

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TERMOFİLİK BİR KSİLANAZIN KRAFT KAĞIT HAMURU
AĞARTILMASINDA KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gözde GÖÇMEN

TEMMUZ 2015

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyoloji Anabilim Dalında
Gözde GÖÇMEN tarafından hazırlanan**

**TERMOFİLİK BİR KSİLANAZIN KRAFT KAĞIT HAMURU AĞARTILMASINDA
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 07 / 07 / 2015 gün ve 1610 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. İlhan DENİZ

Üye : Prof.Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Üye : Doç.Dr. Cemal SANDALLI



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma, FBA-2014-134 kodlu, “Termofilik Bir Ksilanazın Kraft Kağıt Hamuru Ağartılmasında Kullanımının Araştırılması” adlı proje kapsamında KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri biriminden sağlanan destekle, Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, çalışmam süresince ilgisini ve bilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi aşamasında deneyimlerini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. İlhan DENİZ’e, jüri üyeliğimi üstlenerek engin bilgilerini esirgemeyen Doç. Dr. Cemal SANDALLI’ya laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Hüseyin KIRCI’ya ve deneyimleriyle her zaman yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e teşekkürü borç bilirim. Ayrıca, laboratuvar çalışmam süresince benden yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Onur Tolga OKAN’a, Arş. Gör. Ayşegül ÖZER’e, Orman Endüstri Mühendisi yüksek lisans öğrencisi İsmail AYDIN ve Kevser ALTINTAŞ’a ve tüm Biyoloji Bölümüne, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı çalışanlarına ve Orman Endüstri Mühendisliği Kağıt ve Lif Teknolojisi Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bugünlere gelmemi sağlayan, attığım her adımda yanımda olan, maddi manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme, lisansüstü eğitimim boyunca zor zamanlarımda beni yalnız bırakmayan, manevi desteğini benden esirgemeyen Biyolog Eray KÜÇÜK’e ve tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ediyorum

Gözde GÖÇMEN

Trabzon, 2015

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Termofilik Bir Ksilanazın Kraft Kağıt Hamuru Ağartılmasında Kullanımının Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırıldığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 27/07/2015

Gözde GÖÇMEN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK 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. Termofilik Organizmalar	2
1.3. Termostabil Enzimler ve Önemi.....	4
1.4. <i>Geobacillus</i> Cinsi	4
1.5. Hemiselüloz	5
1.5.1. İğne Yapraklı Ağaç Hemiselülozları	6
1.5.2. Yapraklı Ağaçların Hemiselülozları.....	7
1.5.3. Ksilan.....	7
1.6. Ksilanazlar	9
1.6.1. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmalar	10
1.7. Ksilanaz Enziminin Moleküler Biyolojisi	13
1.8. Ksilanazların Endüstriyel Uygulama Alanları.....	13
1.9. Kağıt Hamurunun Ağartılmasında Ksilanaz Enzimler.....	16
1.10. Dünya’da ve Türkiye’de Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisi	18
1.10.1. Kağıdın Tanımı ve Tarihçesi	19
1.10.2. Türkiye’de Kamu ve Özel Sektör	20
1.10.3. Türkiye’de Kağıt Endüstrisinin Hammadde Durumu	21
1.10.4. Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisinin Problemleri ve Çözüm Önerileri	21
1.11. Kimyasal Kağıt Hamuru Üretim Yöntemleri	23
1.11.1. Kraft (Sülfat) Pişirme Yöntemi ve Kraft Kağıt Hamurlarının Özellikleri.....	23
1.12. Kimyasal Kağıt Hamurlarının Ağartılması.....	26

1.12.1.	Ağartmanın Tanımı ve Amacı	26
1.12.2.	Ağartma Kademeleri ve Dizinleri.....	27
1.12.3.	Oksijen Delignifikasyonu	30
1.12.4.	Çelatlama İşlemi	31
1.12.5.	Hidrojen Peroksit Ağartması	31
1.13.	Ağartmanın Çevresel Etkileri	33
1.14.	Çalışmanın Amacı	34
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	35
2.1.	Mikroorganizma ve Kültür Koşulları	35
2.2.	Araştırma Materyali	35
2.3.	<i>Geo71</i> Endoksilanaz Enzim Aktivitesinin Tespiti	35
2.4.	<i>Geo71</i> Endoksilanaz Enzim Ekstraktının Hazırlanması	36
2.5.	<i>Geo71</i> Endoksilanaz Enzimine Ait Kinetik İncelemeler	36
2.6.	Okaliptus Yongalarından Kraft Yöntemiyle Kağıt Hamuru Üretimi	37
2.7.	Kağıt Hamuru Ağartma Çalışmaları.....	38
2.7.1.	Kağıt Hamurları ile Enzimatik Ağartma	38
2.7.2.	Kağıt Hamuru ile <i>Geo71</i> Endoksilanaz Enzimi Optimizasyonu.....	38
2.7.3.	Oksijen Delignifikasyonu	39
2.7.4.	Çelatlama İşlemi	39
2.7.5.	Hidrojen Peroksit Ağartması	40
2.8.	Kağıt Hamurlarına Uygulanan Analiz Yöntemleri.....	40
2.8.1.	Kappa Numarası Tayini.....	40
2.8.2.	Delignifikasyon Derecesinin Hesaplanması	41
2.9.	Kağıtlara Uygulanan Fiziksel ve Optik Testler	41
2.9.1.	Test Kağıtlarının Hazırlanması.....	41
2.9.2.	Gramaj, Kalınlık, Yoğunluk ve Hacimlilik Tayinleri.....	42
2.9.3.	Patlama Testi	42
2.9.4.	Kopma Testi	43
2.9.5.	Yırtılma Testi.....	43
2.9.6.	Deneme Kağıtlarına Uygulanan Optik Testler	43
2.10.	SEM Analizi	44
3.	BULGULAR	45
3.1.	Okaliptus Yongalarından Kraft Pişirme Koşullarının Belirlenmesi.....	45

3.2.	Kızılcam ve Okaliptus Kağıt Hamuru ile Geo7 ₁ Endoksilanaz Enzimi Optimizasyonu.....	46
3.3.	TCF Ağartma Dizininde İşlem Koşullarının Belirlenmesi.....	48
3.4.	Kağıtlara Uygulan Fiziksel Ve Optik Testlerin Belirlenmesi	53
3.4.1.	Kızılcam ve Okaliptus Kraft Hamurları İçin Fiziksel Özelliklerin Değerlendirilmesi	55
3.4.2.	Kızılcam ve Okaliptus Kraft Hamurları İçin Optik Özelliklerin Değerlendirilmesi	55
3.5.	SEM Analizinin Değerlendirilmesi	58
4.	TARTIŞMA.....	60
5.	SONUÇLAR.....	66
6.	ÖNERİLER	68
7.	KAYNAKLAR.....	69
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans

ÖZET

TERMOFİLİK BİR KSİLANAZIN KRAFT KAĞIT HAMURU AĞARTILMASINDA
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Gözde GÖÇMEN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2015, 81 Sayfa

Bu çalışmada, Kızılcım (*Pinus brutia Ten.*) ve Okalıptus (*Eucalyptus camaldulensis*) kraft kağıt hamurları kullanılarak ilk basamağı *Geo7₁* endoksilanaz enzim delignifikasyonu olan TCF ağartma dizini yapıldı. TCF ağartma dizini basamakları “XOQP” olarak belirlendi. Enzim delignifikasyonunda Kızılcım kraft hamuru için optimum muamele şartları, %10 hamur konsantrasyonu, 30U/g *Geo7₁* endoksilanaz enzimi, pH 7,0 ve 70°C’de 2 saat olarak belirlenirken, Okalıptus kraft hamuru için %5 hamur konsantrasyonu, 30U/g *Geo7₁* endoksilanaz enzimi, pH 7,0 ve 70°C’de 2 saat olarak belirlendi. Her bir enzim muamelesi kontrol grubu için enzim ilavesiz aynı şartlar altında gerçekleştirildi. Okalıptus ve Kızılcım kraft kağıt hamurları ile yapılan *Geo7₁* endoksilanaz optimizasyonu sonucunda sırasıyla; 5,54 birim ve 4,81 birim kapa numarasında düşüş belirlendi. Ağartma dizini sonucunda Kızılcım kraft hamurunda %73,51’lük delignifikasyon oranı ile kapa numarası 49,27’dan 13,05’e, Okalıptus kraft hamurunda %66,27’lik delignifikasyon oranı ile kapa numarası 19,42’den 6,55’e düşürülmüştür.

Ağartma dizini uygulanmış Kızılcım ve Okalıptus kraft hamurlarından deneme kağıtları üretilerek fiziksel ve optik direnç özellikleri belirlendi. Kontrol ve enzim grupları karşılaştırıldığında *Geo7₁* endoksilanaz enzimi uygulanmış kraft kağıt hamurlarından elde edilen deneme kağıtlarında her iki hamur türünün de parlaklıklarında artış belirlendi. Yapılan fiziksel testler sonucunda kraft hamurların fiziksel özelliklerinde ise bir kayıp belirlenmedi.

Anahtar Kelimeler: Ksilanaz, Biyolojik Ağartma, Termofilik Bakteri, Kızılcım, Okalıptus

Master Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF A THERMOPHILIC XYLANASE FOR BLEACHING OF KRAFT
PAPER PULP

Gözde GÖÇMEN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI
2015, 81 Pages

In this study, TCF bleaching sequence which the first step is Geo71 endoxylanase delignification was performed. TCF bleaching sequence stages were determined as a “XOQP”. Pine and eucalyptus kraft pulp were used in the experiments. Optimization conditions of pine pulp was determined as a 10% consistency, 30UI/g Geo71 endoxylanase, pH 7,0, 70°C, 2 hour. Optimization conditions of eucalyptus pulp were determined as a 5% consistency, 30UI/g Geo71 endoxylanase, pH 7,0, 70°C, 2 hour. Control samples were subjected to the same treatment conditions without enzyme addition. Geo71 endoxylanase treatment as the first stage reduced the kappa number of pine and eucalyptus by 4,81 and 5,54 units. Thus the final XOQP bleached pulp showed a kappa number of 13,05 (reduction of 73,51%) for pine pulp and kappa number of 6,55 (reduction of 66,27%) for eucalyptus pulp.

Handsheet paper was produced from pine and eucalyptus kraft pulp which applied bleaching sequence. And then physical and optical properties were determined to kraft pulps. Using the *Geo71* endoxylanase treatment, the ISO brightness of pulp was increased when compared to non-enzymatic treated bleached pulp prepared using identical conditions. In result of pyhsical analysis, the physical properties of pine and eucalyptus kraft pulps were not determined a loss.

Key Words: Biobleaching, Thermophilic bacteria, Xylanase, Pine, Eucalyptus

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Ksilanın tam hidrolizinde gerekli enzimler ve etki bölgeleri.....	10
Şekil 2. Kraft hamurunun kademeli olarak ağartılması sonucunda renk değişimi.....	29
Şekil 3. Deneme kağıtlarının fiziksel testlere hazırlanmasında oluşturulan kesim şablonu	42
Şekil 4. Renk koordinatları.....	44
Şekil 5. Kızılçam kraft hamuru için ağartma kademelerinde delignifikasyon derecesi.....	52
Şekil 6. Okaliptus kraft hamuru için ağartma kademelerinde delignifikasyon derecesi.....	52
Şekil 7. Kızılçam ve okaliptus kraft hamurlarının kappa no ve parlaklıklarının değişimi...	56
Şekil 8. Kızılçam kraft kağıt hamuru liflerinin SEM görüntüsü	59
Şekil 9. Okaliptus kraft kağıt hamuru liflerinin SEM görüntüsü	59

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Mikroorganizmaların minimal, optimal ve maksimal üreme sıcaklıklarına göre sınıflandırılması.....	3
Tablo 2. İğne yapraklı ve yapraklı ağaçlarda bulunan şekerlerin ağırlık oranları (%).....	6
Tablo 3. Bacillaceae familyasına ait ksilanazların fizikokimyasal özellikleri	12
Tablo 4. Ksilanazların Potansiyel Uygulama Alanları.....	15
Tablo 5. Dünya ve Türkiye için yıllık bitki olarak hammadde kaynakları ve potansiyelleri	22
Tablo 6. Ağartmada kullanılan kimyasal maddelerin sınıflandırılması	28
Tablo 7. Kimyasal kağıt hamurlarının ağartılmasında kullanılan kimyasallar	29
Tablo 8. Kraft(sülfat) yöntemiyle kağıt hamur üretimi deney planı	37
Tablo 9. Enzimatik ağartma optimizasyon şartları.....	38
Tablo 10. Oksijen delignifikasyonu (O) için deney planı	39
Tablo 11. Çelatlama işlemi (Q) deney planı	40
Tablo 12. Hidrojen Peroksit Ağartması (P) Deney Planı	40
Tablo 13. Okalıptus kraft pişirme deney planı	45
Tablo 14. Kızılcam ve okalıptus Geo71 Endoksilanaz aşaması optimum koşullar	46
Tablo 15. Kağıt hamurları ile Geo71 Endoksilanaz enzimatik delignifikasyon optimizasyon denemeleri.....	47
Tablo 16. TCF ağartma dizini deney planı.....	49
Tablo 17. Kızılcam ve okalıptus hamurlarının kappa numaraları ve delignifikasyon dereceleri	51
Tablo 18. Kızılcam ve okalıptus kraft hamurlarının fiziksel özelliklerine ait bulgular	54
Tablo 19. Kızılcam ve okalıptus kraft hamurlarının optik özelliklerine ait bulgular.....	54

SEMBOLLER DİZİNİ

EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
DNS	: Dinitrosalisilik asit
IPTG	: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	: Luria-Bertani
O	: Oksijen delinifikasyonu
OD	: Optik yoğunluk
P	: Peroksit kademesi
Q	: Çelatlama aşaması
TAPPI	: Technical Association of the Pulp and Paper Industry
TCF	: Tamamıyla klorsuz ağartma
U	: Ünite
X	: Enzim delignifikasyonu
μ l	: Mikrolitre

1.GENEL BİLGİLER

1.1.Giriş

Günümüzde bitkisel ve hayvansal dokulardan üretilen ve genel olarak mikroorganizmalardan elde edilen, biyolojik sistemlerde kimyasal reaksiyonları katalizleme yeteneğine sahip olan enzimlerin endüstriyel boyutta üretimi ve kullanımı giderek önem kazanmıştır. Son yıllarda ticari olarak kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı mikroorganizma kaynaklı enzimlerdir. Mikroorganizmaların daha hızlı çoğalmaları, gelişme koşullarının kontrolünün kolay olması ve üretimlerinin mevsimlere bağlı olmaması gibi nedenlerle ticari enzimlerin üretiminde tercih edilen önemli kaynaklardır (İnce, 2006).

Dünya genelinde mevcut endüstriyel enzim pazarı, 1.4 milyar USD dolayındadır ve yılda %10'un üzerinde pazar ağı artışı ve %4-5 dolayında satış artışı bulunmaktadır. Son zamanlarda bu enzimlerin kullanıldığı endüstriyel alanlar oldukça çeşitlenmiş ve mikroorganizmalar kullanılarak her yıl üretilen saf enzimlerin miktarları 500 ton gibi değerlere ulaşmıştır. Ticari boyutta yaygın olarak kullanılan enzim grupları ise; proteaz, amilaz, lipaz, selülaz, pektinaz, ksilanaz gibi hidrolazlardır.

Endüstriyel enzimlerin büyük çoğunluğu mezofilik mikroorganizmalardan sağlanmaktadır fakat proseslerdeki ekstrem pH, sıcaklık ve iyon konsantresi vb. uygulamalarına dayanıksız olmaları nedeni ile kullanımları sınırlı kalmakta ve bu ekstrem koşullara dayanıklı enzimlere gerek duyulmaktadır. Bu nedenle termofilik mikroorganizmalardan elde edilen termostabil ve alkali enzimlerin, ısıl stabiliteleri ve yüksek pH kararlılıkları endüstriyel açıdan önem kazanmıştır. Termofilik ve alkali enzimler, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklık ve pH değerlerinde dahi kararlı ve aktiftirler. Bu özellikleri dolayısıyla bu tip enzimler endüstriyel alanda ilgi odağı olmuşlardır. Endüstriyel sanayide tercih edilen enzimlerden biri olan termostabil ksilanazların biyoteknolojik uygulamaları 1980'li yıllarda hayvan yemi hazırlanmasıyla başlamış olup daha sonra gıda, tekstil ve kağıt sanayi alanlarına genişletilmiştir.

Ksilanazlar, selülazlar ve pektinazlarla birlikte küresel endüstriyel enzim pazarının % 20'sini oluşturmaktadır (Polizeli E. ve ark., 2005). Bununla birlikte potansiyel pazar için aday ksilanazların çeşitli kriterleri olmalıdır.

Bu kriterler, selüloz liflerinin hidrolizin önlemek için selüloolitik aktivitenin olmaması, moleküler ağırlıklarının yeterince düşük olması, yüksek sıcaklıkta ve alkali pH'ta kararlı ve etkin olması ve düşük maliyetli ve aynı zamanda yüksek verimli olmasıdır (Samain E. ve ark., 1997).

Ülkemizde ve dünyada artan talep karşısında hızla gelişen sanayilerden biri olan kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, neden olduğu çevre problemlerinin gittikçe artan baskısı sonucu çevre dostu yöntemlerin kağıt hamuru üretimi ve ağartmada kullanılması gereği ortaya çıkmıştır (Tutuş ve ark., 2009). Bu nedenle çevreyi endüstriyel atıklardan korumak için mikrobiyal enzim sistemlerinin uygulanması önem kazanmıştır. Kağıt hamurunun ksilanaz enzimi kullanılarak ön işlemlerden geçirilmesi, ağartma kimyasallarının önemli derecede indirgenmesine ve kirliliğin azaltılmasına izin vermektedir.

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

Kağıt ve kağıt hamur endüstrisinde saflaştırmaya gerek kalmadan kullanılabilen, hiç selüloz üretimi olmadan düşük moleküler ağırlıkta, alkalın şartlarda aktif ksilanazları üst seviyelerde üreten yeni mikroorganizmaların bulunması önemlidir (Bakır, 2007). Hamurun enzimatik işleyişi hem lif kalitesinin artırılması ve fiyatını düşürmesini hemde ksilanaz enzimin bu sanayi kolunda kullanımının mümkün olması ile birlikte yerli kaynaktan bir enzimin kullanımının dışa bağımlılığımızı azaltacak olması endüstriyel alanda umut vaat etmektedir.

1.2.Termofilik Mikroorganizmalar

Son yıllarda yapılan çalışmalarda termofilik mikroorganizmalar araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. Çünkü termofilik mikroorganizmalar pek çok canlı grubunun yaşayabilmesinin imkansız olduğu sıcaklıklarda bile enzimlerini kullanabilme ve yaşamlarını sürdürebilme yeteneğine sahiptirler. Dünyamızda solfatarik alanlar, hidrotermal kuyular, sıcak su kaynakları gibi çeşitli jeotermal alanlardan aerobik termofillerin

izolasyonları yapılmaktadır. Yapılan araştırmalarda sıcaklığın mikroorganizmalar için fizyolojik aktiviteleri ve gelişimleri üzerinde en önemli faktörlerden biri olduğu ve farklı mikroorganizmalar tarafından farklı düzeyde tolere edildiği tespit edilmiştir. Pek çok ökaryotik canlı kısa bir süreliğine 50 °C'lik sıcaklığa bile dayanamazken bazı mikroorganizmaların oldukça yüksek sıcaklıklarda yaşayabildiği bildirilmiştir (Williams, 1995; Cevher, 2010).

Mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklıkları dikkate alındığında sakrofiller (20 °C altında), mezofiller (20-55 °C) ve termofiller (55 °C üzerinde) olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar. Termofilik organizmalar yüksek sıcaklıklarda yaşamaya adapte olup kendi aralarında zorunlu termofiller (45-65 °C) ve ekstremtermofiller (85 °C) şeklinde de ayrılırlar (Tablo 1) (Gomes ve Steiner, 2004; Tokgöz, 2013; Cevher, 2010).

Dünya üzerinde yaşayan canlılar arkealar, bakteriler ve ökaryotlar olmak üzere üç ana domain altında toplanmaktadır (Wosse ve ark., 1990). Termofilik bakteriler genellikle arkea sınıfına aittirler. 1970'li yılların sonunda keşfedilen arkealar, aşırı ısı, aşırı tuz gibi çok ekstrem koşullarda yaşayabilme özelliğine sahiptirler. Çoğu arkea, ekstremofildir. Arkealar tercih ettikleri habitatlarına göre beş gruba ayrılırlar. Bunlar tuzsevenler (halofiller), metanojenler, sülfür indirgeyenler, termofiller ve psikrofillerdir (Tunçel, 2014).

Tablo 1. Mikroorganizmaların minimal, optimal ve maksimal üreme sıcaklıklarına göre sınıflandırılması (Arda, 2000; Tunçel, 2014).

Mikroorganizma	Minimum °C	Optimum °C	Maksimum °C
Psikrofiller	-5-5	15-30	19-35
Mezofiller	10-15	30-45	35-47
Fakültatif Termofiller	37	45-55	70
Zorunlu Termofiller	40-45	55-75	60-80
Ekstrem Termofiller	60	75-80	85-110

1.3. Termostabil Enzimler ve Önemi

Yüksek sıcaklıklardaki biyoteknolojik işlemlerde avantaj sağlayan termostabil enzimler, protein stabilitesini anlaşılmasında yol gösterici modellerdir. Termofilik mikroorganizmaların hücre bileşenlerinin termal kararlı olmalarının yanında, aşırı derecede asidik ve alkali şartların denatürasyonuna karşı da dirençli olmaları biyoteknolojik önemlerinin günden güne artmasına neden olmaktadır (Haki ve Rakshit, 2003).

Termofillerden elde edilen termostabil enzimlerin, mikroorganizmaların gelişme sıcaklıklarından daha yüksek sıcaklıklarda bile kararlı oldukları ve termofil enzimlerinin daha sağlam oldukları belirlenmiştir (Sabato ve ark., 1999). Termofilik enzimlerin, etki mekanizmalarının mezofilik olanlarla benzer oldukları belirtilmiştir (Adams, 1993; Danson ve Hough, 1998). Termofilik enzimlerden bazılarının mezofilik konak hücrede ekspresyonu ile termal kararlılıklarının bozulmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle, termofilik enzimlerin yüksek sıcaklıklara adaptasyon için geliştirdikleri moleküler stratejilerin genetik bir özellik olduğu belirtilmiştir (Niehaus ve ark., 1999; Jaenicke ve Böhm, 1998; Cevher 2010).

Termofilik enzimlerin pH değişikliklerine ve yüksek sıcaklıklara karşı gösterdiği kararlılık, bu enzimlerin biyoteknoloji ve endüstride termofilik organizmaların kullanımı artmıştır. Termofilik enzimler, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta bile kararlı ve aktiftirler. Bu yüksek sıcaklıklar, reaksiyon sırasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskini önemli derecede azaltır (Burg, 2003; Gül-Güven, 2004).

1.4. *Geobacillus* Cinsi

Nazina ve arkadaşları tarafından 2001 yılında *Bacillus* cinsinden ayrılıp bakteri sistematiğine kazandırılmış olan *Geobacillus* yeni bir cinstir. Yapılan fizyolojik ve genetik araştırmalar ışığında farklı bir cinse ait olduğu ortaya çıkmıştır. Bu cinse ait bakteriler gram pozitif, aerobik veya fakültatif aerobik, hareketli, endosporlu, termofilik bakterileri içermektedir. Bu cinsin üyeleri, dünya üzerinde termofilik ve mezofilik coğrafik bölgelerde geniş yayılım gösterirler (McMullan ve ark., 2004; Cevher 2010).

Geobacillus cinsini *Bacillus* cinsinden ayıran en önemli özellik 16S rRNA gen sıralarıdır. 16S rRNA gen dizin analizlerini temel alan çalışmalara göre, *Geobacillus* cinsi ile *Bacillus* cinsi üyeleri arasında % 95'den daha az bir benzerlik bulunmaktadır. Fakat

Geobacillus cinsi kendi üyeleri arasındaki 16S rRNA gen benzerliği % 96,5 ve % 99,2 arasındadır. Bundan dolayı 16S rRNA gen dizi analizleri *Geobacillus* cinsine ait türlerin ayırımında geçerli değildir, sadece cins seviyesindeki sınıflandırmalarda önemli rol oynar (Banat, 2004; Cevher, 2010).

Bu cinsin üyeleri yeryüzünde petrol alanları, kuru ot karışımı, hidrotermal ağız veya topraklar gibi çeşitli termofilik ve mezofilik coğrafik alanlara yayılmıştır ve 35 °C'den 78 °C'ye kadar büyüme sıcaklığı gösteren *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus subterraneus*, *Geobacillus uzonensis*, *Geobacillus caldoxylosilyticus*, *Geobacillus toebii*, *Geobacillus vulcani*, *Geobacillus lituanicus*, *Geobacillus tepidamans*, *Geobacillus gargensis*, *Geobacillus jurassicus*, *Geobacillus caldoproteolyticus*, *Geobacillus pallidus* ve *Geobacillus debilis* türlerini içerir (Nazina, 2001).

