using inexpensive agricultural residues. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 17 ( 1 ), 5–8

**64. Haltrich D., Nidetzky B., Kulbe K.D., Steiner W., Zupancic S., 1999.** Production of fungal xylanases. Bioresource Tech., 58, 137–161

**65. Holt J., Krieg N., Sneath P., Staley J., Williams S., 1994.** Group 18; Endospore-forming Gram-pozitif rods and cocci, In: Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., 1994, Baltimore, Williams and Wilkins, Baltimore. USA. 559–564

- 66. Horikoshi K., 1999.** Alkaliphiles, Some Application of Their Products for Biotechnology, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63 ( 4 ), 735-750
- 67. Ibarra D., Del Río J. C., Gutiérrez A., Rodríguez I. M., Romero J., Martínez M. J., Martínez Á. T., 2005.** Chemical characterization of residual lignins from eucalypt paper pulps Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, J. Anal. Appl. Pyrolysis, 74, 116–122
- 68. Ito S., Kuno A., Suzuki R., Kaneko S., Kawabata Y., Kusakabe I., Hasegawa T., 2004.** Rational affinity purification of native *Streptomyces* family 10 xylanase, J. Biotechnol., 110 ( 2 ), 137–142
- 69. Jeffery G. H., Bassett J., Mentham J., Denney R. C., 1991 .** Vogel's textbook of quantitative chemical analysis, Fifth edition, 1991, Longman Scientific & Technical, Longman group UK limited, Longman House, Burntmill, Harlow, Essex CM20 2JE England. 370–372
- 70. Jeffries T. W., 1996.** Biochemistry and genetics of microbial xylanases. Current Opinion in Biotechnology, 7 ( 3 ), 337–342
- 71. Jiang Z.Q., Deng W., Li X.T., Ai Z.L., Li L.T., Kusakabe I., 2005.** Characterization of a novel, ultra-large xylanolytic complex (xylanosome) from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 Enzyme and Microbial Technology 36 ( 7 ), 923–929
- 72. Jiménez L., Navarro E., Ferrer J. L., López F., Ariza J., 1999.** Biobleaching of cellulose pulp from wheat straw with enzymes and hydrogen peroxide, Process Biochem. 1999, 35 ( 1–2 ), 149–157
- 73. Kenealy W. R., Jeffries T. W., 2003.** Enzyme Processes for Pulp and Paper: A Review of Recent Developments. In; Barry G. ,Darrel D. N. , Tor P. S., ( Editors ). Wood Eterioration And Preservation, Symposium, 221 st National Meeting of the American Chemical Society, San Diego, California, April 1-5, 2001. American Chemical Society. Oxford University Pres. Chapter 12. 210 – 229
- 74. Khandeparkarand R.D.S., Bhosle N.B., 2006a.** Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation Enzyme and Microbial Technology, 39 ( 4 ), 732–742
- 75. Khandeparkarand R.D.S., Bhosle N.B., 2006b.** Application of thermoalkalophilic xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 in biobleaching of kraft pulp. Bioresource Technology. 98 ( 4 ), 897–903.
- 76. Khandeparkar R.D.S., Bhosle N.B., 2006c.** Purification and characterization of thermoalkalophilic xylanase isolated from the *Enterobacter* sp. MTCC 5112. *Research in Microbiology*, Rakhee Khandeparkar and Narayan B. Bhosle Research in microbiology. 157 ( 4 ), 315–325
- 77. Khanongnuch C. , Lumyong S., Ooi T., Kinoshita S., 1991.** A non-cellulase producing strain of *Bacillus subtilis* and its potential use in pulp biobleaching Biotechnology Letters. 21, 61–63

