

BIYODELİGNİFİKASYON VE BIYOTEKNOLOJİK ÖNEMİ

Doç. Dr. Nazif KOLANKAYA*
Dr. Necdet SAĞLAM**

Fotosentez olarak bilinen biyolojik süreç ile yeryüzünde her yıl 33×10^{10} ton CO_2 bitkisel yaşam tarafından özümlemektedir. Bu özümleme sonucu oluşan karbohidratların başında, bitki hücre-duvarı'nın ana bileşeni selüloz gelmektedir. Bu şekilde fotosentetik biyosentezle her yıl yeryüzünde 22×10^9 ton selüloz oluşmaktadır.¹ Selüloz moleküler yapısı bakımından β 1,4 glikozid bağları içeren bir glikoz polimeri olduğundan, enerjice yüksek bir potansiyele sahiptir. Vejetatif yaşamla her yıl yenilenebilir özelliğine sahip bu potansiyel enerji kaynağının ancak % 20'si yararlı amaçlarla kullanılabilir. Geriye kalan önemli miktarda selüloz ise doğal ekolojik sistemde yer alan mikroorganizmalarla tekrar CO_2 'e dönüştürülmektedir.

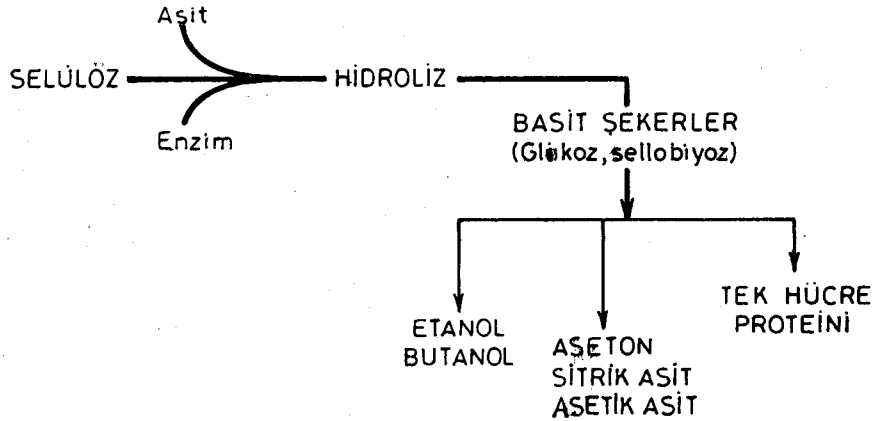
Günümüzde selüloz'un hammadde olarak kullanım alanı bulunduğu sanayii dallarının başında selüloz-kağıt sanayii gelmektedir. Selülozlu maddelerden enerji kaynağı olarak yararlanma ise çok sınırlı alanlarda olmaktadır. Bu yararlanma, ya selülozlu maddeleri yakıt enerjisi kaynağı olarak kullanma şeklinde, ya da rumenli (işkembeli) hayvanların besin maddesi olarak, onların metabolik enerji kaynağını sağlamak şeklinde olmaktadır.

İçinde bulunduğumuz yüzyılın birinci yarısından itibaren, yenilenebilir bu potansiyel enerji kaynağından daha değişik amaçlarla yararlanmayı hedefleyen bilimsel araştırma ve teknolojik çalışmaların artmış olduğunu görmekteyiz. Söz konusu bu çalışmalarda ilk aşamada amaçlanan, selülozu asit yada enzim aracılığıyla hidrolize ederek bu polisakkariti daha kolay fermente edilebilir glikoz veya sellobiyoz (disakkarit) gibi yapısal bakımdan daha basit şekerlere dönüştürmektir. Daha sonraki aşamalar için, selülozdan bu şekilde elde edilecek şekerleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmak suretiyle, bilinen ferman-

* Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Öğretim Üyesi.

** Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Araştırma Görevlisi.

tasyon süreçlerini uygulayarak çeşitli kimyasallar, organik asitler (örneğin; sitrik asit, asetik asit gibi), enerji içeriği olan organik alkoller (örneğin; etanol, butanol gibi) ya da tek-hücre-protein üretimi hedef alınmıştır (Bkz. Şekil 1). Bu yöndeki çalışmalara endüstriyel ölçekte, ilk kez ülkede ortaya çıkan protein açığını gidermek için II. Dünya Savaşı sırasında Hitler Almanya'sında başlanmıştır.² Ancak, sonuçta selüloz hidrolizatından besin-mayası üretimi teknolojik olarak geliştirilmiş ise de, asit hidrolizi sırasında oluşan furfural türevi toksik bileşiklerin, üretilen besin-mayasına geçmesinden dolayı bu şekildeki üretimden kısa sürede vazgeçilmek zorunda kalınmıştır. Bununla beraber, selülozun asit hidrolizatından hayvan besiciliğinde kullanılan besi-mayası üretimi esasına dayalı bazı tesislerin 1940'lı yıllardan bu yana Sovyetler Birliği'nde kullanılmakta olduğu bilinmektedir. Selüloz'un seyreltik mineral asitlerle hidrolizi, yüksek ısı, basınç ve korozyona dayanıklı kaplara gereksinim gösterir. Öte yandan, asidik hidroliz sırasında toksik bileşiklerin de ortaya çıkma olasılığı yüksek olduğundan, bu yöntem gerek ekonomik, gerekse sağlık açısından bazı dezavantajlar taşımaktadır. İşte bu nedenlerle, son yıllarda daha çok batılı ülkelerin çeşitli laboratuvarlarında selüloz'un enzimatik hidrolizini geliştirmeye yönelik çalışmalara büyük bir ivme kazandırılmıştır.



Şekil 1
Selüloz Hidrolizatının Değişik Üretimlerde Kullanımı.

Doğal selüloz, bitkisel yapılarda çoğunlukla lignin adı verilen karmaşık yapıdaki aromatik bir birleşikle beraber bulunur. Karmaşık yapısı nedeniyle lignin, rekalsitrant (biyolojik parçalanmaya dayanıklı) bir özelliğe sahiptir. Ayrıca, lignin bileşiği, selüloz'un hidrolizinden sorumlu selülaz enziminin kendi substratı olan selüloz'a bağlanmasını engeller.^{3,4} Lignin bu özellikleri nedeniyle, doğada her yıl yenilenebilen vejetatif

yaşamın yine doğal ekosistemde mevcut selülitik (selüloz'u parçalayan) mikroorganizmalar tarafından kısa sürede ortadan kaldırılmasında koruyucu bir rol oynuyor denilebilir. Ancak, lignin'in yine bu özelliğidir ki, bitkisel materyallerin enzimatik hidroliz süreci ile değerlendirilmesini amaçlayan çalışmalarda hidroliz öncesi delignifikasyonu (lignin'in yapıdan uzaklaştırılması) zorunlu hale getirmiştir.

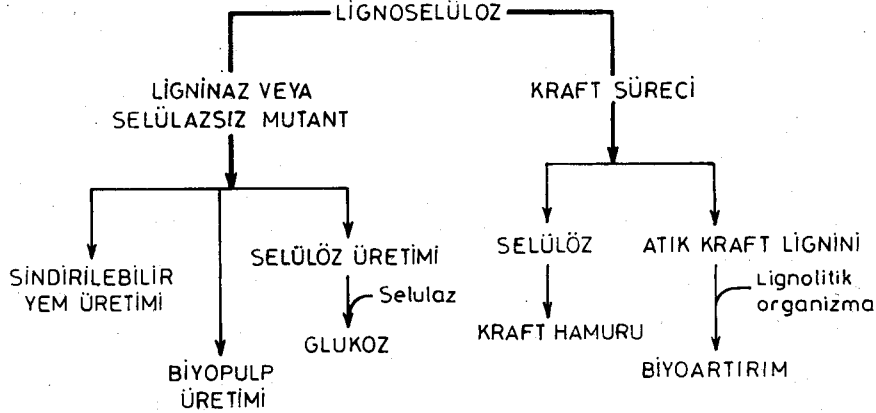
Lignin'in bitkisel materyallerde selülozla beraber bulunmasının yarattığı bir başka sorun da hayvan besiciliğinde karşımıza çıkmaktadır. Bilindiği üzere, et ve süt üretimi yönünden önem taşıyan iştakembi hayvanların temel besinini ot ve saman gibi lignoselülozlu maddeler oluşturmaktadır. Bu grup hayvanlar kendi enerji ve biyosentez metabolizmaları için gerekli enerji kaynağı ve yapı taşlarını selüloz'un hidroliz ürünlerinden sağlarlar. Selüloz hidrolizi bu grup hayvanların iştakembi-lerinin bir bölümü olan rumen'in normal florasında var olan anaerobik ve selüloz'u hidrolize edebilen karaktere sahip rumen bakterilerince gerçekleştirilir. Ne varki, söz konusu bakteriler bu işlevlerini sentezledikleri selüloz enzimiyle gerçekleştirdiklerinden, ot ve saman gibi maddelerde yer alan lignin yine bu maddelerde bulunan selüloz'un rumen içinde yetersiz ve yavaş sindirilmesine neden olmaktadır. Bu bakımdan, son yıllarda saman gibi temel besin maddelerinin delignifikasyonla rumen-içi sindirimini arttırmaya yönelik çalışmalar bazı araştırma kuruluşlarında gerçekleştirilmiştir.^{5,6}

