



## Fungal ve Arkeal Kaynaklı Lipazların Eldesi, Aktivitelerinin Kıyaslanması ve Kağıt Üretiminde Kullanımı

Azade Attar

Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Metalürji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 34210, Esenler İstanbul  
Tel: 02123834649, Fax: 02123834625  
azadeattar@hotmail.com

Geliş (Received): 3 Şubat (February) 2017  
Kabul (Accepted): 24 Temmuz (July) 2017  
DOI: 10.18466/cbayarfbe.339543

### Özet

Lipaz, gıda teknolojisi, klinik ve endüstriyel kimya gibi birçok biyoteknolojik alanda yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Endüstriyel alanda kullanılan lipazların çoğu funguslardan elde edilir. Bu enzimler ticari olarak satılmaya uygun olup saflaştırılır ve immobilize hale getirilir. Ancak tüm bu işlemler ürünün maliyetini arttırdığından son ürün haline dönüşen lipaz enzimi oldukça pahalıdır. Kağıt üretiminde karşılaşılan problemlerin en önemlilerinden biri odun ekstraktiflerinin kağıt hamuru ve kağıtta kaliteyi düşürmesi ve atık sularda toksisite oluşturmaktır. Bu yapışkan bileşiklerden biyolojik yolla kurtulmak amacıyla lipaz enzimi kullanılabilir. Bu çalışmada, çürükçül bir fungus olan *Phanerochaete chrysosporium* ile bir halofilik arke olan *Haloarcula hispanica*'dan elde edilen ekstraselüler lipazların aktivite tayini yapılmış ve geri dönüşümlü karton üretimi proseslerinden alınan kağıt hamuru numunelerine uygulanmıştır. Aseton ekstraksiyonuna tabi tutulan kağıt hamuru numunelerine nem analizi yapıldıktan sonra lipaz eklenmiştir. Hidrolizi daha detaylı ölçmek amacıyla asit değeri analizi yapılarak serbest yağ asidi miktarını belirlemek amacıyla gaz kromatografi uygulanmıştır. Sonuçlar, *P. chrysosporium* ve *H. hispanica*'dan düşük maliyetle elde edilen lipaz enzimlerinin herhangi bir saflaştırma veya immobilizasyon yapılmaksızın aktivite gösterdiğini ve lipofilik bileşiklerin hidrolizinde etkin biçimde kullanılabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Haloarcula hispanica*, Kağıt hamuru, Lipaz, Lipofilik bileşiklerin hidrolizi, *Phanerochaete chrysosporium*.

### Production of Fungal and Archaeal Lipases, Comparison of their Enzymatic Activities and Utilization in Paper Production

#### Abstract

Lipases are used extensively in biotechnological fields such as food technology, clinical and industrial chemistry. Many industrially used lipases are prepared from fungi. Hence, their consideration as industrially relevant enzymes includes purification and immobilization processes which means an increase in the price of the final product. One of the most important problems in paper production is wood extractives so-called pitch that cause low quality pulp and paper, and create waste water toxicity. Lipase could be used for the hydrolysis of those sticky compounds as a biological approach. In this study, extracellular lipases of a fungus *Phanerochaete chrysosporium* and a halophilic archaeon *Haloarcula hispanica* were used in pitch component and sticky material degradation in recycled paper production in comparison with controls. Acetone extraction was applied on the samples. After the determination of the enzyme activity lipases were added to the pulp samples. The amount of free fatty acids were determined by acid value analysis in order to get a better quantification of the hydrolysis. Also gas chromatography was applied. The results demonstrated that *P. chrysosporium* and *H. hispanica* extracellular lipases have substantially high enzyme activity without any purification or immobilization processes and can be efficiently used for the hydrolysis of lipophilic compounds in an environmentally friendly approach.

**Keywords:** *Haloarcula hispanica*, Hydrolysis of lipophilic compounds, Lipase, Paper pulp, *Phanerochaete chrysosporium*.