1.5.Hemiselüloz

Bitki hücre duvarının yapısında birbiriyle birleşmiş, lignoselülozik olarak isimlendirilen, selüloz, hemiselüloz ve lignin bulunur (Deniz, 2011). Lignoselülozik maddelerin yapılarında bulunan selülozdan sonraki en önemli bileşenleri ve kuru ağırlığının %22'sini oluşturan hemiselülozlardır (Biely, 1984; Puls ve Schseil, 1993). Bunlar selüloz gibi kristalin bir yapıya sahip olmayan ve odundaki selüloz olmayan başlıca polisakkaritlerdir (Kurtulmuş, 2010). Hücre duvarı yapısında bu üç bileşen kovalent ya da kovalent olmayan bağlarla bir ilişki halindedirler. Ksilanın ya da hemiselülozun lignin ve selüloz arasına yerleşmesi selülozun bütünlüğünün devamı ve selülaz degradasyonuna karşı liflerin korunması açısından önemlidir (Beg ve ark., 2001). Hemiselülozlar kendilerini oluşturan şeker birimlerine göre; ksilanlar, mannanlar, arabinoksilanlar, glikomannanlar ve glikoksilanlar şeklinde isimlendirilirler (Mutlu, 1990). Birçok hemiselüloz, özellikle yapraklı ağaçlar ksilanca zengin bir yapı teşkil eder, β -1,4-ksilopiranosidaz gruplarından oluşan omurgaya, α -D-glukuronik asit ya da 4-O-metil- α -D-glukuronik asit ve α -L-arabinofuranoz birimleriyle bağlanır (Joseleau ve ark., 1992).

İğne yapraklı ve yapraklı odunlar sadece toplam hemiselüloz yüzdesinde değil aynı zamanda herbir hemiselülozun oranları bakımından da farklılık gösterir. İğne yapraklı

ağaçlar yapraklı ağaçlardan daha fazla mannoz ve glaktoz üniteleri içerirken, yapraklı ağaçlar daha fazla ksiloz ve asetil grupları içerirler. Odun polisakkaritleri hücrelerin yapısal maddesini meydana getirdiği gibi, hemiselülozların birçoğu da nişasta gibi rezerv maddesi olarak odunda yer alır (Deniz, 2011).

Hemiselülozlar tüm odun türlerinde odun kuru ağırlığının % 20–30 ‘unu meydana getirir. İğne yapraklı ağaçların hemiselüloz bileşimi yapraklı ağaç hemiselülozlarının bileşiminden oldukça farklıdır. Önemli farklar ağacın gövdesi, dalları, kökleri veya kabuğu söz konusu olduğunda da ortaya çıkmaktadır. Tablo 2’de iğne yapraklı ve yapraklı ağaçlarda bulunan şekerlerin oranları verimiştir (Deniz, 2011).

Tablo 2. İğne yapraklı ve yapraklı ağaçlarda bulunan şekerlerin ağırlık oranları (%)

		İĞNE YAPRAKLI AĞAÇLAR	YAPRAKLI AĞAÇLAR
1	D-Glukoz	61–65	53–73
2	D-Mannoz	7–16	0.4-4
3	D-Galaktoz	6–17	1–4
4	D-Ksiloz	9–13	20–39
5	L-Arabinoz	< 3.5	≤1.0
6	L-Rhamnoz	≤1.0	+
7	L-Fukoz	+	
8	3-0-Metil-L-rhmnoz	+	
9	4-0-Metil-D-glukuronikasit	+	+
10	D-Galakturonik asit (pektinden)	+	
11	D-Glukuronik asit		+
(+) çok az miktarda bulunan şekerleri gösteriyor.			

1.5.1. İğne Yapraklı Ağaç Hemiselülozları

İğne yapraklı ağaçların hemiselülozları başlıca galaktoglukomannan ve arabinoglukuronoksilandan oluşur. İğne yapraklı ağaçların en önemli hemiselüloz maddesi % 20-25 oranında galaktoglukomannanlardır. Bu hemiselülozun ana zincirini glukomannan zinciri meydana getirir. Bu zincirler β -D-glukopiranoz ve β -D-mannopiranoz birimlerinden oluşmaktadır. Glukoz ve mannoz birimleri birbirlerine 1→4 glikozidik bağlarla bağlanmıştır. Galaktoz miktarı bakımından galaktoglukomannanda birbirinden kabaca ayrılabilen iki fraksiyon vardır. Galaktozca fakir fraksiyonda galaktoz: glukoz: mannoz oranı 0,1:1:4, galaktozca zengin fraksiyonda ise aynı oran 1:1:3 ‘dür. Galaktozca

fakir fraksiyona glukomannan adı da verilebilmektedir. Galaktoz, α -D-galaktopiranoz birimi durumunda asıl zincirin mannoz birimlerine C₆- pozisyonunda eklenmiştir. Önemli bir yapısal özellik de süstitüe asetil gruplarıdır. Mannozların C2 ve C3 karbonlarında bulunurlar. Bunların oranı yaklaşık 3-4 mannoz birimine karşı bir birimdir.

İğne yapraklı ağaçlar galaktoglukomannanlardan başka bir miktar da arabinoglukuronoksilan içermektedir. Ana zincir birbirine 1→4-glikozidik bağlarla eklenmiş β -D-ksiloz birimlerinden meydana gelir. Ana zincire 1→2 glikozidik bağlarla eklenmiş 4-0-metilglukuronik asit grupları bulunur. Genellikle 2 birim, 10 birim ksiloza karşı gelir. Ayrıca, ana zincire α -L-arabinofuranoz birimleri de eklenmiştir. Genellikle 1,3 birim 10 ksiloz birimine karşı. Furanozit yapıları nedeniyle arabinoz yan zincirleri asitlerin etkisiyle kolayca hidroliz olabilmektedir. Diğer taraftan onlar ksilan zincirini alkelen soyulma reaksiyonuna karşı stabilize etmektedir (Deniz, 2011).

1.5.2.Yapraklı Ağaçların Hemiselülozları

Yapraklı ağaçların asıl hemiselülozu glukuronoksilandandır. İğne yapraklı ağaçlardaki ksilandan farkı yapılarında asetil grupları içerir ve arabinofuranoz birimleri ise içermezler. Ksilan miktarı odun kuru ağırlığının % 15-30 'unu meydana getirmektedir. Ana zincir β -D-ksilopiranoz birimlerinden oluşur. Bağlanmalar 1→4 glikozidik bağlar biçimindedir. Ana zincirin hidroksil gruplarından bir kısmı (özellikle C₃- pozisyonu) asetil gruplarıyla süstitüe olmuştur. 10 ksiloz birimine karşı 7 asetil grubu yer almaktadır. Ksilan ana zincirine 1→2 glikozidik bağlarla 4-0-metil- α -D-glukuronik asit grupları bağlanmıştır. Bunların oranı da 10 ksiloz birimine karşı 1 birim olmaktadır. Yapraklı ağaç ksilanları az miktarlarda ramnoz ve glakturonik asit içerirler ve bu yapı ksilan moleküllerinin alkaliye karşı dayanıklı kılar. Ksiloz birimleri indirgenip uzaklaştıktan sonra uçtaki glakturonik asit birimi hidrolize karşı zinciri korur (Deniz, 2011).

1.5.3.Ksilan

Ksilan, hemiselülozun polisakkaritlerden meydana gelen önemli bir yapıtaşdır. Bunlar bileşenlerine ayrıştırılarak yeniden kullanılabilirlik açısından doğada en yaygın bulunan ikinci kaynaktır (Kulkarni ve ark., 1999). Karasal bitkilerin hücre duvarı

çeperlerindeki, lignin ve selüloz ara yüzeyinde bir başka deyişle, bitki hücrelerinin ikincil hücre duvarında yer almaktadırlar (Wong ve ark,1988, Seyis,1997).

Doğada yeniden dönüşebilir bitki biyokütlesinin üçte birini ksilanlar oluşturur. Bitki kuru ağırlığının ksilan yüzdesi odun yapısına ve bitki kaynağına göre değişim gösterir. Sert ağaç, yapraklı ağaç ve iğne yapraklı ağaç ksilan yüzdesi sırasıyla 15-10, 7-10 ve 30 aralığında değişmektedir. Bununla birlikte tahıl tanelerinin lif içeriklerinin büyük bir kısmını da ksilan oluşturur (Cowan, 1996; Bakır, 2005).

Ksilan, selüloz ve lignin birbirlerine kovalent ya da non-kovalent bağlarla bağlanmış olup birlikte bitki hücre duvarının ana yapısını oluştururlar (Beg ve ark., 2001). Esas olarak β -1,4 bağlı D-ksilopiranoz ünitelerinden oluşmuş olan ksilanlar, çoğunlukla zincir yapıda farklı gruplar içeren, çok dallanmış polimerik heteropolisakkaritlerdir (Beg ve ark., 2001; İnce, 2006). Asetil, arabinozil, galaktozil ve glukuronozil grupları ksilanın omurgasını oluşturan temel yapıya bağlı gruplardan en yaygın olanlarıdır (Wong ve ark, 1988; Beg ve ark., 2001; İnce, 2006). Ksilan, esparto çimeni ve tütünde homoksilan olarak bulunur. Bundan başka, bazı deniz alglerinde β -1,3 bağlı ksiloz omurgasına sahip olan ksilanların bulunduğu; çimenlerde ve yıllık bitkilerdeki ksilanın ise arabinoksilan yapısında olduğu bildirilmiştir (Beg ve ark., 2001). Ksilan bunun dışındaki bütün bitkilerde heterojen yapıdadır.

Ksilan, ksiloz birimlerinin β -1,4 glikozidik bağlarla bağlanması ile oluşan bir omurgayı içeren kompleks bir polisakkarit olup ana zincir β -ksilopiranoz birimlerinden oluşur. Sert odunlu bitkilerdeki ksilan *O*-asetil-4-*O*-metilglukuronoksilandır. Bu polisakkarit 70 β -ksilopiranoz biriminden oluşur ve β -1,4 glikosidik bağlarla bağlıdır. Her 10 ksiloz biriminde bir ksiloz biriminin 2 numaralı karbonuna bir 4-*O*-metilglukuronik asit bağlanmıştır. Sert odunlu ksilanlar yüksek oranda asetilleşmiştir. Yumuşak odunlulardaki ksilan ise, arabino-4-*O*-metilglukuroksilandan oluşur. Sert odunlulardan daha yüksek oranda 4-*O*-metilglukuronik asit içeriğine sahiptir. Bunlar 2 numaralı karbon atomunda (C-2) yerleşmişlerdir. Sert odunlulardakinin aksine yumuşak odunlardaki ksilan asetillenmemiştir. Bunun yerine α -L-arabinofuranoz üniteleri ksilozun 3 numaralı karbon (C-3) atomuna α -1,3 glikozidik bağlarla bağlanmıştır (Puls ve Schuseil, 1993). Bu arabinozil eklentileri ksiloz birimlerinin hemen hemen %12'sinde görülür (Wong ve ark., 1988). α -D-ksilopiranoz, 4-*O*-metil- α -D-glukuronik asit ve L-arabinofuranoz oranı 100:20:13'dür. Ksilanların çoğu ana ve yan zincirlerinde değişen grupları içeren bir heteropolisakkarit olarak bulunur. Ksilanın ana omurgasındaki yaygın yer alan radikal gruplar asetil, arabinozil ve glukuronozil birimleridir.

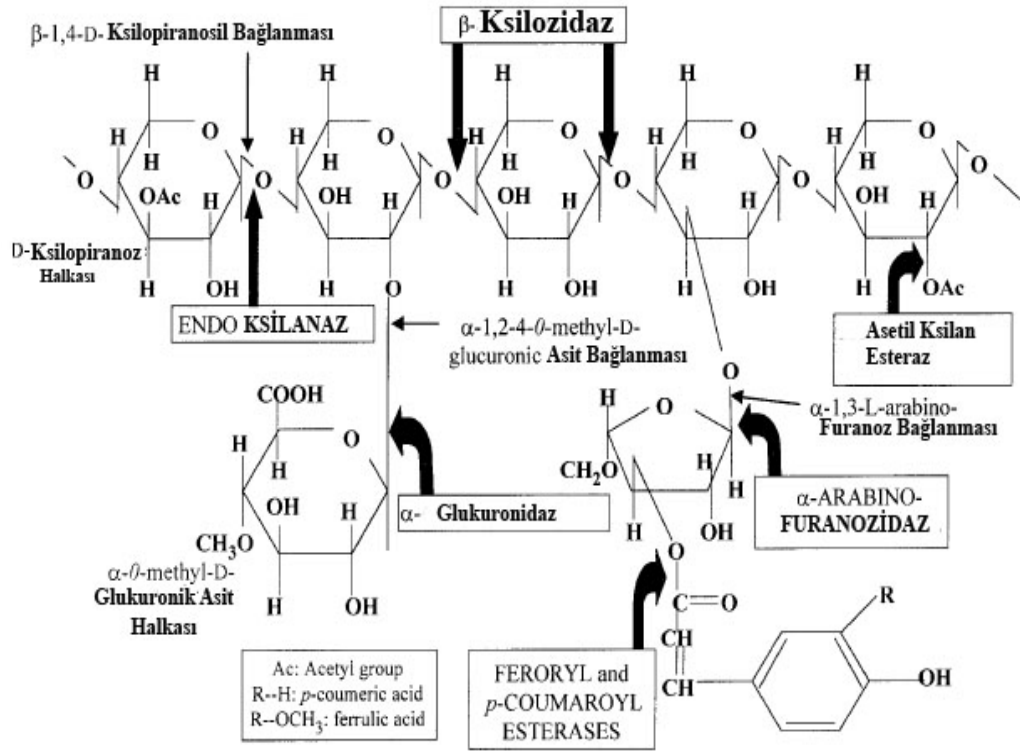
1.6.Ksilanazlar

Hemiselülozun kompleks yapılı bileşeni olan ksilanın hidrolizi için farklı enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Ksilanın hidrolizi için gerekli enzimlerin tamamına da ksilanolitik enzimler adı verilir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen bu enzimler polisakkaritleri hidrolizleyen diğer enzimlerle birlikte bitki hücre duvarının yıkımında rol alırlar. Ksilanazlar marina alglerinde, protozoalarda, kabuklu hayvanlarda, böceklerde, salyangozlarda ve toprak bitkilerinin tohumlarında da bulunabilir (Sunna ve Antranikian, 1997).

Ksilanazın spesifik aktivitesi kristalleşmiş selüloz gibi diğer polimerlerin hidrolazlarından daha geniştir. Ksilanların birbirine sıkıca bağlanmış yapıda olmamasından dolayı ksilanı hidrolize eden çok miktarda enzim vardır. (Orpin ve Letcher, 1979). Bu grupta β -1,4-Endoksilanaz, β -Ksilozidaz, α -L-araninofuranozidaz, α -Glukuronidaz, Asetil Ksilan Esteraz ve Fenolik asit (Ferulik ve *p*-Kumarik asit) esteraz yer almaktadır (Aygan, 2008). Bu enzimler ksilanın şeker bileşenlerine dönüşümünde kooperatif şekilde rol oynar (Gilbert ve Hazlewood 1993; Collins ve ark., 2005; İnce, 2006).

- -1,4-endoksilanazlar (β -1,4-D-ksilanazlar; β -1,4-D-ksilan ksilanohidrolazlar; E.C. 3.2.1.8),
- β -D-ksilozidazlar (β -1,4-D-ksilozid ksilohidrolazlar; E.C.3.2.1.37),
- α -L-arabinofuranosidazlar (E.C. 3.2.1.55),
- α -D-glukuronidazlar (E.C. 3.2.1.139),
- Asetil-ksilan esterazlar (E.C.3.1.1.72)
- Ekzo- β -1,4-ksilanazlar (α - 1,4-D-ksilan ksilohidrolazlar).

Ksilan hidrolizini gerçekleştiren enzimler arasında sinerjik etki meydana gelir. Hidroliz sırasında 1,4- β -D-Ksilan omurgasında etkin olan (β -1,4- Endoksilanaz) ve yan zincirleri koparan enzimlerin aktif olduğu gözlemlenir. Asetil ksilan esteraz ve endoksilanaz arasındaki sinerjik etki asetil ksilanların degradasyonunda etkindir.



Şekil 1. Ksilanın tam hidrolizinde gerekli enzimler ve etki bölgeleri (Beg ve ark,2001).

Bu enzimlerden en önemlisi β-1,4-endoksilanazlar'dır. Endoksilanazlar, ksilan omurgasındaki iç glikozid bağlarını hidroliz eder ve ksilan ana iskeletindeki β-1,4 bağını kırarak ksilooligosakkaritleri üretir. Bu oligosakkaritler de daha sonraki hidroliz sürecinde β-1,4-ksilosidaz enzimi ile D-ksiloza dönüştürülür (Cevher, 2010). Ekzoksilanazlar ise endoksilanazların etkisi sonucunda oluşan ksilooligosakkaritleri hidrolize ederler ve bu yolla ksilanın hidroliz oranı yükseltilmiş olur (Wong ve ark., 1988). Asetil ksilan esteraz, α-L-arabinofuranozidaz, α-D-glukuronidaz ve galaktozidazlar ise ksilanın yan gruplarını ana zincirden kopartarak serbest kalmalarını sağlar (Aygan, 2008; Altun, 2012).

1.6.1.Ksilanaz Üreten Mikroorganizmalar

Ksilanazlar, ksilanca zengin ortamlarda gelişen mikroorganizmalarda bulunan indüktif enzimlerdir. Bakteriler, funguslar, protozoalar, algler, karındanbacaklılar ve antropodları da içine alan bir grup organizma tarafından üretildikleri bildirilmiştir (Beg ve ark.,2001). Ksilanaz üreten birçok ksilanolitik mantar (*Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp.) ve bakterileri

türleri (*Bacillus* spp.) tanımlanmıştır. Bakteriyel kaynaklı ksilanolitik enzimlerin kapsamlı biyokimyasal analizi yapılmış, bunlardan çok sayıda enzim saflaştırılarak karakterize edilmiştir (Cevher, 2010).

Yapılan çalışmalarda bitkisel kökenli endoksilanazların da bulunduğu saptanmıştır. Bunlar bazı meyvelerin aşırı olgunlaşma dönemi sonunda, çekirdeklerin çimlenmesi sırasında üretildikleri görülmüştür. Su yumuşakçaları dahil, bazı gelişmiş hayvanlarda da ksilan üretiminin gerçekleştiği bilinmektedir (Cevher, 2010).

Yapılan çalışmalara göre endüstriyel fermentasyonlarda kullanım yaygınlığı göz önüne alındığında en çok çalışılan bakteriyel ksilanaz üreticisi *Bacillaceae*'dir (Pham vd., 1998). *Bacillus* fermentasyonlarından yüksek miktarda ksilanaz üretimini sağlamak bu mikroorganizmanın endüstriyel uygulamalarda kullanımını açısından önemlidir. Samain ve arkadaşları (1997) yarı-kesikli *Bacillus* fermentasyonu sonucunda 1000 U/ml ksilanaz aktivitesi elde etmiştir. Bu da Eriksson ve arkadaşlarının *T. reesei*'den bulduğu 130 U/ml olan ksilanaz aktivitesinden oldukça fazladır. Elde edilen yüksek ksilanaz verimi, *Bacillus* türünün endüstriyel uygulamalarda seçilmesinde önemli rol oynamaktadır (Pham ve ark., 1998).

Bacillus ksilanazlarının pH stabilitesinin bazik ortamlarda yüksek olduğu görülmüştür (Beg ve ark., 2001). Bu nedenle *Bacillus* türlerinin avantajlarından birisi de, ksilanaz enzimlerinin optimal pH'larının bazik olması dolayısı ile kağıt sanayisinde kağıt hamurunun beyazlatılmasında kullanılmasıdır (Bakır, 2005).

Günümüzde genetik mühendisliği, moleküler biyoloji ve rekombinant DNA teknolojileri ile üretilip endüstride kullanılan çok sayıda ticari ksilanazlar da bulunmaktadır. Ksilanazların ticari üretiminde kullanılan suşlar *Trichoderma reesei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus subtilis* ve *Streptomyces lividans*' dir (Beg ve ark., 2001; Saltık, 2014).

Tablo 3. *Bacillaceae* familyasına ait ksilanazların fizikokimyasal özellikleri (Cevher, 2010; Tunçel, 2014)

Mikroorganizma	Mw (kDa) (SDS-PAGE)	Opt. Sıcaklık	Opt. pH
<i>Bacillus halodurans</i> C-125 (Akita ve ark., 2005)	31 kDa	60 °C	6.0- 8.0
<i>Geobacillus</i> sp. 7 ₁ (Cevher, 2010)	45 kDa	70 °C	7.5
<i>Anoxybacillus</i> sp. E ₂ (Wang ve ark., 2009)	38.8 kDa	65 °C	7.8
<i>Geobacillus</i> sp. MT-1 (Wu ve ark., 2006)	62 kDa	70 °C	7.0
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> (Sharma ve ark., 2006)	–	70 °C	7.0
<i>Bacillus</i> sp. C-14 (Aygan, 2008)	61 kDa	50 °C	11.0
<i>Bacillus circulans</i> BL53 (Xandro Heck ve ark., 2006)	22-45 kDa	40-80 °C	5.0- 8.0
<i>Bacillus</i> sp. (Kim ve ark., 2005)	80 kDa	50 °C	10.0
<i>Bacillus subtilis</i> B10 (Huang ve ark., 2005)	–	50 °C	6.0
<i>Bacillus sphaericus</i> JS1 (Singh ve ark., 2004)	42 kDa	60 °C	8.0
<i>Bacillus</i> sp. BP-7 (Gallardo ve ark., 2003)	24 kDa	60 °C	6.0
<i>Bacillus</i> sp. KSM- N252 (Endo ve ark., 2001)	50 kDa	55 °C	10
<i>Bacillus</i> spp. CH43	40 kDa	65 °C	5.0- 6.5

1.7.Ksilanaz Enziminin Moleküler Biyolojisi

Pham ve ark. (1998), en çok çalışılan bakteriyel ksilanaz üreticisinin *Bacillaceae* familyasına ait olduğunu bildirdikten sonra *Bacillus* suşlarına ait birçok ksilanaz geni izolasyonu ve ekspresyonuna ait birçok araştırma yapılmıştır. Ksilanazın kullanım alanları dikkate alındığında, özellikle kağıt endüstrisinde, ksilanaz aktivitesi yüksek, selüloz üretimi olmayan üreticilerin bulunmasını gerektirmektedir (Wong ve ark., 1988). Bunun için en iyi strateji, izole edilen ksilanaz geninin selülaz üretmeyen bir başka taşıyıcı içine yerleştirilmesi ve ekspres edilmesidir. Bernier (1983), *Bacillus*'e ait ksilanaz geninin bu amaçla izole edilip *E. coli*'ye aktarılıp ekspres edilmesine ait ilk çalışmayı rapor etmiştir. Daha sonra ksilan hidroliz enzimlerinin klonlama ve ekspres etme çalışmaları devam etmiştir (La Grange ve ark., 1996; Cevher, 2010).

1.8.Ksilanazların Endüstriyel Uygulama Alanları

Teknolojinin gelişmesi ile birlikte endüstriyel alanda farklı uygulamalara ihtiyaç duyulması endüstriyel uygulamalarda biyoteknolojinin kullanımına ışık tutmuştur. Mikroorganizmalardan elde edilen ürünler birçok alanda kullanılmaya başlamıştır. Biyolojik katalizör olan enzimlerin hücre içerisinde üretilmelerine rağmen birçoğunun hücre dışına salınarak aktivitelerine devam etmesi endüstriyel uygulamalarda kullanımlarının yolunu açmıştır.

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığı zaman, alkalın proteaz % 25, diğer proteazlar % 21, amilaz % 18, Renin % 10, Trypsin % 3, Lipaz % 3, diğer karbonhidrat parçalayıcı enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi) % 10, analitik ve farmasötik enzimlerin % 10'unu oluşturduğu görülmüştür (Rao ve ark., 1998).

Ksilanın doğada yaygın olarak bulunması, ksilanazların biyoremediasyon işleminde kullanımını ve atıkların yakıt, tek hücre proteini, ksiloz ve ksitol gibi yararlı ürünlere dönüştürülmesini gerektirir. Ksilanazların birçok faydalı ürünün istenilen düzeyde üretimi için önemli bir potansiyele ve ekonomik öneme sahip olduğu gösterilmiştir (Beg ve ark., 2001).

Bakteriyel ksilanazların optimum pH'ı, fungal enzimlere göre daha yüksek olduğundan, bakteriyel ksilanazların bu endüstriyel işlemlerde kullanılması daha çok tercih

edilmektedir (Subramaniyan ve Prema, 2000). Bununla birlikte termofilik karakterde olan ksilanazlar gün geçtikçe ilgi odağı olmaya başlamıştır.

Ksilan hidrolizinde etkili enzimlerin, hemiselülozik biyokütlenin yakıt ve kimyasal türlere dönüştürülmesi, kağıt hamurunda ligninin uzaklaştırılması, meyve sularının berraklaştırılması, hayvan yemi sindiriminin ve besin değerinin arttırılması, meyve suyu ve şarap aromasının arttırılması, pentoz içeren disakkaritlerin sentezlenmesi gibi işlemlerde kullanılması, bu enzimleri endüstriyel olarak değerli kılmaktadır (Wong ve ark., 1988; Gunata ve ark., 1990; Spagna ve ark., 1998; Rahman ve ark., 2001; Remond ve ark., 2004; Makkonen ve ark., 2005).

Ksilanazın bu kullanımlarına ek olarak; deterjan endüstrisinde deterjanların temizleme etkilerini arttırmada, lignoselülozdan hidrolizle basit şekerlerin elde edilmesinde ve bu şekerlerden fermentatif mikroorganizmalar aracılığıyla sıvı yakıt, tek hücre proteini ve sitrik asit, fumarik asit, glikolaldehit, izopropil alkol gibi çeşitli kimyasalların üretiminde ve çeşitli amaçlarla tekstil endüstrisinde kullanıldığı belirtilmiştir (İnce, 2006). Aynı zamanda antimikrobiyal ajan veya antioksidant gibi farmakolojisel aktif polisakkaritlerin üretilmesi amacıyla da kullanılmaktadır (Tablo 4) (Cevher, 2010).

