



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**BİYOREAKTÖRDE MİKROPARTİKÜL
KULLANARAK *Aspergillus niger*'DEN KSİLANAZ
ENZİMİ ÜRETİMİ**

Yüksek Lisans Tezi

Ercan KOŞARLAR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**BİYOREAKTÖRDE MİKROPARTİKÜL
KULLANARAK *Aspergillus niger*'DEN KSİLANAZ
ENZİMİ ÜRETİMİ**

Ercan KOŞARLAR

Danışman: Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ÖZGEN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir

2020

Ercan KOŞARLAR tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Biyoreaktörde mikropartikül kullanarak *Aspergillus niger*’den ksilanaz enzimi üretimi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 29/01/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ÖZGEN

Üye : Doç. Dr. Sait SARGIN

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hilal Betül KAYA AKKALE

İmza




EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Biyoreaktörde mikropartikül kullanarak *Aspergillus niger*’den ksilanaz enzimi üretimi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

29 / 01 / 2020



Ercan KOŞARLAR

ÖZET

BİYOREAKTÖRDE MİKROPARTİKÜL KULLANARAK *Aspergillus niger*'DEN KSİLANAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

KOŞARLAR, Ercan

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ÖZGEN

Ocak 2020, 100 sayfa

Bu tezde biyoreaktörlerde mikropartikül kullanılarak *Aspergillus niger*'den ksilanaz enzimi üretimi üzerine çalışılmıştır.

Çalışmaya başlanırken *A. niger* ile ksilanaz enzimi üretiminde, üretim ortamına Al_2O_3 ve Talc mikropartikülleri eklenerek fungal morfolojinin etkilenmesi ve bunun sonucu olarak ksilanaz enzim üretim veriminin artırılması amaçlanmıştır. Biyoreaktör ölçeği öncesinde erlen ölçeğinde denemelerle, mikropartikül konsantrasyonu, besi ortamı bileşenlerine farklı ön işlem uygulamaları gibi parametreler belirlenmiştir.

Biyoreaktör üretimlerinde, belirli koşullar sabit tutularak, mikropartikül içeren ve içermeyen deneme setleri kurulmuş, belirli aralıklarla örnek alınmıştır. Alınan örnekler üzerinden ksilanaz enzim aktivitesi tayini ve stereo mikroskop altında *A. niger* pellet morfolojisi görüntülemeleri yapılarak çalışma tamamlanmıştır.

Anahtar sözcükler: Ksilanaz, alüminyum oksit, magnezyum silikat, mikropartikül, *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

XYLANASE ENZYME PRODUCTION BY *Aspergillus niger* WITH MICROPARTICLES IN BIOREACTORS

KOŞARLAR, Ercan

MSc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ÖZGEN

January 2020, 100 pages

In this thesis, the production of xylanase enzyme from *Aspergillus niger* has been studied by using microparticle in bioreactors.

The aim of the study was to effect the fungal morphology by adding Al₂O₃ and Talc microparticles to the production medium of *A. niger* and to increase the xylanase enzyme production efficiency. The parameters such as microparticle concentration and different pretreatment applications to the nutrient components were determined with the laboratory scale experiments before the bioreactor scale.

In bioreactor production, certain conditions have been kept constant. Experimental sets with and without microparticles were established and samples were taken at constant period. Xylanase enzyme activity was determined and morphology images of *A. niger* pellets were taken under stereo microscope. After the interpretation of the results, the study was completed.

Keywords: Xylanase, aluminum oxide, magnesium silicate, microparticle, *Aspergillus niger*.

ÖNSÖZ

Endüstriyel öneme sahip, özellikle ekmekçilik ve kağıt endüstrisinde kullanım alanı bulan ksilanaz enzimi, birçok enzim gibi yurt dışından ithal edilmektedir. Bu nedenle ksilanaz enzimi için verimli bir üretim sisteminin geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Literatür verileri ışığında fungusların önemli enzim üreticileri olduğu ve üretim ortamındaki fungal morfolojinin üretim verimine etkisi olduğu bilinmektedir. Bu bilgilere dayanarak, tez çalışması kapsamında, daha iyi ksilanaz aktivitesine, fungal morfoloji üzerinden ulaşılmaya çalışılmıştır. Fungal morfolojiyi etkilemek için Al_2O_3 ve Talc mikropartikülleri kullanılmıştır. Literatürdeki pek çok çalışmanın aksine, mikropartiküllerin etkilerinin kolay olarak incelenebildiği sentetik besin ortamları yerine, maliyet de göz önünde bulundurularak kompleks bir besin ortamı kullanılmıştır.

Tez çalışması boyunca erlen ve biyoreaktör üretimleriyle, biyolojik sistemlerin karmaşıklığı ve tahmin edilemezliği içerisinde bir yön bulmaya çalışmanın zorluklarıyla mücadele edilmiştir.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

İÇ KAPAK	ii
TEZ ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ	xviii
GRAFİKLER DİZİNİ	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Lignoselüloz	3
2.2 Hemiselüloz	4
2.3 Ksilan	5
2.3.1 Ksilan yapısı	5
2.3.1 Ksilan çeşitleri	6
2.3.2 Ksilanın enzimatik hidrolizi	7
2.4 Ksilanazlar	8
2.4.1 Ksilanaz aileleri	8

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

2.4.2	Ksılanaz üreticisi mikroorganizmalar	9
2.4.3	Ksılanazların kullanım alanları.....	14
2.4.4	Kültür ortamında fungal morfoloji ve mikropartiküller.....	16
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1	Gereç	18
3.1.1	Mikroorganizma	18
3.1.2	Substratlar	18
3.1.3	Kullanılan araçlar.....	18
3.1.4	Kullanılan kimyasallar	19
3.2	Yöntem.....	20
3.2.1	Mikroorganizma stoğu hazırlanması	20
3.2.2	Aşı hazırlanması	20
3.2.3	Spor sayısının belirlenmesi	21
3.2.4	Vogel tuzları	21
3.2.5	Erlen denemeleri.....	22
3.2.6	Biyoreaktör denemeleri.....	28
3.2.7	Ksılanaz aktivitesi tayini	30
3.2.8	Biyoreaktör örneklerinin mikroskopta görüntülenmesi	34
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	35

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

4.1	Erlen Denemeleri.....	35
4.1.1	Ön deneme	35
4.1.2	Mikropartiküllerin besin ortamı içerisinde sterilizasyon denemesi ..	39
4.1.3	Al ₂ O ₃ mikropartikülleri konsantrasyon denemesi.....	41
4.1.4	Isıl işlem ile malt çiminden ksılan ekstraksiyon denemesi.....	42
4.1.5	Malt çimi ve buğday kepeğine ön işlem denemesi	45
4.1.6	Al ₂ O ₃ konsantrasyonu ve malt çimi ön işlem denemesi.....	47
4.1.7	Talc konsantrasyonu ve malt çimi ön işlem denemesi	49
4.2	Biyoreaktör Denemeleri.....	51
4.2.1	Mikropartikül içermeyen biyoreaktör denemeleri.....	51
4.2.2	Al ₂ O ₃ mikropartikülleri içeren biyoreaktör denemeleri	54
4.2.3	Talc mikropartikülleri içeren biyoreaktör denemeleri.....	57
4.3	Biyoreaktör Örnekleri ve Mikropartiküllerin Mikroskopta Görüntülenmesi	65
4.3.1	Mikropartiküllerin stereo mikroskop görüntüleri.....	66
4.3.2	Biyoreaktör örneklerinin stereo mikroskop görüntüleri	67
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	83
	KAYNAKLAR DİZİNİ	85
	TEŞEKKÜR	99
	ÖZGEÇMİŞ	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2-1: Lignoselülozun karmaşık yapısının şematik gösterimi.	3
2-2: Hemiselülozlarda en fazla bulunan monomerik şekerler	4
2-3: Ksilan yapısı ve ksilan iskeleti üzerine bağlanan çeşitli yan birimler	6
2-4: Arabinoksilan yapısı	6
4-1: Al_2O_3 mikroskop görüntüleri.....	66
4-2: Talc mikroskop görüntüleri.....	66
4-3: R1 120.saat mikroskop görüntüleri.....	67
4-4: R1 144.saat mikroskop görüntüleri.....	67
4-5: R1 168.saat mikroskop görüntüleri.....	68
4-6: R1 192.saat mikroskop görüntüleri.....	68
4-7: R1 216.saat mikroskop görüntüleri.....	68
4-8: R2 120.saat mikroskop görüntüleri.....	69
4-9: R2 144.saat mikroskop görüntüleri.....	69
4-10: R2 168.saat mikroskop görüntüleri.....	69
4-11: R2 192.saat mikroskop görüntüleri.....	70
4-12: R2 216.saat mikroskop görüntüleri.....	70
4-13: R3 120.saat mikroskop görüntüleri.....	70
4-14: R3 144.saat mikroskop görüntüleri.....	71
4-15: R3 168.saat mikroskop görüntüleri.....	71
4-16: R3 192.saat mikroskop görüntüleri.....	71
4-17: R3 216.saat mikroskop görüntüleri.....	72
4-18: R4 120.saat mikroskop görüntüleri.....	73
4-19: R4 144.saat mikroskop görüntüleri.....	73

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4-20: R4 168.saat mikroskop görüntüleri	73
4-21: R4 192.saat mikroskop görüntüleri	74
4-22: R4 216.saat mikroskop görüntüleri	74
4-23: R5 120.saat mikroskop görüntüleri	74
4-24: R5 144.saat mikroskop görüntüleri	75
4-25: R5 168.saat mikroskop görüntüleri	75
4-26: R5 192.saat mikroskop görüntüleri	75
4-27: R5 216.saat mikroskop görüntüleri	76
4-28: R6 120.saat mikroskop görüntüleri	76
4-29: R6 144.saat mikroskop görüntüleri	76
4-30: R6 168.saat mikroskop görüntüleri	77
4-31: R6 192.saat mikroskop görüntüleri	77
4-32: R6 216.saat mikroskop görüntüleri	77
4-33: R7 120.saat mikroskop görüntüleri	78
4-34: R7 144.saat mikroskop görüntüleri	78
4-35: R7 168.saat mikroskop görüntüleri	78
4-36: R7 192.saat mikroskop görüntüleri	79
4-37: R7 216.saat mikroskop görüntüleri	79
4-38: R8 120.saat mikroskop görüntüleri	79
4-39: R8 144.saat mikroskop görüntüleri	80
4-40: R8 168.saat mikroskop görüntüleri	80
4-41: R8 192.saat mikroskop görüntüleri	80
4-42: R8 216.saat mikroskop görüntüleri	81

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2-1: Ksilanaz üreticisi bakteri ve funguslardan bazıları.....	9
2-2: Çeşitli fungus ve bakteri türlerinden elde edilen ksilanazlar ve karakteristik özellikleri	10
2-3: Ticari ksilanazlar, uygulama alanları ve özellikleri	13
2-4: Çeşitli mikroorganizmalarla yapılan enzim üretimlerinde mikropartiküllerin enzim aktivitesine etkileri.....	17
3-1: Üretim ortamında kullanılan vogel tuzları ve konsantrasyonları	21
3-2: Ön deneme erlenlerinin kodlanması	23
3-3: Mikropartiküllerin farklı sterilizasyon denemesine ait erlen kodlamaları ...	24
3-4: Isıl işlem ile ksilan ekstraksiyonu denemesine ait erlen kodlamaları	25
3-5: Malt çimi ve buğday kepeğine ön işlem denemesine ait erlen kodlamaları.	26
3-6: Al_2O_3 konsantrasyonu ve malt çimi ön işlem denemesi erlen kodlamaları .	27
3-7: Talc konsantrasyonu ve malt çimi ön işlem denemesi erlen kodlamaları....	28
3-8: Biyoreaktör denemelerinde sabit tutulan parametreler	29
3-9: Biyoreaktör denemelerine ait kodlamalar	29
3-10: Enzim aktivitesi kalibrasyon eğrisinin çıkarılması için hazırlanan konsantrasyonlar	32
3-11: Kalibrasyon eğrisi için ölçülen absorbans değerleri	33
4-1: Ön deneme erlenlerinden elde edilen aktivite değerleri.....	35
4-2: Mikropartiküllerin farklı sterilizasyon denemesi aktiviteleri	39
4-3: Al_2O_3 mikropartikülleri konsantrasyon denemesinden elde edilen enzim aktiviteleri	41
4-4: Isıl işlem ile malt çiminden ksilan ekstraksiyonu denemesinden elde edilen aktivite değerleri.....	43

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4-5: Malt çimi ve buğday kepeği ön işlem denemesinden elde edilen enzim aktiviteleri.....	45
4-6: Al ₂ O ₃ konsantrasyon ve malt çimi ön işlem denemesinden elde edilen enzim aktiviteleri	47
4-7: Talc konsantrasyon ve malt çimi ön işlem denemesinden elde edilen enzim aktiviteleri	49
4-8: R1 ve R4 denemelerinden elde edilen aktivite değerleri	52
4-9: R2,R5 ve R7 denemelerinden elde edilen aktivite değerleri.....	54
4-10: R3,R6 ve R8 denemelerinden elde edilen aktivite değerleri.....	57
4-11: Biyoreaktör üretimlerinden elde edilen enzim aktivitesi karşılaştırmaları ..	61
4-12: Ksilanaz enzim aktivitesi %artış verileri	61
5-1: Elenmiş malt çimi ile yapılan biyoreaktör üretimlerinde verimlilik değerleri.....	84
5-2: Elenmemiş malt çimi ile yapılan biyoreaktör üretimlerinde verimlilik değerleri.....	84

GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
3-1: Ksilanaz aktivitesi için kalibrasyon grafiği	33
4-1: Ön deneme kontrol erlen aktiviteleri	36
4-2: Ön deneme Al ₂ O ₃ mikropartikülü içeren erlen aktiviteleri	36
4-3: Ön deneme Talc mikropartikülü içeren erlen aktiviteleri	37
4-4: Ön deneme CaCO ₃ mikropartikülü içeren erlen aktiviteleri	37
4-5: Ön deneme erlenlerinin aktivitelerinin karşılaştırılması grafiği	38
4-6: Mikropartiküllerin farklı sterilizasyon denemesine ait aktivite grafiği.....	40
4-7: Al ₂ O ₃ mikropartikülleri konsantrasyon denemesi aktivite grafiği.....	42
4-8: Isıl işlem ile malt çiminden ksilan ekstraksiyonu denemesi aktiviteleri...	43
4-9: Malt çimi ve buğday kepeği ön işlem denemesine ait aktivite grafiği.....	46
4-10: Al ₂ O ₃ konsantrasyon ve malt çimi ön işlem denemesi ksilanaz aktivitesi grafiği-I	48
4-11: Al ₂ O ₃ konsantrasyon ve malt çimi ön işlem denemesi ksilanaz aktivitesi grafiği-II.....	48
4-12: Talc konsantrasyon ve malt çimi ön işlem denemesi ksilanaz aktivitesi grafiği-I	50
4-13: Talc konsantrasyon ve malt çimi ön işlem denemesi ksilanaz aktivitesi grafiği-II.....	50
4-14: R1 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği	52
4-15: R4 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği	53
4-16: R1 ve R4 karşılaştırmalı enzim aktivite grafiği	53
4-17: R2 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği	55
4-18: R5 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği	55
4-19: R7 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği	56

GRAFİKLER DİZİNİ (devam)

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
4-20: R2, R5 ve R7 karşılaştırmalı enzim aktivite grafiği	56
4-21: R3 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği	58
4-22: R6 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği	58
4-23: R8 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği	59
4-24: R3,R6 ve R8 karşılaştırmalı enzim aktivite grafiği	59
4-25: R1, R2 ve R3 enzim aktivitesi karşılaştırma grafiği.....	62
4-26: R4, R5, R6, R7 ve R8 enzim aktivitesi karşılaştırma grafiği.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
α	alfa
β	beta
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PDA	Patates Dekstroz Agar
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GH	Glikozit hidrolaz
g/L	gram / litre
mm	milimetre
mL	mililitre
μ L	mikrolitre
μ m	mikrometre
Al ₂ O ₃	Alüminyum oksit – Mikropartikül
Talc	Magnezyum silikat – Mikropartikül
<i>A. niger,oryzae..</i>	<i>Aspergillus</i>
% DO	Çözülmüş Oksijen (Dissolved Oxygen)

1. GİRİŞ

Doğadaki bitkisel biyokütlenin ana bileşeni olan lignoselüloz; selüloz, hemiselüloz ve lignin olmak üzere üç tip polimerden oluşur. Bu polimerler bitki hücre duvarı yapısında kovalent çapraz bağlar ve kovalent olmayan etkileşimler ile iç içe geçmiş şekilde bulunurlar (Pérez et al., 2002). Lignoselülozik biyokütle içerisinde bulunan hemiselüloz, doğada selülozdan sonra en yaygın olan polisakkarit olarak nitelendirilmektedir (Saha, 2003). Hemiselüloz yapısı D-ksiloz, D-mannoz, D-galaktoz, D-glukoz, L-arabinoz ve çeşitli şeker asitlerinin heterojen karışımından oluşur (Puls, 1997; Saha, 2003).

En yaygın hemiselüloz olan ksilan, karasal bitkilerin kuru kütlesinin %30'undan fazlasını meydana getirmektedir (Yi et al., 2010). Ksilan β -1,4-bağlantılı ksilopiranoz iskeleti üzerinde asetil, 4-O-metil-D-glukuronozil, α -arabinofurasil grupları içeren bir heteropolisakkarittir (Subramaniyan and Prema, 2002). Tahıllar, odunsu bitkiler, otsu bitkiler gibi farklı kaynaklardan elde edilen ksilanlar kompozisyonları bakımından farklılıklar gösterir (Saha, 2003).

Kompleks yapısı nedeniyle ksilanın tamamen hidrolizinin gerçekleşmesi için birkaç farklı enzimin işlev göstermesi gerekir (Subramaniyan and Prema, 2002). Endo-1,4- β -ksilanazlar (E.C.3.2.1.8) ksilan iskeletine değişen noktalardan etki ederek oligosakkaritlere parçalar, 1,4- β -D-ksilosidazlar (E.C.3.2.1.37) oligosakkaritler üzerinde çalışarak ksiloz birimlerine parçalar (Pérez et al., 2002; Subramaniyan and Prema, 2002). Ksilanlarda, iskelet üzerinde yer alan yan birimler; α -L-arabinofuranosidaz, α -D-glukuronidaz, galaktosidaz ve asetil ksilan esteraz enzimlerinin aktivitesiyle uzaklaştırılır (Subramaniyan and Prema, 2002).

Korunmuş aminoasit dizilerinin homolojilerine göre ksilanazlar “aile 10” (diğer adıyla F) ve “aile 11” (diğer adıyla G) olmak üzere ikiye ayrılır (Pérez et al., 2002).

Ksilanaz enzimleri; bakteriler, funguslar, mayalar, algler, protozoalar, salyangozlar, kabuklular, böcekler gibi çeşitli canlılarda ve bitki tohumlarında üretilmektedir. Endüstriyel açıdan bakıldığında, ksilanaz enzimlerini hücre dışı ortama salgılamaları ve diğer canlılardan daha yüksek seviyede ksilanaz üretim kapasiteleri nedeniyle, filamentli funguslar önemli ksilanaz üreticileri olarak öne

çıkılmaktadır. *Aspergillus*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Neocallimastix*, *Trichoderma*, *Coniothyrium* ksilanaz ürettiği bilinen fungal organizmalardır (Bajpai, 2009).

Ksilanazlar ilk olarak 1980’li yıllarda hayvan yemlerinde kullanılmaya başlanmış, ardından gıda, tekstil ve kağıt endüstrilerinde de kullanım alanı bulmuştur. Hayvan yemlerinde farklı enzimlerle beraber kullanılan ksilanazlar, yemin sindiriminin kolaylaştırılmasına, enerjinin daha verimli kullanılmasına yardımcı olur. Ekmekçilik sektöründe ksilanaz kullanımı; hamurdaki su dağılımını düzenleyerek hamurun daha yumuşak olmasını ve kolay yoğurulabilmesini, ekmek hacminin arttırılmasını sağlar. Ksilanazlar, tekstil endüstrisinde bitki liflerinin işlenmesinde ve kağıt endüstrisinde selüloz posasının ağartılmasında kullanılabilmektedir (Polizeli et al., 2005).

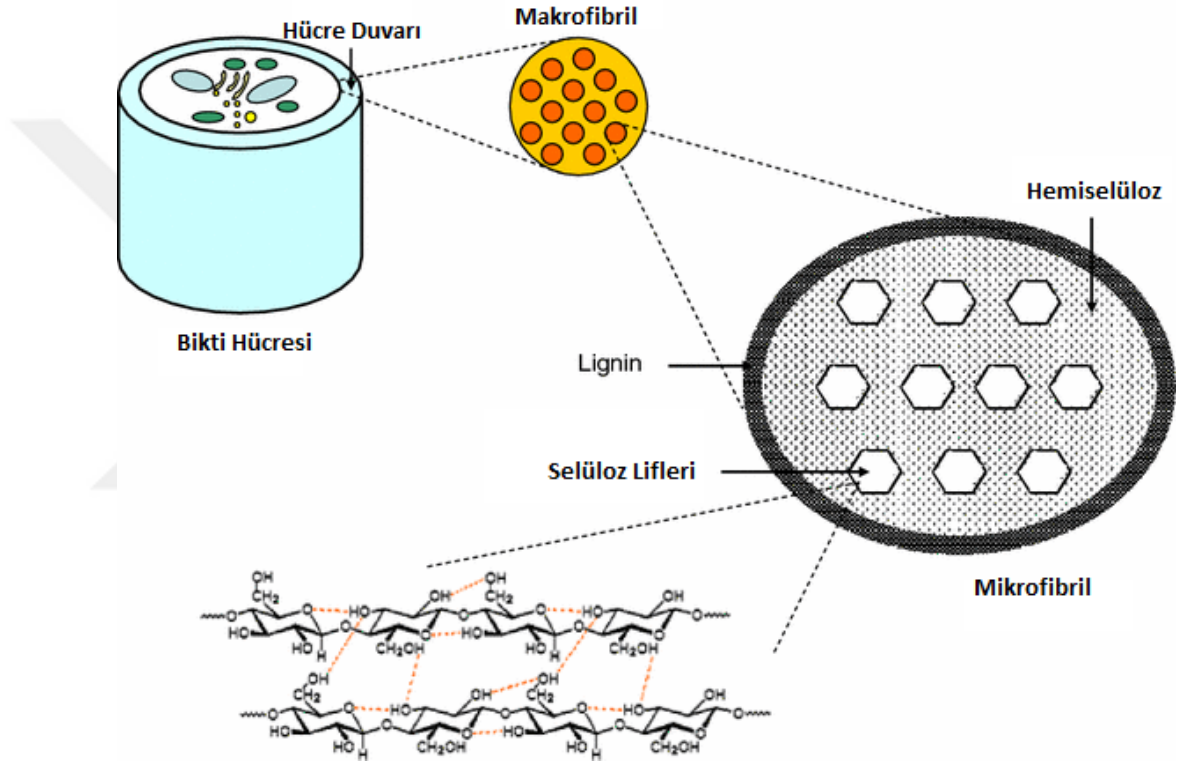
Filamentli fungusların derin kültürde üretimlerinde yüksek viskozite, yoğun kümelenmeler nedeniyle oksijen ve besin transferi kısıtları yaşanmakta ve üretim verimliliği azalmaktadır (Kaup et al., 2008). Üretim sürecinde, makroskopik boyutlarda oluşan pelletlerin sadece dış yüzeyindeki ince bir tabakadaki hücrelerin aktif protein üretimini gerçekleştirdikleri, iç tabakadaki hücrelerin büyük olasılıkla difüzyon kısıtları nedeniyle protein üretimine katkıda bulunmadıkları görülmüştür (Driouch, et al., 2010).

Bu tez kapsamında, Al_2O_3 ve Talc mikropartikülleri ile, *Aspergillus niger* mikroorganizmasının derin kültür içerisindeki fungal morfolojisi etkilenerek ksilanaz enzimi üretimi üzerine çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Lignoselüloz

Lignoselüloz, doğada en fazla bulunan, yenilenebilir ve biyolojik bir kaynaktır. Dünyadaki fotosentetik aktivite sonucu, yılda yaklaşık olarak 200 milyar ton lignoselüloz biyokütlesi üretildiği düşünülmektedir. Bitki hücre duvarının ana bileşeni olan lignoselüloz; selüloz, hemiselüloz ve lignin biyopolimerlerinin karmaşık yapıdaki birlikteliğinden oluşur (Şekil 2-1) (Zhang et al., 2007).

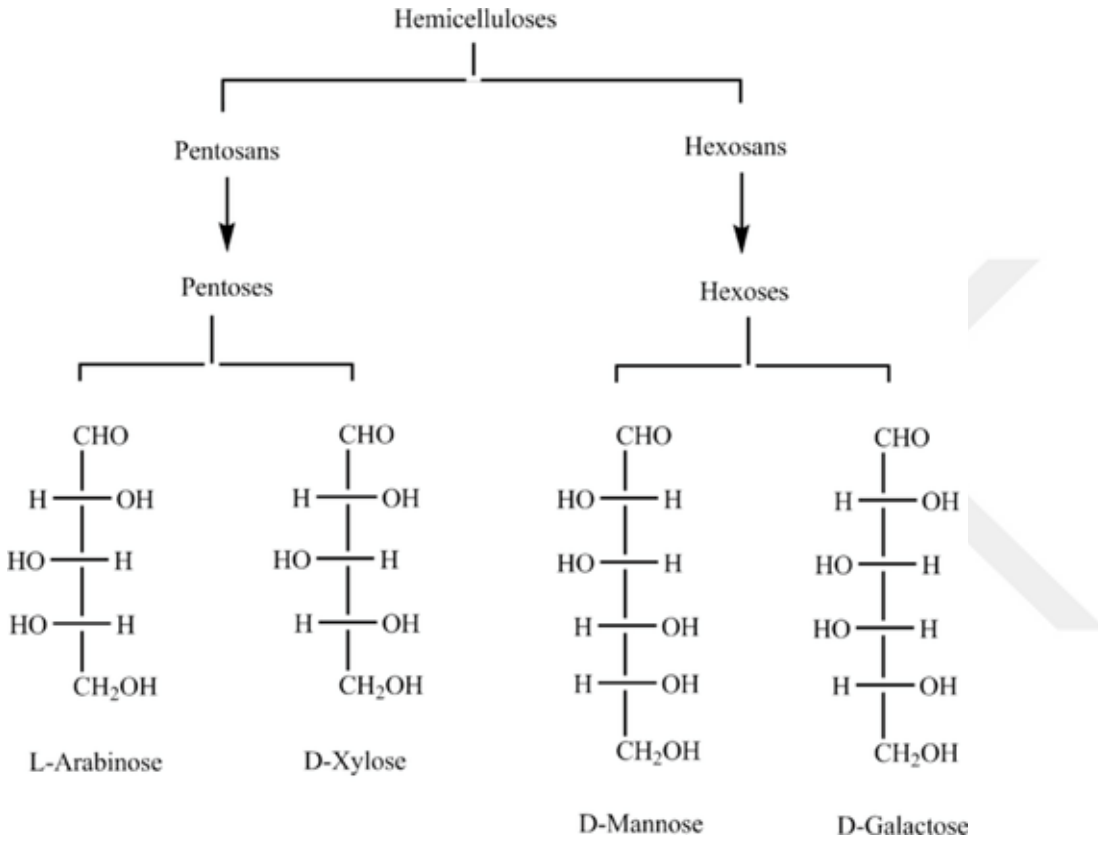


Şekil 2-1: Lignoselülozun karmaşık yapısının şematik gösterimi (Zhang, 2008).