## 1 Giriş

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrileri, dünya ekonomisine etkileri nedeniyle pek çok ülke için ekonomik açıdan önemlidir ve ürünleri dünya çapında tüketilmektedir. Elektronik iletişim bile kağıt ürünlerinin önemine ve kullanımına gölge düşürememiştir [1]. Her ne kadar geri-dönüşüm yöntemiyle liflerin tekrar kullanılabilir olması saf elyaf kullanım hızını düşürmüş olsa da, kağıt tüketiminin hızla artması nedeniyle saf elyafların kullanımına devam edilmektedir. İkincil elyaf, kağıt endüstrisinde çok önemli bir hammadde kaynağıdır. Birçok önemli kağıt ürünü %100 geri dönüşümlü kağıttan yapılır. Yüksek seviyede üretim yapan fabrikalar, ürün gamlarına geri dönüşümlü karton veya kağıt ekleyerek kapasitelerini artırmaya başlamıştır. Bununla birlikte, bu hammaddelerin kullanımı çoğunlukla ürün kalitesinin düşmesi veya makine işlevlerinin bozulması gibi çeşitli sorunları beraberinde getirir [2]. Önceden daha açık sistemlerle kısmen çıkarılan kir, zift ve yapışkanlar, geri dönüşümle birlikte kağıt üretim sürecinde kalmakta ve döngülere girmektedir. Sonuç olarak, kağıt geri dönüşümünün çeşitli avantajları ve potansiyel faydalarına rağmen yapışkan bileşiklerin kağıt üretim prosesinin çeşitli aşamalarında birikmesi kağıt makinesi için birçok problem oluşturmaktadır [3]. Temel olarak, bu değişiklikler, hamurların daha düşük lif kalitesi (uzunluk, esneklik) ve daha yüksek drenaj direncinden kaynaklanmaktadır. Birincisi, fiberler arası bağları ve buna bağlı olarak elyaf mukavemetini etkiler. İkincisi, tabaka oluşumunu daha zor hale getirir, kağıt makinesi çalıştırılabilirliğini azaltır ve kurutuculardaki enerji tüketimini artırır [4]. Çeşitli iyileştirme teknikleri, yani alkali işleme, rafine etme / atma işlemleri, katkı maddesi kullanımı veya odun dışı bitki lifi katılması bilinmektedir. Bununla birlikte, kağıt direncinde ve kağıt hamuru drenaj becerisinde eşzamanlı artışın sağlanamamasından dolayı, kağıt imalatına sağladıkları avantajlar bazen sınırlıdır [5]. Bu tekniklerle karşılaştırıldığında enzimlerin kullanımı umut verici bir alternatiftir [6].

Enzimler, antik dönemlerden beri peynir, ekme, şarap üretimi ve nişasta modifikasyonu gibi birçok imalat prosesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Mikroorganizmaların, metabolik ürünlerinin ve enzimlerin temel araştırmaların geniş bir alanındaki kullanımları ve potansiyel endüstriyel uygulamaları hakkında bilgi 1950'lerden günümüze giderek artmaktadır. Ancak son 20 yılda, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde ticari olarak mikrobiyal enzimler kullanılmıştır [7]. Biyolojik zift giderimi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi için geliştirilmiş biyoteknolojik bir yöntemdir. Kağıt fabrikalarında odun ekstraktiflerinin birikimi, düşük kaliteli hamur ve tıkanmalara neden olur ve bu da işlemlerin durdurulmasına ve önemli ekonomik kayıplara yol açar, ürün kalitesini düşürür ve atık su toksisitesi yaratır. Ağaç ek-

raktarı, diğer adıyla zift başlıca triaçilgliseroller, yağ asitleri, reçine asitleri, mumlar, steroller, sterol esterler, mono ve diaçilgliserollerden oluşur. Geri dönüşümlü kağıt kullanıldığında, çeşitli yeni lipid bileşikleri örneğin yağ esaslı mürekkep, kağıt hamuruna dahil edildiğinden zift sorunları artabilir. Problemlili zift miktarı, kağıt üretimi sırasında biyolojik ve kimyasal işlemlerle azaltılabilmektedir. Biyolojik zift kontrolünde, problemlili adımın azaltılması için funguslar, mikroorganizmalar veya enzimler kullanılmaktadır. Bu doğrultuda, zift bileşenlerinin parçalanması için farklı enzim türleri ve çeşitli organizmalar seçilebilir. Hamurdan önce ekstraktiflerin ortadan kaldırılması için odunun biyolojik olarak muamele edilmesi, zift kontrolü için geleneksel yöntemlere bir alternatif olarak önerilmiş ve test edilmiştir [8]. Biyoteknoloji, çürükçül fungusların [9] veya enzimlerin [10] kullanımına dayalı olarak zift kontrolü için çevreye dost ve ekonomik çözümler sunar. Bu amaçla ticarileştirilen ürünler lipaz ve benzeri enzimler içermektedir. Kraft pişirme ve kloruz (hidrojen peroksit ile) ağartma sırasında sterollerin ve sterol esterlerin önemli bir yapısal değişikliğe uğramadığı tespit edilmiştir. Bunun aksine, klorin dioksit ile ağartma, sitosterol ve sitosterol esterleri gibi doymamış sterol yapılarını parçalamakta ve sadece stigmastanol gibi doymuş olanlar bu ağartma ajanıyla muameleden sonra da kalmaktadır [11]. Klorin dioksit, çoğu ahşap ekstraktının ana lipofilik bileşiği olan serbest ve esterifiye doymamış sterollerini parçalar; ancak bu bileşikler, kloruz ağartma işleminde hidrojen peroksitle hayatta kalmaktadır [12]. Bundan dolayı, yüksek kaliteli kraft hamurlarının üretiminde temel ağartma yöntemi kloruz ağartma yöntemi ile değiştirildiğinde zift problemleri dramatik biçimde artmıştır. Söz konusu problemlerin etkin kontrolü için rasyonel bir strateji tasarlamak amacıyla farklı çalışmalar yapılmıştır. Birikinti oluşumundan sorumlu olan ekstraktiflerin belirlenmesi ve bu sorunlu bileşiklerin ortadan kaldırılması veya kontrol altına alınması için yöntemler araştırılmaktadır. Mekanik hamurun enzimatik muamelesinin zift problemlerini çözdüğü ve ağartıcı kimyasalların gereksinimlerini azalttığı rapor edilmiştir [13]. Bu çalışmalar, kağıt hamuru yapımı ve beyazlatma sırasında oluşan zift birikintilerinin ve odun ekstraktiflerinin enzimatik analizini içermektedir [9, 14, 15].

