

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**LAKKAZIN KIZILÇAM KRAFT VE ATIK KAĞIT HAMURU ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Miray ŞAHİNKAYA

HAZİRAN 2016

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**LAKKAZIN KIZILÇAM KRAFT VE ATIK KAĞIT HAMURU ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Miray ŞAHİNKAYA

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 17 / 05 / 2016

Tezin Savunma Tarihi : 06 / 06 / 2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Trabzon 2016

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Miray ŞAHİNKAYA Tarafından Hazırlanan**

**LAKKAZIN KIZILÇAM KRAFT VE ATIK KAĞIT HAMURU ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 17/05/2016 gün ve 1653 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Üye : Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Üye : Doç. Dr. Cemal SANDALLI



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Lakkazın Kızılçam Kraft ve Atık Kağıt Hamuru Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” konu alan bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi gerekse çalışmaların yürütülmesi ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’ e, laboratuvar çalışmalarım sırasında deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya ve çalışmaların her aşamasında bana yardımcı olan ve yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Dilşat Nigar ÇOLAK’a teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Aynı zamanda çalışmalarımda bana yardımcı olan Arş. Gör. Ayşegül ÖZER’e, Esmâ CEYLAN’a, Arş. Gör. Fulya AY ŞAL’a, Yrd. Doç. Dr. Uğur UZUNER’e, Yasemin KÖKSAL’a, Merve BEKTAŞ’a, tüm laboratuvar çalışanlarına ve beni yalnız bırakmayan ailem ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Miray ŞAHİNKAYA

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “Lakkazın Kızılçam Kraft ve Atık Kağıt Hamuru Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’ün sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 18/05/2016

Miray ŞAHİNKAYA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	X
SUMMARY	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
TABLolar DİZİNİ	XIII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XIV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Lakkazın Genel Özellikleri	4
1.2.1. Çoklu-bakır Oksidazlar	5
1.2.2. Lakkazın Moleküler Yapısı.....	7
1.2.3. Lakkazın Biyokimyasal Özellikleri.....	9
1.2.4. Lakkaz İnhibitörleri.....	10
1.2.5. Lakkaz İndükleyicileri	10
1.2.6. Lakkazın Fonksiyonu	11
1.2.7. Lakkazın Katalitik Mekanizması.....	12
1.3. Lakkaz Mediatör Sistemi.....	14
1.4. Lakkazın Organizmalardaki Yayılışı ve Doğal Görevleri.....	19
1.4.1. Böceklerde Lakkaz	20
1.4.2. Bitkilerde Lakkaz	20
1.4.3. Mantarlarda Lakkaz.....	21
1.4.4. Bakterilerde Lakkaz	22
1.5. Lakkaz Uygulama Alanları	23
1.5.1. Gıda Endüstrisi	23

1.5.2.	Tekstil.....	24
1.5.3.	Nanobiyoteknoloji	24
1.5.4.	Biyoremediasyon.....	25
1.5.5.	Organik Sentez	25
1.5.6.	Farmakolojik Sektör	25
1.5.7.	Kozmetik	26
1.6.	Hamur ve Kağıt Hamuru Endüstrisinde Lakkaz	26
1.7.	Ligninin Yapısı.....	27
1.8.	Ligninazlar	30
1.9.	Kimyasal Kağıt Hamuru Üretimi Yöntemleri	31
1.9.1.	Kraft(Sülfat) Pişirme Yöntemi ve Kraft Kağıt Hamurlarının Özellikleri	32
1.9.2.	Kimyasal Kağıt Hamurlarının Ağartılması	34
1.9.2.1.	Ağartmanın Tanımı ve Amacı.....	34
1.9.2.2.	Ağartma Kademeleri ve Dizinleri	36
1.9.2.3.	Oksijen Delignifikasyonu (O)	38
1.9.2.4..	Şelat Yıkaması (Q)	39
1.9.2.5.	Hidrojen Peroksit Ağartması (P).....	40
1.9.2.6.	Ağartmanın Çevresel Etkileri.....	42
1.10.	Çalışmanın Amacı	42
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	44
2.1.	Kullanılan Kimyasallar.....	44
2.2.	Kullanılan Hücreler	44
2.3.	Moleküler Çalışmalar	45
2.3.1.	Mikroorganizma ve Kültür Koşulları	45
2.3.2.	Lakkaz Aktivitesinin Varlığının Belirlenmesi	45
2.3.3.	Lignin Degradasyon Hızının Belirlenmesi	45
2.3.4.	Genomik DNA İzolasyonu	46
2.3.5.	Primer Dizayını	47

2.3.6.	PCR ile Lakkaz Geninin Eldesi.....	47
2.3.7.	Lakkaz Geninin PMA0911 Shuttle Vektörüne Klonlanması	48
2.4.	Biyokimyasal Çalışmalar	49
2.4.1.	Lakkaz Proteinin Ekstraksiyonu.....	49
2.4.2.	Lakkaz Enzim Aktivitesinin Araştırılması	49
2.4.3.	Protein Konsantrasyon Tayini	49
2.4.4.	Lakkaz Protein Varlığının SDS Jel Elektroforezi ile Teyit Edilmesi.....	50
2.4.5.	Lakkazın Karakterizasyonu	51
2.4.5.1.	Lakkaz Optimum Sıcaklık ve Isıl Stabilitesi ile Optimum pH ve pH Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi	51
2.4.5.2.	Lakkaz Enziminin K_m ve V_{max} Değerlerinin Hesaplanması	51
2.5.	Lakkazın Kağıt Hamuruna Uygulama Çalışmaları	52
2.5.1.	Kağıt Hamuru Kaynağı	52
2.5.2.	Kağıt Hamuru Ağartma Çalışmaları.....	52
2.5.2.1.	Kağıt Hamurunun Rekombinant Bakteri ile Muamele Şartlarının Optimizasyonu.....	52
2.5.2.2.	Kağıt Hamurunun Enzimle Muamele Şartlarının Optimizasyonu	53
2.5.2.3.	Oksijen Delignifikasyonu (O)	54
2.5.2.4.	Şelatlama Çalışması (Q).....	54
2.5.2.5.	Hidrojen Peroksit Ağartması (P)	55
2.5.3.	Kağıt Hamuruna Uygulanan Analiz Yöntemleri.....	56
2.5.3.1.	Kraft Lignin Degradasyon Zonunun Belirlenmesi	56
2.5.3.2.	Kraft Lignin Degradasyon Oranının Belirlenmesi	56
2.5.3.3.	Kağıt Hamurunun Enzimle Muamelesi ve Kappa Numarasının Tayini.....	56
2.5.3.4.	Delignifikasyon Derecesinin Hesaplanması.....	57
2.5.4.	Kağıtlara Uygulanan Fiziksel ve Optik Testler	57
2.5.4.1.	Test Kağıtlarının Hazırlanması	58
2.5.4.2.	Gramaj, Kalınlık, Yoğunluk ve Hacimlilik Tayinleri	58
2.5.4.3.	Patlama Testi	59

2.5.4.4.	Kopma Testi	59
2.5.4.5.	Yırtılma Testi	59
2.5.4.6.	Deneme Kağıtlarına Uygulanan Optik Testler	60
2.6.	SEM Analizi	60
3.	BULGULAR	61
3.1.	Lignin Degrede Eden Bakteriler	61
3.2.	<i>Bacillus megaterium</i> 'a ait Lakkazın Gen Dizininin Belirlenmesi	61
3.3.	Lakkaz Genini PMA0911 Shuttle Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu	62
3.4.	Lakkaz Proteininin SDS Poliakrilamin Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi	63
3.5.	Lakkazın Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	63
3.5.1.	Optimum Sıcaklık	63
3.5.2.	Optimum pH.....	64
3.5.3.	Isıl Kararlılık	65
3.5.4.	pH Kararlılığı	66
3.5.5.	Lakkazın K_m ve V_{max} Değerleri	66
3.6.	Kağıt Hamuru Ağartma Çalışmaları ile İlgili Bulgular.....	67
3.6.1.	Kağıt Hamurunun Rekombinant Bakteri ile Muamele Şartlarının Optimizasyonu	67
3.6.2.	Kağıt Hamurunun Enzim ile Muamele Şartlarının Optimizasyonu	68
3.7.	Kağıt Hamuruna Uygulanan Analizlerin Bulguları.....	69
3.7.1.	Kağıt Hamurunun 'XOQP' Delignifikasyon Sonuçları	69
3.7.2.	Kraf Lignin Degradasyon Yarıçapı	70
3.7.3.	Kraft Lignin Degradasyon Oranı.....	70
3.8	Kağıt Hamuruna Uygulanan Fiziksel Testler	70
3.9.	Kağıt Hamuruna Uygulanan Optik Testler	72
3.10.	SEM Analiz Sonuçları.....	72
4.	TARTIŞMA.....	75
5.	SONUÇLAR	79

6.	ÖNERİLER	81
7.	KAYNAKLAR.....	82
8.	EKLER	98

ÖZGEÇMİŞ



Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

LAKKAZIN KIZILÇAM KRAFT VE ATIK KAĞIT HAMURU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Miray ŞAHİNKAYA

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2016, 97 Sayfa, 1 Ek Sayfa

Lakkaz enzimi, kofaktör olarak oksijen molekülünü kullanarak fenolik bileşikleri oksitleyen ve sonunda serbest radikaller üreten bir enzimdir. Ayrıca katalitik bölgesi, çok iyi korunmuş olan üç tip bakır merkezi içerir. Diğer avantajları arasında her türlü ortamda çok çeşitli organizmalarda bulunabilirliği ve geniş substrat aralığına sahip oluşu yer alır. Bu avantajları sebebiyle lakkaz, endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılmaktadır.

Bu çalışmada bakteriyel kaynaklı bir lakkaz enziminin, kağıt hamurunun ağartılmasındaki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Kağıt hamuru uygulamalarından önce, lakkaz, pMA0911 vektörüne klonlandı, *Bacillus subtilis* WB800 hücresine transforme edildi ve ekspresyonu yapıldı. Optimum sıcaklığı 60°C ve optimum pH'sı 4,5 olarak belirlendi ve enzim Kızılçam ağaçlarından elde edilen Kraft hamuruna ve atık kağıt hamuruna uygulandı. Kızılçam Kraft ve atık kağıt hamuru uygulamaları için, ağartma çalışmaları yapıldı. Degredasyon zonu, degredasyon oranı ve delignifikasyon dereceleri analiz edildi. Atık kağıdının delignifikasyon derecesi %5,15 kızılçam Kraft hamurununki ise %5,5 olarak belirlendi. Enzim uygulanan kağıtlara yırtılma, çekme, patlama indisi, gramaj, kalınlık, yoğunluk, kopma uzunluğu ve hacimlilik gibi fiziksel testler, ve optik testleri yapıldı. Lakkaz enzimi uygulamaları sonrasında, kağıdın parlaklığı Kappa numarası 12,97 olarak %56,86, atık kağıtta ise %56,77 arttırdığı görüldü. Lakkazın lignini zayıflatıcı etkisi, SEM görüntüleriyle de incelendi.

Anahtar Kelimeler: Lakkaz, kraft, atık kağıt, kappa numarası

Master Thesis

SUMMARY

STUDYİNG THE EFFECTS OF LACCASE ON RED PINE KRAFT AND WASTE PAPER PULP

Miray ŞAHİNKAYA

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2016, 97 Pages, 1 Appendix Pages

Laccase is an enzyme that oxidizing phenolic substrates via using oxygen as a cofactor and releasing free radicals. The catalytic region of the enzyme includes three different types of copper molecules that highly conserved. The stability of the laccase is quite high because of the carbohydrates included in the enzyme structure. Some of the most important advantages of the laccase are being existed in many different types of organisms and environments, and wide range of substrate specificity. Because of these advantages, laccase is used in various means of industry.

In this work we aimed to determine the effects of a bacterial laccase on bleaching of paper pulp. Cloning of laccase gene into pMA0911 vector was followed by expression and application on paper bleaching analyses. Optimum temperature and pH of the enzyme was 60°C and 4.5 respectively. Bleaching analyses were carried out with red pine Kraft pulp and waste paper pulp. Degradation zone, degradation rate and delignification rate were analysed. Delignification degree of waste water pulp was 5,1% and pine Kraft pulp was 5,5%. Some physical tests as laceration, soaking, blow out, grammage, thickness, intensity, rupture length and volume and optical tests were performed. The brightness of the paper was increased 56.86% for pine Kraft pulp and 56.77% for waste water pulp based on 12,97 Kappa number. The reducing effects of laccase on lignin was analyzed through SEM.

Key Words: Laccase, kraft, waste paper, Kappa number

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No.</u>
Şekil 1. <i>Bacillus subtilis</i> CotA.....	5
Şekil 2. <i>Trametes troglia</i> Trinükleer Merkez	6
Şekil 3. Çoklu-bakır Oksidaz Reaksiyon Mekanizması	7
Şekil 4. Lakkaz Pymol Görüntüsü.....	7
Şekil 5. Lakkaz Bakır Merkezleri.....	9
Şekil 6. Lakkaz Aktivitesi	14
Şekil 7. ABTS'de Elektron Akışı	15
Şekil 8. Yapay Olarak Üretilen ve Doğal Olarak Kullanılan Lignin Türevli Mediator Örnekleri	17
Şekil 9. Ligninin Monolignol Yapıları	28
Şekil 10. Kraft Hamurunun Kademeli Olarak Ağartılması Sonucunda Renk Değişimi	37
Şekil 11. Deneme Kağıtlarının Fiziksel Testlere Hazırlanmasında Oluşturulan Kesim Şablonu	58
Şekil 12. Lakkaz Geni İçin Elde Edilen DNA Fragmentinin PCR Görüntüsü.....	62
Şekil 13. Lakkaz içeren pMA0911 Vektörünün Kesimi	62
Şekil 14. Lakkaz Proteinin SDS Görüntüsü	63
Şekil 15. <i>Bacillus megaterium</i> 'a Ait Lakkazın Optimum Sıcaklığı.....	64
Şekil 16. <i>Bacillus megaterium</i> 'a Ait Lakkazın Optimum pH'sı.....	64
Şekil 17. Lakkaz Isıl Kararlılığı	65
Şekil 18. Lakkaz pH Kararlılığı.....	66
Şekil 19. <i>Bacillus megaterium</i> Lakkazının Michaelis- Menten Grafiği.....	67
Şekil 20. Kızılcım Kraft ve Atık Kağıt Hamurunun SEM Görüntüleri	73

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No.

Tablo 1.	Farklı Organizmalarda Bulunan Lakkaz/Lakkaz Benzeri Proteinlerin Çeşitli Özellikleri	8
Tablo 2.	Organizmalardaki Lakkaz Özellikleri	23
Tablo 3.	Ağaç Yapılarına Göre Lignin İçeriği	27
Tablo 4.	Lignin Yapısında Bulunan Bağlar	29
Tablo 5.	Ağartmada Kullanılan Kimyasal Maddelerin Sınıflandırılması	36
Tablo 6.	Kimyasal Kağıt Hamurlarının Ağartılmasında Kullanılan Kimyasallar	38
Tablo 7.	Rekombinant Bakreti ile Ağartma Optimizasyon Şartları	53
Tablo 8.	Enzimatik Ağartma Optimizasyon Şartları	53
Tablo 9.	Oksijen Delignifikasyon Şartları	54
Tablo 10.	Şelatlama Şartları	55
Tablo 11.	Hidrojen Peroksit Ağartma Şartları	55
Tablo 12.	Rekombinant Bakteri Ağartma Sonuçları	67
Tablo 13.	Lakkaz Enziminin Optimizasyon Sonuçları	68
Tablo 14.	Kızılçam Kraft Hamuru ve Atık Kağıt Hamuru Ağartma Sonuçları	69
Tablo 15.	Enzim Uygulanan Kızılçam Kraft ve Atık Kağıdı Hamurlarının Fiziksel Özellikleri	71
Tablo 16.	Enzim Uygulanan Kraft Hamurlarının Optik Özellikleri	72

KISALTMALAR VE SİMGELER

ΔE^0 :	Redoks potansiyeli
ABTS :	2,2'-azino-bis(3-etilbenziazoline-6-sülfonik asit)
AR-GE:	Araştırma geliştirme B6S
CDH:	Sellobiyoz dehidrojenaz
COD :	Kimyasal oksijen ihtiyacı
DTPA:	Dietilentriaminpentaasetik asit
E.C :	Enzim komisyonu
EDTA:	Etilen diamin tetraasetik asit
EGTA:	Etilen glikol tetraasetik asit
EPR :	Elektron paramagnetik rezonans
FTIR :	İnfrared spektroskopisi
HAA :	N-hidroksiasetanilit
HBT :	1-hidroksibenzotriazol
ISO:	Uluslararası Standartlık Örgütü
K_{cat} :	Katalitik etkinlik sabiti
kDa :	Kilo Dalton
K_m :	Michaelis-Menten sabiti
Lİ:	Lakkaz iyileştirici
LiP :	Lignin peroksidaz
LB :	Luria Bertani Broth

LBM:	Lignin Temel Besiyeri
LMS :	Lakkaz-medyatör sistemleri
MnP:	Mangan peroksidaz
MSM:	Sipizizen's Minimal Medium
NA:	Nutrient agar
NHP:	N-hidroksiftalimid
SDS- PAGE:	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SPI/II:	Spizizen's salts
PAH :	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PCB :	Poliklorlubifeniller
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEM :	Taramalı elektron mikroskopu
TEMPO:	1,1,6,6-tetrametil-1-piperidiniloksil
T1 :	Tip 1 bakır
T2 :	Tip 2 bakır
T3 :	Tip 3 bakır
V_{max} :	Enzimin bir reaksiyondaki en yüksek hızını ifade eden parametre
VA:	Violurik asit
VP:	Çok yönlü peroksidaz

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Yüzyıllardır insanoğlunun yeryüzündeki yaşama ortamına duyduğu merak, yaşam standartlarını yükseltecek bir etkinliğe bürünmeye başladı. Biyoloji bilimi içinde geçerli olan bu durum, teknolojinin ve endüstrinin gelişmesiyle birlikte, canlılığı incelemekten ziyade, canlılığı kullanma ve modifiye ederek hayata geçirme yolunda Endüstriyel Biyoteknoloji gibi yeni altbilim dallarının açılmasına sebep oldu. Hem bu gelişimin içinde hem de bu gelişmeyle birlikte gelen küresel ısınma ve çevre kirliliği gibi problemlerin önüne geçmek için, Biyoteknoloji alanında elde edilen verilerle, günümüzde yaygın olarak biyodegradasyon çalışmaları yapılmaktadır. Biyodegradasyon, hidrokarbonlar, poliklorlu bifeniller (PCB) ve poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi parçalanması güç organik bileşiklerin bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalar aracılığı ile parçalanmasıdır (URL-1, 2016). Parçalanması güç olan organik bileşikler, tıp, eczacılık, tarım, hayvancılık, çevre, gıda, kağıt, tekstil, deterjan gibi endüstrinin her alanında karşımıza çıkmaktadır. Mikroorganizmaların bu alanlarda kullanımının, onların her yerde buldukları ve biyodegradasyon işlemini kendi yaşamsal faaliyetleri için doğal olarak yaptıkları düşünülürse, hayatımıza bu denli yayılmış olmalarının hiç tesadüf olmadığı görülür. Endüstri’de asıl kullanılan, mikroorganizmaların ürettikleri enzimlerdir. Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Enzimler, bütün canlı sistemlerinde bulunsalar da, endüstriyel çalışmalarda, mikroorganizma kaynaklı enzimler kullanılmaktadır. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987). Ayrıca, bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir (Demain ve Solomon, 1981).

Bugüne kadar 2000’den fazla enzim tanımlanmış ve bunlardan yaklaşık 100 tanesi ticari olarak kullanıma uygun bulunmuştur. Fakat günümüzde bunlardan sadece 18 tanesi endüstriyel amaçla üretilmektedir (Zeman ve McCrea, 1985). Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59’unu proteazlar, %28’ini karbohidrazlar, %3’ünü lipazlar ve %10’unu ise

diğer enzimler oluşturmaktadır. Karbohidrazlar grubuna giren α -amilaz üretimi %13 ile önemli bir yer tutmaktadır (Wiseman, 1987). Bu enzimlerin çoğu ekstrasellüler olarak bulunur ve yüksek moleküler ağırlığa sahip substratlarla görev yaparlar. Ekstrasellüler enzimler, besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanır (Madsen vd., 1973; John ve Sons, 1998). Günümüzde enzimlerin ticari hayattaki yerlerinin artmasının paralelinde, enzimler üzerine yapılan biyoteknolojik araştırmalar da artmıştır.

Günümüzde endüstride ve biyoteknolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan enzimlerden biri de lakkazdır. Lakkazlar, çalışılan en eski ve böylece en çok çalışılan enzimler içinde yer alır (Williamson, 1994). Lakkazlar, mavi bakır içeren proteinlerdendir. Bu enzimlerin %15-30'u karbohidrat yapıdadır, moleküler ağırlığı 60-90 kDa'dur ve 4,0 civarında asidik izoelektrik noktasına sahiptir (Baldran, 2006). Bu özellik onun yüksek stabilitesine katkı sağlar (Dur'an, 2002; Shraddha, 2011).

Oksidasyon reaksiyonları çeşitli sektörlerde gereklidir fakat geleneksel oksidasyon teknolojilerinin çoğu spesifik olmayan ve istenmeyen yan etkilere sahiptir ve çevreye zarar veren kimyasalların kullanımını içerir. Günümüzde enzimatik oksidasyon gibi biyolojik sisteme dayalı yeni oksidasyon sistemleriyle bu problemlerin üstesinden gelinebilmektedir. Enzimatik oksidasyon artık, gıda, tekstil, kağıt ve kağıt hamuru endüstrileri gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimler içinde bir elektron alıcısı olarak oksijen molekülünü kullananlar en ilginç olanlardır. Bu açıdan, bu özelliğiyle lakkazlar, endüstriyel amaçlar için ümit vadeden enzimlerdir (Xu, 2005).

Lakkazlar gıda endüstrisi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, tekstil endüstrisi, sentetik kimya, kozmetik, toprak biyoremediasyonu, çevresel fenolik kirleticilerin ve endokrin bozucuların uzaklaştırılması gibi alanlarda önemli rol oynamaktadır (Couto vd., 2006). Bu enzimler kağıt hamuru delignifikasyonu için, pestisit ve insektisitlerin degradasyonu için, organik sentez, atık detoksifikasyonu, tekstil boya transformasyonu, gıda teknoloji kullanımları, biyosensör ve analitik uygulamalarda kullanılır (Bourbonnais vd., 1995; Bajpai, 1999; Breen ve Singleton, 1999; Faccelo ve Cruz, 2008). Ayrıca lakkazlar, dekolorizasyon, tekstil boyalarının detoksifikasyonu, ksenobiyotik bileşiklerin biyoremediasyonu, atık su ve diğer poliaromatik hidrokarbon (PAH) bileşikleri içeren kirliliklerin arıtımında kullanılır (Karam ve Nicell, 1997; Reyes vd., 1999; Cameron vd., 2000; Abadulla vd., 2000; Pointing ve Vrilmoe, 2000; Mougin vd., 2002; Kandelbauer, 2005).

Lakkaz mediatör sistemin geliştirilmesiyle, lakkazların biyoteknolojik alanlardaki kullanımı daha da genişlemiştir. Lakkazın üretimi, veratril alkol, 2,5-ksilidin, guaisol, gallik asit ve ferulik asit, etanol ve bakır gibi lignin ve lignin türevleriyle de ilişkili olan aromatik ve fenolik bileşiklerin varlığıyla arttırılabilir. Enerji tasarrufu ve biyodegradasyon özelliği ile lakkaz bazlı biyokatalistler yüksek etkinlikte, sürdürülebilir ve çevreye dost endüstri alanlarının gelişimi için uygun özelliktedir (URL-2).

Lakkazlar, son zamanlarda kofaktöre ihtiyaç duymaksızın elektron transfer edebilme özelliği sayesinde nanobiyoteknoloji alanında da kullanılmaya başlanmıştır. Tabaka tabaka, mikromodelleme ve kendiliğinden kurulan tek tabaka teknikleriyle lakkaz enziminin immobilizasyonu sağlanabilir (URL-2).

Lakkazın substrat spesifitesinin geniş oluşu ve kolayca temin edilebilirliği her alanda önemli derecede kullanılabilirliğini sağlamıştır. Lakkazın bu şekilde çok fazla öneme sahip olduğu alanlardan biri de kağıt ve kağıt hamuru endüstrisidir.

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

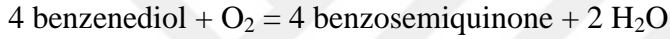
Lakkazın kağıt ve kağıt endüstrisindeki kullanımı selüloz bütünlüğüne zarar vermeyecek şekilde ligninin uzaklaştırılmasına dayalıdır (Kuhad vd, 1997). Lakkazın, endüstrideki kullanımı klorin gibi zararlı kimyasallara olan ihtiyacı ortadan kaldırır (Call vd., 1997). Ayrıca lakkaz kullanımı, enerji tasarrufu sağlaması ve çevreye dost özelliği ile günümüz endüstrisinin göz önünde aldığı değerler içinde yer aldığı için de önem arz etmektedir. Lakkazın, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanımı lakkaz mediatör sistemin (LMS) gelişmesiyle birlikte önem kazanmıştır çünkü doğal olarak fenolik bileşiklere etkisi ile lignin yapısının %10'luk fenolik olan kısmını parçalayabilen lakkaz, lakkaz mediatör sistemi ile ABTS gibi aracı düşük moleküllü bileşikler kullanılarak ligninin C-C ve β -aril bağlarını hedef alan aromatik yapılarını da parçalayıp lignini çeşitli bölgelerden ayrıştırabilmesiyle diğer ligninaz enzimlerden daha önemli bir hale gelmiştir. Lakkaz enziminin kolay temin edilebilirliği, geniş substrat aralığı ve yüksek stabilizasyon özelliği ile ve bilhassa bir elektron alıcısı olarak ihtiyaç duyduğu kofaktörün oksijen

molekölü olmasıyla LMS sayesinde kağıt ve kağıt endüstriyel alanı önde olmak üzere birçok alanda çok değerli bir enzimdir. Ayrıca son zamanlarda araştırılan lakkazın immobilizasyon çalışmaları da lakkazın öneminin daha da artacağına işaretçisidir (Callvd., 1994, 1997; Crestini vd., 1998; Wong vd., 2012).

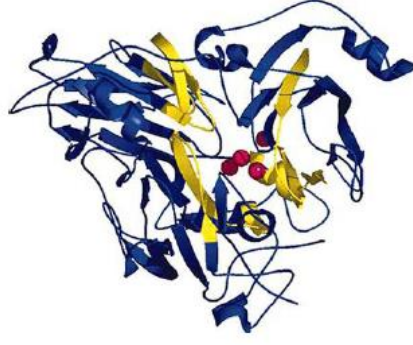
1.2. Lakkaz'ın Genel Özellikleri

Lakkaz (EC.1.10.3.2), oksidoredüktaz grubu bir enzimdir ve çoklu-bakır oksidazlar ailesine ait genellikle fenolik bileşikleri parçalayan bir fenoloksidaz enzimidir (Bourbonnaise vd., 1997; Sirim vd., 2011).

Katalizlediği reaksiyon;



Sistemik adı; benzenediol:oxygen oxidoreductase ve sinonimleri ise; urishiol oxidase; dioxygen oxidase; p-diphenol oxidase' dir. Lakkaz, çeşitli aromatik bileşenleri, fenoller, aminofenoller, polifenoller, o- vep-difenoller, poliaminler, methoksifenoller, arildiaminesler, aromatik aminler, tioller, iyodin ve ferrosiyadin iyonları gibi inorganik bileşenleri okside edebilmektedir (Christopher, 2014). Lakkaz, neredeyse tüm organizmalarda bulunan bir enzimdir. İlk kez 1883'de, Japonya'da adını aldığı bir Japon vernik ağacı (lacquer) olan *Rhus vernicifera*'danekstre edilmiştir (Yoshida, 1883). Lakkaz, önce bitkilerde keşfedilmiş olmasına rağmen en yoğun çalışma mantarlar üzerinde yapılmıştır. Bunun sebebi, bitki özütünün lakkazdan başka geniş bir substrat özgüllüğü gösteren çok sayıda oksidatif enzimi içermesidir (Ranocha vd., 1999). Lakkazın geniş yayılımı ve her yerde bulunabilir olması, yapısının çok iyi incelenmesini sağlamıştır. Ayrıca, geniş substrat aralığı ve yüksek stabilizasyon özelliği sayesinde biyoteknolojinin hemen her alanında literatürler ve endüstride uygulamalar barındırmaktadır. Bu uygulamalar arasında, çevre kirleticilerin detoksifikasyonu, endüstriyel atık, kağıt ve kağıt hamuru ağartılması, biyosensörlerin ve kemoterapik ilaçların yapımı, tekstil, kozmetik ve petrokimyasal endüstri çalışmaları yer almaktadır (Şekil 1).