Tablo 4. Ksilanazların Potansiyel Uygulama Alanları (Collins ve ark., 2005)

ENDÜSTRİSİ	UYGULAMA ALANI	FONKSİYONU
Meyva ve sebze işleme süreçleri, demleme, şarap imalatı	Meyve ve sebze suyu, nektar ve pürele eldesi ile bitkisel yağ, şarap imalatı	Meyve suları viskozitesini azaltıcı etkisi yanında yumuşatma özelliği ile kaliteyi artırır
Fırıncılık	Hamur ve pastacılık ürünleri	Hamur elastikiyetini ve dayanıklılığını artırır
Hayvan besleme	Monogastrik (domuz ve kümes hayvanları) ve geviş getirenlerin yemleri	Nişasta ihtiva etmeyen polisakkaritlerin içeriğini azaltır, intestinal vizkoziteyi azaltarak hayvanın protein ve nişastadan maksimum ölçüde faydalanmasını sağlar
Kağıt ve kağıt hamuru üretimi	Kağıt hamurunun ağartılması	Kağıt imalatı esnasında klorin ve toksik disakkaritlerin kullanımlarının azaltılması
	Biyoleke yok edilmesi	Alkali kullanımının azaltılması ve biyoleke çıkarılması süreçlerinin kolaylaştırılması
Nişasta	Nişasta gluten ayırımı	Pasta hamuru viskozitesinin azaltılması ve gluten topaklanmasının artırılması
Tekstil	Keten, kendir, jüt ve rami işlenmesi	Enzimatik yüzey düzleştirimi
Biyodönüşüm	Tarımsal, evsel ve endüstriyel atıkların çevreye zararsızlaştırılması	Çöp arıtımı, fermente edilebilen ürünlerin üretimi, yenilenebilir bioetanol ve zararsız kimyasalların üretimi

1.9.Kağıt Hamurunun Ağartılmasında Ksilanaz Enzimler

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

Amerika kıtasının kuzey ülkeleri ile Avrupa'nın batısında yer alan bazı ülkelerde, ksilanazlar, ağaç kabuklarının çıkartılmasında, geri dönüştürülmüş liflerin boyalarından arındırılmasından ve kağıt hamurunun çözülmesinin hazırlığı için selülozun saflaştırılmasında kullanılmaktadır (Chen ve ark., 1996).

Kağıt doğal polimerler olan selüloz, hemiselüloz ve lignin bileşenlerinden oluşur. Lignin, kağıt üretimi aşamasında istenmeyen bir madde olarak kimyasal hamur üretmede ve ağartma işlemlerinde hamurdan uzaklaştırılmaya çalışılır (Karademir ve ark., 2002). Hemiselüloz da ürün rengini esmerleştirir ve çözünmez parçacıklar oluşturur bu nedenle hamur üretme ve ağartma işlemleri sırasında uzaklaştırılmaya çalışılır (Gamerith ve Strutzenberg, 1992). Uzaklaştırma işlemi tam anlamıyla yapılamadığı için sonraki üretim safhalarında hemiselüloz, özellikle ksilan, bazı problemlere sebep olur. Bu nedenle son yıllarda alternatif bir metot olarak sadece hemiselülozu uzaklaştıran enzimler üzerinde çalışılmaya başlanmıştır (Altun, 2012).

Biyolojik yöntemlerle kağıt hamurunun beyazlatılmasında, lignini azaltan enzimlere göre ksilanazın çok daha etkili olduğu rapor edilmiştir. Bunun sebebi ise, lignin çoğunlukla hemiselüloza çapraz bağlanması ve hemiselülozun ligninden daha kolay ve hızlı şekilde depolimerize olmasıdır. Hemiselülozun küçük miktardaki parçasının uzaklaştırılması bile depolimerleşmesine yeterlidir ve mutedil oksidantlar aracılığıyla artan ligninin uzaklaştırılması kolaylaşır (Subramaniyan ve ark., 2002).

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde enzimatik uygulamalar 1980'den sonra başlamıştır. Kağıt hamuru ve kağıt üretimini geliştirmek için sellobiyohidrolaz, endoglukanaz, endoksilanaz, endomannanaz, galaktanaz, poligalakturonaz vb. gibi pek çok farklı enzimin kullanılabileceği, ksilanazların kağıt hamurunun ağartılmasında uygulanabildiği açıklanmıştır (Aehle, 2004).

Kağıt hamurundan ligninin giderilmesi ile yapılan ağartma işlemi genel olarak klor ve hipoklorit (klor dioksit) gibi kimyasallar ile yapılmaktadır. Bu tür kimyasalların kullanımı sonucu oluşan klorlanmış organik bileşiklerin toksik, mutajenik ve karsinojenik gibi çok

sayıda tehlikeleri olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda kağıt endüstrisinde ağartma amacıyla klor yerine ksilanazların kullanımının, kağıt hamurlarından ligninin ayrılmasını kolaylaştırdığı ve bu yolla çok daha az klor kullanımının sağlandığı saptanmıştır (Beg ve ark., 2001). Ksilanazların kağıt hamurunun hazırlamasında beyazlaştırma ajanı olarak klor kullanımının azaltılması ve kağıt hamurundan lignini ayırma özelliği en ümit verici uygulamalarından biri olmuştur (Viikari ve ark., 1986; Beg ve ark., 2001).

Enzim uygulaması kağıt hamurunun fibrilasyonunu ve suyun tutuşunu artırır, işlenmemiş kağıt hamurunda dövme miktarını düşürür, hurda kağıt hamurunda bağları onarır, çözünen hamurdan ksilanın selektif giderimini sağlar. Ksilanazlardan ayrıca odun hamurunda biobeyazlatma, sentetik ipek üretiminde ise hamurdan selüloz eldesinde faydalanılır (Viikari ve ark., 1986; Beg ve ark., 2001). Biyoteknolojik metodun prensibi, selülozu uzaklaştırmaksızın seçilen hemiselülozun taşınmasını sağlamaktır. Çünkü selülozun azaltılması, kağıt kalitesine etki eden asıl problemdir. Hücre duvarlarından ksilanazın uzaklaştırılması, beyazlatma sürecinde enerji talebinin azaltılmasına yol açar. Bu nedenle, ksilanazı kullanan hamurun enzimatik işleyişi hem lif kalitesinin artırılmasını hemde fiyatını düşürmesini sağlayacağından daha iyi bir umuttur. Fakat, enzimatik ağartmanın başarısı kullanılan enzimin özelliklerine bağlıdır. Ksilanazları ekstra pH düzenleme basamağından kaçınmak için yüksek pH'da aktif olmalıdır, ksilanazın kağıt hamuruna yayılması için selülozun salınabilmesi gerekir. Bu yüzden, kağıt ve hamur endüstrisinde saflaştırmaya gerek kalmadan kullanılabilen, hiç selülaz üretimi olmadan düşük moleküler ağırlıkta, alkalın şartlarda aktif ksilanazları üst seviyelerde üreten yeni mikroorganizmaların bulunması önemlidir (Bakır, 2007).

Ksilanazlar günümüzde endüstriyel olarak uygulanan hem ECF (Elemental Chlorine Free) hem de TCF (Totally Chlorine Free) denilen ağartma yöntemlerinde kullanılmaktadır. TCF uygulaması ile kağıt parlaklığının arttığı, lif uzunluğunun korunduğu ve ağartma masraflarında azalma olduğu belirtilmiştir (Aehle, 2004). Son zamanlarda, enzimlerle birlikte O₂ (oksijen), O₃ (ozon) veya H₂O₂ (hidrojen peroksit)'in de kullanıldığı TCF ağartma yöntemleri geliştirildiği bildirilmiştir.

1.10.Dünya’da ve Türkiye’de Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisi

Food and Agriculture Organization of the United Nations’nun (FAO) 2008-2009 verilerine göre; Dünyada kağıt ve karton tüketimi azalma trendine girmiştir. Dünya ölçeğinde 2008 yılı itibariyle kağıt ve karton tüketiminde düşüş gözlemlenmektedir. Bunun başlıca sebebi 2008 yılının ortalarında yaşanan ekonomik krizden dolayı ani bir şekilde tüketici taleplerinin azalmasıyla beraber global ölçekte yaşanan bu ekonomik krizden hemen önce ortaya çıkan enerji krizidir. Bunun yanı sıra bu krizlerden bazı kağıt türleri oldukça fazla etkilenirken bazı kağıt türleri ise oldukça az etkilenmiştir. Bunlardan ambalaj kağıdı ve karton ekonomik krizden en fazla etkilenen grupta yer alırken, hijyenik kağıt ürünleri en az etkilenen grupta yer almıştır (FAO, 2009).

Gelişme potansiyeli yüksek Türkiye Kağıt-Karton sektörünün sıhhatli, sağlam ve kalıcı gelişimi ile rekabet edebilir güçlü yapısını oluşturmak için; ormanların işletme politikaları, AB uyumlu katı atıklar yönetmeliklerinin uygulama etkinliği, enerji fiyatlarında indirim teşvikleri uygulanması, gümrüklerin bilinçli kontrol altına alınması ve haksız rekabet konularının hali, sektörün önemli öncelikleri olarak belirlenmiştir (ANONİM-1, 2009).

Kağıt üretimi büyük miktarda doğal kaynak tüketimine neden olmaktadır (Rousu ve ark., 2002). Bu nedenle zengin orman kaynağına sahip olan İskandinav ülkeleri gibi kuzey ülkeleri, Dünya kağıt ürünleri pazarında egemen durumdadır. Elektronik kayıt sistemlerinin hızla yaygınlaşmış olmasına rağmen kağıdın öneminde bir azalma olmamıştır. Kağıt endüstrisi en eski endüstrilerden biri olup halen dünyanın en büyük 5 endüstrisi olan demir-çelik, tekstil, kağıt, organik kimyasallar ve petrokimya endüstrileri içinde üçüncü sırayı almaktadır.

2009 yılı verilerine göre; dünya kağıt ve karton üretimi 370,7 milyon ton civarındadır. FAO-Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü istatistiklerine göre; dünyada kağıt ve kartonun %41,7’si Asya’da, %27,4’si Avrupa’da, %22,8’i Kuzey Amerika’da üretilmektedir. Dünya kağıt-karton üretiminden ülkelerin aldığı paya bakıldığında ise; 2009 yılında dünyanın en büyük kağıt-karton üreticisinin Çin Halk Cumhuriyeti olduğu görülmektedir. Dünya kağıt ve selüloz üretiminde lider konumda olan ÇHC dünya üretiminin yaklaşık %24’ünü yapmaktadır. İkinci sırada 71,6 milyon ton ile ABD’nin yer aldığı görülmektedir. Onu sırasıyla 26,3 milyon ton ile Japonya, 20,9 milyon tonla Almanya, 12,8 milyon tonla Kanada, 10,9 milyon tonla İsveç, 10,6 milyon tonla Finlandiya ve 10,5

milyon tonla Güney Kore takip etmektedir. Türkiye ise 2,5 milyon tonluk kağıt-karton üretimi ile dünyanın 25. büyük kağıt-karton üreticisidir.

Dünya’da milyonlarca insan, çevre bilinciyle, kağıt ürünlerinin dönüşümü için çaba göstermektedir. Kağıt dönüşüm oranı 2009 yılında A.B.D.’de %63,4, Avrupa’da ise %72,2 olarak gerçekleşmiştir. Kağıt ve karton talebindeki artış Avrupa’dan K.Amerika ve başta Çin olmak üzere Asya’ya doğru yönlenmektedir. Asya global tüketimin %40’ını oluşturmaktadır. FAO-Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü’nün tahminine göre 2005-2020 yıllarını kapsayan süreçte dünya kağıt ve karton tüketimi yıllık %3 oranında artacaktır. Türkiye ise 5,4 milyon ton ile dünya sıralamasında 16. kağıt-karton tüketicisi olarak yerini almıştır. Türkiye’de kişi başına 68,6 kg kağıt-karton tüketimi yapılmaktadır.

2010 yılında dünya kağıt-karton ihracatından en büyük payı 24,2 milyar \$’la Almanya almıştır. Dünya ihracatının %14,5’ini gerçekleştiren Almanya’yı, 15,7 milyar \$’la ABD takip etmektedir. Dünya ihracatından %9,4 oranında pay alan ABD’yi, 10,8 milyar \$’la İsveç, 9,8 milyar \$’la Finlandiya, 9,7 milyar \$’la ise Kanada takip etmiştir. Türkiye 1,2 milyar \$’lık kağıt-karton ihracatı ile 216 ülke arasından dünyanın en fazla ihracat yapan 26.ülkesi olarak yerini almıştır (URL-1).

1.10.1. Kağıdın Tanımı ve Tarihçesi

Kağıt, kültürel ve sanayi alanındaki yeri ile insanlığın en önemli ihtiyaç maddelerinden biri olup, kağıt sanayinin gelişmesi bir ülkenin sanayi ve kültürel gelişmişlik düzeylerinin belirleyici etmenlerinden biri olarak kabul edilmektedir.

Kağıt sektörü; odun, yıllık bitkiler ve atık kağıt hammaddelerinden selüloz, odun hamuru, eski kağıt hamuru üretilmesi ve bu ara ürünlerin değişik mekanik, kimyasal işlemlerle kağıda dönüştürülmesine kadar geçen aşamaları içeren sanayi koludur. Sermaye ve enerji yoğun, orta-ağır bir sanayi dalı olan kağıt sanayinde üretimi gerçekleştirilen ürün grupları basım ve ambalaj sektörleri için girdi oluşturmaktadır.

Kağıda benzeyen ilk yazı safıhası M.Ö 4000’li yıllarda Mısırlılar tarafından “cypruspapyrus” denilen ve kamışa benzeyen bir bitkiden yapılmıştır. İnsanların yıllar boyunca yazma ve çizme için denedikleri taç tabletler, metal yapraklar, tahta levhalar, kabuklar ve derilerden sonra ekonomik olarak daha bol ve kolay işlenebilir bir madde ihtiyacı ile ortaya çıkan kağıt, günümüz koşullarında en önemli endüstri maddelerinden biri haline gelmiştir.

Bitkisel liflerden elde edilen ilk kağıt M.S. 105 yılında Tsai Lun adında Çin İmparatorluğu Tarım Bakanı tarafından bulunmuş olup, Ortadoğu ve Arabistan üzerinden 1100'li yıllarda Türkiye ve Avrupa'ya yayılmıştır. Avrupa'da ilk kağıt fabrikası 1150 yılında kurulmuştur. İspanyada, Türkiye'de ise elle imalat yapılan ilk kağıt fabrikası 1453 yılında İstanbul'da Kağıthane'de kurulmuş olup, Çinlilerin üretim tekniği tümüyle uygulanmıştır (URL-2).

1.10.2. Türkiye'de Kamu ve Özel Sektör

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

Türkiye'de kağıt ve karton üretiminde faaliyet gösteren; kamu ve özel sektör işletmelerinde 1996 yılında yapılan bir araştırmada kağıt ve karton sanayi işletmelerinin % 53'ünde hammadde sorunu yaşanmaktadır. Hammadde probleminde öncelikler şöyle sıralanabilir (Duran, 1997).

- 1- Uygun kalitede hammadde bulunamaması, % 31
- 2- Uygun fiyatta hammadde bulunamaması, % 28
- 3- Yeterli miktarda hammadde bulunamaması, % 21
- 4- Zamanında hammadde bulunamama, %17
- 5- Diğer nedenler, % 3

Duran'a göre yukarıda sayılan bu sebeplerin yanında pazarlama sorunu, işgücü maliyetleri, finansman faaliyetleri ve enerji maliyetleri de diğer problemler arasında görülmektedir (Duran, 1997).

1.10.3. Türkiye’de Kağıt Endüstrisinin Hammadde Durumu

Ülkemizde bulunan kağıt fabrikalarının üretim kapasiteleri AB ülkelerine göre oldukça düşük, uluslar arası ticarete rekabet gücü zayıf olup, kağıt üretiminde kullandığı hammaddeyi yurtdışından tedarik etmektedir. Bu durumda dışa bağımlılığı artırmaktadır. Teknoloji ortaya koyma durumu hemen hemen hiç yoktur. Diğer taraftan kullandığı enerjiyi AB ülkelerine göre % 40-80 oranında daha yüksek maliyetle kullanmaktadır. Bu sorunların aşılması için üretim kapasitesinin en az 100.000 tona çıkarılmalı, bilimsel kurumlarla daha fazla işbirliğine gitmeli, mevcut teknolojiler yerine yeni teknolojiler geliştirilmeli, üretim etkinliğini artırılarak maliyet düşürülmeli, toplam kalite olgusuna üretimin her aşamasında yer vererek kağıt üretimde verimlilik artırılmalıdır. Bunlar içerisinde en önemlisi kağıt üretiminde kullanılan hammaddeyi ülke içerisinde sağlayacak bir yapı oluşturulmalıdır (Okan, 2010).

1.10.4. Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisinin Problemleri ve Çözüm Önerileri

Ülkemizdeki orman kaynakları kağıt hamuru üretimine dayalı endüstrilerin ihtiyacını karşılayabilecek yeterlilikte olmadığı için alternatif hammadde kaynağı olarak atık kağıtlar ve yıllık bitkiler, özellikle de ekin sapları giderek önem kazanmıştır. Ülkemiz için hammadde sorununun çözümünde başta ekin sapları olmak üzere yıllık bitkiler önemli bir şans olarak önümüzde durmaktadır. Çünkü önemli bir tarım ülkesi olan Türkiye’de senede yaklaşık 45 milyon ton ekin sapı üretilmektedir ve bunun 20 milyon tonunu buğday sapı oluşturmaktadır. Türkiye dünyanın sayılı buğday üreticisi ülkeleri arasında bulunmaktadır (Tablo 5).

Tablo 5. Dünya ve Türkiye için yıllık bitki olarak hammadde kaynakları ve potansiyelleri (Atchinson, 1993, Atchinson, 1997; Bostancı 1987).

DÜNYA		TÜRKİYE	
Lif Kaynakları	Yıllık Bitki Sapı (ton)	Lif Kaynakları	Yıllık Bitki Sapı (ton)
Tahıl Sapları (buğday, çavdar, yulaf vs)	1.145.000.000	Buğday Sapı	20.600.000
Diğer sapslar (mısır, tütün, pirinç, pamuk, vs.)	970.000.000	Arpa sapsı	7.300.000
Şeker kamışı	75.000.000	Pamuk sapsı	3.000.000
Göl kamışı	30.000.000	Mısır sapsı	4.250.000
Bambu	30.000.000	Ayçiçeği sapsı	2.500.000
Pamuk lifi	15.000.000	Kendir-kenevir	2.000.000
Jüt, kenaf, kendir	10.900.000	Tütün sapsı	411.000
Papirus	5.000.000	Çavdar sapsı	240.000
Pamuk linteri	1.000.000	Pirinç sapsı	200.000
Esparto otu	500.000	Göl kamışı	200.000
Sisal ve abaca yaprakları	480.000	Pamuk linteri	100.000
Sabai otu	200.000	Pamuk şifti	580.000
Odun	1.750.000.000	Asma budama atığı	600.000
Toplam	4.033.080.000	Toplam	Toplam 41.981.000

Kağıt endüstrisi için hammadde sorunundan sonra çevre kirlenmesinin en az düzeye indirilmesi, gerek pişirme gerek de ağartma yöntemleri için çevreyi en az kirleten tekniklerin geliştirilmesi ve enerji tüketiminin azaltılması dikkate alınması gereken diğer önemli sorunlardır. Çevresel problemlerin giderek artan baskısı sonucu kükürtsüz pişirme yöntemlerinin kullanılması gereği ortaya çıkmıştır. Dünyada halen en yaygın olarak kullanılan kraft pişirme yöntemi ile pişirme, buharlaştırma ve geri kazanma sırasında ortaya çıkan kötü kokulu metil merkaptan, dimetil sülfür, dimetil disülfür ve hidrojen sülfür gibi kükürtlü bileşikler soluduğumuz havayı kirletmektedir. Bu nedenle günümüzde yürütülen çalışmalar mevcut teknolojilerin olumsuz özelliklerinin ortadan kaldırılması, verimi yüksek, çevre kirliliği oluşturmayan, üretimde seçici kimyasalların kullanılması üzerine yoğunlaşmıştır (Eroğlu, 1980a; Tutuş, 2000).

Ağartma işleminin hamurdaki kalıntı lignini uzaklaştırmaktan başka hamurun safsızlıklardan temizlenmesi, parlaklık değerinin artırılması, renk kararlılığının sağlanması gibi bir dizi hedefi bulunmaktadır (McDonough, 1992). Kağıt hamurunun geleneksel yöntemlerle ağartılması sırasında zehirlilik etkisi gösteren klorlanmış fenolik maddelerin

oluşumu kaçınılmazdır. Bu bileşiklere bağlı kalarak oluşan çevresel sorunları azaltmak adına yeni ve geliştirilmiş yöntemlere önem verilmelidir. Üretilen kağıt hamurlarının oksijen esaslı ağartıcılar kullanarak ağartılmasının yanında alternatif yöntem olarak ligninoselülozik yapılı enzimlerin kullanılması ile klorlu ağartıcıların oluşturduğu çevresel problemleri ortadan kaldırmakta, ağartıcıların fonksiyonel özellikleri göz önünde bulundurularak geliştirilen uygun ağartma dizinleri ile en az onlar kadar etkili ağartma işlemi gerçekleştirebilmektedir. Bu amaçla ağartmayı olumsuz yönde etkileyebilecek çeşitli karakteristikler üzerinde durularak farklı yöntemlerle üretilmiş kağıt hamurlarının ağartılabilirlikleri çevreye duyarlı hale getirilebilmektedir.

1.11.Kimyasal Kağıt Hamuru Üretim Yöntemleri

Kimyasal hamur, odundaki lifleri bir arada tutan ve çoğunlukla ligninden oluşan orta lameli kimyasal yolla çözerek (delignifikasyon=lignin giderme) liflerin bireysel hale getirilmesidir. Bu işlem sırasında hücre çeperi içindeki lignin ve hemiselülozların büyük bir kısmında çözüldüğünden bireysel hale geçen liflerin esneklikleri artar. Lifleri serbest hale getirmek için mekanik enerji kullanılmadığından, lifler üzerinde hasar bulunmaz. Dolayısıyla, mekanik ve yarıkimyasal hamurlara göre, kimyasal hamurdan yapılan kağıtlar daha sağlam lifler arası bağ yapar ve kağıdın direnç özellikleri yüksek olur (Kırcı, 2006).

1.11.1. Kraft (Sülfat) Pişirme Yöntemi ve Kraft Kağıt Hamurlarının Özellikleri

Kimyasal hamur üretimi çeşitli kimyasallar kullanılarak lifleri bireysel hale getirmek için ligninin uzaklaştırılması (delignifikasyon) olayıdır. Bu işlemde önemli olan selüloz ve hemiselülozları uzaklaştırmadan lignini uzaklaştırmaktır. Kimyasal kağıt hamuru üretim yöntemlerinden biri olan kraft (sülfat) yöntemi, diğer yöntemlere göre hamurların direnç özellikleri bakımından daha verimlidir. Bu nedenden dolayı, kraft yöntemi en yaygın olarak kullanılan kağıt hamuru üretim yöntemidir (Vaaler ve Moe, 2001).

Kraft pişirme yönteminin temeli, Alman kimyacı Carl DAHL tarafından 1879 yılında keşfedilmiş olup pişirme kimyasal olarak sodyum hidroksit ve sodyum sülfür kullanılmaktadır (Casey, 1960). Yöntem hidroksit iyonları veya bisülfür iyonları tarafından hidrosülfür iyonlarının oluşmasıyla odundaki ligninin suda çözünür hale getirilmesiyle

gerçekleşir (Gellerstedt, 2007). Sülfat alkali geri kazanma işlemi sırasında indirgenerek sülfüre dönüşür. Sülfat terimi aktif pişirme maddesinden ziyade eksilen kükürdü telafi etmek için kullanıldığından yöntemine ismi verilmiştir. Kraft yöntemi, koyu renkli hamurlardan yumuşak ve kolay beyazlatılabilir hamurlara kadar birçok cins kağıt hamuru üretiminde kullanılır. Kraft yöntemi, koyu renkli ve son derece dayanıklı bir hamur üretimi anlamında kullanılır. Kraft kelimesi Almanca'dan alınmıştır ve "kuvvetli, sağlam, dayanıklı" anlamına gelmektedir (Casey, 1960).

Kraft yönteminde delignifikasyon başlıca OH⁻ ve HS⁻ iyonlarından oluşan güçlü bir alkali çözelti ile sağlanır. Bu esnada, hemiselülozların önemli bir kısmı (yaklaşık %75'i), bir miktar selüloz (yaklaşık %10'u) ve ekstraktifler (yaklaşık %90'ı) lignin ile birlikte uzaklaşır. Kraft yönteminde bütün polisakkaritler yapılarındaki glikozidik bağların alkali hidrolizi ve soyulma (peeling) reaksiyonuna maruz kalmaları sonucu degrade olabilirler (Kleppe, 1970; Kocurek ve ark., 1989; Vaaler ve Moe, 2001).

Kraft yönteminde, pişirme çözeltisi NaOH (soyum hidroksit) ve Na₂S (sodyum sülfid) kimyasal maddeleri kullanılarak hazırlanır ve bu çözeltiliye beyaz çözelti adı verilmektedir. Beyaz çözelti kuvvetli alkali solüsyon olarak nitelendirilir (pH≈14). Laboratuvar koşullarında pişirme çözeltisinin hazırlanması, iki kimyasalın uygun miktarlarda alınıp suda çözündürülmesiyle gerçekleştirilmektedir. Kraft pişirme çözeltisinde başlıca aktif elemanların OH⁻ ve HS⁻ iyonları olması ortamdaki sülfidite yüzdesini tayin eden Na₂S'in pişirme sırasında selülozun degradasyonunu önlediği ve pişirmeyi süratlendirdiği bildirilmiştir (Kırcı,2006; Deniz, 2011).

Yıllık bitki saplarının kraft yöntemi ile pişirilmesinde tam kuru sapa oranla %10-12 NaOH ve %2 Na₂S kullanılması yeterlidir. Bu yöntemle 150-170 °C sıcaklık ve 2,5-4 saat süre ile %35-40 hamur verimi elde edilebilmektedir (Jeyasingam, 1987b). Kraft yöntemi ile üretilen hamurların diğer yöntemlerle üretilen hamurlara göre daha yüksek verim ve sağlamlık özelliklerine sahip hamurlar elde edilmesine rağmen kraft hamurlarının ağartılması diğerlerine göre daha zordur (Kalyoncu, 2011).