Bu çalışmada söz konusu problem, doğal olarak zift bileşiklerini parçalayan çürükçül bir fungus ve termostabil lipaz üreten bir arkebakteri kullanılarak çözülmeye çalışılmıştır. Lipaz üretiminde önde gelen canlılardan *Phanerochaete chrysosporium* ve *Haloarcula hispanica*'nın zift bozunmasında başarıyla uygulanabileceği hedeflenmiştir. Bu çalışmanın amacı, geri dönüşümlü kağıtta bulunan zift bileşenlerini analiz ederek uygun bir bozunma metodu geliştirmektir.

## 2 Materyal ve Metod

### 2.1 Fungal ve Arkeal Büyütme Koşulları

Beyaz çürükçül bir fungus olan *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 20696) 2.6 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.2 g/L 2,2 dime-tilsüksinik asit, 1.1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve mikronütrientler 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.01 g/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.005 g/L MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0.074 g/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.001 g/L COCl<sub>2</sub>, 0.1 g/L tiamin içeren sıvı besiyerinde 37 °C 80 dev/dak inkübe edilmiştir [16]. Lipaz sentezini indüklemek amacıyla besin ortamına ayrıca %1'lik zeytinyağı ilave edilmiştir [17]. Log fazındaki kültürler 10.000 dev/dak, 4 °C'de santrifüj edilerek süpernatantları toplanmıştır (Sigma, Almanya).

Halofilik bir arke olan *Haloarcula hispanica* (ATCC 33960) ise 180 g/L NaCl, 20 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 5 g/L maya özütü, 3 g/L C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 2 g/L KCl içeren sıvı besiyerinde üretilmiştir [18]. Lipaz sentezini indüklemek amacıyla besin ortamına ayrıca %1'lik ceviz yağı ilave edilmiştir [19]. Kültürler 40 °C 100 dev/dak inkübe edilmiştir. Bakteriyel üreme spektrofotometrik olarak 600 nm'de optik yoğunluk ölçülerek belirlenmiştir (Scinco S-3100, Seul, Kore). Kültürler geç durağan fazda 10.000 dev/dak, 4 °C'de santrifüj edilerek toplanmış ve kullanılmadığında +4 °C'de saklanmıştır. Her iki kültürün de santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlarında sekonder metabolizma ürünü olarak hücre dışına salgıladıkları lipaz enzimi bulunmaktadır. Tüm deneylerde bu süpernatantlar kullanılmıştır. Her deney 3 tekrarludur.

### 2.2 Lipaz Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivitesinin tayininde pH-stat adlı otomatik titratör cihazı kullanılmıştır. pH-stat sistemi, reaksiyon haznesinin pH değerini sabit bir değere ayarlayan otomatik titratördür. Reaksiyon haznesi sabit bir değere ayarlanır ve reaksiyon süresi belirlenir. Daha sonra titrasyon için reaksiyon haznesine eklenen NaOH nedeniyle pH değişir. Reaksiyon verimi, ayarlanan pH'ı tekrar yakalamak için titre edilen bazın miktarı ile ölçülür. Emülsiyon haline getirilmiş triaçilgliseroller, reaksiyon haznesinin pH'ı ve sıcaklığı uygun bir pH tamponu (NaOH) ile kontrol edildiğinde lipaz ilave edildikten sonra yağ asitlerine hidrolize edilebilir, böylece sistemin pH'ı düşer. Lipazın tüm substratı tüketmesi durumunda pH'daki düşüş durur. Otomatik titrasyon başlar ve tepkime öncesi pH yakalanana kadar titrasyon yapılır. Bu işlem, ilave edilen lipaz örneğinin etkisini ortadan kaldıran standart bir NaOH çözeltisinin hacmini hesaplar. Lipaz aktivitesi, titre edilmiş baz hacmi vasıtasıyla tanımlanır.