- 78. Ki J.S., Zhang W., Qian P.Y., 2009.** Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. *Journal of Microbiological Methods*. 77 ( 1 ), 48-57
- 79. Kitreechavanich V., Hayashi M., Nagai S., 1984.** Production of Xylan-Degrading Enzymes by Thermophilic Fungi, *Aspergillus fumigatus* and *Humicola lanuginosa*, *Journal of Fermentation Technology*, 62 ( 1 ), 63 – 69
- 80. Krause D.O., Denman S.E., Mackie R.I., Morrison M., Rae A.L., Attwood G.T. and McSweeney C.S., 2003.** Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics, *FEMS Microbiol. Rev.* 27. 663–693
- 81. Kulkarni N., Rao M., 1996,** Application of Xylanase from Alkaliphilic Thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59 in biobleaching of bagasse pulp. *Journal of Biotechnology*, 51 ( 2 ), 1 , 167-173
- 82. Lama L., Calandrelli V., Gambacorta A., Nicolaus B., 2004.** Purification and characterization of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. *Research in Microbiology*, 155 ( 4 ), 283–289
- 83. Latif F., Asgher M., Saleem R., Akrem A., Legge R. L., 2006.** Purification and Characterization of a Xylanase Produced by *Chaetomium thermophile* NIBGE, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 ( 1 ), 45-50
- 84. Lawoko M., Henriksson G., Gellerstedt G., 2003.** New Method for Quantitative Preparation of Lignin-Carbohydrate Complex from Unbleached Softwood Kraft Pulp: Lignin-Polysaccharide Networks I, *Holzforschung*, 57, 69–74
- 85. Lee Y., Kim B., Lee B., Jo K., Lee N., Chung C., Lee Y., Lee J., 2008.** Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*. 99 ( 2 ), 378–386
- 86. Li J., and Gellerstedt G. 1997,** The contribution to kappa number from hexeneuronic acid groups in pulp xylan Carbohydrate Research., 302 ( 3–4 ), 213–218
- 87. Li X.T., Jiang Z.Q., Li L.T., Yang S.Q., Feng W.Y., Fan J.Y., Kusakabe I., 2005.** Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp *Bioresource Technology*, 96 ( 12 ), 1370–1379
- 88. Liab K., Azadi P., Collins R., Tolan J., Kim J.S., Eriksson K.L., 2000.** Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology*, 27 ( 1–2 ), 89-94
- 89. Liu L., Zhang J., Chen B., Shao W., 2004.** Principle component analysis in F/10 and G/11xylanase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 322 ( 1 ), 277–280
- 90. Maes C., Vangeneugden B., Delcour J.A., 2004.** relative activity of two endoxylanases towards water-unextractable arabinoxylans in wheat bran , *Journal of Cereal Science*, 2004, 39 ( 2 ), 181-186

- 91. Melamud V.S., Pivovarova T.A., Tourova T.P., Kolganova T.V., Osipov G.A., Lysenko A.M., Kondrat'eva T.F., Karavaiko G.I., 2003.** *Sulfobacillus sibiricus* sp. nov., a New Moderately Thermophilic Bacterium. *Microbiology*. 72 ( 5 ), 605–612
- 92. Miranda C.A.C., Martins O. B., Mandetta C.M., 2008.** Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*. 93 ( 3 ), 297–304.
- 93. Morris S., Hanna S., Miles M.J., 2004** The self-assembly of plant cell wall components by single-molecule force spectroscopy and Monte Carlo modelling . *Nanotechnology*. 15, 1296–1301.
- 94. Murakami M. T., Arni R. K., Vieira D. S., Degrève L., Ruller R., Ward R. J., 2005.** Correlation of temperature induced conformation change with optimum catalytic activity in the recombinant G/11 xylanase A from *Bacillus subtilis* strain 168 (1A1). *FEBS Letters*. 579 ( 28 ), 6505–6510
- 95. Nakamura A., Uozumi T., Beppu T.,1991.** Nucleotide sequence of a cellulase gene of *Bacillus subtilis* . *European Journal of Biochemistry*. 164 ( 2 ), 317 – 320
- 96. Muna A., Sreerishnan T.R., 2001.** Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents. *Advances in Environmental Research*. 5 ( 2 ), 175–196.
- 97. Muzariri C.C., Mapingire J., Mazorodze J.H., Mandikutse L., 2001.** Isolation and screening of microorganisms for potential application in remediation of effluent from the pulp and paper industry. 2nd WARFSA/WATERNET symposium: October.2001. *Integrated Water Resources Management: Theory, Practice, Cases*. Cape Town, South Africa. 30–31
- 98. Nakamura S., Ishiguro Y., Nakai R., Wakabayashi K., Aono R., Horikoshi K., 1995.** Purification and characterization of a thermophilic alkaline xylanase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TAR-1, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1 ( 1 ), 7–15,
- 99. Nascimento R.P., Coelho R.R.R., Marques S., Alves L., Gírio F. M., Bon E.P.S., Amaral-Collaco M. T., 2002,** Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil . *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (.4 ), 549–555
- 100. Ninawe S., and Kuhad R. C., 2005.** Bleaching of wheat straw-rich soda pulp with xylanase from a thermoalkalophilic *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresour Technol.* *Bioresource Technology*. 97 ( 18 ), 2291–5.
- 101. Oliveira L.A., Porto A.L.F., Tambourgi E. B., 2006.** Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technology*, 97 ( 6 ), 862–867