Kraft yöntemi kullanımında 1930'lu yıllardan beri çok hızlı bir şekilde gelişme meydana gelmiştir. Bu gelişmeye sebepler ise şunlardır (Casey, 1960):

- Odun cinsleri yönünden en büyük esneklik (her cins odun, hatta atık odun bile kullanılabilir),
- Pişirme süresinin kısalığı,
- Kağıt hamurunun daha yüksek beyazlık derecelerine kadar ağartılabilmesi,

- Reçinelerden ileri gelen sorunların olmaması,
- Selülozun sağlamlık özelliklerinin yüksek olması,
- Tall-oil ve terpentin şeklinde kıymetli ürünler elde edilebilir olması,
- Kullanılan çözeltilerin geri kazanılması oldukça olmalıdır.

Sülfat yönteminin başlıca sakıncaları ise (Casey, 1960):

- Tesislerin kuruluşları için gerekli yatırımların yüksekliği,
- Artık gazların ortaya çıkardığı koku sorunları,
- Esmer hamurun renklerinin kötülüğü, ağartma giderlerinin yüksekliği,
- Çözünür hamurların üretiminde alkali ekstraksiyonunun güçlük göstermesi,
- Selülozların yavaş dövülebilmeleridir.

Kağıt hamuru üretiminde verim artışı, karbohidrat kaybı, uzaklaştırılan lignin miktarının azaltılması gibi yöntemlerle sağlanabilmektedir (Kırcı, 2000). Başka basit bir yöntemde, pişirme süresini düşürerek yüksek kappa numarası elde etmektir. Kappa numarasındaki her on birimlik artış yaklaşık olarak verimde %1,5'lük bir artışa sebep olmaktadır. Verim artışının avantajları olduğu gibi direnç değerlerindeki azalma gibi deavantajları da vardır. Kappa numarası artarken direnç değerleri düşer ve dövme zamanı artar. Hamura sonradan bazı ilave maddelerle direnç degerleri yeniden kazandırılabilir olmasına rağmen bu da güç kaybını artırmasına sebep olmaktadır.

Kraft yöntemi diğer yöntemlere göre oldukça üstündür, bu üstünlüğün sebebi dayanım özelliklerinden ileri gelmektedir. Bununla birlikte kraft yönteminde odun yongasının life dönüşme süresi oldukça kısadır. Hamurun rengi koyu olmasına rağmen, farklı hammaddelerden kuvvetli hamurlar elde edilebilmesi bu yöntemi çekici kılmaktadır (Okan, 2010).

Kraft (sülfat) yöntemi ile elde edilen kağıt hamurlarının özelliklerini aşağıdaki gibi açıklamak mümkündür.

1. Aynı kappa numarasında bile sülfite hamurlarından daha koyu renklidir
2. Sülfat hamurunun lifleri daha esnek olup, daha zor hidratlanır ve şişerler, dolayısıyla dövülmeleri bisülfite hamurundan çok daha zordur.
3. Bisülfite hamuru selüloz zincirinde zayıf noktalar belirli yerlere toplandığı halde sülfat hamurunda tesadüfi olarak dağılmıştır. Bu nedenle sülfat hamuruna ait lifler daha sağlamdır.

4. Pişirmeden sonra sülfat hamuru lignini lif içerisinde düzenli dağıldığı halde, bisülfite hamuru liflerinde daha çok liflerin dış kısmında toplanmıştır. Bu nedenle sülfat hamurları daha zor ağartılır.

5. Sülfat hamurlarından elde edilen kağıtlar bisülfite hamuruna oranla özellikle yırtılma direnci yönünden çok daha üstündür.

6. Sülfat hamurlarının hemiselüloz oranı daha düşüktür. Bisülfite hamurunun hemiselülozları daha çok degradasyona uğramıştır. Bisülfite hamuru daha çok glukomannan daha az pentozan içerir. Sülfat hamurunda üronik asitler bulunmaz (Casey, 1980; Eroğlu,1981).

1.12.Kimyasal Kağıt Hamurlarının Ağartılması

1.12.1. Ağartmanın Tanımı ve Amacı

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

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

Piştirme işleminde sonra üretilen kağıt hamurları oldukça koyu renkli olur. Bundan dolayı ağartma işlemine uğratılmadan pek çok kağıt ve karton türünün yapımına uygun değildir. Kaliteli kağıt üretimi sağlam ve yüksek parlaklık özelliğine sahip lifler ile yapılmaktadır. Kağıt hamurunun parlaklığını arttırmak ve kalıntı lignini uzaklaştırmak için ağartma işleminin uygulanması zorunludur. Aynı zamanda kağıt hamurunda kirlilik oluşturan safsızlıkların arındırılması, oluşan ürünün yaşlanması ve sararmasını önlemek amacıyla renk kararlılığının artırılması ve çevresel yönden problem olabilecek durumların ortadan kaldırılması ağartma işleminin diğer hedeflerini oluşturmaktadır (EPA, 1993, Kalyoncu 2011).

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

1.12.2. Ağartma Kademeleri ve Dizinleri

Ağartma yapacağımız hamura hangi ağartma metodunu kullanacağımızın seçimine, ağartılmamış hamurun karakteri (Tablo 6) ve ağartıldıktan sonra kağıt hamurunda istenilen kalite belirler. Ağartma işleminde mümkün olduğunca az materyalin kaldırılarak hamur veriminin yüksek tutulması ve yüksek parlaklık arzu edilen bir durumdur (Okan, 2010). Kimyasal kağıt hamurlarının ağartılmasında tek bir ağartıcı ile elde edilen delignifikasyon oranı ve parlaklık artışı yeterli olmadığından etkili ağartma işlemi gerçekleştirilmez. Bundan dolayı ağartma işlemi birbirini takip eden ve farklı özellik gösteren kademeler ve yıkama işlemlerinde oluşan dizin şekline uygulanır. Bu şekilde çok kademeli olarak kullanılmasının ağartma üzerine etkisi büyük olmakla birlikte kalıntı ligninin, liflerden seçici şekilde uzaklaştırılması kolaydır (Reeve, 1996).

Tablo 6. Ağartmada kullanılan kimyasal maddelerin sınıflandırılması

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

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

Kimyasal hamurun ağartılmasında kullanılan oksidantlar, ligninin parçalanarak moleküler büyüklüğünün azaltılmasını sağlarlar. Birçok ağartma kimyasalları, kalıntı ligninde asidik gruplar oluşturan oksitlenme ajanlarıdır. Asidik koşullar altında yapılan bir ağartma kademesinden sonra yapılan alkali ekstraksiyon kademesi ile ortamda oluşan, suda çözünmeyen asidik lignin ürünlerinin uzaklaştırılması sağlanır (Nelson, 1998). Alkaliler, özellikle sodyum hidroksit, asidik özellik kazanan lignini hidrolize etmede ve çözümede görev alır. Günümüzde ağartılacak hamurun türüne ve istenen parlaklık derecesine bağlı olarak hamurdaki lignini oksitlemek, çözmek ve hamur rengini açmak gibi işlemler için 4-6 adet ağartma kademesinden oluşan dizinler kullanılmaktadır (Şekil 2). Her bir oksidatif ağartma kademesi sonrasında uygulanan yıkama işlemleri ile hamurdan çözülmüş partiküller uzaklaştırılarak, ağartmanın etkisi geliştirilir (Nelson, 1998).



Şekil 2. Kraft hamurunun kademeli olarak ağartılması sonucunda renk değişimi

Kimyasal kağıt hamurlarının içinde kraft pişirme yöntemi ile pişirilen kağıt hamurları en koyu renkli ve ağartılması en zor olan hamur türüdür. Bu nedenle kraft hamurların ağartılmasında daha çok ağartma dizini basamaklarına ve daha fazla kimyasala ihtiyaç duyulur (Tablo 7). Kraft hamurunun tam anlamıyla ağartılabilmesi için, ağartma dizini her kademe arasında yıkama yapılacak şekilde, sırayla alkali ve asidik kademeler olarak düzenlenmelidir (Dahl, 1999).

Tablo 7. Kimyasal kağıt hamurlarının ağartılmasında kullanılan kimyasallar

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

1.12.3. Oksijen Delignifikasyonu (O)

Oksijen delignifikasyonu ilk olarak Joy ve Campbell tarafından kağıt hamurlarının ağartılmasındaki iyileştirmeler üzerine bir patent alımıyla yapılmaya başlanmıştır. Kağıt hamurunun alkali bir ortamda oksijen kullanılarak kalıntı lignin fraksiyonunu uzaklaştıma işlemine oksijen delignifikasyonu adı verilir. Belirli bir basınç altında yapılan bu işlem hamurdaki kalıntı ligninin yaklaşık olarak %35-50'sini uzaklaştırmaktadır (McDonough, 1996).

Oksijen delignifikasyonu genel olarak Kraft hamurları için kullanılmakta olmakla birlikte, uygun sıcaklık ve basınç altında, yüksek veya orta konsantrasyonda, tek veya kademeli olarak tüm hamurlara uygulanabilmektedir (Gullichsen ve Fogelholm, 1999). Oksijen delignifikasyonunun uygulama kolaylığı, işleö sonrası hamur kalitesi, toplam maliyet ve çevresel açıdan avantaj sağlamaktadır (Suchy ve Argyropoulos, 2002). Bu yöntemin en önemli özelliği çevreye karşı oldukça zararsız olmasıdır. Atık sudaki COD, BOD, renk ve klorlu organik bileşikler bu yöntem ile önemli azaltılabilmektedir. Ağartma işleminde kullanılan kimyasal madde yükünü azaltması, kraft kimyasal madde döngüsüne uygun olması diğere önemli özelliklerindedir (Okan, 2010).

Oksijen delignifikasyonu işleminde hamur buharla karıştırıldıktan sonra besleme tankına gönderilir. Reaksiyon ortamını alkali yapmak için NaOH ya da asitlendirilmiş beyaz çözelti kullanılır. Gerekli miktardaki alkali, besleme tankının üstünde bulunan bir tahliye pompası ile hamura karıştırıldıktan sonra, ek buharla birlikte oksijen gazı da orta konsantrasyonda çalışan makaslama etkisine sahip karıştırıcıya gönderilir. Bu karıştırıcı oksijeni hamura karıştırır. Daha sonra karışım yukarı akımlı bir reaktöre gönderilir. Yıkayıcı olarak dönen tambur tipi yıkayıcı ya da basınç altında çalışan yıkayıcılar kullanılabilir. Yıkama kademesi oksijen delignifikasyonu ile çözünen maddelerin hamur içerisinden tamamen ayrılmasını sağlar. Aynı zamanda elde edilen süzüntü çözelti alkali ve hamurdan çözünen bileşenler dışında zararlı bileşikler içermez. Bundan dolayı doğrudan çözelti geri kazanma sistemine gönderilebilir. Böylece atık çözelti içindeki alkali geri kazanılabilir olmakta birlikte çevre kirlenmesine de yol açmamaktadır (McDonough, 1996).

Oksijenin işletmeler bakımından düşük maliyetli bir oksidasyon maddesi olması, atık suların korozyon yapıcı bileşik içermemesi birçok fabrika tarafından kolaylıkla benimsenmesine yol açmıştır. Oksijen delignifikasyonunun çevresel parametreler üzerinde ve bazı işletme maliyeti üzerinde olumlu etkisi olması avantajları arasındadır. Bununla

birlikte ana deavantajı da kapital maliyetlerinin yüksek olması ve fabrika geri kazanma sistemine ilave yük getirmesidir (Kiviah, 1995; Nelson, 1998; Okan,2010; Kalyoncu, 2011).

1.12.4. Çelat Yıkaması (Q)

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

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

1.12.5. Hidrojen Peroksit Ağartması (P)

Geleneksel ağartma dizinlerinde etkili bir ağartıcı olmayan hidrojen peroksit, TCF ağartma yönteminde kullanılan etkili ağartıcılardandır (Van Lierop ve ark., 1993; Troughton ve ark., 1994; Bajpai, 2005). Kağıt hamuru endüstrisinde yaygın ve çok yönlü olarak

kullanılan oksidatif bir ağartıcı olan hidrojen peroksit, alkalen koşullar altında mekanik ve kimyasal hamurların ağartılmasında ve mürekkep uzaklaştırma işlemlerinde kullanılan en iyi kimyasaldır (Anderson, 1992; Anderson ve Amini, 1996; Troughton ve Sarot, 1992; Nelson ve ark., 1995; Nelson, 1998; Lachenal ve Muguet, 1992, Lachenal ve ark., 1992b; Lachenal, 1996; Pikka ve ark., 2000; Beeman ve Reichert, 1953; Holladay and Solari, 1963; Andrews ve Singh, 1979).

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

Hidrojen peroksit kimyasal hamurların ağartılmasında çoğunlukla diğer ağartıcıların etkinliğini ve ağartılmış hamurların son parlaklık değerlerini arttırmak üzere kullanılır (Anderson, 1992; Anderson ve Amini, 1996). Araştırmacılar yüksek parlaklık değerine ulaşmak için yapılan hidrojen peroksit ağartmasında iki reaksiyonun oluştuğunu bildirmişlerdir. Bunlardan biri perhidroksil anyonu (HOO^-) ile lignin yapısında konjuge karbonil yapılarını içeren kromoforların uzaklaştırılması, diğeri ise ligninin peroksidin ayrışması sonucu oluşan HO^\bullet ve $\text{O}_2^{\bullet -}$ radikalleri ile degradasyonu ile çözünmesi ve uzaklaşmasıdır (Anderson ve Amini, 1996; Backman ve Gellerstedt, 1993). Radikaller ligninin aromatik halkası ile oksidatif bozunma reaksiyonu şeklinde reaksiyona girer ve ligninin moleküler hidrofilik özelliğini ve çözünürlüğünü artırır (Bajpai, 2005; Kalyoncu, 2011). Bununla birlikte hidrojen peroksit ağartmasında asıl ağartıcı fonksiyona sahip olan radikallerin oluşabilmesi için alkalen şartlar mutlaka gereklidir. Delignifikasyon işleminde radikallerin olumlu etkilerinde çok olumsuz etkileri de bulunmaktadır bu nedenle yüksek miktarda bulunan geçiş metalleriin peroksit ağartmasından önce ya asit yıkaması işlemiyle ya da çelatlama işlemiyle uzaklaştırılması gerekmektedir (Sixta, 2006).

Peroksit ağartmasında mekanik ve kimyasal hamurlar arasında farklılık meydana gelir. Mekanik hamurlarda hamura renk veren kromoforik yapılar uzaklaştırılırken, lignin ve hamur verimi değişmeden kalır. Bundan farklı olarak kimyasal hamurların peroksit ile ağartılması işleminde lignin kapsamlı şekilde modifikasyona uğrar ve çeşitli yeni yapılar meydana gelir. Bu işlemde peroksidin bozunma ürünü olarak perhidroksil (HOO^-) iyonları, hidroksil (HO^\bullet) radikalleri ve süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet -}$) radikal iyonları meydana gelir (Dence ve

Reeve, 1996; Hobbs ve Abbot,1992). Bu yapılar önemli ara ürünler olmakla birlikte ağartma işlemi esnasında yan reaksiyonlar vermektedir. Perhidroksil anyonunun (HOO^-) oldukça kuvvetli bir nükleofil olmasından dolayı, ligninin elektronca zengin aromatik halkasına atakta bulunamaz ve lignindeki karbonil içerikli kromoforlarlar reaksiyona girer (Gierer, 1982). Hidroksil (HO^\bullet) ve ondan daha az oranda oluşan süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$) radikallerinin ağartma reaksiyonlarında katılımları daha düşük oranlardadır (Hobbs ve Abbot, 1991; Gellerstedt ve Pettersson, 1982; Dence ve Reeve, 1996; Gellerstedt ve Lindors, 1991; Lachenal ve ark., 1994). Hidroksil radikalleri hidrojen peroksitin geçiş metallerinin katalizörlenerek bozunması sonucu oluşmaktadır (Dence ve Reeve, 1996; Gierer ve ark., 1991). Hidroksil radikalleri, lignindeki fenolik yapılarla reaksiyona girmektedir bununla birlikte karbohidratları da bozundurma özelliklerine sahiptirler. Süperoksit radikalleri ise selülozun bozunmasına neden olurlar (Dence ve Reeve, 1996). Bu nedenle bu radikallerin oluşturduğu reaksiyonlar delignifikasyon için olumlu etki yaparken, selüloz için olumsuz depolimerizasyona sebep olmaktadır (Kalyoncu, 2011).

Peroksit kademesinden önce uygulanan çelatlama kademesi sayesinde hamurların direnç özelliklerinde önemli kayıplar olmaksızın daha yüksek parlaklık değerlerine ulaşmak mümkün olduğu için peroksit kademesinde daha zorlu işlem koşulları seçilebilmektedir (Abrantes ve ark. 2007). Oksijen bazlı kimyasal olan hidrojen peroksit, TCF ağartmasında en çok kullanılan kullanılan ağartıcıdır (Mariani ve ark., 1999; de la Rosa ve ark., 2002; Khristova ve ark., 2003; Roncero ve ark., 2003; Shatalov ve Pereira, 2005).

1.13.Ağartmanın Çevresel Etkileri

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

Yapılan çalışmalar toksiditeye sadece klor içeren bileşiklerin değil, odun ekstraktiflerinin neden olduğu belirlenmiştir (Kalyoncu, 2004). Ligninin bozunmasıyla

oluşan fenoller, kateşoller, guyasiller ve aromatik hidrokarbonlar ile, ekstraktif madde kaynaklı düşük miktarda reçine ve yağ asitlerinin klorlanması ile toksiklik etki daha da artmaktadır. Ağartma sırasında toksik özellikteki maddelerin oluşumunu azaltmanın bir yolu, ağartma işleminde ilk kademe olarak hamurdaki lignin miktarını azaltmaktır (Reeve, 1996). Bu nedenle, pişirmede delignifikasyonu uzatmak, oksijen delignifikasyonu, ön enzim uygulaması, klor basamağının modifiye edilmesi, oksijen ve/veya hidrojen peroksitle güçlendirilmiş kostik ekstraksiyonu gibi yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (Barroca ve ark., 2001).

1.14.Çalışmanın Amacı

Termofilik organizmalardan elde edilen termostabil enzimlerin, ısıl stabiliteleri endüstriyel açıdan önemlidir. Bu tip enzimlerden biri olan termostabil ksilanaz, kağıt sanayinde ağartma işlemlerinde, yem ve gıda sektöründe kullanılmaktadır. Gerçekleştirilen çalışmada, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda daha önceden, termofilik bir bakteri olan *Geobacillus* sp. 7₁ suşundan izole edilerek klonlanmış ve karakterizasyonu yapılmış olan ksilanaz enzimi kullanılmıştır. Kızılcım ve ökaliptusdan elde edilen kraft kağıt hamurları ksilanaz enzimi ile muamele edilerek, kağıt ağartılmasında, klor dioksidin lignini okside etmesi ile başlayan reaksiyonlar zincirinin sonunda oluşan toksik ve kanserojen özellikteki klorlanmış organobileşiklerin, insan sağlığını ve çevreyi ciddi anlamda tehdit etme riskini azaltması ve bu alanda ksilanaz enziminin kullanılarak biyolojik ağartma işlemlerinin yaygınlaşp bu tehditlerin ortadan kaldırılmasına katkı sağlamak amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Mikroorganizma ve Kültür Koşulları

Termofilik ksilanaz kaynağı olarak Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda Dikili-Bergama Kaynarca Kaplıcası'ndan (İzmir) izole edilen ve tanımlanan *Geobacillus* sp. 7₁ suşu kullanıldı (Canakci ve ark., 2007). Ksilanaz kaynağı olarak daha önce enzim çalışmaları Canakci ve ark., (2012) tarafından tamamlanan *Geo7₁* Endoksilanaz kullanıldı.

2.2. Araştırma Materyali

Çalışmada ülkemizde ibreli ağaçtan kraft yöntemiyle kağıt hamuru üretimi yapan Oyka-Zonguldak-Çaycuma fabrikasından satın alınan kızılçam kağıt hamuru örnekleri ve K.T.Ü kampüsünden temin edilen okaliptus odunları kullanıldı. Okaliptustan kraft yöntemiyle kağıt hamuru üretimi KTÜ, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği laboratuvarında yapıldı. Deneyle ilgili iğne yapraklı kızılçam ve geniş yapraklı okaliptus türleri üzerinden yürütüldü.

2.3. *Geo7₁* Endoksilanaz Enzim Aktivitesinin Tespiti

Geobacillus sp. 7₁ suşu 60 °C'de LB besiyerinde bir gece büyütüldükten sonra %1'lik ksilan içeren LB besiyerine inokülasyon yapılarak indükleme gerçekleştirildi. Büyüme 48 saat boyunca devam etti. Daha sonra, kültür santrifüjlenerek hücre dışı proteinleri elde edildi. Elde edilen kaba enzim ekstratı, ksilanaz aktivitesini belirlemek üzere kullanıldı. Çalışmada enzim aktivitesini tayin eden yöntem; ksilanazın substrat (ksilan) ile girdiği tepkime sonucu açığa çıkan indirgeyici şekerleri ölçen bir methodur. 500 µL'lik reaksiyon hacminde, %5'lik ksilan substratından (Oat Spelt Xylan) 200 µL, 200 mM'lık pH 6,5 fosfat tamponundan 125 µl, 175 µL enzim (süpernatant) konularak 20 dakika 70 °C'de bekletildi. Bir ksilanaz aktivitesi birimi (U), dakikada 1 µmol ksiloz ve eşdeğeri olan şekerleri 70 °C'lik reaksiyon sıcaklığında üreten enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. İndirgen şeker tayini ise,

Dinitrosalisilik asit metodu (Miller, 1957) ile gerçekleştirildi. İnkübasyondan sonra örnekler, 0,5 mL Dinitrosalisilik asit (DNS) reaktifi ile karıştırılarak, 5 dakika kaynatıldı. Örnekler, spektrofotometrede 540 nm’de okunarak, örnekteki indirgen şeker miktarı, ksiloz standartı kullanılarak belirlendi.

2.4. *Geo7₁* Endoksilanaz Enzim Ekstraktının Hazırlanması

Çalışmada daha önce grubumuz tarafından başka bir çalışmada pET20b vektörüne klonlanmış ve *Escherichia coli* BL21(DE3):pLysS hücrelerine transforme edilmiş olan *Geobacillus* sp. 7₁ suşuna ait ksilanaz enzimi (*Geo7₁* Endoksilanaz) 100 ml LB sıvı besi ortamında, sallamalı inkübatörde 37 °C de 18 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, hücre kültürü 1:10 oranında seyreltilip taze 1000 ml LB sıvı besi ortamına ilave edilerek ve sallamalı inkübatörde 37 °C de optik yoğunluk yaklaşık 0.6-0.8 oluncaya devam edildi. Absorbans değeri yaklaşık 0.6-0.8 civarında sıcaklık 37 °C den 26 °C ye düşürülerek büyümekte olan hücre kültürüne 1 mM IPTG ilave edilerek hücreler yaklaşık 20 saat daha 37 °C de sallamalı inkübatörde bekletildi. Daha sonra işlem durdurulup hücreler 10000rpm de 10 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant -20 °C’de bir sonraki işlemlerde kullanılmak üzere saklandı. Enzimin over ekspresyon sonuçları SDS-PAGE ile değerlendirildi.

2.5. *Geo7₁* Endoksilanaz Enzimine Ait Kinetik İncelemeler

Enzimin başlangıç tepkime hızı 75 °C’de 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 0,25-4 mg/mL oat spelt xylan substrat konsantrasyonu aralığında ölçülmüştür. Enzimin Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu belirlenmiş olup substrat olarak oat spelt xylan kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk eğrisinin oluşturduğu doğrunun x-eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ ’ye eşitlenerek K_m değeri 0,425 mg/mL, y-eksenini kestiği nokta ise $1/V_{maks}$ ’a eşitlenerek V_{maks} değeri 500 U/mg olarak Canakci ve ark (2012) tarafından belirlenmiştir.

2.6.Okaliptus Yongalarından Kraft Yöntemiyle Kağıt Hamuru Üretimi

K.T.Ü kampüsten toplanan okaliptus odunları 3 cm uzunluğunda, 1.5-2 mm kalınlığında, 2 cm genişliğinde kağıt hamuru pişirme işleminde kullanılmak üzere yongalandı. Uygulanacak ağartma işleminden önce, uygulamada kullanılacak hamur için en uygun kraft pişirme yöntemi belirlendi. Uygulama şartları tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Kraft(sülfat) yöntemiyle kağıt hamur üretimi deney planı

Hamur Tipi	Aktif Alkali (%)	Süre (dk)	Sülfidite (%)	Sıcaklık (°C)	Çöz/Sap Oranı
Okaliptus	20	120	25	170	4/1

Pişirme işlemi 15 litre kapasiteli, elektrikle ısıtılan, 25 bar basınca dayanıklı, dakikada 4 devir yapabilen ve otomatik kontrol tablosu ile sıcaklığı termostatlı olarak kontrol edilebilen laboratuvar tipi kesikli döner silindirik kazanda yapıldı. Kazana hammaddenin doldurması ve boşaltması el ile yapılmış olup her pişirmede tam kuru 1000gr. tam kuru okaliptus yongası kullanıldı. Pişirme sıcaklığı seyri kumanda tablosundan ayarlandıktan sonra kazan üzerindeki termometre ile de kontrol edilerek +2 °C hassasiyetle çalışıldı. Pişirme sonunda kazandan pişen materyal alınıp, 150 mesh’lik elek üzerinde bol su ile siyah çözelti uzaklaşmaya kadar yıkandı. Yıkama ile kimyasal maddeler uzaklaştırıldıktan sonra laboratuvar tipi hamur disintegratöründe belli bir konsantrasyonda 10 dakika süreyle açılıp, yarık açıklığı 0.15 mm olan sarsıntılı vakum eleğinde elenerek pişmeyen kısımlar ayrıldı. Elenen kısmın rutubet dağılımı homojen olacak şekilde % 20-25 kuru madde oranına kadar suyu sıkılarak uzaklaştırıp, karıştırdıktan sonra polietilen torbalara alınarak rutubetin dengelenmesi için 24 saat ağzı kapalı şekilde bekletildi. Daha sonra hamurun rutubeti TAPPI T 210 cm-86 standart metoduna göre belirlenerek elenmiş verim tayini yapıldı. Elek üzerinde kalan pişmemiş kısımlar alınıp kurutulduktan sonra tam kuru yonga ağırlığına oranlanarak elek artığı oranı tayin edildi.