Lipaz üretiminin gözlenmesi için kültürlerle ait sıvı besin ortamlarından her 24 saatte bir örnek alınmıştır. Lipaz aktivitesi, sabit sıcaklık (30 °C) ve pH'da (7.5) 1 dakikada titre edilen 0.01 M NaOH miktarıyla belirlenmiştir. Reaksiyon ünitesi 45 mL Tris-glisin tamponu [1 mM Tris-glisin (pH

7.5), 0.1 M NaCl ve 5 mM CaCl<sub>2</sub>], 1.5 mL emülsifiye substrat [distile su içinde %10 tributirin (emülsifiye edilecek triaçilglycerol), %1 gum Arabic (emülsifiye edici) çözelti] içerir. Substrat çözeltisi sonikatör yardımıyla emülsifiye edilir ve tampon çözeltiye eklendikten sonra optimum pH değeri olan 7.5'e ayarlanır. 1 mL örnek sisteme eklenir ve 1 dakika sonra NaOH titrasyonu başlatılır. Örneklerin ya da yağ asitlerinin akümülyasyonunun enzim aktivitesine etkisini önlemek amacıyla her ölçümde tampon ve substrat yenilenir.

### 2.3 Hamur Numuneleri

Bu çalışmada kullanılan kağıt hamuru numuneleri:

1. Saf elyaf: %80 uzun elyaf ve %20 kısa elyaf selülozdan oluşur.
2. 1. kalite geri dönüşümlü kağıt: Ofis kağıt ve dokümanlarından oluşur, mürekkep ve yapıştırıcı gibi kirlilikler içerebilir. Bu nedenle mürekkepten arındırma işlemi uygulanmıştır.
3. Atık kağıt: Bu numunelerin %80'i gazete, %20'si oluklu kartondan oluşmaktadır.
4. Geri dönüşümlü kağıt: Her türlü atık kağıttan oluşur, kirlilik oranı en yüksek numunelerdir. Bazı temizleme işlemlerinden geçirilmiştir.

### 2.4 Sokslet Ekstraksiyonu

Kağıt hamuru numuneleri oda sıcaklığında kurulduktan sonra aseton ile 6 saat sokslet ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Aseton rotari evaporatör ile tamamen uçurulduktan sonra hamur ekstraktları 2 mL kloroform içinde çözündürülüp 5000 dev/dak hızda 5 dak santrifüj edilmiştir. Hamur numuneleri birçok atık bileşik içermektedir, bunlardan kurtulmak için numuneler santrifüj edilir ve koyu renkli süpernatant atılır ve kloroform uçurulur.

### 2.5 Asit Değeri Analizi

Asit değeri, 1 g numunedeki serbest yağ asidini nötralize etmek için gerekli mg KOH miktarıdır. Enzim uygulaması öncesi ve sonrasında serbest yağ asidi miktarının saptanması için asit değeri analizleri yapılmıştır. Numuneler, lipaz içeren süpernatant ilavesinden önce ve sonra analiz edilmiştir. Bu analiz sisteminde, kağıt hamuru numuneleri, süpernatantların ilavesiyle 37 °C'de Tris-HCl tamponu (25 mM, pH 7.0) ile 3 saat mantar ve bakteri enzimleri ile inkübe edilmiştir. Aynı hacim, kontrollere sadece Tris-HCl tamponunun eklenmesiyle elde edilmiştir. Çalışma boyunca enzimlerin eşit birimleri kullanılmıştır. İnkübasyonun ardından, numuneler vakumda filtrelenmiş ve filtratlar, hamur numunesi süzüntülerinde bulunan yağ asitlerini ekstrakte edebilen n-hekzan ile muamele edilmiştir. Süzülen maddenin bir hunide n-hekzan ile hızlı bir şekilde çalkalanmasından sonra, alt faz atılmış ve üst faz temiz bir şişeye alınmıştır. 5 damla fenol fitalein bu faza ilave edilmiştir ve 0.005 N KOH ile titre edilmiştir. Asit değeri tüketilen

KOH miktarının hesaplanmasıyla tespit edilmiştir.

Hesaplama:

Asit değeri, örnekteki mg KOH = [(A-B) x N x 56.1]/W  
A = titrasyonda kullanılan standart alkalinin mL cinsinden miktarı  
B = körün titrasyonunda kullanılan alkalinin mL cinsinden miktarı  
N = standart alkalinin normalitesi  
W = örneğin gram cinsinden miktarı ifade eder.

## 2.6 Gaz Kromatografi Analizi

Sokslet ekstraksiyonundan sonra tüm numuneler hidrofilik polipropilen membran filtrelerden geçirilmiştir. Gaz kromatografi analizleri alev iyonizasyon dedektörlü 6890N network sisteminde yapılmıştır (Agilent Technologies, ABD). Kağıt hamuru numuneleri 2 mL kloroformda çözüldükten sonra 0.22 µm filtreden şırınga edilmiştir (Millipore, ABD). 1 µL filtrat bileşik-silika kapiler kolonda 24 dakika yürütülmüştür (DB-5HT, 15 m x 0.25 mm I.D., 0.1 µm film inceliği; J&W, ABD). Fırın sıcaklığı 100 °C'den 350 °C'ye dakikada 15 °C artışla çıkartılmıştır. Mobil faz olarak helyum kullanılmıştır. Standartlar (palmitik asit, stigmasterol, sitosterol, kolesteril oleat ve triheptadekanoil; Sigma, Almanya) 0.1 ile 1.0 mg/mL aralığında değişen konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Her koşulda korelasyon katsayısı 0.99'dan yüksektir. Tüm pikler pik alanından hesaplanmıştır. Mumlar, sterol esterlerine ait kalibrasyon eğrisi kullanılarak ölçülürken, steroid ketonlar sitosterol, squalen ise stigmasta-3,5-diene ait kalibrasyon eğrisi kullanılarak ölçülmüştür.