- 102. Oskay M., 2006.** Kuzey Kıbrıs Topraklarından Antimikrobiyal Aktivitesi Yüksek *Streptomyces* Suşlarının İzolasyonu, Taksonomisi ve Fermentasyon Çalışmaları Üzerine Bir Araştırma. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora tezi. MANİSA. 2006. sf 38
- 103. Özdemir G., 1997.** Aktif Çamurda Flok Oluşturan Bakterilerde Ekzopolisakkarit Üretimi Üzerine Etkili Faktörler. Doktora Tezi,. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.Yök Tez no 65670, 1997.
- 104. Paës G., O'Donohue M.J., 2006.** Engineering increased thermostability in the thermostable GH-11 xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus*. Journal of Biotechnology. 125 ( 3 ), 338-350.
- 105. Parkinson D., Gray, T.R.G., Williams, S.T., 1971.** Methods for Studying Ecology of Soil Microorganisms. IBP handbook No: 19. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London. 1971.
- 106. Pérez-Alzola I.P., Santos M.J., 1997.** In vitro genotoxic evaluation of conventional bleached and biobleached softwood pulp mill effluents, Mutat. Res./Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 395 ( 2–3 ), 107–112
- 107. Pham P. L., Taillandier P., Delmas M., Strehaiano P., 1998.** Production of xylanases by *Bacillus polymyxa* using lignocellulosic wastes. Industrial Crops and Products, 7 ( 2–3 ), 195–203
- 108. Priest F.G., Alexander B., 1988.** A frequency matrix for probabilistic identification of some bacilli. J Gen Microbiol. 134 ( 11 ), 3011–3018.
- 109. Priest F.G., Barker M., Baillie L.W.J., Holmes E.C., Maiden M.C.J., 2004.** Population Structure and Evolution of the *Bacillus cereus* Group. Journal of Bacteriology, 186 ( 23 ), 7959–7970
- 110. Puchart v., Biely p., 2007.** A simple enzymatic synthesis of 4-nitrophenyl  $\beta$ -1,4-d-xylobioside, a chromogenic substrate for assay and differentiation of endoxylanases. Journal of Biotechnology. 128 ( 3 ), 576–586
- 111. Raghukumar C., 2004.** Decolorization of colored waste- waters catalyzed by lignin-degrading enzymes of marine fungi , Conference on Microbiology of the Tropical Seas. National Institute of Oceanography, Marinebiology section, Dona Paula, Goa 403 004 India, 13–15 December 2004
- 112. Reinstaller a., 2005.** Policy of TCF in Sweden Policy entrepreneurship in the co-evolution of institutions, preferences, and technology: Comparing the diffusion of totally chlorine free pulp bleaching technologies in the US and Sweden. Research Policy. 34 ( 9 ), 1366–1384
- 113. Reis D., Vian B., 2004.** Helicoidal pattern in secondary cell walls and possible role of xylans in their construction , Comptes Rendus Biologies, 327 ( 9–10 ), 785–790

