

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DEĞİŞİK KAYNAKLARDAN LİGNİN DEGREDE EDEN BAKTERİLERİN
İZOLASYONU VE LİGNİNOLİTİK AKTİVİTELERİNİN TEST EDİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşegül ÖZER

HAZİRAN 2012

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DEĞİŞİK KAYNAKLARDAN LİGNİN DEGREDE EDEN BAKTERİLERİN
İZOLASYONU VE LİGNİNOLİTİK AKTİVİTELERİNİN TEST EDİLMESİ**

Ayşegül ÖZER

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 21.05.2012
Tezin Savunma Tarihi : 11.06.2012**

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Trabzon 2012

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalında

Ayşegül ÖZER tarafından hazırlanan

**DEĞİŞİK KAYNAKLARDAN LİGNİN DEGREDE EDEN BAKTERİLERİN
İZOLASYONU VE LİGNİNOLİTİK AKTİVİTELERİNİN TEST EDİLMESİ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 22 / 05 / 2012 gün ve 1457/2 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Üye : Prof. Dr. İlhan DENİZ

Üye : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI


.....

.....

.....

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Değişik kaynaklardan lignin degrede eden bakterilerin izolasyonu ve ligninolitik aktivitelerinin incelenmesi“ adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, laboratuvar çalışmalarım sırasında deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e ve çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan ve yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Kadriye İNAN’a teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Aynı zamanda bana her an destek olan, Dilşat Nigar ÇOLAK’a, Fulya AY ŞAL’a, Nazan DALKIRAN’a tez yazımında yardımını esirgemeyen Onur TOSUN’a ve tüm laboratuvar çalışma arkadaşlarıma, beni yalnız bırakmayan ailem ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayşegül ÖZER

Trabzon 2012

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Değişik Kaynaklardan Lignin Degrede eden Bakterilerin İzolasyonu ve Ligninolitik Aktivitelerinin Test Edilmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Sabriye ÇANAKCI'nın sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 21 / 05 / 2012

Ayşegül ÖZER

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Lignin Biyosentezi	3
1.3. Ligninin Yapısı	5
1.4. Lignin Degredasyonu ile İlgili Yapılan Çalımlar.....	6
1.5. Ligninolitik Enzimler.....	7
1.5.1. Lignin Peroksidaz (EC 1.11.1.14).....	7
1.5.1.1. LiP'nin Katalitik Döngüsü.....	7
1.5.1.2. LiP'nin Kristal Yapısı	8
1.5.2. Lakkaz (EC 1.10.3.2).....	9
1.5.2.1. Lakkazın Katalitik Döngüsü	10
1.5.2.2. Lakkazın Kristal Yapısı	10
1.5.3. Mangan Peroksidaz (EC 1.11.1.13).....	13
1.5.3.1. MnP'nin Katalitik Döngüsü.....	14
1.5.3.2. MnP'nin Kristal Yapısı	14
1.6. Ligninolitik Enzimlerin Biyolojik Fonksiyonları	15
1.6.1. Gıda Sanayi.....	16
1.6.2. Kağıt ve Kağıt Hamuru Sanayi.....	17
1.6.3. Tekstil Sanayi.....	18
1.6.4. Biyoremediasyon	18
1.6.5. Organik, Medikal, Farmasötik, Kozmetik ve Nanoteknoloji Uygulamaları.....	19

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	23
2.1.	Kullanılan Kimyasallar	23
2.2.	Çeşitli Toprak ve Gübre Örneklerinin Toplanması ve Lignin Degrede Eden Bakterilerin İzolasyonu.....	23
2.3.	Genomik DNA İzolasyonu	23
2.4.	İzolatların rRNA Analizleri	24
2.4.1.	16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Artırılması	24
2.4.2.	16S rRNA Geninin Klonlanması, Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bank'taki Sıralarla Karşılaştırılması	25
2.4.3.	16S rRNA Gen Dizilerine Göre Filogenetik Ağaç Çizilmesi.....	25
2.5.	Bakterilerin Ligninolitik Enzimlerinin Belirlenmesi	26
2.5.1.	Peroksidaz Varlığının Tespit Edilmesi	26
2.5.2.	Lakkaz Varlığının Tespit Edilmesi	26
2.6.	Bakterilerin Lignin Degredasyon Oranının Belirlenmesi	26
2.6.1.	Lignosülfat Degredasyonu	26
2.6.2.	Kraft Lignin Degredasyonu	27
2.7.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	28
2.7.1.	Lignin Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi	28
2.7.2.	Mangan Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	28
2.7.3.	Lakkaz Aktivitesinin Belirlenmesi	28
2.8.	Bakterilerin Atık Boya Gideriminde Kullanılması	28
2.9.	Bakterilerin Sentetik Boya Dekolorizasyon Oranlarının Belirlenmesi.....	29
2.9.1.	Ligninolitik Enzimlerin Kısmi Saflaştırılması.....	29
2.9.2.	Boya Dekolorizasyonu.....	29
2.10.	İzolatların Boya Ağartmada Kullanılması	30
3.	BULGULAR.....	31
3.1.	Lignin Degrede Eden Bakterilerin Seçilmesi	31
3.2.	İzolatların Türlerinin Belirlenmesi	31
3.3.	Bakterilerin Sahip Oldukları Ligninolitik Enzimlerinin Belirlenmesi.....	34
3.3.1.	Peroksidaz	34
3.3.2.	Lakkaz.....	34
3.4.	Bakterilerin Lignin Degredasyon Oranının Belirlenmesi	35
3.4.1.	Lignosülfat Degredasyonu	35

3.4.2.	Kraft Lignin Degredasyonu	35
3.5.	Bakterilerin Atık Boya Gideriminde Kullanılması	36
3.6.	Lignin Peroksidazın Sentetik Boyaların Dekolorizasyonunda Kullanılması.....	37
3.7.	Bakterilerin Boya Ağartmada Kullanılması.....	37
4.	TARTIŞMA	39
5.	SONUÇLAR.....	45
6.	ÖNERİLER.....	46
7.	KAYNAKLAR	47
8.	EKLER.....	56
ÖZGEÇMİŞ		

Yüksek Lisans

ÖZET

DEĞİŞİK KAYNAKLARDAN LİGNİN DEGREDE EDEN BAKTERİLERİN
İZOLASYONU VE LİGNİNOLİTİK AKTİVİTELERİNİN TEST EDİLMESİ

Ayşegül ÖZER

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2012, 55 Sayfa, 7 Ek Sayfa

Bu yüksek lisans tezi değişik kaynaklardan lignin degrade eden bakterilerin izolasyonunu, tür tayinlerinin yapılmasını ve bu bakterilerin ligninolitik aktivitelerinin test edilmesini konu almaktadır. Toprak ve gübre örneklerinden sekiz farklı izolat elde edilmiş ve yapılan analizlere göre bu izolatlardan L1, L2 ve PT21 izolatının *Enterobacter carcerogenus* türüne ait farklı suşlar olduğu, L3 ve L4 izolatının *Enterobacter ludwigii* türüne ait farklı suşlar olduğu, PT22 izolatının *Citrobacter sedlakii* türüne, PT41 izolatının *Citrobacter farmeri* türüne ve G1 izolatının ise *Klebsiella pneumonia* türüne ait suşlar olduğu belirlendi. İzolatların kraft lignin degradasyon oranları %37, 14, 20, 43, 48, 51, 28, 60 olarak belirlendi. İzolatların atık boya giderimindeki etkinlikleri incelendiğinde RBBR'yi % 20-90 oranında degrade ettiği belirlendi. G1 izolatından elde edilen lignin peroksidaz enziminin boyaları substrat olarak kullanarak %19-70 oranında dekolorize ettiği belirlendi. Ayrıca kumaş boyamada kullanılan direkt boyaların izolatlar tarafından ağartılma etkinliği araştırıldı. L1, PT21, PT22, PT41 ve G1 izolatlarının boyayı ortamdan uzaklaştırdığı ve ağartma kapasitelerinin olduğu tespit edildi. Ligninolitik enzimlerin kağıt ve tekstil endüstrisi gibi alanlarda kullanıldığı bilinmektedir. Elde edilen veriler ışığında, izolatların endüstriyel kullanım açısından yeterli kapasitede olabileceği görülmüştür. Bu bulgulardan yola çıkılarak izolatlardan elde edilecek enzimlerin önemli birer endüstriyel enzim olabilecekleri görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Lignin, 16S rRNA, Dekolorizasyon

Master Thesis

SUMMARY

ISOLATION OF LIGNIN DEGRADING BACTERIA FROM DIFFERENT
SOURCES AND TESTING THEIR LIGNINOLYTIC ACTIVITIES

Ayşegül ÖZER

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2012, 55 Pages, 7 Pages Appendix

This study is about the isolation of the bacteria degrading lignin out of soil and fertilizer samples contaminated with petrol, and the identification of species. Eight different isolates were obtained from the soil and fertilizer samples, and according to the analysis, it was determined that L1, L2, and PT21 isolates were the different strains belonging to species of *Enterobacter carcerogenus*, L3 and L4 were different strains of *Enterobacter ludwigii*, PT22 isolate belonged to *Citrobacter sedlakii*, PT41 belonged to *Citrobacter farmeri*, and G1 isolate was the strain belonging to the species of *Klebsiella pneumonia*. The Kraft lignin degradation ratios of L1, L2, L3, L4, PT21, PT22, PT41 and G1 were identified to be 37 %, 14 %, 20 %, 43 %, 48 %, 51%, 28%, and 60% respectively. The peroxidase was found in all isolates, whereas laccase was identified only in PT41 isolate. As the efficiency of isolates in waste dye removal was examined, they were observed to degrade RBBR at 20-90 %. Lignin peroxidase enzyme obtained from G1 isolate decolorized the dyes to the proportions between 19-70 % by using them as substrate. However, the enzymes derived from the other isolates were not efficient so much. The efficiency of the isolates in decoloring the direct dyes used for fabrics was examined. L1, PT21, PT22, PT41, and G1 isolates were observed to remove dye, and have decolorizing capacity. Ligninolytic enzymes obtained from microorganisms are used in paper, textile industries. In the light of the acquired data, the isolates were found to have sufficient capacity for industrial utilization. Based upon these findings, the enzymes to be obtained from isolates are thought to take their places among the industrial enzymes.

Key words: Lignin, 16S rRNA, Decolorization

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Lignin prekursorları	4
Şekil 2. Ligninin yapısı	5
Şekil 3. LiP'in yapısı.....	9
Şekil 4. <i>Bacillus subtilis</i> lakkazının (CotA) bakır merkezleri	11
Şekil 5. Lakkaz enzimlerinin bakır-bağlama bölgeleri	12
Şekil 6. Çeşitli organizmalar tarafından üretilen çoklu-bakır içeren oksidazların genel katlanmalarını gösteren kurdela modelleri.....	13
Şekil 7. MnP'nin üç boyutlu yapısı	15
Şekil 8. <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> ve <i>Klebsiella</i> cinslerine ait izolatların 16S rRNA bölgesi açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç	33
Şekil 9. PT41 izolatının ABTS agardaki lakkaz aktivitesi	34
Şekil 10. Lignin degradasyon grafiği.....	35
Şekil 11. Kraft lignin degradasyon grafiği.....	36
Şekil 12. Atık boya giderimi grafiği	36
Şekil 13. LiP enziminin sentetik boya dekolorizasyonu	37
Şekil 14. İzolatların boya ağartma kapasiteleri	38

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Lignin degradasyonunda yer alan ana enzimler ve reaksiyonları.....	15
Tablo 2. Ligninolitik enzimlerin gıda sanayinde kullanımı	16
Tablo 3. Ligninolitik enzimlerin kağıt endüstrisinde kullanımı.	17
Tablo 4. Ligninolitik enzimlerin biyoremediasyonda kullanımı	19
Tablo 5. Ligninolitik enzimlerin organik, medikal, farmasötik, kozmetik ve nanoteknolojik uygulamaları	21
Tablo 6. <i>Enterobacter</i> cinsine ait izolatların, <i>Enterobacter</i> türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi	32
Tablo 7. <i>Citrobacter</i> ve <i>Klebsiella</i> cinslerine ait izolatların, <i>Citrobacter</i> ve <i>Klebsiella</i> türlerinin 16S rRNA dizilerine olan benzerliklerin yüzdesi	32

SEMBOLLER DİZİNİ

rRNA	Ribozomal RNA
MnP	Mangan Peroksidaz
LiP	Lignin Peroksidaz
ml	Mililitre
RBBR	Remezzol Brillat Blue R
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Dakikadaki devir sayısı
BPB	Bromo Fenol Mavisi
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
nm	Nanometre
MSM	Mineral salt medium

1. GENEL BİLGİLER

1.1.Giriş

Biyoteknoloji, çok çeşitli alanlarda gelişme gösteren ve günümüzde moleküler biyolojik yöntemlerin de yaygın şekilde kullanımıyla birlikte, giderek moleküler biyoteknoloji şeklinde transformasyon geçiren, çok yeni ve geleceğe damgasını vuracak bir alandır. Biyoteknolojik uygulamalar moleküler biyolojinin yanı sıra mikrobiyoloji, biyokimya, hücre biyolojisi, immünoloji, protein mühendisliği, çevre mühendisliği, enzimoloji ve biyoproses teknolojileri gibi farklı alanları bünyesinde topladığından birçok bilimsel disiplinle karşılıklı ilişki içinde gelişmektedir. Biyoteknoloji sayesinde yeni tür enzimlerin büyük ölçeklerde ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmuştur. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır. Ticari olarak üretilen ve kullanılan enzimlerin çok büyük bir kısmı mikrobiyal organizmalar tarafından üretilmekte ve mikrobiyal enzimlerin biyoteknolojik süreçlerle üretilmeleri ve çeşitli matrikslere bağlanarak daha kararlı kılınmaları, enzimlerin endüstriyel kullanımındaki artışın temel nedenleri arasındadır. Özellikle birkaç ülke dışında diğer ülkelerin bu konuda tamamen dışa bağımlı olmaları dikkate alındığında, bu konu daha da önemli duruma gelmektedir.

Enzimler, kimyasal reaksiyonları büyük bir spesifikle ve hızını artırarak katalizlerler. Bütün bu enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar, canlı organizmaların metabolizmasının temeli olup, randımanlı ve ekonomik olarak biyokatalitik değişim uygulamalarında, endüstri için muazzam fırsatlar sağlamaktadır (Van Beilen ve Li, 2002).

Biyolojik sistemlerde olduğu kadar endüstriyel uygulamalar içinde önemli özelliklere sahip olan enzimler, asitler, bazlar ya da metal oksitler gibi inorganik katalistlerin tersine son derece seçici ve verimli olmaları, ılımlı şartlarda çalışmaları ve biyolojik olarak parçalanabilmeleri gibi pek çok avantaja sahiptirler. Bu özellikleri sebebiyle endüstri açısından büyük önem taşımaktadırlar (Sağiroğlu, 1999). Günümüzde enzimler tıp, kimya endüstrisi, gıda prosesi, ziraat, tekstil, deri sektörü vb. birçok endüstriyel malzemenin üretimi ve islenmesi, çeşitli toksik maddelerin muamelesi gibi pek çok alanda kullanılmaktadırlar (Telefoncu, 1997; Karademir vd., 2002). Enzimler bitki, hayvan ve

mikroorganizmalar gibi farklı orijinlerden elde edilmektedir. Fakat, potansiyel endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal enzimler geniş çapta kullanılmaktadır (Sağiroğlu, 1999). Hayvansal kaynaklardan enzim üretimi, pahalı olmasının yanında, arz ve talep gibi pazar faktörleri tarafından da etkilenmektedir. Buna karşılık birçok bitkisel kaynaklı enzim nispeten kolay elde edilebilir. Fakat, bitkisel kaynakların da endüstriyel hammadde olarak kullanılmalrı, gıda ihtiyaçlarına bağlıdır. Mikrobiyal enzimler ise büyük çapta üretimi mümkün kılacak yöntemlerle üretilebilirler. Ayrıca, mikroorganizmaların üreme süreleri kolaylıkla enzimlerin pazar ihtiyaçlarına uyarlanabilir (Telefoncu, 1986). Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görünmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Topal vd., 2000).

Son yıllarda özellikle tekstil, kağıt, farmasötik, kozmetik ve atık boya giderimi gibi endüstriyel alanlarda etkili olan ligninoseölütik enzimlerle ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Ligninoseölüz doğada bol olarak bulunan ve yenilenebilen bir enerji kaynağını teşkil eder. Günümüzde, mikroorganizmaların ligninoseölüzü kullanarak işe yarar son ürünler oluşturabilme yeteneklerinden kazanç sağlanmaya çalışılmaktadır. Bu yeteneklerin kullanıldığı potansiyel uygulamaların gelişebilmesi, ligninoseölüzü enerji kaynağı olarak kullanan organizmaların tanımlanarak, bu organizmaların gelişerek gerekli enzim sistemlerinin indüksiyonu için optimum çevresel koşulların belirlenmesi ve ligninoseölüzün enzimatik olarak yıkım mekanizmasını ortaya koyan araştırmaların yoğunlaştırılmasına bağlıdır.

Ligninoseölüzün yapısında yer alan ligninin, selölütik ve hemiselölütik enzimlerin aktivitelerini sınırladığı dolayısı ile ligninoseölüz yıkımını indirgediği düşünölmektedir. Bu yüzden lignin degradasyonu büyük önem arz etmektedir. Lignin degradasyonu için mantarlardan elde edilen ligninolitik enzimler kullanılmaktadır. Ama pratik uygulamalara bakıldığında yüksek pH, sınırlı oksijen ve lignin konsantrasyonu gibi ekstrem çevre ve substrat şartlarında mantarların stabilitesi pek iyi değildir. Bakteriler ise mantarların bu dezavantajlarının aksine geniş çevresel adaptasyon yetenekleri ve çok yönlü biyokimyasaları sayesinde avantaj sağlamaktadırlar. Bu nedenle son yıllarda lignin degrede eden bakterilerle ilgili yapılan çalışmalar ağırlık kazanmıştır. Ligninolitik enzimlerin atık boya giderimi, boya ağartımı, kağıt endüstrisi gibi çeşitli alanlarda kullanılması da bu çalışmalarını daha da önemli hale getirmektedir.

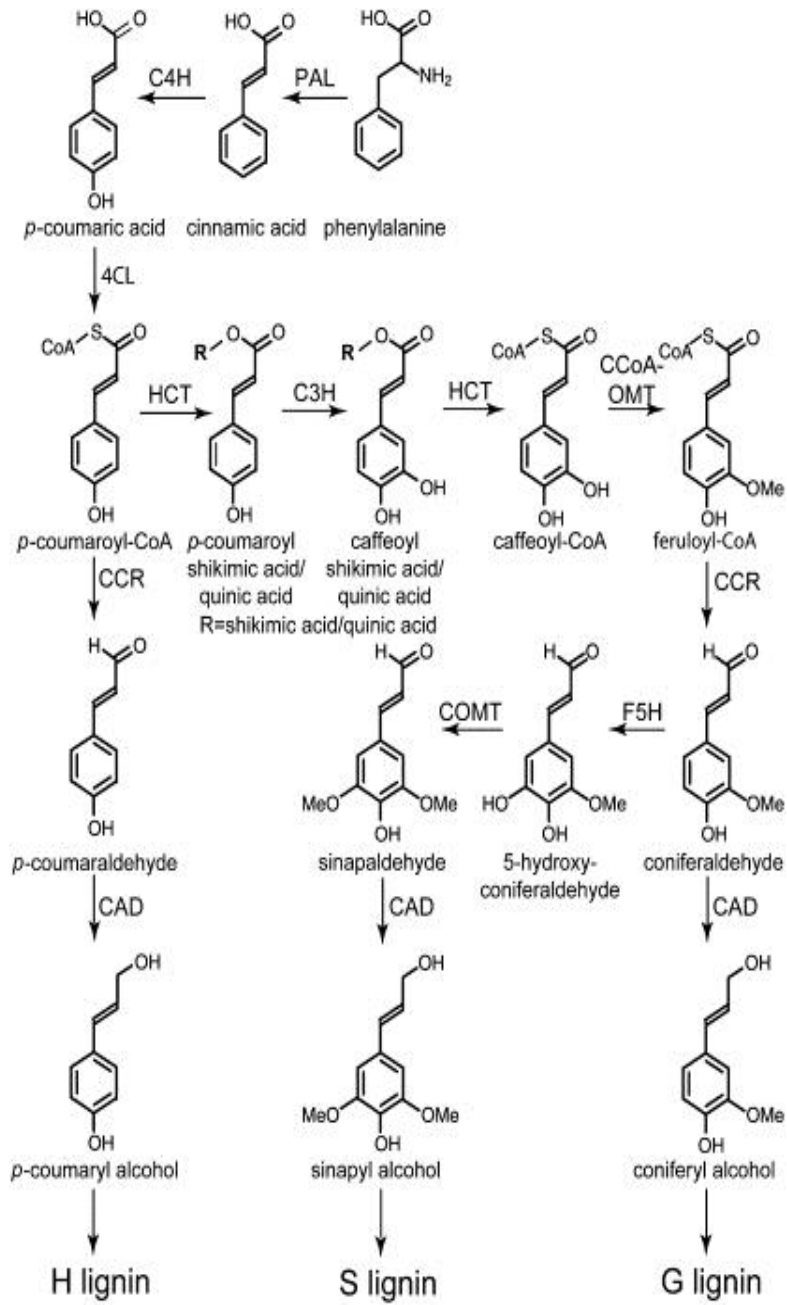
1.2. Lignin Biyosentezi

Lignin, 4-hidroksifenilpropanoidlerin kombinasyonel olarak birleşmelerinden oluşan aromatik polimerlerin büyük bir bölümü için kullanılan genel bir terimdir (Boerjan vd., 2003; Ralph vd., 2004). Bu polimerler bitkinin sekonder çeperinde birikerek onu su geçirmez ve dayanıklı bir hale getirir. Lignin biyosentezi, programlanmış birikiminin yanı sıra yaralanma, patojen enfeksiyonu, metabolik stres ve hücre duvarı yapısındaki bozulma gibi çeşitli biyotik ve abiyotik şartlarla uyarılabilir (Cano-Delgado vd., 2003; Tronchet vd., 2010). Çünkü lignin hücre duvarı polisakkaritlerini mikrobiyal degradasyondan koruyarak çürümeye karşı bir dirençlilik sağlar. Ayrıca bitki biyokütlesinin kağıt hamuru ve biyoyakıt dönüşümünü sınırlayan en önemli faktörlerden biridir.