2.7.Kağıt Hamuru Ağartma Çalışmaları

Yapılan bu çalışmada kağıt hamurlarının ağartılmasında, “XOQP” kademelerinden oluşan TCF ağartma dizini uygulandı. Bunlar: Enzim Delignifikasyonu (X), Oksijen Delignifikasyonu (O), Çelat Yıkaması (Q), Hidrojen Peroksit Ağartması (P).

2.7.1. Kağıt Hamurları ile Enzimatik Ağartma

2.7.2. Kağıt Hamuru ile Geo7₁ Endoksilanaz Enzimi Optimizasyonu

Çalışmada kullanılan kızılçam ve okaliptus kağıt hamurları üzerinde ksilanolitik aktivitenin araştırılması için optimizasyon yapıldı. Optimizasyon, hamur konsantrasyonu, enzim miktarı ve inkübasyon zamanı olmak üzere 3 parametrenin farklı değerlerde değiştirilmesi ile gerçekleştirildi (Tablo 9).

Tablo 9. Enzimatik ağartma optimizasyon şartları

Enzim miktarı (U/g)	5U/g	10U/g	20U/g	30U/g	40U/g	50U/g
Hamur konsantrasyonu	%3	%5	%7	%10		
İnkübasyon zamanı (saat)	2	3	4	6		

Kağıt hamuru örneklerinin enzim ile muamelesi, değiştirilen optimazasyon parametreleri dışında, Geo7₁ Endoksilanaz enziminin optimum koşulları olan pH:7 (50 mM sodium-fosfat tamponunda), 70°C’ de polietilen poşet içerisinde karıştırılarak sulu sallayıcıda inkübasyona bırakılarak gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak, her bir deney şartı için, sadece Geo7₁ Endoksilanaz enzimi içermeyen hamur örnekleri aynı şartlar altında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hamur distile su ile yıkandı. Daha sonra hamurun rutubeti TAPPI T 264 om-88 standart metoduna göre belirlendi. Optimum şartların belirlenebilmesi için TAPPI T 236 om-99 standardına göre kappa tayini yapıldı.

2.7.3. Oksijen Delignifikasyonu (O)

Enzim delignifikasyonu yapılmış her bir hamur türü için oksijen delignifikasyonu Tablo 10'da verilen şartlara göre gerçekleştirildi. Deney için kontrol gruplarıyla birlikte 50-200gr tam kuru hamur kullanıldı.

Tablo 10. Oksijen delignifikasyonu (O) için deney planı

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Hamur Konsantrasyonu (%)	Oksijen Basıncı (bar)	NaOH (%)	MgSO ₄ (%)
100	60	12	7	4	1

2.7.4. Çelatlama İşlemi (Q)

TCF ağartmasında kullanılan oksidatif ağartıcılardan en yaygın olarak kullanılan hidrojen peroksit, düşük seçicilik özelliği nedeniyle hamurda ciddi viskozite kayıpları oluşturabilir (Gierer ve ark., 1991; Gierer, 1993). Bu duruma hidrojen peroksidin demir, bakır, manganez gibi geçiş metalleri katalizörlüğünde bozunması sonucu HO[•] gibi oluşan aktif radikaller neden olmaktadır (Johansson ve Ljunggren, 1991; Cardona-Barrau ve ark., 2001; Duarte ve Lachenal, 2002; Cardona-Barrau ve ark., 2003). Bu metal kompleks oluşturucu ajanlar ile çelatlanması peroksit degradasyonunu ve dolayısıyla da selüloz degradasyonunu azaltır (Mariani ve ark., 1999; de la Rosa ve ark., 2002; Duarte ve Lachenal, 2002; Lapierre ve ark, 2003). Hamurların ağartma işleminde genellikle son kademe olarak kullanılan peroksit kademesinden önce, metal iyonlarının uzaklaştırılması amacıyla hamurlara çelatlama işlemi uygulandı. Çelatlama işleminde çelatlayıcı olarak EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) kullanıldı. İşlem koşulları Tablo 11'de yer alan plana göre her bir hamura enzim ve kontrol grubuyla birlikte uygulandı. Her uygulamada 50-200gr tam kuru hamur kullanıldı.

Tablo 11. Çelatlama işlemi (Q) deney planı

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Hamur Konsantrasyonu (%)	İlk pH	EDTA (%)
90	60	12	7.0	2

2.7.5. Hidrojen Peroksit Ağartması (P)

TCF ağartmasının son kademesi olarak hidrojen peroksit kullanıldı. Peroksit kademesi (P) için deney planı Tablo 12’de yer almaktadır. Tüm hamur türleri için enzim ve kontrol gruplarına aynı şartlar altında uygulama yapıldı. Her uygulamada 50-200gr tam kuru hamur kullanıldı.

Tablo 12. Hidrojen Peroksit Ağartması (P) Deney Planı

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Hamur Kons. (%)	H ₂ O ₂ (%)	NaOH (%)	MgSO ₄ (%)
90	120	12	5	4	1

2.8.Kağıt Hamurlarına Uygulanan Analiz Yöntemleri

2.8.1. Kappa Numarası Tayini

Her bir hamur türü için delignifikasyonun kontrolü ve ağartma reaktiflerinin hesaplanması için tüm ağartma kademeleri arasında kappa numarası belirlendi. Kappa numarası özel şartlar altında 1 gram tam kuru kağıt hamuru tarafından tüketilen 0,1 N KMnO₄ çözeltisinin ml olarak miktarıdır. Kappa numarası ile 0,15 faktörünün çarpılması sonucu elde edilen değer % olarak hamurda kalan ortalama Klason lignin miktarını vermektedir. Bu nedenle kappa numarası lignin arındırılmış hamur veriminin bulunması yanında ağartmada kullanılacak kimyasal madde miktarının hesaplamasında da dikkate alınması gereken önemli bir faktördür. Kappa numarası tayini TAPPI T 236 om-99 standardına göre her hamur için iki defa yapıldı.

2.8.2. Delignifikasyon Derecesinin Hesaplanması

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

$$\text{Delignifikasyon derecesi} = [(Ka - Kb)/Ka]x100$$

Burada;

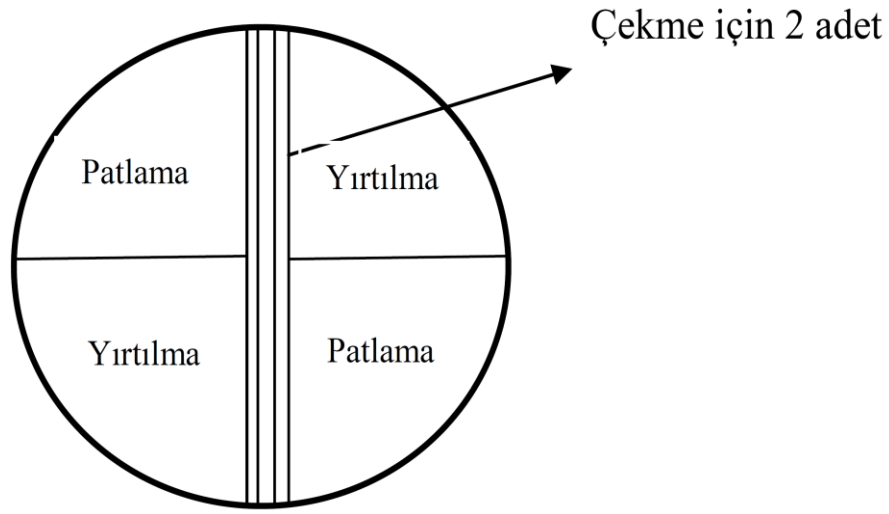
Ka: Oksijen delignifikasyonu öncesi kappa numarası

Kb: Oksijen delignifikasyonu sonrası kappa numarasıdır.

2.9. Kağıtlara Uygulanan Fiziksel ve Optik Testler

2.9.1. Test Kağıtlarının Hazırlanması

Ağartma yapılmış kağıt hamurlarından Regmed marka Rapid Köthen laboratuvar tipi kağıt makinesinde $70 \pm 5 \text{ g/m}^2$ ağırlığında kağıtlar yapıldı. Yapılan deneme kağıtları TAPPI T 402 om-88 standardına göre $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ve bağıl nemi $\% 50 \pm 3$ olarak ayarlandı ve kondisyonlama odasında 24 saat süreyle bekletildikten sonra fiziksel testlere tabi tutuldu. Daha sonra da Şekil 3'de gösterildiği gibi kesilerek fiziksel özelliklerine bakılmak üzere test kağıtları hazırlandı.



Şekil 3. Deneme kağıtlarının fiziksel testlere hazırlanmasında oluşturulan kesim şablonu

2.9.2. Gramaj, Kalınlık, Yoğunluk ve Hacimlilik Tayinleri

Kullanılan test kağıtlarının gramajları TAPPI T 410 om-98 standardı kullanılarak yapılmış ve sonuçlar 1m^2 deki tam kuru madde miktarı olarak verilmiştir. Ayrıca kağıtların kalınlıkları TAPPI T 411 om-88 standardına uygun olarak belirlenirken hacimlilik ve yoğunluk değerleri ise hesaplama yoluyla bulundu.

2.9.3. Patlama Testi

Kağıtların patlama testleri Tappi 403 om-91 metoduna göre Müllen aletinde kg/cm^2 cinsinden tipi standart patlama test cihazında gerçekleştirildi. Patlama direnci kadran üzerinden kgf/cm^2 olarak kaydedilmiş ve patlama indisi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Patlama indisi } (\text{kPa} \cdot \text{m}^2/\text{g}) = \frac{\text{Patl. Dir. } (\text{kgf}/\text{cm}^2) \times 98,06}{\text{Gramaj } (\text{g}/\text{m}^2)}$$

2.9.4. Kopma Testi

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

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

2.9.5. Yırtılma Testi

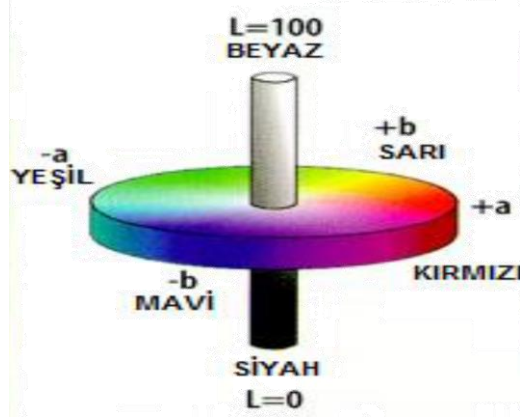
Yırtılma testi, Tappi 414 om-88 standardına göre Elmendorf-1650 tipi yırtılma cihazında yapıldı. Kağıt örnekleri 62x100 mm boyutlarında kesildikten sonra 4 kat olacak şekilde yırtılma işlemi gerçekleştirildi. Kadrandaki okunan değer aşağıdaki formül yardımı ile yırtılma indisine çevrildi.

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

2.9.6. Deneme Kağıtlarına Uygulanan Optik Testler

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

Renk değerlendirmeleri CIE (Commission International de l'Éclairage) tarafından 1971 yılında kağıt endüstrisi için önerilen sistemle L^* , a^* ve b^* CIELAB koordinatlarının hesaplanmasıyla gerçekleştirildi. Renk koordinatları Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4. Renk koordinatları

2.10.SEM Analizi

Çalışmada *Geo7₁* endoksilanaz ile muamele edilen kızılçam ve okaliptus kraft kağıt hamurları Taramalı Elektron mikroskobunda (SEM) incelendi. Kraft hamur örnekleri altın film ile kaplandı. Daha sonra lifler 5 kV'de incelendi (Roncero ve ark.,2000,2003; Nagar ve ark., 2013).

3. BULGULAR

Yapılan çalışmada iki farklı ağaç türü olan kızılçam ve okaliptusa ait kraft hamurlar kullanıldı. Okaliptus odunlarından optimum kraft pişirme yöntemi ile kağıt hamurları elde edildi. Ağartma dizini için TCF ağartma dizini seçildi. Kızılçam ve okaliptus kağıt hamurları birinci basamak olarak enzimatik delignifikasyona uğratıldı. TCF ağartma dizine göre belirlenen ağartmaya göre sırasıyla oksijen delignifikasyonu, çelatlama ve hidrojen peroksit ağartması yapıldı. Bunun sonucunda enzimatik delignifikasyondaki etkinin kağıdın fiziksel optik ve kimyasal özellikleri üzerinde nasıl bir değişiklik yaptığı tespit edildi.

3.1.Okaliptus Yongalarından Kraft pişirme koşullarının belirlenmesi

Kağıt hamuru eldesinde kullanılan okaliptus odun yongaları için kraft (sülfat) pişirme yöntemi seçildi. Pişirme şartları yüksek verim ve düşük lignin miktarı hedeflenerek yapıldı. pişirme koşullarının belirlenmesi önceki çalışmalar göz önüne alınarak belirlendi (Deniz, 2009; Şahin, 2006; Vu ve ark., 2003). Okaliptus yongalarına yapılan pişirme yöntemine ait deney koşulları, hamurların verim ve kimyasal özelliklerine ait değerler Tablo 13'de yer almaktadır.

Tablo 13. Okaliptus kraft pişirme deney planı

Pişirme Şartları	
Na ₂ S+NaOH (%)	20
Sülfidite (%)	25
Çöz/Sap Oranı	4/1
Maksimum Sıcaklık (°C)	170
Maksimum Sıcaklığa Çıkış Süresi (dak)	70
Maksimum Sıcaklıktaki Süre (dak)	120
Maksimum Sıcaklıktaki Basınç (kg/cm ²)	8
Pişirme Sonuçları	
Toplam Verim (%)	44,91
Elenmiş Verim (%)	44,8
Elek Artığı (%)	0,11
Kappa Numarası	21,53
Siyah Çöz pH	13,43

3.2.Kızılçam ve Okaliptus Kağıt Hamuru ile *Geo7₁* Endoksilanaz Enzimi Optimizasyonu

Çalışmada TCF ağartma dizinine geçilmeden önce enzim ile hamur arasındaki maksimum enzimatik delignifikasyon belirlendi. Enzimatik delignifikasyonda etkisi olduğu düşünülen parametreler yapılan diğer çalışmalar göz önüne alınarak farklı oranlarda değiştirilerek denemeler yapıldı. Çalışmada kullanılan *Geo7₁* Endoksilanaz Enzimi daha önceden Canakci ve ark (2012) tarafından tanımlanmış olup enzimatik aktivitesinin optimum koşulları belirlenmiştir. Bu nedenle denemeler enzimin optimum koşulları göz önüne alınarak belirlendi. Kağıt hamurları ile optimizasyon yapılırken ilk basamakta hamur konsantrasyonu %3-10 arasında değiştirildi. Daha sonra enzim miktarı 10-20U/g arasında *Geo7₁* Endoksilanaz Enzimi ile deneme yapıldı. Son olarak inkübasyon süresi 2-6 saat arasında değiştirilerek en iyi süre belirlendi. Enzim uygulaması 24 saat inkübasyona bırakılarak da deneme yapıldı. Buna göre *Geo7₁* Endoksilanaz Enziminin 24 saatte de hamur üzerinde aktivitesini kaybetmediği fakat ağartmada önemli derecede birim düşüş vermediği belirlendi. Optimizasyon yapılırken değiştirilen parametreler dışında, *Geo7₁* Endoksilanazın optimum şartları olan 70 °C, pH 7,0 sabit tutularak denemeler gerçekleştirildi (Tablo 15).

Yapılan denemeler sonucunda kağıt hamurları ile *Geo7₁* Endoksilanaz Enzim ağartmasının optimumu Kızılçam kağıt hamurları için; kappa numarasında 4,81 birim düşüş ile enzimatik delignifikasyon derecesi %9,76 olarak belirlendi. Okaliptus kağıt hamurları için ise; kappa numarasında 5,54 birim düşüş ile enzimatik delignifikasyon derecesi %28,52 olarak belirlendi. Kızılçam ve okaliptus kağıt hamurları için optimum koşullar Tablo 14'de yer almaktadır.

Tablo 14. Kızılçam ve okaliptus *Geo7₁* endoksilanaz aşaması optimum koşullar

Kızılçam		Okaliptus	
Hamur konsantrasyonu %	10	Hamur konsantrasyonu %	5
Enzim miktarı (U/g)	30 U/g	Enzim miktarı (U/g)	30 U/g
Süre (saat)	2 saat	Süre (saat)	2 saat
Sıcaklık	70 °C	Sıcaklık	70 °C
pH	7,0	pH	7,0

Tablo 15. Kağıt hamurları ile *Geo7₁* endoksilanaz enzimmatik delignifikasyon optimizasyon denemeleri

HAMUR TİPİ	HAMUR KONSANTRASYONU	KAPPA NO.	ENZİM MİKTARI	KAPPA NO.	İNKÜBASYON SÜRESİ	KAPPA NO.
OKALİPTUS	%3	15,54	Kontrol	19,42	3 saat	14,6
	%3 Kontrol	18,05	20U/g	15,37	3 saat kontrol	16,5
	%5	15,37	30U/g	13,88	4 saat	12,54
	%5 Kontrol	18,72	40U/g	14,06	4 saat kontrol	15,63
	%7	17,2	50U/g	14,38	6 saat	14,24
	%7 Kontrol	18,05			6 saat kontrol	14,08
	%10	17,88				
	%10 Kontrol	15,21				
KIZILÇAM	%3	43,69	Kontrol	44,78	kontrol 2 saat	49,27
	%3 Kontrol	42,54	20U/g	42,89	2 saat	44,46
	%5	38,13	30U/g	40,7	4 saat	48,63
	%5 Kontrol	41,17	40U/g	42,54	6 saat	44,61
	%7	39,62	50U/g	43,95	24 saat	42,54
	%7 Kontrol	40,45			kontrol 24 saat	48,009
	%10	38,23				
	%10 Kontrol	42,08				

3.3.TCF Ağartma Dizininde İşlem Koşullarının Belirlenmesi

Yapılan çalışmada her bir hamur türü için uygun olarak belirlenmiş koşullar altında Kızılçam ve Okalıptus hamurları, klor ve klorlu bileşik içermeyen, oksidatif özellikli çevre dostu ağartıcılardan oluşan TCF ağartma dizini ile ağartıldı. Ağartma dizininde en uygun parametreleri belirlerken, amaçlanan delignifikasyonu ve seçiciliği geliştirmek olmasından dolayı kappa numarasının düşük elde edilmesi tercih edilir. Ayrıca ağartıcı kimyasalların gereksiz kullanımının azaltılarak ağartma maliyetinin düşürülmesi hedeflenmiştir. TCF ağartma dizinine ait deney planı Tablo 16'de yer almaktadır. TCF ağartma dizininin "XOQP" kademelerinden oluşması belirlendikten sonra daha önce yapılan çalışmalar göz önüne alınarak en iyi koşullar altında ağartma dizini gerçekleştirildi.

Tablo 16. TCF ağartma dizini deney planı

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

Ağartma dizini için her iki hamur türünden 200gr tam kuru kağıt hamuru ile çalışma başlatıldı. Ağartma dizini sonunda kullanılan enzimin etkisinin sağlıklı bir şekilde belirlenebilmesi için enzimatik ağartma basamağında enzimli ve enzimsiz olmak üzere 2 grup üzerinden çalışma sürdürüldü. Enzimatik ağartma Tablo 14’de yer alan koşullara göre yapıldı.

İkinci basamak olarak TCF’nin önemli basamaklarında biri olan oksijen delignifikasyonu yapıldı. Bu basamakta kullanılan alkalın ile ksilanlar soyulma reaksiyonları ile tüketilmektedir (Sixta, 2006). Magnezyum sülfat ise selülozun çözeltide meydana gelen radikaller tarafından bozunmasını ve katalitik ayrışmasını önlemek amacıyla ağartma ortamına ilave edilmektedir (Linden ve Ohman, 1997; Van Heiningen ve Violette, 2003). Oksijen delignifikasyonu ile reaksiyon ortamında oluşan perhidroksil iyonlarının lignindeki kromoforik grupları oksitleyerek renklerini açması parlaklık artışına neden olmaktadır (Gullichsen ve Fogelholm, 1999).

Üçüncü basamakta etkili bir peroksit kademesi yapılabilmesi için çelatlama amacıyla ağartma dizininde Q basamağı uygulandı. Çelatlama EDTA kullanıldı. Bu basamak metal kontrolü için oldukça önemlidir. Ayrıca ağartma dizininde Q kademesinin hidrojen peroksit kademesinden önce yer almasının daha uygun olduğu üzerine yapılan birçok çalışma mevcuttur (Van Lierop, 1993; Kappel ve ark., 1994). Bu sayede hamurda bulunabilecek geçiş metallere katalizörlüğünde bozunması sonucu oluşan HO• gibi aktif radikallerin hamurda oluşturabileceği ciddi viskozite kayıpları önlenmektedir (Gierer, v.d. 1991; Gierer, 1993). Ayrıca ağartma dizininde çelatlama kademesinden sonra yer alan hidrojen peroksit kademesinde peroksit tüketiminin azaldığı, işlem sonrasında hamurların daha yüksek parlaklık ve viskozite değerine sahip olduğu yapılan çalışmalar ile de desteklenmiştir (Abrantes ve ark., 2007).

Çelatma (Q) basamağından sonra son basamak olan hidrojen peroksit ağartması (P) yapıldı. Son kademeler daha çok hamurların parlaklık değerlerinin artırılması üzerine uygulanmaktadır. Hidrojen peroksit, yüksek verim ve parlaklık değerine sahip hamurların üretilmesi amacıyla yaygın bir şekilde ağartma dizinlerinin son ağartma kademesi olarak kullanılmaktadır (Renders, 1995). Hidrojen peroksit ağartması kapa numarasından ziyade parlaklık artışında etkili olan kimyasal bir maddedir. Yapılan ağartmada hidrojen peroksidin aktif olabilmesi için ortama yeterli ölçüde alkali ilave edilmesi gerekmektedir.

Yapılan tüm ağartma kademeleri Tablo 16’de yer alan koşullar altında gerçekleştirildi. Her kademededen sonra kağıt hamurları distile su ile yıkandı.

Kondisyonlanması için bekletildikten sonra rutubet tayini yapıldı. Uzaklaştırılan lignin miktarının belirlenip delignifikasyon derecesinin hesaplanabilmesi için kappaya tayini yapıldı.

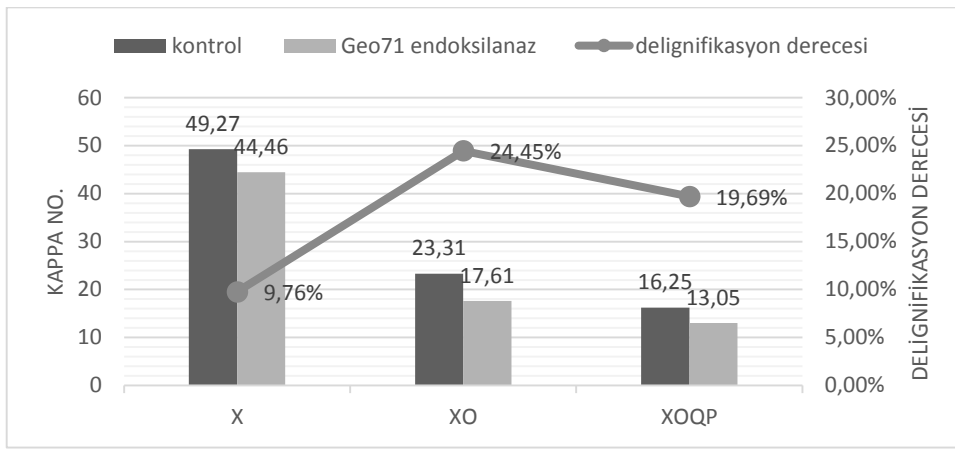
Yapılan çalışmalar sonunda, enzimatik delignifikasyon sonunda kızılçam kağıt hamurları için kappaya numarasında kontrol gruplarına göre %9,7'lik delignifikasyon oranı ile 49,27'den 44,46'ya düşerek 4,81 birim düşüş sağlandı. Okaliptus kağıt hamurları için ise, enzimatik delignifikasyon sonunda kappaya numarası %21,23'lik delignifikasyon oranı ile 17,42'den 13,72'e düşerek 3,7 birim düşüş sağlandı.

Kızılçam için, oksijen delignifikasyon sonunda kappaya numarasında 23,31'den 17,61'e düşerek 5,7 birim düşüş, hidrojen peroksit ağartması ile de kappaya numarasında 16,25'den 13,05'e düşerek 3,3 birim düşüş olduğu belirlendi. Okaliptus için, oksijen delignifikasyonu sonunda 11,74'den 10,57'ye düşerek 1,17 birim düşüş, hidrojen peroksit ağartmasından sonra 7,65'den 6,55'e düşerek 1,1 birim düşüş olduğu belirlendi. Kızılçam ve okaliptus kağıt hamurlarının kappaya numaraları ve delignifikasyon dereceleri Tablo 17'de verilmiştir.