- 114. Rifaat H.M., Nagieb Z.A., Ahmed ,Y.M., 2005.** Production of xylanases by *Streptomyces* species and their bleaching effect on rice straw pulp., *Applied Ecology and Environmental Research*. 4 ( 1 ), 151-160
- 115. Rohman, A., Oosterwijk, N. V., Kralj, S., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B.W., Puspaningsih, N. N., 2007.** Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a thermostable glycoside hydrolase family 43  $\beta$ -xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. *Acta Crystallographica Section F. Structural Biology and Crystallization Communications*, F63. 932–935
- 116. Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. and Vidal, T., 2000.** Using xylanase before oxygen delignification on TCF bleaching. Influence on fibre surfaces by SEM. *Process Biochemistry* **36**, pp. 45–50.
- 117. Roncero B., Torres A.L., Colom J.F., and Vidal T., 2005.** The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps. *Bioresour. Technol.*, 96 ( 1 ), Pages 21–30
- 118. Rousu P., Rousu P., Anttila J., 2002.** Sustainable pulp production from agricultural waste *Resources, Conservation and Recycling*, 35 ( 1–2 ), 85–103
- 119. Roy N., Belaluddin M., 2004.** Production and Characterization of Alkaline Xylanases from *Bacillus* sp. Isolated from an Alkaline Soda Lake. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 7 ( 5 ), 777–781
- 120. Roy N., 2004.** Characterization and Identification of Xylanase Producing Bacterial Strains Isolated from Soil and Water. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 7 ( 5 ), 711–716,
- 121. Sánchez M., Pastor F. I. J., Diaz P., 2003.** Exo-mode of action of cellobiohydrolase Cel48C from *Paenibacillus* sp. BP–23. A unique type of cellulase among Bacillales. *Eur. J. Biochem.*, 270, 2913–2919
- 122. Sapag A., Wouters J., Lambert C., Ioannes P., Eyzaguirre J., Depiereux E., 2002.** The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. *Journal of Biotechnology*, 95 ( 2 ), 109–131
- 123. Sato Y., Niimura Y., Yura K., Gó M., 1999.** Module–intron correlation and intron sliding in family F/10 xylanase genes. *Gene*, 238 ( 1 ), 93–101.
- Schönberg C., Oksanen T., Suurnäkki A., Kettunen H., Buchert J., 2001.** The Importance of Xylan for the Strength Properties of Spruce Kraft Pulp Fibres. *Holzforschung* 2001, 55, 639–644
- 124. Sevastyanova O., 2005.** On the importance of oxidizable structures in bleached kraft pulps, Doctoral Thesis, Fibre and Polymer Technology, Royal Institute of Technology, KTH SE-100 44 Stockholm Sweden. 2005.
- 125. Shallom D., Shoham Y., 2003.** Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology.*, 6 ( 3 ), 219–228