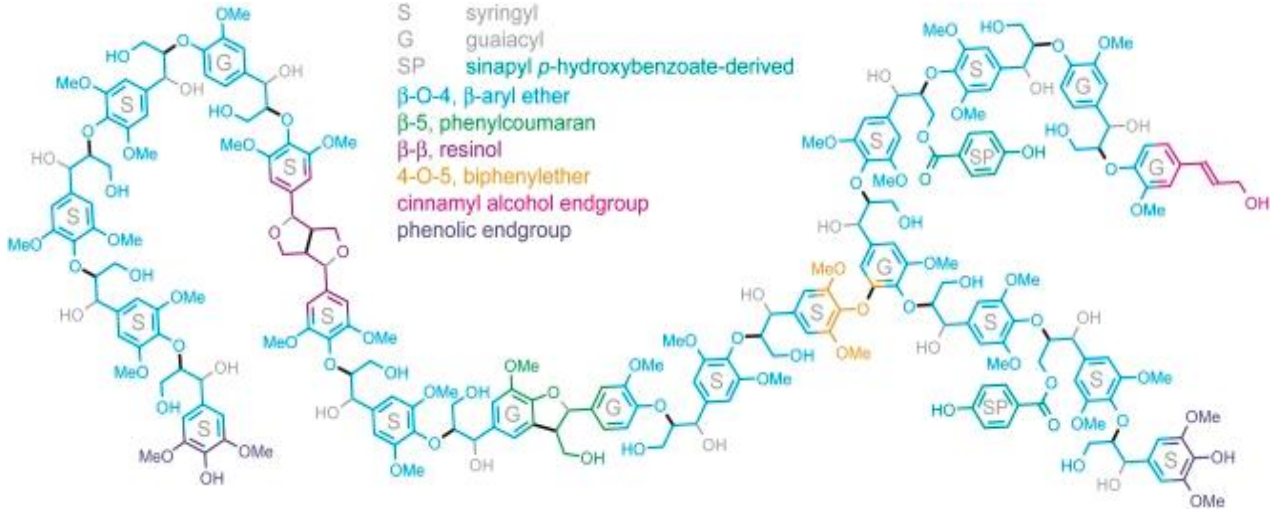
Bitki biyokütlesinden ligninin uzaklaştırılması maliyeti yüksek bir süreç gerektirir. Bu yüzden araştırmalar ya daha az lignin içeren ya da kimyasal degradasyona daha yakın lignin yapısındaki bitkilerle çalışmayı amaçlamaktadır (Sticklen, 2008; Weng vd., 2008; Mansfield, 2009).

Lignin yapısının kalıpları incelendiğinde hidroksisinnamil alkol (ya da monolignol), koniferil alkol, sinapil alkol ve p-kumaril alkolden oluştuğu görülmektedir (Şekil-1). Monolignoller genel olarak fenilpropanoid ve monolignol-spesifik metabolik yolları aracılığıyla fenilalaninden sentezlenirler. Lignin biyosentezinin belirlenmiş enzimleri olan ve sitokrom P450 enzimleri olarak adlandırılan sinnamat 4-hidroksilaz (C4H), p-kumarat 3-hidroksilaz (C3H) ve ferulat 5-hidroksilaz (F5H)'in endoplazmik retikulumun sitosolik tarafında aktif olan membran proteinleri oldukları düşünülmektedir (Chapple, 1998; Ro vd., 2001). Fenilalanin amonya-liyaz (PAL) ve sinnamat 4-hidroksilaz (C4H) arasındaki metabolik kanallaşma gösterilmiş olmasına rağmen metabolik yoldaki diğer enzimlerin de endoplazmik retikulumdaki metabolik komplekslerin parçası olup olmadıkları hala tam olarak bilinmemektedir (Rasmussen ve Dixon, 1999; Achnine vd., 2004).

Monolignolden türeyen birimler, lignin polimerini oluşturmak üzere birleştiklerinde gayasil (G), siringil (S) ve p-hidroksifenil (H) birimleri şeklinde isimlendirilirler (Şekil-1 ve Şekil-2). Bazı göze çarpan istisnalar dışında gymnospermlerden elde edilen ligninlerin angiosperm dikotiledonlarının (G ve S birimleri) aksine sadece G birimlerinden (çok az miktarda H birimleri de içermektedir) oluştuğu belirlenmiştir (Novo Uzal vd., 2009). H birimleri yumuşak odunlarda ve az oranda otsu bitkilerde bulunmaktadır (Boerjan vd., 2003).



Şekil 1. Lignin prekursorları



Şekil 2. Ligninin yapısı

1.3. Ligninin Yapısı

Ligninin yapısındaki moleküler detayları ortaya çıkarmak için çeşitli metodlar vardır. Kullanılan metodlarda genellikle, ligninin kompleks ve heterojen bir polimerler karışımı olmasından dolayı, polimerdeki ana ünitelerin ve ana bağ tiplerinin ortalama frekansı hesaplanmaya çalışılmaktadır.

Nitrobenzen oksidasyonu, piroliz-gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GS-MS) ve indirgeyici kırılma tarafından takip edilen türevlendirme lignin polimerindeki H/G/S kompozisyonunu açığa çıkaran metotlardır.

Lignin, kimyasal olarak heterojen, fenilpropanoid ara birimlerinin değişik tipteki kovalent bağlanmalarını (aril-eter, aril-aril, karbon-karbon gibi) içeren optik olarak inaktif bir polimerdir (Bronow, 2001). β-O-4 bağlanmış eterler baskın olan yapının yarısını oluşturmaktadır. Bunu takiben β-5 fenilkumaran, β-β resinol ve diğer alt birimler gelmektedir (Şekil-2).

Ligninin rasemik olduğu tespit edilmiştir (Ralph vd., 1999). Bu nedenle iki asimetric karbon içeren basit β-O-4 bağlı bir dimer dört stereozomer olarak ortaya çıkmaktadır. Alt birimlerin sayısı arttıkça izomerlerin sayısı da geometrik olarak artmaktadır ve böylece lignin kompleks ve tekrarsız bir üç boyutlu yapı kazanmaktadır. Ligninin farklı bağ çeşitleri ve onların heterojenitesi bitkinin hücre duvarını kurlsız ve asimetric bir hale getirmektedir.

Ligninin bu heterojen ve kompleks yapısı onun güçlükle degrede olmasına sebep olur. Lignin degrede eden enzimlere bakıldığında üç ana enzim dikkat çekmektedir. Bu enzimler lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP) ve bakır içeren fenoloksidaz olarak bilinen lakkazdır.

1.4. Lignin Degredasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Lignin degradasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde daha çok mantarlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar öne çıkmaktadır fakat özellikle son yıllarda bakteriler üzerinde yapılan çalışmalarda bu alanda öne çıkmaya başlamıştır. Lignin parçalayan funguslardan *Phanerochaete cryso sporium* ve *Trametes versicolor* en çok çalışılmış funguslardır. Ligninolitik basidiomycete *Phanerochaete cryso sporium*'un lignini oldukça iyi degrede ettiği bulunmuştur ve ligninin biyolojik parçalanmasının fizyolojik gereksinimlerinin çalışılması için model organizma olarak kullanılmıştır. *Trametes versicolor* oldukça fazla çalışılmış ve önemli miktarda lakkaz salgılayan bir diğer beyaz çürükçül fungustur. El-Gammal ve ark. (1998) *P. crhysoendosporium*, *C.versicolor* ve *S. viridoendosporus* mantarları ile yaptıkları çalışmada bu mantarların lignini degrede ettiklerini gözlemlemişlerdir. Bu türlerin lignin degradasyonları incelendiğinde en fazla degradasyona sebep olanın % 84,06 oranında *P. crhysoendosporium* ve en az degradasyona sebep olanın ise % 26,25 oranında *S. viridoendosporus* olduğunu tespit etmişlerdir. *C. versicolor* ise % 62,9 oranında degradasyona sebep olabilmektedir.

Chandra ve ark. 2006'da yaptıkları çalışmada kraft lignini degrede eden *Aneurinibacillus aneurinilyticus* bakterisini izole etmişlerdir. Bu bakteri kraft lignin mineral salt medium'da (tuz ortamında) glukoz varlığında pH 7,6'da 30°C'de 6 gün büyütülmüş ve lignin içeriğini %43 oranında azalttığı bulunmuştur.

Abd-Elsalam ve El-Hanafy 2009'da yaptıkları çalışmada topraktan *Bacillus* sp. bakterisini izole etmişlerdir. % 0,1 kraft lignin içeren MSM'de 30°C'de 6 gün büyütülen bakterinin lignini %81,4 oranında degrede ettiği bulunmuştur.

Li ve ark. 2008' de yaptıkları çalışmalarda radyoaktif metotlar kullanarak *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Pseudomonas* cinslerinin yaklaşık % 15 oranında lignini degrede ettiğini bulmuşlardır.

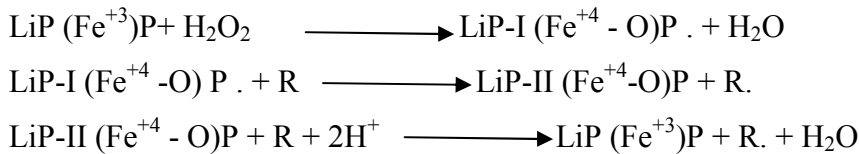
1.5. Ligninolitik Enzimler

1.5.1. Lignin Peroksidaz (EC 1.11.1.14)

Oksidoredüktaz sınıfına ait bir enzimdir. İlk olarak 1983 yılında bir basidiomiset olan *Phanerochaete chrysosporium*' da tanımlanmıştır (Glenn vd., 1983). Lignin peroksidaz düşük optimum pH'da çalışan, yüksek redoks potansiyeline sahip, H₂O₂'ye bağımlı olan bir ekstraselüler hem proteindir (Gold ve Alic, 1993; Haglund, 1999; Erden vd., 2009). Polimerik substratlar da dahil olmak üzere çeşitli indirgeyici substratları okside etme kapasitesine sahiptir (Oyadomari vd., 2003). Lignin peroksidaz, yüksek redoks potansiyeli ve geniş substrat aralığı sayesinde çeşitli endüstriyel işlemlerin uygulamaları için büyük potansiyele sahiptir (Erden vd., 2009). Enzim çok az substrat spesifikliğı gösterir ve çok çeşitli lignin modelli bileşiklerle hatta ligninle ilgili olmayan bileşiklerle bile reaksiyon verir (Barr ve Aust, 1994). Serbest fenolik grupları olmayan metoksilli aromatik halkaları okside edebilmektedir. Bu oksidasyon sonucunda ileriki aşamalardaki halka açma, demetilasyon ve fenol dimerizasyonu gibi metabolik yollarda reaksiyona girecek olan kasyonlar oluşur (Haglund, 1999). Lakkazların aksine lignin peroksidaz, yüksek redoks potansiyelindeki bileşikleri parçalamak için bir mediyatöre gereksinim duymaz. Fakat katalizi başlatabilmek için H₂O₂'ye ihtiyaç duyar.

LiP tipik bir peroksidaz gibi davranır ve H₂O₂ tarafından iki elektron eksik Bileşik I'e yükseltgenir. Bir elektron eksik olan kısım ise Bileşik II olarak belirlenmiştir. Lignin yapılarındaki LiP katalizli oksidasyon, aromatik halkadan bir elektron çıkararak bir aril kasyon radikal oluşturur. Moleküler oksijen varlığında farklı ürünler de oluşur (Kirk ve Farrel, 1997).

1.5.1.1. LiP'nin Katalitik Döngüsü



Bu şemada R, veratril alkol gibi bir aromatik substratdır, P porfirindir. LiP Bileşik I (LiP-I) ise biri oksiferil noktası diğeri de porfirin p kasyon radikali olan H₂O₂'ye

yükseltgenen eşdeğer, iki yapıyı taşır. LiP bileşik II ise sadece bir yükseltgenen eşdeğer yapı taşıyabilir. R substratı Bileşik I' e yükseltgenir (Paulos vd., 1993, Kirk ve Farel, 1997). Aşırı H₂O₂ varlığında LiP katalitik olarak inaktif orta dereceli Bileşik III'e dönüşür (Cai ve Tien 1989; Renganathan ve Gold, 1994). Doğal LiP Bileşik III'den kendiliğinden bir ayrışmayla, bir süperoksit açığa çıkararak yenileştirilebilir (Wariishi ve Gold, 1990). Lignin biyodegradasyonu çalışmaları için substrat olarak en çok kullanılan yardımcı yapı dimerik nonfenolik β -O-4 lignin modelidir (Kirk vd., 1986). LiP genellikle model bileşiğin propil zincirindeki C α -C β bağlarının kırılmasını katalizler (Kirk ve Farrel, 1987).

1.5.1.2. Lignin Peroksidazın Kristal Yapısı

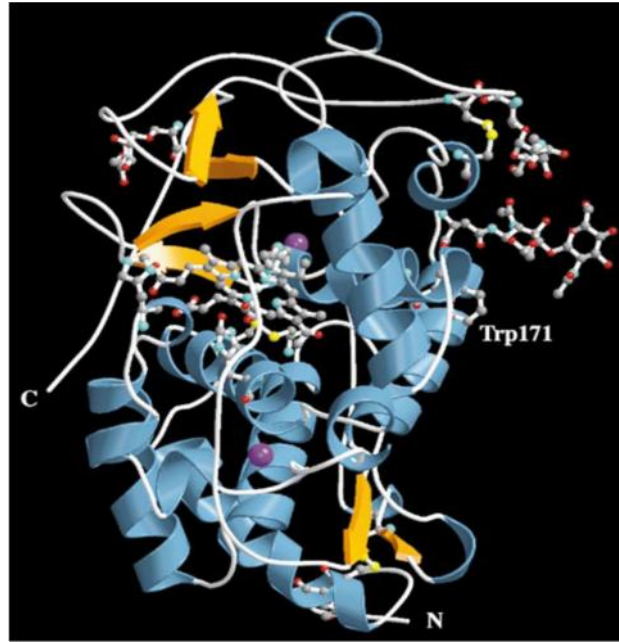
LiP, distal ve proksimal helikler arasında hem örtülü 1 α helikal segmentler içeren dört disülfid köprüye sahiptir. LiP'in aktif bölgesi hem ile bağlantılı fenilalanin artıkları içerir. LiP yapısındaki hidrojen bağları yapısal yönden ve enzimin katalitik özellikleri yönünden önemli rollere sahiptir (Piontek vd., 1993). Proksimal histidin (His176) hem grubunun beşinci ligandıdır ancak hem grubu His47'nin azotunun su ile yaptığı hidrojen bağıyla altılı bir koordinasyon bölgesi olarak doldurulmuştur. Dış kısımdaki heliks üzerinde üç adet anahtar pozisyonda amino asit vardır. Bunlar Arg43, Phe46 ve His47'dir. Bileşik I oluşumu için gerekli olan hidrojen peroksitin hem grubunun Fe iyonu ile etkileşimi için peroksit bağlanma bölgesini oluştururlar. Arg43 ve His47 peroksidazlarla korunmuş rezüdülerdir; ancak Phe46 korunmuş değildir ve çoğunlukla hem grubunun pirol halkasıyla aynı düzlemde bulunur. Bu iki değişmeyen sabit amino asit, Bileşik I oluşumunda önemli rol oynar (English ve Tsaprailis, 1995).

Arg43 amino asidinin iki önemli görevi olduğu öne sürülmektedir. Birincisi peroksidaz üzerindeki negatif yükün artışı stabilize etmek, ikincisi peroksit grubunun O=O çift bağının yarılmasıyla ferryl oksijen atomuyla hidrojen bağı yaparak Bileşik I ara ürününü stabilize etmektir. Diğer taraftan peroksit grubunun bağlanması için proton alıcısıdır (Steven vd., 1993).

LiP'in substrat bağlanma bölgesi ve de substrattan hem grubuna elektron transferinin yolu hakkında oldukça az bilgi vardır. Lignin peroksidazın kristal yapısı incelendiğinde hem aktif bölgesi hem de substrat giriş kanalının neredeyse ulaşılamaz olduğu gözlemlenmiştir. Diğer peroksidazlar ile kıyaslandığında tam tersi olarak substrat giriş

kanalı ve aktif bölgenin arasındaki diğer etkileşimin daha kolay olduğu görülür (Piontek vd., 1993; Steven vd., 1993; English ve Tsaprailis, 1995; Banci vd., 1999).

Monomerik LiP molekülü sekiz büyük α -heliks ve sekiz küçük heliks içerir. Buna ek olarak birbirine antiparalel duran üç kısa β -tabakası vardır. Sekiz tane sistein aminoasidi vardır. Bunların hepsi disülfid bağı yapar ve bir tanesi C-terminaldeki çekirdek proteini ile bağlantılıdır. Lignin peroksidaz biri distal biri proksimal domainde olmak üzere iki tane kalsiyum bağlanma bölgesine sahiptir ve bunların ikisi de aktif bölgenin arkasında bulunur.



Şekil 3. LiP'in yapısı

1.5.2. Lakkaz (EC 1.10.3.2)

Çoklu bakır içeren oksidaz sınıfına ait bir enzimdir. Bu bakır içeren enzimler çeşitli substratların oksidasyonunu katalizlerler ve bunu moleküler oksijenin suya eş zamanlı olarak indirgenmesi şeklinde gerçekleştirirler (Yaropolov vd. 1994).

Lakkaz, ilk olarak 1880'li yıllarda Lacquer ağacında keşfedildiğinden beri çalışılmaya devam eden az sayıdaki enzimlerden biridir (Yoshida, 1883; Thurston, 1994). İlk olarak yüksek bitki ve diğer mantarlarda bulunmuştur. Farklı yardımcı mediatör molekülleri ligninin fenolik olmayan kısımlarında, lakkazın oksidasyon potansiyelini arttırmak için bulunmuştur (Bourbannis ve Paice, 1990; Kawai vd., 1999). Bu olay sadece doğal lignin indirgenmesinde değil, endüstriyel uygulamalarda lakkazın değerinin tekrar

anlaşılmasına neden olmuştur. Mediatör denilen birtakım küçük sentetik moleküler ağırlık efektörleri, lakkazın aktivitesini arttırır (Bourbannis vd., 1995; Bourbannis vd., 1997; Call ve Mucke 1997).

Lakkazın katalitik bölgesinin farklı türler arasında az oranda korunmuş olduğu görülmektedir. Fakat enzimin geri kalan yapısı çeşitlilik göstermektedir (Gochev ve Krastanov, 2007). Lakkazlar genellikle ekstraselüler, indüklenebilir, %10-20 oranında karbohidrat içerikli monomerik glikoproteinlerdir. Bu karbohidrat içeriği lakkazın stabilitesine katkıda bulunur (Mayer ve Staples, 2002).