Karasal bitki biyokütlesindeki lignoselülozik yapının yaklaşık %30 - %45'i selüloz, %20 - %30'u hemiselüloz ve %5 - %20'si ligninden meydana gelir (Samayam and Schall, 2010). Yenilenebilir bir enerji kaynağı olarak lignoselülozik biyokütle, gelecek yıllarda fosil yakıtların yerini alma konusunda önemli bir potansiyele sahiptir (Marquardt et al., 2010).

2.2 Hemiselüloz

Hemiselülozlar, bitkilerde selülozdan sonra en fazla bulunan polisakkaritlerdir. Heteropolimer olan hemiselülozlar, birçok farklı monomerik ünitenin bir araya gelmesiyle oluşur (Şekil 2-2) ve genellikle ana zincir üzerine yan grupların bağlanmasıyla dallanırlar (Negahdar et al., 2016).



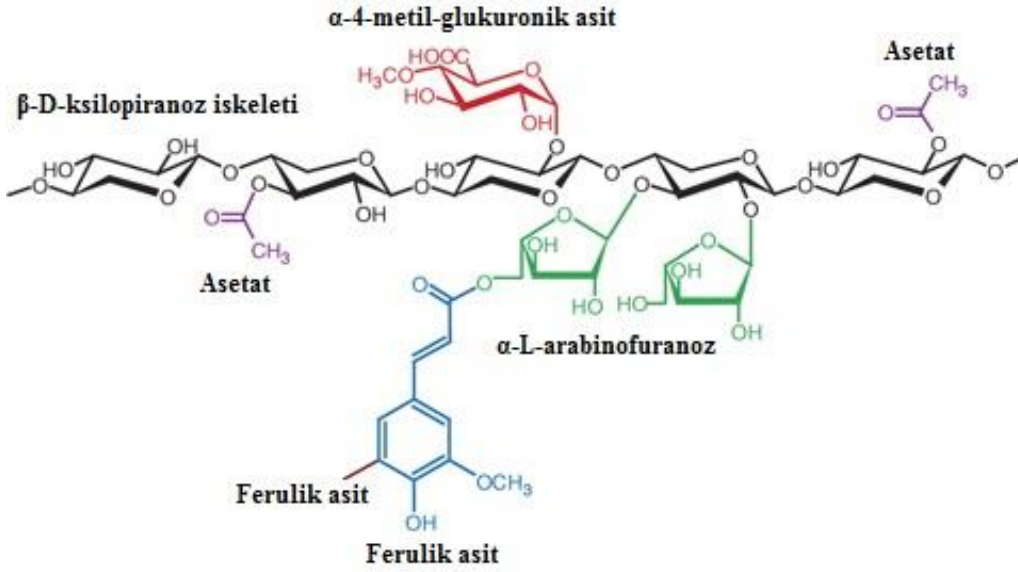
2.3 Ksilan

Önemli bir hemiselüloz bileşeni olan ksilanlar ağırlıklı olarak açık ve kapalı tohumluların ikincil hücre duvarında konumlanırlar. Yapısı ve bileşimi selüloza oranla oldukça karmaşık olan ksilanlar bulundukları bitki türlerinde (Christov and Prior, 1993) ve aynı bitki türünün farklı dokularında değişiklikler gösterebilir (Ebringerová and Heinze, 2000). Ksilanlar bitkisel hücre duvarlarında; sert ağaçlarda %15-30, yumuşak ağaçlarda %7-10 ve tek yıllık bitkilerde %30 oranında bulunabilirler. Kompleks ve oldukça dallanmış bir yapıda olan ksilanların polimerizasyon derecesi 70 ile 200 arasında değişir (Collins et al., 2002).

2.3.1 Ksilan yapısı

Bitkisel materyalden elde edilen ksilanlar çoğunlukla homopolimerik 1,4- β -D-ksilopiranoz iskeletine sahip heteropolimerlerdir. Ksilanlar, ksiloz birimlerinin yanı sıra arabinoz, glukuronik asit veya glukuronik asidin 4-O-metil eteri, asetik asit, ferulik asit ve p-kumarik asit birimleri de içerir. Ksilan iskeleti üzerine yan zincir olarak O-asetil, α -L-arabinofuranosil, α -(1,2)-bağlı glukuronik asit veya 4-O-metil glukuronik asit birimleri bağlanır (Şekil 2-3) (Saha, 2003).

Tek çenekli bitkilerde, ksilan iskeletinin α -(1,2), α -(1,3) veya hem α -(1,2) hem de α -(1,3) pozisyonlarında L-arabinofuranosil birimleri bağlanarak yan zincirleri oluştururlar. Arabino-furanasil birimleri de 5-O pozisyonlarında p-kumarik asit veya ferulik asit birimleriyle esterleşmiş olabilirler. Çift çeneklilerin ksilan iskeletinde ise ana monosakkarit olarak α -(1,2) bağlı D-glukopiranosil üronik asit ve D-glukopiranosil üronik asidin 4-O pozisyonunda metillenmiş hali bulunur. Ayrıca çift çeneklilerde, ksilanın ksilopiranoz iskeleti üzerinde bol miktarda asetil grupları bulunurken tek çeneklilerde asetil grupları daha azdır (Koutaniemi et al., 2012). Bu asetilasyon derecesi, çift çeneklilerde ksiloz birimlerinin %50'sine kadar ulaşabilir (Busse-Wicher et al., 2014).

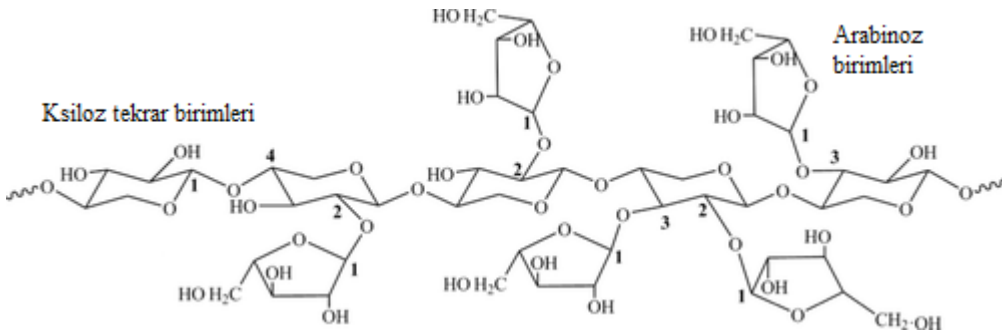


Şekil 2-3: Ksilan yapısı ve ksilan iskeleti üzerine bağlanan çeşitli yan birimler (Dodd and Cann, 2009)

2.3.1 Ksilan çeşitleri

2.3.1.1 Arabinoksilan

Arabinoksilanlar; buğday, çavdar, arpa, yulaf ve pirinç gibi tahılların bitkisel hücre duvarlarında bulunmaktadır (Izydorczyk and Biliaderis, 1995). Arabinoksilanlarda, 1,4- β -D-ksilopiranoz iskeleti üzerindeki ksiloz birimlerinin ikinci, üçüncü veya iki ve üçüncü karbon pozisyonlarında arabinoz birimleri bağlanır (Şekil 2-4). Ayrıca, ferulik asit ve hidroksisinamik asitler arabinoz birimleriyle esterleşebilir (Hartmann et al., 2005).



Şekil 2-4: Arabinoksilan yapısı (Farhat et al., 2017)

Arabinoksilanlar suda çözünen ve suda çözünemeyen olarak iki grupta kategorize edilirler (Saeed et al., 2011). Ksilopiranoz iskeletinde yan zincir olarak

bulunan arabinoz birimlerine ferulik asit birimleri esterleşebilir. Bu ferulik asit birimlerinin kendi aralarında veya proteinlerle çapraz bağlantılar yapması arabinoksilanların suda çözünürlüğünü etkiler. Ayrıca arabinoz birimlerinin ksilopiranoz iskeletindeki ksiloz birimlerine oranı da suda çözünürlüğe etki eden diğer bir faktördür (Finnie et al., 2006).

2.3.1.2 Diğer ksilanlar

Glukuronoksilanlar sert ağaçlarda kuru kütlenin %15-30'unu oluşturur. Ksilopiranoz iskeleti β -(1,4) bağlı ksiloz birimlerinden meydana gelmektedir. İskelet üzerinde her 10 ksiloz biriminde bir α -(1,2) bağlı üronik asit bulunmaktadır. Üronik asit birimleri dördüncü karbon pozisyonlarında metil gruplarıyla esterleşmiştir (4-O-metilglukuronik asit). Ayrıca iskelet üzerindeki ksiloz birimleri ikinci ve üçüncü karbon pozisyonlarında asetil grupları barındırabilir. Glukuronoksilanlarda asetillenme oranı %8-17 arasında değişmektedir (Gírio et al., 2010).

Homoksilanlar, ksiloz birimlerinin birbirine β -(1,3) veya β -(1,4) bağlandığı homopolimerlerdir. Polimer zincirinde β -(1,3) ve β -(1,4) bağlar birlikte de bulunabilmektedir. Homoksilanlarda ksiloz iskeleti üzerinde yan birimler bulunmamaktadır. Homoksilanlara deniz yosunlarında ve buriti meyvelerinde rastlanmıştır (Zhou et al., 2017).

Bazı durumlarda glukuronoksilanlar ek olarak arabinoz birimleri, arabinoksilanlar ise 4-O-metilglukuronik asit birimleri içerebilirler. Bu ksilan tipleri arabino-glukuronoksilanlar ve glukurono-arabinoksilanlar olarak adlandırılmaktadır (Zhou et al., 2017).

2.3.2 Ksilanın enzimatik hidrolizi

Ksilanlarda farklı yan grupların bulunması, ksilan degradasyonu için birkaç enzimin birlikte çalışmasını gerektirir. Bu enzimler arasında en önemli rolü ksilanın ana iskeletinde, ksiloz birimleri arasındaki β -(1,4) bağlarını kıran ve ksilanı kısa oligosakkaritlere parçalayan endo-1,4- β -ksilanaz (EC 3.2.1.8) enzimidir (Valenzuela et al., 2014).

Ksilanın enzimatik hidrolizinde etki eden diğer enzimler; β -D-ksilosidazlar (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidazlar (EC 3.2.1.55), α -glukuronidazlar (EC 3.2.1.139), asetil ksilan esterazlar (EC 3.1.1.72), ferulik ve kumarik asit esterazlardır (EC 3.1.1.73) (Antranikian, 1997; Dodd and Cann, 2009). Endoksilanazların aktivitesi sonucu açığa çıkan ksilooligosakkaritler β -D-ksilosidazlar tarafından ksiloz birimlerine parçalanır. Asetil ksilan esterazlar, α -glukuronidazlar, α -L-arabinofuranosidazlar, ferulik ve kumarik asit esterazlar ise ksilan iskeletinden yan zincirlerin uzaklaştırılmasını katalizlerler (Christov and Prior, 1993).

2.4 Ksilanazlar

2.4.1 Ksilanaz aileleri

Karbonhidrat-aktif enzim veritabanına göre farklı kaynaklardan (bakteri, fungus, maya, bitki, böcek) elde edilen ksilanazlar, glikozit hidrolazlar (GH) enzim aileleri içerisinde sınıflandırılırlar. Ksilanazların büyük kısmı aminoasit dizileri ve hidrofobik küme analizlerine göre GH10 ve GH11 aileleri içerisinde gruplanırlar. Az sayıda ksilanaz enzimi ise GH5, GH7, GH8, GH26, GH30 ve GH43 aileleri içerisinde yer alır (Moreira and Filho, 2016; Valenzuela et al., 2014).

GH10 ailesinde yer alan ksilanazların substratlarına karşı spesifikliğı GH11 ailesindeki ksilanazlara oranla düşüktür ve yan birimlere sahip ksilan iskeletini ksilooligosakkaritlere parçalayabilir. GH11 ailesindeki ksilanazlar ise gerçek ksilanazlar olarak bilinirler ve yan birimleri olmayan veya uzaklaştırılmış ksilan iskeleti üzerine etki ederler. GH10 ksilanazları yüksek moleküler ağırlık ve düşük izoelektirik noktaya, GH11 ksilanazları ise düşük moleküler ağırlık ve yüksek izoelektirik noktaya sahiptir (Collins et al., 2005; Moreira and Filho, 2016).

GH 11 ksilanazları genellikle aktivite gösterdikleri optimum pH değerlerine göre asidik ve alkali ksilanazlar olarak ikiye ayrılırlar. Yüksek oranda yapısal ve dizisel benzerliklerine rağmen 2'den 11'e kadar farklı pH'larda çalışabilen ksilanazlar bulunmaktadır. GH11 ksilanazlarının aktivitesi sonucu oluşan ana ürünler ksilobiyoz ve ksilotriyozlardır. GH11 ksilanazlarının bu ürünlere karşı ölçülebilir bir aktiviteleri yoktur (Pollet et al., 2010).

2.4.2 Ksilanaz üreticisi mikroorganizmalar

Karasal veya sucul ortamlarda yaşayan bakterilerde, funguslarda (saprofitler, mikorizalar ve fitopatojenler), mayalarda, protozoalarda, böceklerde, alglerde, salyangozlarda ve bitkilerin çimlenen tohumlarında ksilanaz üretimine rastlanmıştır (Dekker and Richards, 1976). Ancak ksilanazların en önemli üreticileri bakteriler ve funguslardır. Ksilanaz üreticisi olan bakteri ve fungusların bir kısmı Tablo 2-1’de gösterilmiştir (Burlacu et al., 2016).