Doğada gerek selüloz gerekse lignin hidrolizinden sorumlu enzimlerin sentezi sadece metabolik bakımdan özelleşmiş bazı mikroorganizmalarca başarılabilen bir olgudur. Günümüzde selüloz enzimi üretimi endüstriyel ölçekte çeşitli amaçlarla yapılabilmekte ve üretim için *Aspergillus niger* ve *Trichoderma viride* gibi fungus türleri kullanılmaktadır.

Lignin biyodegradasyonu (biyolojik parçalanması) ve transformasyonu ile ilgili çalışmalar kısa bir geçmişe sahip olmakla beraber, bu çalışmaların sonucu olarak doğadaki lignin biyodegradasyonunda daha çok beyaz-çürükçül fungusların etkin oldukları saptanmıştır.^{7,8} Özellikle bu fungus grubuna giren *Phanerochaete chrysosporium*' la lignin biyodegradasyonu ile ilişkili dünyanın çeşitli laboratuvarlarında çok sayıda araştırma yapılmış ve halen de yapılagelmektedir.^{9,10}

Lignin biyodegradasyonu yada transformasyonu ile ilgili biyokimyasal mekanizma tam anlamıyla ortaya çıkarılmıştır denilemez. Ancak, çalışmalar bu olayın beyaz-çürükçül funguslarda sekonder metabolizma olgusuna dayanan ve oksidatif enzimlerle yürütülen bir biyokimyasal süreç olduğunu göstermektedir.¹¹ Bu sürecin sekonder metabolizmaya bağlı olması nedeniyle de lignolitik mikroorganizmalar karbon-enerji kaynağı

olarak lignin dışında başta glikoz veya selüloz gibi diğer karbonhidratlara gerek duyarlar. Bunun için lignolitik mikroorganizmaları, lignoselülozlu maddelerin delignifikasyonunda direkt olarak kullanmanın aynı zamanda selüloz biyodegradasyonuna da sebep olacaklarından, sakıncaları bulunmaktadır. Nitekim, bu durum dikkate alınarak özellikle biyolojik selüloz hamuru üretiminde kullanılmak amacıyla selülazsız-mutant türler eldesine gidilmiştir.¹³ Ayrıca, yine delignifikasyon işlemlerinde kullanılmak üzere son yıllarda varlığı gösterilen^{13,14} ligninaz enziminin de lignolitik mikroorganizmalardan elde edilmesi önem kazanmıştır. Gerek selülazsız-mutant türler, gerek ligninaz enzimiyle yapılacak biyodelignifikasyonda amaçlanan kağıt endüstrisinin hammaddesi selüloz-hamurunu bugün kullanılmakta olan kimyasal ve mekanik süreçlere kıyasla daha ekonomik olacak biyolojik bir süreçle üretmektir (Biyopulp üretimi). Öte yandan, yine bu şekilde gerçekleştirilecek delignifikasyonlarla (Bkz. Şekil 2) besicilikte kullanılan çeşitli lignoselülozlu maddelerin rumen-içi sindirilebilirlik değerleri artırılabilir, ayrıca yine bu maddelerin selülaz enzimiyle şekerleştirilmeleri kolay ve ekonomik olacaktır.



Şekil 2

Lignin Biyodegradasyonunun Biyoteknolojik Amaçlara Yönelik Kullanım Alanları.

Günümüz selüloz-kağıt endüstrisinin selüloz-hamuru (pulp) üretiminde çoğunlukla tercih ettiği üretim süreci Kraft sürecidir. Ancak bu süreci uygulayan işletmelerin atık suları önemli miktarda lignin türevi bileşikler içerdiğinden, küçümsenmeyecek oranda bir kirlilik yüküne sahiptir.¹⁵ Lignin bileşiklerinin rekalsitran özelliği nedeniyle söz konusu atık işletme sularının aktif-çamur ilkesine dayanan biyolojik oksidasyon sistemleriyle arıtımı mümkün olamamaktadır. Bu durum göz önünde tutularak, aktif biyolojik ajan olarak lignolitik mikroorganizmaların yer alabileceği arıtım sistemlerinin geliştirilmesi düşünülmüş ve nitekim

başka laboratuvarlarda *P. chrysosporium*, laboratuvarımız da ise *Pleurotus sajor-caju* kullanılmak suretiyle kraft atık sularının arıtılmasında yararlanılmak üzere laboratuvar ölçeğinde özel arıtım sistemleri geliştirilmiştir.^{16, 17, 18}