## 3 Bulgular ve Tartışma

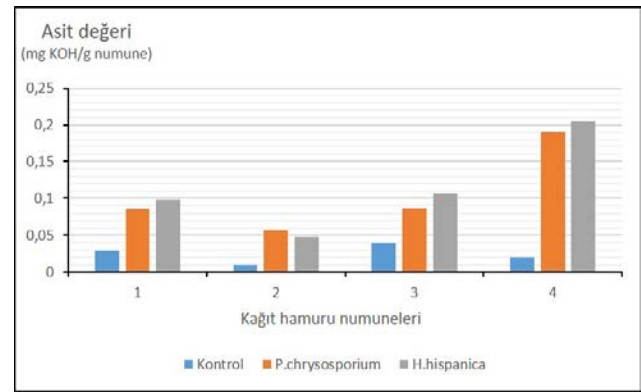
### 3.1 Enzim Aktivitesinin Tayini

Bu çalışma kapsamında, geri dönüştürülmüş kağıt hamurlarının zift içeriği fungal ve bakteriyel lipaz ile azaltılacak şekilde incelenmiştir. Zift bileşenlerinin saptanması, azaltılması ve kontrollerle kıyaslanması için farklı yöntemler uygulanmıştır. Kültürler ilk olarak agar içeren katı besiyerinde üretilmiştir. Ardından her iki kültür de, ekstraselüler bir enzim olan lipaz üretimini incelemek için sıvı ortamda yetiştirilmiştir. Sıvı kültürler içinde lipaz aktivitesinin varlığı, pH-stat ile gösterilmiştir. Kültürlerdeki ekstraselüler lipaz aktivitesini belirlemek için her 24 saatte bir örnek alınmıştır. *Phanerochaete chrysosporium* kültüründe en yüksek lipaz aktivitesine 5. günde (964 U/L) ulaşılmıştır. İnkübasyonun ilk evresinden 3. haftaya kadar lipaz aktivitesi tespit edilmiştir. Bu sonuç Wymelenberg ve arkadaşlarının rapor ettiği sonuçlarla paraleldir [20]. *Haloarcula hispanica* kültüründe ise en yüksek lipaz aktivitesine 24. günde ulaşılmıştır (2190 U/L). *P. chrysosporium*, problemlili lipofilik bileşikler üzerindeki hücre dışı ligninolitik özgülüğü nedeniyle tercih edilmiştir, ancak pH-stat sonuçları, *H. his-*

*panica* lipazının *P. chrysosporium* lipazına kıyasla daha aktif olduğunu göstermektedir. *H. hispanica* ekstrem koşullara dayanıklı bir mikroorganizma olup yüksek aktiviteye sahip termostabil bir lipaz ürettiği rapor edilmiştir [19].

### 3.2 Asit Değeri Analizi

Asit değeri analizi, lipaz etkinliği ile serbest yağ asidi artışını göstermek için standart lipid belirleme yöntemleriyle yapılmıştır. Bu analiz sisteminde, üretim hatlarından 10 g kağıt hamuru örneği alınmış ve asit değerleri mikrobiyal besiyeri süpernatantları içeren ve içermeyen (kontrol) gruplara göre belirlenmiştir. Bu deneyde her deney için kağıt hamuru miktarı sabit olup kullanılan lipaz içeren süpernatant miktarı 100 U olarak uygulanmıştır.



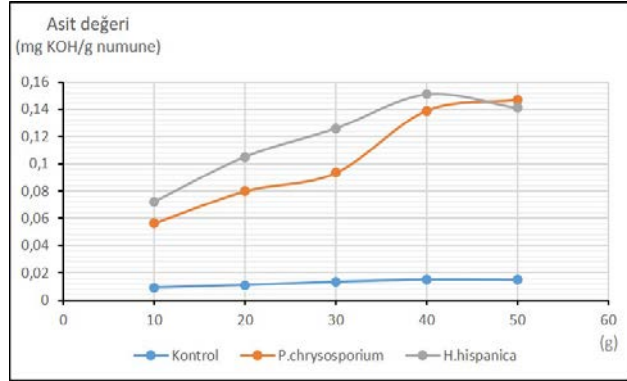
**Şekil 1.** Farklı üretim hatlarından alınan 1, 2, 3 ve 4 no.lu kağıt hamuru numunelerinin asit değeri analizi. Sabit miktarda kağıt hamuruna (10 g) uygulanan *P. chrysosporium* ekstraselüler lipazı (100 U) ile *H. hispanica* ekstraselüler lipazı (100 U) enzim içermeyen kontrol grubuyla karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir.