Tablo 2-1: Ksilanaz üreticisi bakteri ve funguslardan bazıları (Burlacu et al., 2016)

Bakteriler	Funguslar
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus foetidus</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>Bacillus megatorium</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Penicilium sp.</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
<i>Streptomyces roseiscleroticus</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>Streptomyces cuspidosporus</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Streptomyces actuosus</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>
<i>Pseudonomas sp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Clostridium absonum</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i>
<i>Thermoactinomyces thalophilus</i>	<i>Alternaria sp.</i>
	<i>Talaromyces emersonii</i>
	<i>Schizophyllum commune</i>
	<i>Piromyces sp.</i>

Bakteriyel ksilanazlar nötral veya alkali pH aralıklarında optimum aktivite gösterirler. Termal stabilitesi yüksek ksilanazlar da bakteriler tarafından üretilebilmektedir (Chakdar et al., 2016).

Funguslar endüstriyel anlamda öne çıkan ksilanaz üreticilerindendir. Ksilanları parçalayan enzimleri hücre dışına salgılayan funguslarda, üretim sonrası alt akım işlemlerinde, maliyeti ve iş yükünü arttıran hücre parçalama işlemine ihtiyaç duyulmaz. Ayrıca fungal kültürlerden üretilen ksilanaz miktarları bakteri ve mayalardan yüksektir (Haltrich et al., 1996). Bazı fungus ve bakterilerden üretilen ksilanazlar ve karakteristik özellikleri Tablo 2-2’de gösterilmiştir.

Tablo 2-2: Çeşitli fungus ve bakteri türlerinden elde edilen ksilanazlar ve karakteristik özellikleri (Polizeli et al., 2005)

Mikrorganizma	Moleküler ağırlık (kDa)	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH	Kaynak
<i>Aspergillus aculeatus</i>	18,26,52	50,50,70	4.0,4.0,5.0	(Fujimoto et al., 1995)
<i>Aspergillus awamori</i>	39,23,26	45-55	4.0-5.5	(Kormelink et al., 1993)
<i>Aspergillus fischeri</i>	31	60	6.0	(Chandra Raj and Chandra, 1996)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	19,8.5	55	5.5	(Silva et al., 1999)
<i>Aspergillus kawachii</i>	35,26,29	60,55,50	5.5,4.5,2.0	(Ito et al., 1992)
<i>Aspergillus nidulans</i>	22,34	62,56	5.5,6.0	(Fernández-Espinar et al., 1994)
<i>Aspergillus nidulans KK-99</i>	-	55	8.0	(Taneja et al., 2002)
<i>Aspergillus oryzae</i>	35	60	5.0	(Moto et al., 1999)
<i>Aspergillus sojae</i>	33,36	60,50	5.0,5.5	(I. Kimura et al., 1995)

<i>Aspergillus sp.</i>	26	50	5.0	(Khanna et al., 1995)
<i>Aspergillus sydowii</i>	33	50	4.0	(Ghosh and Nanda, 1994)
<i>Aspergillus terreus</i>	-	50	7.0	(Ghanem et al., 2000)
	-	45	4.5	(Ghareib and Nour el Dein, 1992)
<i>Aspergillus versicolor</i>	19	55	6.0	(Carmona et al., 1998)
<i>Acrophialophora nainiana</i>	22	55	7.0	(Salles et al., 2000)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	25	54	4.4	(Li et al., 1993)
<i>Bacillus sp.</i>	99	75	6.0	(Bataillon et al., 2000)
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	25,47,57	50	5.0-7.0	(Baraznenok et al., 1999)
<i>Cryptococcus sp.</i>	22	40	2.0	(Iefuji et al., 1996)
<i>Fusarium oxysporum F3</i>	20.8,23.5	60,55	6.0	(Christakopoulos et al., 1996)
<i>H. grisea var. thermoidea</i>	23	70	5.5	(Monti et al., 1991)
<i>Myceliophthora sp.</i>	53	75	6.0	(Chadha et al., 2004)
<i>Penicillium brasilianum</i>	31	-	-	(Jørgensen et al., 2003)
<i>Penicillium capsulatum</i>	22	48	3.8	(Ryan et al., 2003)
<i>Penicillium sp.</i>	25	50	2.0	(T. Kimura et al., 2000)
<i>Streptomyces sp.</i>	24.5,37.5,38	55-60	6.0-8.0	(Georis et al., 2000)

<i>Thermoascus aurantiacus</i>	-	70-75	4.0-5.0	(Kalogeris et al., 1998)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	24.7	70	6.0-6.5	(Singh et al., 2000)

Endüstriyel olarak öne çıkan *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. terreus* türleri, bitki veya hayvan patojeni olarak etki gösterebilen *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. flavus* gibi türler dahil yaklaşık 250 *Aspergillus* türü tanımlanmıştır. Organik asitler, enzimler, proteinler gibi ürünlerin birçok çeşidinin üreticileri olmaları ve sıradışı metabolik çeşitlilikleri nedeniyle *Aspergillus* türleri biyoteknolojik açıdan önem taşımaktadır (Meyer et al., 2011). *Aspergillus* türlerinin bir diğer avantajı, abiyotik ortam parametreleri açısından seçici olmamaları nedeniyle, geniş sıcaklık (6-55 °C), geniş pH aralıklarında (1.5-12.0) ve düşük nem oranlarında bile yaşayabilmeleridir (Krijghsheld et al., 2013).

“Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi” (U.S. Food and Drug Administration, FDA) tarafından “GRAS” (Generally recognised as safe - sağlık açısından güvenilir) kabul edilen *A. niger* (Jia et al., 2015; Lubertozzi and Keasling, 2009), farklı fizikokimyasal özelliklere sahip birçok ksilanaz üretebilmektedir (Deng et al., 2006).

Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi, endüstriyel uygulamalar için yeterli karakteristik özelliklere sahip enzimlerin seçilerek homolog veya heterolog mikroorganizmalara klonlanmasını ve üretilmelerini sağlamıştır. *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisia*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus awamori*, *Trichoderma reesei* gibi çeşitli bakteri, maya ve funguslar ile rekombinant ksilanaz çalışmaları yapılmıştır (Ahmed et al., 2009).

Ticari ürün olarak piyasada yer alan ksilanaz enzimleri Tablo 2-3’de gösterilmiştir.

Tablo 2-3: Ticari ksilanazlar, uygulama alanları ve özellikleri (Polizeli et al., 2005)

Ticari isim	Firma	Mikroorganizma	Optimum pH	Optimum sıcaklık	Uygulama
Allzym PT	Alltech	<i>Aspergillus niger</i>	5.3	65	Hayvan yemi
Amano 90	Amano Pharmaceutical	<i>Aspergillus niger</i>	4.5	50	Farmasötik analizler, gıda endüstrisi
Bio-Feed Plus	Novo Nordisk	<i>Humicola insolens</i>	Veri yok	Veri yok	Hayvan yemi
Bleachzyme	Biocon	Veri yok	6.5-7.0	40-50	Selüloz ve kağıt endüstrisi
Cartazyme	Clariant	<i>Termomonospora fusca</i>	5.0	45-55	Selüloz ve kağıt endüstrisi
EcopulpX-200	Primalco	<i>Trichoderma reesei</i>	5.0-6.0	50-55	Kağıt hamuru ağartma
Ecosane	Biotec	<i>Trichoderma reesei</i>	Veri yok	Veri yok	Hayvan yemi
Ecozyme	Thomas Swan	Veri yok	7.0	50	Selüloz ve kağıt endüstrisi
Grindazym GP e GV	Danisco Ingredients	<i>Aspergillus niger</i>	Veri yok	Veri yok	Kuş ve domuz yemi
Irgazyme 40	Nalco-Genencor, Ciba, -Geigy	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Veri yok	Veri yok	Kağıt endüstrisi ve hayvan yemi
Multifect XL	Genencor	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	5.0-5.5	55-60	Gıda endüstrisi
Pulpzyme	Novozymes	<i>Bacillus sp.</i>	9.5	50	Selüloz ve kağıt endüstrisi
Solvay pentonase	Solvay Enzymes	<i>Trichoderma reesei</i>	5.3-5.5	55	Nişasta ve ekmekçilik endüstrisi
Sternzym HC 46	Stern-Enzym	<i>Trichoderma reesei</i>	Veri yok	Veri yok	Ekmekçilik

Sumizyme X	Shin Nihon	<i>Trichoderma koningii</i>	5.0	55	Sebze ekstraktı eldesi, ekmekçilik, hayvan yemi
Xylanase	Seikagaku	<i>Trichoderma sp.</i>	Veri yok	Veri yok	Karbonhidrat yapı çalışmaları
Xylanase	Granotec do	Veri yok	Veri yok	Veri yok	Gıda endüstrisi
Xylanase	Iogen	<i>Trichoderma reesei</i>	4.5	40	Kağıt hamuru ağartma, hayvan yemi

2.4.3 Ksilanazların kullanım alanları

2.4.3.1 Unlu mamuller

Hemiselülozik polisakkaritlerin ksilanazlar ile enzimatik hidrolizi ekmekçilikte hamurun reolojik özelliklerinin iyileştirilmesi, yoğurulmasının kolaylaşması, su dağılımının düzenlenmesi ve ekmek hacminin artması gibi avantajlar sağlamaktadır (Harris and Ramalingam, 2010).

Buğday ve çavdar unundaki arabinoksilanlar hamurun su tutma kapasitesini ve viskozitesini etkileyerek fizikokimyasal özelliklerini belirler (Schooneveld-Bergmans et al., 1999). Buğday unundaki arabinoksilana endoksilanaz aktivitesi birkaç etkiye birden neden olur. Endoksilanaz aktivitesi sonucu suda çözünemeyen arabinoksilanlardaki çapraz bağlar azalır ve hücre duvarındaki su tutma kapasitesi artar. Aynı zamanda suda çözünebilir arabinoksilan miktarı artarak hamur viskozitesinde artış meydana gelir. Suda çözünebilir arabinoksilanların da enzim aktivitesi sonucu parçalanması hamur viskozitesini tekrar düşürür (Courtin and Delcour, 2002).

Ksilanazlar ekmekçilikte α -amilazlar, glikoz oksidazlar ve proteazlarla beraber kullanılabilirler. Hamurun kalitesini ve işlenebilirliğini arttıran ksilanazlar ayrıca hamur içerisinde sağlık açısından faydalı ksilooligosakkaritlerin oluşmasını sağlar (Mandal, 2015).

2.4.3.2 Kağıt endüstrisi

Kağıt hamuru üretim prosesinde hemiselülozlar proses aşamalarında olumsuz etkiler yaratmakta ve kağıt kalitesini düşürmektedir. Bu nedenle hemiselülozların ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Hemiselülozların uzaklaştırıldığı ağartma prosesi için genellikle klor gazı, klorlu bileşikler ve diğer toksik bileşikler kullanılmaktadır. Zararlı kimyasallar yerine ksilanaz enzimleri kullanılarak biyoağartma işlemi gerçekleştirilebilir (Maalej-Achouri et al., 2012; S. Yang et al., 2019; Zhao et al., 2017)

2.4.3.3 Hayvan yemleri

Ksilanazlar hayvan yemlerinde; selülozlar, pektinazlar, proteazlar, amilazlar ve fitazlar gibi diğer enzimlerle beraber kullanılırlar. Bu sayede yemlerin hayvanlar tarafından sindirilebilirliği kolaylaştırılır ve hayvanların yemlerden aldığı enerjide artış sağlanır (Chakdar et al., 2016).

2.4.3.4 Biyoyakıt üretimi

Etanol, yakıt olarak kullanılabilmesi nedeniyle dünya genelinde ilgi çekmektedir. Biyolojik olarak etanol üretimi fosil yakıtların kullanımını azaltabileceği için çevre dostu bir yaklaşım olarak görülmektedir. Öte yandan biyoetanol üretiminde mısır, melas, şeker kamışı gibi karbon kaynaklarının kullanımı sosyal ve ekonomik açıdan olumsuz karşılanmaktadır. Bu nedenle lignoselülozik biyokütlenin biyoetanol üretiminde kullanılması alternatif olarak sunulmaktadır (Kumar et al., 2009). Lignoselülozik biyokütlenin biyoetanol üretiminde kullanılabilmesi için selüloz, hemiselüloz ve lignin yapılarının, üretici mikroorganizmaların kullanabileceği birimlere parçalanması gerekmektedir. Ksilanazlar hemiselülozları parçalayarak biyoyakıt üretiminde görev alabilirler (Bhalla et al., 2015).

2.4.3.5 Farmasötik endüstri

Ksilooligosakkaritler prebiyotik özellik göstermektedir ve sağlık açısından faydalıdır. İnsanlar tarafından sindirilemeyen ksilooligosakkaritler bağırsak florasındaki probiyotik mikroorganizmalar tarafından kullanılırlar. Ksilanazlar ile

hemiselülozik kaynaklar parçalanarak ksilooligosakkaritler elde edilebilmektedir (Nieto-Domínguez et al. 2017; Vázquez et al. 2000).

2.4.4 Kültür ortamında fungal morfoloji ve mikropartiküller

Filamentli funguslardan endüstride ticari öneme sahip birçok ürünün üretiminde faydalanılmaktadır. Filamentli funguslar tarafından; organik asitler, antibiyotikler, enzimler ve proteinler verimli bir şekilde derin kültür fermentasyonu ile üretilmektedir (Papagianni et al., 1999).