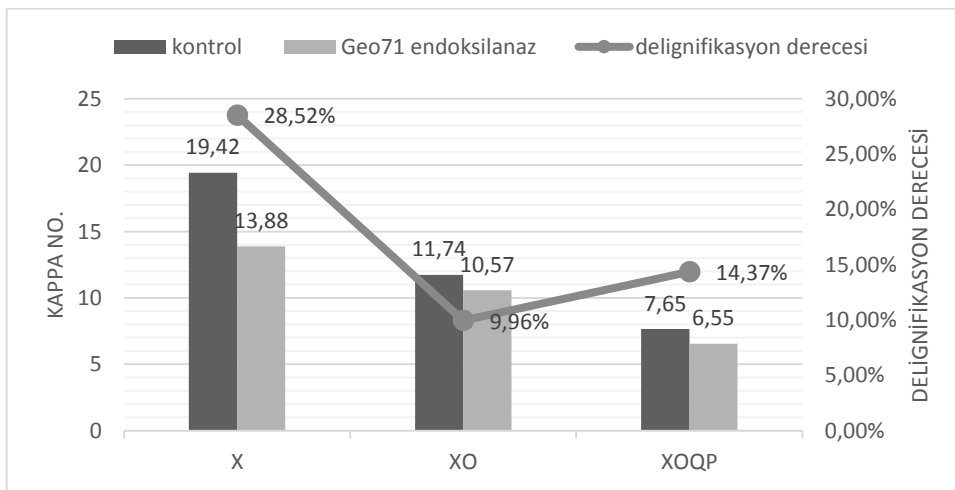
Tablo 17. Kızılçam ve okaliptus hamurlarının kappaya numaraları ve delignifikasyon dereceleri

	Ağartma tipi	Kappaya no.	Delignifikasyon derecesi (%)
KIZILÇAM	X kontrol	49,27	% 9,76
	X	44,46	
	O kontrol	23,31	%24,45
	O	17,61	
	P kontrol	16,25	%19,69
	P	13,05	
ÖKALİPTUS	X kontrol	19,42	%28,52
	X	13,88	
	O kontrol	11,74	%9,96
	O	10,57	
	P kontrol	7,65	%14,37
	P	6,55	
X: enzimatik delignifikasyon, O: Oksijen delignifikasyonu, Q: Çelatlama, P: Hidrojen peroksit ağartması			

Kızılçam ve okaliptus kraft hamuları ile yapılan ağartma sonucu kendi kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman enzim ilavesi yapılmış ağartmanın kappa numarasında daha fazla düşüş olduğu belirlenmiştir. Kızılçam kraft hamurlarına yapılan enzim uygulanmış TCF ağartma sonucunda %73,51 delignifikasyon oranı elde edilirken, enzimsiz ağartmada %67,01 delignifikasyon oranı elde edilmiştir (Şekil 5). Okaliptus kraft hamurlarının sonuçları karşılaştırıldığında enzim uygulanmış TCF ağartması sonucunda %66,27 delignifikasyonu elde edilirken, enzimsiz ağartmada %60,60 delignifikasyon oranı belirlenmiştir (Şekil 6).



Şekil 5. Kızılçam kraft hamuru için ağartma kademelerinde delignifikasyon derecesi



Şekil 6. Okaliptus kraft hamuru için ağartma kademelerinde delignifikasyon derecesi

3.4.Kağıtlara Uygulan Fiziksel Ve Optik Testlerin Belirlenmesi

Yapılan ‘‘XOQP’’ ağartması sonucu, kızılçam ve okaliptus hamurlarından elde edilen deneme kağıtlarının fiziksel ve optik özellikleri üzerine ne gibi bir etki yaptığı incelendi. Okaliptus ve kızılçam kağıt hamurlarının yapılan son son ağartmadan sonra bazı fiziksel ve optik özelliklerine ait bulgular belirlendi (Tablo 18 ve 19). Standart yöntemlere göre yapılan test kağıtları üzerinden kopma uzunluğu, patlama ve yırtılma indisleri gibi fiziksel direnç özelliklerinin yanında parlaklık gibi optik özellikleri ve gramaj, kalınlık, yoğunluk ve hacimlilik gibi diğer özellikleri ayrı ayrı belirlendi. Elde edilen verilere göre kızılçam ve okaliptus kraft hamur türleri enzim ve kontrol grubuyla birlikte değerlendirilirken aynı zamanda iki hamur arasındaki değer farklılıkları da incelendi.

Tablo 18. Kızılçam ve okaliptus kraft hamurlarının fiziksel özelliklerine ait bulgular

HAMUR TİPİ		Çekme indisi (Nm/g)	Patlama indisi (kPa.m ² .g)	Yırtılma indisi (mN.m ² /g)	Kopma uzunluğu (km)	Kalınlık (mikron)	Gramaj (gr/m ²)	Yoğunluk (gr/cm ³)	Hacimlilik (cm ³ /gr)
OKALİPTUS	Kontrol	2,60	4,15	2,98	2,65	136,63	69,88	0,51	1,96
	Enzim	2,57	4,12	2,39	2,62	139,38	71,86	0,52	1,94
KIZILÇAM	Kontrol	2,69	4,13	0,02	2,74	125,63	70,57	0,56	1,78
	Enzim	2,86	3,73	0,02	2,91	136,25	76,93	0,57	1,77

Tablo 19. Kızılçam ve okaliptus kraft hamurlarının optik özelliklerine ait bulgular

OKALİPTUS		ISO Parlaklık (%)	L*	a*	b*	KIZILÇAM		ISO Parlaklık (%)	L*	a*	b*
Kontrol OQP		62,13	89,68	1,42	12,12	Kontrol OQP		52,32	87,61	1,37	18,67
Enzim XOQP		64,24	90,18	1,25	11,43	Enzim XOQP		53,89	88,16	1,13	17,99

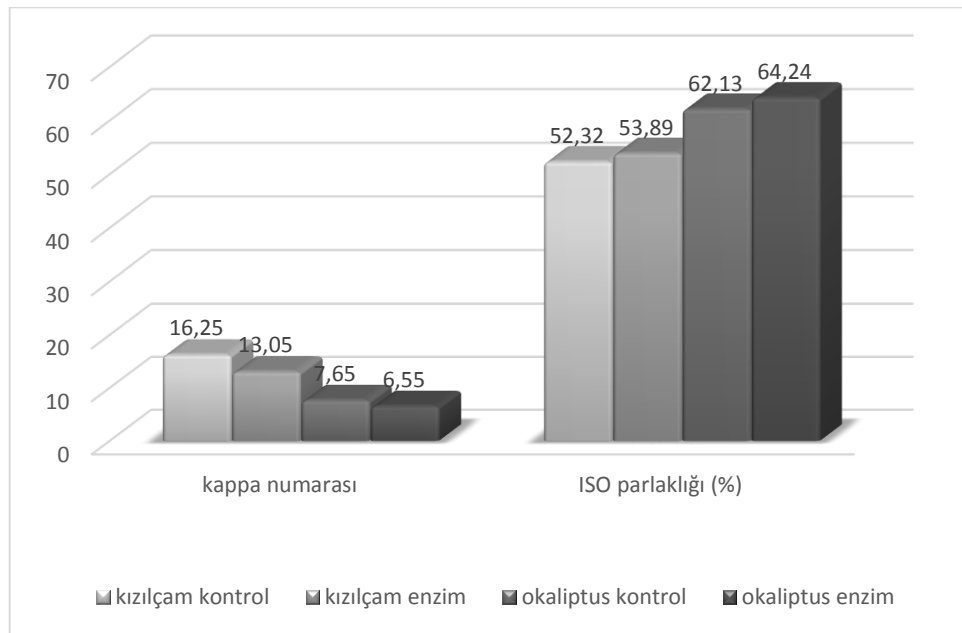
3.4.1.Kızılçam ve Okaliptus Kraft Hamurları İçin Fiziksel Özelliklerin Değerlendirilmesi

Fiziksel özellikler için deneme kağıtları, Regmed marka Rapid Köthen laboratuvar tipi kağıt makinesinde 70 ± 5 g/m² gramajda ve her bir gruptan 10'ar adet kağıt olacak şekilde yapıldı. Yaptığımız çalışma, ağartmada ksilanaz enzimi kullanımının kontrol grupları ile karşılaştırılması olmasından dolayı deneme kağıtları yapılmadan önce dövme işlemi yapılmadı. Dövme işlemi yapılması direnç özelliklerini artırmaktadır. Tablo 18'de verilen bulgulara göre kontrol ve enzim ilaveli ağartmalar karşılaştırıldığında, kızılçam kraft hamurunda kopma uzunluğu kontrole göre 2,74 km'den 2,91 km'ye artış göstermiştir. Buna bağlı olarak belirlenen çekme indiside aynı oranda artmıştır. Patlama indisi enzim ilavesi ile azalma göstermiş ve yırtılma indisi değerlerine bir değişim meydana gelmemiştir. Hacimlilik ve yoğunluk değerlerinde de önemli derecede bir değişim belirlenmedi. Okaliptüs kraft hamurlarında yapılan karşılaştırmaya göre enzim ilavesi ile hamurun fiziksel özelliklerinde bir artış yapmadığı ve önemli derece bir değişim göstermediği belirlendi.

3.4.2.Kızılçam ve Okaliptus Kraft Hamurları İçin Optik Özelliklerin Değerlendirilmesi

TCF ağartma kademelerinin ardında hamurların parlaklık değerleri, uzaklaştırılan lignine bağlı olarak artmaktadır. TCF ağartması ile ulaşılan son parlaklık değerinde Peroksit kademesinin katısı önemli derecededir. Bununla birlikte peroksit kademesinden önce uygulanan çelatlama kademesi ile geçiş metallerinin peroksidi bozundurarak etkisiz hale getirilmesi büyük ölçüde önlenmektedir. Kızılçam ve okaliptus kraft hamurlarından üretilen kağıtlardan optik özellikleri standart yöntemlere göre tespit edilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen veriler Tablo 19'da verilmiştir. Ağartılması güç olan kraft hamurdalardan kızılçam ve okaliptus üzerinde ksilanaz enzim ağartması ile her iki kraft hamur türü için ISO parlaklık ve beyazlık değerlerinin arttığı gözlemlendi. Renk değerlerinin değişiminde de istenilen düzeyde veriler elde edildi.

Şekil 7'den görüldüğü üzere kızılçam kraft kağıtlarında, kapa numarasına doğru orantılı olarak ISO parlaklık değerlerinde artış belirlenmiştir. Enzim ve kontrol grupları karşılaştırıldığında enziminde etkisiyle ISO parlaklık değerleri %52,32'den %53,89'a yükselerek %2,91'lik artış gözlemlendi. Okaliptus kraft kağıtlarında da aynı şekilde etki gözlemlenerek parlaklık değerleri %62,13'den %64,24'e yükselerek %3,28'lik gözlemlendi. Elde edilen verilere göre enzim ilavesi ile kağıtlardan yüksek parlaklık elde edilebilirliği belirlendi. Bununla birlikte optik özelliklerindeki iyileşme okaliptus hamurlarında kızılçam hamurundakine göre daha fazla olduğu belirlendi.



Şekil 7. Kızılçam ve okaliptus kraft hamurlarının kapa no. ve parlaklıklarının değişimi

TCF ağartmasına uğratılan kızılçam ve okaliptus hamurlarında üretilen deneme kağıtlarının renk özellikleri, standart yöntemler baz alınarak Şekil 4'de gösterilen renk koordinat sistemine göre belirlendi.

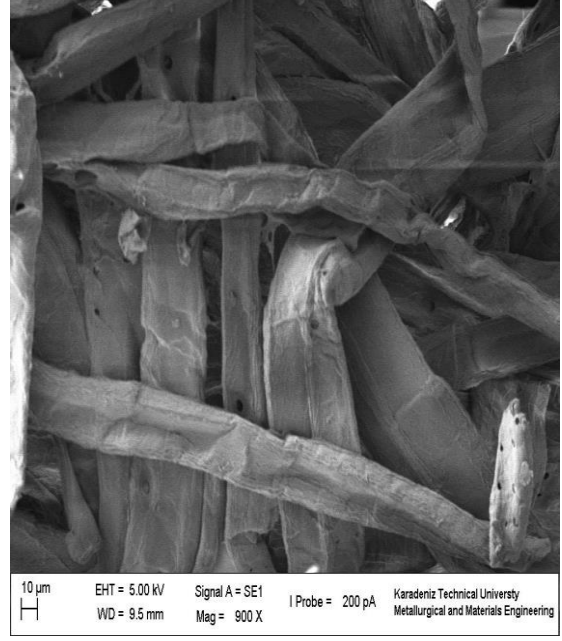
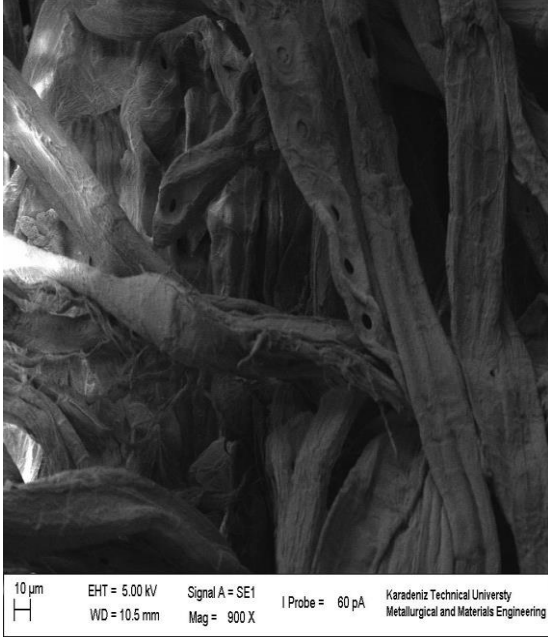
L^* , a^* , b^* değerlerindeki değişimler tablo 18'da verilmiştir. L^* değeri her iki tür içinde ksilanaz enzimi ilavesi ile arttığı gözlemlendi. Şekil 8. incelendiğinde L^* değerinin her iki hamur türü için beyaza doğru gittiği belirlendi. Kızılçam kraft hamurlarında ksilanaz enzim ilavesi ile 87,61'den 88,16 ya yükselirken, okaliptus kraft hamurlarında ksilanaz enzim ilavesi ile 89,68'dan 90,18'e yükseldiği gözlemlendi. Kızılçam ve Okaliptus hamurları için L^* değerindeki değişme ksilanaz enzim ilavesi ile arttığı ve değişimlerin her iki hamur türü için hemen hemen aynı oranlarda gerçekleştiği ve değerlerinde birbirine birer birim farklı olduğu görülmektedir. Aynı şekilde a^* değeri, Kızılçam ve okaliptus hamurlarına ağartmada ksilanaz ilavesi ile elde edilen deneme kağıtlarında kırmızıdan yeşile doğru gittiği görülmektedir. Oranların her iki hamur türü için hemen hemen birine yakın olduğu belirlendi. b^* değerine bakıldığında ise, enzim ilavesi ile renk değişiminin sarıdan maviye doğru gittiği görülmektedir. Her iki hamur türü için değerler birbirinden farklıdır. Kızılçam hamurlarında b^* değeri okaliptus hamurlarına göre daha yüksektir.

3.5.SEM Analizinin Değerlendirilmesi

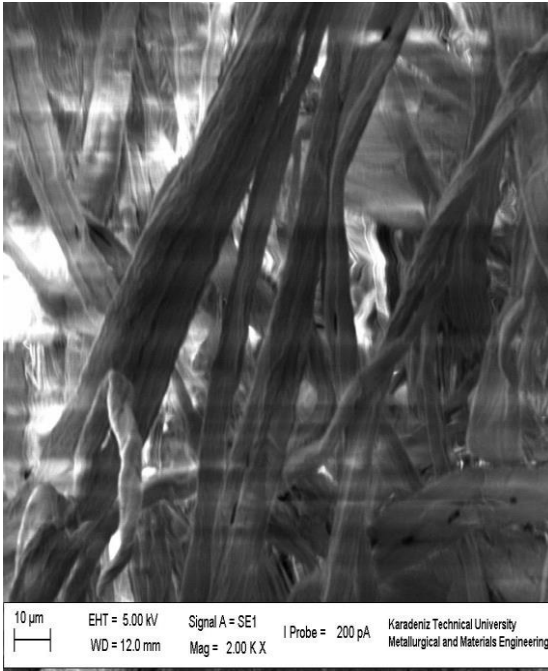
Geo7₁ Endoksilanaz Enzimi ile kraft kağıt hamurları muamele edildiğinde hamur liflerinde morfolojik değişimler meydana gelmektedir. Enzimden kaynaklanan bu değişimler, çatlaklar, pul, delik ve ipliklenme gibi morfolojik bozulmalardır. Aynı zamanda ksilanaz enzimleri hamur liflerinin hücre duvarında gözenekler açmaktadır. Bu gözenek ve çatlaklar, büyük lignin makromoleküllerinin difüzyonundan oluşmaktadır (Roncero ve ark., (2000a; Paice ark 1995; Wang ve ark, 1997) Lignin parçalarının bu şekilde dışa doğru hareketi hamurların ağartıcı kimyasallara erişebilirliğini artırmaktadır (Roncero, 2005).

Kızılcım ve okaliptus hamurları ile optimum koşullar (Tablo 14) altında yapılan enzimatik ağartma sonucu hamuların lif yapıları SEM mikroskobunda incelendi. Hamur liflerindeki değişimlerin karşılaştırılabilmesi için kontrol gruplarında incelenmesi yapıldı. Elde edilen bulgularda her iki hamur türü için liflerin yapısında morfolojik değişimler meydana geldiği belirlendi.

Şekil 8 ve 9'da verilen Elektron mikroskobu taraması (SEM) görüntülerine bakıldığında her iki hamur türünde ksilanaz enzim muamelesi yapılmış liflerin boyutlarında daralma meydana geldiği görüldü. Şekil 8.A ve şekil 9A'da bazı liflerde lignin difüzyonu nedeniyle oluşan delikler görüldü. Şekil 8'de A ve B ayrı ayrı incelendiğinde, kağıt hamur liflerinin enzim muamelesi ile yüzeylerinde pürüzlerin meydana geldiği ve bazı liflerde dallanmalar olduğu görüldü. Aynı şekilde Şekil 9'da A ve B ayrı ayrı incelendiğinde liflerin yüzeyinde pürüzlenme meydana geldiği, sıkı dizilmiş olan liflerin daha gevşek şekilde dizilmiş olduğu görüldü. Bu da *Geo7₁* Endoksilanaz Enziminin hamur lifleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 8. Kızılçam kraft kağıt hamuru liflerinin SEM görüntüsü (A. *Geo7₁* Endoksilanaz Enzimi muamelesi B. Kontrol)



Şekil 9. Okaliptus kraft kağıt hamuru liflerinin SEM görüntüsü (A. *Geo7₁* Endoksilanaz Enzimi muamelesi B. Kontrol)

4.TARTIŞMA

K.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışma termofilik bir ksilanazın kağıt hamuru ağartılmasında kullanımının araştırılmasını kapsamaktadır. Çalışma, FBA-2014-134 nolu BAP projesiyle desteklenmiştir.

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kraft kağıt hamuru üretilirken ligninin yaklaşık % 90'ı pişirme çözültisi içerisinde çözülmekte ve geride kalan lignin kraft kağıt hamurunun kahve rengine neden olmaktadır. Bu durum kağıt sanayisinde tercih edilen bir durum olmamakla birlikte bu güne kadar yapılan çalışmalar göstermiştir ki kalan ligninin uzaklaştırılmasında kullanılan klasik metotlar klor tabanlı kimyasalların kullanılmasına yöneliktir. Ancak bu kimyasallar toksik ve mutajenik kloroorganik bileşiklerin oluşmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle klor kullanımına alternatif olarak geliştirilen elementel klorsuz ağartma anlamına gelen ECF yöntemi geliştirilmiştir (EPA, 2003). Bu yöntemle klorlu organik bileşiklerin oranı önemli ölçüde azaltılmış fakat tamamıyla bertaraf edilememiştir. Daha sonra TCF yöntemi adı verilen klor içeren herhangi bir ağartıcı kullanılmadan gerçekleştirilen ağartma tekniği geliştirilmiştir. Bu yöntemde oksijen, peroksit, ozon ve peroksi asitler gibi oksijen bazlı ağartıcılar kullanıldığı için atık su bileşiminde klorlu organiklerin oluşumu tümüyle bertaraf edilmektedir (EPA, 2003).

Kağıt hamurunun ağartılmasında kullanılan yöntemlerin gelişmesiyle de bu yöntemlerdeki kimyasalların kullanımını azaltıcı alternatif yöntem mikrobiyal enzimler olmuştur. Ksilanaz enziminin kağıt hamurunun ağartılmasında kullanılmasının tercih edilmesinin sebebi, pişirilmeden sonra kalan ligninin uzaklaştırılmasında rol oynaması ve kraft kağıt hamurunda bulunan hemiselülozların enzim tarafından parçalanmasıyla birlikte kimyasalların kağıt hamuruna etkisinin artırmasıdır. Böylece herhangi bir ağartma yönteminin ilk kademesi olarak enzim uygulaması yapılması, hamurun kimyasal etkinliğini artırarak kendinden sonra gelen kimyasal miktarında azaltma ve az kimyasal kullanımıyla yüksek parlaklık elde etmeyi sağlamaktadır. Bu çalışmada öncelikle kimyasal miktarını azaltmak ve çevreye duyarlı bir ağartma gerçekleştirmek amacıyla enzim uygulaması TCF yöntemi ile birlikte yapılmıştır. Yöntem daha önceki çalışmalar dikkate alınarak "XOQP" olarak belirlenmiştir. Yapılan "XOQP" ağartması sonunda kızılçam ve okaliptus kraft hamurlarından deneme kağıtları üretilmiştir. Daha sonra fiziksel ve optik özellikleri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan kraft kağıt hamurlarından okaliptus ve kızılçam üzerinde

daha önce klonlanması grubumuz tarafından gerçekleştirilmiş olan *Geo7₁* endoksilanaz enzimi kullanılmış ve *Geo7₁* endoksilanazın kızılçam ve okalıptus kraft kağıt hamurlarının kapp numaralarını düşürdüğü, parlaklık ve beyazlık değerlerini artırdığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada kraft kağıt hamurları üzerinde etkinliği belirlenen *Geo7₁* endoksilanaz, termofilik bir bakteri olan *Geobacillus* sp. 7₁ suşundan elde edilmiştir. Yapılan literatür taramasında kağıt hamurlarının ağartılmasında kullanılan ksilanazların bakteriyel ve fungal kaynaklı oldukları gözlemlenmiştir. Ancak bakterilerden üretilen ksilanazlar alkali-ısı kararlı olmaları nedeniyle funguslardan üretilen ksilanazlara göre daha fazla avantajlara sahiptir. Genellikle bakteriyel ksilanazın optimum pH ve sıcaklığı fungal ksilanaza göre biraz daha yüksektir. Bu da pek çok endüstriyel uygulamada özellikle de kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanımına uygun bir özelliktir (Ratanachomsri ark 2006;. Khasin et ark., 1993). 2002 yılında, Subramaniyan ve Prema). Bu bilgilere göre; *Geo7₁* endoksilanaz enziminin optimum şartlarının pH 7,0 ve 70 °C olması ve bu şartlarda kızılçam ve okalıptus hamurlarının kapp numaralarında ve kağıtların parlaklıklarında iyileştirme yapması kağıt ve kağıt hamuru sanayisi için ilgi çekici bir durumdur.

Yapılan bu çalışmada, *Geo7₁* endoksilanazın en aktif olarak ağartma yaptığı koşulların belirlenmesi için kızılçam ve okalıptus kraft hamurları ile optimizasyon yapılmıştır. Optimizasyon *Geo7₁* endoksilanazın optimum şartları olan pH 7,0 ve 70 °C'de gerçekleştirilmiştir. *Geo7₁* endoksilanazın yüksek sıcaklıkta aktivite göstermesi endüstriyel açısından önemlidir. Günümüzde var olan ticarileşmiş enzimlerin kullanılabildikleri pH ve sıcaklık aralıklarına bakıldığında zaman; Cartazyme için pH 5 – 7 ve 45 – 55 °C; Irgazyme için pH 7 – 8 ve 50 – 60 °C; Ecopulp için pH 7 – 8 ve 50 °C, Pulpzyme için pH 6 – 8 ve 50 – 55 °C; Resinase için pH 7 ve 45 – 50 °C; Bleachzyme, Amano90 ve XylanaseGS35 için pH 4.5 – 7.0 ve 30 – 40 °C olduğu görülmektedir (Techapun ve ark., 2003). Buna göre çalışmada kullanılan *Geo7₁* endoksilanazın ticari enzimlere kıyasla pH'ının optimum koşullar arasında yer aldığı ve sıcaklık bakımından daha yüksek sıcaklıkta aktif olduğu görülmektedir. Yüksek sıcaklık ve diğer ekstrem koşullarda aktivite göstermeleri bu enzimleri endüstriyel kullanım için uygun hale getirmektedir. Termofilik enzimlerin pH değişikliklerine ve yüksek sıcaklıklara karşı gösterdiği kararlılık, bu enzimlerin endüstri alanlarında tercih edilme nedenleridir. Termofilik enzimler, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta kararlı ve aktiftirler. Bu yüksek sıcaklıklar, reaksiyon sırasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskini önemli derecede azaltmaktadır (Burg, 2003). Ayrıca, bu yüksek sıcaklıklarda, reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızları ve

çözünürlükleri önemli derecede artar ve bu da daha fazla ürün oluşumunu sağlar (Mozhaev, 1993; Kumar ve Swati, 2001). Bu sıcaklıklarda suyun yüzey geriliminin ve vizkositesinin azalması da diğer bir avantajdır (Kristjansson, 1989).

Çalışmada lignin miktarı bakımından birbirinden farklı olan okaliptus ve kızılçam iki hamur türüne *Geo7₁* endoksilanaz uygulaması yapılmıştır. kağıt hamurları 30 U/g *Geo7₁* endoksilanaz ile muamele edilmiştir. Enzimatik uygulamalarda kullanılacak enzim dozunun ayarlanması enzimlerin tasarruflu kullanılması açısından önem arz etmektedir. Bu nedenle 10-50 U/g *Geo7₁* endoksilanaz kağıt hamuru dozları okaliptus ve kızılçam üzerinde denenmiştir.