Kısaca denilebilir ki, lignin biyodegradasyonu temeline dayalı biyoteknolojik yöntemler, bir kısmı yukarıda sayılan çeşitli sorunların çözümünde gelecekte geniş çapta uygulama alanı bulabilecektir.

KAYNAKÇA

1. Humphrey, E.A. (1975). **Economical Factors in The Assessment of Various Cellulosic Substance as a Chemical and Energy Resources. Biotechnol. and Bioeng. Symp. 5**, 49-65.
2. Sacsmen, J.F. and Anderson, A.A. (1954). "In industrial fermentation" Underkofler and Hickey Eds. Chem. Publ. New York.
3. Stone, J.E. and Scallan, A.M. (1969). **Digestibility as a Simple Function of a Molecule of Similar Size to a Cellulase Enzyme. Adv. in Chem. Series. 95**, 219-238.
4. Goldstein, I.S. (1976). **Chemicals from lignocellulose. Biotechnol. and Bioeng. Symp. 6**, 293-301.
5. Kolankaya, N., Stewart, C.S., Duncan, S.H., Cheng, K.-J. and Costerton, J.-V. (1985). **The effect of ammonia treatment on the solubilization of straw and growth of cellulolytic rumen bacteria. J. Appl. Bacteriol. 58**, 371-379.
6. Hartley, R.D. (1981). Chemical constitution, properties and processing of lignocellulosic wastes in relation to nutritional quality for animals. **Agriculture and Environment 6**, 91-113.
7. Kirk, T.K. (1984). Degradation of lignin. In: Gibson, D.T. (ed.) **Microbial degradation of organic compounds. Microbiology Series. 13** New York; Marcel Dekker, Inc. **14**, 399-437.
8. Kirk, T.K. and Cowling, E.B. (1984). Biological decomposition of solid wood: The chemistry of solid wood, Rowell, R.M. (ed.), **Adv. in Chem. Ser. 207**, Washington **American Chemical Society 12**, 455-487.
9. Tien, M. and Kirk, T.K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete **Phanerochaete chrysosporium** Burd. **Science 221**, 661-663.
10. Kirk, T.K., Connors, W.J. and Zeikus, J.G. (1976). Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. **J. Appl. Environm. Microbiol. 32**, 1, 192-194.
11. Bu'Lock, J.O. (1975). Secondary metabolism in fungi and its relationship to growth and development p. 33-58. In Smith, J.E. and Berry, D.R. (ed.), **The filamentous fungi 1, Industrial Mycology**, Wiley, New York.
12. Kirk, T.K. and Tien, M. (1986). Lignin degrading activity of **Phanerochaete chrysosporium** Burds: Comparison of Cellulase-negative and other strains. **Enzyme. Microb. Technol. 8**, 75-80.
13. Kirk, T.K. Croan, S. and Tien, M. (1986). Production of multiple ligninases by **Phanerochaete chrysosporium** : effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. **Enzyme. Microb. Technol. 8**, 27-32.

14. Asther, M. and George, C. (1987). Effect of Tween-80 and oleic acid on ligninase production by **Phanerochaete chrysosporium** INA-12. **Enzyme. Microb. Technol.** **9**, 245-249.
15. Kolankaya, N. ve Sağlam, N. (1983). Atık siyah kraft liköründe biyolojik olarak renk giderimi ve lignin biyodegradasyonu. **Doğa Dergisi** **7**, 513-517.
16. Joyce, T.W., Chang, A.G., Campbell, J.R., Gerrard, E.D. and Kirk, T.K. (1984). A continuous biological process to decolorize bleach plant effluents. **Biotech. Adv.** **2**, 2, 301-308.
17. Willershausen, H., Jüger, A. and Graf, H. (1987). Ligninase production of **Phanerochaete chrysosporium** by immobilization in bioreactors. **Journal of Biotechnology** **00**, 1-5.
18. Kolankaya, N., Arısoy, M., Sağlam, N. and Cansunar, E. (1988). Removal of color from bleach plant effluent by **Pleurotus sajor-caju**. **Doğa Dergisi** (baskıda).