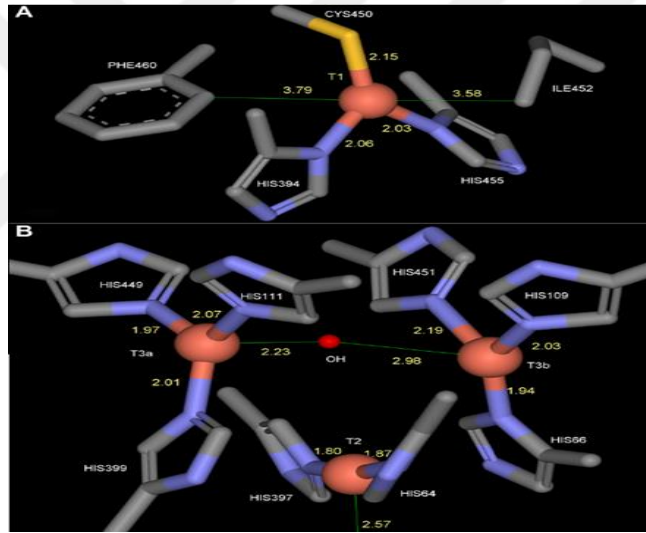
Şekil 1. *Bacillus subtilis* CotA (Enguitavd., 2003)

1.2.1. Çoklu-bakır Oksidazlar

Bakır (biyolojik sistemde kullanılan Cu(I) ve Cu(II) formları), neredeyse tüm organizmalarda kullanılan bir iz elementtir. Bakırın redoks aktif özelliğinden dolayı, elektron transferi, organik yapı ve metal iyonlarının oksidasyonu, süperoksitlerin dismutasyonu, monooksijenasyon, demir ve dioksijenin taşınması, dioksijen, nitrit ve azotlu oksitlerin redüksiyonu gibi biyolojik rolleri vardır (Frausta daSilva, 2001; Sakurai ve Kataoka, 2007). Bakır içeren proteinlerin bakıra bağlı ligandları, ister prokaryotik ister ökaryotik olsun tüm canlılarda üç şekildedir. Bakır içeren proteinlerin bu üç formu spektroskopik ve manyetik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Buna göre; Tip 1, paramanyetik mavi bakır bölgesi; Tip 2, paramanyetik normal bakır bölgesi ve Tip 3, diyamanyetik binükleerbakır bölgesi olarak adlandırılır (Pleiss ve Schmid, 2011). Tip 1 ve Tip 2, elektroparamanyetik rezonans spektroskopisinde (EPR) sinyal verirken, Tip 3'deki iki bakır iyonu arasındaki antiferromanyetik bağdan dolayı EPR'de sinyal vermez. Tip 1, bakıra bağlı sistein sülfüründen dolayı mavi renkli görünür ve spektrofotometrede yaklaşık 610 nm'de pik verir. Plastosiyanın, azurin gibi önemli küçük mavi elektron transfer proteinleri, mavi oksidazlar ve nitrit redüktazlar Tip 1 mavi bakır bölgesini içerir. Tip 2, düşük yoğunluğundan dolayı görünür ışıktaki pik vermez. Cu/Zn süperoksit dismutazlar, dioksijenazlar, monooksijenazlar, nitrit redüktazlar ve mavi olmayan oksidazlar Tip 2 bakır bölgesini içerir. Tip 3, spektrofotometrede 330 nm'de pik verir ve iki bakır iyonu içerdiğinden dolayı binükleerbakır bölgesi olarak adlandırılır. Katekol

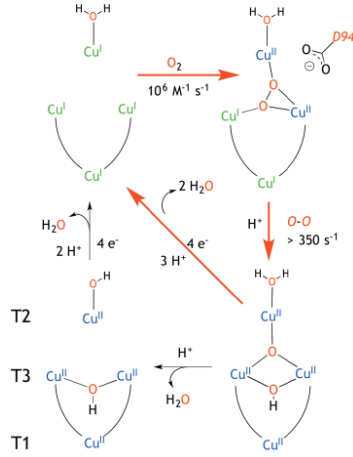
oksidazlar, hemosiyeninler ve tirozinazlar da Tip 3 bakır bölgesi içeren proteinler arasında yer alır (Solomon, 1996; Fernandes, 2011).

Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 domainlerinin üçünü de bulunduran çoklu-bakır oksidazlar, mavi oksidazlar olarak da adlandırılır. Bunlar arasında en iyi bilinen mavi oksidazlar; prokaryotik ve ökaryotik çoğu organizmada bulunan lakkazlar, yüksek yapılı bitkilerde bulunan askorbat oksidazlar ve kuş ve memelilerde bulunan seruloplazminlerdir. Bunların dışında son zamanlarda karakterize edilen fenoksazin sentaz, bilirubin oksidaz, dihidrogeodin oksidaz, sulokrin oksidaz ve FET3 de mavi oksidazlar içerisinde yer alır. Mavi oksidazlar, Tip 1 bulunduran bir mononükleer ve Tip 2 ve Tip 3 bulunduran trinükleer bakır merkezleri ile en az dört bakır içeren bir moleküler düzene bağlı oksidasyon kapasitelerinden dolayı önem taşırlar (Şekil 2) (Solomon, 1996).



Şekil 2. *Trametes trogii* trinükleer merkez. A: Tip 1 bakır bölgesi, B: Tip 2 ve Tip 3 bakır bölgeleri (Matera, 2008)

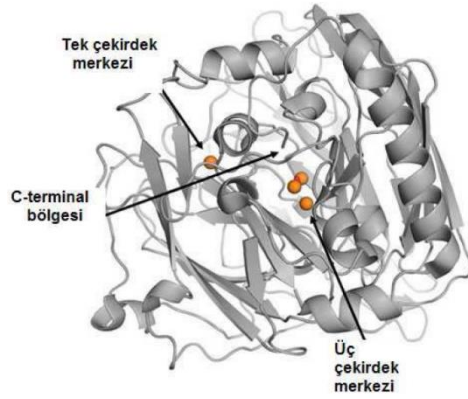
Mavi oksidazlar, bir fenolokdisaz olan lakkaz gibi büyük yapılı bileşikler okside edenler ve metaloksidaz gibi metal iyonlarını okside edenler olarak iki sınıfa ayrılır (Fernandes, 2011). Örnek olarak, seruloplazminler, demiri (FeII) okside ederek Fe(III)'ün transferrine bağlanmasını sağlarken, lakkazlar, dioksijeni suya indirgeyerek fenolik yapılı bileşikler okside ederler (Şekil 3) (Hoegger vd, 2006).



Şekil 3. Çoklu-bakır oksidaz reaksiyon mekanizması (Heppner, 2014)

1.2.2. Lakkazın Moleküler Yapısı

Prokaryotlardan ökaryotlara çok çeşitli organizmalarda bulunan lakkaz çoklu-bakır oksidazlarının en geniş grubunu oluşturur (Hoegger vd, 2006).



Şekil 4. Lakkaz pymol görüntüsü (Claus, 2004)

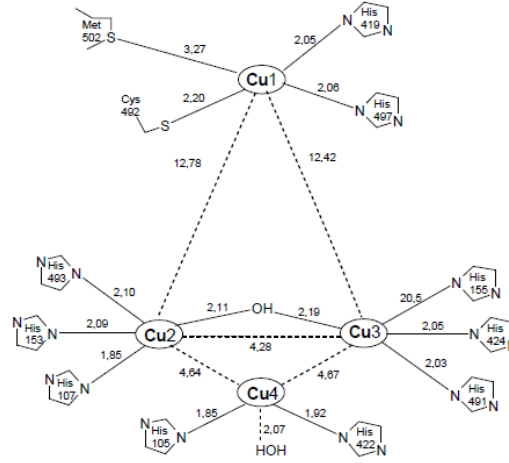
Moleküler yapıları çok iyi çalışılan lakkazların bir monomerdeki ağırlığı yaklaşık 50-130 kDa arasında değişebilir. Lakkaz, ağırlığının %10-45'i (%86-91 olan örnekleri de var) karbohidrat olan bir glikoproteindir (Kunamneni vd, 2008). Karbohidrat yapısı, heksozamin, glikoz, mannoz, galaktoz, fruktoz ve arabinozdan oluşmuştur ve lakkazın stabilitesiyle ilişkilendirilmiştir (Yarapolov vd, 1994). Monomerik, dimerik ya da

tetramerik yapıda bulunabilir. Her monomerde dört bakır içeren aktif holoenzim yapı gösterir (Tablo 1).

Tablo 1. Farklı organizmalarda bulunan lakkaz/lakkaz benzeri proteinlerin çeşitli özellikleri (Tuncer, 2010)

Organizma	Muhtemel fonksiyon	Amino asit uzunluğu (Giriş no)	Moleküler kütle (kDa)	Referans
<i>Aquifex aeolicus</i> (sufl) ^a	Hücre bölünme proteini	527 (NP_213779)	59.3	[109]
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Pigmentasyon, Elektron transportu, Fenolik bileşiklerin oksidasyonu, Sporulasyon, Mn ²⁺ oksidasyonu	–	Multimerik: 48.9, 97.8, 179.3	[62,97,102]
<i>Bacillus</i> sp. (mxG)	Sporulasyon, pigmentasyon	1217 (AAB06489)	Multimerik	[60]
<i>Bacillus sphaericus</i>	Sporulasyon, pigmentasyon	–	–	[110]
<i>Bacillus subtilis</i> (CotA)	Sporların pigmentasyonu, UV ve H ₂ O ₂ dirençliliği	511 (SP P07788)	65	[18,23]
<i>Bacillus halodurans</i> C-125 (Ibh 2082)	Cu ²⁺ dirençliliği	500 (NP_242948)	56	[111]
<i>Escherichia coli</i> (yacK)	Cu ²⁺ akışı, Fenolat-siderofor oksidasyonu, Ferooksidaz aktivitesi	516 (SP P36649)	56.5	[19,112]
<i>Leptothrix discophora</i> SS1	Mn ²⁺ Detoksifikasyonu, Toksik oksijen türlerinin yıkımı	1662 (CAA81037)	110	[113]
<i>Marinomonas mediterranea</i> (PpoA)	Pigmentasyon	675 (AAF75831)	54.3	[103,104]
<i>Oceanobacillus ihayensis</i> (cotA) ^a	Sporulasyon	513 (BAC13302)	59.08	[114]
α -Proteobakteri SD 21	Mn ²⁺ oksidasyonu	–	150 ve 250	[115]
γ -Proteobakteri JB	Toksik bileşiklerin oksidasyonu	–	120	[66]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> GB-1	Mn ²⁺ oksidasyonu, Toksik oksijen türlerinin destruksiyonu	–	180 ve 250	[63]
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	Nukleoside oksidaz aktivitesi	–	–	[107]
<i>Pseudomonas putida</i> GB1 (cumA)	Mn ²⁺ oksidasyonu	460 (AAD24211.1)	50	[116]
<i>Pseudomonas</i> sp (cumA)	Mn ²⁺ oksidasyonu	–	50	[115]
<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> (copA)	Cu ²⁺ dirençliliği	609 (SP P12374)	67.35	[117]
<i>Pseudomonas aerophilum</i> (pae1888) ^a	Bilinmiyor	477 (NP_559612)	52.9	[118]
<i>Streptomyces antibioticus</i> (PHS)	Fenoksazinone sentezi	642 (AAA86668.1)	67.5	[108]
<i>Streptomyces griseus</i> (EpoA)	Pigmentasyon, morfogenez	348 (BAB64332)	114(Homotrimer)	[15,70]
<i>Streptomyces cyaneus</i>	Lignin solübilizasyonu ve mineralizasyonu	–	75	[58]
<i>Streptomyces lavendulae</i> (STSL)	–	631 (AB092576)	–	[24]
<i>Streptomyces coelicolor</i> (SLAC)	–	343(CAB45586)	32	[16,17]
<i>Streptomyces psammoticus</i>	–	–	–	[71]
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	–	462 (BAE16261)	53	[119]
<i>Xanthomonas campestris</i> (copA)	Cu ²⁺ dirençliliği	635 (AAA72013)	69.5	[120]

Bir çoklu-bakır oksidaz özelliği olarak dört bakır elementi, lakkazlarda, iki bakır merkezi oluşturacak şekilde düzenlenmiştir. Bu merkezlerden biri Tip 1 bakır içeren mononükleer merkez ve diğeri Tip 2 ve Tip 3 bakırlarını içeren trinükleer merkezdir. Lakkazlar, farklı alemlerden çok çeşitli organizmalarda bulunduğundan moleküler yapıları ne kadar çeşitlilik gösterse de bakır bağlanma bölgeleri çok iyi derecede korunmuştur. Tip 1 bakır bağlanma bölgesi, iki histidin ve bir sistein içeren trigonal yapı sergiler. Bazen bakterilerde olduğu gibi buna zayıf olarak bağlı bir metiyonin ve funguslarda bir fenilalanin ya da lösin bulundurması ile tetragonal yapı gösterebilir. Tip 2 ve tip 3 bakır bağlanma bölgesi her zaman bir arada bulunarak trinükleer bakır merkezini oluştururlar. Trinükleer bakır merkeziyle ilişkili Tip 2’de iki ve Tip 3’de altı olmak üzere sekiz histidin bulunur (Şekil 5).



Şekil 5. Lakkaz bakır merkezleri (Tuncer, 2010)

1.2.3. Lakkazın Biyokimyasal Özellikleri

Bir enzimin katalitik etkinliği kantitatif olarak Michaelis-Menten sabiti K_M ve katalitik etkinlik sabiti de k_{cat} ile tanımlanır. Bu sabitler çok sayıda lakkaz için ölçülmüştür. Bunlar kaynaklarına bağlı olarak değişiklik gösterir. Lakkazların K_M değerleri indirgenen substrata ve enzimin kaynağına bağlı olarak 2-500 μM aralığında değişir. Düşük K_M değerleri siringaldazin ile ölçülmüştür (Xu vd., 1996). Katalitik etkinlik sabitlerinde (k_{cat}) çok büyük farklılıklar gözlenmektedir. Aynı substrata karşı farklı lakkazların k_{cat} değerleri arasında 3500 kata kadar farklılık ölçülmüştür ancak aynı kaynaklı lakkazların k_{cat} değerleri substrat farklılığına bağlı olarak en fazla 2-10 kat farklılık gösterir çünkü k_{cat} değeri substratın enzime bağlandıktan sonraki elektron transfer reaksiyon hızı olarak tanımlanır (Xu, 2001). Bu veriler, sonuçlar üzerinde büyük etkisi olan değişik pH, iyonik şiddet, sıcaklık koşulları ve farklı protein derişimlerinde ölçümler yapılarak elde edilmiştir. Kinetik sabitlere ilave olarak lakkazların katalitik performansları, farklı pH ve sıcaklık koşullarında aktiviteleri ve kararlılıkları ile tanımlanır. Lakkazların pH aktivite profili bir çan eğrisi verir ve fenolik substrat kullanıldığında optimal değer 4-6 arasında değişir (Palmieri vd., 1993; Eggert vd., 1996; Chefetz vd., 1998; Garzillo vd., 2001). Nötral veya bazik pH'larda lakkaz aktivitesindeki düşüşün nedeni OH⁻ iyonlarının inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. Diğer yandan pH yükselmesi fenolik substratların redoks potansiyelini

düşürür, bu da lakkazı substrat tarafından oksidasyona dirençli kılar. pH çan eğrisi profiliiki karşıt etkinin sonucudur: ΔE^0 [lakkaz-substrat] yükselmesi ve OH⁻ tarafından inhibisyonu (Xu, 1997). ABTS gibi fenolik olmayan substratların oksidasyonu proton değişimi içermez ve bu yüzden tek düzelik göstererek optimal pH değerine 2-3 arasında ulaşır (Hofman ve Esser 1997; Garzillo vd., 2001).

Lakkazların sıcaklık kararlılıkları, kaynak organizmaya bağlı olarak anlamlı ölçüde değişiklik gösterir. Genellikle lakkazlar 30-50 °C'de kararlıdır ve 60 °C üzerinde aktivitelerini hızlı bir şekilde kaybederler (Wood, 1980; Xu vd., 1996; Chefetz vd., 1998; Galhaup vd., 2002; Jung vd., 2002; Palonen vd., 2003). Termo kararlılığa sahip lakkazların çoğu bakterilerden izole edilmiştir. Örneğin; *Streptomyces lavendulae* (Suzuki vd., 2003) lakkazının yarılanma ömrü 70 °C 100dk. iken, *Bacillus subtilis* Cota'nın lakkazı 80 °C'de 112 dk'dır (Martins vd., 2002). Fungal lakkazların yarılanma ömrü genellikle 70 °C'de 60 dk'nın altında ve 80 °C'de 10 dk'nın altındadır (Wood, 1980; Nishizawa vd., 1995; Xu vd., 1996; Chefetz vd., 1998; Schneider vd., 1999; Galhaup vd., 2002; Jung vd., 2002; Palonen vd., 2003).

1.2.4. Lakkaz İnhibitörleri

Lakkazlar çeşitli reaktiflerle çok güçlü bir şekilde inhibe edilebilir. Azid, halid, siyanür, tiyosiyonür, flor ve Tip2-Tip3 bakıra bağlı hidroksit gibi küçük anyonlar; iç elektron transferini bozarak enzim aktivitesinin inhibisyonuna neden olmaktadır (Baldrian, 2006). Diğer inhibitörler; Hg⁺² gibi metal iyonları, yağ asitleri, sülfidril reaktifleri, hidroksiglisin, kojik asit, desferal ve katyonik kuarternler amonyum deterjanları sayılabilir. Bunlar Cu iyonlarına bağlanarak proteinin konformasyonunda değişikliğe yol açmaktadırlar. Bu, şelatlayıcı ajanlara karşı olan duyarlılığın bir sonucudur (Christopher vd, 2014).

1.2.5. Lakkaz İndükleyicileri

Bakır lakkaz gen transkripsiyonun güçlü bir indükleyicisidir. Bu indüklemenin, serbest bakır iyonlarının neden olduğu oksidatif strese karşı bir savunma mekanizması

sonucu gerçekleştiği ifade edilmektedir (Collins ve Dobson, 1997; Palmieri vd., 2000; Soden ve Dobson, 2001; Litvintseva ve Henson, 2002). Bakıra ilave olarak Mg^{+2} , Cd^{+2} veya Hg^{+2} gibi metal iyonlarının da lakkaz gen ekspresyonunu stimule edebildiği gösterilmiştir (Scheel vd., 2000; Galhaup vd., 2002). Yapısal olarak lignin öncüleri benzeri 2,5- ksilidin, sringaldazin, lignoslfanat, gallik asit, veratril alkol ve fenolik asit gibi bazı aromatik bileşiklerin *T. villosa*, *P. sajor-caju* ve *T. versicolor* lakkaz gen ekspresyonunu yükselttiği gösterilmiştir (Yaver ve Golightly, 1996; Collins ve Dobson, 1997; Soden ve Dobson, 2001). Metal iyonları ve fenolik bileşiklerin, genin promotor bölgesindeki spesifik regülatör kısmını etkileyerek, lakkaz genlerinin transkripsiyonunun indklediklerine inanılmaktadır (Christopher vd, 2014).

1.2.6. Lakkazın Fonksiyonu

Substratın tek elektronlu oksidasyonu neticesinde oksijenin dört elektronlu indirgenmesi söz konusudur, dolayısıyla reaksiyon mekanizmasının basit (doğrudan) olması beklenemez. Oluşan ilk ürün kararsızdır ve başka bir enzim tarafından katalizlenen oksidasyon reaksiyonuna katılabileceği gibi diğer taraftan enzimatik olmayan hidrasyon ya da polimerizasyon reaksiyonlarına da girebilir. Doğal bir substrat olan ligninde lakkaz tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlar, $C\alpha$ - oksidasyon, $C\alpha$ - $C\beta$ bölünme ve aril-alkil bölünme reaksiyonlarıdır (Bar, 2001).

Substratların oksidasyonu sonucunda enzimatik olmayan reaksiyonlara giren reaktif radikaller oluşur. Bu reaktif radikaller;

- i. Monomerlerin apraz bağlanması: fenolik bileşiklerin ve anilinlerin lakkaz tarafından enzimatik oksitlenmesi sonucunda birbirine C-C, CO, C-N bağları ile kovalent birleşebilen dimer, oligomer ya da polimerler oluşmaktadır. Lakkazın bu özelliğinden zehirli toprak ya da atık suların arındırılmasında faydalanılmaktadır (Sjoblad ve Bollag, 1981; Filip ve Claus, 1995; Leonowicz vd, 2001).
- ii. Polimerlerin parçalanması: lakkazlar, kompleks doğal polimerleri paralayabilmektedirler. Oluşan reaktif radikaller, kovalent bağların bölünmesini ve böylece monomerlerin açığa çıkmasını sağlamaktadır. Enzimlerin ulaşamayıp direkt temas edemediği polimerler, lakkaz tarafından aktifleştirilen küçük organik

bileşikler ya da metal iyonları tarafından depolimerize olabilir (Liv d, 1999; Claus vd, 2002).

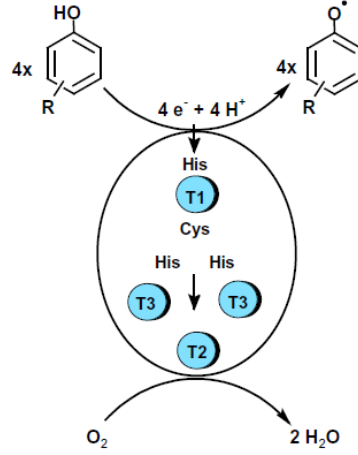
- iii. Aromatiklerde halka açılması reaksiyonlarının lakkaz tarafından katalizlendiği belirtilmiştir (Kawai vd, 1988; Durán ve Esposito, 2000; Claus vd, 2002).

1.2.7. Lakkazın Katalitik Mekanizması

Lakkaz, aslında bir fenoloksidazdır. Oksijen molekülü varlığında, uygun substratlardan fenolik bileşikleri oksitleyerek serbest radikaller üretir (Hoegger vd, 2006). Kararsız radikal, lakkaz tarafından daha ileri oksidasyona uğratılabileceği gibi enzimatik olmayan reaksiyonlar da verebilir (Thurston, 1994). Katalitik mekanizmada ilk adım, mononükleer bölgedeki Tip 1 bakırın indirgeyici bir substrat tarafından elektron alarak indirgenmesidir. Burada substrat molekülü yükseltgenmiş olur. Daha sonra elektronlar trinükleer bölgeye transfer edilir. Trinükleer bölge, dioksijenin bağlandığı ve 4 elektron transferi ile 2 molekül H₂O'ya indirgendiği bölgedir. Lakkazların reaksiyon mekanizmaları reaksiyon çevrimi esnasında bakırların yükseltgenme basamakları EPR, magnetik sirkular dikroizm (MCD) ve X-ışınları spektroskopisi gibi spektroskopik yöntemlerle izlenerek açıklanmaya çalışılmaktadır. Ancak oksijenin trinükleer merkezde indirgenmesi mekanizması, tam olarak açıklanamamıştır. Moleküler oksijen, tamamen indirgenmiş lakkazı muhtemelen peroksit ara ürün üzerinden yükseltirken hemoksi suya indirgenir (Shin vd., 1996; Soloman vd., 1996; Lee vd., 2002) . Lee ve arkadaşlarına göre (2002) peroksi ara ürününün yükseltgenmesi oksijen ile aktive edilmiş lakkaz ana ara ürününün oluşmasına yol açar. Bu ana ara üründe dört Cu atomu da yükseltgenmiş formda (Cu⁺²) ve trinükleer merkezdeki üç Cu atomu hidroksit veya okzo köprüleri ile bağlanmış durumdadırlar. Bu köprüler ana ara ürünün indirgenmesini ve enzimin hızlı bir şekilde yeni bir çevrime girmesine olanak sağlar (Forootanfar vd., 2011).

Bir bileşiğin lakkaz için substrat olma uygunluğu iki faktöre bağlıdır. Birincisi substratın T1 bölgesine geometrik uyumdur. Geometrik uyumu fenol halkasına bağlı molekülerin yapı ve pozisyonuna bağlıdır (Xu, 1996; Bertrand vd., 2002). İkincisi substratın redoks potansiyelinin yeterince düşük olmasına bağlıdır. Çünkü lakkaz kataliz reaksiyonların hızının, enzim ve substratın redoks potansiyelleri arasındaki farka (ΔE^0) bağlı olduğu gösterilmiştir (Xu vd., 2001). Substratın redoks potansiyeli onun kimyasal

yapısını belirler. Çünkü farklı substitüenlerin, elektron çekme ve verme arzularına bağlı olarak, substratın sahip olacağı redoks potansiyeli üzerinde farklı etkileri vardır. Substratın redoks potansiyeli onun kimyasal yapısını belirler. Çünkü farklı substitüenlerin, elektron çekme ve verme arzularına bağlı olarak, substratın sahip olacağı redoks potansiyeli üzerinde farklı etkileri vardır. Örneğin metoksi substitüent elektron verici olduğu için fenoksi halkasında elektron yoğunluğu oluşmasına yol açar ve onu yükseltgenmeye elverişli hale getirir (Xu, 1996; Garzillo vd., 1998). $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+}$ 'in sudaki redoks potansiyeli 0.15 V iken, lakkazların redoks potansiyelleri 0.4-0.8 V arasında değişir. Bunun değerini belirleyen en önemli kriter T1 bölgesinde bulunan Cu'nun çevresidir. T1 bakırının aksiyal ligandının redoks potansiyelinin oluşmasında özel bir önemi olduğu düşünülmektedir. Çünkü diğer çoklu bakır (multicopper) oksidazlar aksiyal pozisyonda Metionin taşıdıklarından redoks potansiyelleri lakkazlardan çok düşüktür (Palmer vd., 1999; Xu vd., 1999). Mutant *Trametes villosa* lakkazında Phe yerine Met oluşturulduğunda redoks potansiyelinin 0.1 V düştüğü saptanmıştır (Xu vd., 1999). Yüksek redoks potansiyeline sahip lakkazlarda (0.8 V) bu pozisyonda Phe artığı bulunurken düşük (0.4 V) olanlarda Leu bulunduğu gösterilmiştir (Eggert vd.,1998). Ancak redoks potansiyeli yüksek lakkazlarda Phe yerine Leu, düşük olanlarda Leu yerine Phe mutantları oluşturulduğunda, salgılanan lakkazların redoks potansiyellerinde bir değişme olmadığı yani E_0 yüksekse yüksek, düşükse düşük kaldığı gözlenmiştir (Xu vd.,1999). Bu sonuçlara dayanarak Piontek ve arkadaşları (2002), redoks potansiyelinin geniş bir etkileşim ağından kaynaklanabileceğini, örneğin T1 bakırının çevresindeki hidrojen bağlarının T1 bakırı ile NHis arasındaki kordinasyon bağının boyunun belirlenmesi gibi, bağlı olabileceğini iddia etmektedirler. Çünkü hidrojen bağları His artığını T1 bakırından uzaklaştırarak gerer. Bunun sonucunda bakır atomunun üzerindeki elektron yoğunluğu düşer (Şekil 6).



Şekil 6. Lakkaz Aktivitesi (Matera, 2008)

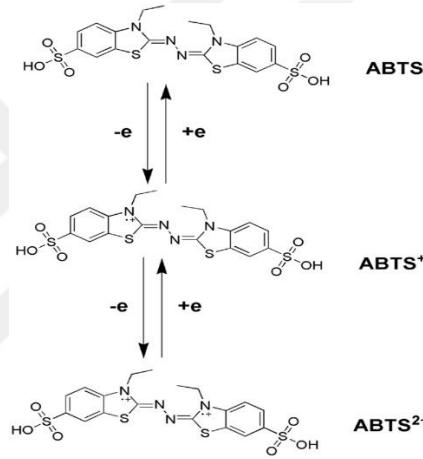
Bazen substratlar enzimin aktif merkezine giremeyecek kadar büyük oldukları için ya da yüksek redoks potansiyellerine sahip oldukları için lakkazlar tarafından yükseltgenemezler. Bu sınırlamayı ortadan kaldırmak çoğu kez ortama bir kimyasal mediatör ilave etmekle mümkündür. Kimyasal mediatörler, lakkazlar için ara substrattırlar ve bir redoks mekiği gibi davranarak bu enzimler tarafından büyük ya da yüksek redoks potansiyeline sahip hedef substratla etkileşebilen radikal formlarına yükseltgenirler.