Filamentli funguslar morfolojik olarak karmaşık mikroorganizmalardır. Filamentli funguslarda üretken bir sporun çimlenmesiyle hif denilen tübüler filament oluşur. Hifler gelişirken birçok kez dallanarak misel denilen hifsel filament yapılarını oluşturur (Papagianni, 2004).

Derin kültür fermentasyonlarında birçok parametrenin etkisiyle, kompakt pelletlerden dağınık filamentlere kadar farklı morfolojik yapılar oluşturabilirler. Kültür ortamında bulunan katı partikül miktarı, karbon kaynağı, azot ve fosfat miktarı, iz elementler, çözünmüş oksijen miktarı, kültür ortamı pH'sı, aşı tipi, karıştırma hızı, kültür ortamı reolojisi, biyoreaktör geometrisi, üretim modu (kesikli, yarı-kesikli, sürekli, yarı sürekli) derin kültür fermentasyonlarında fungal morfolojiyi etkileyebilen faktörlerdir (Papagianni, 2014).

Fungal morfoloji fermentasyon ortamındaki reolojik özellikleri etkilemektedir. Dağınık filamentli morfoloji fermentasyon ortamının viskozitesini artırır ve psödoplastik akış karakteristiğine neden olur. Pellet morfolojisi sergilenen durumlarda ise viskozite düşüktür ve newtonian akış tipi görülür (Papagianni et al., 1999). Pellet morfolojisinin sağladığı daha düşük viskozite avantajlı olabilmektedir. Viskozitenin azalması üretim ortamının karıştırma verimini artırır. Ayrıca daha düşük viskozite, üretim ortamındaki besin elementlerinin ve oksijenin kütle transferini olumlu yönde etkiler. Pellet morfolojisi bir dezavantajı da beraberinde getirebilir. Mikroorganizma pelletlerinin iç kısımlarında oksijen ve besin kısıtlamaları nedeniyle otoliz meydana gelebilir. Bunun sonucunda üretim ortamındaki fungal biyokütlenin önemli bir kısmından faydalanılamaz (van Suijdam et al., 1980).

Üretim ortamına mikropartiküllerin eklenmesi, misel pelletlerinin boyutunu küçültmekte, uygun konsantrasyonlarda ise pellet oluşumu yerine filamentli fungus morfolojisinin etkilenecek dağılmış hifsel gelişimin meydana geldiği gösterilmiştir (Driouch, et al., 2010; Kaup et al., 2008). Farklı mikroorganizmalarla yapılan, farklı enzimlerin üretildiği çalışmalarda üretim ortamına mikropartikül ilavesinin, fungal morfolojiyi etkilemesi sonucu enzim aktivitelerinin birkaç kat arttırılabileceği gösterilmiştir (Tablo 2-4) (Driouch, et al., 2010; Driouch, et al., 2010; Kowalska et al., 2017; Zhu et al., 2018).

Tablo 2-4: Çeşitli mikroorganizmalarla yapılan enzim üretimlerinde mikropartiküllerin enzim aktivitesine etkileri (Antecka, et al., 2016; Walisko et al., 2012)

Mikroorganizma	Kullanılan mikropartikül	Enzim	Aktivite Artışı	Kaynak
<i>Caldariomyces fumago</i>	Talc	Kloroperoksidaz	10 kat	(Kaup et al., 2008)
<i>Caldariomyces fumago</i>	Al ₂ O ₃	Kloroperoksidaz	6 kat	(Kaup et al., 2008)
<i>Aspergillus niger</i>	Talc	Fruktofuranosidaz	2 kat	(Driouch, et al., 2010)
<i>Aspergillus niger</i>	Talc	Glukoamilaz	4 kat	(Driouch, et al., 2010)
<i>Basidiomycetes</i>	Al ₂ O ₃	Lakkaz	3,5 kat	(Antecka, Blatkiewicz, et al., 2016)
<i>Aspergillus sojae</i>	Al ₂ O ₃	β-mannanaz	2,5 kat	(Yatmaz et al., 2016)
<i>Aspergillus sojae</i>	Talc	β-mannanaz	1,8 kat	(Yatmaz et al., 2016)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Mikroorganizma

Yapılan tüm üretim denemelerinde, üretici mikroorganizma kaynağı olarak, TÜBİTAK MAM Küf Koleksiyonundan temin edilen 200803 (12) kodlu *Aspergillus niger* suşu kullanılmıştır.

3.1.2 Substratlar

Üretim denemelerinde besin ortamı içerisinde karbon ve azot kaynağı olarak kullanılan malt çimi TUBORG A.Ş.'den, buğday kepeği ise Söke Un A.Ş.'den temin edilmiştir.

3.1.3 Kullanılan araçlar

Araç ve Gereçler	Araç ve Gereçlerin Markası
Otoklav	HMC HIRAYAMA, Japonya
Isıticılı çalkalayıcı inkübatör	Sartorius Certomat HK-Certomat R, Almanya
Statik inkübatör	Sanyo, Japonya
Otomatik mikropipet	BRAND-Transferpette S, Almanya
Steril kabin	ESCO Class II BSC;AC2-4E8 Model, Singapur
Spektrofotometre	Amersham Biosciences, İngiltere
Işık mikroskobu	Olympus CX31RTSF, Japonya
Santrifüj	Sartorius 1-14, Almanya
Hassas terazi	Precisa, İsviçre
Kaba Terazi	Kern, Almanya
Su banyosu	Memmert, Almanya
pH metre	Mettler Toledo, İsviçre
Isıticılı manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya

Vorteks	Scilogex, ABD
Buzdolabı	Profilo, Türkiye
2L Biyoreaktör	Sartorius, Almanya
Biyoreaktör kulesi	Sartorius Biostat B+, Almanya
Soğutucu birim	Sartorius, Almanya
Su sirkulatörü	PolyScience, ABD
El eleği (0,75mm por çaplı)	Prüfsieb, Almanya
Neubaer lamı	Marienfeld, Almanya
Stereo mikroskop	Leica Cls 150 XE – Leica MZ16, Almanya

3.1.4 Kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Kimyasalın Markası
Al_2O_3	Sigma Aldrich, Almanya
$3\text{MgO} \cdot 4\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Talc)	Sigma Aldrich, Fransa
CaCO_3	Merck, Almanya
Patates Dekstroza Agar	Merck, Almanya
Tween 80	Merck, Almanya
$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, Almanya
KH_2PO_4	Merck, Almanya
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Carlo Erba, Fransa
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, Almanya
NH_4NO_3	Carlo Erba, Fransa
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Merck, Almanya
Buğday Arabinoksilanı	Megazyme, İrlanda
Etanol	Merck, Almanya
$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	Merck, Almanya
Toluen	Merck, Almanya

Na_2CO_3	Merck, Almanya
$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck, Almanya
Na_2SO_4	Merck, Almanya
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Riedel-de Haen, Almanya
H_2SO_4	Merck, Almanya
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck, Almanya
$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, Hindistan
CH_3COOH	Merck, Almanya
D-Ksiloz	Merck, Almanya

3.2 Yöntem

3.2.1 Mikroorganizma stoğu hazırlanması

Patates dekstroza agar (PDA) (Merck), üreticinin belirttiği değer olan 39 g/L olacak şekilde distile su ile hazırlanıp kaynayınca kadar ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda (Heidolph) karıştırılmıştır. Çözünen PDA, 10mL'lik cam tüplere 6'şar mL olarak paylaştırıldıktan sonra otoklavda (HMC Hirayama) 121°C'de 15 dakika boyunca tutularak steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan PDA içeren tüpler eğik bir vaziyette katılaşmaya bırakılmıştır.

Üretim denemelerinde kullanılacak üretici kaynak mikroorganizma *Aspergillus niger* sporları, hazırlanan eğik PDA içeren cam tüplere steril kabin (ESCO) içerisinde tek kullanımlık özeler yardımıyla ekilmiştir. Tüpler statik inkübatör (Sanyo) içerisinde 30°C sıcaklıkta 7 gün boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra +4°C sıcaklıktaki buzdolabında (Profilo) saklanmıştır.

3.2.2 Aşı hazırlanması

PDA, üreticinin belirttiği değer olan 39 g/L olacak şekilde 250mL'lik erlenlerde 150 mL hacimde hazırlanarak kaynayınca kadar ısıtılmıştır. Ardından otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca tutularak steril edilen erlenler eğik bir vaziyette katılaşmaya bırakılmıştır.

Mikroorganizma stoğu tüpler $+4^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktan alınmıştır. Eğik PDA içeren erlenlere, mikroorganizma stoğu tüplerden steril kabin içerisinde, tek kullanımlık özeler yardımıyla *Aspergillus niger* sporları ekilmiştir. Erlenler statik inkübatör içerisinde 30°C sıcaklıkta 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Tween 80'den (Merck) 100 μL alınıp 100 mL distile su içerisine eklenerek (%0,1 hacim/hacim) otoklavda 121°C 'de 15 dakika boyunca tutularak steril edilmiştir. İnkübasyonunun 7. gününü dolduran erlenlere steril kabin içerisinde tween 80 çözeltisi eklenmiş; erlenlerin agar yüzeyi tek kullanımlık öze yardımıyla hafifçe kazınarak PDA yüzeyinde gelişen sporlar kaldırılmıştır. Elde edilen spor çözeltisi aşı olarak kullanılmıştır.

3.2.3 Spor sayısının belirlenmesi

Spor çözeltisinden alınan örnek, distile su ile 100 kat seyreltilmiştir. Seyreltilen örnek neubauer lamına (Marienfeld) aktarılmış ve ışık mikroskopunda (Olympus) spor sayımı yapılmıştır. Spor çözeltisinin aşı olarak kullanılabilmesi için spor sayısının $0,5 \times 10^8$ ile $1,5 \times 10^8$ spor/mL arasında olmasına dikkat edilmiştir.

3.2.4 Vogel tuzları

Üretim ortamında mikroorganizma gelişimini desteklemek amacıyla vogel tuzları kullanılmıştır. Besin ortamında azot kaynağı olarak malt çimi olduğundan, azot içeren NH_4NO_3 tuzu aksi belirtilmediği sürece besin ortamlarına ilave edilmemiştir. Vogel tuzları Tablo 3-1'de gösterilen konsantrasyonlarda besin ortamına eklenmiştir.

Tablo 3-1: Üretim ortamında kullanılan vogel tuzları ve konsantrasyonları

Kimyasal	Konsantrasyon (g/L)
$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)	2,5
KH_2PO_4 (Merck)	5,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba)	0,2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)	0,1
NH_4NO_3 (Carlo Erba)	2,0

3.2.5 Erlen denemeleri

Erlen denemeleri, biyoreaktör denemeleri öncesinde ön bilgi sağlama amacıyla yapılmıştır. Erlen denemelerinde, mikropartiküllerin üretim ortamında, ksilanaz aktivitesine en olumlu etkiyi göstereceği üretim parametreleri araştırılmıştır.

Tüm erlen denemelerinde sabit tutulan üretim koşulları bulunmaktadır. Bu koşullar aşağıda listelenmiştir:

- 250 mL’lik erlenlerde üretim ortamı hacmi 50mL olarak ayarlanmıştır.
- Isıtıcılı çalkalayıcılı inkübatörde (Sartorius Certomat HK-Certomat R) 200 dev/dak karıştırma hızı kullanılmıştır.
- İnkübasyon süresince erlenler ısıtıcılı çalkalayıcılı inkübatörde 30°C sıcaklıkta bırakılmıştır.
- Aşılama %2 (hacim/hacim) olacak şekilde yapılmıştır. Aşılama spor sayısının $0,5 \times 10^8$ ile $1,5 \times 10^8$ spor/mL arasında olmasına dikkat edilmiştir.

3.2.5.1 Ön deneme

Ön deneme olarak tasarlanan ilk erlen denemesinde karbon ve azot kaynağı olarak %5 (kütle/hacim) malt çimi kullanılmıştır. Besin ortamına Vogel tuzları eklenmiştir. Mikropartikül olarak Al_2O_3 (Sigma), Talc (Sigma) ve $CaCO_3$ (Merck) “3.2.7.1 Analiz çözeltilerinin hazırlanması” başlığında anlatılan 0,1 molar ve pH 5.5 sodyum asetat tampon içerisinde süspanse edilmiştir. Her bir mikropartikülden 0,5’er g tartılarak 5’er mL sodyum asetat tampon içerisine eklenmiştir. Besin ortamı ve mikropartiküller ayrı olarak otoklavda 121°C’de 15 dakika boyunca tutularak steril edilmiştir. Sterilizasyonun sonrası, mikropartiküller steril kabin içerisinde besin ortamına eklenmiştir. Ardından aşılama yapılarak erlenler inkübasyona bırakılmıştır. İki paralelli çalışılmıştır ve karşılaştırma için mikropartikül eklenmeyen erlenler de hazırlanmıştır. Erlenlerden 24 saat aralıklarla 1’er mL örnek alınarak 144. saat sonunda inkübasyon sonlandırılmıştır.

Hazırlanan erlenlerin kodlamaları ve mikropartikül içeriği Tablo 3-2’de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: Ön deneme erlenlerinin kodlanması

Kodlama	Mikropartikül İçeriği
K	mikropartikül yok
A	10g/L Al ₂ O ₃
T	10g/L Talc
C	10g/L CaCO ₃

3.2.5.2 Mikropartiküllerin besin ortamı içerisinde sterilizasyon denemesi

Besin ortamında %5 (kütle/hacim) malt çimi ve vogel tuzları kullanılmıştır. Al₂O₃ ve Talc mikropartikülleri kullanılmıştır. Her iki mikropartikül için besin ortamıyla birlikte steril edileceği ve besin ortamından ayrı steril edilip aşılama öncesi aktarılacağı erlenler hazırlanmıştır. Sterilizasyon sonrası eklenecek mikropartiküller “3.2.5.1 Ön deneme” başlığında anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. İki paralelli çalışılmış ve kontrol erlenleri eklenmiştir. Hazırlanan erlenler ve mikropartiküller otoklavda 121°C’de 15 dakika boyunca tutularak steril edilmiştir. Sterilizasyonun ardından eklenecek mikropartiküller steril kabin içerisinde besin ortamına aktarılmıştır. Ardından aşılama yapılarak erlenler inkübasyona bırakılmıştır. Erlenlerden 24 saat aralıklarla 1’er mL örnek alınarak 120. saat sonunda inkübasyon sonlandırılmıştır.