Asit değeri analizlerinin sonuçları, lipaz içeren fungal ve arkeal besiyeri süpernatantlarının eklenmesiyle tüm numunelerdeki asit değerinin artırdığını göstermektedir. Şekil 1'den anlaşılacağı gibi en sorunlu numuneler 1 ve 4 numaralıdır. Bu numunelerdeki asit değeri yükselişi lipofilik bileşiklerdeki yoğunluğa işaret etmektedir. Bu deneyle en fazla zift bileşeni içeren numunenin 4 no.lu numune olduğu belirlenmiş ve diğer çalışmalarda bu numunenin kullanılmasına karar verilmiştir. Lipaz eklenen numunelerin asit değeri, enzim içermeyen kontrol grubunun asit değerinden 2-10 kat daha yüksektir. Örneğin, 4 no.lu numunede kontrol grubunun asit değeri 0.02 mg/g iken *P. chrysosporium* ekstraselüler lipazı eklendiğinde bu değer 0.19 mg/g'a çıkmış, *H. hispanica* ekstraselüler lipazı ile 0.205 mg/g'a yükselmiştir.

### 3.3 Kağıt Hamuru Kuru Ağırlığının Etkisi

Bu bölümde en sorunlu üretim hattından alınan 4 numaralı kağıt hamuru numunesi kullanılmıştır. Kağıt hamuru miktarı artırılarak 10, 20, 30, 40 ve 50 g kuru kağıt hamuruna

sabit miktarda lipaz eklenmiştir. Her deneyde kontrol grubu hariç 50 U enzim kullanılmıştır. Deneyde sabit miktarda enzim, artan miktar kağıt hamuruna uygulanarak serbest yağ asidindeki artış incelenmiştir.

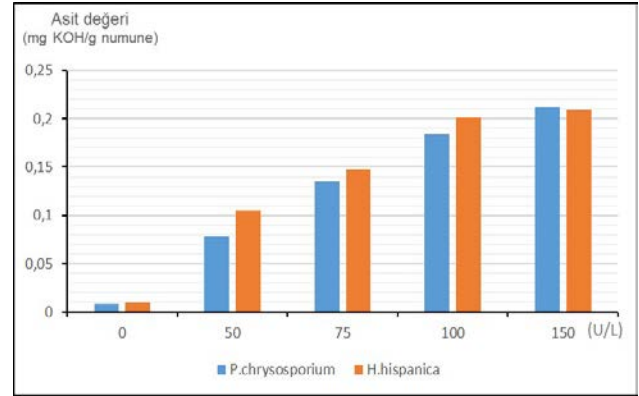


**Şekil 2.** Hamur ağırlığının asit değerine etkisi. Deneyde artan miktarda kağıt hamuruna (10-50 g), *P. chrysosporium* ve *H. hispanica* ekstraselüler lipazı enzim miktarı sabit tutulmak koşuluyla (50 U) kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak uygulanmış ve serbest yağ asidi artışı incelenmiştir.

Bu deneyde, kullanılan fungal ve arkeal lipazların hidroliz kapasitesi tespit edilmiştir. Sonuçlar göstermektedir ki, hamur ağırlığı 10 gr'dan 50 gr'a çıktıkça serbest yağ asidi miktarı lipaz varlığında kontrol grubuna oranla yaklaşık 10 kat artmıştır (Şekil 2). Enzim türleri karşılaştırıldığında arkeal lipaz ile fungal lipazın asit değeri artışına etkisinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. Lipazlar özgülüğünü organizmadan organizmaya değiştirirse de, diaçilgliserol ve monoaçilgliserol ile karşılaştırıldığında, aynı ortam içerisinde hepsinin tercihen triaçilgliserol üzerinden hareket ettiği bilinmektedir [21]. Hamur ağırlığı arttıkça, lipaz ilaveli numunelerin asit değeri artmaktadır. Bu da, hamur numunelerinin zift içeriğinin hamurun miktarıyla orantılı biçimde arttığını göstermektedir. 50 g hamurun *H. hispanica* ekstraselüler lipazı ile muamelesinde asit değerindeki düşüş substrat inhibisyonunu akla getirmektedir. Sonuçlar, sabit miktarda enzim kullanılarak artan miktarda ziftin hidrolizinin gerçekleşebileceğini göstermektedir.

### 3.4 Enzim Miktarının Etkisi

Bu deneyde numune miktarı sabit tutulmuş, lipaz miktarı zift hidrolizini test etmek için artırılmıştır. Deneylerde metotta belirtilen kağıt hamuru numunelerinden 4 no.lu numune kullanılmıştır. Enzim aktivitesi, kontrol grubu (0 U/L) ile 50, 75, 100 ve 150 U/L olacak biçimde *P. chrysosporium* ve *H. hispanica* ekstraselüler lipazı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Her deneyde 20 g kuru kağıt hamuru numunesi kullanılmıştır.