1.3. Lakkaz Mediatör Sistem (LMS)

İdeal bir lakkaz mediatörü, iyi bir lakkaz substratı özelliğine sahip olmalıdır; yükseltgenmiş ya da indirgenmiş formları kararlı olmalı ve enzimatik reaksiyonu inhibe etmemelidir ve redoks dönüşümü çevrimsel olmalıdır (Johannes ve Majcherczyk, 2000).

Mediatör, enzimatik oksidasyonunda, yüksek redoks potansiyeline sahip kararlı ürünler veren, düşük molekül ağırlıklı lakkaz substratı olarak düşünülebilir. İdeal bir redoks mediatörünün yan ürün oluşturmada ve kendisi bozunmadan çok sayıda katalitik çevrimin gerçekleştirilmesine olanak sağlamalıdır. Bu özellikleri taşıyan sınırlı sayıda bileşik vardır. Bunlardan bazıları; geçiş elementlerinin değişik kompleksleri (potasyum oktasianomolibdat ve oktasianotungustat), demir-II'nin o-fenantrolin ve 4,4'-dimetilpiperidin ile yaptığı kompleksler ile ABTS ve TEMPO (1,1,6,6-tetrametil-1-piperidiniloksil)'dur. Bu bileşikler yeterli büyüklükte redoks potansiyeline sahip olup, bozunmadan çok sayıda katalitik çevrimin gerçekleştirilmesine katkıda bulunabilirler

(Bourbonnais vd., 2000; Fabbrini vd., 2002). Metal kompleksleri organik mediatörlerle kıyaslandıklarında daha pahalı oldukları ve çevre kirliliği açısından yeterli derecede güvenli olmadıkları için tercih edilmezler. Organik bileşikler içerisinde redoks mediatörü tanımına en iyi uyan bileşik ABTS'dir. Lakkaz-ABTS mediatör sisteminin yükseltgeme işlemini iki aşamada gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Bourbonnais vd., 1998; Fabbrini vd., 2002). İlk aşamada $ABTS^+$ katyon radikali oluşur. Bunu katyon radikalinin $ABTS^{+2}$ ye yavaş bir şekilde yükseltgenmesi izler (Şekil 7). Ag/AgCl referans elektroda karşı $ABTS/ABTS^+$ çifti için redoks potansiyeli 0.472 V ve $ABTS^+ /ABTS^{+2}$ için 0.885 V olarak ölçülmüştür.



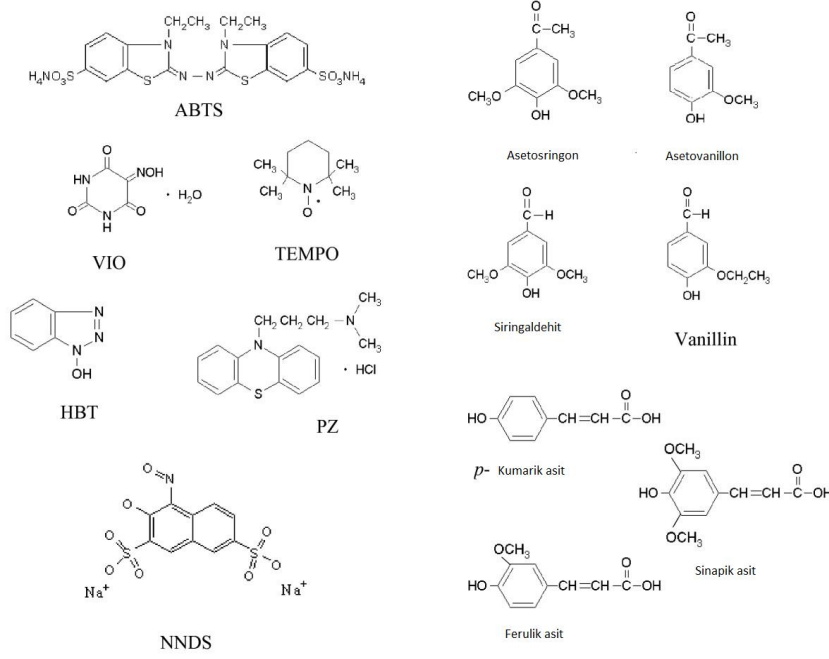
Şekil 7. ABTS'de elektron akışı (Fabbrini vd., 2002)

Yapılan araştırmalarda ligninin fenol gruplarının lakkaz tarafından yükseltgenmesinin ABTS'nin varlığında arttığı gösterilmiştir. Ancak ligninin fenol gruplarının yükseltgenmesi için $ABTS^+$ 'ye gereksinim duyulurken $ABTS^{+2}$ fenolik olmayan grupların yükseltgenmesinde rol alır. Fakat $ABTS^+$ nin indigo gibi organik boyaların yıkımında mediatör olarak işlev görmesi önerilen mekanizmaya kuşku ile yaklaşılmasına yol açmıştır. Çünkü indigo boya fenolik lignin yapısında değildir ve önerilen mekanizmaya göre ona $ABTS^{+2}$ 'nin mediatör olarak etkimesi gerekirdi. Kaldı ki indigo boyanın yıkımında mediatör olarak etkiyen $ABTS^+$ işlem sonunda başlangıç yapısına (ABTS) indirgenir (Solís-Oba vd., 2005).

Şimdiye dek lakkaz redoks mediatörü olarak bütün beklentileri karşılayan bir bileşik bulunamamıştır. Lakkaz redoks mediatörü olarak tanımlanan bileşikler, enzimatik

reaksiyon sırasında düşük kararlılığa sahip ara ürün oluşturlar ve buna bağlı olarak da non-fenolik bileşiklerin katalitik oksidasyonu için az sayıda redoks çevriminin gerçekleştirilmesine olanak sağlarlar. Bu yüzden bu bileşikler için “mediatör” olarak değil lakkazın kinetik etkinliğini “iyileştirici (enhancer)” teriminin kullanılması daha doğru bulunmaktadır. Bu terim gerçek redoks mediatöründen farklı olarak, oksidasyonları daha fazla dönüşüme olanak veren aktif radikal oluşumunu artıran bileşikleri kapsamaktadır (Mediatör, enzimatik oksidasyonla yüksek redoks potansiyeline sahip ürün oluştururken kendisi korunabilen bileşikler kapsar). Son zamanlarda lakkazın katalitik etkinliğini iyileştiren (lakkaz iyileştirici, Lİ) bileşiklerle ve işlem esnasında yer aldığına inanılan mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. Bu bileşiklerin çoğu gerçek redoks mediatörü değildirler. Çünkü bir veya birkaç çevrimden sonra kimyasal transformasyon sonucu elimine olmaktadır. Lİ olarak kullanılan bileşikler genel olarak >N-OH veya >N-O yapısal gruplarını içerirler. 1-hidroksibenzotriazol (HBT), TEMPO, N-hidroksiftalimid (NHP), violurik asit (VA) ve N-hidroksiasetanilit (HAA) bu bileşiklerden bazılarıdır (Xu vd.,2001;Fabbrini vd., 2002;Sheldon ve Arends, 2006). Deneyler, *T. Villosa* lakkazı ile alkil arenlerin oksidasyonunda >N-OH tipi bu dört iyileştirici (HBT, HPI, VA ve HAA) arasında en etkililerinin HBT olduğunu göstermiştir (Cantarella vd.,2003). Değişik >N-OH bileşiğinin katalitik oksidasyon yeterliliği, lakkazın T1 Cu potansiyeli ile >N-OH bileşiğinin redoks potansiyeli arasındaki farka bağlı olan $\log(k_{cat}/K_M)$ ifadesiyle tanımlanmaktadır. Aynı fenolik olmayan substrat ve mediatör/iyileştirici varlığında farklı funguslardan elde edilen lakkazların katalitik etkinliklerinin farklı olduğu gösterilmiştir (Li vd., 1999). TEMPO'nun ABTS, HBT, VA, NHP ve doğal lakkaz mediatörü 3-hidroksiantranilik asitten mediatör/iyileştirici olarak daha etkili bir bileşik olduğu gösterilmiştir (Fabbrini vd., 2002). TEMPO çözeltide kısmen kararlı N-oksil radikali formunda bulunur. Bu da lakkaz ortamda olmadan substratın yükseltgenmek üzere yüksek potansiyele sahip olacak şekilde öncü modifikasyonunu sağlar.

Lakkaz, TEMPO'yu substratla etkileşecek form olan oksoamonyum oluşturacak şekilde yükseltger. Proton ayrılması TEMPO'nun yükseltgenmiş ve indirgenmiş (NOH) formlarını ürün olarak verir. İndirgenmiş TEMPO lakkaz tarafından yeniden oksoamonyum verecek şekilde yükseltgenir. Lakkaz iyileştirici olarak kullanılan diğer organik bileşik sınıflarından nitrozo bileşikleri ile fenotiyoazin türevleri sayılabilir (Şekil 8).



Şekil 8. Yapay Olarak Üretilen (ABTS, HBT, PZ, TEMPO, VIO, NNDS) ve doğal olarak kullanılan lignin türevli (Asetosringon, Asetovanillon, Asetosringaldehit, Vanilin, Farulik asit, Kumarik asit, Sinapik asit) mediatör örnekleri (Christopher, 2014)

Bir fenotiyoazin türevi olan fenotiyoazin-10-propiyonik asit, tekstil endüstrisinde indigo deklorizasyonunda lakkaz mediatörü olarak Novazymes firması (Danimarka) tarafından DeniLite® ticari formülasyonunda kullanılmaktadır (Morozova vd., 2007). Ancak firmanın Türkiye distribütörlüğü ile yapılan görüşmelerde mediatör olarak Metil-Siringeyt kullanıldığı ifade edildi. *T. versicolor* lakkazı için fenoller ve aromatik aminler yüksek potansiyele sahip iyileştiricilerdendir. Fenol, anilin, p-hidroksibenzoat ve p-hidroksibenzil alkol bu enzim için ABTS ve HBT kadar yeterli mediatör etkiye sahiptirler. Metiyonin, sistein ve indirgenmiş glutatyon da *T. versicolor* lakkazı için etkin iyileştiricilerdendirler (Johannes ve Majcherczyk, 2000). Benzoik ve 3-hidroksiantranilik asitler gibi doğal bileşikler de mediatör olarak etkiyebilirler. *Pycnoporus cinnabarinus* beyaz çürükçülünün bir metaboliti olan 3- hidroksiantranilik asit, yine bu fungusun lakkazının, fenolik olmayan lignin yapılarını yükseltgemesinde mediatör olarak etki ettiği gösterilmiştir (De Jong vd., 1994). Genellikle indikatör olarak bilinen fenol kırmızısı ve onun türevlerinin (diklorofenol red gibi) *Polyponus pinsitus* lakkazı için mediatör etkisine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bileşiklerin fenolik olmayan 4-hidroksibenzil alkolün

yükseltgenmesinde mediatör olarak etkilerinin, doğal lakkaz mediatörü 3-hidroksiantranilik asitten on kat daha etkili oldukları gösterilmiştir (D'Acunzo ve Galli, 2003).

Katı besiyerinde doğal lignoselülotik substratlar üzerinde salgılanan lakkazlarla birlikte tanımlanmamış bileşiklerin varlığı da fark edilmiştir (Leontievsky vd., 1999). Homojen, yoğunlaştırılmış çözeltilerinin sarı-kahverengimsi renginden dolayı bu lakkazlar “sarı” olarak adlandırılır. Bu lakkazların ilk olarak *Pinus tigrinus*'un katı faz (buğday samanı) inkübasyonunda çoklu formda oldukları fark edildi. Aynı fungus sıvı besiyerine inkübe edildiğinde “mavi” lakkaz salgıladığı belirtilmektedir. Sarı ve mavi lakkazların aynı molekül ağırlığına, aynı izoelektrik pH değerine, aktif merkezlerinde dört Cu iyonuna ve fenolik substratların oksidasyonunda aynı kinetik değerlere sahip oldukları belirtilmektedir. Aradaki fark sarı lakkazın 600 nm'de mavi lakkazın sahip olduğu absorpsiyon değerine sahip olmamasıdır. Bu lakkazlar herhangi bir redoks iyileştiricisine ya da mediatöre gereksinim duymadan fenolik olmayan model lignin yapılarını (örneğin veratril alkol veya dimerik bileşikler) yükseltgeyebilmektedir. *P. ostreatus*'un katı faz inokülasyonu ile mediatör olmaksızın antreseni, antrakinaona yükseltgeyen “sarılakkaz” salgıladığı bilinmektedir (Pozdnyakova vd., 2006). Bu veriler katı faz inkübasyonu ile salgılanan lakkazların doğal mediatörleri enzimatik olarak yükseltgemesi sonucu oluşan radikallerin, proteinin üçüncül yapısında modifikasyona yol açacak şekilde yapılarında bulunan aminoasitlerle etkileşmiş olabileceği fikrini doğurmuştur. Ancak bu düşüncüyü doğrulayacak deneysel veriler hala elde edilememiştir.

Lakkaz mediatörü seçiminde bir takım kriterlerin gözönüne alınması önerilmektedir (Shleev vd., 2004); 1. Bileşik konjüge çift bağlar, hetero siklik atomlar, -OH ve -NH₂ grupları gibi fonksiyonel gruplardan birkaçını ya da tümünü içermelidir. 2. Substrata bağlı olarak yeterli redoks potansiyeline sahip olması gerekir. 3. İzole edildiği kaynağa bağlı olarak lakkaz enziminin kinetik değerlerinde makul iyileştirmelere yol açmalı ve kinetik değerlerin deneysel ölçümünü engelleyici bir etkiye sahip olmamalıdır. Bu kriterler göz önüne alındığında lakkaz mediatörü potansiyeline sahip yeni bileşiklerin araştırılmasının gerektiği düşünülmelidir. Örneğin 1-fenil-3- metilpirazolon-5; metil ve fenil gibi elektron verici sübtitüe gruplar içeren heterosiklik bir bileşiktir. Çözeltide iki tautomerik formda bulunur.

Biyoteknolojide lakkaz ve LMS kullanılmasına yönelik çok sayıda makale ve patent bulunmaktadır (Duran vd., 2002; Minussi vd., 2002; Baldrian, 2006; Riva, 2006). Örneğin

Danimarka'nın Novozymes şirketi birkaç lakkaz ve LMS formülü geliştirmiştir. DenLite® kumaş ağartmada ve Novozymes 51003® şişe fungusu üretimi modifikasyonunda ve Suberash® kağıt hamurunun delignifikasyonunda, Dünya pazarında önemli bir paya sahiptir. Kağıt hamurunun ağartılması için 40-65 °C sıcaklık ve pH 4,5, basınç 10-14 barr, etki zamanı 1-4 saat, hamur kuru ağırlığının %0.01-2 kadar mediatör ve 20 U/g enzim miktarı reçete olarak verilmektedir (Call ve Mucke, 1997). Bunların dışında insektisit olarak kullanılan fosfoorganik bileşiklerin doğadaki parçalanma hızını artırmada da LMS kullanılmaktadır (JP Appl. no. JR2003128835 2003, Int. Patent no. WO 00078274, Morozova vd., 2000). Moda yaratmak adına denim ürünlerinin eskitilmesinde pomza taşının yıkama işlemlerinde kullanılması yerini büyük ölçüde enzimatik yıkamaya bırakmıştır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan enzim selülaz enzimidir. Bu enzimi kullanmanın iki dezavantajı vardır; birincisi selülaz, boyanmış pamuk (selüloz) liflerini kırarak etki gösterdiğinden giysinin dayanıklılığını azaltmaktadır. İkincisi ve en önemlisi selülaz etkisiyle çözeltiye geçen ürünler hem çözgü, hem de atkı ipliklerini yeniden boyamalarıdır. Bir başka deyişle selülaz ile yıkamada geri boyama gerçekleşmektedir. Bunu önlemek için boyayı suda askıda tutacak lineer etoksillenmiş yağ asitleri ve modifiye poliakrilik asit gibi kimyasallar kullanmayı zorunlu kılmaktadır ki, bu da hem maliyeti artırmakta hem de çevre kirliliğine yol açabilmektedir. 2001 yılından bu yana özellikle çevre kirliliğini önemseyen ve güçlü tekstil endüstrisine sahip ülkelerde, denim kumaşların üzerindeki indigo boyanın ağartılmasında lakkaz enzimi ve kimyasal mediatörler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Lakkaz-Mediatör Sistemleri ile indigo boya parçalanarak renksiz ürüne (İsatin, İndol-2,3-dion) dönüştürüldüğünden geri boyama gibi bir problemle karşılaşılmamaktadır.

1.4. Lakkazların Organizmalardaki Yayılışı ve Doğal Görevleri

Lakkaz, her yerde bulunabilen, prokaryotlardan ökaryotlara çeşitli organizmalarda yayılış gösteren bir enzimdir. Bu yüzden hem yapısal hem de fonksiyonel olarak çok çeşitlilik gösterir. Lakkaz ilk önce bitkilerde keşfedilmiş fakat bitkilerin karmaşık yapısı, bulunduğu bölgedeki lakkaz benzeri oksidazların çeşitliliği dolayısıyla bitkilerde çok iyi aydınlatılamamış, daha sonra funguslarda lignin degradasyonundaki önemli rolüyle keşfedilmiş ve bu alanda birçok çalışma ve makale ile lakkaz yapıları ve mekanizmaları iyi

derecede açıklanabilmiştir. Son yıllarda ise endüstriyel alandaki biyoteknolojik çalışmaların gelişmesiyle birlikte, funguslar kadar etkili olmayan bakteriyel lakkazların etkinliklerinin iyi dereceye getirilme çalışmalarıyla endüstri alanında kullanımı giderek artmış ve buna paralel olarak bakteriyel lakkaz çalışmaları da hızlanmıştır. Ayrıca, lakkazın böceklerde de önemli görevlere sahip olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Fernandes, 2011).

1.4.1. Böceklerde Lakkaz

Lakkaz enzimi *Bombyx*, *Calliphora*, *Diptoptera*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Oryctes*, *Papilio*, *Phormia*, *Rhodnius*, *Sarcophaga*, *Schistocerca* ve *Tenebrio* gibi böcek türlerinde karakterize edilmiştir (İmran vd, 2012). Lakkaz, böceklerin sklerizasyonunda yani dış iskeletlerinin oluşumunda önemli bir görev alır. Dış iskelet, eklem bacaklılarda sadece korunma değil aynı zamanda solunum, hareket ve haberleşmeyle ilişkili bir yapıdır. Bu yapı, yüksek derecede reaktif olan kinonların çapraz bağlanma şekilleriyle oluşur. Kinonlarsa, temel olarak hidroksifeniletanol ve dopamin türevli katekollerin oksitlenmesiyle oluşur. Bu difenol yapılı bileşiklerin oksitlenmesi, lakkazlar ve tirozinazlar tarafından gerçekleştirilir. Böcekler lakkazları üzerinde yapılan çalışmalarda, böceklerin en az iki tip lakkaz geni içerdiği görülmüş ve bu lakkazlardan birinin larvadaki pigmentleşmeyle diğerininse immün sistemiyle ilişkisi olduğu ortaya konmuştur (Fernandes, 2011). Bunun dışında böcek lakkazları, bitkisel besinlerdeki toksik bileşiklerin oksidasyonunda ve demir metabolizmasında da kullanılmaktadır (Hoigger vd, 2006).

1.4.2. Bitkilerde Lakkaz

Bilinen en eski lakkazlar, bitkisel kaynaklıdır ve ilk olarak Japonya'daki vernik ağacı olan *Rhus vernicifera*'dan izole edilmiştir. Lakkaz adını vernik anlamına gelen 'lacquer' ağacından alsa da, bitkisel lakkazlar için kullanılan sinonimi olan; 'urishiol oksidaz'adı da buradan gelir. Lakkaza, urishiol oksidaz denmesinin sebebi, vernik ağacında bir süt salgısı olan urishiolun oksidasyonundan sorumlu olmasıdır. Urishiol, ağaç kabuğu yaralandığında bitkinin kendisini böceklerden, mantarlardan ve fitofajlardan koruması için salgıladığı bitki

özütünün içinde %60-65 oranında bulunan çok zehirli bir toksiktir. Vernik ağacının dışında, bitkilerde lakkazlar, lahana, turp, pancar, elma, kuşkonmaz, patates, armut ağaçlarında ve diğer sebze çeşitlerinde tespit edilmiştir. *Acer pseudoplatanus*'da, *Pinus taeda* ve *Populus americana*'nın ksilem dokusunda, *Aesculus parviflora*'nın yapraklarında ve çayın sürgünlerinde de çeşitli sayılarda lakkaz bulunduğu rapor edilmiştir (Bligny ve Douce, 1983; Gregory ve Bendall, 1966; Ranochavd., 1999; Satovd., 2001). Ayrıca bitkisel lakkazların, daha yüksek yapılı bitki türlerinde lignifikasyonun erken aşamalarında monolignollerin oksidasyonunda görev aldığı da bildirilmiştir (Mayer ve Staples, 2002; URL-2). İlginç bir şekilde, bitkisel lakkazların, mantar kaynaklı lakkazlarla karşılaştırıldığında tamamiyle zıt fonksiyona sahip olduğu görülür; bitkilerde ligninin polimerizasyonunda görev alırken, mantarlarda ligninin biyodegradasyonundan sorumludur(İmran vd, 2012).

1.4.3. Mantarlarda Lakkaz

Lakkazların mantarlardaki keşfi, ilk olarak, 1896'da, Bertrand ve Labordetarafından rapor edilmiştir. Lakkazlarla ilgili günümüze kadar elde edilen bilgilerin çoğu mantarlar üzerinde yapılan çalışmalarla elde edilmiştir. Askomisetler, bazidiyomisetler ve döteromisetler gibi 60'ın üzerinde mantardan lakkaz izole edilmiştir. Askomisetlerden elde edilen lakkazların, oksidasyon mekanizması ile fenoksi radikallerini ve quinonları oluşturan bazidiyomiset ve döteromisetlerden elde edilen lakkazlarla karşılaştırıldığında daha etkili lignin degradasyon kabiliyetleri olduğu gösterilmiştir. İyi bilinen lakkaz üreticileri arasında *Podospora anserina*, *T. versicolor*, *Polyporus ostreatus* (yeni adı, *Trametes cubensis*), *Neurospora crassa*, *A. bisporus*, *Botrytis cinerea*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia radiata*, *Coriolus (Trametes) polyporus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Chaetomium thermophilum* ve *Coprinus cinereus* gibi çok sayıda mantar bulunmaktadır. *Trametes versicolor*'dan izole edilen lakkazların fırıncılıktan biyoremediasyona kadar kullanılan çeşitli uygulama alanları vardır.

Ligninoselülozik materyalin delignifikasyonu, sporulasyon, pigmentleşme, fungal morfogenez, toksik bileşenlere karşı koruma, meyve oluşumu ve bitki patojenisi mantarlarda var olan lakkazların doğal görevleridir. Lakkazlar, hücre içi örneklerinin de varlığıyla birlikte çoğunlukla hücre dışı enzimlerdir. Bitkiye karşı patojenik olan

mantarlarda, lakkazların bitki tarafından üretilen toksik savunma metabolitlerinin detoksifikasyonunu içeren önemli virulans faktörleri vardır. Bundan başka, kestane için patojenik olan küf mantarı *Cryphonectria parasitica* ve insanlar için patojenik olan *Cryptococcus neoformans*'da da patojenite ile ilgili rolleri bulunur. *Aspergillus nidulans* da lakkaz geninin delesyonu sporun yeşil renginin kaybolmasıyla sonuçlanmıştır. *Armillaria* spp. *Lentinus edodes* ve *Volvariella volvacea*'da da lakkazın hücre dışı pigmentlerin oluşumunu katalizleyerek mantar morfoljisinin gelişmesinde rol aldığı rapor edilmiştir. Lakkazlar mantarlarda ayrıca çevresel stresler karşısında üretilen dihidroksinaftalin pigmentinin sentezinde görevlidir. Mantar kaynaklı lakkazlar bitkilerden çok daha yüksek redoks potansiyeline (+800 mV) sahip oldukları için biyoteknoloji alanında kullanımları bulunur. Bu lakkazlar, lignin degradasyonu ve toksik fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasında kullanılırlar (Fernandes, 2011; URL-2).

1.4.4. Bakterilerde Lakkaz

İlk bakteri kaynaklı lakkaz *Azospirillum lipoferum*'da keşfedilmiştir ve *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lavendulae*, *S. cyaneus* ve *Marinomonas mediterranea* gibi bakterilerde karakterize edilmiştir. Bu bakteriler içinde en iyi çalışılan lakkaz *Bacillus subtilis*'in CotA lakkazıdır ve bu lakkazın, endospor örtüsünün H₂O₂ ve UV ışınlarına karşı korunması için melaninle ve morfoloji oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buğday sapından alınan *Streptomyces cyaneus*' un lakkazının da ligninin mineralleşmesi ve çözünmesinde görevli olduğu rapor edilmiştir. Funguslara oranla düşük redoks potansiyeline (0,45-0,54 V) sahip olmalarına rağmen, bakteriyel lakkazlar yüksek sıcaklık (60°C' de 66 saat), pH (7-9) ve tuz konsantrasyonlarında aktif ve stabil kalabildikleri için endüstriyel alanda kullanımları yaygındır (Tablo 2).

Tablo 2. Organizmalardaki lakkaz özellikleri (Christopher, 2014)

Lakkaz	T _{opt} (°C)	pH _{opt}	Mw (kDa)	Glikolizasyon (%)	Kaynak
Bakteriyal					
<i>Bacillus subtilis</i>	37	7.6	57.2	ND	Phelan et al. (2013)
<i>Bacillus licheniformis</i>	40	7.0	64	ND	Salkinoja-Salonen et al. (1999)
<i>Streptomyces griseus</i>	40	6.5	209	ND	Leigh (1997)
Bitkisel					
<i>Agaricus blazei</i>	20	5.5	66	ND	Ullrich et al. (2005)
<i>Basidiomycota</i> sp.	80	4.5	64	6.5	He and Li (2013)
<i>Melanocarpus albomyces</i>	60–70	6.0	80	ND	Berdy (2005)
<i>Trametes hirsuta</i>	45	4.5	70	12	Shleev et al. (2004)
<i>Trametes versicolor</i>	50	3.0	67	10–12	Solomon et al. (1996)
<i>Trichophyton rubrum</i>	20	5.5	65	ND	Yang et al. (2007)
Fungal					
<i>Acer pseudoplatanus</i>	15.5	6.6	97	40–45	Sterjiades et al. (1996)
<i>Chaetomiaceae</i> sp.	60	7.0	77	ND	Jiao et al. (2006)
<i>Rhus vernicifera</i>	25	7.0	110	45	Messerschmidt and Huber (1990)

1.5. Lakkaz Uygulama Alanları

Lakkaz, fenolik ve fenolik olmayan aromatik özellikteki çok sayıda bileşiği okside etme kabiliyetinden dolayı biyoteknolojinin çoğu alanında kullanılmaktadır. Lakkazın temiz endüstriyel etkilerinden dolayı da petrokimyasal, tekstil, kağıt ve kağıt hamuru endüstrilerinde kullanımı yaygındır. Hastalık teşhis ve kemoterapide ilaç üretimi için tıbbi alanda, herbisit, pestisit ve bazı patlayıcıların temizlenmesi için tarım alanlarında ve toksik etkileri ortadan kaldırması amacıyla kozmetik alanında da kullanımı vardır. Diğer yandan lakkazın ksenobiyotik maddeleri ortadan kaldırma ve polimerik ürünler üretme özelliği ile de bioremediasyonda kullanılır. Ayrıca, lakkazın kullanıldığı enzimatik yolla organik bileşenlerin sentezi, biyooksidasyon, biyotransformasyon ve biyosensor çalışmaları da vardır.

1.5.1. Gıda Endüstrisi

Lakkazın gıda endüstrisi alanındaki uygulamaları, molekülleri polimerize etme kabiliyetine dayanır. Lakkazın gıda endüstrisinde kullanımı, ürüne yeni bir özellik kazandırabilir, kalitesini artırabilir ya da maliyetini düşürebilir. Ayrıca lakkazın oksijen temizleyicisi olarak kullanımı ürünün depolama ömrünü uzatabilir. Lakkazlar, gıda endüstrisinde besin ya da içeceklerin görünümünü değiştirmek ya da yoğunlaştırmak, içki

kalitesini ve bitkisel yağ içeren bozulabilir ürünlerin stabilizasyonunu arttırmak amacıyla kullanılır. Lakkazın gıda ürünlerindeki substratları arasında, doymamış yağ asitleri, tiol içeren proteinler, fenoller ve karbohidratlar yer alır. İçki ya da içeceklerin kalitesine etkisi, esmerleşmeden, puslu ve bulanık görüntüden sorumlu fenolik bileşikleri parçalamasıyla sağlanır.