Hazırlanan erlenlerin kodlamaları, mikropartikül içeriği ve mikropartiküllerin besin ortamına eklenme aşaması Tablo 3-3’te gösterilmiştir.

Tablo 3-3: Mikropartiküllerin farklı sterilizasyon denemesine ait erlen kodlamaları

Kodlama	Mikropartikül içeriği	Ekleme zamanı
K	yok	-
AÖ	10g/L Al ₂ O ₃	Sterilizasyondan önce
AS	10g/L Al ₂ O ₃	Sterilizasyondan sonra
TÖ	10g/L Talc	Sterilizasyondan önce
TS	10g/L Talc	Sterilizasyondan sonra

3.2.5.3 Al₂O₃ mikropartikülleri konsantrasyon denemesi

Besin ortamında %5 (kütle/hacim) malt çimi ve vogel tuzları kullanılmıştır. Al₂O₃ mikropartiküllerinin besin ortamında 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 g/L konsantrasyonlarda bulunduğu erlenler hazırlanmıştır. Üç paralelli çalışılarak karşılaştırma amacıyla Al₂O₃ mikropartikülleri bulunmayan kontrol erlenleri de eklenmiştir. Hazırlanan erlenler otoklavda 121°C’de 15 dakika boyunca tutularak steril edilmiştir. Ardından steril kabin içerisinde erlenlere aşılama yapılarak inkübasyon başlatılmıştır. Erlenlerden 72. ve 96. saatlerde 1’er mL örnek alınarak inkübasyon sonlandırılmıştır.

3.2.5.4 Isıl işlem ile malt çimi ve buğday kepeğinden ksilan ekstraksiyonu denemesi

Malt çimi ve buğday kepeğine ön işlem olarak eleme uygulanmıştır. Por çapı 0,75 mm olan el eleği (Prüfsieb) kullanılarak malt çimi ve buğday kepeği eelenmiştir. Eleğin altında kalan 0,75 mm çapından küçük kısımlar, eleğin üstünde kalan 0,75 mm çapından büyük kısımlar ve eleme uygulanmamış substrat (malt çimi ve buğday kepeği) örneklerinden 30’ar gram tartılarak 300 mL distile su içerisinde süspanse edilmiştir. Örnekler; 121°C’de 15 dakika, 125°C’de 60 dakika ve 125°C’de 120 dakika olarak farklı sıcaklık ve sürelerde otoklavda tutulmuştur. Isıl işlemin ardından kaba filtrasyon uygulanmıştır. Elde edilen sıvı kısım karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Azot kaynağı olarak inorganik bileşik (NH₄)₂HPO₄ (Merck) kullanılmıştır. Vogel tuzları besin ortamına NH₄NO₃ (Carlo Erba) da dahil edilerek eklenmiştir. İki paralelli olarak hazırlanan erlenler otoklavda 121°C’de 15

dakika boyunca tutularak steril edilmiştir. Erlenlere steril kabin içerisinde aşılama yapıldıktan sonra inkübasyon başlatılmıştır. Erlenlerden 72. ve 96. saatlerde 1'er mL örnek alınmış ve inkübasyon sonlandırılmıştır.

Denenen ekstraksiyon parametrelerine göre hazırlanan erlenlerin kodlamaları Tablo 3-4'te gösterilmiştir.

Tablo 3-4: Isıl işlem ile ksilan ekstraksiyonu denemesine ait erlen kodlamaları

Kodlama	Ekstraksiyon sıcaklığı	Ekstraksiyon süresi	Substrat	Ön işlem
121-15-MÇ-E	121°C	15 dakika	Malt çimi	< 0,75mm
121-15-BK-E	121°C	15 dakika	Buğday kepeği	< 0,75mm
125-1-MÇ-E	125°C	60 dakika	Malt çimi	< 0,75mm
125-1-BK-E	125°C	60 dakika	Buğday kepeği	< 0,75mm
125-2-MÇ	125°C	120 dakika	Malt çimi	yok
125-2-BK	125°C	120 dakika	Buğday kepeği	yok
125-2-MÇ-E	125°C	120 dakika	Malt çimi	< 0,75mm
125-2-BK-E	125°C	120 dakika	Buğday kepeği	< 0,75mm
125-2-MÇ-EÜ	125°C	120 dakika	Malt çimi	> 0,75mm
125-2-BK-EÜ	125°C	120 dakika	Buğday kepeği	> 0,75mm

3.2.5.5 Malt çimi ve buğday kepeğine ön işlem denemesi

Üretim ortamında karbon ve azot kaynağı olarak kullanılan malt çimi ve buğday kepeğine ön işlem olarak eleme uygulanmıştır. Por çapı 0,75 mm olan el eleği kullanılarak, malt çimi ve buğday kepeği elenmiştir. Elek altında kalan 0,75 mm'den küçük kısım ve elek üzerinde kalan 0,75 mm'den büyük olan kısım ayrı erlenlerde substrat olarak kullanılmıştır. Ön işlem uygulanmış substratlarla ayrıca 10 g/L konsantrasyonda Al_2O_3 mikropartikülleri eklenen erlenler hazırlanmıştır. Karşılaştırma amacıyla ön işlem uygulanmayan malt çimi ve buğday kepeği ile mikropartikül eklenmeyen erlenler de hazırlanmıştır. İki paralelli çalışılarak hazırlanan erlenler otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca tutularak steril

edilmiştir. Steril kabin içerisinde aşılama yapılan erlenler inkübasyona bırakılmıştır. Erlenlerden 72. ve 96. saatlerde 1'er mL örnek alınarak inkübasyon sonlandırılmıştır.

Hazırlanan erlenlerin substrat tipi, ön işlem durumu ve mikropartikül içeriğine göre kodlanması Tablo 3-5'te gösterilmiştir.

Tablo 3-5: Malt çimi ve buğday kepeğine ön işlem denemesine ait erlen kodlamaları

Kodlama	Mikropartikül içeriği	Substrat	Ön işlem
MÇ	yok	Malt çimi	yok
BK	yok	Buğday kepeği	yok
MÇ-E	yok	Malt çimi	< 0,75mm
BK-E	yok	Buğday kepeği	< 0,75mm
MÇ-E-A	10g/L Al ₂ O ₃	Malt çimi	< 0,75mm
BK-E-A	10g/L Al ₂ O ₃	Buğday kepeği	< 0,75mm
MÇ-EÜ	yok	Malt çimi	> 0,75mm
BK-EÜ	yok	Buğday kepeği	> 0,75mm
MÇ-EÜ-A	10g/L Al ₂ O ₃	Malt çimi	> 0,75mm
BK-EÜ-A	10g/L Al ₂ O ₃	Buğday kepeği	> 0,75mm

3.2.5.6 Al₂O₃ konsantrasyonu ve malt çimi ön işlem denemesi

5 ve 10 g/L olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda Al₂O₃ mikropartikülleri ve vogel tuzları besin ortamlarına eklenmiştir. Karbon ve azot kaynağı olarak malt çimi ise %5 (kütle/hacim) oranında ön işlem uygulanmadan ve ön işlem uygulanarak iki farklı şekilde kullanılmıştır. Ön işlem olarak malt çimine eleme işlemi uygulanmıştır. Por çapı 0,75 mm olan el eleği kullanılarak malt çimi elenmiş ve eleğin üstünde kalan kısım substrat olarak kullanılmıştır. Karşılaştırma yapılabilmesi için mikropartikül eklenmeyen erlenler de hazırlanmış ve iki paralelli çalışılmıştır. Tüm erlenler otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca tutularak steril edilmiştir. Steril kabin içerisinde erlenlere aşılama yapıldıktan sonra erlenler 120

saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Erlenlerden, 48. saatten itibaren 24 saat aralıklarla örnek alınarak 120. saatte üretim sonlandırılmıştır.

Hazırlanan erlenlerin ön işlem durumu ve mikropartikül içeriğine göre kodlanması Tablo 3-6'da gösterilmiştir.

Tablo 3-6: Al_2O_3 konsantrasyonu ve malt çimi ön işlem denemesine ait erlen kodlamaları

Kodlama	Mikropartikül içeriği	Ön işlem
K	yok	yok
K-EÜ	yok	> 0,75mm
5-A	5g/L Al_2O_3	yok
5-A-EÜ	5g/L Al_2O_3	> 0,75mm
10-A	10g/L Al_2O_3	yok
10-A-EÜ	10g/L Al_2O_3	> 0,75mm

3.2.5.7 Talc konsantrasyonu ve malt çimi ön işlem denemesi

1, 5 ve 10 g/L olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda Talc mikropartikülleri ve vogel tuzları besin ortamlarına eklenmiştir. Karbon ve azot kaynağı olarak malt çimi ise %5 (kütle/hacim) oranında eleme uygulanmadan ve eleme uygulanarak iki farklı şekilde kullanılmıştır. Por çapı 0,75 mm olan el eleği kullanılarak malt çimi elenmiş ve eleğin üstünde kalan kısım substrat olarak kullanılmıştır. Karşılaştırma amacıyla mikropartikül içermeyen erlenler de hazırlanarak iki paralelli çalışılmıştır. Tüm erlenler otoklavda 121°C'de 15 dakika boyunca tutularak steril edilmiştir. Steril kabin içerisinde erlenlere aşılama yapıldıktan sonra erlenler 120 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Erlenlerden, 48. saatten itibaren 24 saat aralıklarla örnek alınarak 120. saatte üretim sonlandırılmıştır.

Hazırlanan erlenlerin ön işlem durumu ve mikropartikül içeriğine göre kodlanması Tablo 3-7'de gösterilmiştir.

Tablo 3-7: Talc konsantrasyonu ve malt çimi ön işlem denemesine ait erlen kodlamaları

Kodlama	Mikropartikül içeriği	Ön işlem
K	yok	yok
K-EÜ	yok	> 0,75mm
5-T	5g/L Talc	yok
5-T-EÜ	5g/L Talc	> 0,75mm
10-T	10g/L Talc	yok
10-T-EÜ	10g/L Talc	> 0,75mm

3.2.6 Biyoreaktör denemeleri

Biyoreaktörlerde yapılan üretim denemelerinde 2L Sartorius mekanik karıştırmalı tank reaktör ve Sartorius biostat b+ reaktör kule sistemi kullanılmıştır. Biyoreaktör iyice temizlendikten sonra substrat, vogel tuzları, 2mL köpük kırıcı (sigma), çalışma hacmi 1,4 litre (toplam biyoreaktör hacminin %70'i) olacak şekilde distile su ile tamamlanarak biyoreaktör içerisine alınmıştır. Problar (pH ve O₂), geri soğutucu, bağlantı hortumları ve havalandırma filtresi biyoreaktör üzerindeki yerlerine bağlanmıştır. Biyoreaktör otoklava girecek şekilde hazırlandıktan sonra, otoklavda 121°C'de 30 dakika boyunca steril edilmiştir.

Sterilizasyonun ardından biyoreaktör, reaktör kulesine bağlanarak 30°C'ye soğutulmuştur. Üretimin başlatılmasına hazır hale gelen biyoreaktör "3.2.2 Aşı hazırlanması" başlığında anlatıldığı şekilde elde edilen spor çözeltisi ile %2 (hacim/hacim) oranında (28mL) aseptik koşullar altında aşılanmıştır. Aşıdaki spor sayısına "3.2.3 Spor sayısının belirlenmesi" başlığında belirtildiği gibi dikkat edilmiştir. Aşılamadan sonra biyoreaktör 9 gün (216 saat) boyunca ceketinden su sirkülatörü (PolyScience) ile su sirkülasyonu gerçekleştirilerek 30°C sıcaklıkta tutulmuştur. Karıştırma hızı olarak sabit 300 devir/dakika kullanılmıştır. Hava regülatörü ve reaktör kulesindeki kütle akış kontrolörü yardımıyla havalandırma hızı 1 vvm (1,4 litre/dakika) olarak sabitlenmiştir. Aşılamadan 48. saatinden itibaren, 24 saat aralıklarla, aseptik koşullar altında 20'şer mL örnek alınmıştır.

Tüm biyoreaktör denemelerinde aynı olan üretim parametreleri Tablo 3-8’de verilmiştir.

Tablo 3-8: Biyoreaktör denemelerinde sabit tutulan parametreler

Biyoreaktör hacmi	2 litre
Çalışma hacmi	1,4 litre
Sıcaklık	30°C
Karıştırma hızı	300 devir/dakika
Havalandırma hızı	1 vvm

Biyoreaktör denemelerinde üretim ortamına eklenen iki farklı mikropartikülün (Al_2O_3 ve Talc) enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Ayrıca substrat olarak kullanılan malt çimi, ön işlem olarak elenerek ve elenmeden, iki farklı şekilde üretim ortamına eklenmiştir. Bu sayede, üretim ortamındaki malt çimi partiküllerinin yoğunluğunun, Al_2O_3 ve Talc mikropartiküllerinin etkisinde herhangi bir değişiklik yaratıp yaratmadığı incelenmiştir. Üretimlerde Al_2O_3 ve Talc mikropartikülleri 5g/L ve 10 g/L konsantrasyonlarda denenmiştir. Yapılan biyoreaktör üretimlerinin substrat durumuna ve mikropartikül içeriğine göre kodlanması Tablo 3-9’da gösterilmiştir.