1.5.2.1. Lakkazın Katalitik Döngüsü

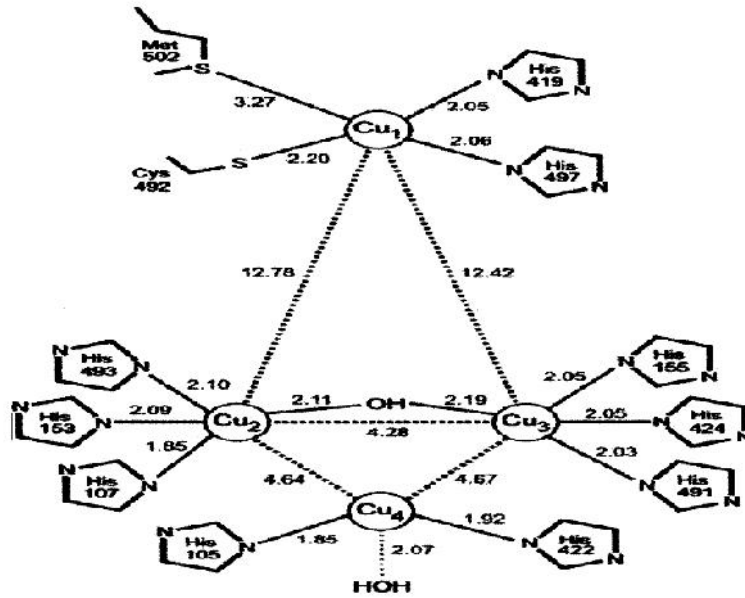
Lakkaz katalizli reaksiyonlarda substrat molekülleri bir elektron oksidasyonu ile bir serbest radikal meydana getirir. Substratın bir elektron oksidasyonu, oksijenin 4 elektron indirgenmesiyle eşleşir. İlk ürün tipik olarak stabil değildir ve ikinci bir enzim katalizli oksidasyon veya hidrasyon, kimyasal tepkime, polimerizasyon gibi enzimatik olmayan bir reaksiyon geçirebilir (Thurston, 1994; Ducros vd., 1998). Lakkazın doğal substratı olan bağları lakkaz tarafından yarılr. Bu yarıma C α oksidasyonu ile (C α -C β bağının yarılması ve aril-alkil yarılması) ligninin fenolik alt birimlerine saldırmasıyla olur. Moleküler oksijen son elektron alıcısı olarak davranır ve böylece iki molekül su indirgenir (Archibald vd., 1997). Yapılan çalışmalarda indirgen substrattan öncelikle T1 bakır bölgesinin elektron aldığı ve bu reaksiyonun tek fazlı, bimoleküler ve ikinci derece yürüdüğü görülmüştür. İkinci dereceden hız sabiti T1 bakırının indirgenme hızı olarak tanımlanmaktadır. T1 bölgesinden üç çekirdekli bakır bölgesinin (T2/T3) moleküller arası elektron transferi daha yavaştır (Mester ve Tien, 2000).

1.5.2.2. Lakkazın Kristal Yapısı

N-terminaldeki sinyal peptidi de dahil olmak üzere 520-550 aminoasit içeren bir zincirden oluşur (Gianfreda vd. 1999). Lakkazlar multinükleer enzimlerdir (Gayazov ve Rodakiewicz-Nowak, 1996; Heinzkill vd., 1998; Bertrand vd., 2002; Piontek vd., 2002). Lakkaz enzimleri düşük substrat özgüllükleri ile karakterize edilmekte olup, difenoller, polifenoller, farklı sübstitüye fenoller, diaminler, aromatik aminler ve hatta iyodin gibi

inorganik bileşikler de dahil olmak üzere çok fazla çeşitlilikteki substratları okside etmektedirler. Lakkaz enzimlerin indüksiyon mekanizmaları, fiziko-kimyasal özellikleri (örneğin, izoelektrik noktaları ve karbonhidrat içerikleri) ve biyokimyasal özellikleri türler arasında değişse de lakkaz enzimlerinin bakır-bağlama bölgeleri (domainleri) sıkı bir şekilde korunmuştur.

Lakkazın aktif bölgesi dört bakır atomu içerir ve üç grup şeklinde (T1, T2, T3) incelenir (Yaropolov vd., 1994; Solomon vd., 1996). Bakır atomları paramanyetik rezonans sinyallerine (EPR: Elektron Paramanyetik Rezonans) göre farklılık gösterirler (Gianfreda vd., 1999).



Şekil 4. *Bacillus subtilis* lakkazının (CotA) bakır merkezleri

Tip 1 (T1): Enzimin mavi renginden sorumludur ve 610 nm'de absorbanı verir. Tip1 bakır, korunmuş ekvatorial ligandlar olarak iki histidin ve bir sistein kalıntısı ile, bir pozisyonda ise genellikle değişken olan bir amino asit kalıntısı ile trigonal bir koordinasyona sahiptir. Değişken olan bu eksenel (axial) ligand ise *Bacillus subtilis* CotA proteininde metionin kalıntısı iken, fungal lakkazlarda ise lösin veya izolösin gibi alifatik bir amino asit kalıntısından oluşabilmektedir.

Tip 2 (T2): Renksizdir ve spektrofotometrik olarak saptanamaz. Ancak EPR çalışmalarında paramanyetik özellikleri ortaya çıkar (Solomon vd., 1996; Leontievsky vd.,

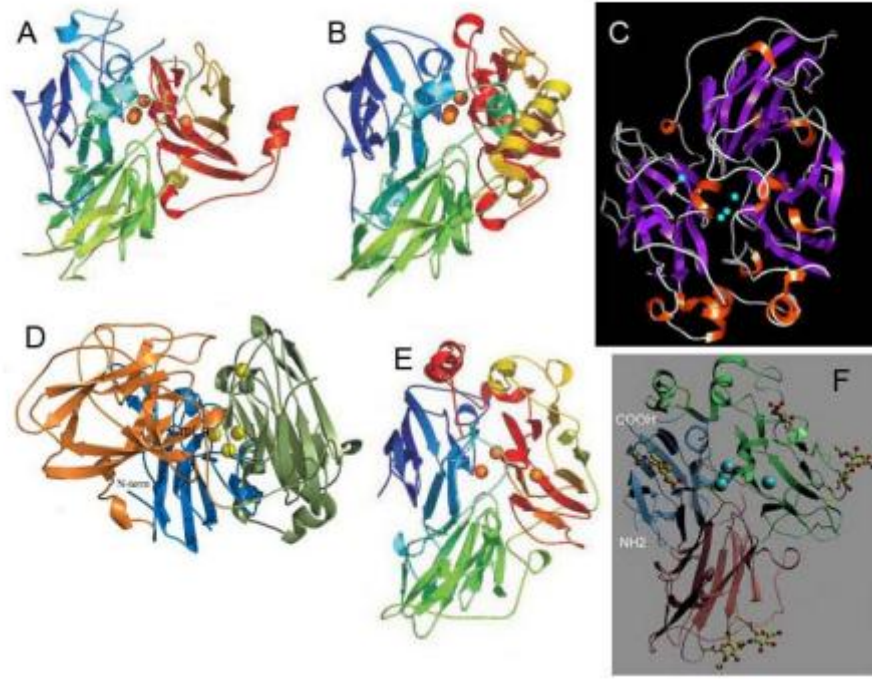
1997; Koroljova-Skorobogat'ko vd., 1998). T2 bakır atomları iki histidin ile koordine olmuştur.

Tip 3 (T3): İki çekirdekli olan T3 diyamanyetikdir. Spektrofotometrede 330 nm'de ölçülebilir (Shin ve Lee, 2000). Bu bakır atomları altı histidin ile koordine edilir.

	T ₂	T ₃		T ₂	T ₃		T ₁	T ₂	T ₃		T ₂ T ₃	T ₁		
Zao → 92	VVI	HWHG	135	TYE	YHGH	417	HPWH	LHGDF	476	WAF	HCH	IEPH	LHMG	
Fet3p → 78	SMH	FHG	122	TYW	YHSH	476	HPFH	LHGAE	543	WF	FCH	IEWH	LLQGL	
TvLa → 85	TSI	HWHG	126	TFW	YHSH	416	HPFH	LGHAF	473		HCH	IDFH	LEAGF	
MaLa → 90	TSI	HWHG	134	TSW	YHSH	431	HPMH	LGHDF	499	WLF	FCH	IAPH	VSGGL	
CcLa → 61	TSI	HWHG	105	TFW	YHSH	396	HPFH	LGHAF	448	WF	FCH	IEFH	IMNGL	
NcLa → 141	TSI	HWHG	185	TSW	YHSH	477	HPFH	LGHDF	544	WLM	HCH	IAPH	VSGGL	
PaLa → 135	TSI	HWHG	179	TSW	YHSH	476	HPMH	LGHDF	544	WLF	FCH	IAPH	VSGGL	
GgLa → 114	SMH	HWHG	157	TAW	YHSH	455	HPMH	LGHDF	522	WLF	FCH	IAPH	VQGL	
CvLa → 82	TSI	HWHG	136	TFW	YHSH	416	HPFH	LHCAF	468	WF	LCH	IDFH	LEAGF	
CsLa → 87		HWHG	128	TFW	YHSH	416	HPFH	LHGTE	473		HCH	IDWH	LQAGF	
CotA → 104	VVHV	HG	150	ILW	YHSH	421	HPFH	LHLSV	490	W	--	HCH	ILEH	EYDM
PpoA → 195	INF	HG	237	TFW	YHSH	583	HPYH	IHVNP	651	FV	L	HCH	ILDH	EDQGM
PHS → 162		H L HG	198	GW	YHSH	525	HPMH	HLAD	603			HCH	LEE	HEDMGM
EpoA → 99	ASL	H L HG	152	YW	HYHSH	231	HF	FTHGHRW	282	W	MY	HCH	VQSH	SDMGM
STSL → 145		H L HG	181	ow	YHSH	511	HPMH	HLAD	598			HCH	LEE	HEDMGM
SLAC → 99	ASL	H V HG	138	W	HYHSH	231	HT	FHMHGHRW	285	W	MY	HCH	VQSH	SDMGM

Şekil 5. Lakkaz enzimlerinin bakır-bağlama bölgeleri. Korunmuş olan amino asitler koyu olarak gösterilmiştir. Oklar ve hemen üzerlerinde bulunan sayılar ise bakır-bağlamada rol alan amino asitleri ve bakır tiplerini (T1, Tip1; T2, Tip2 ve T3, Tip3) göstermektedir. Zao, sakız kabağı askorbat oksidazı (KSKVAO); Fet3p, *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p (CAA89768); TvLa, *Trametes versicolor* lakkazı (A35883); MaLa, *Melanocarpus albomyces* lakkazı (1GW0A); CcLa, *Coprinus cinereus* lakkazı (1A65A); NcLa, *Neurospora crassa* lakkazı (A28523); PaLa, *Podospora anserina* lakkazı (224342A); GgLa, *Gaeumannomyces graminis* lakkaz-3'ü (AJ417687); CvLa, *Coriolus versicolor* lakkazı (D13372); CsLa, *Ceriporiopsis subvermispora* lakkazı; CotA, *Bacillus subtilis* CotA proteini (2408231AG); PpoA, *Marinomonas mediterranea* PpoA proteini (2616352A); PHS, *Streptomyces antibioticus*; EpoA, *Streptomyces griseus* EpoA proteini (AB056583); STSL, *Streptomyces lavendulae* lakkazı (CAB45586); SL AC, *Streptomyces coelicolor* lakkazı.

Kristal yapı üç çekirdekli merkezde T2 bakırı ve T3 bakırının beraber ve birbirine yakın olduğunu gösterir. Çalışmalar T2/T3 bakır bölgesinin Cu atomlarının sekiz Histidin (His) ile düzenlenmiş lduğunu göstermiştir. Bu sekiz histidin 4His-X-His motifiyle korunmaktadır. T3 bakırları altı histidine koordine iken T2 bakırı kalan 2 histidin ile koordine edilir.



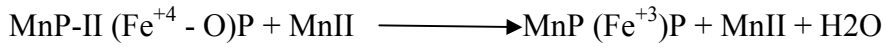
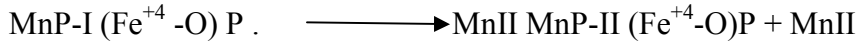
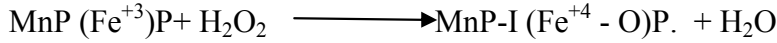
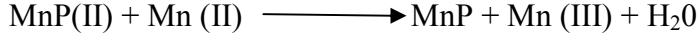
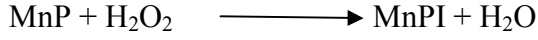
Şekil 6. Çeşitli organizmalar tarafından üretilen çoklu-bakır içeren oksidazların genel katlanmalarını gösteren kurdela modelleri. A: CotA (*B. subtilis*), B: CueO (*E. coli*), C: LtLa (*L. tigrinus*), D: CmLa (*C. maxima*), E: CcLa (*C. cinerius*) ve F: TvLa (*T. versicolor*).

1.5.3. Mangan Peroksidaz (EC 1.11.1.13)

Oksidoredüktazlar sınıfına ait bir enzimdir. *Phanerochaete chrysosporium*'da lignin peroksidazın keşfinden hemen sonra mangan peroksidazın da aynı mantarda tarafından lignini degrede eden diğer bir enzim olarak salgılandığı bulunmuştur (Glenn ve Gold, 1985; Paszczyński vd., 1985). Mangan peroksidaz mantarlar arasında lignin peroksidazdan daha yaygın olarak bulunur (Hammel ve Cullen, 2008).

Mangan peroksidaz Mn^{+2} 'yi Mn^{+3} 'e okside eder. Ürün olarak açığa çıkan Mn^{+3} oldukça reaktiftir ve mantarlar tarafından üretilen oksalat ve malat gibi organik asitleri şelatlar (Kishi vd., 1994; Galkin vd., 1998; Mäkälä vd., 2002). Mangan peroksidazın redoks potansiyeli lignin peroksidazinkinden daha düşüktür.

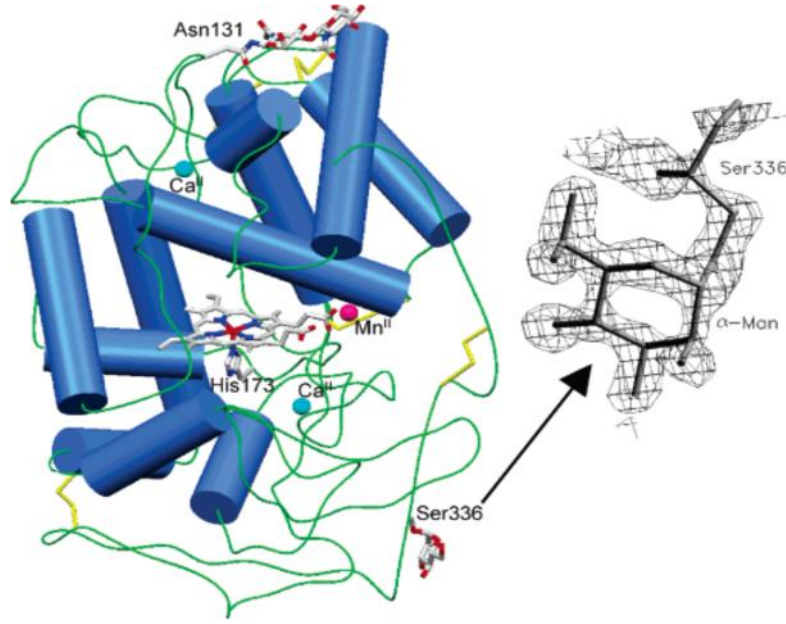
1.5.3.1. MnP'nin Katalitik Döngüsü



Bu şemada P porfirin, MnP-Bileşik I H₂O₂' nin yükseltgenen eşdeğerleri olan, oksiferil noktası ve porfirin katyon radikali (P.) taşır. MnP Bileşik II ise sadece bir yükseltgenen eşdeğer taşır. Şelat Mn⁺³ lignin ve lignin model bileşiklerindeki fenolik halkaları fenoksi radikallerine yükseltger ve bunlar yapıların dekompozisyonuna önderlik ederler (Popp ve Kirk, 1991). Şelat oluşturmuş Mn⁺³, düşük molekül ağırlıklı oldukça reaktif, difüze olabilen redoks mediatör olarak davranır. Böylece MnP, tekstil boyaları, nitroaminotoluen gibi yıkımı güç ksenobiyotikler ile doğal substratı olan lignini depolimerize ve okside edebilir (Van Aken vd., 1994; Heinfling vd., 1998;).

1.5.3.2. MnP'nin Kristal Yapısı

MnP'in belirleyici özelliği, yapıdaki aktif bölümde iki adet kalsiyum iyonunun bulunmasıdır. Aktif bölgesi Asp amino asidine hidrojen bağıyla bağlı bir His ligandı ve cep içeren katalitik Arg ve His bağlı peroksit distal tarafı içerir (Banci, 1997). MnP beş adet disülfid bağı sahiptir. Beşinci disülfid bağı MnP'a özgüdür. Bu bağ C-ucu kuyruğunun bir kısmıdır ve kısmen proteinin ana gövdesinden, C-ucunu uzak tutmaktan sorumludur. MnP, Mn(II)'yi Mn(III)'ye yükseltgeme kabiliyeti konusunda eşsizdir. MnP'in substrat bağlanan bölge mutantlarının kristal yapısı, sadece bir Mn bağlanma bölgeleri olduğunu gösterir. Mn (II) bağlanma bölgesi, bir hem propiyonik asit, üç asidik ligant ve iki su molekülü içerir (Glenn ve Gold, 1985). Mangan peroksidaz iki domainden oluşur ve hem grubu bu iki domain arasında sıkışıp kalmıştır. Domainlerin herbiri 10 büyük ve 1 adet küçük heliks içerir (Welinder ve Gajhede, 1993).



Şekil 7. MnP'nin üç boyutlu yapısı

Tablo 1. Lignin degradasyonunda yer alan ana enzimler ve reaksiyonları

Enzim	Kofaktörü ya da substratı	Ana etkisi ya da reaksiyonu
Lignin peroksidaz	H ₂ O ₂ , veratril alkol	Aromatik halkaları katyon radikallerine oksitler
Mangan peroksidaz	H ₂ O ₂ , Mn, organik asitler, tiyoller, doymamış yağlar	Fenolik bileşikleri fenoksil radikallere oksitler, Mn(II)'yi Mn(III)'e oksitler, Mn(III)'ü şelatlar
Lakkaz	O ₂ , hidroksibezotriazol ve ABTS gibi mediyatörler	Fenolleri fenoksil radikallere okside eder

1.6. Ligninolitik Enzimlerin Biyolojik Fonksiyonları

Ligninolitik enzimler birçok alanda kullanılmaktadır. Bu alanların başında kimya, gıda, tarım, kağıt ve tekstil sanayi gelmektedir. Bunların yanı sıra bu enzimler kozmetikte, ksenobiyotik bileşiklerin degradasyonunda ve atıkların temizlenmesinde kullanılmaktadır.

1.6.1. Gıda Sanayi

Lakkazlar gıdalarda rengi arttırmak ya da modifiye etmek amacıyla kullanılmaktadırlar. Enzim meyve sularında, biralarda ve şaraplarda kararmaya, puslanmaya ve bulanıklılığa sebep olan istenmeyen fenolik bileşikleri elimine etmek için kullanılır (Rodriguez ve Toca, 2006). Lakkaz aynı zamanda şeker pancarında askorbik asit tayini yapmak için de kullanılmaktadır (Ghindilis, 2000). Lakkaz enzimleri, biyopolimerlerin çapraz bağlanmasını sağlaması nedeniyle, hamurun karışma özelliklerini ve hamur ürününün yapısal özelliklerini iyileştirmek amacıyla fırıncılıkta da kullanılmaktadırlar. Lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz ise doğal aromatik tatlandırıcı olarak bir potansiyele sahiptir (Lesage-Meessen vd., 1996; Lomascolo vd., 1999; Zorn vd., 2003; Barbosa vd., 2008). Selinheimo ve arkadaşları (2006) yapmış oldukları bir çalışmada, beyaz çürükçül bir fungus olan *Trametes hirsuta* tarafından üretilen lakkaz enziminin hem unda hem de gluten hamurda hamur uzamasını düşürdüğünü, hamurun maksimum direncini ise artırdığını göstermişlerdir. Flander ve arkadaşları (2008) ise yapmış oldukları bir çalışmada yine *T. hirsuta* kaynaklı lakkaz enzimini yulaf, buğday ve yulaf-buğday karışımından oluşan hamurlarda kullanmışlar ve lakkaz ilave edilen hamurlardan elde edilen taze ekmeklerin sıklığının arttığını rapor etmişlerdir. Minussi ve arkadaşları (2002) ise meşrubat işleme, askorbik asitin tanımlanması, şeker pancarı pektin jelatinasyonu, fırıncılık gıda endüstrisinin farklı alanlarında lakkaz enzimlerinin potansiyel uygulamalarını tanımlamışlardır. Buna rağmen, bu araştırmacılar lakkaz enzimlerinin endüstriyel kullanımlarının daha da geliştirilmesi için bu enzimlerin düşük maliyetlerle üretilmesini ve tutuklanmasını sağlayan tekniklerin daha fazla araştırılması gerektiğini ifade etmişlerdir. Enzimlerin gıda sanayinde kullanımı Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. Ligninolitik enzimlerin gıda sanayinde kullanımı

Lakkaz	Yiyecek ve içeceklerden fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması Askorbik asit tespiti
Lignin peroksidaz	Doğal aroma kaynağı Vanilya üretimi
Mangan peroksidaz	Doğal aromatik çeşni üretimi

1.6.2. Kağıt ve Kağıt Hamuru Sanayi

Lakkazlar odun hamurundaki ve kraft hamur liflerindeki lignini depolimerize ederler. Endüstride lakkazın en sık kullanıldığı alan kraft hamurunu ağartılmasıdır (Strebotnik ve Hammel, 2000). Arias ve arkadaşları (2003) *Streptomyces cyaneus* türüyle yaptıkları çalışmada bakterinin ökaliptustan elde edilen kraft hamurunda kappa numarasını %18,4 oranında düşürüp kağıt parlaklığını %2,2 oranında arttırdığını bulmuşlardır. Yine Singh (2008) yaptığı çalışmada *Gammaproteobacterium* grubuna ait JB suşu ile çalışmış ve elde ettiği lakkaz enziminin 55°C’de dört saat muamelesi sonucu kappa numarasını %21 oranında azalttığını ve kağıt parlaklığını %5,89 oranında arttırdığını rapor etmiştir. Gelecekte kimyasal olarak çok yönlü bileşiklerin lifsel yüzeylere tutturulmasında bu enzim, kağıt hamurların geri dönüştürülmüş olarak tekrar kullanılmasını sağlayabilir (Rodríguez ve Toca, 2006; Mocchiutti vd., 2005; Saparrat vd., 2008). Lignin peroksidazlar lakkazlarla karşılaştırıldığında ağartma için tercih edilen biyokatalizörlerdir (Bajpai, 2004; Sigoillot vd., 2005). Lignin peroksidaz ve mangan peroksidazın kağıt hamurunun ve atıkların rengini açmada etkili oldukları rapor edilmiştir (Ferre vd., 1991; Michel vd., 1991; Moreira vd., 2003). Lignin bileşiklerinde reaktif radikaller oluşturma yeteneğine sahip olan ligninolitik enzimler, aynı zamanda odun liflerinin maksatlı olarak modifikasyonunda da kullanılabilirler. Örneğin, sunta gibi lignoselüloz temelli kompozit materyallerin üretilmesinde odun liflerinin birbirine enzimatik olarak yapışmasını sağlamak amacıyla ligninolitik enzimler kullanılabilir. Ligninolitik enzimler, sunta gibi odunlu kompozit materyallerin üretimi esnasında odun liflerine bağlı olan ligninin aktive edilmesini sağlayarak liflerin birbirine yapışmasını sağlayacak ve böylece elde edilen suntalar, iyi bir mekanik özellik taşıırken aynı zamanda da toksik olan sentetik yapıştırıcıları içermeyeceklerdir (Tablo 3).