1.5.2. Tekstil

Tekstil sanayi, toplam boyar madde pazarının üçte ikisini oluşturmaktadır. Lakkazlar, tekstil sanayinde tekstil atık sularının renksizleştirilmesinin yanı sıra tekstillerin ağartılmasında, kaynatılmasında, denim yıkamada ve hatta boyar maddelerin sentezinde de kullanılmaktadır (Couto ve Herrera, 2006). Novozyme (Novo Nordisk, Danimarka) 1996'da kot ağartmada lakkaz enziminin endüstriyel uygulamasını başlatmıştır. DeniLite, ilk endüstriyel lakkaz ve araçlar yardımıyla etki gösteren ilk ağartıcı enzimdir. Ayrıca 2001'de Zytex şirketi (Zytex Pvt. Ltd., Hindistan), ticari adı Zylite olan ve indigoyu çok spesifik bir şekilde parçalayabilen lakkaz aracılı sisteme dayanan bir formülasyon geliştirmiştir (Couto ve Herrera, 2006). Lakkazlar, selülozik liflerde bulunan yağlar, mumlar, pektinler, proteinler ve pigmentler gibi doğal renklendirici maddelerin uzaklaştırılması ve bu sayede boyama, baskı ve bitim gibi işlemlere hazırlanması amacıyla kullanılmaktadır. Lakkaz kullanımı, düşük maliyet ve az çamur oluşturmaları nedeniyle giderek önem kazanmaktadır (Bl'aquez,2004; Demiralp; 2015).

1.5.3. Nanobiyoteknoloji

Klinik ve atık suda fenolik bileşiklerin analizlerinde dedektörler olarak kullanılmaya çalışılmaktadır. Lakkaz enzimlerine ilişkin olarak biyosensör duyarlılığı üzerine ise enzim yapıştırılmasının önemli bir etkisi bulunmaktadır. Martele ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada katı bir yüzey üzerine lakkaz enziminin tutuklanarak çok fonksiyonlu bir biyosensör geliştirilebilmesi için mikro-desenlemenin etkili bir metot olduğunu göstermişlerdir. Lakkaz enzimleri; biyo-yakıt hücrelerinin katotlarına yapıştırılarak, örneğin küçük transmitter sistemleri için gerekli olan güç gibi,

güç üretmek amacıyla kullanılabilirler. Biyo-yakıt hücreleri ise yakıt kullanmadan elektrik enerjisi ürettikleri için ve temiz bir enerji kaynağı sağladığı için çevresel açıdan oldukça cazip hale gelmiştir (Fernandes, 2011; Demiralp, 2015).

1.5.4. Biyoremediasyon

Lakkaz enzimlerinin katalitik özellikleri ise PAH'lar ve klorofenoller gibi bileşiklerin parçalanmasında kullanılabilir (Pointing, 2001; Ahn, 2002). PAH kaynağı olarak, fosil yakıtları ve petrolerin de lakkaz enzimleri tarafından parçalandığı belirlenmiştir. Lakkaz enzimleri indirgenmiş TNT metabolitlerini organik toprak matriksine bağlayabilmekte, böylece de savaş amaçlı kullanılan patlayıcı kalıntılarının detoksifikasyonu sağlanmaktadır (Durán vd., 2000).

1.5.5. Organik Sentez

Lakkaz, açık ortamda hidrojen peroksit kullanmadan ılıman (benign) çevresel koşullarda polimer üretimini sağlar. Ayrıca mediatör varlığında veya yokluğunda, radikal akrilamid polimerizasyonunu indüklediği rapor edilmiştir. Lakkaz ek olarak lignin kraft kopolimerlerinin kemoenzimatik sentezi için de kullanılmaktadır. Daha yakın bir tarihte de odunsu bileşiklerin fonksiyonelliği ve çapraz bağlanması için bu enzimin potansiyeli olduğu keşfedilmiştir (Zille, 2005).

1.5.6. Farmakolojik Sektör

Lakkaz tarafından antimikrobiyal, detoksifiye edici ve kişisel bakım maddesi olarak pek çok ürün üretilmiştir. Ayrıca, lakkazın HIV -1 ters transkriptaz aktivitesine sahip olduğu literatürde rapor edilmiştir. Birkaç yıl evvelinde, lakkaz, ilaçlardaki morfin ve kodeini ayırt etmek için bir enzimetik metotta kullanılmıştır (Wang ve Ng, 2004; Harris vd, 2004). Ayrıca lakkaz, vücutta demir dengesini düzenleyen, ferroksidaz aktivitesine sahip bir çoklu bakır serumu olan ceruloplasmine de yardımcı olur (Bauer vd., 1999).

1.5.7. Kozmetik

Lakkaz temelli saç boyaları çok daha az tahriş edicidirler ve normal saç boyası içerisinde oksitleyici ajan olarak bulunan hidrojen peroksit (H_2O_2) yerine lakkaz bulunduğundan, bu tip saç boyalarının kullanımı geleneksel saç boyalarına göre daha kolaydır (Raure vd., 1992; Aaslyng vd., 1996; Lang ve Cotteret, 1999; Xu, 1999)..Kozmetik malezemelerin yanında temizlik ürünlerinde; deodorant, diş macunu, gargara, deterjan, sabun ve çocuk bezlerinde de lakkazlar bulunmaktadır (Golz-Berner vd., 2004).

1.6. Hamur ve Kağıt Hamuru Endüstrisinde Lakkaz

Kağıt endüstrisinde, kağıt hazırlama işlemi sırasında, lignini uzaklaştırmak için geleneksel olarak, klorin ve oksijen bazlı kimyasal oksidantlar kullanılır. Ligninazların kağıt hamurunun ağartılmasında kullanılması, bu pahalı ve zararlı kimyasallara olan ihtiyacı ortadan kaldırır.

Lakkazın kağıt hamuru ağartılmasında kullanımıyla ilgili ilk çalışma 1994'de düşük lignin içeriği ile daha parlak kağıtlar elde etme amacıyla yapılmıştır. Lakkazın klorin yerine kullanımı, selüloz bütünlüğüne zarar vermeyen delignifikasyon stratejileriyle daha hafif ve daha temiz ağartma avantajları sunar. Ancak, ligninin fenolik olmayan yapılarını parçalaması için, mediatör olarak adlandırılan yüksek redoks potansiyeline sahip (>900 mV) düşük moleküler ağırlıklı bileşiklere ihtiyaç vardır. Bu sistemde mediatör lakkaz tarafından okside edilir ve okside edilen mediatör ile lakkazın ulaşamayacağı büyüklükteki ligninin alt birimleri oksidasyona uğratarak parçalanmış olur. Mediatör ihtiyacı, onun geri dönüşümü, maliyeti ve toksik etkileri gibi dezavantajlar oluştursa da, çevresel fayda ve kolayca uygulanabilirliği açısından klorinin yerine kullanımı büyük bir avantaj olarak kabul edilir. Bunların haricinde, lakkaz kullanımı daha az enerji kaybı ile daha yüksek kağıthamuru verimi sunar. Lakkazın substrat aralığı oldukça geniş olduğu için, renk uzaklaştırıcı olarak kağıtların geri dönüşümünde de kullanılabilir (Kunamneni vd, 2008; İmran vd, 2012, URL-2).

Camarero ve arkadaşları (2004) yapmış oldukları çalışmada yüksek-kaliteli keten hamurundan, renk oluşumundan sorumlu olan lignin türevlerinin uzaklaştırılması için

LMS'nin potansiyelini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, yüksek fiyatlı bu keten hamurlarının üretiminde kullanılan klorin-içerikli beyazlatma yerine LMS'nin kullanılabilir olduğunu göstermişlerdir.

Lignin bileşiklerinde reaktif radikaller oluşturma yeteneğine sahip olan lakkazlar, aynı zamanda odun liflerinin maksatlı olarak modifikasyonunda da kullanılabilirler (Chandra vd., 2002; Kenealy vd., 2003). Örneğin, sunta gibi lignoselüloz temelli kompozit materyallerin üretilmesinde odun liflerinin birbirine enzimatik olarak yapışmasını sağlamak amacıyla lakkazlar kullanılabilir. Lakkazlar, sunta gibi odunlu kompozit materyallerin üretimi esnasında odun liflerine bağlı olan ligninin aktive edilmesini sağlayarak liflerin birbirine yapışmasını sağlayacak ve böylece elde edilen suntalar, iyi bir mekanik özellik taşıırken aynı zamanda toksik olan sentetik yapıştırıcıları içermeyeceklerdir (Felby cd., 1997; Huttermann vd., 2001). Diğer bir olasılık ise lif ürünlerinin kimyasal veya fiziksel özelliklerini iyileştirmek amacıyla, lignoselüloz liflerinin lakkaz enzimleri ile fonksiyonlaştırılmasıdır (Lund vd., 2001; Kenealy vd., 2003).

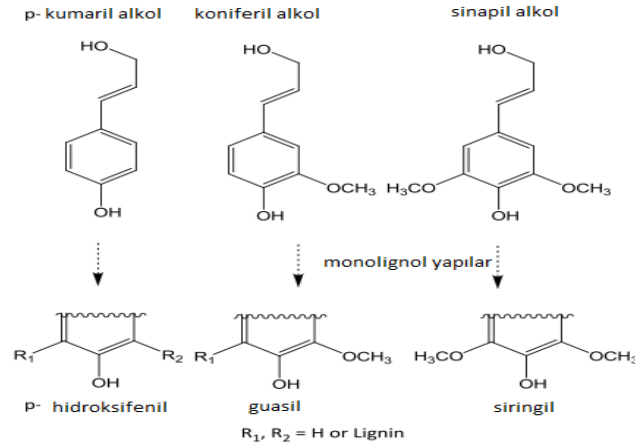
1.7. Lignin Yapısı

Odunun yapısında selüloz, hemiselüloz ve lignin olmak üzere üç ana bileşik vardır. Bunlardan selüloz, kuru ağaç ağırlığının %50-60'ını oluşturan, ağaca esneklik ve eğilme yeteneği veren bileşiktir. Kağıt yapımında kullanılan temel maddedir. Hemiselüloz ve lignin ise ağaca dayanıklılık kazandırır. Hemiselüloz, selüloz, pektin ve çeşitli karbohidrat bileşikleri içerirken, lignin parçalanması güç aromatik yapılar içeren çok kompleks bir özellik gösterir. Hemiselüloz ve ligninin oranları ağacın tipini belirler. Sert yapılı odunda hemiselüloz miktarı daha az bulunurken, yumuşak yapılı odunda lignin miktarı daha azdır (Tablo 3) (Noberg, 2012).

Tablo 3. Ağaç yapılarına göre lignin içeriği (Noberg, 2012)

Ağaç tipi	Selüloz (%)	Hemiselüloz (%)	Lignin (%)
Yumuşak ağaç	40-45	25-30	25-30
Sert ağaç	40-45	30-35	20-25
Ökalyptus	45	20	30

Lignin, bitki hücre çeperinde bulunan ve bitki hücrelerini, fibrillerini ve damarlarını bağlayan bir maddedir. Hemiselülozla birlikte, bitkinin dayanıklılığını arttıran ve selüloz mikrofibrillerini çevreleyen matriksi oluşturur. Bitkiye dayanıklılık sağlamanın dışında, hücre çeperine hidrofobik özellik kazandırarak, besin ve su geçişine katkı sağlar ve ağacı mikrobiyal degradasyona karşı korur (Noberg, 2012). Genellikle, odunsu ve damarlı yapının %20-30'unu oluşturur. Moleküler yapısı amorf ve polimerdir. Lignin, fenilpropanoit grupların oldukça dallanmış bir polimeridir. Bozunması çok zor olan çok çeşitli aromatik ve fenolik bileşikler içerir, bu yüzden son derece kompleksdir. Genel olarak yapısındaki üç fenilpropanoit grubu alkol; 4-hidroksi-3-metoksisinamil (koniferil) alkol, 3,5-dimetoksi-4-hidroksisinamil (sinapil) alkol ve p -hidroksisinamil (p-kumaril) alkol karbon ve eter bağlarıyla birbirlerine bağlanarak, sırasıyla, guasil, siringil ve p-hidroksifenil ünitelerini oluştururlar. Üç alkol grubu gelişmiş bitkilerde nadir olarak birlikte bulunur (Şekil 9). Daha çok çimen ve tek yıllık bitkilerde üçü birlikte bulunabilir. Sert yapılı odunda, koniferil ve sinefil alkol ikisi birlikte bulunurken, yumuşak yapılı odunda sadece koniferil alkole rastlanır (Kirk ve Farrel, 1987; Kirk ve Cullen 1998; Palonen 2004).



Şekil 9. Ligninin monolignol yapıları (Norberg, 2012)

Bağların yaklaşık olarak üçte ikisi karbon bağları, üçte biri de eter bağlarıdır (Tablo 4).

Tablo 4. Lignin yapısında bulunan bağlar

İsim	Bağ	Yumuşak odun (%)	Sert odun (%)
β - aril eter	β -O-4'	35-60	50-70
Diaril eter	4-O-5'	<4	7
Fenil kumaran	β -5'	11-12	4-9
Dihidroksibifenol	5-5'	10	\approx 5
Diarilpropan 1,3-diol	β -1'	1-2	1
Pinorezinol	β - β '	2-3	3-4
Dibenzodioksin	5-5'-O-4	4-5	trace
Spirodienon	β -1' α -O- α '	1-3	2-3

Karbon bağları, eter bağlarına göre daha kararlı ve parçalaması zordur. Ligninin yapısında, fonksiyonel grup olarak, fenolik hidroksil gruplar ve metoksil gruplar bulunur. Metoksil gruplar, sinapil alkolün varlığında oluşurlar, dolayısıyla bu gruplar sert yapılı odunlarda görülür. Fenol grupları ise en reaktif bölgelerdir, bu açıdan ligninde fenolik yapıların bulunması, ağartma ve biyodegradasyon işlemleri açısından daha önemlidir. Lignindeki aromatik halkalardaki oksijen atomunun %10-13'ü, serbest fenolik bileşikleri, kalanı da eter bağlarını oluşturur. Lignin, bütün bu bağların dışında hemiselülozla birlikte, LCC (lignin karbohidrat kompleks) bağları da kurar.

Lignin biyosentezi, dehidrojeneratif polimerizasyon olarak isimlendirilen serbest radikal bağlanma mekanizması aracılığıyla üretilir. Mekanizmada, fenilpropanoit alkol gruplarının oksidasyonu ile oluşan serbest radikal grupları üretilir ve bu radikaller çapraz bağlanarak çok dallı polimerleri oluştururlar (Kirk ve Farrel 1987; Jeffries, 1994; Norberg, 2012).

Lignin, yeryüzünde, selülozdan sonraki en büyük yenilenebilir karbon kaynağıdır ve günümüzde, üretimi kısmi olarak sağlanabilmiştir. Bu duruma göre, sülfür içerenler ve içermeyenler olarak iki gruba ayrılır. Ticarileşen yani üretimi sağlanan grup sülfür içerenler, dünya yıllık üretimi 500.000 ton olan lignosülfonatları ve 100.000 ton altında olan kraft ligninleri içerir. Uygun endüstriyel işlemlerin eksikliğinden dolayı, sülfür içermeyen ligninlerin henüz üretimi yapılmamaktadır (Kirk ve Farrel, 1987). Lignin ve lignin kaynaklı ürünler, toprakların oluşumunda ve hayvan besiciliğinde önemli rol oynar. Lignin içerdiği hidrofilik ve hidrofobik gruplarından ötürü gıda ve kozmetik sektöründe jelleşmede veya emülgator ve dispersantların özelliklerinin iyileştirilmesinde kullanılır.

Uygun maliyetinden ötürü doğal ve yenilenebilir hammadde olarak, günümüzde petrokimyasal maddelerin yerine kullanılabilir. Ligninlerin antioksidan, antibakteryal ve antiviral özelliklere de sahip olduğu belirtilmiştir (URL-3).

1.8. Ligninazlar

Ligninaz, genel olarak kağıt endüstrisinde kullanılan lignin parçalama özelliğine sahip enzimlere denir. Alternatif biyo-beyazlatma sistemlerinin geliştirilmesi amacıyla gerçekleştirilen araştırmaların çoğunluğu lignin-degradasyonunu gerçekleştiren funguslardan ve bakterilerden elde edilen lignin peroksidaz (LiP), mangan bağımlı peroksidaz (MnP), çok-yönlü peroksidaz (VP; LiP, MnP ve fenolik bileşikleri oksitleyen bitkisel/mikrobiyal peroksidazların katalitik özelliklerine sahiptir) ve lakkazlar üzerinde yoğunlaşmıştır.

Peroksidazlar Hem (heme) grubu içeren enzimlerdir. Hem peroksidazlar *Phanerochaete crysosporium* gibi lignini parçalayan bazidiyomisetler tarafından üretilir (Munirathinam vd., 1994) ve substrat spektrasına dayalı olarak ikiye ayrılır. Birinci tür mangan peroksidaz (MnP)'dır ve Mn^{+2} onun için en iyi indirgen substrattır. Mangan peroksidaz (MnP), hemen hemen tüm beyaz ve kahverengi çürükçül fungusların en yaygın ürettiği ligninolitik peroksidazdır (Hatakka, 1994; Willman ve Fakoussa, 1997). *P.chryso sporium*'dan elde edilen manganaz peroksidaz ilk olarak yaklaşık 25 yıl önce tanımlanmıştır (Kuwahara vd.,1984; Paszcynski vd., 1986). MnP'in belirgin özelliği, yapısındaki aktif bölümde iki adet kalsiyum iyonunun bulunmasıdır. Aktif bölgesi Asp rezüdüsüne H- bağlı bir His ligandı ve cep içeren katalitik Arg ve His bağlı peroksit distal tarafı içerir (Banci, 1997). MnP beş adet disülfür bağı sahiptir. Beşinci disülfür bağı MnP'a özgüdür. Bu bağı bir bileşeni C terminal uçtur ve kısmen proteinin ana gövdesinden C-terminal ucu uzak tutmak için uygulanan kuvetten sorumludur. MnP, Mn^{+2} 'yi Mn^{+3} 'e yükseltme kabiliyeti konusunda eşsizdir. MnP'in substrat bağlanan bölgesinin kristal yapısı, sadece bir Mn bağlanma bölgesi olduğunu gösterir. Mn^{+2} bağlanma bölgesi, bir Hem propiyonik asit, üç asidik ligan ve iki su molekülü içerir (Glenn ve Gold, 1985). Mangan peroksidaz iki domainden oluşur ve Hem grubu bu iki domain arasında sıkışıp kalmıştır. Domainlerin herbiri 10 büyük ve 1 adet küçük heliks yapı içerir (Welinder ve Gajhede, 1993).Lignin peroksidaz (LiP) ise, nonfenolik ve fenolik aromatik bileşikleri

oksitler. Lignin ve benzeri bileşikleri oksitleyebilmeleri için hidrojen peroksit (H_2O_2) ihtiyaç duyarlar (Mester vd., 1996). Lignin peroksidaz (LiP), beyaz çürükçül fungus *P. cryosporium*'un ligninolitik kültüründen izole edilmiş Hem grubu içeren bir glikoproteindir ve oksidatif lignin depolimerizasyonunu elektron transferiyle gerçekleştirebilen hidrojen peroksit bağımlı oldukça önemli bir enzimdir. LiP ayrıca fenol içermeyen, elektron yönünden zengin aromatik lignin benzeri bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyebilmektedir (Kertsen vd., 1985; Schoemaker ve Leisola, 1990). Lignin peroksidaz tarafından kullanılan indirgen substrat türleri mangan peroksidazın substratından biraz farklılık gösterir. Lignin peroksidaz için bir bileşiğin substrat olup olmadığını belirlemede iki faktör etkilidir; birincisi molekülün büyüklüğü ikincisi de redoks potansiyelidir. Lignin peroksidazın diğer peroksidazlardan daha yüksek redoks potansiyeline sahip olması bu enzimi poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) için iyi bir yükseltgen yapar. Lignin peroksidaz da indirgen substratın bağlanma bölgesi tam olarak doğrulanmamış olması lignin gibi büyük moleküllerle lignin peroksidazın kinetik parametrelerini belirlemenin oldukça zor olmasına sebep olur (Ferafontova vd., 2006).

Lakkaz ise lignin biyodegradasyonu için en yaygın kullanılan enzimdir. En yaygın olarak kullanılmasının sebebi, patenti de alınmış olan, kraft hamuru için geliştirilmiş Lakkaz mediatör sistemi (LMS) delignifikasyon teknolojisidir. LMS delignifikasyon teknolojisi oldukça seçici olup, kâğıt hamurundan çok az karbonhidrat kaybına veya hasara yol açmaktadır ve lakkazın oksidasyon potansiyelini artırır. Diğer sebepler arasında, LiP ve MnP enzimlerine göre daha kolay temin edilebilmesi, kullanımının kolaylığı ve bileşiklerin oksidasyonlarını çok daha az özgüllükte sağladıklarından dolayı da çok fazla çeşitlilikteki bileşiklerin parçalanmasında kullanılacak bir potansiyele sahip olması yer alır (Demiralp, 2015).

1.9. 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 bağımsız hale getirilmesidir. Bu işlem sırasında hücre çeperi içindeki lignin ve hemiselülozların büyük bir kısmı da çözüldüğünden bağımsız 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).

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

Kimyasal hamur üretimi çeşitli kimyasallar kullanılarak lifleri bağımsız 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.

Kraft pişirme yönteminin temeli, Alman kimyacı Carl DAHL tarafından 1879 yılında keşfedilmiş olup pişirmede 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 yöntem 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 vd., 1989).

Kraft yönteminde, pişirme çözeltisi NaOH (sodyum hidroksit) ve Na₂S (sodyum sülfid) kimyasal maddeleri kullanılarak hazırlanır ve bu çözeltiye 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 çözeltilerinde 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 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 kazanılmasının oldukça kolay olmasıdır.

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 dezavantajları da vardır. Kappa numarası artarken direnç değerleri düşer ve dövme zamanı

artar. Hamura sonradan bazı ilave maddelerle direnç değerleri 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 sülfat hamurlarından daha koyu renklidir.
2. Sülfat hamurunun lifleri daha esnek olup, daha zor hidratlanır ve şişerler, dolayısıyla dövülmeleri bisülfat hamurundan çok daha zordur.
3. Bisülfat 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, bisülfat hamuru liflerinde daha çok liflerin dış kısmında toplanmıştır. Bu nedenle sülfat hamurları daha zor ağartılır.
5. Sülfat hamurlarından elde edilen kağıtlar bisülfat hamuruna oranla özellikle yırtılma direnci yönünden çok daha üstündür.
6. Sülfat hamurlarının hemiselüloz oranı daha düşüktür. Bisülfat hamurunun hemiselülozları daha çok degradasyona uğramıştır. Bisülfat hamuru daha çok glukomannan daha az pentozan içerir. Sülfat hamurunda üronik asitler bulunmaz (Casey, 1980; Eroğlu,1981).

1.9.2. Kimyasal Kağıt Hamurlarının Ağartılması

1.9.2.1. 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 işleminde hamurun parlaklığı, ligninin uzaklaştırılması veya ligninin liflere verdiği renk giderilmesi ile artırılır (Reeve, 1989; Farr vd., 1992; Fredette, 1996; McDonough, 1992, Bajpai, 2005).

Pişirme işleminden 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).

1.9.2.2. Ağartma Kademeleri ve Dizinleri

Ağartma yapacağımız hamura hangi ağartma metodunu kullanacağımızın seçimine, ağartılmamış hamurun karakteri (Tablo 5) 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 5. 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 Bisülfid 2.Sodyum veya Çinko ditiyonit 3.Sodyum borhidrür 4.Sodyum veya Hidrojen Peroksit	1. Klor 2. Hipoklorit 3.Alkali Ekstraksiyonu 4. Klor Dioksit 5.Hidrojen Peroksit ve Oksijen 6. Ozon	1.Sıcak ve Soğuk Alkali Saflaştırması

Dizinin ilk kademeleri, hamurdaki ligninin uzaklaştırılmasında ve nihai hamurda istenen parlaklık değerinin sağlanmasında en büyük görevi üstlenir. Sonraki kademeler ise, hamurdaki fazla lignini uzaklaştırdığı, dolayısıyla parlaklığın yüksek seviyeye ulaştırıldığı kademelerdir (Nelson, 1998). Ağartma basamaklarının ağartma fonksiyonlarına yüklediği özel görevler vardır, bu görevler 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, 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. Alkaliler, özellikle sodyum hidroksit, asidik özellik kazanan lignini hidrolize etmede ve çözmede 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. Her bir oksidatif ağartma kademesi sonrasında uygulanan yıkama işlemleri ile hamurdan çözülmüş partiküller uzaklaştırılarak, ağartmanın etkisi geliştirilir (Nelson, 1998).



Şekil 10. 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 6). Kraft hamurunun tam anlamıyla ağartılabilmesi için, ağartma dizini her kademe arasında yıkama yapılacak şekilde, sırayla alkali ve asidik kademeler olarak düzenlenmelidir (Dahl, 1999).

Tablo 6. Kimyasal kağıt hamurlarının ağartılmasında kullanılan kimyasallar

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

1.9.2.3. 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 uzaklaştırma 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, işlem sonrası hamur kalitesi, toplam maliyet ve çevresel açıdan avantaj sağlamaktadır (Suchy ve Argyropoulos, 2002). Bu yöntemin en önemli özelliği çevreye karşı oldukça zararsız olmasıdır. Atık sudaki COD, BOD, renk ve klorlu organik bileşikler bu yöntem ile önemli ölçüde azaltılabilmektedir. Ağartma işleminde kullanılan kimyasal madde yükünü azaltması, kraft kimyasal madde döngüsüne uygun olması diğer önemli özelliklerindedir (Okan, 2010).

Oksijen delignifikasyonu işleminde hamur buharla karıştırıldıktan sonra besleme tankına gönderilir. Reaksiyon ortamını alkali yapmak için NaOH ya da asitlendirilmiş beyaz çözelti kullanılır. Gerekli miktardaki alkali, besleme tankının üstünde bulunan bir tahliye pompasıyla 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 olmakla 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 (Kiviahho, 1995; Nelson, 1998; Okan,2010; Kalyoncu, 2011).

1.9.2.4. Şelat 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 vd., 1996). Geçiş metal iyonları hamur viskozitesini düşürür ve ağartma işleminin sonunda final hamurda renk koyuluğu oluşumunu hızlandırır (Kutney ve Evans, 1985). Bu nedenle ağartmada metal iyonlarının uzaklaştırılması oldukça önemli olmakla birlikte uzaklaştırılması için asit muamelesi ya da şelatlama işlemi yapılmaktadır (Sixta, 2006).

Kağıt endüstrisinde genel olarak kullanılan şelatlar, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve dietilentriaminpentaasetik asit (DTPA)'dır (Anderson vd., 1996). Şelatlayıcıların görevi ağır metal iyonları ile çözünebilir formda kompleksler oluşturarak, hidrojen peroksit gibi ağartıcı kimyasalları, zararlı metal iyonlarına karşı korumaktır (Colodette vd., 1989). Aynı zamanda şelatlayıcılar ağartma işleminde hamura ilave

edilerek viskoziteye de koruyucu etki yapmaktadır. Şelatlama 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, şelatlama işleminin ardından etkili bir yıkama işlemi yapılmalıdır (Sixta, 2006).

1.9.2.5. Hidrojen Peroksit Ağartması (P)

Geleneksel ağartma dizinlerinde etkili bir ağartıcı olmayan hidrojen peroksit, TCF ağartma yönteminde kullanılan etkili ağartıcılardandır (Van Lierop vd., 1993; Troughton vd., 1994; Bajpai, 2005). Kağıt hamuru endüstrisinde yaygın ve çok yönlü olarak kullanılan oksidatif bir ağartıcı olan hidrojen peroksit, alkalen koşullar altında mekanik ve kimyasal hamurların ağartılmasında ve mürekkep uzaklaştırma işlemlerinde kullanılan en iyi kimyasaldır (Beeman ve Reichert, 1953; Holladay ve Solari, 1963; Andrews ve Singh, 1979; Anderson, 1992; Troughton ve Sarot, 1992; Lachenal ve Muguet, 1992, Lachenal vd., 1992b; Nelson vd., 1995; Anderson ve Amini, 1996; Lachenal, 1996; Nelson, 1998; Pikka vd., 2000).