Kağıt hamurlarının ağartılmasında ksilanaz enzimlerin kullanıma yönelik literatürde pek çok çalışma mevcuttur. Literatürde yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, *Geo7₁* endoksilanaz enziminin kraft kağıt hamurları üzerinde etkinliğinin yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan kızılçam kraft kağıt hamuru, ülkemizde kraft yöntemine uygun olan, en yaygın ve en fazla yetişen ağaç türüdür fakat enzimatik ağartma uygulaması bakımından literatürde sık rastlanmamakla birlikte lignin içeriği yüksek, kappa numarası yüksek ve ağartılması zor olan kağıt hamuru türüdür. Okaliptus kraft hamurları ise dünyada yaygın olarak bulunan, kızılçam kraft hamurlarına nazaran daha düşük lignin içeriğine sahip ve kappa numarası daha düşüştür. İki hamur arasındaki farklıklar göz önüne alındığında *Geo7₁* endoksilanazın enziminin farklı hemiselüloz ve lignin içerikli hamurlarda da enzimatik olarak etki yaptığı belirlenmiştir. *Geo7₁* endoksilanaz enzimi 24 saatte enzim kararlılığını kaybetmemektedir. Bu nedenle kağıt hamurları ile ksilanaz muamesi pH 7,0, 70 °C'de 24 saat boyunca devam ettirilmiştir ve elde edilen kappa sonuçlarına göre enzimin kararlılığının 24 saat boyunca da aktif olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda kızılçam kağıt hamurlarının *Geo7₁* endoksilanaz ile muamesi sonucu kappa numarasında 4,81 birim, %9,76'lik düşüş belirlendi. Okaliptus hamurlarının *Geo7₁* endoksilanaz muamesi ile 5,54 birim %28,52'lik düşüş belirlendi. Buna göre *Geo7₁* endoksilanazın literatürdeki enzimlere kıyasla kappa numarasında yaptığı düşüşün daha yüksek olduğu görülmektedir. Ksilanaz enzimlerinin kullanılmaya başlanmasının ilk yıllarında, Barnoud ve arkadaşları, (1986) yaptıkları çalışmada yüksek konsantrasyondaki ksilanaz ile kağıt hamurunun uzun süre muamele edilmesi sonucu, TEM (Transmisyon Elektron Mikroskobu) altında gruplar ve tek tek lifler halinde selüloz mikrofibrillerinin ayrıştığını izlenmişler ve ilgili çeperde bulunan selüloz mikrofibrillerini birbirine bağlamada ksilanazların önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir.

Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda; *S. Thermoviolaceus*'den elde edilen ksilanaz okaliptüs kraft hamurlarının lignin içeriğinde %25 düşüş sağlandığı bildirilmiştir (Kulkarni ve Rao, 1996). *Bacillus pumilus*'tan elde edilen bir ksilanaz kraft bir hamur ile muamele edilmiş ve kappa numarasında % 14'lik bir düşüş göstermiştir (Bim and Franco, 2000). *Bacillus licheniformis* 77-2'ye ait ksilanaz kappa numarasında 1.5 birimlik düşüş yapmıştır (Damiano et al., 2003). Ticari bir enzim olan Pulpzyme HC ile okaliptüs kraft hamuru muamele edilmiş kappa numarasında %10,4'lük azalma bildirilmiştir (Roncero ve ark., 2003b). Sert odun ambalaj kağıt hamurunun ön ağartma işleminde sırasıyla; *Aspergillus indicus*, *A. flavus* ve *A. niveus* türü funguslardan elde edilen ksilanaz enzimleri kullanıldığı bildirilmiştir. Çalışma sonucunda kağıt hamurunun kappa değerinin 18.60'dan sırasıyla 6.8, 6.2 ve 5.0 düştüğü ve parlaklığının 19.83'ten sırasıyla *A. indicus*, *A. flavus*, *A. niveus*'un ksilanazları tarafından 42.20, 43.13 ve 45.19'a çıkartılmıştır (Angayarkanni ve ark., 2005). Zhao ve ark., (2006) fungusdan elde edilen ksilanaz enziminin buğday sapında %6,29'lik delignifikasyon yaptığını bildirmiştir. *Bacillus coagulans*'dan elde edilen ksilanaz enziminin odunsu olmayan kağıt hamurunun ön ağartılmasında kullanıldığı ve sonuçların olumlu olduğu ifade edilmiştir (Chauhan ve ark., 2005). Başka bir çalışmada Choudhury ve ark. (2006) *Bacillus coagulans*'tan üretilen ksilanazın %5.45'lik delignifikasyon yaptığını belirlemişlerdir. *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis*'den elde edilen ksilanaz kombinasyonunun kullanılmasıyla kappa numarasında 1,2 birimlik düşüş rapor edilmiştir (Ahlawat ve ark., 2007). Ahlawat ve ark., (2008) meşe ve bamboo karışımı kağıt hamurunun kappa numarasında ksilanaz enzimi kullanılmasıyla %5,85'lik düşüş meydana getirildiğini bildirmiştir. *Bacillus pumilus* elde edilen ksilanaz kraft kağıt hamurunun lignin içeriğinde %8,5 düşüş bildirmiştir (Kaur et. al., 2010). *Bacillus subtilis*'den elde edilen ksilanaz enziminin ise ambalaj kağıdı hamurunun ağartılmasında kullanılmasıyla lignin miktarında azalma olduğu ve kappa sayısının düştüğü bildirilmiştir (Saleem ve Akhtar, 2012). *Bacillus pumilus* SV-85S'den elde edilen ksilanaz ile farklı odun türlerinden elde edilmiş kraft kağıt hamurunun kappa numarasında 1.6 birimlik düşüş bildirilmiştir (Nagar et. al., 2013).

Comlekcioglu ve ark., (2014) tarafından yakın zamanda yapılmış olan kızılçam ve okaliptüs kraft hamurlarının kullanılması yönüyle yaptığımız çalışmaya benzer olan bir çalışmada, *Orpinomyces sp.*'a ait recombinant bir ksilanaz, kızılçam ve okaliptüs kraft hamurlarına pH 6,0'da 50 °C'de muamele edilmiş ve sırasıyla %9.03 ve %13.78 delignifikasyon oranı elde edilmiştir. Buna göre çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar

literatürdeki en yakın çalışmaya göre termostabil pH ve sıcaklık bakımından daha yüksek ve kappa numarasındaki düşüşe göre elde edilen delignifikasyon derecesi daha yüksektir.

TCF ağartma dizini aşamaları “XOQP” olarak daha önceki çalışmalar göz önüne alınarak belirlendi. TCF ağartması sonucunda kızılçam kraft hamurlarının kontrol ile karşılaştırıldığında delignifikasyon derecesi %67,01’den %73,51’e yükseltildi. Buna bağlı olarak kızılçam kraft hamurlarının ISO parlaklık değerleri %52,32’den %53,89’a yükseltildi. Okaliptus kraft hamurları delignifikasyon derecesi ağartmada %60,60’dan %66,27’ye yükseltildi. Bununla birlikte okaliptus kraft hamurlarının ISO parlaklık değerleri %62,13’den %64,24’e yükseltildi. *Geo7₁* endoksilanaz ile muamele edilen kızılçam ve okaliptus kraft hamurlarından elde edilen kağıtların ISO parlaklık değerleri sırasıyla %2,91, %3,28 artış meydana gelmiştir. Elde edilen bulgulara göre *Geo7₁* endoksilanaz enzimi ilave edilen ağartma dizini kontrol ile karşılaştırıldığında kızılçam ve okaliptus kraft hamurlarının son kappa değerlerinde düşüş belirlenmesiyle birlikte kağıt parlaklıklarında da iyileşme meydana gelmiştir. Yapılan ağartma dizilerinde kimyasalı en az düzeyde kullanarak kappa numarası düşürülürken aynı zamanda parlaklığı artırmak tercih edilen bir durumdur. Yapılan literatür çalışmalarına bakıldığında zaman; *Streptomyces thermoviolaceus* ksilanazı kraft kağıt parlaklığında %6.9 artış meydana getirmiştir (Garg ve ark., 1998). Başka bir çalışmada *Bacillus* sp. NCIM 59 ksilanazı, şeker kamışından elde edilen kraft kağıt parlaklığında %2,5 artış meydana gelmiştir (Kulkarni and Rao, 1996). *Bacillus pumilus* ksilanazıyla yapılan çalışmada kağıt parlaklığında %6.5 artış bildirilmiştir (Bim and Franco, 2000). Zhao ve ark (2002) *Aspergillus niger* An-76 suşuna ait ksilanaz buğday sapından elde edilen kağıtlarda %3 parlaklık meydana gelmiştir. Buğday sapından elde edilen kağıtlarla yapılan başka bir çalışmada, *Thermomyces lanuginosus* CBS288.54 ksilanazı kullanılmış ve parlaklık %3.93 artırılmıştır (Li et al.,2005). Comlekcioglu ve ark., (2014) tarafından yapılan çalışmada, TCF ağartması sonucunda, kızılçam kraft hamuru için son parlaklık değeri %54,77 olarak elde edilirken okaliptus kraft hamurları %71,47 olarak elde edilmiştir. Rapor edilmiş olan sonuçlar, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre kızılçam için elde ettiğimiz %53,89’luk ISO parlaklığı ile birbirine yakın olarak belirlenirken, okaliptus için sonucumuzun daha düşük olduğu görülmüştür.

Fiziksel özelliklere ait bulgulara bakıldığında kızılçam ve okaliptusun ksilanaz muamelesi ile patlama indisi, yırtılma indisi, kopma uzunluğu ve çekme indisi gibi direnç özelliklerinde önemli derece bir değişim olmadığı belirlendi. Literatürde ksilanaz enzimi muamelesi sonucunda fiziksel özelliklerde değişim olmayan çalışmalar mevcuttur (Kim ve

Paik., 2000; Saleem ve ark., 2009; Bissoon ve ark., 2002; Comlekcioglu ve ark., 2014). Sonuçlarımızla benzer olan literatürdeki çalışmalardan, Comlekcioglu ve ark., (2014) tarafından rapor edilen bilgilere göre, kızılçam ve okaliptus kraft hamurlarında elde edilen kağıtların fiziksel özelliklerine ait kopma uzunluğu ve yırtılma indisinde kontrole göre düşüş meydana gelmiştir. Buna göre kızılçam kraft hamurlarında kopma uzunluğu 6,75'den 5,25'e düşüş, okaliptus hamurları için kopma uzunluğu 5,98'den 4,91'e düştüğü rapor edilmiştir. Patlama indisi ise, kızılçam kraft hamuru için 4,82'den 3,35'e düşüş, okaliptus kraft hamurları için 3,75'den 2,81'e düşüş rapor edilmiştir. Literatürdeki bu sonuçlar kendi sonuçlarımızla karşılaştırıldığında kızılçam kraft kağıt hamurlarına ait elde ettiğimiz kopma uzunluğu değerlerimiz 2,74'den 2,91'e yükselmesinde dolayı daha iyi olduğu fakat patlama indisi bakımından 4,13'den 3,73 düşmesiyle iyileşme yapmadığı fakat Comlekcioglu ve ark., (2014) tarafından rapor edilen değere göre daha iyi olduğu belirlendi. Okaliptus kraft hamurları için ise kopma uzunluğu sonuçlarımız 2,65'den 2,61'e birbirine yakın olarak değişimin ihmal edilebilir düzeyde olduğu belirkenirken, patlama indisi için de 4,15'den 4,12'ye birbirine yakın ve ihmal edilebilir derecede değişim gösterdiği belirlenmiştir. Comlekcioglu ve ark., (2014) tarafından rapor edilen okaliptus kraft kağıt hamurları değerlerine göre kopma uzunluğunun daha düşük olduğu fakat patlama indisinin daha yüksek olduğu belirlendi.

Kağıt hamurları ile yapılan enzimatik çalışmalarda, enzim hamur lifleri üzerine etki etmektedir. Liflerde meydana gelen morfolojik değişimleri belirlemek için taramalı elektron mikroskobu kullanılarak inceleme yapılmaktadır. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda ksilanaz enzimi ile muamele edilen hamurlar SEM tarafından incelenmiştir. Yaptığımız TCF ağartma çalışmasında ilk basamak olarak yapılan *Geo7₁* endoksilanaz muamelesinden sonra hamurlar SEM ile incelenmiştir. Kızılçam ve okaliptus kraft hamurları kontrol hamur örnekleri ile karşılaştırıldığında ksilanaz muamelesi yapılmış olanları morfolojilerinde değişimler meydana gelmiştir. Hamur liflerinde fibrillenme, bazı bölgelerde porların meydana gelmesi, gevşek dizilmeler gibi oluşan morfolojik değişimler ligninin uzaklaştırıldığı yerlerde görülmektedir. Yaptığımız çalışmada elde edilen SEM bulgularına göre *Geo7₁* endoksilanaz enzimi ile kraft hamurların muamele edilmesi sonucu enzimin hamurda lignine uzaklaştırmaya yönelik bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu şekilde enzim muamelesi ile ilk kademedeki uzaklaştırılan lignin molekülleri, bir sonraki aşamadaki kimyasal etkinliğinde artırdığı için tercih edilen bir durumdur (Paice ve ark. 1995; Wang ve ark., 1997; Roncero ve ark., 2000; 2003; 2005; Nagar et. al., 2012).

5.SONUÇLAR

Bu çalışmada bakteriyal kaynaklı *Geo7₁* endoksilanaz enziminin Kızılcım ve Okalıptus kraft kağıt hamurları üzerindeki etkisi ve ağartmadaki katkıları araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan materyallerden kızılcım kraft kağıt hamurları Zonguldak/Çaycuma OYKA Kağıt ve Ambalaj Sanayisi'nden satın alındı. Okalıptus kraft kağıt hamurları ise laboratuvar şartlarında üretildi. Öncelikle Karadeniz Teknik Üniversitesi kampüsünden okalıptus odunları temin edildi ve yongalandı daha sonra 1000gr okalıptus yongaları kraft yöntemi ile kağıt hamuru üretildi. Okalıptus kraft hamurunun kapa numarası 21,53 olarak hesaplandı. Kızılcım kraft kağıt hamurlarının kapa numarası ise 46 olarak hesaplandı.

Kızılcım ve okalıptus kraft kağıt hamurları ile *Geo7₁* endoksilanaz enziminin en etkin koşullarını belirlemek için optimizasyon yapıldı. Optimizasyon yapılırken enzimin hamura etkisini değiştirdiği düşünülen inkübasyon süresi, hamur konsantrasyonu ve enzim miktarı farklı oranlarda değiştirildi. Deneş şartları *Geo7₁* endoksilanaz'ın optimum şartları olan pH 7,0 ve 70°C'de gerçekleştirildi. Optimizasyon sonucunda, kızılcım kraft hamuru için optimum koşullar, kapa numarasında 4,81 birim düşüş ile %10 hamur konsantrasyonu, 30U/g *Geo7₁* endoksilanaz ve 2 saat olarak belirlendi. Okalıptus kraft hamurları için 5,54 birim düşüş ile, %5 hamur konsantrasyonu, 30U/g *Geo7₁* endoksilanaz ve 2 saat olarak belirlendi.

TCF ağartma dizini aşamaları "XOQP" olarak daha önceki çalışmalar göz önüne alınarak belirlendi. Ağartma dizininde; X, enzim delignifikasyonu, O, oksijen delignifikasyonu, Q, çelatlama ve P, peroksit ağartmasıdır. İlk basamağı *Geo7₁* endoksilanaz delignifikasyonu olan TCF ağartması sonucunda kızılcım kraft hamurlarının kontrol ile karşılaştırıldığında delignifikasyon derecesi %67,01'dan %73,51'e yükseltildi. Buna bağlı olarak kızılcım kraft hamurlarının ISO parlaklık değerleri %52,32'den %53,89'a yükseltildi. Okalıptus kraft hamurları delignifikasyon derecesi ağartmada %60,60'dan %66,27'a yükseltildi. Bununla birlikte okalıptus kraft hamurlarının ISO parlaklık değerleri %62,13'den %64,24'e yükseltildi. Yapılan fiziksel özellik testlerinde *Geo7₁* endoksilanaz enziminin ağartmada direnç özelliklerini önemli derecede değiştirmediği belirlendi. Bu bilgilere göre kızılcım ve okalıptus kraft hamurunda *Geo7₁* endoksilanaz enzimi uygulaması

ile en az kimyasal muamelesiyle düşük kappa numarası ve yüksek ISO parlaklık elde edilebilirliği belirlendi.

“XOQP” TCF ağartmasında ilk basamakta *Geo7₁* endoksilanaz uygulanan kızılçam ve okalıptus kraft hamurlarının liflerinde meydana gelen morfolojik değişimler SEM mikroskopunda incelendi. Elde edilen bulgularda, her iki hamur türü için, hamur yapısında ligninin hamurdan difüzyonuna bağlı olarak deliklerin meydana geldiği, liflerin fibrillendiği ve hamurun liflerinin genişliğinde daralma meydana geldiği görüldü. Bu bulgulara göre *Geo7₁* endoksilanaz enziminin hamur lifleri morfolojisinde değişim yaptığı belirlendi. Bu da çalışmada kullandığımız *Geo7₁* endoksilanaz enziminin hamurdan ligninin uzaklaştırılmasında ilk basamak olarak kullanılmasının tercih edilir bir yöntem olduğunu gösterdi.

6.ÖNERİLER

Son zamanlarda, ülkemizdeki en önemli sıkıntılardan biri, kullanımını yaygınlaşan endüstriyel enzim kaynaklarının yurtdışı kaynaklı olmasıdır. Enzimlerin üretiminin maliyette yüksek olması ve dış pazardan yüksek fiyatta alınması ülkemizdeki ihtiyacı karşılayamamaktadır. Bu alanda yapılacak olan en iyi gelişme dışa bağımlılığımızı azaltmaktır.

Günümüzde enzim kullanılan alanların başında gelen kağıt ve kağıt hamuru sanayisinde yaşanan sıkıntılar ve kullanılan kimyasalların çevreye verdiği zarardan dolayı enzimlerin kullanımının tercih edilmesi her geçen gün artmaktadır.

Bu çalışmada *Geo7₁* endoksilanaz enzimi kullanılarak Kızılçam ve Okaliptus hamurlarına yapılan TCF ağartmasının ilk basamağı olarak kullanılmıştır. *Geo7₁* endoksilanaz enzimin hem optimum pH ve sıcaklık kararlılığının yüksek olması hem de yüksek verimde üretilebilir olması kağıt endüstrisinde lignin yok etme çalışmalarında tercih edilen bir durumdur. Yapılan çalışmada, lignin miktarı yüksek ve ağartması zor olan Kızılçam kraft hamuru ve geniş yapraklı ağaçtan üretilen Okaliptus kraft hamuru üzerinde *Geo7₁* endoksilanaz enzimin etkinliği yüksek derecede belirlendi. *Geo7₁* endoksilanaz enzimi kraft hamurların kappa numaralarında düşüş yaparken buna oranla parlaklarında artış meydana getirmiştir. Bu bilgiler ışığında *Geo7₁* endoksilanaz enziminin hem kararlı olması hem de ağartma dizininin ilk basamak olarak kullanılmasıyla kappa numarası daha düşük ve daha parlak kağıtlar üretilmesi sağlanması bakımından endüstriyel sanayide önemli bir yere sahip olduğu gösterilmiştir.

Tez kapsamında, *Geo7₁* endoksilanaz enziminin kağıt hamurundan lignin gidermede etkin şekilde rol oynadığı belirlenmiştir. Bu çalışmanın devamında ksilanaz enziminin kağıt hamuru üzerindeki etkinliğinin artırılması için yöntemler geliştirilebilir ve kağıt ve kağıt hamuru sanayisinde yerli kaynaktan üretilen ksilanaz enzimi kullanımı ile dışa bağımlılığı azaltması, maliyeti düşürmesi ve çevreye dost bir yöntem olarak ticari boyuta taşınması hedeflenebilir.

7.KAYNAKLAR

- Abbot, J. ve Hobbs, G.C., 1991. Peroxide Bleaching Under Acidic and Alkaline Conditions: The Role of Transition Metal Ions, 6th Intl. Symp., Wood Pulping Chem. Appita, 579-586.
- Adams, M.W.W., 1993. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100 °C, Annu. Rev. Microbiol, 47, 627-58.
- Abrantes, S., Amaral, E., Costa, A. P., Shatalov, A.A. ve Duarte, A., P., 2007. Hydrogen Peroxide Bleaching of *Arundo donax* L. Kraft-Anthraquinone Pulp-Effect of a Chelating Stage, Industrial Crops and Products, 25, 288–293.
- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry; Production and Applications. Wiley-Vch Verlag GwBH & Co. KgaA, Weinheim, 484, Netherlands.
- Ahlawat, S., Battan, B., Dhiman, S.S., Sharma, J. ve Mandhan, R.P., 2007. Production of thermostable pectinase and xylanase for their potential application in bleaching of kraft pulp. J. Ind. Microbiol. Biotechnol, 34, 763–770.
- Ahlawat, S., Mandhan, R.P., Dhiman, S.S., Kumar, R. ve Sharma, J., 2008. Potential application of alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* SS in pulp and paper industry. Appl. Biochem. Biotechnol, 149, 287–293.
- Altun, H., 2012. Ksilanaz Enzimi xynA-7'nin Enzimatik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Kağıt Hamuru Ağartma Endüstrisi'nde Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Anderson, J.R., 1992. Hydrogen Peroxide Use in Chemical Pulp Bleaching. In Tappi Bleach Plant Operations Short Course Notes, Tappi Press, Atlanta, 123.
- Anderson, J.R. ve Amini, B., 1996. Hydrogen Peroxide Bleaching In: Dence, C.W. and Reeve, D. W. (Eds.), Pulp Bleaching Principles and Practice, Tappi Press, Atlanta, GA, 411.
- Andrews, D.H. ve Singh, R.P., 1979. The Bleaching of Pulp, Tappi Press, Atlanta, 211.
- Anonim-1, Selüloz ve Kağıt Sanayii Vakfı (SKSV), 2009. Türkiye Kağıt-Karton Sanayininin 2008 yılı Yıllık Raporu, İstanbul.
- Angayarkanni ve ark., 2005. Biochemical substitution of fungal xylanases for prebleaching of hardwood kraft pulp. Department of Biotechnology, Bharathiar University, Coimbatore - 641 046, India.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No:46, Ankara.

- Atchinson, J.E., 1993. World Wide Capacities for Non-Wood Plant Fiber Pulping-Increasing Faster than Wood Pulping Capacities, Nonwood Plant Fiber, Progress Report No. 19. TAPPI, 1, 1991.
- Atchinson, J.E., 1997. Data on Non-Wood Plant Fibers, In: Pulp and Paper Manufacture, (Ed. M.J. Kocurek and C.F.B. Stevens), CPPA., Montreal, Canada, 157-169.
- Aygan, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selüloz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Backman, L. ve Gellerstedt, G., 1993. Reactions of Kraft Pulp with Alkaline Hydrogen Peroxide, In: Proceedings of the 7th International Symposium Wood and Pulping Chemistry, 1, 223.
- Bajpai, P., 2005. Environmentally Benign Approaches for Pulp Bleaching, Volume 1, First Edition, Elsevier, Amsterdam, 288.
- Bakır, U., Ögel, Z. ve Ersayın Yaşınok, A., 2007. Toprak İzolatı *Bacillus* sp. M-13 Ksilanaz'ının Saflaştırılması, Karakterize Edilmesi ve Ksilanaz Geninin İzolasyonu, Temel Bilimler Araştırma Grubu, TÜBİTAK.
- Bakır, U., 2005. Microbial Enzymes: Production and Applications, The Haworth Press, New York, 592.
- Barroca, M. J. M. C., Seco, I. M., Fernandes P. M. M., Ferreira, L. M. G. A., and Castro A. A. M., 2001. Reduction of AOX in the Bleach Plant of a Pulp Mill, Environmental Science & Technology, 21, 35, 4390-4393.
- Barnoud, F., J. Combat, J.P. Joseleau, Mora, F. ve Ruel, K. 1986. In Proceeding of 3rd International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Stockholm, Sweden, 70.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. ve Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review, Applied Microbiology and Biotechnology, 56, 326-338.
- Beeman, L.A. ve Reichert, J.S., 1953. The Bleaching of Pulp. In Tappi Press, New York, 210.
- Bernier, R., Desrochers, M., Jurasek, L. ve Paice, M., 1983. Isolation and Characterization of a Xylanase from *Bacillus subtilis*, Applied and Environmental Microbiology, 46, 511-514.
- Biely, P. ve Petrakova, E., 1984. Novel inducers of the xylan-degrading enzyme system of *Cryptococcus albidus*, Journal of Bacteriology, 160, 408-412.

- Bim, M.A. ve Franco, T.T., 2000. Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., 743, 349–356.
- Bissoon, S., Christov, L. Ve Singh, S., 2002. Bleach-enhancing effects of purified xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp. Pro. Biochem., 38,571,577.
- Burg, B.V.D., 2003. Extremophiles as a Source for Novel Enzymes, Current Opinion in Microbiology, 6, 213-218.
- Cardona-Barrau, D., Lachenal, D. ve Chirat, C., 2001. Affinity of Metal Ions for Kraft Pulps Studied by ESR. Inhibition of Their Catalytic Action in Oxygen bleaching, Journal Wood Chemical Technology, 21, 3, 247–261.
- Cardona-Barrau, D., Mat'eo, C., Lachenal, D. ve Chirat, C., 2003. Application of ESR Spectroscopy in Bleaching Studies, Holzforschung, 57, 2, 171–180.
- Casey, J. P., 1960. Selüloz ve Kağıt Kimyası ve Kimyasal Teknolojisi, Selüloz Basımevi, Birinci Cilt, İzmit.
- Casey, J.P., 1980. Pulp and Paper,1, Interscience Publishers inc, New York.
- Chauhan, S., Choudhur, B., Singh, S.N. ve Ghosh, P., 2005. Application of xylanaseenzyme of *Bacillus coagulans* as a prebleaching agent on non-woody pulps. Kumarappa National Hand Made Paper Institute, Sanganer, Jaipur 303902, India.
- Chen, X., Whitmire, D. ve Bowen, J. P., 1996. Xylanase Homology Modeling Using the Inverse Protein Folding Approach. Cambridge Uni. Press, USA.
- Choudhury, B., Chauhan, S., Singh, S.N. ve Ghosh, P., 2006. Production of Xylanase of *Bacillus coagulans* and its bleaching potential. World J. Microbiol. Biotechnol. 22, 283–288.
- Colodette, J.L., Rothenberg, S. ve Dence, C.W., 1989. Factors Affecting Hydrogen Peroxide Stability in the Brightening of Mechanical and Chemi-Mechanical Pulps, Part III: Hydrogen Peroxide Stability in the Presence of Magnesium and Combinations of Stabilizers, The Journal of Pulp and Paper Science, 15, 2, 45-51.
- Collins, T., Gerday, C. ve Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, FEMS Microbiology Review, 29, 3-23.
- Cowan, W.O., 1996. Animal Feed. Industrial Enzymology, McMillan Press, In Godfrey T. ve West S, Editors, London, 69.
- Canakci, S., Inan, K., Kacagan, M. ve Belduz, A.O., 2007. Evaluation of arabinofuranosidase and xylanase activities of *Geobacillus* spp. isolated from some hot springs in Turkey. J Microbiol Biotechnol 17:1262–1270.