Tablo 3. Ligninolitik enzimlerin kağıt endüstrisinde kullanımı

Lakkaz	Lignin depolimerizasyonu, Kraft hamuru ağartma, Odun yongalarından ligninin uzaklaştırılması
Lignin peroksidaz	Kraft hamurunun ağartılması, Sunta üretimi Fabrika atıklarının giderilmesi
Mangan peroksidaz	Kraft hamurunun ağartılması, Sunta üretimi

1.6.3. Tekstil Sanayi

Lakkaz aracı sistem (LMS : Lakkaz mediatör sistem), tekstil ve boya endüstrisinde enzimatik modifikasyonla boya ağartmada potansiyel bir kullanım alanı bulmuştur (Abadulla vd., 2000; Kunamneni vd., 2008). Şu anda kullanılan atık sulardaki boya muamele işlemleri etkili ve ekonomik değildir (Rodrigez ve Toca, 2006). Bu nedenle, lakkazla ilgili bu gelişmeler endüstrideki sentetik boyaların kimyasal degradasyonu için ilgi çekici bir çözüm olmuştur (Abadulla vd., 2000; Wong ve Yu, 1999). Lakkaz enzimleri, redoks-aracıları ile birlikte kullanıldığında ise indigo boyasının beyazlatılmasını sağlayarak, kullanılmış görüntüsü veren kotların üretiminde kullanılmaktadır. Lignin peroksidazlar ve mangan peroksidazlar da yine farklı sentetik boyaların renklerinin giderilmesinde kullanılmaktadır (Cripps vd., 1990; Pointing, 2001; Gomes vd., 2009). Tekstil boyalarını içeren atık suların muamelesine ilaveten, LiP ve MnP enzimlerine dayalı arıtma sistemleri zeytinyağı fabrika atıklarındaki renkli fenolik bileşiklerin oksidasyonlarını sağlayarak bu atıkların muamelesinde de kullanılmaktadırlar.

Nyanhongo ve arkadaşları (2001) *Trametes modesta*, *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor* ve *Sclerotium rolfsii* ile yaptıkları çalışmada 50-60°C'de pH 3-6'da tekstil boyalarını % 48 oranında ağarttığını bulmuşlardır. Abadulla ve arkadaşları ise (2000) *Trametes hirsuta* ile yaptıkları çalışmada bu mantardan elde ettikleri enzimi immobilize etmişler ve enzimin 60°C'de pH 4,5'de stabil olduğunu, 13 saat yarı ömrü olduğunu ve %80 oranında boya ağartması yaptığını rapor etmişlerdir.

1.6.4. Biyoremidasyon

Lakkazlar katalitik özelliklerinden dolayı yeşil biyodegradasyona katılırlar. Ksenobiyotikler toprak kontaminasyonunun ana kaynağıdır ve lakkaz tarafından degrade edilirler (Rodrigez ve Toca, 2006). Buna ek olarak mutajenik ve karsinojenik özelliklerinden dolayı insan sağlığına ciddi risk oluşturan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) da lakkazlar tarafından degrade edilirler (Bamforth ve Singleton, 2005). Yapılan bir çalışmada ise Nyanhongo ve arkadaşları (2001), *Trametes modesta* kaynaklı lakkaz enziminin 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) degradasyon ürünlerinin

immobilizasyonunda rol aldığını göstermişlerdir. Ligninolitik enzimler indirgenmiş TNT metabolitlerini organik toprak matrisine bağlayabilmekte, böylece de savaş amaçlı kullanılan patlayıcı kalıntılarının detoksifikasyonu sağlanmaktadır. Lignin peroksidazların spesifik olmayan bir biyokatalizör mekanizmaları vardır. Mangan peroksidaz biyoremediasyon süreçlerinde kullanılan birçok çevresel kirleticiyi mineralize etme özelliği gösterir. Bu özelliklerinden dolayı LiP ve MnP azo, heterosiklik, reaktif ve polimerik boyaları, DDT, TNT ve PAH gibi kirleticileri degrades edebilmektedirler (Köller vd., 2000; Abraham vd., 2002; Gomes vd., 2009; Wen vd., 2009). Sentetik boyaların dekolorizasyonu ile ilgili *Citrobacter* cinsi ile çalışma yapılmıştır (Oh, 2010). Bu çalışma sonucunda söz konusu cinsin sentetik boyaları dekolorize ettiği tespit edilmiştir. Tekstil sanayinin atık sularında oluşan ve sağlığa zararlı olan RBBR boyasının dekolorizasyonu mantarlar açısından çalışılmıştır. Lopez ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada topraktan farklı bakteri ve mantar türleri izole edilmiş ve elde edilen mantarların RBBR'yi etkili biçimde dekolorize ederken bakteri izolatlarının aynı etkinliği göstermediğini rapor etmişlerdir. Enzimlerin kullanım alanları Tablo 4'de özetlenmiştir.

Tablo 4. Ligninolitik enzimlerin biyoremediasyonda kullanımı

Lakkaz	Ksenobiyotiklerin biyodegradasyonu Polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) degradasyonu
Lignin peroksidaz	Azo, heterosiklik, reaktif ve polimerik boyaların degradasyonu Çevresel kirleticilerin mineralizasyonu Ksenobiyotiklerin ve pestisitlerin degradasyonu
Mangan peroksidaz	PAH degradasyonu Sentetik boyaların degradasyonu DDT, PCB, TNT degradasyonu

1.6.5. Organik, Medikal, Farmasötik, Kozmetik ve Nanoteknoloji Uygulamaları

Son zamanlarda, yeni bir biyokatalizör olarak lakkazın organik sentezde kullanılması üzerine artan bir ilgi vardır. Lakkaz ve lakkaz aracı sistemin (LMS) kimyasal sentezinde kullanılan açık polimerleri oluşturma yetenekleri olduğu ortaya çıktığından beri lakkaz ve LMS enzimatik polimerizasyonda dikkat çekmişlerdir (Aktaş ve Tanyolaç, 2003). Lakkazlar fonksiyonel grupların oksidasyonu, fenol ve steroidlerin bağlanması, karbon azot bağlarının oluşturulması gibi organik sentez uygulamalarında, doğal komplekslerin

üretiminde ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır (Baminger vd., 2001; Fabbrini vd., 2001; Mikolasch vd., 2002; Ponzoni vd., 2006). Örneğin, lakkaz-temelli saç boyaları çok daha az tahriş edicidirler ve normal saç boyası içerisinde oksitleyici ajan olarak bulunan H_2O_2 yerine lakkaz bulunduğundan, bu tip saç boyalarının kullanımı geleneksel saç boyalarına göre daha kolaydır. Cilt beyazlatıcı olarak kullanılan ve çeşitli proteinleri içeren kozmetik ve dermatolojik preparasyonlar da geliştirilmiş bulunmaktadır.

Lignin peroksidaz atomik rezolasyonda yüksek biyoelektro-katalitik aktivite göstermektedir. Bu da polimerik fenol veya lignin biyosensörlerindeki ticari gelişim için uygundur (Christenson vd., 2004). Gelecekte LiP kozmetik ve dermatolojik ürünlerin üretimi için sentetik kimyada büyük ilgi görecektir.

Mangan peroksidazlar akrilamid polimerizasyonunda kullanılmaktadır (Iwahara vd.,2000). Bunun yanı sıra endüstriyel bir polimer olan ve toprağı, havayı, suyu kirleten stireni de degrede edebilmektedir (Soto vd., 1991; Lee vd., 2006).

Lakkaz enzimlerine ilişkin olarak biyosensör duyarlılığı üzerine ise enzim tutuklanmasının önemli bir etkisi bulunmaktadır (Freire, 2001). Martele ve arkadaşları (2003) ise katı bir yüzey üzerine lakkaz enziminin tutuklanarak çok fonksiyonlu bir biyosensör geliştirilebilmesi için, mikro-desenlemenin etkili bir metot olduğunu göstermişlerdir. Roy ve arkadaşları (2005) *Trametes versicolor* kaynaklı lakkazın, çapraz-bağılı enzim kristalleri (CLEC) halinde iken çözünmüş durumdaki enzimlere göre çok daha avantajlı bir şekilde biyosensör uygulamalarında kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Cabrita ve arkadaşları (2005) *Coriolus versicolor*'dan elde ettikleri lakkazı, altın üzerine kendiliğinden-birleşen ve N-hidroksisüksinimid ile sonlanan tekli-tabakaya tutuklamışlardır. Bu işlem biyosensörlerin daha da geliştirilmesi için kullanışlı olabilir. Buna ilaveten, bir osmiyum redoks polimeri ve *T. versicolor* kaynaklı lakkaz enziminin camı karbon elektrodu üzerine birlikte tutuklanmasına dayalı bir enzim elektrodu, kateşolamin nörotransmitterleri dopamin, epinefrin ve norepinefrinin nanomolar düzeyinde belirleme limitine sahip olan ultraduyarlı amperometrik belirlenmesinde kullanılmıştır (Ferry, 2005). Bahsedilen uygulamalar Tablo 5'de özet olarak verilmiştir.

Tablo 5. Ligninolitik enzimlerin organik, medikal, farmasötik, kozmetik ve nanoteknolojik uygulamaları

Lakkaz	Polimer üretimi Fenollerin ve steroidlerin bağlanması Karbon-azot bağlarının oluşturulması Kişisel hijyenik ürünler Biyosensörler
Lignin peroksidaz	Fonksiyonel bileşiklerin sentezi Kozmetik ve dermatolojik ürünler Atomik çözünürlüğün biyoelektro-katalitik aktivitesinde
Mangan peroksidaz	Akrilamid polimerizasyonu Polimer stiren degradasyonu Direkt elektron transferi (DET)

Yukarıda bahsedilen endüstriyel kullanım alanları ile ilgili şu ana kadar yapılan çalışmalar ve patentler incelendiğinde, bunların çoğunun mantarlar üzerine yoğunlaştığı görülmektedir. Çalışmalarda mantarlara incelendiğinde ligninolitik enzimlerden birini veya ikisini içerdikleri tespit edilmiştir. Üç ana enzimi birden içeren organizma çok nadir bulunmaktadır. Bakterilerle ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında bunların sınırlı sayıda olduğu ve endüstride yaygın olarak kullanılmadığı görülmektedir. Crawford ve arkadaşları tarafından 1993 yılında bakteri kaynaklı bir lignin peroksidaz bulunmuş ve bunun patenti alınarak kağıt endüstrisinde kullanılmıştır (US Patent 5,200,338). Yine *Serratia marcescens* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın lignin degrade ettiği bulunmuş ve patenti alınmıştır (US 2004/0241846 A1).

Bu çalışma kapsamında çeşitli toprak ve gübre örneklerinden lignin degrade edebilme özelliğinde olan bakteriler izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin ligno sülfat ve kraft lignin degradasyon yüzdeleri boya ağartma ve atık boya giderimindeki kullanım kapasiteleri belirlenmiştir. Ligninolitik enzimlerin endüstride kullanımının geniş olması ve geleceğinin parlak olması bu alandaki çalışmaları önemli kılmaktadır. Endüstriyel enzim kaynaklarının çoğunu mantarlar oluşturmaktadır fakat mantarlar pratik kullanımlarda ekstrem koşullarda stabilitlerini kaybetmektedirler. Bakteriler ise adaptasyon yetenekleri sayesinde mantarlardan daha avantajlıdır. Bu yüzden son dönemlerde bakterilerle ilgili olan çalışmalara verilen önem artmıştır. Bu çalışma kapsamında ligninolitik bakterilerin ve bakterilerden elde edilen ligninolitik enzimlerin endüstride kullanılabilme kapasitesi araştırılmış ve elde edilen verilere bakıldığında endüstriyel anlamda kullanım

kapasitelerinin geniş olduğu görülmüştür. Ülkemizde özellikle kağıt sanayinde ve atık boya ların gideriminde mikroorganizmaların kullanılabilirliği ile ilgili çalışma yapılmamaktadır. Bu çalışma kapsamında izole edilen ve ligninolitik enzimler için kaynak teşkil eden her bir bakterinin çeşitli endüstri alanlarının hizmetine sunulması amaçlanmaktadır. Atık boya dekolorizasyonunda ve kağıt üretiminde kullanılan mekanik ve kimyasal metotlara alternatif yollar arandığı göz önüne alındığında, yapılacak bu çalışma ile bu ihtiyaçların giderilmesine katkıda bulunulacaktır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Yeast ekstrakt (Merck), NaCl (Merck), Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega), Taq DNA polimeraz (Promega), dNTP seti (Promega), pGEM-T Easy Klonlama Vektörü (Promega), EDTA (Merck), X-Gal (Applichem), IPTG (Applichem), CaCl₂ (Aktar Kimya), KH₂PO₄ (Merck), Nutrient Agar (Merck), Bromofenol mavisi (Gerbu), Ligno-sülfonat (Bes Kimya), Kraft lignin (Sigma), H₂O₂ (Sigma), Pyrogallol (Sigma), C₄H₁₂N₂O₆, MgSO₄ (Sigma), CuSO₄ (Merck), MnSO₄ (BDH Analar), Glukoz (Sigma), ABTS (Sigma), NH₄NO₃, Nitrilasetik asit (Acros Organik), FeSO₄ (Merck), CoSO₄ (Merck), ZnSO₄ (Merck), CuSO₄ (Merck), AlK(SO₄)₂, H₃BO₃ (Sigma), Na₂MoO₄ (Merck), Sodyum malonat (Sigma-Aldrich), Remazol Brilliant Blue R (Sigma), Metilen mavisi (Merck), Metil oranj (Merck), Toluidine mavisi (Merck).

2.2. Çeşitli Toprak ve Gübre Örneklerinin Toplanması ve Lignin Degrede Eden Bakterilerin İzolasyonu

Trabzon Değirmendere Büyük Sanayi Sitesi'nin farklı yerlerinden alınan petrollü toprak örnekleri ile yine Trabzon ilinin farklı bölgelerinden alınan inek gübresi, ağzı kapaklı steril şişelere alındı. Laboratuara getirilen örnekler öncelikle lignin içeren sıvı besiyerine inoküle edilerek zenginleştirme kültürleri yapıldı. 2-3 günlük 30-37°C'de yapılan inkübasyonlar neticesinde lignin agar (5 g lignin; 17,3 g agar; 1000 ml fizyolojik distile su) besiyerine çizgi ekimler gerçekleştirildi. Yapılan inkübasyonlar neticesinde oluşan koloniler gözle ve binoküler mikroskop altında incelenerek birbirinden farklı kolonilerden saf bakteri kültürleri gerçekleştirildi.

2.3. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak yapıldı. Toprakta izole edilen ve saf kültürü yapılan bakterilerden 3 ml LB besiyerine inoküle edildi ve 37°C'de gece boyunca bir sulu çalkalayıcıda inkübe edildi. Bakteri

üremesi olan gece kültürü 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücreler 480 µl 50 mM EDTA içerisinde çözüldü. 120 µl 10 mg/ml lizozim ilave edildi, hafifçe pipetleyerek karıştırıldı ve 37°C'de 60 dk inkübe edildi. Elde edilen karışım 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tüpe 600 µl Nuclei Lyzis solüsyonu eklendi ve hafifçe pipetle karıştırıldı. Karışım 80°C'de 5 dk inkübe edildi ve oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 3 µl RNase solüsyonu eklendi. Tüp 2-5 kez alt-üst edildi ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Karışım oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 200 µl Protein Precipitation solüsyonu eklendi ve 20 sn vortekslenildikten sonra 5 dk süreyle buza bırakıldı. 5 dk sonunda 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant içinde 600 µl izopropanol bulunan yeni bir ependorfa aktarıldı. Ependorf pelet oluşuncaya kadar alt üst edildi ve 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve kurutma kağıdı kullanarak tüm süpernatant sıvısının atıldığından emin olundu. Pelletin üzerine 600 µl oda sıcaklığında % 70'lik etanol eklendi ve alt üst edildikten sonra 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Pipetörle süpernatant uzaklaştırıldı ve etanolün tamamının uzaklaşması için mikrosantrifüj tüpü 15 dk 37°C'de bekletildi. Pellet üzerine 100 µl DNA Rehydration solüsyonu eklendi ve 65°C'de 1 saat inkübe edildi. Genomik DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra, elde edilen DNA kullanılacağı zamana kadar +4 °C'de saklandı.

2.4. İzolatların rRNA Analizleri

2.4.1. 16S rRNA Geninin PCR Yardımı ile Arttırılması

16S rRNA genleri, her bir izolattan Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak izole edilen genomik DNA'dan UNI16S-L (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3') ileri ve UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA) geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonlarının şartları Beffa ve arkadaşlarına (1996) göre oluşturuldu. 12 ng kalıp DNA, 5 µl 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200 µl'lik tüplerde, "Biometra Personal Cycler'da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk denatürasyon basamağı 95°C'de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü 94°C'de 1 dakika

(denatürasyon için), 56°C’de 1 dakika (hibridizasyon için) ve 72°C’de 2 dakika (polimerizasyon için) şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl’si %1,1’lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra “BioDocAnalyze” sistemiyle görüntülendi.

2.4.2. 16S rRNA Geninin Klonlanması, Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve Gen Bank’taki Sıralarla Karşılaştırılması

Yukarıda açıklanan PCR reaksiyonu ile çoğaltılan 16S rRNA genleri, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı. Klonlanma sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis ve arkadaşlarının (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildiler. Daha sonra izole edilen bu plazmitlerin hangilerinin istenilen parçayı taşıdığı belirlendi ve doğruluğu teyit edilen klonların baz dizini analizi, baz dizini otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla ile (Macrogen, Hollanda) belirlendi. Elde edilen yaklaşık 1400 bp uzunluğundaki 16S rRNA dizileri Gen Bankasında var olan diğer bakteriyel dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarıldı.

2.4.3. 16S rRNA Gen Dizilerine Göre Filogenetik Ağaç Çizilmesi

Elde edilen 16S rRNA geni baz sıraları, moleküler analizlerde ham veri olarak kullanıldı. Her taksonun bu genlerine ait nükleotit baz dizileri, Clustal W (Thompson vd., 1997) programı kullanılarak alt alta hizalandı. Daha sonra bu sıralar analiz edilmek üzere sırasıyla Fasta, Nexus ve PHYLIP formatlarına dönüştürüldü.

Elde edilen veriler temel olarak 16S rRNA genlerine dayanarak çalışılan taksonlar arasındaki ilişkileri ortaya koymak amacıyla 16S rRNA genlerine ait baz dizinleri MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura vd., 2007) paket programı kullanılarak değerlendirildi.