**Şekil 3.** Artan enzim miktarının kağıt hamuru numunesinin asit değerine etkisi.

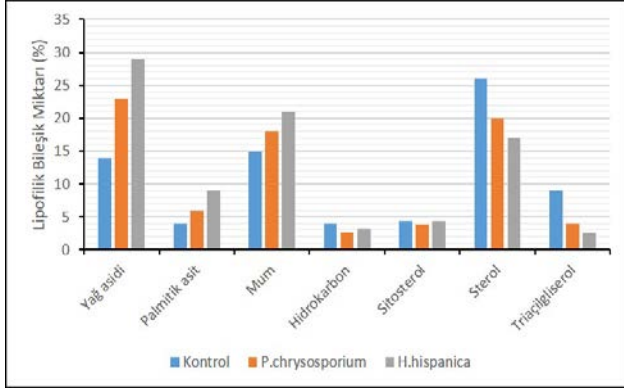
Numune 4, en problemlü üretim hattından alınan örnek olup kontrolü fungal ve arkeal kaynaklı lipazların yol açtığı asit değeri artışının belirlenmesini sağlamıştır. Kontrolün asit değeri 0,01 mg/g iken enzimatik hidroliz sonucu bu değer 10 kattan fazla yükselmiştir. Enzim ünitesi arttıkça ortaya çıkan serbest yağ asidi miktarı Şekil 3'teki grafikte görülmektedir. Bu sonuçlar açıkça, fungal ve arkeal kaynaklı lipaz içeren süpernatantların ortama eklenmesiyle serbest yağ asidi miktarında artış olduğunu göstermiştir. Diğer sonuçlarla paralel olarak bu deney sonuçları da, *H. hispanica* ve *P. chrysosporium* lipazı ile muamele edilen numunelerde lipofilik bileşiklerin hidrolize olduğunu göstermektedir. Asit değeri analizi sonuçlarıyla belirlenen ve enzimatik muamele sonucu elde edilen serbest yağ asidi artışı, hem *P. chrysosporium* hem de *H. hispanica* süpernatantlarının kağıt hamurunda mevcut problemlü yağ bileşiklerinin hidrolizinden sorumlu olduğunu ifade etmektedir.

### 3.5 Gaz Kromatografi Analizi

Kağıt hamuru numunelerindeki lipofilik bileşikler gaz kromatografi cihazı ile analiz edilmiştir. Gaz kromatografi, örnekler fungal lipaz ve arkeal lipaz eklendiğinde gerçekleşecek serbest yağ asidi artışını göstermek için kullanılmıştır. Ayrıca, diğer zift bileşenlerinin miktarlarındaki değişim de bu sistemde analiz edilmiştir. Gaz kromatografi yöntemi, 100 - 350 °C arasında bir sıcaklıkta 24 dakikalık bir süreye sabitlenmiştir. Kapiler kolonun temizlenmesi için dedektör sıcaklık süresi 3 dakika ile 10 dakika arasında değiştirilmiştir. Palmitik asit, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, kolesterol-oleat, triheptadekanoin sırasıyla yağ asitleri, mumlar, steroid hidrokarbonlar, sitosteroller ve sterol esterleri, steroid ketonlar ve triaçilgliserollerin kalibrasyonu için kullanılmıştır.

4 no.lu numunenin gaz kromatografi analizi, lipaz ilave edildiğinde serbest yağ asidi miktarı artarken steroller, steroid hidrokarbonlar, sitosteroller, steroid ketonlar ve tria-

çilgliserollerin azaldığını göstermiştir (Şekil 4). Bu sonuçlar, üretilen lipazın kontrol grubuyla karşılaştırıldığında problemlili zift bileşiklerinin parçalanmasında başarılı olduğunu kanıtlamıştır.



Şekil 4. Numune 4'e ait sorunlu zift bileşiklerini gösteren gaz kromatografi analizi sonuçları.

#### 4 Sonuç

Bu çalışmada geri dönüşümlü kağıt üretiminde karşılaşılan problemlili zift bileşiklerinin hidrolizine ait biyoteknolojik bir yöntem incelenmiş ve rapor edilmiştir. Deneyler *Phanerochaete chryso sporium* ve *Haloarcula hispanica* lipazlarıyla tasarlanmış ve sonuçlar enzim içermeyen kontrol grubuyla karşılaştırılmalı olarak alınmıştır. Sonuçlar mikrobiyal enzimlerin etkisini açıkça göstermektedir ki kullanılan ekstraselüler lipazlar numunelerdeki zift bileşikleri ve yapışkan elementlerin başarılı biçimde parçalanmasından sorumludur. Bu enzimlerin büyük ölçekli üretimi ve sanayiye uygulanması ileriki çalışmalarda yapılacaktır.