- 126. Shatalov A.A., Pereira H., 2007.** Effect of xylanases on peroxide bleachability of eucalypt (*E. globulus*) kraft pulp. *Biochemical Engineering Journal.*, 40 ( 1 ), 19–26
- Shirling E.B., Göttlieb D., 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16, 313–340.
- 127. Shrivastava S., Shukla P., Poddar R., 2007.** In Silico Studies For Evaluating Conservation Homology Among Family 11 Xylanases From *Thermomyces Lanuginosus*. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation.* , 2 (3): 70–76
- 128. Singh S., Madlala A.M., Prior B.A., 2003.** *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews*, 27 ( 1 ), 3–16
- 129. Slepecky R.A., Hemphill E., 2006.** The genus *Bacillus*—Nonmedical, in: Dworkin, M.F.S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E., (Eds.), *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*, 3rd edition, Pringer, New York: Section 1.2, New York, 2006, 530-562
- 130. Smith H ., 1977.** The Molecular Biology of Plant Cells ,In: Smith H. (ed.), *The Molecular Biology of Plant Cells*. University of California Press . Berkeley. Los Angeles, 1977.
- Sneath, P.H.A., 1986.** Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In; *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. ( Editors ), Vol. 2.. Williams & Wilkins. Baltimore, Md, 1104–1207
- 131. Srinivasan M.C., Rele M.V., 1999.** Microbial xylanases for paper industry, *Current Science*, 77 ( 1 ), 137–142
- 132. Stanley A., 1996,** The Environmental Consequences Of Pulp And Paper Manufacture, Briefing Sheet. Friends of the Earth Ltd, England, Underwood Street, London N1 7JQ, 1996, 26-28
- 133. Subramaniyan S., Prema P., 2000.** Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms, *FEMS Microbiol. Lett.*, 183 ( 1 ), 1-7
- 134. Subramaniyan S., Prema P., 2002.** Biotechnology of Microbial Xylanases:Enzymology, Molecular Biology, and Application, *Critical Reviews in Biotechnology*, 22 ( 1 ):33–64.
- 135. Sunna A., Prowe S.G., Stoffregen T., Antranikian G., 1997.** Characterization of the xylanases from the new isolated thermophilic xylan-degrading *Bacillus thermoleovorans* strain K-3d and *Bacillus flavothermus* strain LB3A. *FEMS Microbiology Letters*, 148 ( 2 ), 209-216
- 136. Tamer A.Ü., Uçar F., Karaboz Ü.E. ,Bursalioğlu M., oğltekin R., 1989.** 2. ve 4. Sınıf mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu. T.C. Anadolu Üniversitesi Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları. No 75. Eskişehir. 1989.
- 137. Tamer A.Ü., Oskay M., 2001 .** Bakteriyoloji Laboratuvar Uygulamaları. Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü. Manisa 2001.
- 138. Tamerler C.B., 2001.** Kâğıt Sektöründe Enzim Talebi, *Biyotek Biyoteknoloji sektör dergisi*, temmuz-agustos 2001, 3, yıl 1, 22-26

- 139. Taneja K., Gupta S. and Rao RC., 2002.** Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99, *Bioresour. Technol.*, 85, 39-42
- 140. Techapun C., Poosaran N., Watanabe M., Sasaki K., 2003.** Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process Biochem.*, 38 ( 9 ), 1327–1340
- 141. Tezel U., Guven E., Erguder T.H., Demirer G.N., 2001.** Sequential (anaerobic/aerobic) biological treatment of Dalaman SEKA Pulp and Paper Industry effluent. *Waste Management*, 21 ( 8 ), 717–724
- 142. Törrönen A., Harkki A., Rouvinen J., 1994.** Crystallographic studies on endo-1,4- $\beta$ -xylanase II from *Trichoderma reesei*, two conformational states in the active site. *EMBO J.*, 13, 2493-2501.
- 143. Tulus A., 2004.** Bleaching of Rice Straw With Hydrogen Peroxide. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 7 ( 8 ), 1327–1329.
- 144. Tseng M.J., Yap M.N., Ratanakhanokchai K., Kyu K. L., Chen S.T., 2002.** Purification and characterization of two cellulase free xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 30 ( 5 ), 590–595
- 145. Uffen, R.L., 1997.** Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 19, 1–6
- 146. Uçar F., Şentük S., 1995.** Alkali Toprak Ve Su Örneklerinden Alkalofilik Bakterilerin İzolasyonu Ve Tanısı. *Kükem Dergisi*. 1995, 18, ( 1 ), 43–50
- 147. Ünal A., 2004.** Lakkaz Enzimi İle Bazı Toksik Klorofenolik Bileşiklerin Detoksifikasyonu, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2004. 116 sayfa.
- 148. Üner B., 2003.** Kraft Hamurundan Kalıntı Ligninin İzole Edilmesi Ve Yapısı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 2003, Seri: A, Sayı: 2, 83–100
- 149. Ventosa A., Nieto J. J., Oren A., 1998.** Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62 ( 2 ), 504–544.
- 150. Virupakshi S., Babu K. G., Gaikwad S.R., Naik G. R., 2005.** Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 40 ( 1 ), 431–435.
- 151. Vysotskii V., Svetashev O., Nedashkovskaya N., Gorshkova M., Mikhailov V., Yumoto N., Shigeri Y., Taguchi T., Yoshikawa S., 1999.** Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Internatl Microbiol*. 2, 267–271
- 152. Williams S.T., Goodfellow M., Wellington E.M.H., Vickers J.C., Alderson G., Sneath P.H.A., Sackin M.J., Mortimer A.M., 1983.** A probability matrix for identification of some *streptomycetes*. *J. Gene. Microbiol*. 129, 1815–1830.