2.5. Bakterilerin Ligninolitik Enzimlerinin Belirlenmesi

2.5.1. Peroksidaz Varlığının Tespit Edilmesi

Yeni belirlenen ligninolitik izolatların, hangi ligninolitik enzimi ürettiğini belirlemek için Rayner ve Boddy'nin (1988) geliştirdikleri testler uygulandı. Bakteriler öncelikle NA besiyeri üzerinde 2 gün 37°C'de büyütüldü. Kolonilerin mangan peroksidaz veya lignin peroksidaz aktivitesine sahip olup olmadığının test edilmesi için koloniler üzerine eşit hacimde karıştırılan %0,4'lük H₂O₂ ve %1'lik pyrogallol çözeltisi döküldü ve sarı-kahverengi bir rengin oluşup oluşmadığına bakılarak bu aktivitelerin olup olmadığına karar verildi. Bu iki enzim aktivitesinin birbirinden ayrılabilmesi için ise bir petri testi var olmadığından iki enzim aktivitesinin birbirinden ayırt edilmesi spektrofotometrik aktivite testi yardımıyla yapıldı.

2.5.2. Lakkaz Varlığının Tespit Edilmesi

İzolatların lakkaz içerip içermediklerinin belirlenmesi amacıyla ABTS agar kullanıldı. %0,1 oranında ABTS ve %1,6 oranında agar içeren LBM (1 g KH₂PO₄, 0,5 g C₄H₁₂N₂O₆, 0,5 g MgSO₄, 0,01 g CaCl₂, 0,01 g maya ekstraktı, 0,001 g CuSO₄, 0,001 g FeSO₄, 0,001 g MnSO₄) besiyeri otoklav edildikten sonra her 100 ml besiyeri için 1ml %20'lik glukoz çözeltisi aseptik olarak eklendi. Bakteri ile inoküle edilen petriker karanlıkta 37°C'de 10 gün boyunca büyütüldü. 10 gün sonunda petri renginin yeşile dönüşmesi lakkaz varlığı için pozitif sonuç göstergesi olarak alındı.

2.6. Bakterilerin Lignin Degredasyon Oranının Belirlenmesi

2.6.1. Lignosülfat Degredasyonu

Yeni belirlenmiş olan ligninolitik izolatların, lignin degredasyon oranlarının belirlenmesi için bakteriler lignin degredasyon sıvı besiyerine (1 g KH₂PO₄, 4 g NaHPO₄, 0,2 g NaCl, 0,2 g MgSO₄.7H₂O, 0,05 g CaCl₂, 2 g yeast ekstrakt, 5 g lignosülfat, 1000 ml distile su) inoküle edildikten sonra 37 °C'de 120 rpm'de 1 hafta süre ile inkübasyona

bırakıldı. Deneyde iki farklı kontrol kullanıldı. Bunlardan birisi bakteri inoküle edilmeyen ligninli sıvı besiyeri diğeri ise yukarıda tanımlanan besiyerinin lignin içermeyen haline bakteri inokulasyonu yapılarak oluşturulanıdır (El-Gammal ve ark., 1997).

Bir haftalık süre sonunda bakteri aşılınmış ve 37 °C’de inkübe edilmiş olan lignin degradasyon besiyeri otoklavda steril edildikten sonra, kurutulmuş ve ağırlıkları kaydedilmiş olan filtre kağıtlarından süzüldü. Süzme işleminden sonra filtre kağıtlarının üzerinde kalan lignin Pastör fırınında tekrar kurutuldu. Bu işlemin ardından tartım işlemi tekrarlandı ve kağıdın kaydedilen ilk ağırlığı son ağırlığından çıkarıldı. Böylece oluşan fark filtre kağıdı üzerinde kalan lignin ağırlığı olarak belirlendi (El-Gammal ve ark., 1998). Degradasyona uğrayan ligninin miktarı ise aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

$$\% \text{ Degrede lignin} = \frac{\text{LB-LS}}{\text{LB}} \times 100$$

LB: Başlangıçtaki lignin miktarı

LS: Son lignin miktarı

2.6.2. Kraft Lignin Degredasyonu

Yeni belirlenmiş olan ligninolitik izolatların, lignin degradasyon oranlarının belirlenmesi için bakteriler KL (2 g/l) içeren MSM (2,4 g Na₂HPO₄, 2 g K₂HPO₄, 0,1 g NH₄NO₃, 0,01 g MgSO₄, 0,01 g CaCl₂, 10 g D-glukoz, 5 g peptone, 1ml l⁻¹trace element solusyonu (g l⁻¹: 1.5 g nitrilasetik asit %99, 3 g MgSO₄.7H₂O, 0.5 g MnSO₄.H₂O, 1 g NaCl, 0,1 g FeSO₄.7H₂O, 0,1 g CoSO₄, 0,1 g CaCl₂.2H₂O, 0,1 g ZnSO₄.7H₂O, 0,01 g CuSO₄.5H₂O, 0,01 g AlK(SO₄)₂.12H₂O, 0,01 g H₃BO₃, 0,01 g Na₂MoO₄.2H₂O pH 7,6) besiyerine inoküle edildikten sonra 37 °C’de 120 rpm’de 1 hafta süre ile inkübasyona bırakıldı. Kontrol olarak bakteri inoküle edilmemiş besiyeri kullanıldı (Raj vd. 2006). Bir hafta sonunda kontrol ve bakteri inokulasyonu yapılan kültürler 8000 g’de 15 dk. santrifüje tabi tutuldu. Elde edilen süpernatantların pH’ı HCl ile 1’e kadar düşürülerek kraft ligninin çökmesi sağlandı. Çökeltiler darası alınmış santrifüj tüplerinde 8000 g’de 30 dk. santrifüj edilerek toplandı ve 60°C’de 48 saat kurumaya bırakıldı. 48 saat sonunda santrifüj tüpleri

tartılarak kraft lignin kaybı % olarak hesaplandı (kontrolden elde edilen kraft lignin miktarı %100 olarak alındı).

2.7. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

2.7.1. Lignin Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Lignin peroksidaz aktivitesi veratril alkolün veratril aldehite dönüşüm miktarının tayin edilmesi ile ölçüldü. Standart şartlarda reaksiyon karışımı 2 mM veratril alkol, 0,1 mM sodyum tartarat tamponu (pH 2,5) 275 µl enzim içermektedir. Reaksiyon 0,4 mM olacak şekilde H₂O₂'nin yavaş yavaş eklenmesiyle başlatıldı. Daha sonra 310 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümler yapıldı.

2.7.2. Mangan Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Mangan peroksidaz aktivitesi Mn(III) malonat kompleksinin miktarının belirlenmesi ile ölçüldü. Standart şartlarda reaksiyon karışımı pH 4,5 olan 50 mM sodyum malonat tamponu içinde 0,2 mM MnSO₄, 0,1mM H₂O₂ ve enzim içermektedir. Reaksiyon sonucu oluşan Mn(III) malonat kompleksi 270 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü.

2.7.3. Lakkaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Lakkaz aktivitesi ABTS'nin oksidasyonu ile belirlendi. Standart şartlarda reaksiyon karışımı 0,5 mM ABTS, 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 5) ve uygun miktarda enzim içermektedir. ABTS'nin oksidasyonu 420 nm dalga boyunda spektrofotometrede yapılacak olan ölçümlerle belirlendi.

2.8. Bakterilerin Atık Boya Gideriminde Kullanılması

Elde edilen bakterilerin boya renk giderimini test etmek için 200 mg l⁻¹ oranında Remazol Brilliant Blue R (RBBR) içeren 25 ml minimal sıvı besiyeri (BLM-l⁻¹: 10 g glukoz, 5 g pepton, 2 g yeast ekstrakt ve 70 ml iz element solusyonu (g l⁻¹: 1.5 g nitrilasetik

asit %99, 3 g MgSO₄.7H₂O, 0.5 g MnSO₄.H₂O, 1 g NaCl, 0,1 g FeSO₄.7H₂O, 0,1 g CoSO₄, 0,1 g CaCl₂.2H₂O, 0,1 g ZnSO₄.7H₂O, 0,01 g CuSO₄.5H₂O, 0,01 g AlK(SO₄)₂.12H₂O, 0,01 g H₃BO₃, 0,01 g Na₂MoO₄.2H₂O pH 7,6) kullanıldı. Steril edilen besiyeri 0,25 ml 24 saatlik NB'de büyüyen bakteri kültürüyle inoküle edildi. İnoküle edilen kültür 37°C'de 120 rpm'de 1 hafta büyütüldü. Bir haftalık süre sonunda bakteri kültürü 13,000 g'de 5 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant spektrofotometrede 595 nm'de ölçüldü. İnoküle edilmemiş besiyeriden elde edilen süpernatant kör olarak kullanıldı. Renk giderim oranı aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

$$\% \text{ Renk giderimi} = \frac{A_{\lambda B} - A_{\lambda S}}{A_{\lambda B}} \times 100$$

A_{λB}: Başlangıçtaki absorbans

A_{λS}: Bir hafta büyütülen kültürün absorbansı

2.9. Bakterilerin Sentetik Boya Dekolorizasyon Oranlarının Belirlenmesi

2.9.1 Ligninolitik Enzimlerin Kısmi Saflaştırılması

Bakteriler sıvı lignin besiyerinde (5 g lignin, 9 g NaCl; 1000 ml dH₂O) 37°C'de 120 rpm'de 2 gün boyunca büyütüldü. Büyütülen hücreler 10000 rpm'de 5 dk çöktürüldü. Elde edilen süpernatant enzim olarak kullanıldı.

2.9.2. Boya Dekolorizasyonu

Boya dekolozasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan reaksiyon 1 ml son hacimde 80 µM boya, 0,4 mM H₂O₂ ve 50 mM sodyum tartarat tamponu içermektedir. Reaksiyon H₂O₂ eklenmesiyle başlatıldı ve 15 dk sonra absorbansların ölçülmesiyle dekolozasyon hesaplandı (Ollikka, 1993). Bromofenol blue 590 nm, metilen mavisi 662 nm, metil oranj 502 nm ve toluidine mavisi 625 nm'de ölçüldü.

2.10. İzolatların Boya Ağartmada Kullanılması

Elde edilen bakterilerin boya ağartımını test etmek için 1:1 sulandırılmış 2 ml l⁻¹ oranında direkt kumaş boyası (Alex Schoeller, 90905 Carmine Lake) minimal sıvı besiyeri (BLM-l⁻¹: 10 g glukoz, 5 g pepton, 2 g yeast ekstrakt ve 70 ml trace element solusyonu (g l⁻¹: 1.5 g nitrilasetik asit 99%, 3 g MgSO₄.7H₂O, 0.5 g MnSO₄.H₂O, 1 g NaCl, 0,1 g FeSO₄.7H₂O, 0,1 g CoSO₄, 0,1 g CaCl₂.2H₂O, 0,1 g ZnSO₄.7H₂O, 0,01 g CuSO₄.5H₂O, 0,01 g AlK(SO₄)₂.12H₂O, 0,01 g H₃BO₃, 0,01 g Na₂MoO₄.2H₂O pH 7,6) kullanıldı. Steril edilen besiyeri 0,25 ml 24 saatlik NB'de büyüyen bakteri kültürüyle inoküle edildi. İnoküle edilen kültür 37°C'de 120 rpm'de 1 hafta büyütüldü. Bir haftalık süre sonunda bakteri kültürü 13,000 g'de 5 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edildi ve hücreler ortamdan uzaklaştırıldı. İnoküle edilemeyen besiyeri kontrol olarak kullanıldı. Kontrol ve inoküle edilen kültürlerden elde edilen süpernatantlar renk bakımından karşılaştırılarak izolatların boyayı ağartıp ağartmadıkları belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Lignin Degrede Eden Bakterilerin Seçilmesi

Trabzon Değirmendere Büyük Sanayi Sitesi'nin farklı yerlerinden alınan petrol bulaşmış toprak ve farklı bölgelerden alınan inek gübresi örnekleri, lignin içeren sıvı besiyerine inoküle edilerek zenginleştirildi. 2-3 gün 30-37°C'de yapılan inkübasyondan sonra lignin agar besiyerine (5 g lignin; 17,3 g agar; 1000 ml fizyolojik distile su) çizgi ekim yapıldı. Bu besiyerinde tek karbon kaynağı lignin olduğu için besiyeri lignin degrade eden bakteriler için seçici olarak kullanıldı. Lignin agar petrilerinin üzerinde büyüyen bakteriler ligninolitik enzimler bakımından pozitif olan bakteriler olarak belirlendi.

3.2. İzolatların Türlerinin Belirlenmesi

Petrol bulaşmış toprak örnekleri ve inek gübresinden izole edilen lignini degrade eden mezofilik bakteri izolatlarının saf kültürleri yapıldıktan sonra birbirinden farklı olabilecek 8 adet izolat seçildi. Bakterilerin türlerinin belirlenmesi amacıyla genomik DNA'ları kalıp olarak kullanılarak UNI16S-L ve UNI16S-R primerleri ile PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR sonuçları 0,5 mg/ml etidyum bromür içeren %1,0'lik agaroz jelde yürütüldü ve sonuçlar BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntüldü. Ünlversal primerler kullanılarak elde edilen DNA parçası pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı ve baz dizin analizi, baz dizini otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla ile (Macrogen, Hollanda) belirlendi. Elde edilen 16S rRNA dizileri Genbank'ta (NCBI, NIH, Washington, DC) var olan diğer bakteriyal dizilerle karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırma sonucu tüm izolatların *Enterobacteriaceae* familyasına ait olduğu belirlendi. Yapılan Blastn taraması sonucuna göre izole edilen bakterilerin beş tanesinin *Entereobacter*, iki tanesinin *Citrobacter*, bir tanesinin ise *Klebsiella* cinsine ait daha önceden sistematikleri yapılmış olan türlere ait suşlar olduğu belirlendi. EzTaxon programı kullanılarak, bu izolatların 16S rRNA gen dizileri ile ait oldukları cinse ait türlerin 16S rRNA gen dizileri arasındaki benzerlik oranları belirlendi ve bu değerler Tablo 6 ve 7'de her cins için ayrı olarak gösterildi. Elde edilen verilere

göre L1, L2 ve PT21 izolatının *Enterobacter cancerogenus* türüne ait farklı suşlar olduğu, L3 ve L4 izolatının *Enterobacter ludwigii* türüne ait farklı suşlar olduğu, PT22 izolatının *Citrobacter sedlakii* türüne, PT41 izolatının *Citrobacter farmeri* türüne ve G1 izolatının ise *Klebsiella pneumoniae* türüne ait suşlar olduğu belirlendi.

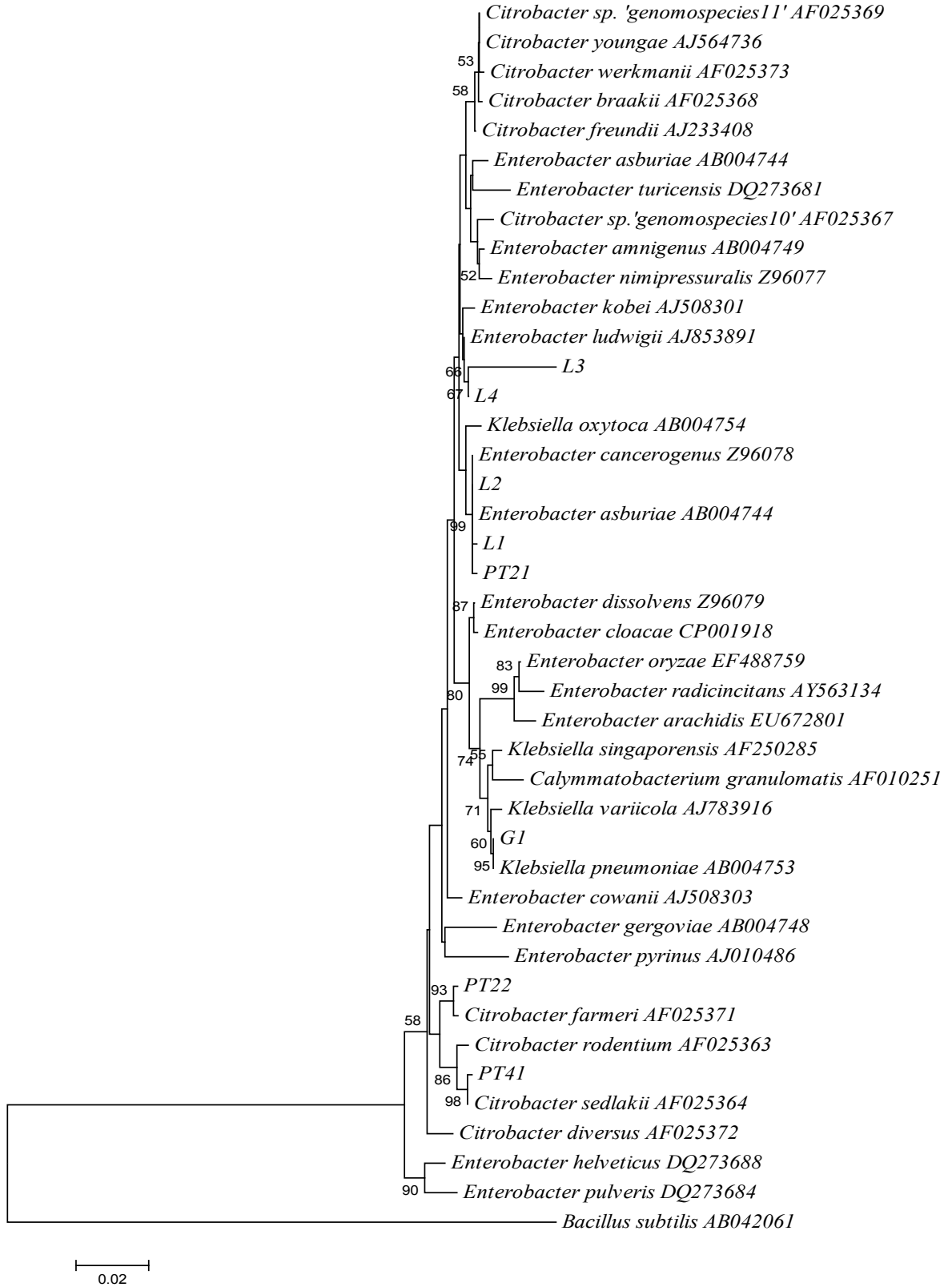
Ayrıca, izolatların, ait oldukları cinslerdeki türlerle aralarındaki ilişkileri ortaya koymak amacıyla 16S rRNA genlerine ait baz dizinleri MEGA 4 paket programı kullanılarak değerlendirildi ve neighbour-joining programıyla 16S rRNA genleri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç çizildi (Şekil 8). Bu üç cinse ait 8 izolatın 16S rRNA gen dizileri Ekler bölümünde verilmektedir.

Tablo 6. *Enterobacter* cinsine ait izolatların, *Enterobacter* türlerinin 16S rRNA gen dizilerine olan benzerliklerinin yüzdesi

	L1	L2	L3	L4	PT21
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99	98,8	96,6	98,9	98,7
<i>Enterobacter asburiae</i>	98,6	98,2	96,5	98,4	98
<i>Enterobacter ludwigii</i>	98,5	98	97,3	99,7	97,8
<i>Enterobacter cowanii</i>	97	98,1	95,7	97,7	98,2

Tablo 7. *Citrobacter* ve *Klebsiella* cinslerine ait izolatların, *Citrobacter* ve *Klebsiella* türlerinin 16S rRNA dizilerine olan benzerliklerin yüzdesi

	PT22	PT41	G1
<i>Citrobacter sedlakii</i>	97,2	99,2	
<i>Citrobacter farmeri</i>	99,2	98,1	
<i>Citrobacter rodentium</i>	97,8	98,4	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			99,8
<i>Klebsiella variicola</i>			99
<i>Klebsiella granulomatis</i>			98



Şekil 8. *Enterobacter*, *Citrobacter* ve *Klebsiella* cinslerine ait izolatların 16S rRNA gen dizileri açısından yakınlık derecelerini gösteren filogenetik ağaç

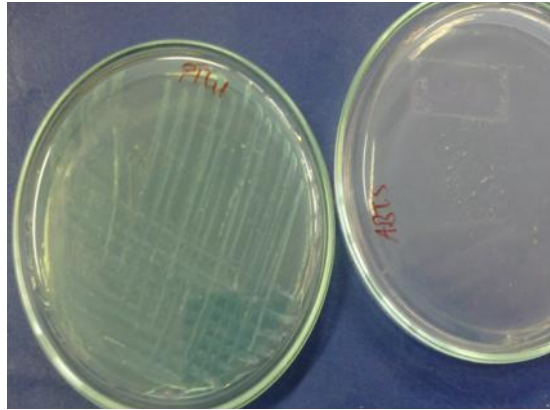
3.3. Bakterilerin Sahip Oldukları Ligninolitik Enzimlerinin Belirlenmesi

3.3.1. Peroksidaz

LiP ve MnP'yi belirlemek için bakteriler NA besiyerinde 37°C'de 2 gün boyunca büyütüldü. 2 gün sonunda koloniler üzerine eşit hacimde karıştırılan %0,4'lük H₂O₂ ve %1'lik pyrogallol çözeltisi damlatıldı. Kolonilerin sarı-kahverengi renk oluşturmaları bu iki enzim açısından pozitif olduklarının göstergesidir. Yapılan çalışma sonucunda tüm izolatlarda kahverengi koloni oluşumu gözlemlendi ve tüm izolatların lignin peroksidaz veya mangan peroksidaz enzimlerinden birine veya her ikisine birden sahip olduğu belirlendi. izolatların hangi peroksidaz enzimini içerdiklerin tespit edilmesi amacıyla spektrofotometrik aktivite testleri yapıldı. Tüm izolatlarda lignin peroksidaz aktivitesinin olduğu tespit edildi ve yine izolatların tümünde mangan peroksidaz enziminin çok düşük seviyede olduğu belirlendi.