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 $\text{HO}\cdot$ ve $\text{O}_2\cdot^-$ radikalleri ile degradasyonu ile çözünmesi ve

uzaklaşmasıdır (Backman ve Gellerstedt, 1993; Anderson ve Amini, 1996). Radikaller ligninin aromatik halkası ile oksidatif bozunma reaksiyonu şeklinde reaksiyona girer ve ligninin moleküler hidrofilitik özelliğini ve çözünürlüğünü artırır (Bajpai, 2005; Kalyoncu, 2011). Bununla birlikte hidrojen peroksit ağartmasında asıl ağartıcı fonksiyona sahip olan radikallerin oluşabilmesi için alkalen şartlar mutlaka gereklidir. Delignifikasyon işleminde radikallerin olumlu etkilerinin yanında çok olumsuz etkileri de bulunmaktadır. Bu nedenle yüksek miktarda bulunan geçiş metallerinin 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 ($\text{HO}\cdot$) radikalleri ve süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radikal iyonları meydana gelir (Hobbs ve Abbot, 1992; Dence ve Reeve, 1996). 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 kromoforlarla reaksiyona girer (Gierer, 1982). Hidroksil ($\text{HO}\cdot$) ve ondan daha az oranda oluşan süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radikallerinin ağartma reaksiyonlarında katılımları daha düşük oranlardadır (Gellerstedt ve Pettersson, 1982; Hobbs ve Abbot, 1991; Gellerstedt ve Lindors, 1991; Lachenal vd., 1994; Dence ve Reeve, 1996). Hidroksil radikalleri hidrojen peroksitin geçiş metallerinin katalizörlenerek bozunması sonucu oluşmaktadır (Gierer vd., 1991; Dence ve Reeve, 1996). 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 şelatlama kademesi sayesinde hamurların direnç özelliklerinde önemli kayıplar olmaksızın daha yüksek parlaklık değerlerine ulaşmak mümkün olduğu için peroksit kademesinde daha zorlu işlem koşulları seçilebilmektedir (Abrantes vd., 2007). Oksijen bazlı kimyasal olan hidrojen peroksit, TCF

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

1.9.2.6. Ağartmanın Çevresel Etkileri

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

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

1.10. Çalışmanın Amacı

Lakkaz, geliştirilen Lakkaz Mediatör Sistem (LMS) sayesinde etkin biçimde lignin degrades etme özelliğiyle kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde ümit vadeden bir enzim olmuştur. Buna göre, bu çalışmada, daha önceden Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda, *Bacillus megaterium* bakterisinden izole edilerek klonlanan lakkaz enzimi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde lignini uzaklaştırma çalışmaları sırasında kullanılan klorin gibi organik bileşiklerin biyolojik hayata ve ekosisteme karşı oluşturduğu istenmeyen yan etkilerini ortadan kaldırma ve böylece

zahmet veren işlemlerin yerine daha kolay ve enerji tasarrufu sağlayan enzimatik çalışmaların endüstride kullanımına katkı sağlama amacıyla karakterize edilmiş ve kağıt hamuruna uygulama çalışmaları yapılmıştır.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Tripton (Merck V441613949), Yeast ekstrakt (Merck VM175053), NaCl (Merck K34243404), Etil alkol, Kanamisin (Applichem A1493), IPTG (Applichem A1008), Amfisilin (Applichem A0839), *Bam*HI (Promega), *Eco*RI (Promega), T4 DNA ligaz (NEB), Taq DNA polimeraz (Promega), Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega A1125), Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas K0513), EDTA (Merck 84211000), dNTP seti (Promega), pGEM-T Easy Klonlama Vektörü (Promega A1360), CaCl₂ (Aktar Kimya), X-Gal (Applichem A10070005), Commassie Brilliant Blue G-250, Commassie Brilliant Blue R-250 (Merck 2C2133453), Fosforik Asit (Merck 563.2500), BSA (NEB), Sodyum Asetat (Merck TA867065), K₂HPO₄ (Merck A678671), KH₂PO₄ (Merck 567300), Trizma Baz (Sigma T1503), Nutrient Agar (MerckVL646350), SDS, Akrilamid (Sigma A8887), Bis-akrilamid (Promega), Bromofenol mavisi (Gerbu 080702), β-merkaptotanol (Merck 805740), Metanol, Asetik asit (Riedel-dan Haen 27225), Gliserol (Merck K40789992008), NaH₂PO₄·2H₂O (Merck K91147745938), MgSO₄·7H₂O, Lignin Alkali (Aldrich 471003), Spizizen's salts, Glukoz (Sigma G7528), Kazein (Himedia RM014), Triptofan, MgCl₂, EGTA (Biobasic Canada ED0077), Mısır nişastası, Pepton (Himedia RM-001), CaCO₃ (Botaforma lab), Amonyum Sülfat (Merck A734116), Malt Ekstrakt (Merck VM264491106), C₄H₁₂N₂O₆, CuSO₄·5H₂O, MgSO₄·7H₂O, Fe₄(SO₄)₄, CaCl₂·2H₂O, MnSO₄·H₂O, Agar (Himedia RM026), ABTS (Sigma A9941-100Tab), H₂O₂, KMnO₄ (Merck), Sodyum Sitrat tribasic dihidrat (Sigma S4641)

2.2. Kullanılan Hücreler

Escherichia coli JM101, *Bacillus* WB800, *Bacillus megaterium*

2.3. Moleküler Çalışmalar

2.3.1. Mikroorganizma ve Kültür Koşulları

Trabzon ve çevresinden çeşitli toprak, gübre, petrole bulaşmış toprak, çürümüş odun ve bitki örnekleri steril şartlar altında laboratuvara getirilerek lignin içeren sıvı besiyerine inoküle edildi ve zenginleştirme kültürleri yapıldı. 30°C' de, 2-3 gün süreyle inoküle edilen örnekler daha sonra lignin agar (5 g lignin; 17,3 g agar; 1000 ml fizyolojik distile su) besiyerine ekildi ve oluşan koloniler gözle veya binoküler mikroskopla gözlenerek saf kültürleri yapıldı. Lignin degrades edebildiği belirlenenve saf kültürleri yapılan 16 farklı izolatin genomik DNA'sı izole edilerek 16S rDNA primerleriyle PCR gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin MacroGen (Hollanda) firması tarafından gerçekleştirilen dizin analizlerine göre 16 tür belirlendi.

2.3.2. Lakkaz Aktivitesinin Varlığının Belirlenmesi

Tanımlanan lignolitik izolatlar öncelikle NA (Nutrient Agar) besiyerinde büyütüldü. Oluşan koloniler guaiacol ile muamele edildi ve 4 saatlik inkübasyon periyodu sonunda mor rengi alan izolatların lakkaz içerdiği tespit edildi.

2.3.3. Lignin Degradasyon Hızının Belirlenmesi

Lignin degradasyon oranlarının belirlenmesi için izolatlar, lignin degradasyon sıvı besiyerine (KH₂PO₄ 1 g; NaHPO₄ 4 g; NaCl 0,2 g; MgSO₄.7H₂O 0,2 g; CaCl₂ 0,05 g; Maya ekstraktı 2 g; Lignin 5 g; Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış) inoküle edilip 37 °C'de 120 rpm'de 1 hafta süre ile inkübasyona bırakıldı. Deneyde iki farklı kontrol kullanıldı. Bunlardan birisi bakteri inoküle edilmeyen ligninli sıvı besiyeri diğeri ise yukarıda tanımlanan besiyerinin lignin içermeyen versiyonuna bakteri inokulasyonu yapılarak oluşturulanıdır (El-Gammal vd., 1997).

Sekiz haftalık süre sonunda bakteri aşılansmış ve 37°C’de inkübe edilmiş olan kültür otoklavda steril edildikten sonra, önceden kurutulmuş ve ağırlıkları kaydedilmiş olan filtre kağıtlarından süzöldü. Süzme işleminden sonra filtre kağıtlarının üzerinde kalan lignin, Pastör fırınında tekrar kurutuldu. Bu işlemin ardından tartım işlemi tekrarlandı ve kağıdın kaydedilen ilk ağırlığı son ağırlığından çıkarıldı. Böylece oluşan fark filtre kağıdı üzerinde kalan lignin ağırlığı olarak belirlendi (El-Gammal vd., 1998).

Sonuç olarak %57 oranında lignin degradasyon hızına sahip *Bacillus megaterium* çalışmaya uygun bulundu.

2.3.4. Genomik DNA İzolasyonu

Bacillus megaterium’un genomik DNA izolasyonu Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak yapıldı. Bakteri 3 ml LB besiyerine ekildi ve 37°C’de gece boyunca sulu çalkalayıcıda inkübe edildi. Büyümüş olan gece kültürü 13.000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücreler 480 µl 50 mM EDTA içerisinde çözüldü. 120 µl 10 mg/ml lizozim ilave edildi, hafifçe pipetleyerek karıştırıldı ve 37°C’de 60 dk inkübe edildi. Elde edilen karışım 13.000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tüpe 600 µl Nuclei Lyzis solüsyonu eklendi ve hafifçe pipetle karıştırıldı. Karışım 80°C’de 5 dk inkübe edildi ve oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 3 µl RNaz solüsyonu eklendi. Tüp 2-5 kez alt-üst edildi ve 37°C’de 30 dk inkübe edildi. Karışım oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 200 µl Protein Precipitation solüsyonu eklendi ve 20 sn vortekslelendikten sonra 5 dk süreyle buza bırakıldı. 5 dk sonunda 13.000 rpm’de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant içinde 600 µl izopropanol bulunan yeni bir ependorfa aktarıldı. Ependorf pellet oluşuncaya kadar alt üst edildi ve 13.000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant dököldü. Pelletin üzerine 600µl oda sıcaklığında %70’lik etanol eklendi ve alt üst edildikten sonra 13.000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Pipetörle süpernatant uzaklaştırıldı ve etanolun tamamının uzaklaşması için mikrosantrifüj tüpü 15 dk 37°C’de bekletildi. Pellet üzerine 100 µl DNA Rehydration solüsyonu eklendi ve 65°C’de 1 saat inkübe edildi. Genomik DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra, elde edilen DNA kullanılacağı zaman kadar +4 °C’de saklandı.

2.3.5. Primer Dizaynı

GenBank'ta daha önceden var olan *Bacillus megaterium*'un genomundan yararlanılarak lakkaz geninden, genin baş ve son kısmına uygun geri primeri, primerlerin uçlarına endonükleaz kesim bölgeleri ilave edilerek dizayn edildi. Genin klonlanacağı pMA0911 shuttle vektörünün çoklu klonlama bölgesinde bulunan ve gen içerisinde kesim bölgesi bulunmayan *EcoRI* kesim bölgesi ileri primerine ve *BamHI* kesim bölgesi geri primerine eklendi. Dizayn edilen primerler aşağıdaki gibidir:

Lak0911F: 5'- ggA ATT CAT gAA TCC TgA gCC ATT A-3' 25 nt

Lak0911R: 5'- Cgg ATC CTT ACT CCT CCT TAA AgC CTA Tg -3' 29 nt

2.3.6. PCR ile Lakkaz Geninin Elde Edilmesi

Lak0911F ve Lak0911R primerleri ile *Bacillus megaterium*'un genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak PCR gerçekleştirildi. PCR şartları şu şekildedir: 95°C'de 3 dakikalık denatürasyon basamağı ardından 36 döngü, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 53°C'de 30sn bağlanma (annealing) ve 72°C'de 45 sn uzama (extention) ve son olarak da 72°C'de 5 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %0,7'lik agaroz jelde yürütülerek BioDoc Analyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. PCR ile çoğaltılan parçalar, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak pGEM-T Easy klonlama vektörüne, firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı (5 µl 2X tampon, 1 µl pGEM-T vektör, 3 µl PCR ürünü ve 1 µl T4 DNA ligaz). Klonlama sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis vd. (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildi ve agaroz jelde yürütülerek rekombinant genler seçildi. Klon olduğunu teyit etmek için *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesim yapıldı ve PCR ürünün elde edilip edilemediği kontrol edildi. Bu şekilde doğruluğu teyit edilen klonların baz dizini, otomatik dizi analizatörleri aracılığı ile (Macrogen, Hollanda)

belirlendi. Dizin analizi sonuçları Genbank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve elde edilendizinin lakkaz genine ait olduğu tespit edildi.

2.3.7. Lakkaz Geninin pMA0911 Shuttle Vektörüne Klonlanması

İçerisinde lakkaz geni olduğu kesinleşen pGEM-T vektörü *E. coli* JM101 hücresinde çoğaltıldı ve plazmit izolasyonu yapıldı. PCR ile üretilen lakkaz genin uç kısımlarında *EcoRI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri bulunmaktadır. pMA0911 shuttle vektörü ve içerisinde lakkaz geni taşıyan pGEM-T vektörü *EcoRI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Kesim reaksiyonu, 1X enzim tamponu içerisinde, 3 U enzim varlığında 37°C'de 2 saat boyunca gerçekleştirildi. Kesim ürünleri %0,8'lik agaroz jelde yürütüldü. Lineer hale getirilen pMA0911 shuttlevektörü ve uç kısımlarından kesilen PCR ürününün bulunduğu bantlar jelden kesilip alındı ve bir Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas) aracılığı ile temizlendi. Temizlenen ürünler ligasyon işlemi ile halkalaştırıldı. Ligasyon; 1 µl 10X tampon, 1 U T4 DNA ligaz enzimi içerecek şekilde 10 µl son hacimde 16°C'de 16 saat boyunca gerçekleştirildi.

Ligasyon ürünü, *Bacillus* WB800 ekspresyon hücresine aktarıldı. Transformasyon için, kompetent hücre hazırlamak üzere *Bacillus* WB800 30°C'de gece boyu büyütüldü. Bir gecelik kültürden 10 ml SPI (10 ml Spizizen's salts, 100 µl %50 glukoz, 50 µl %2 kazein, 50 µl %10 maya ekstraktı, 250 µl 2mg/ml triptofan) besiyerine 1:100 oranında ekim yapıldı. Hücreler durgun faza gelene kadar yaklaşık 4 saat 37°C'de 160 rpm'de üremeye bırakıldı. Bu süre sonunda 1 ml hücre 20 ml SPII (20 ml SPI, 50 µl 50 mM CaCl₂, 50 µl 250 mM MgCl₂, 50 µl 2mg/ml triptofan) besiyerine transfer edildi ve 30°C'de 80 rpm'de 2 saat inkübe edildi. 2 saat sonunda hücreler 14 ml'lik tüplere alınarak 10 µl 100mM EGTA ilave edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Daha sonra kompetent hale gelen hücrelere 1 µg plazmit eklendi ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Petri üzerinde oluşan kolonilerin hangisinin geni taşıdığına belirlemek için kolonilerden rastgele seçim yoluyla tarama yapıldı. Kontrol olarak lakkaz içermeyen pMA0911 shuttle vektörüyle birlikte seçilen koloniler 3 ml (50 µg/ml kanamisin içeren) LB besiyeri içerisinde bir gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Üretilen hücrelerden plazmitler izole edildi. İzole edilen

plazmitlerden %0,8'lik agaroz jel elektroforezde vektörden ağır olanlar seçildi ve *BamHI* ve *EcoRI* restriksiyon endonükleaz ile kesilerek klonlamanın olup olmadığı kontrol edildi.

2.4. Biyokimyasal Çalışmalar

2.4.1. Lakkaz Proteinin Ekstraksiyonu

Lakkaz genini içerdiği belirlenen koloniden, 50 µg/ml kanamisin içeren 50 ml LB'ye inokülasyon yapılarak geceboyu büyümeye bırakıldı ve oluşan kültürün optik yoğunluğu ölçüldü. Bu kültür kullanılarak, 2 L 100 µg/ml kanamisin içeren %1,5 oranında mısır nişastası içeren LB besiyerine (1g pepton, 0,5 g yeast, 0,5 NaCl, ve 1,5 g mısır nişastası 100ml ddH₂O) optik yoğunluğu 0,1 olacak şekilde tekrar ekim yapıldı. 37°C'de 200 rpm'de 36saatlik inkübasyonun ardından büyütülen hücreler 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Elde edilen süpernatant için kontrol olarak enzim aktivitesi yapıldı ve protein SDS poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülerek tespit edildi.

2.4.2. Lakkaz Enzim Aktivitesinin Araştırılması

Lakkaz aktivitesinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi için ABTS substratı kullanıldı. Reaksiyon, 0,5 mM ABTS 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 5,0) ve uygun miktarda enzim içerecek şekilde hazırlandı ve 420nm'de pik veren okside haldeki ürün; ABTS²⁺ absorbanı ölçülerek aktivite tayini yapıldı (More vd., 2011).

2.4.3. Protein Konsantrasyon Tayini

Protein konsantrasyonu tayini Bradford'un (1976) yılında geliştirdiği yöntemle yapılmıştır. Commassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanılmıştır. Bu boya ile ilk olarak BSA (Bovin Serum Albumin) kullanılarak 595 nm dalga boyunda protein konsantrasyonu

standardı grafiği oluşturuldu. Standart grafik için 2, 4, 6,10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Her bir örneğin üzerine 5 ml Commasie Brilliant Blue eklenildi. Protein ve boya karışımıvortekslendi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Standart grafik oluşturulduktan sonra, örneklerin ölçümü yapılırken değişik miktarlarda örnek 0,15 M NaCl ile 100 µl'ye tamamlandıve üzerine 5 ml boya eklendi. Protein ve boya karışımıvortekslendikten sonra oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Süresonunda standart grafiğin yüklendiği Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein konsantrasyonu µg/µl cinsinden hesaplandı.

2.4.4. Lakkaz Protein Varlığının SDS Jel Elektrofrezisi ile Teyit Edilmesi

Protein jel elektrofrezleri Hoeffler SE 600 marka elektrofrezde %12'lik jelkullanılarak 15 mA'lik akım altında gerçekleştirildi. *Bacillus megaterium* lakkazının varlığını kontrol etmek ve moleküler ağırlığını hesaplamak için enzim, moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırile birlikte SDS poliakrilamid jel elektrofrezinde yürütüldü. Her bir örnekten 50 µg protein kullanıldı. Her bir örnek üzerlerine eşit miktarlarda muamele (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; %4 SDS; %20 Gliserol; %6 β-merkaptolanol) tamponu ilave edildi ve sonrasında 99°C'de 4 dakika bekletilerek Maniatis ve arkadaşları (1982) tarafından tanımlanan %12'lik sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 15 mA akım altında, yürütme boyası jelden çıkana kadar yürütüldü. Yürütme işlemi sonrasında jel, Commasie Brilliant Blue (%0,125 Commasie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyasıile 1 saat boyandı ve hemen ardından 1. yıkama solüsyonunda (%50 Metanol, %10 Asetik asit %40 ddH₂O) 1 saat bekletildi. Daha sonra 2. yıkama solusyonunda (%7 asetik asit ve %5 metanol) bantlar belirginleşinceye kadar bekletildikten sonra bilgisayar tarayıcısıile fotoğraflandı.

2.4.5. Lakkaz Karakterizasyonu

2.4.5.1. Lakkaz Optimum Sıcaklık ve Isıl Stabilitesi ile Optimum pH ve pH Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi

Lakkazın optimum sıcaklığı, uygun pH tamponunda 20-80°C aralığındaki sıcaklıklar denenerak belirlendi. Lakkaz enziminin kararlılığına ısının etkisini incelemek için enzim 50 mM sitrat (pH 4,5) tamponu içerisinde, 150 dakika süreyle 40°C, 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C'de inkübe edildi. İnkübasyon boyunca belirli zaman aralıklarında tüplerden alınan örneklerde kalan aktivite, optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite testine göre ölçüldü. Deney başlangıcında yani sıfırıncı dakikada tüplerden alınan örneklerin aktivitesi ile istenilen zamanlarda alınan örneklerdeki aktiviteler kıyaslanarak bir ısıl kararlılığı grafiği çizildi.

Lakkazın, 50 mM sitrat tamponu (pH:4,0-6,0), 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0-8,0), 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0-9,0) içeren reaksiyonları karşılaştırılarak optimum pH'sı belirlendi. Lakkaz enziminin pH kararlılığını belirlemek amacıyla enzim pH'sı 4,0-4,5-5,0-5,5 ve 6,0 olan 50 mM sitrat tamponunda enzimin en iyi çalıştığı optimum sıcaklıkta 150 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite testine göre ölçülerek enzimin en kararlı olduğu pH belirlendi.

2.4.5.2. Lakkaz K_m ve V_{max} Değerlerinin Hesaplanması

Bacillus megaterium lakkazının kinetik verileri, yapılan ön çalışmalar sonucunda belirlenen, 0,1-4 µM arasındaki substrat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen seri reaksiyonlar ile belirlendi. Reaksiyonlar 100 mM sodyum asetat tamponu (pH 5,0) kullanılarak 60°C gerçekleştirildi. *Bacillus megaterium* lakkazının K_m ve V_{max} değerleri Orijin programıyla hesaplandı.

2.5. Lakkazın Kağıt Hamuruna Uygulama Çalışmaları

2.5.1. Kağıt Hamuru Kaynağı

Çalışmada ülkemizde ibreli ağaçtan kraft yöntemiyle kağıt hamuru üretimi yapan Oyka-Zonguldak-Çaycuma fabrikasından satın alınan kızılçam kağıt hamuru kullanıldı. Deneyle iğne yapraklı kızılçam türlerinden elde edilen orijinal Kappa numarası 45 olan Kraft hamuru üzerinden yürütüldü. Çalışmada ayrıca, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği laboratuvarında yapılan atık kağıt hamuru kullanıldı.

2.5.2. Kağıt Hamuru Ağartma Çalışmaları

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

2.5.2.1. Kağıt Hamurunun Rekombinant Bakteri ile Muamele Şartlarının Optimizasyonu

Kağıt hamuru rekombinant bakteri ile muamele edilerek delignifikasyonu sağlamak amacıyla yapılan çalışmada 48 saatlik 25 ml bakteri kültürü, 5 g tam kuru hamur içeren 500 ml MSM besiyerine (L^{-1} : yeast ekstrakt 6 g, sodyum klorür 4 g, magnezyum sülfat 0,2 g, kalsiyum karbonat 0,1 g, amonyum sülfat 0,5 g, malt ekstrakt 6 g) inoküle edildi ve bakterinin sahip olduğu enzimin optimum sıcaklığı ve bakterinin büyüebildiği optimum sıcaklık dikkate alınarak ayarlanan belli bir sıcaklıkta 250 rpm'de 7 gün boyunca inkübe edildi. Daha sonrabakteri büyümesi ve enzim üretimini optimize etmek amacıyla farklı sıcaklıklar ve farklı pH'lar denendi. Optimizasyon parametreleri Tablo 7 'de verilmiştir.

Tablo 7. Rekombinant bakteri ile ağartma optimizasyon şartları

Sıcaklık	30°C	40°C	50°C	60°C
pH	4,0	5,0	6,0	7,0

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

2.5.2.2. Kağıt Hamurunun Enzimle Muamele Şartlarının Optimizasyonu

Lakkazın, kızılçam kağıt hamuru üzerindeki ligninolitik aktivitesinin araştırılması amacıyla enzim optimizasyon çalışmaları yapıldı. Optimizasyon, hamur konsantrasyonu, enzim miktarı ve ABTS miktarı gibi parametrelerin farklı değerlerde değiştirilmesi ile gerçekleştirildi (Tablo 8). Optimizasyon parametreleri belirlenirken ABTS substratı enzimin aktivitesini arttırmaya yardımcı olan mediatör madde olarak kullanıldı.

Tablo 8. Enzimatik ağartma optimizasyon şartları

	Enzim miktarı (U/g)	4 U/g	6 U/g	8 U/g	10 U/g
Lakkaz	Hamur konsantrasyonu	%3	%5	%7	%10
Lakkaz	ABTS konsantrasyonu	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM

Kağıt hamurunun enzim ile muamelesi, enzimin optimum sıcaklık ve pH'sı da polietilen poşet içerisinde kağıt hamuru ve enzimin karıştırılarak sulu sallayıcıda inkübasyona bırakılmasıyla gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak, enzim içermeyen hamur

örneği aynı şartlar altında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hamur distile su ile yıkanarak 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.

2.5.2.3. Oksijen Delignifikasyonu (O)

Enzim ağartması yapılan kağıt hamurları için oksijen delignifikasyonu tabloda verilen şartlara göre gerçekleştirildi. Hem kontrol hem enzim için ayrı ayrı 50 g tam kuru hamur kullanıldı. Kağıttaki ksilanları uzaklaştırmak için %4 oranında NaOH kullanıldı (Sixta, 2006). Magnezyum sülfat ise, selülozun çözeltide meydana gelen radikaller tarafından bozunmasını ve katalitik ayrışmasını önlemek amacıyla %1 oranında kullanıldı (Tablo 9) (Linden ve Ohman, 1997; Van Heiningen ve Violette,2003).

Tablo 9. Oksijen delignifikasyon şartları

OKSİJEN DELİGNİFİKASYONU (O)	
NaOH Oranı (%)	4
MgSO ₄ Oranı (%)	1
O ₂ Basıncı (kg/cm ²)	7
İşlem Süresi (dk)	60dk
Sıcaklık (°C)	100°C
Kons. (%)	12

2.5.2.4. Şelatlama İşlemi (Q)

Hamurların ağartma işleminde genellikle son kademe olarak kullanılan peroksit kademesinden önce, metal iyonlarının uzaklaştırılması amacıyla hamurlara çelatlama işlemi uygulandı. Şelatlama işleminde şelatlayıcı olarak EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) kullanıldı. Hem kontrol hem enzim için 50'şer gr tam kuru hamur kullanılarak tablodaki şartlar altında şelatlama yapıldı (Tablo 10).

Tablo 10. Şelatlama şartları

ŞELATLAMA İŞLEMİ (Q)	
Şelatlayıcı	EDTA
Şelat Oranı (%)	%2
İlk pH	7
İşlem Süresi (dk)	60 dk
Sıcaklık (°C)	90°C
Kons. (%)	12

2.5.2.5. Hidrojen Peroksit Ağartması (P)

TCF ağartmasının son kademesi olarak hidrojen peroksit kullanıldı. Hidrojen peroksit ağartması Kappa numarasından ziyade parlaklık artışında etkili olan kimyasal bir maddedir. Bu aşamada %4 oranındaki NaOH, hidrojen peroksidin aktif olabilmesi için gereken alkali bir ortam oluşturma amacıyla kullanıldı ve bu son kademe de yine hem enzim hem kontrol grubu için 50'şer gram tam kuru hamur kullanıldı (Tablo 11).

Tablo 11. Hidrojen Peroksit ağartma şartları

HİDROJEN PEROKSİT AĞARTMASI (P)	
H ₂ O ₂ (%)	%5
NaOH (%)	%4
MgSO ₄ (%)	%1
İşlem Süresi (dk)	120 dk
Sıcaklık (°C)	80°C
Kons. (%)	12

2.5.3. Kağıt Hamuruna Uygulanan Analiz Yöntemleri

2.5.3.1. Kraft Lignin Degredasyon Zonunun Belirlenmesi

%0,25 oranında Kraft lignin içeren LBM (L: KH_2PO_4 1 g, $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ 0,5 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0,001 g, Yeast Extract 0,01 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,001 g, agar 16 g) bazal medyumunu hazırlandı ve 7 cm'lik petrilere döküldü. Daha sonra besiyeri içerisine steril cam çubukla 0,5 cm çapında kuyucuk açılarak içerisine 100 µl enzim koyuldu. Enzimin optimum çalışma sıcaklığına göre ayarlanan etüvde 1 gece bekletilen petride kuyucuğun etrafında açık renkli zon oluştuğu gözlemlendi ve kraft lignini degredasyonu gözle test edildi.

2.5.3.2. Kraft Lignin Degredasyon Oranının Belirlenmesi

%0,25 oranında kraft lignin içeren LBM bazal medyumunu kullanılarak yapılan deneyde sıvı besiyeri içerisine 100 µl enzim koyuldu. Enzimin optimum çalışma sıcaklığına göre ayarlanan etüvde 2 saat bekletilen medium, spektrofotometrede 465 nm'de ölçülerek enzimin kraft lignin degredasyonları tespit edildi. Kraft lignin degredasyon oranlarını belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı:

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

2.5.3.3. Kağıt Hamurunun Enzimle Muamelesi ve Kappa Numarası Tayini

Zonguldak Çaycuma'dan temin edilen ve orijinal Kappa numarası 45 olan Kraft hamurunun enzim aracılığıyla delignifikasyonu için 5 g tam kuru hamur %5 yoğunlukta olacak şekilde pH 4,5 olan sitrat tamponunda 120 dakika bekletildi. Enzim miktarı 0,5 kg/t hamur olacak şekilde ayarlandı.