Tablo 3-9: Biyoreaktör denemelerine ait kodlamalar

	%5 elenmiş (0,75mm’dan büyük kısım) malt çimi	%5 elenmemiş malt çimi
Mikropartikül yok	R1	R4
Al_2O_3 (10g/L)	R2	R5
Talc (10g/L)	R3	R6
Al_2O_3 (5g/L)	-	R7
Talc (5g/L)	-	R8

3.2.7 Ksilanaz aktivitesi tayini

3.2.7.1 Analiz çözeltilerinin hazırlanması

a. A çözeltisi

25g sodyum karbonat (Na_2CO_3 - Merck), 25g sodyum potasyum tartarat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - Merck) ve 200g sodyum sülfat (Na_2SO_4 - Merck) 800mL distile su içerisinde çözüldükten sonra son çözelti hacmi distile su ile 1000mL'ye tamamlanmıştır.

b. B çözeltisi

200mL distile su içerisine 4 damla derişik sülfürik asit (H_2SO_4 - Merck) damlatıldıktan sonra 30g bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - Riedel-de Haen) eklenerek çözülmüştür.

c. C çözeltisi

50g amonyum molibdat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - Merck) 900mL distile su içerisinde çözülmüştür. Ardından çözeltiye 42mL derişik sülfürik asit eklenmiştir. Ayrı bir beherde, 50mL distile su içerisinde 6g sodyum arsenat heptahidrat ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - Sigma) çözülmüştür. İki çözelti birbirine karıştırıldıktan sonra son çözelti hacmi distile su ile 1000mL'ye tamamlanmıştır.

d. D çözeltisi

B çözeltisi, A çözeltisi ile 25 kat seyreltilerek elde edilmiştir.

e. E çözeltisi

C çözeltisi, distile su ile 5 kat seyreltilerek elde edilmiştir.

f. Sodyum asetat tamponu

82g sodyum asetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ - Merck) 800mL distile suda çözülmüştür. Daha sonra çözeltinin pH'ı 4,7 olana kadar asetik asit (CH_3COOH - Merck) ilave edilmiştir. Son çözelti hacmi 1000mL'ye distile su ile tamamlanarak 1 molar, pH 4,7 sodyum asetat tamponu elde edilmiştir. Bu tampondan distile su ile 40 kat seyreltilerek, 25 milimolar (mM), pH 4,7 sodyum asetat tamponu ayrı olarak hazırlanmıştır.

0,1 molar, pH 5,5 sodyum asetat tamponu hazırlamak için 8,2g sodyum asetat tartılarak 800mL distile su içerisinde çözülmüştür. Daha sonra pH 5,5 olana kadar asetik asit ilave edilmiştir. Son hacim distile su ile 1000mL'ye tamamlanmıştır.

g. Arabinoksilan

1g orta viskoz buğday arabinoksilanının (Megazyme) üzerine 6mL %95'lik (hacim/hacim) etanol (Merck) ve 80mL distile su ilave edilmiştir. Ardından kaynayan dek ısıtılarak karıştırılmıştır. Kaynamaya başladıktan sonra 15 dakika daha ısıtılıp karıştırılmaya devam edilmiştir. Kaynatma işlemin ardından 10mL sodyum asetat tamponu (1 M, pH 4,7) ilave edilip son hacmi balon joje içerisinde distile su ile 100mL'ye tamamlanmıştır. Son olarak kontaminasyonu önlemek ve oda sıcaklığında kararlılığını sağlamak amacıyla 3 damla toluen (Merck) ilave edilmiştir.

h. Ksiloz stok çözeltisi

0,05g ksiloz (Merck) tartılıp, 100mL, 25mM, pH 4,7 sodyum asetat tamponu içinde çözülmüştür.

3.2.7.2 Örneklerin aktivite analizine hazırlanması

Erlenlerden ve biyoreaktörlerden alınan örnekler 9000g'de 10 dakika boyunca santrifüj (Sartorius 1-14) edilmiştir. Yeterince çökmeyen, temiz bir süpernatant elde edilemeyen örnekler bir tur daha 9000g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası örnekler sodyum asetat tampon ile (25mM, pH 4,7) kalibrasyon eğrisi aralığına düşecek oranda seyreltilmiştir. Aktivite analizi sonucunda kalibrasyon eğrisi aralığına düşmeyen örneklerin seyreltme oranları yeniden ayarlanmıştır.

3.2.7.3 Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve aktivite analizi

“3.2.7.1 Analiz çözeltilerinin hazırlanması” başlığında belirtildiği şekilde hazırlanan ksiloz stoğundan Tablo 3-10'da gösterilen seyreltmeler yapılmıştır.

Tablo 3-10: Enzim aktivitesi kalibrasyon eğrisinin çıkarılması için hazırlanan konsantrasyonlar

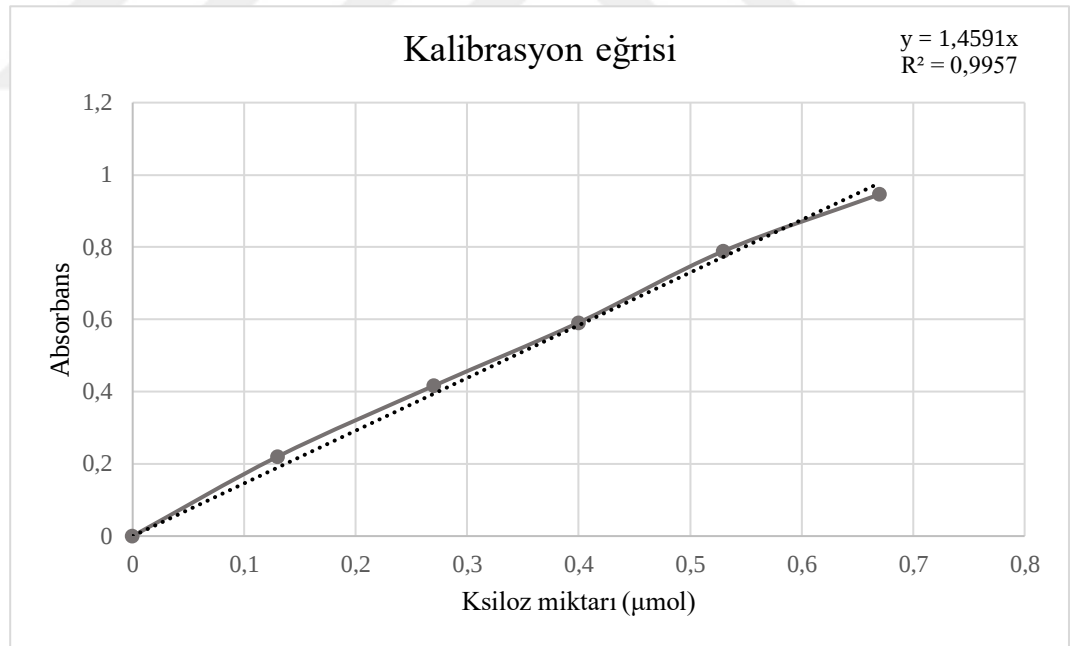
Örnek	Ksiloz stok çözeltisinden alınan miktar (μL)	25 mM, pH 4.7 sodyum asetat tampondan alınan miktar (μL)	Ksiloz konsantrasyonu (μmol/mL)
1	0	1000	0
2	200	800	0,67
3	400	600	1,33
4	600	400	1,99
5	800	200	2,66
6	1000	0	3,33

Kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için “3.2.7.1 Analiz çözeltilerinin hazırlanması” başlığında belirtildiği şekilde hazırlanan %1’lik orta viskoz buğday arabinoksilanı çözeltisinden 500’er μL cam tüplere alınmıştır. Tüpler 40°C’deki su banyosuna (Memmert) yerleştirilmiştir. Tablo 3-10’da gösterilen ksiloz seyreltmelerinden 200’er μL ilave edilen tüpler 40°C’de 5 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Her tüp için 5 dakikalık inkübasyon süresi sona erdikten sonra, ilgili tüplere 500μL D çözeltisi eklenmiş ve tüpler su banyosundan çıkarılmıştır. Daha sonra tüpler içerisinde su kaynayan bir beherde 20 dakika boyunca bırakılmıştır. Kaynama süresinin sonunda tüpler beherden alınarak 5 dakika soğumaya bırakılmıştır. Ardından tüplere 3’er mL E çözeltisi eklenmiş ve tüpler vortekslenmiştir (Scilogex). E çözeltisi eklenen tüpler oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Son olarak tüplerdeki örneklerin spektrofotometrede (Amersham Biosciences) 520 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmış ve elde edilen veriler Tablo 3-11’de verilmiştir. Spektrofotometrede ksiloz içermeyen referans değerini (kör), Tablo 3-10’da yer alan 1 numaralı örnek sağlamıştır.

Tablo 3-11: Kalibrasyon eğrisi için ölçülen absorbans değerleri

Ksiloz miktarı (μmol)	OD ₅₂₀ Absorbans
0	0
0,13	0,220
0,27	0,416
0,4	0,591
0,53	0,789
0,67	0,946

Tablo 3-11’de ksiloz konsantrasyonlarına karşı elde edilen absorbans değerleri, Grafik 3-1’de ise kalibrasyon eğrisi gösterilmiştir. Her analiz çözeltisi yenilendiğinde kalibrasyon eğrisi yeni çözeltilerle yeniden hazırlanmıştır.



Grafik 3-1: Ksilanaz aktivitesi için kalibrasyon grafiği

Üretimlerden alınan örnekler, su banyosundaki tüplere, ksiloz seyreltmeleri yerine eklenerek aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Grafik 3-1’de yer alan kalibrasyon eğrisinin eğimi aşağıdaki formüle yerleştirilerek örneklerdeki ksilanaz aktiviteleri Unite/mL cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{Ksilanaz Aktivitesi} \left(\frac{\text{Unite}}{\text{mL}} \right) = \frac{\left(\frac{\text{OD}_{520}}{\text{Eğim}} \right) \times \text{seyreltme faktörü}}{\text{enzim hacmi(mL)} \times \text{inkübasyon süresi(dakika)}}$$

Bu formülde yer alan parametrelerin açıklamaları aşağıda verilmiştir:

- OD₅₂₀ : Tüplerdeki örneklerin referans değerine karşı spektrofotometrede 520nm’de ölçülen absorbans değeri
- Eğim : Kalibrasyon eğrisinde, değişen ksiloz konsantrasyonlarına karşı ölçülen absorbans değerlerini gösteren grafiğin eğimi
- İnkübasyon süresi : Enzim ve substratın reaksiyonu için izin verilen süre (dakika)
- Seyreltme faktörü : Enzimin substrata ilave edilmeden önceki seyreltilme oranı
- Enzim Hacmi : Enzimin substrata ilave edilmeden önceki hacmi (mL)

3.2.8 Biyoreaktör örneklerinin mikroskopta görüntülenmesi

Biyoreaktör üretimlerinden alınan örneklerdeki fungal morfolojilerin incelenmesi Leica MZ16 Stereo mikroskop sisteminde yapılmış, Leica Application Suite versiyon 4.9.0 bilgisayar yazılımı ile görüntüler kaydedilmiştir. Biyoreaktörlerden 120., 144., 168., 192. ve 216. saatlerde alınan örneklerin görüntülemeleri yapılmıştır.

Görüntüleme hazırlığı olarak R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 ve R8 kodlu biyoreaktör üretimlerinden alınan örnekler, distile su ile tek kullanımlık petrilere 10 kat seyreltilmiştir. Ardından petrilere stereo mikroskoba yerleştirilerek görüntülemeleri yapılmıştır. Mikropartiküller ise tek kullanımlık petrilere distile su ile 0,5 g/L konsantrasyonda süspanse edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