3.3.2. Lakkaz

Diğer bir ligninolitik enzim olan lakkaz varlığının tespit edilmesi için ABTS agar kullanıldı. ABTS lakkaz tarafından okside edildiğinde besiyeri yeşil renge dönüşmektedir (Şekil 9). Bu renk farklılaşmasından yararlanılarak yapılan tarama sonucunda sadece PT 41 izolatında lakkaz varlığı tespit edildi.

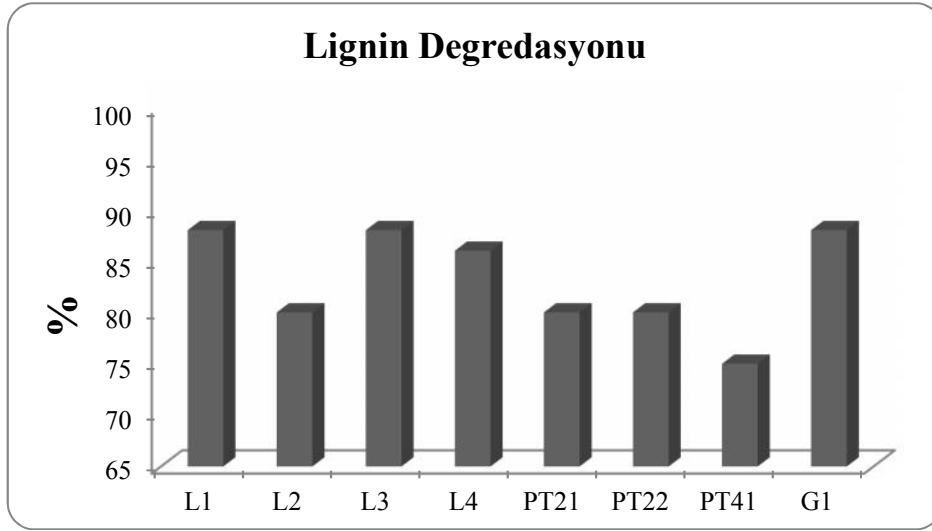


Şekil 9. PT41 izolatının ABTS agardaki lakkaz aktivitesi

3.4. Bakterilerin Lignin Degredasyon Oranının Belirlenmesi

3.4.1. Lignosülfat Degredasyonu

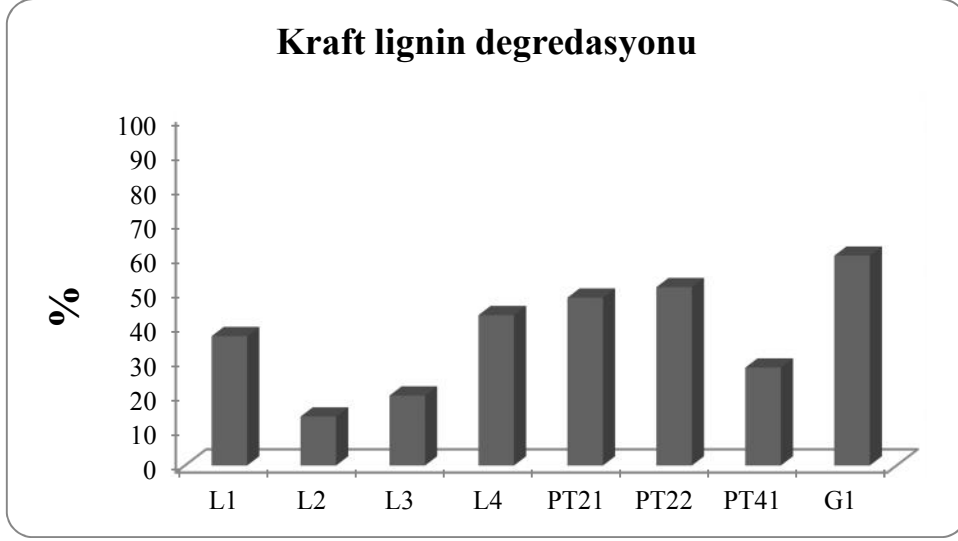
Bakterilerin lignin degredasyon oranının belirlenmesi için lignin degredasyon besiyerinde yapılan 1 haftalık inkübasyon sonunda degredasyona uğrayan lignin miktarı hesaplandı. Elde edilen bulgular Şekil 10'da verildi.



Şekil 10. Lignin degredasyon grafiği

3.4.2. Kraft Lignin Degredasyonu

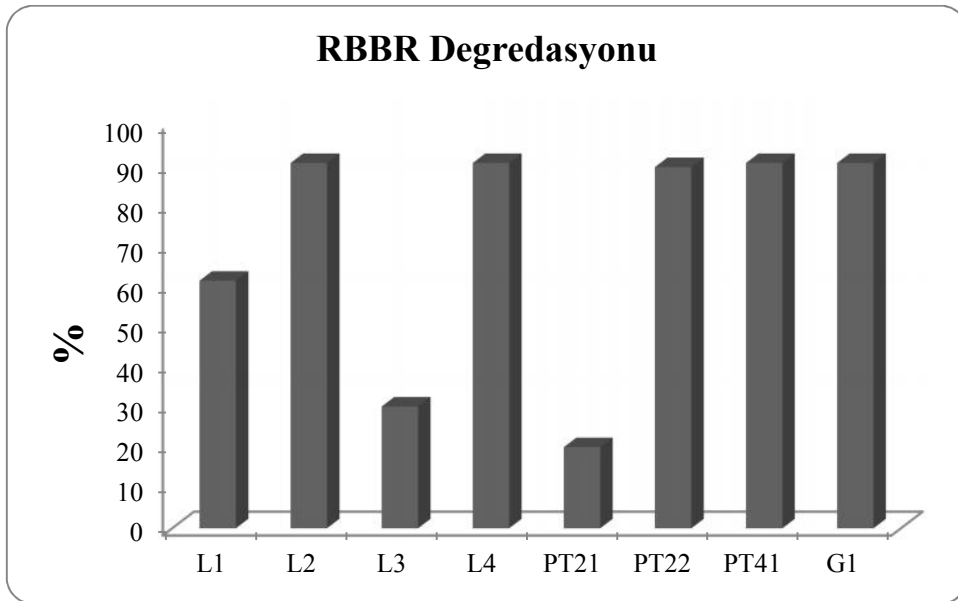
Bakterilerin kraft lignin degredasyon oranının belirlenmesi için KL-MSM besiyerinde yapılan 1 haftalık inkübasyon sonunda degredasyona uğrayan kraft lignin miktarı hesaplandı. Elde edilen bulgular Şekil 11'da verildi.



Şekil 11. Kraft lignin degradasyon grafiği

3.5. Bakterilerin Atık Boya Gideriminde Kullanılması

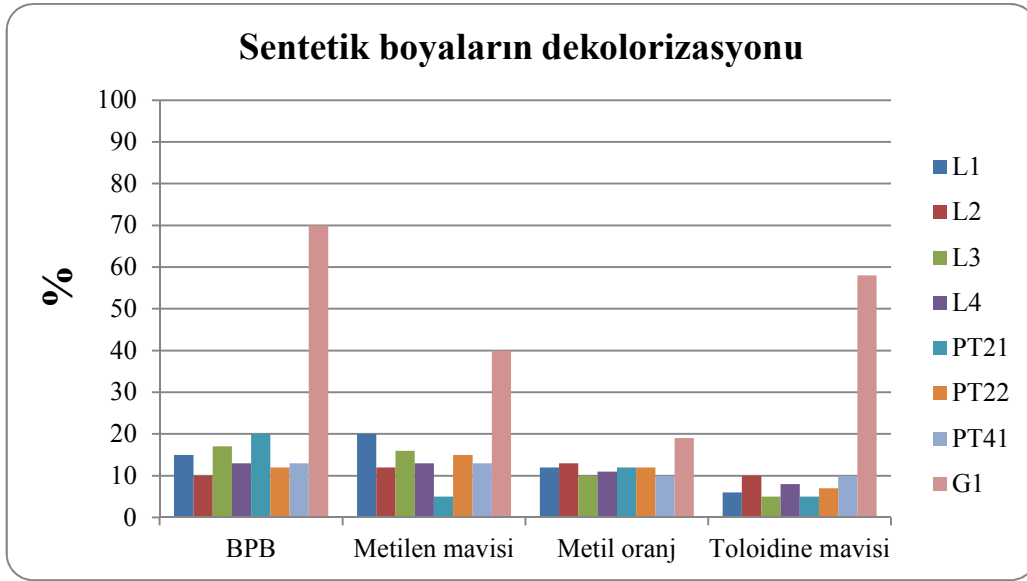
İzolatların atık boya gideriminde kullanılabilirliğini saptamak amacıyla RBBR içeren besiyerine inokülasyon yapıldı ve yapılan inokülasyon sonucunda dekolorizasyon oranı belirlendi. Elde edilen verilere göre en yüksek dekolorizasyon oranı L2, L4, PT41 ve G1 izolatında %90 olarak saptandı. En düşük dekolorizasyon oranı ise PT21 izolatında %20 olarak belirlendi (Şekil 12).



Şekil 12. Atık boya giderimi grafiği

3.6. Lignin Peroksidazın Sentetik Boyaların Dekolorizasyonunda Kullanılması

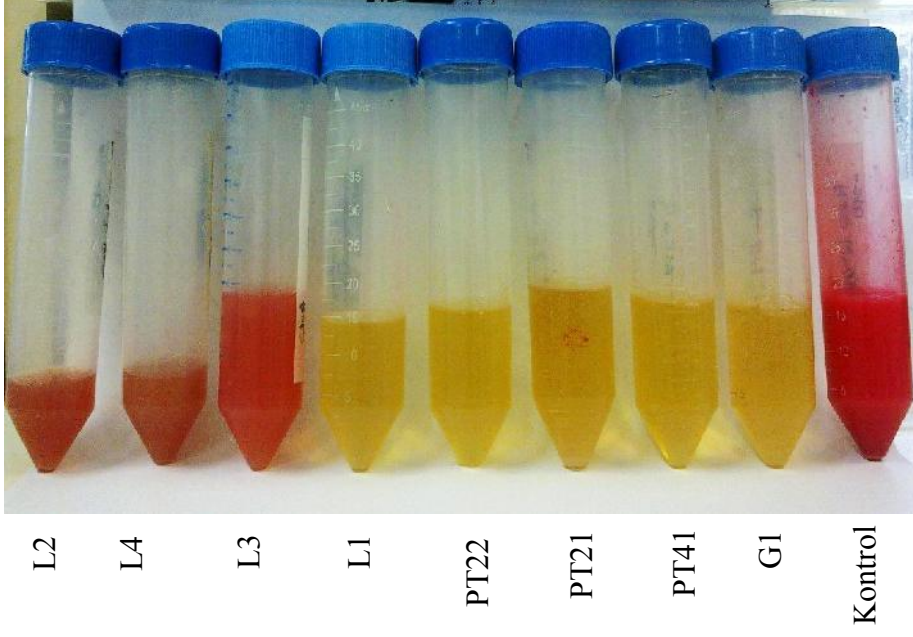
İzolatlardan elde edilen lignin peroksidaz enziminin sentetik boyaların dekolozasyonunda kullanılabilirliği araştırıldı. G1 izolatından elde edilen lignin peroksidazın boyaları etkili bir şekilde dekolozize ettiği belirlenirken diğer izolatlardan elde edilen enzimlerin aynı etkinliği göstermediği tespit edildi (Şekil 13).



Şekil 13. LiP enziminin sentetik boya dekolozasyonu

3.7. Bakterilerin Boya Ağartmada Kullanılması

Yapılan boya ağartma çalışması sonucunda L1, PT21, PT22, PT41 ve G1 izolatlarının boyayı (Alex Schoeller, 90905 Carmine Lake) tamamen ağartarak ortamdan uzaklaştırdığı belirlendi. Diğer izolatların ise boya renginde bir azaltma yapmadığı belirlendi (Şekil 14).



Şekil 14. İzolatların boya (Alex Schoeller, 90905 Carmine Lake) ağartma kapasiteleri

4. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışma ile Trabzon ilinin çeşitli bölgelerinden petrol bulaşmış toprak ve inek gübresi örnekleri toplanmış ve bu örneklerden lignin agar ortamında gelişme gösteren ve morfolojik yapıları farklı olan toplam 8 izolat elde edilmiştir. Elde edilen bu izolatlar L1, L2, L3, L4, PT21, PT22, PT41 ve G1 olarak isimlendirilmiştir. Yapılan 16S rRNA analizleri sonucu izole edilen bakterilerin beş tanesinin *Entereobacter*, iki tanesinin *Citrobacter*, bir tanesinin ise *Klebsiella* cinsine ait daha önceden sistematikleri yapılmış olan türlere ait suşlar olduğu belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre L1, L2 ve PT21 izolatının *Enterobacter carcerogenus* türüne ait farklı suşlar olduğu, L3 ve L4 izolatının *Enterobacter ludwigii* türüne ait farklı suşlar olduğu, PT22 izolatının *Citrobacter sedlakii* türüne, PT41 izolatının *Citrobacter farmeri* türüne ve G1 izolatının ise *Klebsiella pneumonia* türüne ait suşlar olduğu belirlendi.

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde genel olarak mantarlar üzerinde çalışıldığı ve bu mantar türlerinden bazılarının lignini degrades eden enzim sistemlerine sahip olduğu görülmüştür. Lignin parçalayan funguslardan *Phanerochaete cryso sporium* ve *Trametes versicolor* en çok çalışılmış funguslardır. Ligninolitik basidiomycete *Phanerochaete cryso sporium*'un lignini oldukça iyi degrades ettiği bulunmuştur ve ligninin biyolojik parçalanmasının fizyolojik gereksinimlerinin çalışılması için model organizma olarak kullanılmıştır. *Trametes versicolor* oldukça fazla çalışılmış ve önemli miktarda lakkaz salgılayan bir diğer beyaz çürükçül fungustur. El-Gammal ve ark. (1998) *P. crhysoendosporium*, *C.versicolor* ve *S. viridoendosporus* mantarları ile yaptıkları çalışmada bu mantarların lignini degrades ettiklerini gözlemlemişlerdir. Bu türlerin lignin degradesyonları incelendiğinde en fazla degradesyona sebep olanın % 84,06 oranında *P. crhysoendosporium* ve en az degradesyona sebep olanın ise % 26,25 oranında *S. viridoendosporus* olduğu tespit edilmiştir. *C. versicolor* ise % 62,9 oranında degradesyona sebep olabilmektedir.

Her ne kadar yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu mantarlar üzerine olsa da bakterilerin de lignini degrades eden enzim sistemlerine sahip oldukları bilinmektedir. Mantarlara bakıldığında çok güçlü lignin degrades eden enzim sistemleri vardır (Hatakka, 1994) fakat diğer yandan yüksek pH, sınırlı oksijen ve lignin konsantrasyonu gibi ekstrem çevre ve substrat şartlarındaki pratik uygulamalarda mantarların stabilitesi pek iyi değildir.

Bakteriler ise mantarların bu dezavantajlarının aksine geniş çevresel adaptasyon yetenekleri ve çok yönlü biyokimyasaları sayesinde avantaj sağlamaktadırlar. Bu nedenle son yıllarda yapılan ligninolitik enzim çalışmaları bakteriler üzerinde yoğunlaştırılmış ve çalışmalar hız kazanmıştır.

Şu ana kadar bakterilerle yapılan çalışmalara bakıldığında *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Streptomyces* ve *Bacillus* cinslerine ait suşların lignini degrede ettikleri rapor edilmiştir (Mahadevan, 1991; Morii vd., 1995). Yapılan bu çalışmada izole edilen bakterilerden *Enterobacter* ve *Klebsiella* cinsleri daha önce rapor edilmiştir fakat yapılan literatür taraması sonucu *Citrobacter* cinsine ait bir ligninolitik çalışmaya rastlanmamıştır.

İzolatların lignin degradasyon yüzdeleri Şekil 10' da verilmiştir. Yüzelere bakıldığında izolatların lignini yüksek oranda degrede ettiği görülmektedir. Bu sebeple kağıt sanayinde kağıt hamurundan lignin uzaklaştırılmasında bu izolatların kullanılabilceği düşünülmektedir. Fakat bakıldığında kağıt sanayinde asıl uzaklaştırılmak istenen kraft hamurundaki lignindir dolayısı ile bakterilerin kraft lignini degrede etme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla çalışma yapılmış ve sonuçlar Şekil 11'da verilmiş ve en fazla degradasyon oranı G1 izolatında %60 olarak belirlenmiştir.

Lignin degrede eden bakterilerin izolasyonu ve seçiminde kullanılan lignin besiyerinde ortamda tek karbon kaynağı olarak lignin (lignosülfat) bulunmaktadır ve bakteriler bu ortamda kolayca büyümektedirler. Fakat kraft ligninle yapılan besiyerinde bakteriler ek karbon kaynağına ihtiyaç duymaktadırlar. Bu nedenle hazırlanan besiyerinde karbon ve azot kaynağı olarak %1 glukoz ve %0,5 pepton kullanılmış ve bakteri büyümesi uyarılmıştır.

Elsalam ve El-Hanafy (2009) topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp. suşunun farklı pH'lardaki kraft lignin degradasyon oranlarını araştırmışlar ve en yüksek degradasyon oranını %81,4 olarak pH 6'da bulmuşlardır. Literatüre bakıldığında yine El-Hanafy ve ark. (2008) farklı *Bacillus* suşlarında lignin degradasyon oranını pH 6'da %76,3 ve %67,1 olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada lignin degradasyon oranlarının belirlenmesi için tek pH kullanılmıştır ve El-Hanafy ve arkadaşlarına (2008, 2009) göre daha düşük değerler elde edilmiştir. Fakat kullanılan lignin konsantrasyonları karşılaştırıldığında El-Hanafy ve ark. (2009) kullandığı kraft lignin konsantrasyonu 1 g lignin/l iken bu çalışmada kullanılan konsantrasyon 2 g lignin/l'dir. Bu konsantrasyonlar göz önünde bulundurulduğunda bu çalışmada elde edilen değerlerin daha iyi olduğu söylenebilir. Chandra ve ark. (2007)

yaptıkları çalışmada %0,7 g lignin/l oranında kraft lignin kullanmışlar ve buna rağmen *Paenibacillus* sp., *Aneurinibacillus aneurinilyticus* ve *Bacillus* sp. için lignin degradasyon oranını %37, %33, %30 olarak belirlemişlerdir. Yukarıdaki çalışmaya bakıldığında söz konusu değerlerin oldukça düşük oldukları görülmektedir. Literatüre bakıldığında en yüksek lignin degradasyon oranı Deschamps ve ark. (1980) tarafından endüstriyel kraft lignin kullanılarak *Aeromonas* sp. bakterisinde %98 olarak rapor edilmiştir. Ama yine bu çalışmada da 1 g lignin/l konsantrasyonu kullanılmıştır. Yapılan literatür taraması sonucunda 2 g lignin/l gibi yüksek konsantrasyonda lignin kullanılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez kapsamında yapılan bu çalışmada kullanılan lignin oranı 2 g lignin/l'dir. Bu da bu çalışmada kullanılan lignin konsantrasyonunun diğer çalışmalara göre oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Dolayısı ile elde ettiğimiz değerlerin literatürde iyi bir yere sahip olduğunu ve izolatların lignini yüksek oranda degrade ettiğini ve kağıt sanayinde kullanılabilirliklerinin yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Kâğıt ve kâğıt hamurunun beyazlatılmasında biyolojik sistemlerin kullanılması kâğıt fabrikalarında, kâğıt hamurunun beyazlatılması amacıyla klor kullanımını ortadan kaldıracaktır. Bunun sonucu olarak da bu fabrikaların atıkları aracılığı ile çevreye verilen ve toksik olan klorlu bileşikler elimine edileceklerdir.