Kappa numarası, 1 g tam kuru hamurun, belirli koşullar altında tükettiği 0,1 N KMnO_4 çözeltisinin mililitre cinsinden ölçüsüdür. Kappa numarası, hamur üretim yöntemi

ve kullanılan hammaddeye bağılı olarak belirlenen 0,15 faktörünün çarpılması sonucu elde edilen değer % olarak hamurda kalan lignini vermektedir. Bu nedenle Kappa numarası, ağartmada kullanılacak reaktiflerin miktarının hesaplanmasında ve ligninden arındırılmış hamur veriminin bulunmasında yararlanılan kullanışlı bir değerdir. Bu çalışmada Kappa numarası tayini TAPPI T 236 om-99 standardına göre her hamur için iki defa uygulandı.

2.5.3.4. Delignifikasyon Derecesinin Hesaplanması

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

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

Burada;

Ka: Delignifikasyon öncesi Kappa numarası

Kb: Delignifikasyon sonrası Kappa numarasıdır.

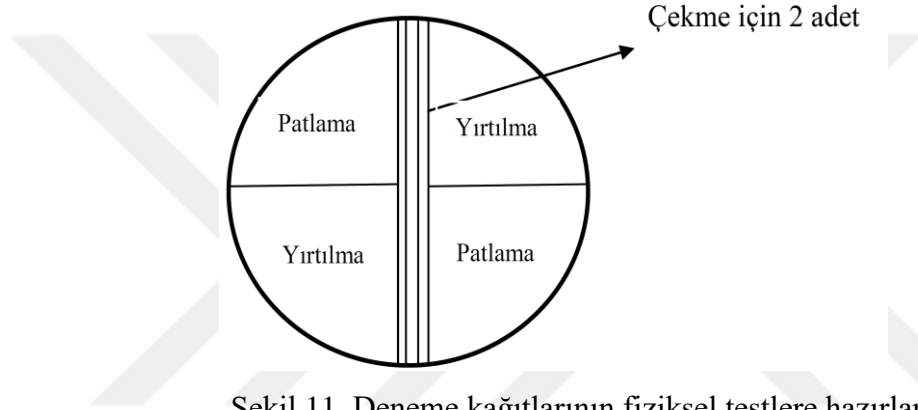
Her bir ağartma kademesinden sonra kağıt hamurları distile su ile yıkandı ve kondisyonlanması için bekletildikten sonra rutubet tayini yapıldı. Daha sonra uzaklaştırılan lignin miktarının belirlenip delignifikasyon derecesinin hesaplanabilmesi için kappa tayini yapıldı.

2.5.4. Kağıtlara Uygulan Fiziksel ve Optik Testler

Yapılan “XOQP” ağartması sonucu lakkaz enzimiyle muamale edilerek ağartma dizinine tabi tutulan hamurlardan elde edilen deneme kağıtlarının fiziksel ve optik özellikleri incelendi. 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.

2.5.4.1. 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 sıcaklık $23 \pm 3^\circ\text{C}$ ve bağıl nemi $\% 50 \pm 3$ olarak ayarlandı ve kondisyonlama odasında 24 saat süreyle bekletildikten sonra fiziksel testlere tabi tutuldu (Şekil 11).



Şekil 11. Deneme kağıtlarının fiziksel testlere hazırlanmasında oluşturulan kesim şablonu

2.5.4.2. Gramaj, Kalınlık, Yoğunluk ve Hacimlilik Tayinleri

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

2.5.4.3. 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 kaydedildi ve patlama indisi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

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

2.5.4.4. 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.

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

2.5.4.5. 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.

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

2.5.4.6. Deneme Kağıtlarına Uygulanan Optik Testler

Standart yöntemlere göre elde edilen kağıtların optik özelliklerinin tespitinde Elrepho 3300 model spektroskopik cihaz kullanılmıştır. Kağıtların parlaklık ölçümleri ISO/DIS 2470 standardına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

2.6. SEM Analizi

Çalışmada lakkaz ile muamele edilen kızılçam Kraft lignin hamurları tarama elektron mikroskopunda (SEM) incelendi. Kraft hamur örnekleri önce nemden tamamen uzaklaşacak şekilde etüvde kurutuldu. Ardından hamur, altın ile kaplandı. Daha sonra lifler 5kV'da incelendi (Roncero vd., 2000,2003; Nagar vd., 2013).

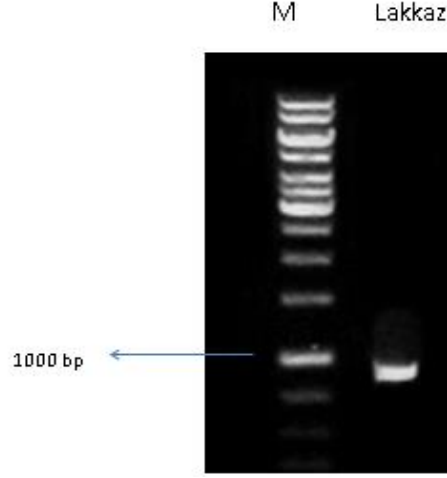
3. BULGULAR

3.1. Lignin Degrede Eden Bakterler

Trabzon ve çevresinden çeşitli toprak, gübre, petrole bulaşmış toprak, çürümüş odun ve bitki örneklerinden alınan ve 30°C' de, 2-3 gün süreyle lignin agar besiyerinde büyütülen izolatların, genomik DNA'ları izole edilerek 16S rDNA primerleriyle PCR gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri dizin analizine tabi tutuldu ve sonuçta izolatların *Klebsiella pneumonia* (*Klebsiella pneumonia* T1, T2, T3), *Bacillus* sp. (*Bacillus* sp. A1, A2, A3, A4), *Pseudomonas* sp. (*Pseudomonas* sp. B1, B2, B3), *Streptomyces* sp. (*Streptomyces* sp. C1, C2, C3, C4) ve *Enterobacter* sp. (*Enterobacter* sp. D1, D2) cinslerine ait olduğu tespit edildi. Daha sonra guaiacol ile muamele edilen kolonilerden *Bacillus megaterium*'a ait kolonilerin 4 saatin sonunda mor rengini alması ile *Bacillus megaterium*'un lakkaz aktivitesine sahip olduğu teyit edildi ve çalışmaya bu bakteri ile devam edildi. *Bacillus megaterium* ile yapılan analizde, lignin degradasyon hızının %57 olduğu belirlendi.

3.2. *Bacillus megaterium*'a Ait Lakkazın Gen Dizisinin Belirlenmesi

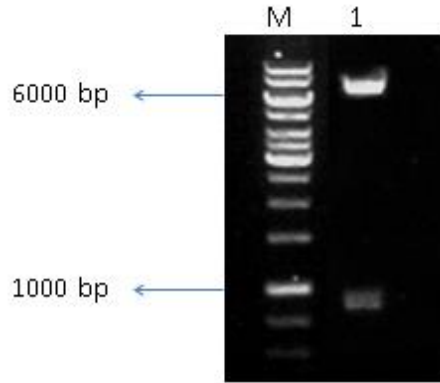
Bacillus megaterium'un genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak Lak0911F ve Lak0911R primerleri ile elde edilen PCR ürünü, pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlanarak rekombinant plazmit dizin analizine tabi tutuldu. Elde edilen diziler Genbank'ta (NCBI, NIH, Washington, DC) var olan verilerle karşılaştırıldı ve sonuçta 822 nt'lik bu dizinin lakkaz genine ait olduğu belirlendi. (Elde edilen nükleotit sırası Ek-1'dedir.) (Şekil 12).



Şekil 12. M: Marker, Lakkaz genine ait DNA fragmentinin PCR görüntüsü

3.3. Lakkaz Geninin pMA0911 Shuttle Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu

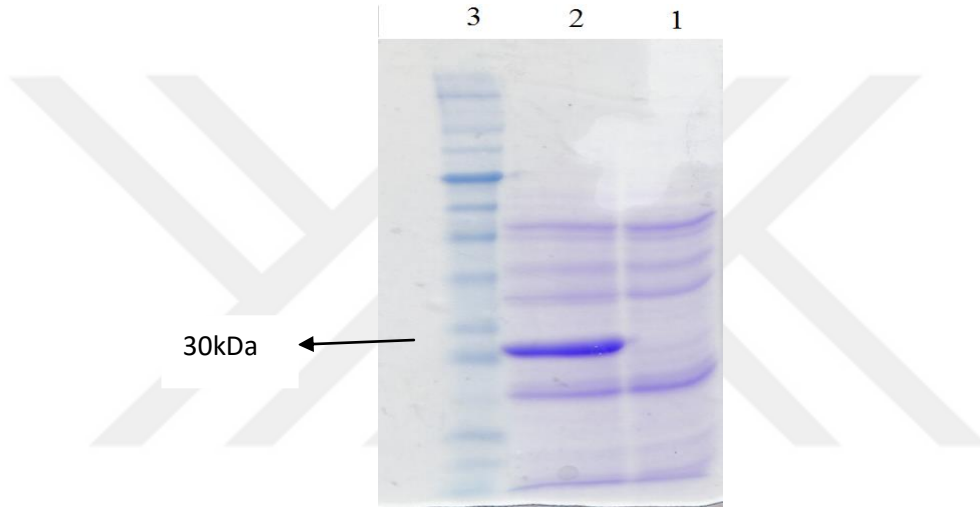
pGEM-T vektörüne klonlanmış olan lakkaz geni ve pMA0911 vektörünün her ikisi de *Bam*HI ve *Eco*RI restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesildi. Ardından %1,0'luk agaroz jelde yürütülerek gen bölgesi ve pMA0911 vektörü jelden çıkarma kiti ile jelden çıkarılarak ligasyonları yapıldı. Elde edilen rekombinant plazmit, ekspresyon hücresi *Bacillus* WB800 'ye aktarıldı (Şekil 13).



Şekil 13. M: Marker, 1: Lakkaz içeren pMA0911 vektörünün kesimi

3.4. Lakkaz Proteininin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Gösterilmesi

Bacillus WB800 ekspresyon hücresine transforme edilen lakkaz proteini, hücrelerin 100 µg/ml kanamisin içeren mısır nişastalı besiyerideki 36saatlik inkübasyonu sonucunda elde edildi ve lakkaz içermeyen *Bacillus* WB800 proteiniyle birlikte %12'lik SDS poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülendi ve ağırlığı yaklaşık 30 kDa olarak belirlendi (Şekil 14).

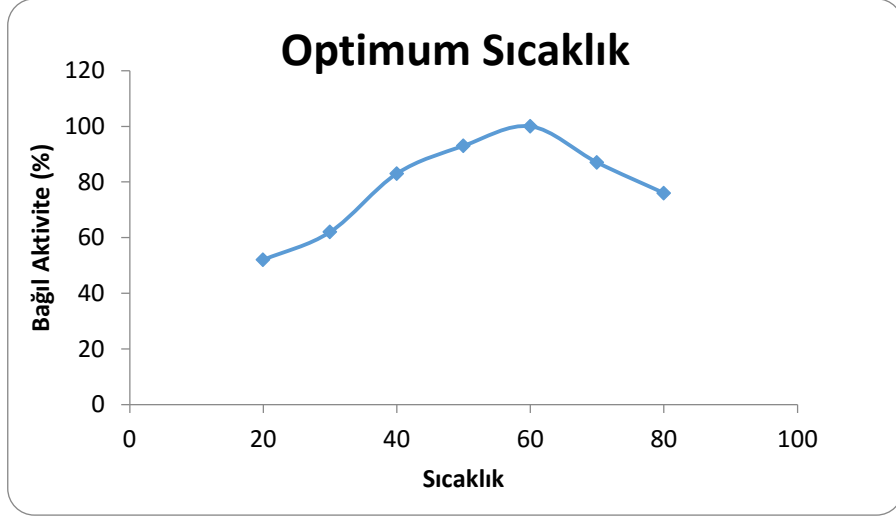


Şekil 14. Lakkaz proteininin SDS görüntüsü 1: Marker, 2: Lakkaz içeren *Bacillus* WB800 süpernatantı 3: Lakkaz içermeyen *Bacillus* WB800 süpernatantı

3.5. Lakkazın Biyokimyasal Karakterizasyonu

3.5.1. Optimum Sıcaklık

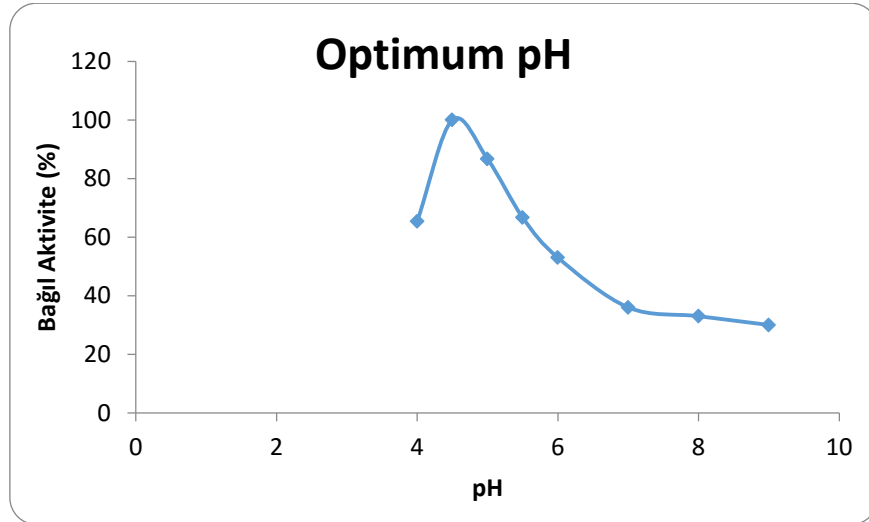
Lakkazın optimum sıcaklığını belirlemek için, lakkaz aktivitesi için 20, 30, 40, 50, 60, 80°C'deki sıcaklıklarda reaksiyon ölçümleri yapıldı ve bir sıcaklık-aktivite grafiği oluşturuldu. Oluşan grafiğe göre, elimizde bulunan *Bacillus megaterium*'a ait lakkazın optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlendi (Şekil 15).



Şekil 15. *Bacillus megaterium*'a ait lakkazın optimum sıcaklığı

3.5.2. Optimum pH

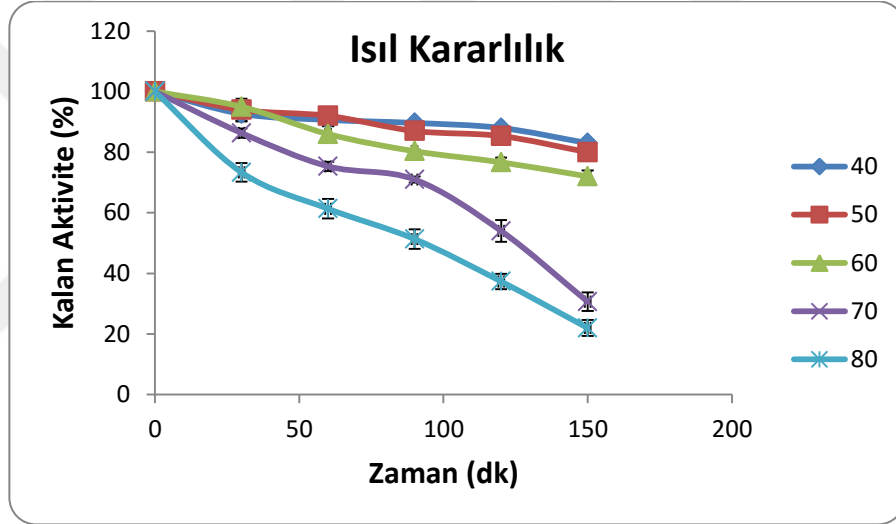
Enzimler üzerindeki önemli etkilerden biri olan pH'nın lakkazla ilişkisini belirlemek için pH4,0-9,0 aralığındaki tamponlar kullanılarak gerçekleştirilen ayrı ayrı reaksiyonların ölçümleri sonucu pH-aktivite grafiği oluşturuldu. Bu grafiğe göre, lakkazın en iyi aktiviteyi pH 4,5'da gösterdiği görüldü (Şekil 16).



Şekil 16. *Bacillus megaterium*'a ait lakkazın optimum pH'sı

3.5.3. Isıl Kararlılık

Lakkazın kararlılığına ısının etkisini incelemek için enzim 150 dakika süreyle 50 mM sitrat (pH 4,5) tamponunda, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C’de inkübe edildi. İnkübasyon boyunca belirli zaman aralıklarında tüplerden alınan örneklerde kalan aktivite,optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite testine göre ölçüldü. Deney başlangıcında yani sıfırıncı dakikada tüplerden alınan örneklerin aktivitesi ile istenilen zamanlarda alınan örneklerdeki aktiviteler kıyaslanarak bir ısıl kararlılığı grafiği çizildi (Şekil 17).

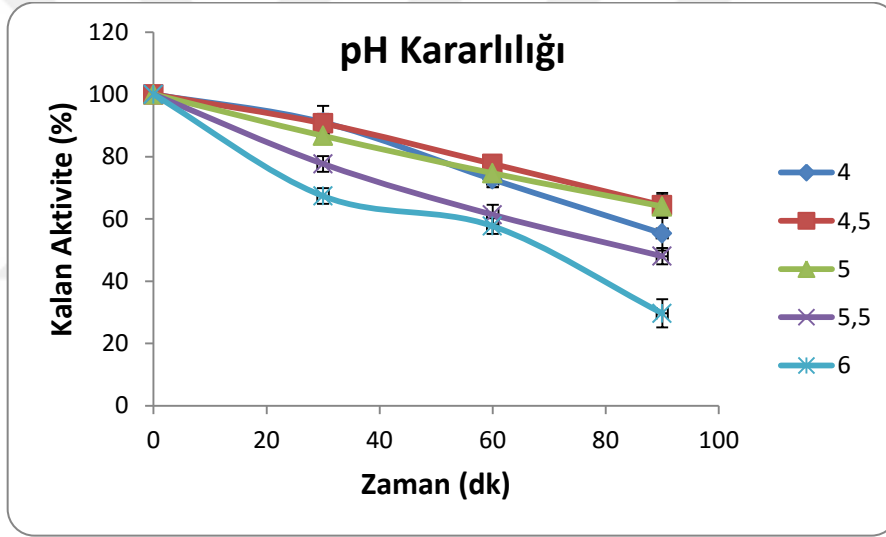


Şekil 17. Lakkaz ısıl kararlılığı

Lakkaz ısıl kararlılık grafiğine bakıldığında enzimin 40°C ve 50°C’de kararlı olduğu belirlendi. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 60°C’de 60. dakikadan sonra bir miktar düşüş olduğu, 150. dakikada ise enzim aktivitesinin %74 olduğu tespit edildi. 70°C ve 80°C’de ise enzim aktivitesinde önemli bir düşüş olduğu, 80°C’de 150 dakika sonunda enzim aktivitesinin %20 olduğu tespit edildi.

3.5.4. pH Kararlılığı

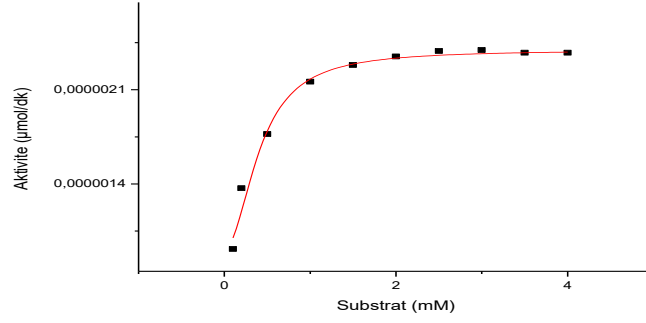
Lakkaz pH kararlılığını belirlemek amacıyla enzim pH'sı 4,0- 4,5-5,0-5,5 ve 6,0 olan 50 mM sitrat tamponlarında, enzimin en iyi çalıştığı optimum sıcaklıkta 150 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite testine göre ölçülerek enzimin en kararlı olduğu pH'nın, optimum pH'sı olan 4,5'e yakın olan pH değerleri olduğu görüldü. pH 4,0 ve 4,5'de ilk 30 dakikada enzim aktivitesinde önemli bir düşüş olmadığı belirlendi. 30. dakikadan sonra enzimin aktivitesinin kısmen azaldığı ve 90 dakika sonunda enzim aktivitesinin yaklaşık %68'e düştüğü tespit edildi (Şekil 18).



Şekil 18. Lakkazın pH kararlılığı

3.5.5. Lakkazın K_m ve V_{max} Değerleri

Bacillus megaterium lakkazının substrat olarak ABTS varlığında substrat-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis- Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Substrat olan ABTS için çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x-eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek K_m değeri $0,41 \pm 0,16$ mM, y-eksenini kestiği nokta ise $1/V_{max}$ 'a eşitlenerek V_{max} değeri $2,39583E-6$ U/mg olarak hesaplandı (Şekil 19).



Şekil 19. *Bacillus megaterium* 'a ait lakkazın Michaelis- Menten grafiği

3.6. Kağıt Hamuru Ağartma Çalışmalarıyla İlgili Bulgular

3.6.1. Kağıt Hamurunun Rekombinant Bakteri ile Muamele Şartlarının Optimizasyonu

48 saatlik 25 ml bakteri kültürü, 5 g tam kuru hamur içeren 500 ml MSM besiyerinde, farklı sıcaklık ve pH'larda, 250 rpm'de 7 günlük süreyle muamele edildi. Ardından herbir faktörün Kappa numaraları belirlenerek optimum şartlar belirlendi (Tablo 12).

Tablo 12. Rekombinant bakteri ağartma sonuçları

Rekombinant Bakteri	Sıcaklık	KAPPA NO.	pH	KAPPA NO.
Lakkaz Genini içeren <i>Bacillus</i> suşu	30°C Kontrol	43,49±0,03	4,0 Kontrol	44,55±0,21
	30°C	43,44±0,06	4,0	44,47±0,16
	40°C Kontrol	44,13±0,05	5,0 Kontrol	44,46±0,14
	40°C	44,10±0,11	5,0	44,35±0,19
	50°C Kontrol	44,62±0,08	6,0 Kontrol	44,74±0,06
	50°C	44,45±0,06	6,0	44,62±0,11
	60°C Kontrol	44,23±0,13	7,0 Kontrol	44,65±0,09
	60°C	44,18±0,10	7,0	44,64±0,08

Elde edilen veriler incelendiğinde Lakkaz genini içeren rekombinant bakterinin optimum koşulları 50 °C ve pH 6,0 olarak belirlendi. Elde edilen sonuçların standart sapmaları dikkate alınarak oluşturulan tabloda verilerin doğruluğu teyit edildi. Bu veriler doğrultusunda önceki çalışmada belirtildiği gibi kontrol grubu ve deney grubu arasında belirgin bir fark olmadığı ve rekombinant bakterilerin kağıt hamurunun Kappa numarasını fazla etkilemediği görüldü. Bu sonuçlardan yola çıkarak kağıt hamurların ağartılmasına bakterilerle değil saf enzimlerle devam edildi.

3.6.2. Kağıt Hamurunun Enzim ile Muamele Şartlarının Optimizasyonu

Enzimin optimum sıcaklık ve pH şartları altında kağıt hamuru, farklı enzim, hamur ve ABTS konsantrasyonlarında enzim ile muamele edildi ve Kappa numaraları belirlendi (Tablo 13).

Tablo 13. Lakkaz optimizasyon sonuçları

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

Tablo 13’de verilen sonuçlara bakıldığında lakkaz için optimum şartların %5 hamur yoğunluğu, 6 U/g enzim miktarı ve 2 mM ABTS konsantrasyonu olduğu belirlendi. Optimum şartlar belirlendikten sonra kağıt hamurlarına ağartma dizini uygulandı ve ardından fiziksel ve optik özellikleri tespit edildi. Ağartma dizini sonunda kullanılan

enzimin etkisinin sağlıklı bir şekilde belirlenebilmesi için ağartma basamaklarında enzimli ve enzimsiz olmak üzere 2 grup üzerinden çalışma sürdürüldü. Ayrıca atık kağıtları içinde bu optimizasyonlar kullanıldı.

3.7. Kağıt Hamuruna Uygulanan Analizlerin Bulguları

3.7.1. Kağıt Hamurunun ‘XOQP’ Delignifikasyon Sonuçları

Kağıt hamuru, her bir kademede kontrol kullanılmak üzere sırası ile enzimatik ağartma, oksijen delignifikasyonu, şelatlama ve Hidrojen peroksit ağartma işlemlerinden geçirildi. Kappa numaraları ve delignifikasyon %'lik dereceleri hesaplandı (Tablo 14).

Tablo 14. Kızılçam kraft hamuru ve atık kağıt hamuru ağartma sonuçları

	Ağartma tipi	Kappa no:	Delignifikasyon derecesi (%)
Atık Kağıdı Hamuru	X kontrol	26,23±0,15	%5,10±0,13
	X	24,89±0,12	
	O kontrol	16,87±0,14	%16,36±0,15
	O	14,11±0,15	
	P kontrol	10,14±0,14	%17,75±0,22
	P	8,34±0,13	
	Ağartma tipi	Kappa no:	Delignifikasyon derecesi (%)
Kızılçam Kraft Hamuru	X kontrol	44,34±0,12	% 5,05±0,31
	X	42,10±0,17	
	O kontrol	23,33±0,08	% 27,77±1,18
	O	16,85±0,27	
	P kontrol	16,11±0,05	% 19,49±0,49
	P	12,97±0,04	
X: enzimatik delignifikasyon, O: Oksijen delignifikasyonu, P: Hidrojen peroksit ağartması			

Lakkazın degradasyon oranı Kızılcam Kraft hamurunda % 63,7'den %69,1'e, atık kağıt hamuruda ise %61,3'den %66,49'a yükseldiği gözlemlendi.

3.7.2. Kraft Lignin Degradasyon Yarıçapı

%0,25 lignin içeren LBM besiyeri 7cm'lik petrilere döküldü ve petrilere 0,5cm kuyucuklar açıldı. Kuyucuklara 100µl enzim koyularak bir gece enzimin optimum sıcaklığında inkübe edildi. Sonuç olarak, lakkaz bulunduğu kuyucukta yarıçapı 2mm olan degradasyon zonu tespit edildi.

3.7.3. Kraft Lignin Degradasyon Oranı

%0,25 oranında lignin içeren LBM sıvı besiyerine 100µl enzim eklendi ve 2 saat enzimin optimum sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından spektrofotometrede 465nm'de yapılan ölçüm sonucu

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

formülüne göre, Kızılcam Kraft hamurunun degradasyon oranı %7 olarak bulunmuştur.

3.8. Kağıt Hamuruna Uygulanan Fiziksel Testler

Bu çalışma, ağartmada enzim kullanımının kontrol grupları ile karşılaştırılması temeline dayandığından deneme kağıtları yapılmadan önce dövme işlemi yapılmamıştır. Dövme işlemi yapılması direnç özelliklerini artırmaktadır. Tablo 14'da verilen bulgulara göre kontrol ve enzim ilaveli ağartmalar karşılaştırıldığında, enzim kullanılan hamurlarda çekme indisi, kopma uzunluğu, gramaj ve kalınlık kontrole göre artış göstermiştir. Patlama indisi ve yırtılma indisi enzim ilavesi ile azalma göstermektedir. Hacimlilik ve yoğunluk değerlerinde de önemli derecede bir değişim belirlenmemiştir. Bu tabloya genel olarak

bakacak olursak enzim kullanımını fiziksel özelliklerde belirli bir değişikliğe sebep olmamıştır (Tablo 15).

Tablo 15. Enzim uygulanan kızılçamve atık kağıdhamurlarının fiziksel özellikleri

Enzim adı	Kızılçam Kraft kağıt hamuru uygulaması		Atık kağıt hamuru uygulaması	
	Kontrol	Enzim	Kontrol	Enzim
Çekme indisi (Nm/g)	2,69±0,13	2,83±0,08	2,67±0,15	2,72±0,16
Patlama indisi (kPa.m ² /g)	4,11±0,21	3,98±0,23	4,15±0,14	4,10±0,22
Yırtılma indisi (mN.m ² /g)	2,89±0,18	2,33±0,11	2,56±0,13	2,44±0,16
Kopma uzunluğu (km)	2,74±0,14	2,82±0,09	2,62±0,16	2,71±0,17
Kalınlık (mikron)	134,33±0,1	135,88±0,28	135,46±0,15	135,39±0,2
Gramaj (gr/ m ²)	70,57±0,15	73,33±0,19	71,67±0,18	72,12±0,21
Yoğunluk (gr/cm ³)	0,52±0,11	0,55±0,17	0,54±0,16	0,55±0,21
Hacimlilik (cm ³ /gr)	1,88±0,15	1,87±0,12	1,79±0,13	1,76±0,11

3.9. Kağıt Hamuruna Uygulanan Optik Testler

ISO parlaklık, kappa numarasına bağlı olarak değişiklik gösterir. Kappa numarası ne kadar düşerse, parlaklık o kadar fazla demektir. Bu aşamada, ağartma uygulanan kızılçam Kraft ve atık kağıt hamurunun ISO parlaklık değerleri Tablo 16’de gösterildiği gibidir.