- Canakci, S., Cevher, Z., Inan, K., Tokgoz, M., Bahar, F., Kacagan, M., Sal, F.A. ve Belduz, A.O., 2012. Cloning, purification and characterization of an alkali-stable endoxylanase from thermophilic *Geobacillus* sp. 71. World J. Microbiol. Biotechnol. 28, 1981–1988.
- Cömlekcioglu, U., Tutus, A., Cicekler, M., Gunes, M. ve Aygan, A., 2014. Application of recombinant xylanase from *Orpinomyces* sp. in elemental chlorine-free bleaching of kraft pulps. Rom. Biotechnol. Lett. 19, 8941–8950.
- Dahl, O., 1999. Evaporation of Acidic Effluent from Kraft Pulp Bleaching Reuse of the Concentrate and Further Processing of the Concentrate, Acedemic Dissertation, Faculty of Technology, Oulu.
- Danson, M.J. ve Hough, D.W., 1998. Structure, function and stability of enzymes from the Archaea, Trends in Microbiology, 6, 307-314.
- De la Rosa, A., Ferr´us, R., Colom, J.F. ve Vidal, T., 2002. Effect of Metal Ions on TCF Bleaching of Kenaf Chemical Pulp, In: Proceedings of the Seventh European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, Turku, Finland, 363–366.
- Dence, C.W. ve Reeve, D.W., 1996. Pulp Bleaching-Principles and Practicles, Tappi Press, Atlanta G.A, USA.
- Deniz, İ., Yaylı, N., Kırcı, H., Tutuş, A., Polat, T., Altun, L., Kolaylı, H. ve Şahin, H.İ., 2009. Şanlıurfa Bölgesindeki Ekin Saplarının Kağıt Özelliklerine Yetiştirme Ortamının Etkisi, TOVAG 1050188, Trabzon.
- Deniz, İ., 2011. Odun Kimyası Ders Notları, KTÜ, Orman Fak., Trabzon.
- Damiano, V.B., Bocchini, D. a., Gomes, E. ve Da Silva, R., 2003. Application of crude xylanase from *Bacillus licheniformis* 77-2 to the bleaching of eucalyptus Kraft pulp. World J. Microbiol. Biotechnol., 19, 139–144.
- Duarte, A.P. ve Lachenal, D., 2002. Hydrogen Peroxide Production During Oxygen Bleaching of Eucalyptus globulus Kraft Pulp-origin of Cellulose Degradation, Paperi ja Puu-Paper and Timber, 84, 4, 275–277.
- Duran, O., 1997. AB ile Gümrük Birliği İçinde Baskı Sektörü ve Kağıt Sanayi ile İlişkilerindeki Değişmeler, SEKA Kağıtçılık Dergisi 59, 12-15 İstanbul.
- EPA (United States Environmental protection Agency), 1993. Pollution Prevention Technologies for the Bleached Kraft Segment of the US Pulp and Paper Industry, EPN600/R-93/110, Washington.
- Eriksson, K.E.L., 1990. Blanchette, R.A. ve Ander, P., Microbiol and enzymatic degradation of wood and wood components, Verlag, NY.
- Eroğlu, H., 1980a, O₂-NaOH Yöntemiyle Buğday Saplarından Kağıt Hamuru Elde Edilmesi, K.T.Ü. Orman Fakültesi Dergisi, 2, 2, 544-47.

- Eroğlu, H., 1981. Sülfat Yöntemiyle Kağıt Hamuru Elde Edilmesi, K.T.Ü, Orman Fakültesi Dergisi, 65-68.
- Farr, J.P., Smith, W.L. ve Steichen, D.S., 1992. Bleaching Agents (Survey). Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4, Grayson, M. (ed.), Wiley, New York, 271-300.
- Fredette, M.C., 1996. Bleaching Chemicals: Chlorine Dioxide Section 2, Chapter 2 In: B Dence, C.W. & Reeve, D.W. (Eds) Pulp Bleaching: Principles and Practice, Tappi Press, Atlanta, 59-69.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2009. Forest Products Annual Market Review, Chapter 8, ISBN: 978-92-1-117007-8, ISSN: 1020-2269, 2008 Geneva.
- Gamerith, G., and H. Strutzenberg, 1992. In Xylans and Xylanases, (ed: Visser, J. Et al), Elsevier, Amsterdam, 339.
- Gellerstedt, G., 2001. Pulping Chemistry, Wood and Cellulosic Chemistry, Edited by David N.-S. Hon, Nobuo Shiraishi, Second Edition, Marcel Dekker Press, New York.
- Gellerstedt, G., 2007. Chemistry of Bleaching of Chemical Pulp, The Ljungberg Textbook Wood Chemistry and Wood Biotechnology, 3D1058, Stockholm, 2-37.
- Gessesse A (1998) Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* sp. Appl Environ Microbiol 64,3533–3535.
- Gierer, J. 1982. The Chemistry of Delignification, Part II, Holzforschung, 36, 55–64.
- Gierer, J., Jansbo, K., Yang, E., Yoon, B.H. ve Reitberger, T., 1991. On The Participation of Hydroxyl Radicals in Oxygen and Hydrogen Peroxide Bleaching Processes. In: Proceedings Of The Sixth International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Melbourne, Australia, 93–97.
- Gierer, J., 1993. The Reactions of Lignins With Oxygen-Containing Species, In: Proceedings of The Seventh International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, I, Beijing, PR China, 301–307.
- Gilbert, H.J. ve Hazlewood, G.P., 1993. Bacterial cellulases and xylanases, Journal of General Microbiology, 139, 187-194.
- Gomes, J. ve Steiner, W., 2004. Extremophiles and extremozymes, Food Technol. Biotechnol., 42, 4, 223-235.
- Gosalbes, M.J., Perez-Gonzalez, J.A., Gonzalez, R. ve Navorro, A., 1991. Two β -glycanase genes are clustered in *Bacillus polymyxa*: molecular cloning, expression, and sequence analysis of genes encoding a xylanase and an endo- β -(1,3)-(1,4)-glucanase, Journal of Bacteriology, 173, 7705-7710.

- Gullichsen, J. ve Fogelholm, C.J., 1999. Chemical Pulping, Papermaking Science and Technology Series, 6A, Tappi Press, USA.
- Gunata, Z.Y., Brillouet, J.M., Voirin, S., Baumes, R. ve Cordonnier, R., 1990. Purification and some properties of an α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*, Action on grape monoterpenly arabinofuranosyl-glucosides, Journal of Agricultural Food Chemistry, 38, 772-776.
- Gül-Güven, R., 2004. *Alicyclobacillus acidocaldarius* subspecies *ritmannii*'nin β Galaktozidaz Enzimi Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Haki, G., D. ve Rakshit, S., 2003. Developments in industrially Important Thermostable Enzymes: a Review, Bioresource Technology, 89, 17-34.
- Heuts, L. ve Gellerstedt, G., 1998. Oxidation of Guaiacylglycerol- β -guaiacyl Ether with Alkaline Hydrogen Peroxide in the Presence of Kraft Pulp, Nordic Pulp Paper Resource Journal, 13, 107.
- Holladay, P. C. ve Solari, R.J., 1963. The Bleaching of Pulp. In: Rapson, W.H. (Ed), Tappi Press, New York, 180.
- ISO 2470, 1977. International Organization for Standardization, International Standard, Paper and Board Measurement of Diffuse Blue Reflectance Factor (ISO Brightness), Second Edition.
- ISO/DIS 2470, 1997. Paper, Board and Pulps-measurement of Diffuse Blue Reflectance Factor (ISO Brightness).
- İnce, E., 2006. Ksilanaz Üreten Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin İzolasyonları Ve Enzimlerinin Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Jaenicke, R. ve Böhm, G., 1998. The stability of proteins in extreme environments, Current Opinion in Structural Biology, 8, 738-748.
- Jeyasingam, J. T., 1987b. Industrial Experience in the Semi-chemical Pulping of Straw, Non-wood Plant Fiber Pulping, Prog Rept. No. 17, TAPPI Press, Atlanta, 127.
- Johansson, E. ve Ljunggren, S., 1991. The Reactivity of Lignin Model Compounds and The Influence of Metal Ions During Bleaching with Oxygen and Hydrogen Peroxide, In: Proceedings of the Seventh International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Beijing, PR China, 180-187.
- Joselleau, J.P., Comtat, J. ve Ruel, K., 1992. Chemical structure of xylans and their and their interaction in the plant cell walls. In: Xylans and Xylanases (Visser, J., Beldman, G., Kuster Van Someren, M.A., Voragen, A.G.J. editor), Elsevier, Amsterdam, 1-15.

- Kaur, A., Mahajan, R., Singh, A., Garg, G. ve Sharma, J., 2010. Application of cellulase-free xylano-pectinolytic enzymes from the same bacterial isolate in biobleaching of kraft pulp. Bioresource Technology. 101, 9150–9155.
- Kappel, J., Grengg, M. ve Bräuer, P., 1994. High Consistency Bleaching Technology for TCF Pulps, Pulp Paper Canada, 95, 1, 1-6.
- Karademir, A., Akgül, M. ve Tutuş, A., 2002. Kağıt endüstrisinde enzim kullanımına genel bir bakış. K.S.Ü. Fen ve Mühendislik Dergisi, 5,1.
- Khasin, A., Alchanati, I. ve Shoham, Y., 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. Applied and Environmental Microbiology 59,6, 1725–1730.
- Kırcı, H. 2000. Kağıt Hamuru Endüstrisi, Ders Notları, K.T.Ü., 63, 274.
- Kırcı, H., 2006. Kağıt Hamuru Endüstrisi Ders Notları, KTU. Orman Fakültesi Yayınları, Yayın No: 86, Trabzon.
- Kiviaho, I., 1995. Optimizing Oxygen Delignification, Proceeding International Non-Chlorine Bleaching Conference, Amelia Island, FL, Paper 2-2.
- Kulkarni, N. ve Rao, M., 1996. Application of xylanase from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59 in biobleaching of bagasse pulp. J. Biotechnol. 51, 167–173.
- Kulkarni, N., Shendye, A. ve Rao, M., 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases, FEMS Microbiology Reviews, 23, 411-456.
- Kurtulmuş, M., 2010. Lignoselülozik Materyallerden Termokatalitik İşleme Suda Çözündürülen Polisakkaritlerin Moleküler Yapılarının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Kutney, G.W. ve Evans, T.D., 1985. Peroxide Bleaching of Mechanical Pulps; Part 1. Alkali Darkening–the Effect of Caustic Soda, Svensk Papperstidn, 88, 78-82.
- Kalyoncu, E. E., 2004 Endüstriyel Kraft Hamurunun Ağartılmasında Yeni Yaklaşımlar, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kalyoncu, E. E., 2011. Buğday Saplarından (*Triticum aestivum*) Çeşitli Yöntemlerle Elde Edilen Hamurların Ağartılma Karakteristiklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kim, D. H., and Paik, K. H., 2000. Effect of Xylanase Pre-and Post-Treatment on oxygen Bleaching of Oak Kraft Pulp. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 6,3, 194-200.
- La Grange, D.C., Pretorius, I.S. ve van Zyl, W. H., 1996. Cloning of the *Bacillus pumilus* xylanase gene (*xynB*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*, Applied Microbiology and Biotechnology, 47, 262-266.

- Lachenal, D. ve Muguet, M., 1992. Degredation of Residual Lignin in Kraft Pulp with Ozone. Application to Bleaching, Nordic Pulp and Paper Research Journal, 1, 25-29.
- Lachenal, D., Wable, F., Damiens, P. ve Ledon, H., 1992b. The Potential of H₂O₂ as Delignifying and Bleaching Agent. Application to New Bleaching Sequences. In Pan Pacific Pulp and Paper Technology Conference Proceedings, Tokyo, 33.
- Lachenal, D., 1996. Hydrogen Peroxide as Delignifying Agent. In: Dence, C.W. and Reeve, D.W. (Eds.), Pulp Bleaching-Principles and Practice, Tappi Press, Atlanta, GA, 347.
- Lapierre, L., Berry, R. ve Bouchard, J., 2003. The Effect of Magnesium Ions and Chelants on Peroxide Bleaching, Holzforschung, 57,6, 627–633.
- Leithe-Eriksen, R., 2001. Pulp Bleaching Around The Baltic Sea, Progress Report For Greenpace International, April, Gothenburg Sweden, 24.
- Mariani, S., Regla, H., Delgado, E., Rivera, J. ve Andrade, A., 1999. Effect of Metallic Ions on The Peroxide Bleaching of Sugar Cane Bagasse Pulp, In: Proceedings of the 10th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, vol. III, Yokohama, Japan, 316–319.
- Makkonen, H.P. ve Nakas, J.P., 2005. Use of xylanase and arabinofuranosidase for arabinose removal from unbleached kraft pulp, Biotechnology Letters, 27, 1675-1679.
- M.Banat, I., Marchant, R. ve J.Rahman, T., 2004. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54, 2197-2201.
- McDonough, T., 1992. Bleaching Agents (Pulp and Paper) In: Volume 4. Grayson, M. (Ed). Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 4th Edition. Publ. John Wiley & Sons, New York, 301-311.
- McDonough, T.J., 1996. The Technology of Pulp Bleaching Chapter 1: Oxygen Delignification, in Pulp Bleaching Principles and Practice, Ed. By. Dence, C. W., ve Reeve, D. W., Tappi Press, Atlanta, 215-239.
- McMullan, G., Christie, J.M., Rahman T.J., Banat, I.M., Ternan, N.G. ve Marchant, R., 2004. Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*, Biochemical Society Transactions, 32, 214-217.
- Miller, G.L., 1951. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Analytical Chemistry, 426-428.
- Mutlu, S.F., 1990 . Ayçiçeği Bitkisinin Sap ve Tohum Kabuklarının Enzimatik Yöntemlerle Şekere Dönüşümü, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara, 1-30.

- Nagar, S., Jain, R.K., Thakur, V.V., Gupta, V.K., 2013. Biobleaching application of cellulase poor and alkali stable xylanase from *Bacillus pumilus* SV-85S. 3 Biotech 277–285.
- Nazina, T. N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S. ve Ivanov, M.V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp.nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. Thermodenitrificans*, International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 433-446.
- Nelson, P. J., Chin, C. W. J., Grover, S.G. ve Ryyänen, H., 1995. Elemental Chlorine-Free (ECF) and Totally Chlorine-Free (TCF) Bleaching of Eucalyptus Kraft Pulps, 49th Appita Annual General Conference Proceedings, 179-186.
- Nelson, P.J., 1998. Elemental Chlorine Free (ECF) and Totally Chlorine Free (TCF) Bleaching of Pulps, in Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry by Young, R.A. ve Akthar, M., John Wiley & Sons. Inc., USA.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M. ve Antranikian, G., 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application, Applied Microbiology and Biotechnology, 51, 711-729.
- Okan, O.T., 2010. Kraft Yöntemiyle Üretilen Bambu (*Phyllostachys bambusoides*) ve Melez Kavak (*Populus x euramericana* (Dode) Guinier) Kağıt Hamurlarının Ağartılması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Orpin, C.G. ve Letcher, A.J., 1979. Utilization of cellulose, starch, xylan and other hemicelluloses for growth by the rumen phycomycete *Neocallinastix frontalis*, Current Microbiology, 3, 121-124.
- Ratanachomsri, U., Sriprang, R., Sornlek, W., Buaban, B., Champreda, V., Tanapongpipat S., ve Eurwilaichitr, L., 2006. Thermostable Xylanase from *Marasmius* sp.: Purification and Characterization. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 39,1, 105-110.
- Persley, J.R. ve Hill, R.T., 1996. Peroxide Bleaching of (Chemi)Mechanical Pulps. In: Pulp Bleaching Principles and Practice. TAPPI Press. Atlanta, 457-489.
- Pham, P.L., Taillandier, P., Delmas, M. ve Strehaiano, P., 1998. Production of xylanases by *Bacillus polymyxa* using lignocellulosic wastes, Industrial Crops and Products, 7, 195-203.

- Pikka, O., Vessala, R., Vilpponen, A., Dahllof, H., Germgard, U., Norden, S., Bokstrom, M., Steffes, F. ve Gullichsen, J., 2000. Bleaching Applications, In: Gullichsen, J. and Fogelholm, C.-J. (Eds.), *Chemical Pulping-Papermaking Science and Technology*, Fapet Oy, Helsinki, Finland, Book 6A, A 616.
- Rydholm, S.A., 1965. *Pulping Processes*, Interscience Publishers, U.S.A., 839-1023.
- Paice, M.G., Bourbonnais, R., Reid, I.D., Archibald, F.S. ve Jurasek, L., 1995. Oxidative bleaching enzymes - a review. *J. Pulp Pap. Sci.* 21, J 280–J 284.
- Puls, J. ve Schuseil, J., 1993. *Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis*, Portland Press, In: Coughlan, M.P., Hazlewood, G.P., Editors, London, 4-5 p.
- Polizeli, M.L.; Rizzatti, A.C.; Monti, R.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. and Amorim, D.S. (2005). Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67,5,577-591.
- Rahman, A.K.M.S., Kawamura, S., Hatus, M., Hoq, M. ve Takamizawa, K., 2001. Physicochemical properties of a novel alpha-L-arabinofuranosidase from *Rhizomucor pusillus* HHT-1, *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 767-772.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. ve Deshpande, W., 1998. Molecular and Biotechnological aspect of Microbial proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597-635.
- Remond, C., Plantier-Royon, R., Aurby, N., Maes, E., Bliard, C. ve O'Donohue, M.J., 2004. Synthesis of pentose containing disaccharides using a thermostable α -L-arabinofuranosidase, *Carbohydrate Research*, 339, 2019-2025.
- Reeve, D. W., 1996. *Introduction to The Principles and Practise of Pulp Bleaching*, In *Pulp Bleaching Principles and Practice* Ed. By Dence, C. W., Reeve, D.W., Tappi Press, Atlanta, USA.
- Renders, A., 1995. *Recycled Fibre Bleaching*. In: *Technology of Paper Recycling*, edit by.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. ve Vidal, T., 2000. Effects of xylanase treatment on fibre morphology in totally chlorine free bleaching (TCF) of Eucalyptus pulp. *Process Biochem.* 36, 45–50.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F.ve Vidal, T., 2003. TCF bleaching of wheat straw pulp using ozone and xylanase. Part A: Paper quality assessment. *Bioresource Technology*. 87, 305–314.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F. ve Vidal, T., 2005. The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps. *Bioresource Technology*, 96, 21–30.

- Sabato, D., Nucci, R., Rossi, M., Gorczynski, I., Gorczynski, Z. ve Lakowicz, J., 1999. The beta-glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100 °C, Biophysical Chemistry, 81, 23-31.
- Saleem, M., Tabassum, M.R., Yasmin, R. ve Imran, M., 2009. Potential of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. XTR-10 in biobleaching of wood kraft pulp. Int. Biodeterior. Biodegrad. 63, 1119–1124.
- Saleem, M., Aslam, F., Akhtar, M.S., Tariq, M. ve Rajoka, M.I., 2012. Characterization of a thermostable and alkaline xylanase from *Bacillus* sp. and its bleaching impact on wheat straw pulp. World J. Microbiol. Biotechnol. 28, 513–522.
- Saltık, H., 2014. Fungal Ksilanaz Enziminin *E. coli*'de Rekombinant Olarak Üretilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Samain, E., Debeire, P. ve Touzel, J. P. (1997). High level production of a cellulase-free xylanase in glucose-limited fed batch cultures of a thermophilic *Bacillus* strain. J Biotechnol, 58,71-78.
- Sandırım, V.C., Rizzatti, A.C.S., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Milagres, A.M.F. ve Polizeli, M.L.T.M., 2005. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. Process Biochem. 40: 1823-1828.
- Seyis, I., 1997. Fungal Kaynaklardan Ksilanaz Eldesi, Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sixta, H., 2006. Handbook of Pulp, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim, I, 465-482.
- Subramaniyan, S. ve Prema, P., 2000. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms, FEMS Microbiology Letters, 183, 1-7.
- Subramaniyan, S. ve Prema, P., 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. Critical Reviews in Biotechnology, 22(1), 33-64.
- Suchy, M. ve Argyropoulos, D.S., 2002. Catalysis and Activation of Oxygen and Peroxide Delignification of Chemical Pulps, Tappi Journal, 1, 2, 1-18.
- Sunna, A. ve Antranikian G., 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. Crit Rev Biotechnol, 17(1), 39–67.
- Spagna, G., Romagnoli, D., Angela, M., Bianchi, G. ve Pifferi, P.G., 1998. Simple method for purifying glycosidases: α -L-arabinofuranosidase and β -D-glucopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of wine. Part 1, Enzyme and Microbial Technology, 22, 298-304.

- Şahin H.A., 2006. Bambu (*Phyllostachys bambusoides*)’ dan Sülfat Yöntemi ile Kağıt Hamuru Üretim Koşullarının Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- TAPPI Standarts, 1992, Official Test Methods Association of The Pulp and Paper Industry, U.S.A.
- Thomson, J.A., 1993. Molecular Biology of xylan degradation, FEMS Microbiology Reviews, 10, 65-82.
- Troughton, N. A. ve Sarot, P., 1992. The Efficient Use of Hydrogen Peroxide as a Chemical Pulp Delignification Agent: The MACROXTM Process, Tappi Pulping Conference Proceedings, 2, 519-535.
- Troughton, N.A., Desprez, F. ve Devenyns, J., 1994. P100 TCF Bleaching of Softwood Kraft Pulps to High Brightness, In: Proceedings Tappi Pulping Conference, 519.
- Tunçel, M., 2014. Yüksek Sıcaklık Ve Ph’da Aktif Yeni Bir Kimerik Ksilanazın Oluşturulması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Tutuş, A., 2000. Buğday (*Triticum aestivum*L.) Saplarından Kağıt Hamuru Üretiminde Kullanılan Soda-Oksijen, Soda-Antrakınon ve Soda Yöntemlerinin Silis Problemi ve Diğer Yönlerden Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Z.K.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Bartın.
- Tutuş, A, Kırıcı, H, Alma, M.H, Deniz, İ ve Karademir, A, 2009. “Buğday Saplarından Kraft-Sodyumborhidrür Yöntemiyle Kağıt Hamuru Üretimi ve Oksijen-Sodyum Perborat Monohidrat ile Ağartılması” Ulusal Bor Araştırmalar Enstitüsü Projesi Sonuç Raporu, Proje No: BOREN-2006-Ç-01, Ankara, 116.
- URL-1, <http://www.turkishpaper.org/index.html>.3 Temmuz 2015
- URL-2, <http://www.ito.org.tr/Dokuman/Sektor/1-47.pdf>. 5 Mayıs 2015.
- Van Lierop, B., Liebergott, N. ve Faubert, M. G., 1993. Using Oxygen and Peroxide to Bleach Kraft Pulps, In: 79th CPPA Annual Meeting Preprints, Tech. Sect., CPPA, Montreal, B81.
- Viikari, L., Ranva, M., Kantelinen, A., Sandquist, J. ve Linko, M., 1986. Bleaching with Enzymes. Third International Conference in biotechnology in pulp and paper industry, June, Stockholm, 67-69.
- Vu, M.H.T., Pakkanen, H., ve Alen, R., 2004. Delignification of Bamboo (*Bambusa Procera Acer*) Part 1. Kraft Pulping and the Subsequent Oxygen Delignification to Pulp with a Low Kappa Number, Industrial Crops and Products, 59-57 s.
- Wang, S., 1995. Delignification and Bleaching with Peracids, Academic Dissertation, North Carolina State University, Raleigh.

- Williams, R.A.D., Simith, K.E., Welch, S.G., Micallef, J. ve Sharp, R.J., 1995. DNA relatednes of *Thermus* suşs, description of *Thermus brockianus* sp. nov., and proposal to reestablish *Thermus thermophilus* (Oshima and Imahori), International Journal of Systematic Bacteriology, 45, 495-499.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., and Saddler, J.N., 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications. Microbiological Reviews, 52, No: 3, 305-317.
- Wosse, C.R., Kandler, O. ve Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, an Eucarya. *Poc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 4576-4579.
- Zhao, J., Li, X. ve Qu, Y., 2006. Application of enzymes in producing bleached pulp from wheat straw. Bioresource Technology, 97, 1470–1476.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Ordu'de doğdu. İlköğretimini Ordu Atatürk İlköğretim Okulunda, lise eğitimini Ordu Fatih Lisesi'nde tamamladı. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde lisans eğitime başladı. 2010 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi, Pedagojik Formasyon ve Sertifika Eğitimi Bölümüne başladı. 2012 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümünden ve Biyoloji Öğretmeliğinden mezun oldu. 2012 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI danışmanlığında yüksek lisans öğrenimine başladı ve halen Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.