Ligninolitik enzim sistemlerine bakıldığında çok çeşitli enzimler içerdikleri görülmektedir. Fakat bu sistemde lignini degrade eden üç ana enzim vardır. Bunlar lignin peroksidaz (LiP), mangan peroksidaz (MnP) ve lakkazdır. Organizmalar bu üç enzime birden sahip olabilecekleri gibi enzimleri tek tek veya ikiyeşerli olarak da bulundurabilirler. Elde edilen izolatların hangi enzimleri içerdiklerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda PT41 izolatının lakkaz ve lignin peroksidaz enzimlerini bulundurduğu diğer izolatların ise sadece lignin peroksidaz enzimine sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında tüm izolatlarda çok düşük oranda mangan peroksidaz aktivitesine rastlanmıştır. Literatürler incelendiğinde bu enzimlerin tekstil, gıda sanayi, biyoremediasyon, kozmetik, farmasötik gibi alanlarda yaygın olarak kullanıldığı göze çarpmaktadır. Fakat enzim kaynaklarına bakıldığında genellikle mantar kaynaklı enzimlerin kullanıldığı görülmektedir. Mantarların yanında *Pseudomonas* türleri lakkaz kaynağı olarak *Streptomyces* türleri de lignin peroksidaz kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Boya ve boyar maddeler tekstil, kozmetik, farmasötik ve deri endüstrilerinde kullanılmaktadır ve birincil olarak önem taşımaktadır çünkü endüstri atık suları bu kirleticileri içermektedir (McKay, 1979). Boyaların bu şekilde atık sularda birikmesi çevre

ve sağlık açısından tehlike arz etmektedir. Bu boyalardan bazıları ışığa ve kimyasallara maruz kalsa bile stabilitesini korumaktadır ve mikroorganizmalar tarafından da zor deġrede edilmektedir (McKay, 1979). Biyoremidasyon tekstil endüstrisi için önerilen, fiziksel ve kimyasal yöntemlere karşı daha az çamur üretmesi, maliyetinin düşük olması veya alıcı ortamlar için daha az zararlı yan ürünlerin oluşması gibi özelliklerinden dolayı atık sularının arıtımı için ideal çözüm olarak kabul edilmektedir (Kocaer ve Alkan, 2002). Özellikle gelişmiş ülkeler başta olmak üzere, son zamanlarda endüstriyel atıklardaki boyaların giderilmesi konusundaki yasal zorunluluklar her geçen gün daha zorlayıcı olmaktadır. Bazı boyaların ise benzidin ve diğer aromatik bileşikler gibi bilinen kanserojenlerden elde edilmesi nedeniyle, bu konudaki kaygılar giderek artmaktadır. Tekstil boyalarının enzimatik olarak parçalanmasını veya renk giderimini sağlayan yaklaşımlar ise genellikle LiP, MnP ve lakkaz gibi ligninolitik enzimlere dayanmaktadır. Mikroorganizmaların ligninolitik sistemleri polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), sentetik boyalar gibi çeşitli ksenobiyotik bileşikleri parçalayabilmektedir (Pointing, 2001). Bu alanda çoğunlukla beyaz çürükçül mantarlar kullanılmaktadır. Bakterilerinde atık boyaları deġrede ettikleri rapor edilmişse de yaygın kullanımı yapılmamaktadır.

Remezol Brilliant Blue R tekstil sanayinde atık sularda bulunan reaktif bir boyadır. Bu yüzden RBBR giderimi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar incelendiğinde daha çok mantar ağırlıklı oldukları, bakterilerle ilgili etkili bir çalışmanın bulunmadığı göze çarpmaktadır. Bu çalışma kapsamında elde ettiğimiz örneklerden izole edilen bakterilerle yaptığımız denemeler sonucunda elde edilen veriler mantarla yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında bakterilerin oldukça etkili oldukları kanaatine varılmıştır. Özsoy ve ark. (2004) *Funalia trogii* ve *Phanerochaete chrysosporium* ile yaptıkları çalışmada iki mantar türünün etkinliğini karşılaştırmışlardır. *Funalia trogii*'nin RBBR'yi 7 günde %92-98 oranında, *Phanerochaete chrysosporium*'un ise 10 gün sonunda bu boyayı sadece %11-12 oranında dekolorize ettiğini bulmuşlardır. Söz konusu sonuçlar bu çalışmayla karşılaştırıldığında (Şekil 12) bakterilerinde oldukça yüksek dekolorizasyon yeteneklerinin olduğu görülmektedir. Kullanılan boya konsantrasyonlarına bakıldığında Özsoy ve ark. (2004) çalışmalarında 10-50 mg/l aralığındaki konsantrasyonlarını kullanmışlardır. Bu çalışmada ise kullanılan boya konsantrasyonu 250 mg/l'dir. Bu konsantrasyon farkı göz önüne alındığında yaptığımız çalışmanın daha etkili olduğu ve elde edilen izolatların atık boya gideriminde mantarlarla yarışabileceği görülmektedir. Yapılan çalışmalar RBBR'nin organizma büyümesi üzerinde toksik etkisi olduğunu

göstermiştir (Al-Sabti, 2000; Chen, 2002). Ortamdaki boya azaldıkça hücre büyümesinin arttığı görülmüştür. Bu yüzden ortama glukoz gibi karbon kaynakları ilave edilerek hücre büyümesi uyarılmıştır.

Lopez ve ark. (2005) ligninolitik aktivitesi olan mantar ve bakteri izole etmişler ve izolatların farklı boyalardaki dekolorizasyon kapasitelerini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucu izole ettikleri bakterilerin pek etkili olmadığını fakat mantarların yüksek oranda dekolorizasyon yeteneğine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Yine de mantarların RBBR'yi zor dekolorize ettiklerini ve etkinliklerinin %30-50 civarında olduğunu belirtmişlerdir.

Yine tekstil endüstrisinde naylon, yün, ipek ve deri boyamasında kullanılan ve insan sağlığına oldukça zararlı olan farklı sentetik boyalarda vardır. Elde edilen izolatların bu boyalardan bromofenol blue, kongo red, metilen mavisi, metil orange ve toluidine blue'nun dekolorizasyonunda kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmış ve Şekil 13' deki sonuçlar elde edilmiştir. RBBR ile karşılaştırıldığında bu boyalarda pek etkili sonuçlar elde edilmediği görülmektedir. Bu boyaların dekolorizasyon sonuçları incelendiğinde G1 izolatının oldukça etkili olduğu ve diğerlerinden öne çıktığı tespit edilmiştir. Kullanılan boyalardaki dekolorizasyon lignin peroksidaz ile ilişkilendirilmektedir (Ollikka, 1993). Yapılan enzim aktivite deneyleri sonucunda da en iyi lignin peroksidaz aktivitesi G1 izolatında elde edilmiştir. Dolayısıyla elde edilen veriler birbirini destekler niteliktedir.

Ollikka ve ark. (1993) *Phanerochaete chrysosporium*'un lignin peroksidazıyla yaptıkları çalışma sonucu boyalardaki dekolorizasyon oranlarını rapor etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara bakıldığında %85 oranında dekolorize olan BPB en etkili değer olarak göze çarpmaktadır. Yapılan çalışmada enzimin boyaları substrat olarak kullanıp parçaladığı belirlenmiştir. Reaksiyona eklenen 2 mM veratril alkolün dekolorizasyonu arttırdığı tespit edilmiştir (Ollikka, 1993). G1 izolatından elde edilen lignin peroksidaz ile yapılan bu çalışmada reaksiyonda tek substrat olarak boya kullanılmış veratril alkol ortama eklenmemiştir. Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda G1 izolatından elde edilen lignin peroksidazın dekolorizasyon kapasitesinin arttırılabileceği ve daha verimli hale getirilebileceği düşünülmektedir.

Literatür taramasında, *Citrobacter* cinsinin dekolorizasyon yeteneğinin olduğu ve bunun daha önce rapor edildiği görülmüştür. Oh ve ark. (2010) *Citrobacter amalonaticus* bakterisinin sentetik boyaları dekolorize ettiğini rapor etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucu %88-99 gibi etkili sonuçlar elde edilmiştir. *Citrobacter* cinsiyle yaptığımız boya

dekolorizasyonu çalışmalarını önceki çalışmalarla karşılaştırdığımızda elde edilen verilerin benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bu çalışmalardan da anlaşıldığı gibi bakterilerinde ligninolitik enzimler açısından kuvvetli olduğu ve çalışmalarda dikkat çekmeye başladığını söyleyebiliriz. Yaptığımız çalışma da bakterilerin dekolorizasyon kapasitesiyle ilgili etkili çalışmalardan biri olma niteliğini taşımaktadır.

Son yıllarda mikroorganizmaların kumaş ağartmasında da kullanılabilirliği tartışılmaktadır. Tekstil sanayi atık suyunun renk-giderimini sağlamanın yanı sıra, dokumaların ağartılmasında ve hatta boyaların sentezinde de ligninolitik enzimlerin kullanılması nedeniyle, bu enzimlerinin tekstil endüstrisinde kullanımını her geçen gün hızla artmaktadır. İzolatların boya dekolorizasyonundaki kapasiteleri göz önünde bulundurulduğunda kumaş ağartmasında kullanılabilecekleri düşünülerek boyamada kullanılan direkt boya ile çalışmalar yapılmıştır. L1, PT21, PT22, PT41 ve G1 izolatlarının boyayı tamamen ağarttığı diğer izolatların ise boya renginde değişiklik yapmadığı belirlenmiştir. Tüm bu veriler ışığında bu çalışmanın ligninolitik bakterilerle ilgili yapılan kapsamlı çalışmalardan biri olduğunu ve izolatların bitoteknolojide kullanılabilirliklerinin yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada petrol bulaşmış toprak ve inek gübresi örneklerinden sekiz farklı bakteri izole edildi ve 16S rRNA analiziyle tür tayini yapıldı. Yapılan analiz sonucunda L1, L2 ve PT21 izolatının *Enterobacter carcerogenus* türüne ait farklı suşlar olduğu, L3 ve L4 izolatının *Enterobacter ludwigii* türüne ait farklı suşlar olduğu, PT22 izolatının *Citrobacter sedlakii* türüne, PT41 izolatının *Citrobacter farmeri* türüne ve G1 izolatının ise *Klebsiella pneumonia* türüne ait suşlar olduğu belirlendi.

Bakterilerin ligninolitik enzimlere sahip olduğu lignin agar üzerinde yapılan inokülasyonlar ile belirlendi. Bakterilerin lignin degradasyon oranları % 88, 80, 88, 86, 80, 80, 75, 88 olarak bulundu. Lignin degradasyonunda asıl hedef kraft lignin olduğundan kraft lignin degradasyon oranının belirlenmesi için yapılan deney sonucu degradasyon oranları L1, L2, L3, L4, PT21, PT22, PT41, G1 izolatları için sırasıyla % 37,14,20,43,48,51,28,60 olarak belirlendi.

Elde edilen izolatların ligninolitik enzimleri belirlendi. PT41 izolatının lakkaz ve lignin peroksidaz içerdiği diğer izolatların ise sadece lignin peroksidaz içerdiği tespit edildi. Bunun yanında tüm izolatların çok düşük oranda mangan peroksidaz aktivitesi gösterdikleri belirlendi.

İzolatların atık boya giderimindeki etkinlikleri incelendi ve RBBR'yi % 20-90 oranında degrade ettikleri belirlendi. RBBR'nin hücre büyümesi açısından toksik etki yarattığı ve bakteri büyümesinin uyarılması için ortama glukoz eklenmesi gerektiği tespit edildi.

İzolatlarda bulunan lignin peroksidaz enziminin sentetik boyaları dekolorize etme özelliği incelendi. G1 izolatından elde edilen lignin peroksidaz enziminin boyaları substrat olarak kullanarak %19-70 oranında dekolorize ettiği belirlenirken diğer izolatlardan elde edilen enzimlerin bu kadar etkili olmadığı gözlemlendi. Kumaş boyamada kullanılan direkt boyaların izolatlar tarafından ağartılma etkinliği araştırıldı. L1, PT21, PT22, PT41 ve G1 izolatlarının boyayı ortamdan uzaklaştırdığı ve ağartma kapasitelerinin olduğu tespit edildi.

6. ÖNERİLER

Ligninolitik enzimler endüstride çok önemli rol oynamaktadır ve bu rollerinin daha da artacağına dair beklentiler bulunmaktadır. Ligninolitik enzim kaynaklarına bakıldığında daha çok mantar kaynaklı enzimlerin kullanıldığı göze çarpmaktadır. Fakat günümüzde mantarlara nazaran daha avantajlı olmaya başlayan bakterilerle ilgili çalışmalar da dikkat çekmektedir. Yapılan bu çalışmada elde edilen izolatların kraft lignin degradasyonu ve boya dekolorizasyonu açısından endüstride kullanılabilecek kapasitede olduğu tespit edildi fakat bakterilerin kapasitelerinin genişletilmesi amacıyla optimizasyon çalışmaları yapılmalıdır.

Bakterilerden elde edilen enzimlerin biyoteknolojide etkin olarak kullanılabilmesi için enzimlerin gen sıraları bulunarak klonlanmalı, genler güçlü promotorlar altına sokularak daha fazla oranda enzim elde edilmelidir. Enzimlerin özellikle ısı kararlılığını arttırmak ve endüstride yararlı bir enzim olmasını sağlamaya yönelik çeşitli mutasyon ve immobilizasyon çalışmaları yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A. ve Gübitz, G. M., 2000. Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*, Applied and Environmental Microbiology, 66, 3357-3362.
- Abraham, W. R., Nogales, B., Golyshin, P. N., Pieper, D. H. ve Timmis, K. N., 2002. Polychlorinated-Biphenyl-Degrading Microbial Communities in Soils and Sediments, Current Opinion in Microbiology, 5, 246-253.
- Achnine, L., Blancaflor, E. B., Rasmussen, S. ve Dixon, R. A., 2004. Colocalization of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase and Cinnamate 4-Hydroxylase For Metabolic Channeling in Phenylpropanoid Biosynthesis, Plant Cell, 16, 3098-3109.
- Aktaş, N. ve Tanyolaç, A., 2003. Reaction Conditions for Laccase Catalyzed Polymerization of Catechol, Bioresource Technology, 87, 209-214.
- Archibald, F. S., Bourbannis, R., Jurasek, L., Paice, M. G. ve Reid, I. D., 1997. Kraft Pulp Bleaching and Delignification by *Trametes vesicolor*, Journal of Biotechnology, 53, 215-236.
- Arias, M. E., Arenas, M., Rodriguez, J., Soliveri, J., Ball, A. S. ve Hernandez, M., 2003. Kraft Pulp Biobleaching and Mediated Oxidation of a Nonphenolic Substrate by Laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, Appl Environ Microbiol, 69, 1953-1958.
- Ay Şal, F., 2010. *Anoxybacillus* sp. PDF1 Lipaz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Bajpai, P., 2004. Biological Bleaching of Chemical Pulps, Critical Reviews in Biotechnology, 24, 1-58.
- Bamforth, S. M. ve Singleton, I., 2005. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Current Knowledge and Future Directions, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 80, 726-736.
- Baminger, U., Ludwig, R., Galhaup, C., Leitner, C., Kulbe, K. D. ve Haltrich, D., 2001. Continuous Enzymatic Regeneration of Redox Mediators Used in Biotransformation Reactions Employing Flavoproteins, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 11, 541-550.
- Banci, L., Ciofi-Baffoni, S. ve Tien, M., 1999. Lignin and Mangan Peroksidaz Catalyzed Oxidation of Phenolic Lignin Oligomers, Biochemistry, 38, 3205-3210.
- Banci, L., 1997. Structural Properties of Peroxidases, J. Biotechnol, 53, 253-263.

- Barbosa, E. S., Perrone, D., Vendramini, A. L. A. ve Leite, S. G. F., 2008. Vanillin Production By *Phanerochaete chrysosporium* Grown On Green Coconut Agro-Industrial Husk in Solid State Fermentation, BioResources, 3, 1042-1050.
- Barr, D. P. ve Aust, S. D., 1994. Mechanisms White Rot Fungi Use to Degrade Pollutants, Environmental Science & Technology, 28, 2, 78A-87A.
- Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Camnade, E., Joly, N., Madzak, C. ve Mougín, C., 2002. Crystal Structure of Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics, Biochemistry, 41, 23, 7325-7333.
- Boerjan, W., Ralph J. ve Baucher, M., 2003. Lignin Biosynthesis, Annu. Rev. Plant Biol., 54, 519–546.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Leech, D. ve Freiermuth, B., 1997. Reactivity and Mechanism of Laccase Mediators for Pulp Delignification, Tappi Proceedings, 335-338.
- Bourbannis, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P. ve Yaguchi, M., 1995, Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator ABTS In Kraft Lignin Depolymerization, Appl. Environ. Microbiol., 61, 1876-1880.
- Cabrita, J. F., Abrantes, L. M. ve Viana, A. S., 2005. N-Hydroxysuccinimide-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold for Biomolecules Immobilisation, Electrochim Acta, 50, 2117–2124.
- Call, H.P ve Mucke, L., 1997. History, Overview and Applications of Mediated Lignolytic Systems, Especially Laccase-Mediator-Systems (Lignozym Process), J. Biotechnol., 53, 163-202.
- Cai, D. ve Tien, M., 1989. On the Reactions of Lignin Peroxidase Compound III (Isozyme H8), Biochem. Biophys. Res. Commun., 162, 464-469.
- Can˜o-Delgado, A., Penfield, S., Smith, C., Catley, M. ve Bevan, M., 2003. Reduced Cellulose Synthesis Invokes Lignification and Defense Responses in *Arabidopsis thaliana*, Plant J, 34, 351–362.
- Chandra, R., Raj, A., Purohit, H. J. ve Kapley, A., 2007. Characterisation and Optimization of Three Potential Aerobic Bacterial Strains for Kraft Lignin Degradation from Pulp Paper Waste, Chemosphere, 67, 839-846.
- Chapple, C., 1998. Molecular Genetic Analysis Of Plant Cytochrome P450- Dependent Monooxygenases, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49, 311–343.
- Christenson, A., Dimcheva, N., Ferapontova, E. E., Gorton, L., Ruzgas, T., Stoica, L., Shleev, S., Yaropolov, A. I., Haltrich, D., Thorneley, R. N. F. ve Aust, S. D., 2004. Direct Electron Transfer Between Ligninolytic Redox Enzymes and Electrodes, Electroanalysis, 16, 1074-1092.

- Cripps, C., Bumpus, J. A. ve Aust, S. D., 1990. Biodegradation of Azo And Heterocyclic Dyes by *Phanerochaete chrysosporium*, Applied and Environmental Microbiology, 56, 1114-1118.
- Deschamps, A. M., Mahoudeau, G. ve Lebeault, J. M., 1980. Fast Degradation of Kraft Lignin by Bacteria, Appl. Microbiol. Biotechnol., 9, 45-51.
- El-Gammal, A. A., Kamel, Z., Adeeb, Z. ve Helmy, S. M., 1997. Biodegradation of Lignocellulosic Substances and Production of Sugars and Lignin Degradation Intermediates by Four Selected Microbial Strains, Polymer Degradation and Stability, 61, 535-542.
- El-Hanafy, A. A. ve Abd-Elsalam, H. E., 2008. Molecular Characterization of Two Native Egyptian Ligninolytic Bacterial Strains, J. Appl. Sci. Res., 4, 1291-1296.
- El-Hanafy, A.A. ve Abd-Elsalam, H. E., 2007. Fingerprinting for the Lignin Degrading Bacteria from the Soil, J. Appl. Sci. Res., 3, 470-475.
- English, A.M., Tsaprailis, G., 1995. Catalytic Structure- Function Relationship in Heme Peroxidases, Adv.Inorg.Chem., 43, 79-125.
- Erden, E., Uçar, C. M., Gezer, T. ve Pazarlıoğlu, N. K., 2009. Screening for Ligninolytic Enzymes from Autochthonous Fungi and Applications for Decolorization of Remazole Marine Blue, Brazilian Journal of Microbiology, 40, 2, 346-353.
- Fabbrini, M., Galli, C., Gentili, P. ve Macchitella, D., 2001. An Oxidation of Alcohols by Oxygen with the Enzyme Laccase, and Mediation by TEMPO, Tetrahedron Letters, 42, 7551-7553.
- Flander, L., Rouau, X., Morel, M. H., Autio, K., Seppänen-Laakso, T., Kruus, K. ve Buchert, J., 2008. Effects of Laccase and Xylanase on the Chemical and Rheological Properties of Oat and Wheat Doughs, J. Agric. Food Chem., 56, 5732-5742.
- Freire, R.S., Durán, N. ve Kubota, L. T., 2001. Effects of Fungal Laccase Immobilization Procedures for the Development of a Biosensor for Phenol Compounds, Talanta, 54, 681-686.
- Ferry, Y. ve Leech, D., 2005. Amperometric Detection of Catecholamine Neurotransmitters Using Electrocatalytic Laccase Electrode, Electroanalysis, 17, 2113-2119.
- Ferrer, I., Dezotti, M. ve Durán, N., 1991. Decolorization of Kraft Effluent by Free and Immobilized Lignin Peroxidases and Horseradish Peroxidase, Biotechnology Letters, 13, 577-582.
- Galkin, S., Vares, T., Kalsi, M. ve Hatakka, A., 1998. Production of Organic Acids by Different White-Rot Fungi as Detected Using Capillary Zone Electrophoresis, Biotechnology Techniques, 12, 4, 267-271.