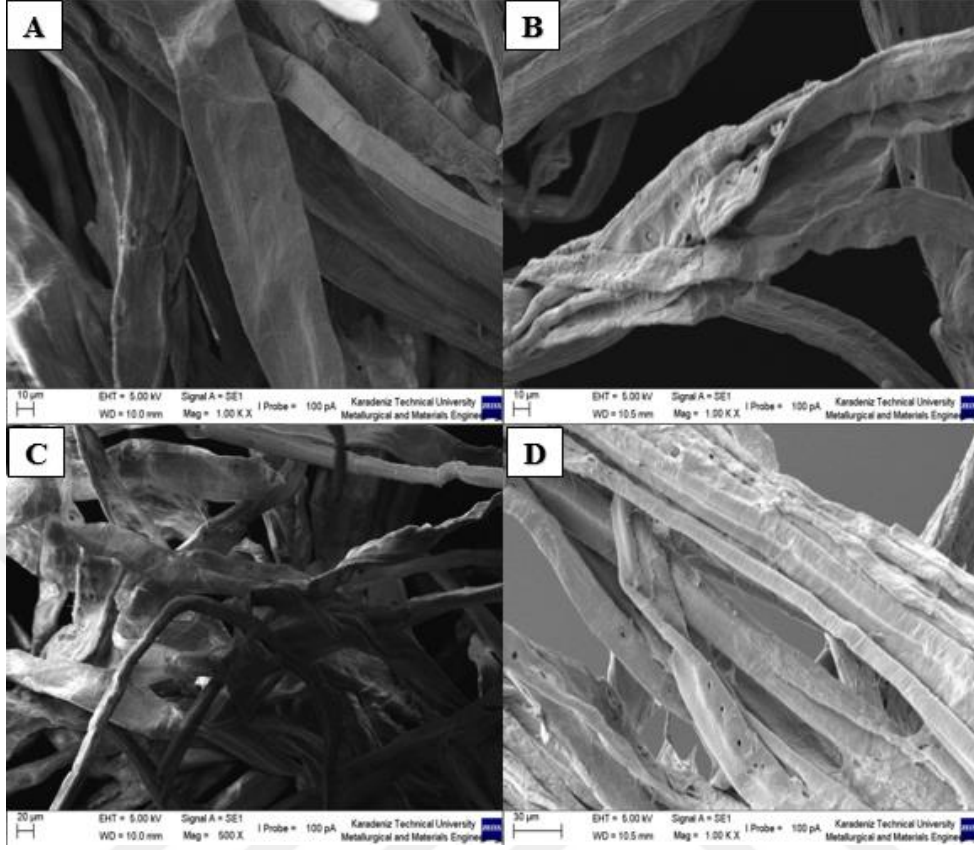
Tablo 16. Enzim uygulanan kraft hamurlarının optik özellikleri

Lakkaz		Kızılçam Kraft Hamuru	Atık Kağıt Hamuru
ISO parlaklık (%)	Kontrol	51,17±0,12	53,21±0,16
	OQP		
	Enzim	56,86±0,21	56,77±0,12
	XOQP		

3.10. SEM Analizi Sonuçları

Lakkaz ile Kraft kağıt hamurları muamele edildiğinde hamur liflerinde morfolojik değişimler meydana gelmektedir. Enzimden kaynaklanan bu değişimler, çatlaklar, pul, delik ve ipliklenme gibi morfolojik bozulmalardır.

Kızılçam Kraft hamuru ve atık kağıt hamuru ile optimum koşullar altında yapılan enzimatik ağartma sonucu hamurların 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 20).



Şekil 20. Kızılcam Kraft ve atık kağıt hamurunun SEM görüntüleri A: Kontrol kızılcam Kraft hamuru, B: Lakkaz uygulanmış kızılcam Kraft hamuru, C: Kontrol atık kağıdı, D: Lakkaz uygulanmış atık kağıdı

Şekil 24’de verilen Elektron mikroskobu taraması (SEM) görüntülerine bakıldığında her iki hamur türünde enzim muamelesi yapılmış liflerin boyutlarında daralma meydana geldiği görüldü. Şekil B ve D’de bazı liflerde lignin difüzyonu nedeniyle oluşan delikler görüldü. Şekil A ile B ayrı ayrı incelendiğinde, kağıt hamur liflerinin enzim muamelesi ile yüzeylerinde pürüzlerin meydana geldiği ve bazı liflerde dallanmalar olduğu görüldü. Aynı şekilde Şekil C ve D ayrı ayrı incelendiğinde liflerin yüzeyinde pürüzlenme meydana geldiği, sıkı dizilmiş olan liflerin daha gevşek şekilde dizilmiş olduğu görüldü. Bu da lakkazın hamur lifleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.

4. TARTIŞMA

113Z741 nolu TÜBİTAK projesiyle desteklenen bu çalışmada, lakkaz klonlanmış, ekspres edilmiş, kısmi karakterizasyonu yapılmış ve enzimin kağıt hamuru ve atık kağıt üzerindeki lignin uzaklaştırıcı etkisi araştırılmıştır. Bu proje, kağıt ve kağıt sanayinde zararlı bir kimyasal yerine enzim kullanılması ile Moleküler Biyoloji'nin, endüstriyi ilgilendiren bir araştırması olması açısından önemlidir.

İlk kez 1883'de elde edilen lakkaz, çalışılan en eski enzimler arasında yer alır. Doğada yayılışı ve yüksek kararlılık ve düşük spesifite gibi avantajlar sunan moleküler yapısı sayesinde, endüstrinin çoğu alanında kullanılan ve moleküler ve biyokimyasal yapısı çok iyi araştırılmış olan bir enzimdir. Lakkaz, oksidoredüktaz grubu bir enzimdir; çeşitli aromatik bileşenleri, fenoller, aminofenoller, polifenoller, o- ve p-difenoller, poliaminleri, methoksifenoller, arildiaminesleri, aromatik aminleri, tioller hem de iyodin ve ferrosiyadin iyonları gibi inorganik bileşenleri okside edebilmektedir (Christopher, 2014). Gıda, kozmetik, medikal, tekstil, petrokimyasal endüstri gibi endüstrinin çoğu alanında kullanılan lakkaz, endüstriyel enzim sınıfına taşıyan özellikleri; iyi derecedeki oksidasyon özelliği, içerdiği karbohidrat yapısı sayesinde sahip olduğu yüksek derecede kararlı yapısı, her yerde bulunur oluşu ve düşük substrat spesifitesidir.

Lakkaz, birçok organizmada yayılış gösterdiği için, moleküler özellikleri ve çalışma şartları açısından oldukça çeşitli özelliklere sahiptir. Lakkaz, ilk olarak bitkilerde keşfedilmiş olmasına rağmen bitkilerin kompleks yapısından dolayı bu alandaki çalışmaları kısıtlı kalmıştır. 1896'da mantarlarda keşfi ile ve buradaki yüksek redoks potansiyeli (+800 mV) sayesinde mantarlar alanında birçok çalışma yapılmıştır. Lakkazın moleküler ve biyokimyasal yapıları mantarlarla yapılan çalışmalarda ayrıntılı olarak ortaya konulmuştur. Fakat mantarların pH ve sıcaklık gibi uygun olmayan çalışma şartları, çalışma zorluğu, kontaminasyon riskleri, kompleks yapıları ve moleküler çalışma alanındaki yetersizliği gibi olumsuz yönleri ile endüstriyel çalışmalar için uygun olmayışları, araştırmacıları bakteriyel kaynaklı lakkazları araştırmaya yöneltmiştir. Bakteriyel lakkazlar düşük redoks potansiyeline (0,45-0,54 V) sahip olsalar da, yüksek sıcaklık (60°C' de 66 sa), pH (7,0-9,0) ve tuz konsantrasyonlarında aktif ve stabil olmaları nedeni ile endüstriyel alanlarda tercih edilmektedirler. Bakteriyel lakkazlar ilk olarak

1993’de *Azospirillum lipoferum* ‘da keşfedilmiş ve *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lavendulae*, *S. cyaneus* ve *Marinomonas mediterranea* gibi bakterilerde karakterize edilmiştir (Givaudan vd.,1993). En iyi araştırma ise *Bacillus subtilis* CotA lakkazı üzerinde yapılmıştır.

Bacillus subtilis CotA’nın moleküler ağırlığı 65 kDa’dur. Literatürde bulunan diğer lakkazların moleküler ağırlıkları 50 kDa ile 209 kDa arasında değişmektedir. Bu çalışmada kullanılan *Bacillus megaterium* kaynaklı lakkazın moleküler ağırlığı ise 30 kDa olarak tespit edilmiştir. Bu, endüstride kullanılan enzimlerin düşük moleküler ağırlıkta olmasının istenen bir özellik olması açısından bir avantaj olarak görülebilir.

Fenolik substratlar için lakkaz enzimlerinin pH bağımlılıkları çan eğrisi şeklindedir. Bunun nedeni ise pH’daki artışın, fenolik bileşiklerin pH’ya bağlı olarak fenol-fenolat dönüşümleri nedeniyle redüksiyon potansiyelindeki bir düşüşe bağlanırken, aktivitenin pH ile olan yarışmacı körelmesi ise trinuklear kümedeki hidroksit inhibisyonuna bağlanmıştır (Adams ve Ghiorse, 1987). Çan eğrisi şeklindeki eğrinin maksimum noktası ise bu çalışmada kullanılan *Bacillus megaterium*’da (4,5 pH) olduğu gibi genellikle asidik pH’larda meydana gelmektedir. Örneğin, Dubé ve ark. (2008) tarafından tekstil sektöründe ticarileşmiş olan *S.coelicolor* kaynaklı lakkazın (SLAC), ABTS’ye karşı pH’sı 4,0 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan *Bacillus megaterium* lakkazında olduğu gibi (60°C), lakkaz enzimleri genel olarak 70 °C’ye kadar optimum aktivite gösterirken, optimum sıcaklığın 70 °C’ nin üzerine çıkabildiği örnekleri de mevcuttur. Bu örneklerden biri olan *B.subtilis* endospor kılıf proteini olan CotA, substrat olarak ABTS’ye karşı en yüksek lakkaz aktivitesini 75°C’de göstermiştir. (Martins vd., 2008). *Bacillus megaterium*’da ise lakkaz, 40 ve 50°C’lerde kararlı iken enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 60°C’de 60. dakikadan sonra bir miktar düşüş gösterdiği, 150. dakikada ise enzim aktivitesinin %74 olduğu tespit edilmiştir. 70°C ve 80°C’de ise enzim aktivitesinde önemli bir düşüş olduğu, 80°C’de 150 dakika sonunda enzim aktivitesinin %20 olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan lakkazın optimum pH ve sıcaklık açısından, literatürdeki fungal lakkazlarla karşılaştırıldığında iyi, bakteriyal lakkazlarla ise uyumlu olduğu görülmektedir. Kağıt endüstrisinde ticarileşen diğer enzimlerle karşılaştırıldığında ise 45 – 55 °C Cartazyme, 50 – 60 °C Irgazyme, 50 °C Ecopulp, 50 – 55 °C Pulpzyme, 45 – 50 °C Resinase, 30 – 40 °C Bleachzyme, Amano90 ve Xylanase GS35 enzimleri arasında iyi bir sıcaklık stabilitesine sahip olduğu görülmektedir.

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, odunun ve kağıt hamurunun işlenmesi, ağartılması, kağıdın yapımı ve atık suyun giderilmesi gibi işlemleri içerir. Aquazym[®], BAN (Bacterial Amylase Novo), Fungamyl[®] Novozym[®], 342 Pulpzyme[™], HC Resinase[®] A 2X, MetZyme, Lignozym[®] kağıt endüstrisinde ticarileşen enzim markalarıdır. Bu markalar içinde, kağıda sertlik veren nişasta moleküllerini ayrıştıran amilazlar, boya uzaklaştıran selüloz, hemiselüloz (xylanase) ve esterazlar, zift arıtımı için lipazlar ve atık suyun giderilmesinde kullanılan proteazlar yer almaktadır. Bunların yanında lignin yapılarını uzaklaştırmak üzere son yıllarda peroksidazlar ve lakkaz ile yapılan çalışmalar artmaktadır. LMS sisteminin gelişmesiyle birlikte peroksidazlardan daha avantajlı hale gelen lakkaz kağıt endüstrisinde ümit vadeden önemli bir enzim haline gelmiştir. Kağıt hamurundan lignini uzaklaştırma işlemi için öncelikle ligninin %90'a etki eden mekanik ya da termal etkiler uygulanmaktadır. Enzimatik uygulama bu aşamanın ardından kalan lignin kalıntılarını uzaklaştırmak üzere oksijen, peroksit, ozon ve peroksi asitler gibi oksijen bazlı ağartıcılarıyla birlikte kullanılmaktadır. Bu sistem, toksik ve mutajenik özellikteki kloroorganik bileşiklerin yerine kullanılması açısından çok büyük önem taşımaktadır. Kağıt endüstrisinde, yüksek enerji tasarrufu, ekonomik ve çevre dostu enzimatik uygulamalar için yüksek pH ve sıcaklıkta kararlı olan enzimler araştırılmaktadır. Günümüzde var olan ticarileşmiş enzimlerin kullanılabilirlikleri pH ve sıcaklık aralıklarına bakıldığında ise; 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 ve bu çalışmada kullanılan lakkazın da ticari enzimlerle uyumlu olduğu görülmektedir (Techapun ve ark., 2003).

Kappa numaralarının hesaplanması için gereken şartlar için hem rekombinant bakteriye göre hem de enzime göre denenen optimizasyon şartları belirlenirken bakterinin kağıt hamuruna önemli etkisi olmadığına karar verilmiş ve çalışmaya enzime uygun olan optimizasyon şartlarıyla devam edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan kızılçam kağıt hamurunun Kappa numarası yüksek (45), ağartılması zor, yoğun lignin içeriğine sahip ve literatürde çok fazla çalışmanın bulunmadığı bir hamur türüdür. Genel olarak yapılan çalışmalarda, ağartma işlemi daha kolay olması açısından Kappa numaraları düşük (14,2) ökaliptus hamurları kullanılmaktadır. *Streptomyces cyaneus* lakkazıyla mediatör olarak ABTS kullanılarak Kappa numarasının % 18,4 ve buğday samanında çalışılan *Gammaproteobacterium* ile %

21.1, ve *Pynoporus cinnabarinus* ile yine ökaliptusta kappa %7 oranında düşürüldüğü çalışmalar bulunmaktadır. 2015’de Sondhi ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir makaleye göre, *Bacillus* türüne ait lakkazın kappa numarasına etkisinin farklı şartlar altında ve farklı tipteki hamurlar üzerine çeşitli indükleyiciler uygulanarak kappa numarasında %47 ‘ye varan örnekleri bulunmaktadır. Kızılçam Kraft hamurunun delignifikasyon derecesinin % 63,7’den %69,1’e, atık kağıt hamurunun derecesinin ise %61,3’den %66,49’a yükseldiği gözlemlendi. Bu sonuçlara göre atık kağıdı ile kızılçam Kraft hamuru arasında çok önemli bir farklılık olmadığı görülmüştür. Buna göre, yapılan çalışmada kağıt hamurlarının Kappa numarası arttığında delignifikasyonunun güçleştiği görülmektedir.

Yapılan literatür çalışmalarına bakıldığında enzimlerin daha çok kağıt hamurlarının parlaklığını arttırdığı fiziksel özelliklerini ise belirli derecede değiştirmedikleri tespit edilmiştir. Camarero ve ark. 2003 yılında lakkaz ile yaptıkları bir çalışmada enzim uygulanan kağıtların patlama indeksinde belirli bir değişiklik gözlemlenmezken, enzim uygulamasının yırtılma ve çekme indeksini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Yine Ibarra ve ark. 2006 yılında lakkaz kullanarak bir ağartma dizini uygulamışlar ve bu çalışma sonucunda enzim uygulamasının patlama ve yırtılma indeksinde bir değişiklik meydana getirmezken çekme indeksini düşürdüğünü belirlemişlerdir.

Kızılçam Kraft hamurunda ‘XOQP’ ölçülen parlaklık değeri %56,86 olarak, atık kağıdında da ISO parlaklık derecesi %56,77 olarak bulunmuştur. Kappa numaralarında da çok önemli farklılık olmayan hamurların parlaklık numaraları da yakın çıkmıştır. Parlaklık sonuçlarına bakıldığında, Kappa numarasıyla parlaklık arasında bir orantı olduğu görülmektedir. Örneğin, *Pynoporus cinnabarinus* ‘da kappa numarası 5 birimlik oranındaki düşüşte parlaklığın %91 oranında artarken, yapılan bu çalışmada 2 birimlik düşüşte %56,86 oranında arttığı görülmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *Bacillus megaterium*'a ait lakkaz geni klonlanıp ekspres edilerek vekısmi olarak karakterize edilerek enzimin kraft hamuru ve atık kağıt üzerindeki ağartma etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada öncelikle Trabzon ve çevresinden çeşitli toprak, gübre, petrole bulaşmış toprak, çürümüş odun ve bitki örneklerinin ligninli besiyeride büyüyen kültürleri içerisinde lignolitik enzim içerme ihtimali olan izolatlar belirlendi. Bunun için önce ligninli besiyeride büyüyen koloniler saflaştırıldı. Ardından 16S rRNA gen bölgeleri çoğaltılarak dizin analizi gerçekleştirildi. 16S rRNA dizin analizi sonuçlarına göre elde edilen izolatların *Klebsiella pneumonia* (*Klebsiella pneumonia* T1, T2, T3), *Bacillus* sp. (*Bacillus* sp. A1, A2, A3, A4), *Pseudomonas* sp. (*Pseudomonas* sp. B1, B2, B3), *Streptomyces* sp. (*Streptomyces* sp. C1, C2, C3, C4) ve *Enterobacter* sp. (*Enterobacter* sp. D1, D2) cinslerine ait olduğu belirlendi. Ardından bu türlerin kolonileri üzerinden lakkaz aktivitesi varlığı araştırılıp yeterli lignin degradasyon hızına sahip olan izolatlar seçildi. Bu izolatlardan lakkaz pozitif ve %57 oranında lignin degradasyon hızına sahip olan *Bacillus megaterium* ile çalışmaya devam edildi.

Dizin analizi sonucu 822 nt uzunluğa sahip olduğu tespit edilen *Bacillus megaterium*' un lakkaz geni, bir ekspresyon vektörü olan pMA0911 shuttle vektörüne aktarıldı ve oluşan rekombinant plazmit *Bacillus* WB800 hücresine transforme edildi ve ekspresyonu yapıldı. Yapılan kinetik analizler sonucu lakkazın optimum pH'sı 4,5 ve optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlendi. Enzimin ısı kararlılığı ve pH kararlılığının, optimum pH ve sıcaklığındaki değerlere yakın olduğu görüldü. Buna göre enzim pH 4,5 ve 4,0' de, 40°C, 50°C ve 60°C' lerde kararlı iken, 70 ve 80°C' de aktivitesini önemli derecede kaybettiği gözlemlendi. Ayrıca SDS poliakrilamid jel görüntüsüyle de desteklenen lakkazın moleküler ağırlığının 30 kDa olduğu tespit edildi.

Lakkazın kağıt hamuru uygulamaları ağartma çalışmalarını, analiz yöntemlerini, fiziksel ve optik testlerini içermektedir.

Ağartma çalışmaları içerisinde kraft ve atık kağıt hamurunun enzim ile muamelesinin optimizasyon şartlarına bakıldı ve ağartma sonucu olarak en iyi düşüşün %5 hamur yoğunluğu, 6 U/g enzim miktarı ve 2 mM ABTS konsantrasyonunda olduğu belirlendi.

Lakkaz kullanılarak yapılan analiz yöntemleri içinde, Kızılçam Kraft hamuru ve atık kağıt hamurundaki deşredasyon zonu, deşredasyon oranı ve ‘XOQP’ delignifikasyon dereceleri hesaplandı. Kızılçam Kraft hamurunun delignifikasyon derecesinin % 63.7’ den %69.1’e, atık kağıt hamurunun derecesi ise %61,3’den %66,49’a yükseldiği gözlandı.

Lakkaz uygulanan Kraft ve atık kağıt hamuruna yapılan fiziksel testler içinde, çekme indisi, patlama indisi, yırtılma indisi, kopma uzunluğu, kalınlık, gramaj, yoğunluk, hacimlilik özellikleri incelendi, sonuç olarak fiziksel özelliklerde belirgin bir değişim olmadığı görüldü.

Enzim kullanılarak elde edilen kağıt hamuru ile yapılan optik testler; ISO/DIS 2470standartlarına uygun olarak yapılan parlaklık ölçümleridir. Kızılçam Kraft hamurunda ‘XOQP’ ölçülen parlaklık değerı %56,86 olarak, atık kağıdında da ISO parlaklık derecesi %56,77 olarak bulundu.

Enzim uygulanan ve uygulanmayan kağıt hamuru materyallerinin SEM görüntüleri incelendi ve enzim uygulanan materyallerin uygulanmayana oranla lignin yapısındaki delik, çatlak, ipliklenme gibi yıpranmaların daha fazla olduğu görüldü.

6. ÖNERİLER

Lakkaz, kolay ulaşımı, düşük substrat spesifitesi, yüksek kararlılık gibi birçok özelliğinden dolayı zaten endüstrinin birçok alanında kullanılmaktadır. Lakkazın prokaryotlardan ökaryotlara kadar çok çeşitli organizmalardaki yayılışı ve her türlü ortamda bulunabilirliğine dayanarak endüstride kullanımı için endüstriyel şartlara en iyi derecede uyum gösteren mikroorganizmalardan lakkazın varlığı ve bu organizmalardaki moleküler yapı ve işlevleri araştırılabilir. Bu zamana kadar en çok mantarlarda araştırılması yapılan lakkazın, en iyi redoks potansiyeline mantarlarda sahip olmasına karşın, mantarların endüstrideki kullanımın zorluğu neticesiyle son zamanlarda yapılan çalışmaları bakteriler üzerine yönelmiştir. Lakkazın endüstriyel amaçlı olarak çok fazla bakteride ayrıntılı olarak araştırılması yapılmamıştır. Bunun için endüstride kullanılabilir olan lakkaz taşıyan termofilik bakteriler araştırılabilir. Ayrıca lakkazın çeşitli tipteki organizmalarda yapılan değişken moleküler yapıları ve aktiviteleri göz önüne alınarak mutasyon çalışmaları ile performansı artırılabilir.

Fenolik bileşiklere etki edip fenolik olmayan bileşiklere doğrudan etki edemeyen lakkazlar, kağıt endüstrisinde diğer ligninaz enzimleriyle birlikte kullanılarak TCF ağartma sisteminin etkisi artırılabilir.

Lakkazın endüstrideki kullanımında, keşfi yeni sayılan Lakkaz Mediatör Sistemin (LMS) geliştirilmeye ihtiyacı vardır. LMS sistemi lakkazın substrat aralığını çeşitlendirerek büyük bir avantaj sağlasa da, kullanılan mediatörler, küçük zararsız kimyasallar olmaları sebebiyle göze batmayan fakat kullanımlarının yan etkileri bilinmediği için önemli olabilecek bir dezavantajdır. Ayrıca LMS'nin kâğıt hamurunun beyazlatılmasında ABTS gibi sentetik redoks araçlarına gereksinim duyması ise bu sistemlerin endüstriyel ölçekte kullanılmasının maliyetini artırmaktadır. Bu nedenle, LMS sistemleri ile kullanılacak ve maliyeti düşürecek bazı lignin türevi fenoller gibi doğal redoks araçlarının keşfedilmesine yönelik çalışmalar yapılabilir ya da üründe önemli bir etki bırakmayacak zararsız mediatörler araştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Aaslyng, D., Rorbaek, K. ve Sorensen, N., H., 1996. An enzyme for dyeing keratinous fibres, Int Pat Apl, 62, 4563–7.
- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K., H., Cavaco, P., A. ve Guebitz, G., M., 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*, Appl Environ Microbiol, 66, 3357–3362.
- Abbot, J. ve Hobbs, G., C., 1991. Peroxide Bleaching Under Acidic and Alkaline Conditions: The Role of Transition Metal Ions, Wood Pulping Chem. Appita, 6th Intl. Symp., , 579-586.
- 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.
- Adams, L., F. ve Ghiorse, W., C., 1987. Characterization of extracellular Mn²⁺-oxidizing activity and isolation of an Mn²⁺-oxidizing protein from *Leptothrix discophora* SS-1, J. Bacteriol., 169, 1279–1285.
- Ahn, M., Y., Dec, J., Kim, J., E. ve Bollag, J.,M., 2002. Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. J Environ Qual,;31, 1509-15.
- 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.
- Anderson, J.R., 1992. Hydrogen Peroxide Use in Chemical Pulp Bleaching. In Tappi Bleach Plant Operations Short Course Notes, Tappi Press, Atlanta, 123.
- Andrews, D., H. ve Singh, R.P., 1979. The Bleaching of Pulp, Tappi Press, Atlanta, 211.
- Archibald, F., S., Bourbannis, R., Jurasek, L., Paice, M., G. ve Reid, I., D., 1997. Kraft Pulp Bleaching and Delignification by *Trametes vesicolor*. J. Biotechnol, 53, 215-236.
- 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., 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry, Biotechnol Prog, 15 147–157.
- Bajpai, P., 2005. Environmentally Benign Approaches for Pulp Bleaching, Volume 1, First Eddition, Elsevier, Amsterdam, 288.
- Baldrian, P., 2006. Fungal laccases-occurrence and properties, FEMS Microbiology Reviews, 30, 2, 215–242.

- Bar, M., 2001. Kinetics and Physico-chemical Properties of White-rot Fungal Laccases. University of Free State, Bloemfontein., 12, 116.
- Barroca, M., J., M., C., Seco, I., M., Fernandes P., M., M., Ferreira, L., M., G., A. ve Castro A., A., M., 2001. Reduction of AOX in the Bleach Plant of a Pulp Mill, Enviromental Science & Technology, 21, 35, 4390-4393.
- Basto, C., Tzanov, T. ve Cavaco-Paulo, A., 2007. Combined ultrasoundlaccase assisted bleaching of cotton, Ultrasonics Sonochemistry, 14, 350–354.
- Bauer, C., G., Kuhn, A., Gajovic, N., Skorobogatko, O., Holt, P., J., Bruce, N., C., Makower, A., Lowe, C., R. ve Scheller, F., W., 1999. New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase, Fresenius J Anal Chem, 364, 179-183.
- Beeman, L., A. ve Reichert, J., S., 1953. The Bleaching of Pulp. In Tappi Press, New York, 210.
- Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C. ve Mougine, C., 2002. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics, Biochemistry, 41, 7325-7333.
- Bl'aquez, P., Casas, N., Font, X. vd., 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*, Water Research, 38, 8, 2166–2172.
- Bligny, R. ve Douce, R., 1983. Excretion of laccase by sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells. Purification and properties of the enzyme. Biochem. J, 209, 489-496.
- Bourbonnais, R. ve Paice, M., G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation, FEBS Lett, 267, 99-102.
- Bourbonnais, R., Leech, D. ve Paice, M., G., 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin, Biochim Biophys Acta., 1379, 381–390.
- Bourbonnais, R., Paice, M., G., Freiermuth, B., Bodie, E. ve Borneman, S., 1997. Reactivities of various mediator and laccase with kraft pulp and lignin model compounds, Appl. Environ. Microbiol, 63, 4627-4632.
- Bourbonnais, R., Paice, M., G., Reid, I., D., Lanthier, P. ve Yaguchi, M., 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2 azinobis(3ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) in kraft lignin depolymerisation. Appl Environ Microbiol, 61, 1876–1880.
- Bourbonnais, R., Rocheford, D., Paice, M., G., Renaud, S. ve Leech, D., 2000. Transition Metal Complexes : A New Class of Laccase Mediators for Pulp Bleaching, TAPPI J., 80, 68-79.