#### Referanslar

1. Rousu, P.; Rousu, P.; Anttila, J. Sustainable Pulp Production from Agricultural Waste, *Resources, Conservation, and Recycling*, 2002; 35, 85-103.
2. Hoekstra, P.M.; May, O.W. Developments in the Control of Stickies. Recycling Paper: From Fiber to Finished Product. *Tappi Journal*, 1990; 2, 446-450.
3. Kenny, R.M.; Engstrom, G.G. New Technology for Stickies. Recycling Paper: From Fiber to Finished Product. *Tappi Journal* 1990; 2, 531-535.
4. Pommier, J.-C.; Fuentes J.-L.; Goma G. Using Enzymes to Improve the Process and the Product Quality in the Recycled Paper Industry. I: The Basis Laboratory Work. *Tappi Journal* 1989; 72, 187-191.
5. Bajpai, P.K. Solving the Problems of Recycled Fiber Processing with Enzymes. *Bioresources*, 2010; 5, 1311-1325.
6. Pala, H.; Lemos, M.A.; Mota, M.; Gama, F.M. Enzymatic Upgrade of Old Paperboard Containers, *Enzyme and Microbial Technology*. 2001; 29, 274-279.

7. Beg, Q.K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G.S.; Microbial Xylanases and Their Industrial Applications: A Review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001; 56, 326-338.
8. Gutierrez, A.; del Rio, J.C.; Martinez, M.J.; Martinez, A.T. The Biotechnological Control of Pitch in Paper Pulp Manufacturing. *Trends in biotechnology*, 2001; 19, 340-348.
9. Martinez-Inigo, M.J.; Gutierrez, A.; del Rio, J.C.; Martinez, M.J.; Martinez, A.T. Time Course of Fungal Removal of Lipophilic Extractives From Eucalyptus globulus Wood. *Journal of biotechnology*, 2000; 84, 119-126.
10. Fischer, K.; Puchinger, L.; Schloffer, K.; Kreiner, W.; Messner, K. Enzymatic Pitch Control of Sulfite Pulp On Pilot Scale. *Journal of biotechnology*, 1993; 27, 341-348.
11. Gutierrez, A.; Romero, J.; del Rio, J.C. Lipophilic Extractives in Process Waters During Manufacturing of Totally Free Kraft Pulp from Eucalypt Wood. *Chemosphere*, 2001; 44, 1237-1242.
12. del Rio, J.C.; Romero, J.; Gutierrez, A. Analysis of Pitch Deposits Produced in Kraft Pulp Mills Using a Totally Chlorine Free Bleaching Sequence, *Journal of Chromatography A*, 2000; 874, 235-245.
13. Hata, K.; Matsukura, M.; Taneda, H.; Fujita, Y. Mill-Scale Application of Enzymatic Pitch Control During Paper Production. ACS Publications, Chapter 22, 1996; 280-296.
14. del Rio, J.C.; Gutierrez, A.; Gonzalez-Vila, F.J. Analysis of Impurities Occurring in a Totally Chlorine Free-Bleached Kraft Pulp, *Journal of Chromatography A*, 1999; 830, 227-232.
15. Gutierrez, A.; del Rio, J.C.; Martinez, A.T. Fungi and Their Enzymes for Pitch Control in the Pulp and Paper Industry Industrial Applications, 2nd Edition, The Mycota X, M. Hofrichter (Ed.), © Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.
16. Adav, S.S.; Ravindran, A.; Sze, S.K. Quantitative Proteomic Analysis of Lignocellulolytic Enzymes by Phanerochaete chryso sporium on Different Lignocellulosic Biomass. *Journal of proteomics*, 2012; 75, 1493-1504.
17. Asther, M.; Lesage, L.; Drapron, R.; Corrieu, G.; Odier, E. Phospholipid and Fatty Acid Enrichment of Phanerochaete Chryso sporium INA-12 in Relation to Ligninase Production. *Applied microbiology and biotechnology*, 1988; 27, 393-398.
18. Attar, A.; Ogan, A.; Yucel, S.; Turan, K. The potential of Archaeosomes as Carriers of pDNA into Mammalian Cells. *Artificial Cells Nanomedicine Biotechnology*, 2016; 44, 710-716.
19. Özgen, M.; Attar, A.; Elalmış, Y.; Birbir, M.; Yücel, S. Enzymatic Activity of a Novel Halotolerant Lipase from Haloarcula hispanica 2TK2. *Polish Congresses on Chemical Technology*, 2016; 18, 20-25.
20. Wymelenberg, A. V.; Minges, P.; Sabat, G.; Martinez, D.; Aerts, A.; Salamov, A.; Dosoretz, C. Computational Analysis of the Phanerochaete chryso sporium v2. 0 Genome Database and Mass Spectrometry Identification of Peptides in Lignolytic Cultures Reveal Complex Mixtures of Secreted Proteins. *Fungal Genetics and Biology*. 2006; 43, 343-356.
21. Striby, L.; Lafont, R.; Goutx, M. Improvement in the Iatroscan Thin-Layer Chromatographic-Flame Ionisation Detection Analysis of Marine Lipids. Separation and Quantitation of Monoacylglycerols and Diacylglycerols in Standards and Natural Samples. *Journal of Chromatography A*, 1999; 849, 371-380.