- Gayazov, R. ve Rodakiewicz-Nowak, J., 1996. Semi-Continuous Production of Laccase by *Phlebia radiata* in Different Culture Media, Folia Microbiologica, 41, 6, 480-484.
- Ghindilis, A. L., 2000. Direct Electron Transfer Catalysed by Enzymes: Application for biosensor development, Biochemical Society Transactions, 28, 84-89.
- Gianfreda, L., Xu, F. ve Bollag, J. M., 1999. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes, Bioremediation Journal, 3, 1, 1-26.
- Glenn, J. K. ve Gold, M. H., 1985. Purification and Characterization of an Extracellular Mn(II)-Dependent Peroxidase from the Lignin Degrading Basidiomycetes, *Phanerochaete chrysosporium*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 242, 329-341.
- Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M. ve Gold, M. H., 1983. An Extracellular H₂O₂-Requiring Enzyme Preparation Involved in Lignin Biodegradation by the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 114, 3, 1077-1083.
- Gochev, V. K. ve Krastanov, A. I., 2007. Isolation of Laccase Producing *Trichoderma* spp., Bulgarian Journal of Agricultural Science, 13, 2, 171-176.
- Gold, M. H. ve Aliç, M., 1993. Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Microbiological Reviews, 57, 3, 605-622.
- Gomes, E., Aguiar, A. P., Carvalho, C. C., Bonfá, M. R. B.; Da Silva, R. ve Boscolo, M., 2009. Ligninases Production by Basidiomycetes Strains on Lignocellulosic Agricultural Residues and Their Application in the Decolorization of Synthetic Dyes, Brazilian Journal of Microbiology, 40, 31-39.
- Haglund, C., 1999. Biodegradation of Xenobiotic Compounds by the White-Rot Fungus *Trametes trogii*, Molecular Biotechnology Programme, Uppsala University School of Engineering, 30.
- Hammel, K. E. ve Cullen, D., 2008. Role of Fungal Peroxidases in Biological Ligninolysis, Current Opinion in Plant Biology, 11, 3, 349-355.
- Hatakka, A., 1994. Lignin-Modifying Enzyme from Selected White-Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation, FEMS Microbiol. Rev., 13, 125-135.
- Heinfling, A., Martinez, M. J., Martinez, A. T., Bergbauer, M. ve Szewzyk, U., 1998. Purification and Characterization of Peroxidases from the Dye Decolorizing Fungus *Bjerkandera adusta*, FEMS Microbiology Letters, 165, 43-50.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P. ve Anke, T., 1998. Characterization of Laccases and Peroxidases from Wood-Rotting Fungi (Family Coprinaceae), Applied and Environmental Microbiology, 64, 1601-1606.

- Iwahara, K., Hirata, M., Honda, Y., Watanabe, T. ve Kuwahara, M., 2000. Free-Radical Polymerization of Acrylamide by Manganese Peroxidase Produced by the White-Rot Basidiomycete *Bjerkandera adusta*, Biotechnology Letters, 22, 17, 1355-1361.
- Kawai, S., Nakagawa, M. ve Ohashi, H., 1999, Aromatic Ring Cleavage of a Nonphenolic β -O-4 Lignin Model Dimer by Laccase of *Trametes versicolor* in the Presence of 1-Hydroxybenzotriazole, FEBS Lett, 446, 355-358.
- Kirk, T. K. ve Farrell, R. L., 1987. Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin, Annual Review of Microbiology, 41, 1, 465-501.
- Kirk, T. K., Tien, M., Kersten, P. J., Mozuch, M. D. ve Kalyanaraman, B., 1986. Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. Mechanism of its Degradation of the Nonphenolic Arylglycerol B-aryl Ether Substructure of Lignin, Biochem.J., 236, 279-287.
- Kishi, K., Wariishi, H., Marquez, L., Dunford, B.H. ve Gold, M. H., 1994. Mechanisms of Manganese Peroxidases Compound II Reduction, Effect of Organic Acid Chelators and pH, Biochemistry, 33, 8694-8701.
- Köller, G., Möeder, M. ve Czihal, K., 2000. Peroxidative Degradation of Selected PCB: A Mechanistic Study, Chemosphere, 41, 1827-1834.
- Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F. J. ve Alcalde, M., 2008. Decolorization of Synthetic Dyes by Laccase Immobilized on Epoxy-Activated Carriers, Process Biochemistry, 43, 169-178.
- Lee, J. W., Lee, S. M., Hong, E. J., Jeung, E. B., Kang, H. Y., Kim, M. K. ve Choi, I. G., 2006. Estrogenic Reduction of Styrene Monomer Degraded by *Phanerochaete chrysosporium* KFRI 20742, The Journal of Microbiology, 44, 177-184.
- Leontievsky, A. A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J. K., Pozdnyakova, N. N. ve Myasoedova, N. M., Kalkkinen, N., Golovleva, L. A., Cammack, R., Thurston, C. F. ve Hatakka, A., 1997. Blue and Yellow Laccases of Ligninolytic Fungi, FEMS Microbiology Letters, 156, 9-14.
- Lesage-Meessen, L., Delattre, M., Haon, M., Thibault, J. F., Ceccaldi, B. C., Brunerie, P. ve Asther, M., 1996. A Two-Step Bioconversion Process for Vanillin Production from Ferulic Acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*, Journal of Biotechnology, 50, 107-113.
- Lomascolo, A., Stentelaire, C., Asther, M. ve Lesage-Meessen, L., 1999. Basidiomycetes as New Biotechnological Tools to Generate Natural Aromatic Flavours for the Food Industry, Trends in Biotechnology, 17, 282-289.
- Makela, M., Galkin, S., Hatakka, A. ve Lundell, T., 2002. Production of Organic Acids and Oxalate Decarboxylase in Lignin-Degrading White Rot Fungi, Enzyme and Microbial Technology, 30, 4, 542-549.

- Mansfield, S. D., 2009 Solutions for Dissolution Engineering Cell Walls for Deconstruction, Curr Opin Biotechnol, 20, 286–294.
- Martele, Y., Callewaerta, K., Naessens, K., Van Daeleb, P., Baetsb, R. ve Schacht, E., 2003. Controlled Patterning of Biomolecules on Solid Surface, Mater Sci. Eng. C Biomim. Mater Sens Syst, 23, 341–345.
- Mayer, A. M. ve Staples, R. C., 2002. Laccase: New Functions for an Old Enzyme, Phytochemistry, 60, 6, 551-565.
- Mc Michel, F. C., Dass, B. S., Grulke, E. A. ve Reddy, A. C., 1991. Role of Manganese Peroxidases and Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in Decolorization of Kraft Bleach Plant Effluent, Applied and Environmental Microbiology, 57, 2368-2375.
- Mester, T. ve Tien, M., 2000. Oxidation Mechanism of Ligninolytic Enzymes Involved in the Degradation of Environmental Pollutants, International Biodeterioration & Biodegradation, 46, 51-59.
- Mikolasch, A., Hammer, E., Jonas, U., Popowski, K., Stelow, A. ve Schauer, F., 2002. Synthesis of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-Propionic Acid Derivatives by N-coupling of Amines Using Laccase, Tetrahedron, 58, 7589-7593.
- Minussi, R. C., Pastore, G. M. ve Durán, N., 2002. Potential applications of laccase in the food industry, Trends Food Sci. Technol, 13, 205–216.
- Mocchiutti, P., Zanuttini, M. ve Saparrat, M. C. N., 2005. Improvement of Recycled Unbleached Pulp Properties by Laccase Mediator System, Periódico o Papel da ABTCP, 66, 54-58.
- Moreira, M. T., Feijoo, G., Canaval, J. ve Lema, J. M., 2003. Semipilot-Scale Bleaching of Kraft Pulp with Manganese Peroxide, Wood Science and Technology, 37, 117-123.
- Morii, H., Nakamiya, K. ve Kinoshita, S., 1995. Isolation of Lignin Decolouring Bacterium, J. Ferment. Bioeng, 80, 296–299.
- Novo Uzal, E., Gomez Ros, L. V., Pomar, F., Bernal, M. A., Paradela, A., Albar, J. P. ve Ros Barcelo, A., 2009. The Presence of Sinapyl Lignin in *Ginkgo biloba* Cell Cultures Changes Our Views of the Evolution of Lignin Biosynthesis, Physiol Plant, 135, 196–213.
- Oyadomari, M., Shinohara, H., Johjima, T., Waruishi, H. ve Tanaka, H., 2003. Electrochemical Characterization of Lignin Peroxidase from the White-Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 21, 4-6, 291-297.

- Paszczynski, A., Huynh, V. B. ve Crawford, R., 1985. Enzymatic Activities of an Extracellular, Manganese-Dependent Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, FEMS Microbiology Letters, 29, 37-41.
- Piontek, K., Antorini, M. ve Choinowski, T., 2002. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers, The Journal of Biological Chemistry, 277, 37663-37669.
- Piontek, K., Glumoff, T. ve Winterhalter, K., 1993. Low pH Crystal Structure of Glycosylated Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å Resolution, FEBS Letters, 315, 119-124.
- Pointing, S. B., 2001. Feasibility of Bioremediation by White-Rot Fungi, Applied Microbiology and Biotechnology, 57, 20-33.
- Ponzoni, C., Beneventi, E., Cramarossa, M. R., Raimondi, S., Trevisi, G., Pagnoni, U. M., Riva, S. ve Forti, L., 2007. Laccase-Catalyzed Dimerization of Hydroxystilbenes, Advanced Synthesis & Catalysis, 349, 1497-1506
- Popp, J. K. ve Kirk, T. K., 1991. Oxidation of Methoxybenzenes by Manganese Peroxidase and by Mn^{+3} , Arch. Biochem. Biophys., 288, 145-148.
- Poulos, T. L., Edwards, S. L., Wariishi, H. ve Gold, M. H., 1993. Crystallographic Refinement of Lignin Peroxidase at 2Å, J. Biol. Chem., 268, 4429-4440.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Ralph, S. A. ve Christensen, J. H., 2004. Lignins: Natural Polymers from Oxidative Coupling of 4-Hydroxyphenylpropanoids, Phytochem Rev 3, 29–60.
- Ralph, J., Marita, J. M., Ralph, S. A., Hatfield, R. D., Lu, F., Ede, R. M., Peng, J., Quideau, S., Helm, R. F. ve Grabber, J. H., 1999. Solution-State NMR of Lignins, In DS Argyropoulos, ed, Advances in Lignocellulosic Characterization, TAPPI Press, Atlanta, pp 55–108.
- Rasmussen, S. ve Dixon, R. A., 1999. Transgene-Mediated and Elicitor-Induced Perturbation of Metabolic Channeling at the Entry Point into the Phenylpropanoid Pathway, Plant Cell, 11, 1537–1552.
- Rayner, A. D. M. ve Boddy, L., 1988. Fungal Decomposition of Wood, Its Biology and Ecology, NY: Wiley.
- Renganathan, V. ve Gold, M. H., 1994. Purification of A 1,2,4-Trihydroxybenzene 1,2-Dioxygenase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, J. Bact., 176, 4838- 4844.
- Rippert, P., Puyaubert, J., Grisolle, D., Derrier, L. ve Matringe, M., 2009. Tyrosine and Phenylalanine are Synthesized within the Plastids in *Arabidopsis*, Plant Physiol., 149, 1251–1260.

- Ro, D. K., Mah, N., Ellis, B. E. ve Douglas, C. J., 2001. Functional Characterization and Subcellular Localization of Poplar (*Populus trichocarpa* , *Populus deltoides*) Cinnamate 4-Hydroxylase, Plant Physiol, 126, 317–329.
- Rodríguez, S. ve Toca, J. L., 2006. Industrial and Biotechnological Applications of Laccases: A review, Biotechnology Advances, 24, 500-513.
- Roy, J. J., Abraham, T. E., Abhijith, K. S., Sujith, K. P. V. ve Thakur, M. S., 2005. Biosensor for the Determination of Phenols Based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of Laccase, Biosens Bioelectron, 21, 206–211.
- Saparrat, M. C. N., Mocchiutti, P., Liggieri, C. S., Aulicino, M. B., Caffini, N. O., Balatti, P. A. ve Martínez, M. J., 2008. Ligninolytic Enzyme Ability and Potential Biotechnology Applications of the White-Rot Fungus *Grammothele subargentea* LPSC no. 436 strain, Process Biochemistry, 43, 368-375.
- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A. ve Autio, K., 2006. Effects of Laccase, Xylanase and Their Combination on the Rheological Properties of Wheat Doughs, J. Cereal. Sci, 43, 152–159.
- Shin, K. S. ve LEE, Y. J., 2000. Purification and Characterization of a New Member of the Laccase Family from the White-Rot Basidiomycete *Coriolus hirsutus*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 384, 109-115.
- Singh, G., Ahuja, N., Batish, M., Capalash, N. ve Sharma, P., 2008. Biobleaching of Wheat Straw-Rich Soda Pulp with Alkalophilic Laccase from *Gammaproteobacterium* JB: Optimization of Process Parameters Using Response Surface Methodology, Bioresour Technol, 99, 7472–7479.
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Pérez-Boada, M., Martínez, M. J., Asther, M. ve Colom, J. F. , 2005. Comparison of Different Fungal Enzymes for Bleaching High-Quality Paper Pulps, Journal of Biotechnology, 115, 333-343.
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M. ve Machonkin, T. E., 1996. Multicopper Oxidases and Oxygenases, Chemical Reviews, 96, 2563-2606.
- Soto, A. M., Justicia, H., Wray, J. W. ve Sonnenschein, C., 1991. p-Nonyl-Phenol: an Estrogenic Xenobiotic Released from “Modified” Polystyrene, Environmental Health Perspectives, 92, 167-173.
- Sticklen, M. B., 2008. Plant Genetic Engineering for Biofuel Production: Towards Affordable Cellulosic Ethanol, Nat Rev Genet, 9, 433–443.
- Steven, L., Edwards, T., Reeta, R., Hiroyuki, W., Michael, H. G. ve Thomas, L. P., 1993. Crystal Structure of Lignin Peroxidase, 90, 750- 754.
- Strebotnik, E. ve Hammel, K. E., 2000. Degradation of Nonphenolic Lignin by the Laccase/1-Hydroxybenzotriazole System, Journal of Biotechnology, 81, 179-188.

- Thurston, C. F., 1994, The Structure and Function of Fungal Laccases, Microbiology, 140,19-26.
- Tronchet, M., Balague, C., Kroj, T., Jouanin, L. ve Roby, D., 2010. Cinnamyl Alcohol Dehydrogenases C and D, Key Enzymes in Lignin Biosynthesis, Play an Essential Role in Disease Resistance in *Arabidopsis*, Mol Plant Pathol, 11, 83–92.
- Van Aken, B., Hofrichter, M., Scheibner, K., Hatakka, A., Naveau, H. ve Agathos, S., 1994. Transformation and Mineralization of 2,4,6-Trinitrotoluene by Manganese Peroxidase from the White- Rot Basidiomycete *Phlebia radiata*, Biodegradation, 10, 83-91.
- Wariishi, H. ve Gold, M. H., 1990. J. Biol. Chem, 265, 2070- 2077.
- Welinder, K. G. ve Gajhede, M., 1993. In Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology, Universe Of Geneva, 35-42,.
- Wen, X., Jia, Y. ve Li, J., 2009. Degradation of Tetracycline and Oxytetracycline by Crude Lignin Peroxidase Prepared from *Phanerochaete chrysosporium* a White- Rot Fungus, Chemosphere, 75, 1003-1007.
- Weng J.K., Li X., Bonawitz N.D. ve Chapple C., 2008. Emerging Strategies of Lignin Engineering and Degradation for Cellulosic Biofuel Production, Curr Opin Biotechnol, 19, 166–172.
- Wong, Y. ve Yu, J., 1999. Laccase-Catalysed Decolorization of Synthetic Dyes, Water Research, 33, 16, 3512-3520.
- Yaropolov, A. I., Skorobogatko, O. V., Vartanov, S. S. ve Varfolomeyev, S. D., 1994. Laccase: Properties, Catalytic Mechanism and Applicability. Applied Biochemistry and Biotechnology, 49, 257-280.
- Yoshida, H., 1883. Chemistry of Lacquer (Urushi) part I, J.Chem.Soc, 43, 472-486.
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Nimtz, M. ve Berger, R.G., 2003. A Peroxidase from *Lepista irina* Cleaves β,β -Carotene to Flavor Compounds, Biological Chemistry, 384, 7, 1049-1056.

8. EKLER

Ek 1. L1 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC
GAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTG
GGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTG
CAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGC
TAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA
GCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC
ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
AGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGC
AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTA
ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGA
ATTCCAGGTGTAGCGGTGAGATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC
CCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCG
GAGCTAACCGTAAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAA
TTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACC
TTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTG
AGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCA
GTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCA
TAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTA
GTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTC
ACACACGGTACCAT

Ek 2. L2 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC
 GAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTC
 TGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGT
 CGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTA
 GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC
 CAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
 GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGT
 AAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTGCGATTGACGTTACCC
 GCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT
 TAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTTCGGATGTGAAATCC
 CCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTA
 GAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG
 CCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCANGTGCGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
 CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCT
 TCCCGGAGCTAACGCGTTAAGTTCGACCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCA
 ATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAAATTCGATGCAACGCGAA
 GAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAA
 CTCTGAGGCAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGAC
 TGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGAGTA
 GGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGA
 CCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAT
 CGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
 CCGTCACACACGGTACCAT

Ek 3. L3 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

ATTCTACAGTTTGATCATGGCTCATATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC
 GAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTG
 GGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCG
 CAAGACCAAAGAGGGGGACCTTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGC
 TAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA
 GCCACACTGGAAGTATACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC
 ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
 AGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGCGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGC
 AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTA
 ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCC
 GGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGA
 ATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGACGAATACCTGTGGCGAAAGCGGCC
 CCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGATTAATACCCTGG
 TAGTCCACGCCGTAACCTATGTCACCTTGCAGGTTGTGCCCTTGAGGTGTGGCTTCCGGAAC
 TAAATTGTAAATTCGACCGCCCTGGCGAGTACGTGCCGCAAGGTTCAAACCTCAATGAATCG
 CGCGGGGGTCCCTCCCCAGGCGATGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACCGGAAGAACC
 TTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCCTTCGGGAACTCTG
 AGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCA
 GTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCT
 ACACACGTGTTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCA
 TAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTA
 GTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
 ACACACGGTACCAT

Ek 4. L4 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC
 GAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTG
 GGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCG
 CAAGACCAAAGAGGGGGACCTTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGC
 TAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA
 GCCACACTGGAAGTATACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC
 ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAA
 AGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGCGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGC
 AGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTA
 ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCC
 GGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGA
 ATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC
 CCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC
 TGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCG
 GAGCTAACCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAA
 TTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCACCGGAAGAACCTT
 ACCTACCTCTTGACATCCAGAG

Ek 5. PT21 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC
GAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTC
TGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGT
CGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCGTCGGATGTGCCCAGATGGGATTA
GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC
CAGCCACACTGGAAGTGAACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT
AAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCC
GCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCC
CCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTA
GAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGG
CCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGAGAGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTC
CGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATG
AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAA
CCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTC
TGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGC
CAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGG
CTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCT
CATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGC
TAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCG
TCACACACGGTACCAT

Ek 6. PT22 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC
 GAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTC
 TGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGT
 CGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC
 CAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
 GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTG
 TAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGGTTAAGGTTAATAACCTTAGCCATTGACGTTACC
 CGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCG
 TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATC
 CCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGT
 AGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCG
 GCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
 CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGTGTGGCTT
 CCGGAGCTAACGCGTTAAATAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAT
 GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGA
 ACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTGGCAGAGATGCCTTGGTGCCTTCGGGAACT
 GTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTG
 CCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGG
 GCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACC
 TCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCG
 CTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
 GTCACACACGGTACCAT

Ek 7. PT41 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC
 GAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTC
 TGGGAAACTGCCCGGTGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGT
 CGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCACCGGATGTGCCCAGATGGGATTA
 GCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC
 CAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
 GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT
 AAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGATTGTGGTTAATAACCGCAGTCATTGACGTTACCC
 GCAGAAGAAGCACCGGGTTAACTCCGTGCCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGC
 GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAAT
 CCCCAGGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGG
 GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGG
 CGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
 TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGCTGTGCCCTTGAGGCGTGGC
 TTCCGGAGCTAACCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAA
 ATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAA
 GAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGACTGCAGAGATGCGGTTGTGCCTTCGGGAA
 CCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGAC
 TGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCA
 GGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGA
 CCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAT
 CGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
 CCGTCACACACGGTACCAT

Ek 8. G1 İzolatının 16S rRNA Geninin Baz Sırası

ACGCTGATTGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGG
 GTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
 CTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAANGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCT
 CATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGC
 GACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGA
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATG
 CCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGA
 GGTTAATAACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC
 AGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAAC
 TGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCG
 AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTTCGAT
 TTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGG
 GAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC
 ATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTT
 CCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT
 CGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAG
 CGGTTAGGCCGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGAC
 GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAG
 AGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTC
 TGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAA
 TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGT
 AGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGA

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğrenimini Trabzon İskenderpaşa İlkokulu'nda, Orta ve Lise öğrenimini Trabzon Kanuni Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2004-2005 öğretim yılında K.T.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı. 2009 yılında bu bölümden mezun oldu. 2009 yılında K.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen K.T.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmakta olup, iyi derecede İngilizce bilmektedir.