- Breen, A. ve Singleton, F., L., 1999. Fungi in lignocellulose breakdown an biopulping, Curr Opin Biotechnol, 10, 252–258.
- Cabrita, J., F., Abrantes, L., M. ve Viana, A., S., 2005. N - Hydroxysuccinimide - terminated self - assembled monolayers on gold for biomolecules immobilisation. Electrochim Acta, 50, 2117-24.
- Call, H., P. ve Mucke, I., 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozymes®-process), J. Biotechnol., 53, 2, 163–202.
- Call, H., P., 1994. Process for modifying, breaking down or breaching lignin, materials containing lignin or like substances, PCT World patent WO 94/29510.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., del Rio, J., C., Gutierrez, A., vd., Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. Enzyme Microb Technol, 35 (2004) 113–20.
- Cameron, M., D., Timofeevski, S. ve Aust, S., D., 2000. Enzymology of Phanerochaete chrysosporium with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics, Appl Microbiol Biotechnol, 54, 751–758.
- Cantarella, G., Galli, C. ve Gentili, P., 2003. Free radical vs. electron-transfer routes of oxidation of hydrocarbons by laccase/mediator systems. Catalytic or stoichiometric procedures, J. Mol. Catal. B: Enzym., 22, 135–144.
- 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.
- Chandra, R., P. ve Ragauskas, A., J., 2002. Evaluating laccasefacilitated coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps, Enzyme Microb Technol, 30, 855–61.
- Chefetz, B., Chen, Y. ve Hadar, Y., 1998. Purification and characterization of laccase from Chaetomium thermophilum and its role in humification, Appl. Environ. Microbiol., 64, 3175-3179.
- Christopher, L., P., Yao, B. ve Ji, Y., 2014. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator System. Center for Bioprocessing Research and Development, South Dakota School of Mines & Technology, Department of Civil and Environmental Engineering, South Dakota School of Mines & Technology, Department of Chemical Engineering, University of North Dakota, Grand Forks, ND, USA.
- Claus H., 2004. Laccases: Structure, Reactions, Distribution. J. Micron., 35, 93-96.
- Claus, H., Faber, G. ve König, H., 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases, Appl. Microbiol. Biotechnol., 59, 672–678.

- Cole, J., L., Tan, G., O., Yang, E., K., Hodgson, K., O. ve Solomon, E., I., 1990. Reactivity of the laccase trinuclear copper active site with dioxygen: an x-ray absorption edge study, J. Am. Chem. Soc., 112, 2243-2249.
- Collins, P.J. ve Dobson, A., D., W., 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*, Appl. Environ. Microbiol., 63, 3444-3450.
- 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.
- Couto, S., R. ve Herrera, J., L., T., 2006. Industrial and Biotechnological Applications of Laccase: A Review, Biotechnology Advances, 24, 500-513.
- Couto, S., R., Toca, J., L. ve Herrera, 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review, Biotechnology Advances, 24, 5, 500–513.
- Crestini, C. ve Argyropoulos, D., S., 1998. The early oxidative biodegradation steps of residual kraft lignin models with laccase, Bioorg Med Chem, 6, 2161– 69.
- D'Acunzo, F. ve Gali, C., 2003. First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models, Eur. J. Biochem. , 270, 3634-3640.
- d'Acunzo, F., Galli, C. ve Masci, B., 2002. Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems: Solubility and steric issues. Eur J Biochem., 269, 5330-5335.
- Dahl, O., 1999. Evaporation of Acidic Effluent from Kraft Pulp Bleaching Reuse of the Concentrate and Further Processing of the Concentrate, Academic Dissertation, Faculty of Technology, Oulu,.
- De Jong, E., De Vries, F., Field, J., Van Der Zwan, R. ve De Bont, J., 1992. Isolation and Screening of Basidiomycetes with High Peroxidative Activity, Mycol. Res., 96, 1098-1104.
- De Jong, E., Field, J., A. ve de Bont, J., A., M., 1994. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. FEMS Microbiol. Rev., 13, 153-188.
- 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.
- Demain, A., L., ve Solomon, N., A., 1981. In Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering, Scientific American, Freeman &Comp., San Francisco, 3-14.
- Demiralp, B., Büyük, İ., Aras, S. ve Cansaran-Duman, D., 2015. Lakkaz enziminin endüstriyel ve biyoteknoloji alanında kullanımı, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez laboratuatu, Ankara.

- Dence, C., W. ve Reeve, D., W., 1996. Pulp Bleaching-Principles and Practicles, Tappi Press, Atlanta G.A, USA.
- Deniz, İ., 2011. Odun Kimyası Ders Notları, KTÜ, Orman Fak., Trabzon.
- Dubé, E., Shareck, F., Hurtubise, Y., Daneault, C. ve Beaugard, M., 2008. Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye, Appl. Microbiol. Biotechnol., 79, 4, 597-603.
- Dur'an, N., Rosa, M., A., D'Annibale, A. ve Gianfreda, L., 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidas) immobilized on different supports: a review, Enzyme and Microbial Technology, 31, 7, 907–931.
- Durán, N ve Esposito, E.,2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review, Appl Cat B: Environ, 28, 83–99.
- Eggert, C., LaFayette, P., R., Temp, U., Eriksson, K., E., L. ve Dean, J., F., D., 1998. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*, Appl. Environ. Microbiol., 64, 1766-1772.
- Eggert, C., Temp, U., ve Eriksson, K., L., 1996. The Ligninolytic System of The White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterisation of the Laccase, Applied and Environmental Microbiology, 62,4, 1151-1158.
- Enguita, F., J., Martins, L., O., Henrique, A., O. ve Carrondo, M., A., 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties, J. Biol. Chem., 278, 21, 19416–19425.
- 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.
- Eroğlu, H., 1981. Sülfat Yöntemiyle Kağıt Hamuru Elde Edilmesi, K.T.Ü, Orman Fakültesi Dergisi, 65-68.
- EuropaBio, 2006. Industrial or White Biothecnology, Camille Burel EuropaBio Secretariat of the SusChem IB Section,Brussels Belgium.
- Fabbrini, M., Gali, C. ve Gentili, P., 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. J Mol Catal B Enzym, 16, 231–240.
- Facelo, J. ve Cruz, O., 2008. Banana skin: a novel material for a low-cost production of laccase, M.S. thesis, Universitat Rovira I Virgili.
- 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.

- Felby, C., Pedersen, L., S. ve Nielsen, B., R., 1997. Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases, Holzforschung,; 51, 281–86.
- Fernandes, A., J., T., 2011. Insight Into The Multicopper Oxidases Stability, *Biochemistry at the Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa*.
- Filip, Z. ve Claus, H., 1995. Effects of soil minerals on the microbial formation of enzymes and their possible use in remediation of chemically polluted sites, Environmental Impacts of Soil Component Interactions, 407–419.
- Forootanfar, H., Faramarzi, M., A., Shahverdi, A., R. ve Yazdi. M., T., 2011. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*, Bioresource Technology, 102,2, 1808-1814.
- Frausto da Silva, J., J., R. ve Williams, R., J., P., 2001. The biological chemistry of the elements. The inorganic chemistry of life, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford.
- 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.
- Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C., K., Strauss, J. ve Haltrich, D., 2002. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions, Microbiology, 148 , 2159-2169.
- Garzillo, A., M., Colao, M., C., Buonocore, V., Oliva, R., Falcigno, L., Saviano, M., Santoro, A., M., Zappala, R., Bonomo, R., P., Bianco, C., Giardina, P., Palmieri, G. ve Sanna, G., 2001. Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*, J. Protein Chem., 20, 191-201.
- Garzillo, A., M., V., Colao, M., C., Caruso, C., Caporale, C., Celletti, D. ve Buonocore, V., 1998. Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 49, 545-551.
- Gellerstedt, G., 2007. Chemistry of Bleaching of Chemical Pulp, *The Ljungberg Textbook Wood Chemistry and Wood Biotechnology*, 3D1058, Stockholm, 2-37.
- 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.
- Golz-Berner, K., Walzel, B., Zastrow, L. ve Doucet, O., 2004. Cosmetic and dermatological preparation containing copperbinding proteins for skin lightening, Int Pat Appl, 64, 2788-93.

- Gray, H., B., Malmstrom, B., G. ve Williams, R., J., 2000. Copper coordination in blue proteins, J Biol Inorg Chem, 5, 551-59.
- Gregory, R., P. ve Bendall, D., S., 1966. Biochemical Journal, 101, 569.
- Gullichsen, J. ve Fogelholm, C.J., 1999. Chemical Pulping, Papermaking Science and Technology Series, 6A, Tappi Press, USA.
- Harris, Z., L., Davis-Kaplan, S., R., Gitlin, J., D. ve Kaplan, J., A 2004. Fungal multicopper oxidase restores iron homeostasis in aceruloplasminemia. Blood, 103, 4672-4673.
- Heppner, D., E., Kjaergaard, C., H. ve Solomon, E., I., 2014. Mechanism of Reduction of the Native Intermediate in the Multicopper Oxidases: Insights into Rapid Intramolecular Electron Transfer in Turnover, Stanford University, California 94305-5080, US
- Hoegger, P., J., Kilaru, S., James, T., Y., Thacker, J., S. ve Kües, U., 2006. Phylogenetic Comparison and Classification of Laccase and Related Multicopper Oksidase Protein Sequences, Institute of Forest Biology, Germany, Duke University, Durham NC, USA.
- Hoffmann, P. ve Esser, K., 1977. The phenol oxidases of the Ascomycete *Podospora anserina*, Arch. Microbiol., 112, 111-114.
- Holladay, P., C. ve Solari, R., J., 1963. The Bleaching of Pulp. In: Rapson, W.H. (Ed), Tappi Press, New York, 180.
- Huttermann, A., Mai, C. ve Kharazipour, A., 2001. Modification of lignin for the production of new compounded materials. Appl Microbiol Biotechnol, 55, 387-94.
- İmran, M., Asad, M., J., Hadri, S., H. ve Mehmood, S., 2012. Production and Industrial Applications of Laccase Enzyme, Pir Mehr Ali Shah Arid Agriculture University, Rawalpindi, Gujrat University, 10, 1.
- Jeffries, T., W., 1994. Biodegradation of Lignin and Hemicelluloses, Institute for Microbial and Biochemical Technology, USA.
- Jeyasingam, J., T., 1987. Industrial Experience in the Semi-chemical Pulping of Straw, Non-wood Plant Fiber Pulping, Prog Rept. No. 17, TAPPI Press, Atlanta, 127.
- Johannes, C. ve Majcherczyk, A., 2000. Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems, Appl. Environ. Microbiol. 66, 524-528.
- John, W. ve Sons, I., 1998. Industrial Enzymes and Their Applications, United States of America, 454.

- Jung, H., Xu, F. ve Li, K., 2002. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7, Enz. Microb. Technol. 30, 161-168.
- 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.
- Kalyoncu, E., E., 2004. Endüstriyel Kraft Hamurunun Ağartılmasında Yeni Yaklaşımlar, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kandelbauer, A., Maute, O., Kessler, R., W., Erlacher, A. ve Guebitz, G., M., 2004. Study of dye decolourization in an immobilized laccase enzyme-reactor using online spectroscopy, Wiley Periodicals, Inc., 552-563.
- Karam, J. ve Nicell, J., A., 1997. Potential applications of enzymes in waste treatment, J Chem Tech Biotechnol, 69, 141–153.
- Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M. ve Higushi, T., 1988. Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus versicolor*, FEBS Lett., 236, 309–311.
- Kenealy, W., Klungness, J., Tshabalala, M., Horn, E., Akhtar, M., Gleisner, R., vd., 2003. Modification of lignocellulosic materials by laccase. TAPPI Fall Techn Conf, Engineering, Pulping & PCE&I Chicago, IL.
- Kırcı, H., 2006, Kağıt Hamuru Endüstrisi Ders Notları, KTU. Orman Fakültesi Yayınları, Yayın No: 86, Trabzon.
- Kırcı, H., 2003. Kağıt Hamuru Endüstrisi, Ders Notları, K.T.Ü., 63, 274.
- Kirk, K., ve Cullen, K., 1998. Enzymology And Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi Environmentally Friendly Technologies For The Pulp and Paper Industry. John Wiley And Sons, Inc. New York., 273-307.
- Kirk, T., ve Farrell, R.,. 1987. Enzymatic “Combustion” The Microbial Degradation of Lignin. Annu Rev Microbiol, 41, 465–505.
- Kiviaho, I., 1995. Optimizing Oxygen Delignification, Proceeding International Non-Chlorine Bleaching Conference, Amelia Island, FL, Paper 2-2.
- Kolankaya, N., 2000. Biyoteknolojiye Bir Bakış: Dünya ve Türkiye, “Küreselleşme Sürecinde Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik” Sempozyum Bildirileri Kitabı, T.C. Çevre Bakanlığı, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ve Biyoteknoloji Derneği Ortak Yayını-Ankara, 1–6.
- Kuhad, R., C., Singh, A. ve Eriksson, K., E., L., 1997. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell Wall, Adv Biochem Eng Biotechnol, 57, 47–125.

- Kunamneni, A., Camarero, S., Garcia-Burgos, C., Plou, F., J., Ballesteros, A. ve Alcalde, M., 2008. Engineering and Applications of Fungal Laccases for Organic Synthesis, Institute de Catalisis y Petroleoquimica, CSIC, Spain.
- 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.
- 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., 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.
- Lachenal, D., Wable, F., Damiens, P. ve Ledon, H., 1992. 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.
- Lang, G. ve Cotteret, J., 1999. Hair dye composition containing a laccase, *Int Pat Appl*, 53, 357-63.
- Lee, S., K., George, S., D., Antholine, W., E., Hedman, B., Hodgson, K.O. ve Solomon, E., I., 2002. Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase, *J. Am. Chem. Soc.* 124, 6180-6193.
- Leithe-Eriksen, R., 2001. Pulp Bleaching Around The Baltic Sea, Progress Report For Greenpace International, April, Gothenburg Sweden, 24.
- Leonowicz, A., Cho, N., S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuzewska, A., Hofrichter, M. ve Rogalski, W., D., 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin, *J. Basic Microbiol.*, 41, 185-227.
- Leontievsky, A., A., Myasoedova, N., M., Baskunov, B., P., Pozdnyakova, N., N., Vares, T., Kalkkinen, N., Hatakka, A., I. ve Golovleva, L., A., 1999. Reactions of blue and yellow fungal laccases with lignin model compounds, *Biochemistry (Mosc)*, 64,10, 1150-1156.
- Li, K., Xu, F. ve Eriksson, K., E., 1999. Comparison of Fungal Laccases and Redox Mediators in Oxidation of a Nonphenolic Lignin Model Compound, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2654–2660.
- Litvintseva, A., P. ve Henson, J., M., 2002. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1305-1311.
- Lund, M. ve Ragauskas, A., J., 2001. Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols, *Appl Microbiol Biotechnol*, 55, 699-703.

- Madsen, G., B., Norman, B., E., ve Slott, S., A 1973. New Heat-Stable Bacterial Amylase and its Use In High-Temperature Liquefaction, Starke, 25, 304.
- 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.
- Martins, L., O., Soares, C., M., Pereira, M., M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G., H. ve Henriques, A., O., 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat, J. Biol. Chem., 277, 21, 18849–18859.
- Matera, I., Gullootto, A., Tilli, S., Ferraroni, M., Scozzafava, A. ve Briganti, F., 2008. Crystal Structure of the Blue Multicopper Oxidase from the White-Rot Fungus *Trametes trogii* Complexed with *p*-toluate. Bioinorganic Chemistry Laboratory, Italy.
- Maury J, Asadollahi, M., A., Moller, K., Clark, A. ve Nielsen, J., 2005. Adv Biochem Eng Biotechnol, 100, 19-51.
- Mayer, A., M. ve Staples, R., C., 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry, 60, 551-565.
- 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.
- Minussi, R., C., Pastore, G., M. ve Duran, N., 2002. Potential applications of laccase in the food industry, Trends Food Sci. Technol., 13, 205-216.
- Morozova, O., V., Shumakovich, G., P., Shleev, S., V. ve Yaropolov, Y., I., 2002. Laccase mediator systems and their applications, Int. Patent no. WO 00078274.
- Morozova, O., V., Shumakovich, G., P., Shleev, S., V. ve Yaropolov, Y., I., 2007. Laccase mediator systems and their applications, Applied Biochemistry and Microbiology, 43, 5, 523-35.
- Mougin, C., Kollmann, A. ve Jolival, C., 2002. Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics, Biotechnology Letters, 24, 139–142.
- 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.

- Nishizawa, Y., Nakabayashi, K. ve Shinagawa, E., 1995. Purification and characterization of laccase from white rot fungus *Trametes sanguinea* M85-2. J. Ferment. Bioeng., 80 91-93.
- Norberg, I., 2012. Carbon Fibres from Kraft Lignin, pH D Doctoral Thesis, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm.
- Nyanhongo, G., S., Rodríguez, C., S. ve Gübitz, G., M., 2006. Coupling of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) metabolites onto humic monomers by a new laccase from *Trametes modesta*, Chemosphere, 64, 3, 359-70.
- 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.
- Palmer, A., E., Randall, D., W., Xu, F. ve Solomon, E., I., 1999. Spectroscopic studies and electronic structure description of the high potential type 1 copper site in fungal laccase: insight into the effect of the axial ligand, J. Am. Chem. Soc., 121, 7138-7149.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. ve Sannia, G., 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*, Appl. Environ. Microbiol., 66, 920-924.
- Palmieri, G., Giardina, P., Marzullo, L., Desiderio, B., Nitti, G., Cannio, R. ve Sannia, G., 1993. Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 39, 632-636.
- Palonen, H., 2004. Role of Lignin in the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose, Helsinki University of Technology, 520, 1846.
- Palonen, H., Saloheimo, M., Viikari, L. ve Kruus, K., Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. Enz. Microb. Technol., 33 (2003) 854-862.
- 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.
- Pikka, O., Vessala, R., Vilpponen, A., Dahllof, H., Germgard, U., Norden, S., Bokstrom, M., Steffes, F. ve Gullichsen, J., 2006. Bleaching Applications, In: Gullichsen, J. and Fogelholm, C.-J. (Eds.), *Chemical Pulping-Papermaking Science and Technology*, Fapet Oy, Helsinki, Finland, Book 6A, A 616.
- Piontek, K., Antorini, M., ve Choinowski, T., 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers. J. Biol. Chem., 277, 37663–37669.
- Pointing, S., B. ve Vrijmoed, L., L., P., 2000. Decolorization of Azo and Triphenylmethane Dyes By *Pycnoporus Sanguineus* Producing Laccase As The Sole Phenoloxidase, World J Microbiol Biotechnol, 16, 317– 318.

- Pointing, S., B., 2001. Feasibility of bioremediation by whiterot fungi, Appl Microbiol Biotechnol, 57, 20–33.
- Pozdnyakova, N., N., Turkovskaya, O., V., Yudina, E., N. ve Rodakiewicz-Nowak, Y., 2006. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* D1: Purification and characterization, Appl. Biochem. Microbiol., 42, 56-61.
- Raghukumar, C., 2000. Fungi from marine habitats: an application in bioremediation. Mycol Res, 104 ,1222–1226.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A., M. ve Goffner, D., 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases-a divergent gene family in poplar, Eur. J. Biochem., 259 , 485–495.
- 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.
- Reyes, P., Pickard, M., A. ve Vazquez-Duhalt, R., 1999. Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase, Biotechnology Letters, 21, 875-880.
- Riva, S., 2006, Laccases: blue enzyme for green chemistry, Trends Biotechnol, 24, 219-226.
- Roncero, M., B., Torres, A., L., Colom, J., F.ve Vidal, T., 1993. TCF bleaching of wheat straw pulp using ozone and xylanase. Part A: Paper quality assessment, Bioresource Technology. 87, 305–314.
- Roure, M., Delattre, P. ve Froger, H., 1995. Composition for an enzymic coloration of keratin fibres, especially for hair and its use in a dyeing process, Eur Pat Appl, 37, 273–302.
- Roy, J., J., Abraham, T., E., Abhijith, K., S., Sujith, K., P., V. ve Thakur, M., S., 20005. Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase, Biosens Bioelectron, 21 206–11.
- Rydholm, S., A., 1965. Pulping Processes, Interscience Publishers, U.S.A., 839-1023.
- Sakurai, T. ve Kataoka, K., 2007. Structure and Function of Type I Copper Multicopper Oxidases Kanazawa Universty, Kakuma Kanazawa, 920-1192.
- Sato, Y., Wuli, B., Sederoff, R. ve Whetten, R., 2000. Journal of Plant Research, 114.
- Scheel, T., Höfer, M., Ludwig, S. ve Hölker, U., 2000. Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds, Appl. Microbiol. Biotechnol., 54, 686-691.

- Schneider, P., Caspersen, M., B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L., K., Østergaard, P., R., Brown, K., M., Brown, S., H. ve Xu, F., 1999. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase, Enz. Microb. Technol., 25, 502-508.
- Sheldon, R., A. ve Arends, I., W., C., E., 2006. Catalytic oxidations mediated by metal ions and nitroxyl radicals, J. Mol. Catalysis A-Chemical, 251, 1-2, 200-214.
- Sheldon, R., A. ve Arends, I., W., C., E., 2004. Organocatalytic oxidations mediated by nitroxyl radicals, Adv. Synth. Catal., 346, 1051-1071.
- Shin, W., Sundaram, U., M., Cole, J., L., Zhang, H., H., Hedman, B., Hodgson, K., O. ve Solomon, E., I., 1996. Chemical and spectroscopic definition of the peroxidelevel intermediate in the multicopper oxidases: Relevance to the catalytic mechanism of dioxygen reduction to water. J. Am. Chem. Soc., 118, 3202-3215.
- Shleev, S., V., Khan, I., G., Morozova, O., V., Mazhugo, I., M., Khalunina, A., S. ve Iaropolov, A., I., 2004. Phenyl pyrazolones--novel oxidoreductase redox-mediators for degradation of xenobiotics, Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya, 40, 2, 165-172.
- Shraddha, Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M. ve Kumar, A., 2011. Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications, Department of Biotechnology, Institute of Biomedical Education & Research, Mangalayatan University, Aligarh 202001, India, 11.
- Sirim, D., Wagner, F., 2011. Wang, L., Schmid, R., D. ve Pleiss, J., The Laccase Engineering Database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases, Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart, Germany.
- Sixta, H., 2006. Handbook of Pulp, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, I, 465-482.
- Sjoblad, R., D. ve Bollag, J., M., 1981. Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms, Soil Biochemistry, 5, 113-152.
- Soden, D., M. Ve Dobson, A., D., W., 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*, Microbiology 147, 1755-1763.
- Soetaert, W. ve Vandamme, E., 2005. The impact of industrial biotechnology, Biotechnol J, 756-769.
- Solís-Oba, M., Ugalde-Saldívar, V., M., González, I. ve Vinięgra-González G., 2005. An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase, J. Electroanal. Chem., 579, 59-66.

- Solomon, E., I. ve Sundaram, U., M., Machonkin TE, 1996. Multicopper oxidases and oxygenases, Chem Rev, 96, 2563–605.
- Solomon, E., I., Sundaram, U., M. ve Machonkin, T., E., 1996. Multicopper Oxidase and Monooxygenase, Stanford university, California.
- Stahl, P., Kissau, L., Mazitschek, R., Giannis, A. ve Waldmann, H., 2002. Natural product derived receptor tyrosin kinase inhibitors: Identification of IGF1R-, Tie-2 and VEGFR3 inhibitors. Angew Chem Int Ed, 41, 1174-1178.
- Suchy, M. ve Argyropoulos, D., S., 2002. Catalysis and Activation of Oxygen and Peroxide Delignification of Chemical Pulps, Tappi Journal, 1, 2, 1-18.
- Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K. ve Inamori, Y., A 2003. Thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, 2167-2175.
- Thurston, C., F., 1992. The Structure and Function of Fungal Laccases, Microbiology, 140, 19-26.
- 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.
- Tutuş A. ve Şah, S., 2009. Asma budama artıklarından kraft-sodyum borhidrür yöntemi ile kraft hamuru üretimi. IV. Uluslararası Bor Sempozyumu (15-17-Ekim 2009), 43-50, Eskişehir.
- Tzanov, T., Basto, C., Guebitz, G. ve Cavaco-Paulo, A., 2003. Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching of cotton. Macromol. Mater. Eng., 288, 807–810.
- URL-1 <https://en.wikipedia.org/wiki/Biodegradation>
 URL-2 http://www.pharmatutor.org/articles/advanceslaccaseenzymeindustrialbiotechnology_review?age=0,2
- 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.
- Wang, H., X. ve Ng, T., B., 2004. A novel laccase with fair thermostability from the edible wild mushroom (*Albatrella dispansus*), Biochem Biophys Res Commun, 315, 450-454.

- Williamson, P., R., 1994. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase, Journal of Bacteriology, 176, 3, 656–664.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, 274-373.
- Wood, D., A., 1980. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*, J. Gen. Microbiol., 117, 327-338.
- Xu, F., Deussen H., J., Lopez, B., Lam, L. ve Li, K., 2001. Enzymatic and electrochemical oxidation of N-hydroxy compounds, Eur. J. Biochem., 268, 4169-4176.
- Xu, F., 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. J. Biol. Chem., 272, 924-928.
- Xu, F., 2005. Industrial Biotechnology, 1, 38-50.
- Xu, F., Kulys, J., J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H., J., Abbate, E., Galinyte, V. ve Schneider, P., 2000. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds, Appl. Environ. Microbiol., 66 , 2052-2056.
- Xu, F., Palmer, A., E., Yaver, D., S., Berka, R., M., Gambetta, G., A., Brown, S., H. ve Solomon, E., I., 1999. Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase, Axial perturbations of the T1 copper, J. Biol. Chem. 274, 12372-12375.
- Xu, F., 1999. Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production and applications. In: Flickinger MC, Drew SW, eds. The encyclopedia of bioprocessing technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation, JohnWiley & Sons, 1545-54.
- Xu, F., Shin, W., Brown, S., Wahleithner, J., A., Sundaram, U., M., ve Solomon, E.I., 1996. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. Biochim. Biophys. Acta, 1292, 303-311.
- Yarapolov, A., I., Skorobogatko, O., V., Vartanov, S., S. ve Varfolomeyev, S., D., 1994. Laccase properties, catalytic mechanism and applicability, Appl. Biochem. and Biotechnol. 49, 257-279.
- Yaver, D., S. ve Golightly, E., J., 1996. Cloning and characterization of three laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family, Gene, 181, 95-102.
- Yoshida, H., 1883. Chemistry of Lacquer (Urushi) part I, J. Chem. Soc., 43, 472-486.
- Zeman, N.,W. ve Mccrea, J., M., 1985. Alpha-amylase Production Using a Recombinant DNA Organism, Cereal Foods World. 30, 1, 777-780.

Zille, A., Munteanu, F., D., Gübitz, G., M. ve Cavaco-Paulo, A., 2005. Laccase kinetics of degradation and coupling reactions, Journal of molecular catalysis, 33, 12, 23-28.



8. EKLER

EK-1

Ekspresyon primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılan *Bacillus megaterium*'a ait 822 nükleotitlik lakkaz geninin baz dizilimi

```
ATGAATCCTGAGCCATTAAAAAAGCCATCACGAGTCGTTTATGTGGCTGAGCCCTTGGG
TAGAAAAGAATGATATGCTTGTTGCTGGTTTCACCACAAAAAATGGTGGCGTGAGTAAACG
TCCATTTGCTTCTTTTAACCTAGGGCTTCACGTAAACGATAACGTAGAAGATGTTATTACA
AATAGAAAAATTTTAGCAGCCGAACTAGACATGTCTTTTGAAAGCTTTGTATGTGCTGAAC
AAGTACATGAAGCAACTGTTCAAAAAGTAACAAAAGCCGACTGTGCAAAGGACTCTACAA
GTATGAAGAGGGCATAAAAAGCAACGGATGGCATTATATACAAATGAATCTGATATTTTGTTA
GCTTTATGTTATGCAGATTGTGTTCCGCTGTACTTCTATGCGCCAGATCACCATTTAGTTG
GTCTTGCTCATGCTGGGTGGAAAGGCACAGTAAAAGATATTGCAGGAAATATGATTCGACG
TTGGGTAGAACAAGAAAATGTTCCAGTTGAAGATATTTACGTGGCGATTGGCCCTTCGATT
GAAGATTGCTGTTATGTTGTCGATAACCGCGTCATTACACAAGTAAACGAAGTAGTTGGCC
AAAATGGATATCAAGAAGTAAGCCCTGGACAATACGCGCTTAATTTAAAAAAGTCAATAA
GCTGCTGATTCAACACGCAGGCGTATTGCCGGAACGAATTTAACATCGTCGTATTGTACA
AGCTGTGAAGATGACCTGTTCTTCTCACATCGCCGCGACCAAGGGAAAACAGGACGCATGT
TTAACTTCATAGCTTTAAGGAGGTAA
```

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğretim, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da Esentepe İlköğretim Okulu, Cumhuriyet İlköğretim Okulu ve Sultangazi Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladı. 2008-2009 öğretim yılında K.T.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı.2013 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl içinde K.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen burada öğrenimine devam etmektedir.