- 153. Wong K.K.Y., Martin L. A., Gama F.M., Saddler J. N., De Jong E., 1997.** Bleach boosting and direct brightening by multiple xylanase treatments during peroxide bleaching of kraft pulps. *Biotechnology and Bioengineering*. 54 ( 4 ), 312 – 318
- 154. Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R., Lee Y.Y., 2005.** Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies, *Bioresour. Technol.*, 96 ( 18 ), 1959–1966
- 155. Yamaç M., 1997.** Eskişehir İli Topraklarından İzole Edilen Aktinomisetlerin Buğday Samanının Delignifikasyonunda Kullanım Olanakları Üzerinde Çalışmalar. T.C. Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi. 1997.
- 156. Yang V.W., Zhuang Z., Elegir G., Jeffries T.W., 1995.** Alkaline-active xylanase, produced by an alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from kraft pulp, *Journ. of Industrial Microbiology*, 15, 434 – 442
- 157. Yavuz E., 2003.** Genotypic Characterization of Extracellular Enzyme Producing Thermophilic Bacteria in Balçova Geothermal Region, *Biotechnology*. Master thesis, İzmir Institute of Technology September 2003.
- 158. Yücel N., 1993.** Ankara Yöresindeki Çiğ Sütlerde Bazı Patojen Mikroorganizmalar Ve *Campylobacter*'lerin İzolasyonu, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Doktora tezi. 1993
- 159. Zhao J., Li X., Qu Y., Gao P., 2002.** Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw . *Enzyme and Microbial Technology*, 30 ( 6 ), 734–740
- 160. Zhao J., Li X., Qu Y., 2006.** Application of enzymes in producing bleached pulp from wheat straw. *Bioresource Technology*, 97 ( 13 ), 1470–1476
- 161. Zhao J., Li X., Qu Y., 2005.** Application of enzymes in producing bleached pulp from wheat straw. *Bioresource Technology*, 97 (13 ), 1470–1476
- 162. Zeng H., Xue Y., Peng T., Shao W., 2006.** Properties of xylanolytic enzyme system in bifidobacteria and their effects on the utilization of xylooligosaccharides. *Food Chemistry*, 101 ( 3 ), 2007, 1172–1177,

**ÖZGEÇMİŞ**


---

Adı Soyadı	Cem AZERİ
Doğum Tarihi	15.01.1967
Doğum Yeri	Bornova/İzmir
Mezun Olduğu İlkokul	Yavuz Selim İlköğretim Okulu
Mezun Olduğu Ortaokul	Suphi Koyuncuoğlu İlköğretim Okulu
Mezun Olduğu Lise	Suphi Koyuncuoğlu İlköğretim Okulu
Okuduğu Fakülte	D.Ü. Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyolojik Bilimler
Fakülte Bitirme Tarihi	1987
Aldığı Ünvan	Tıbbi Biyolog
Yüksek Lisans	CBÜ/Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü/Genel Biyoloji Bilim Dalı
Bitirme Tarihi	1997
Yabancı Dil	İngilizce
Yazışma Adresi	CBU/Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muradiye Kampüsü, 45030, Manisa
Telefon	236 241 2151/122
Faks	236 241 2158
e-mail	cem.azeri@bayar.edu.tr, cemazeri@hotmail.com
Çalıştığı Kurum	CBÜ/Fen-Edebiyat Fakültesi, Araştırma Görevlisi.

---