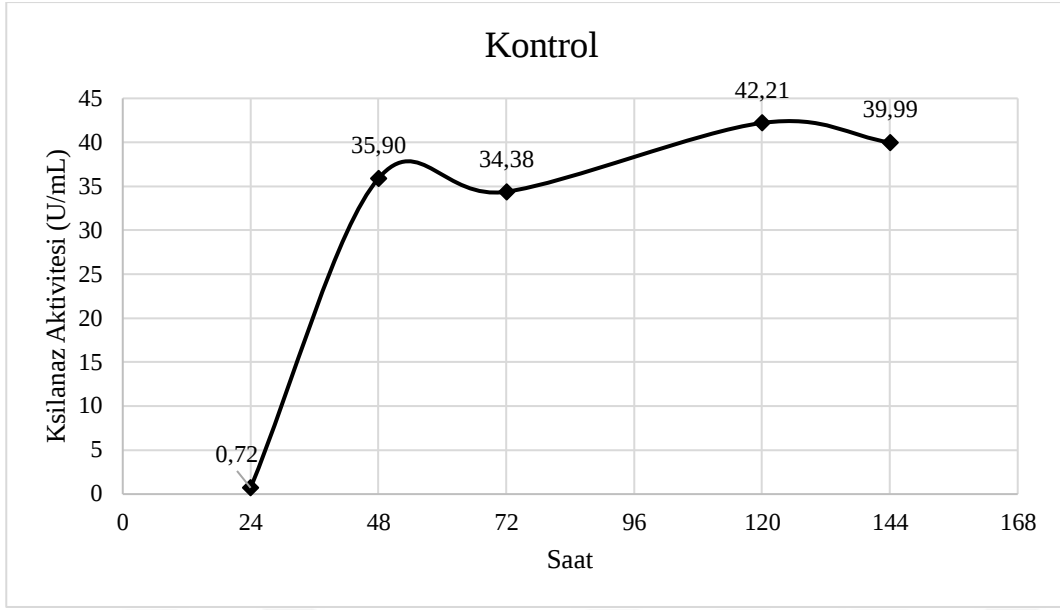
4.1 Erlen Denemeleri

4.1.1 Ön deneme

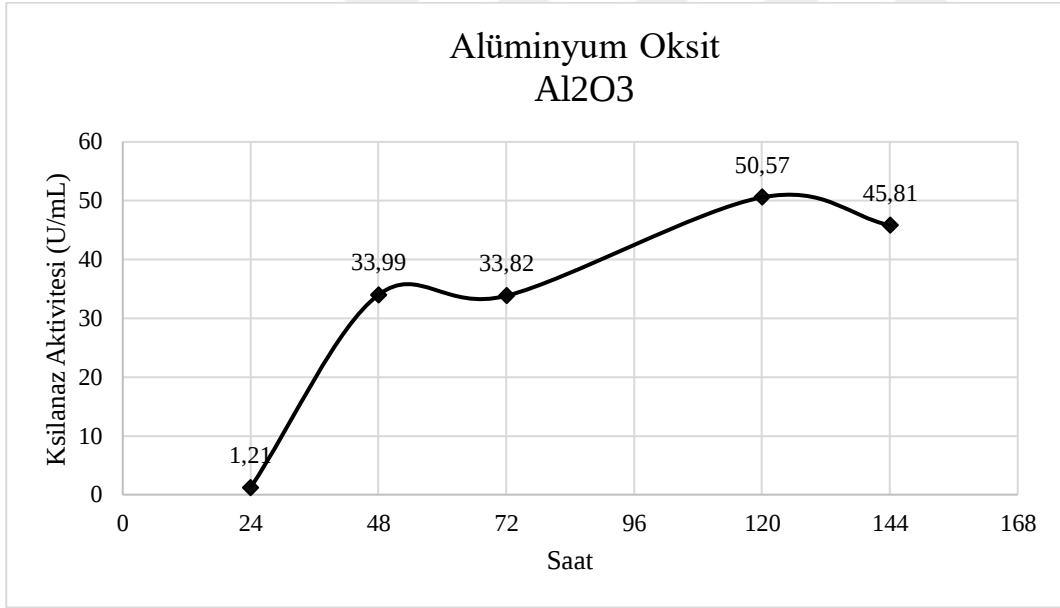
Mikropartikül olarak Al_2O_3 , Talc ve $CaCO_3$ kullanılan ve 9 gün boyunca çalkalamalı inkübatörde devam eden üretimler sonucu elde edilen aktivite değerleri; 2 paralel erlendenden elde edilen aktivite değerlerinin ortalaması ve kontrol grubuna göre aktivite değişim yüzdeleri olarak Tablo 4-1’de gösterilmektedir. Elde edilen aktivite değerleri, her bir grup için ayrı ayrı grafiğe aktarılmış (Grafik 4-1:Grafik 4-4) ve Grafik 4-5’te karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Ön deneme erlenlerinden elde edilen aktivite değerleri

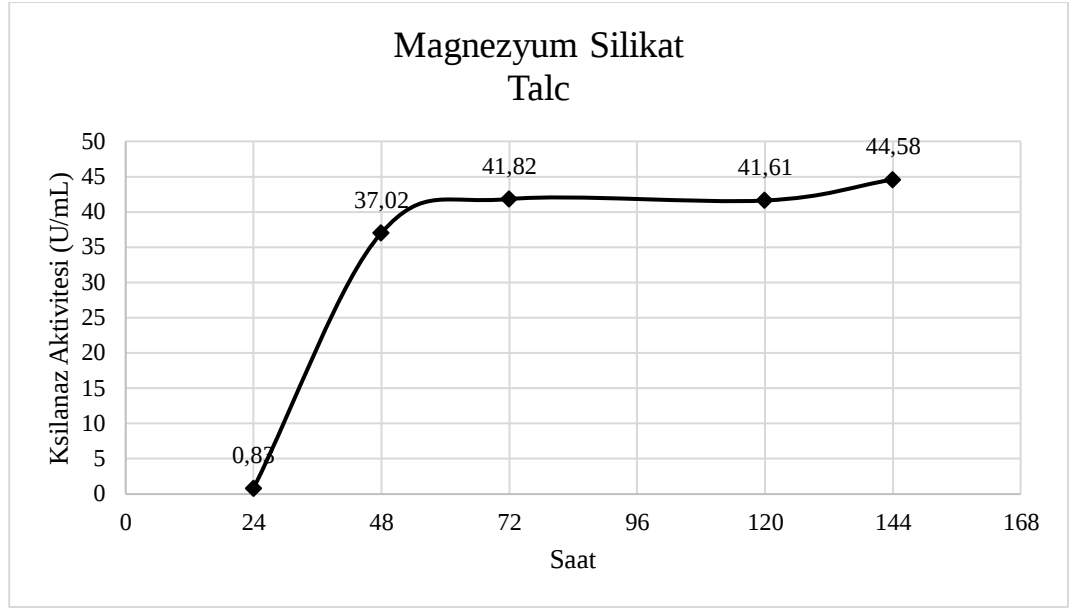
Zaman (saat)	Kontrol Grubu	Ksilanaz Aktivitesi					
		Al ₂ O ₃ İçeren Erlenler		Talc İçeren Erlenler		CaCO ₃ İçeren Erlenler	
		U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%
24	0,72	1,21	68,06	0,83	15,28	2,01	179,17
48	35,90	33,99	-5,32	37,02	3,12	3,57	-90,06
72	34,38	33,82	-1,63	41,82	21,64	4,39	-87,23
120	42,21	50,57	19,81	41,61	-1,42	4,50	-89,34
144	39,99	45,81	14,55	44,58	11,48	2,23	-94,42



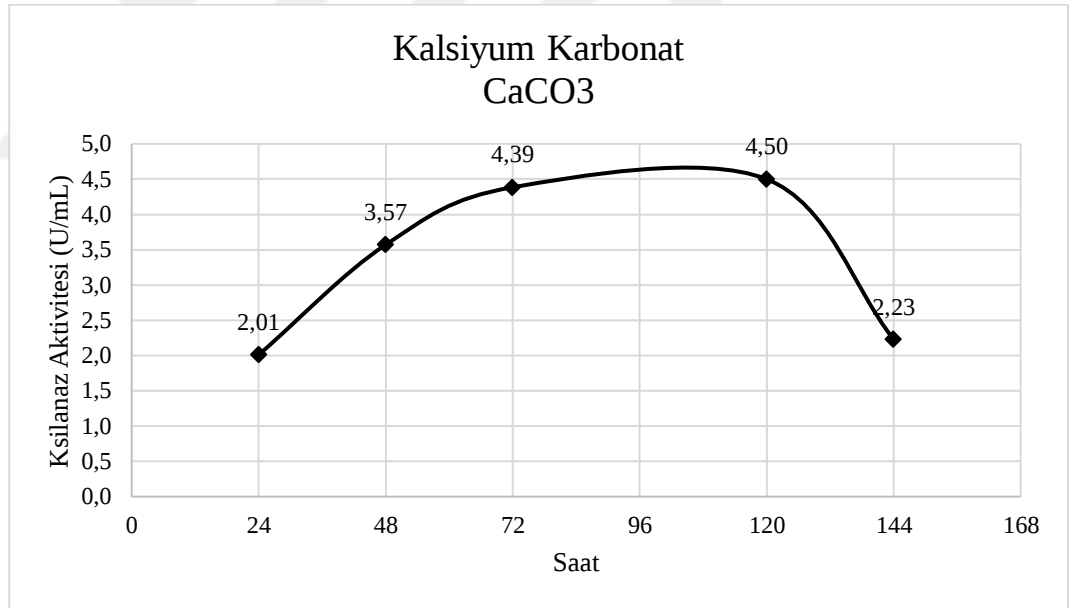
Grafik 4-1: Ön deneme kontrol erlen aktivitelemi



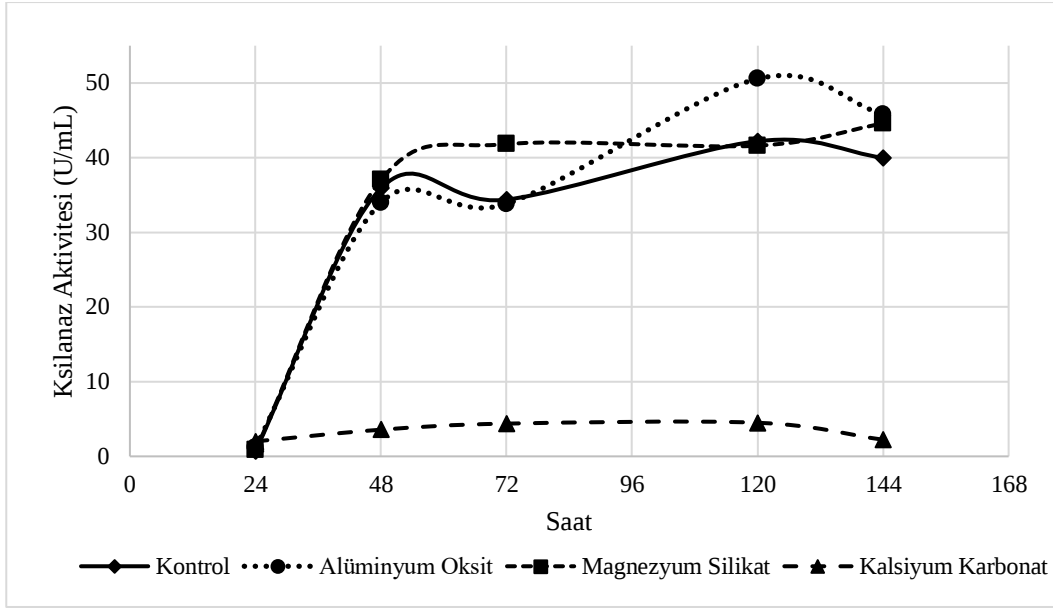
Grafik 4-2: Ön deneme Al₂O₃ mikropartikülü içeren erlen aktivitelemi



Grafik 4-3: Ön deneme Talc mikropartikülü içeren erlen aktiviteleri



Grafik 4-4: Ön deneme CaCO₃ mikropartikülü içeren erlen aktiviteleri



Grafik 4-5: Ön deneme erlenlerinin aktivitelerinin karşılaştırılması grafiği

Yapılan aktivite analizleri sonucunda Tablo 4-1’de görüldüğü üzere, mikropartikül olarak kullanılan CaCO_3 ksilanaz aktivitesini olumsuz yönde etkilemiştir. CaCO_3 eklenen erlenlerde, kontrol erlenlerine göre ksilanaz aktivitesi, inkübasyonun 120.saati temel alındığında yaklaşık %89 oranında azalmıştır. Literatürdeki bir çalışmada ise CaCO_3 kullanılarak üretim ortamındaki *Aspergillus niger* morfolojisinin etkilenecek glikoz oksidaz enziminin aktivitesinin %50 oranında arttırıldığı görülmüştür (Zhu et al., 2018). Bu çalışmada enzim aktivitesindeki artış, CaCO_3 ’ın besin ortamında gerekli olan bir bileşen olması ve üretim sırasında oluşan glukonik asidi nötrlemesi gibi nedenlerle açıklanabilmektedir. Ancak tez çalışmasındaki ksilanaz aktivitesini olumsuz etkilemesi nedeniyle CaCO_3 ile çalışmaya son verilmiştir.

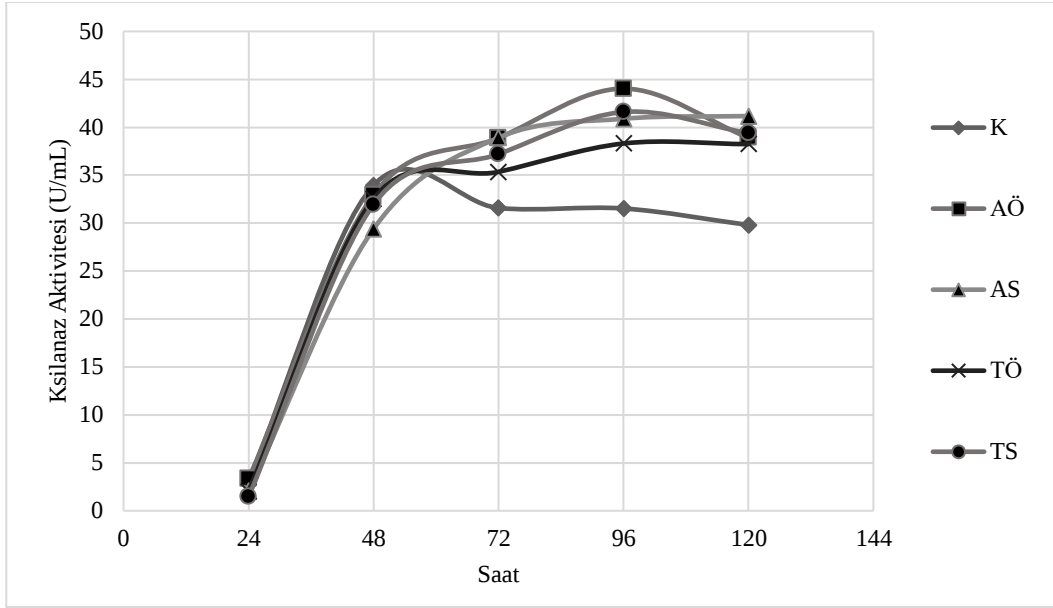
Al_2O_3 mikropartikülleri ksilanaz aktivitesini genel anlamda olumlu yönde etkilemiştir. İnkübasyonun 120.saati temel alındığında Al_2O_3 mikropartikülleri ksilanaz aktivitesini kontrol grubuna göre yaklaşık %20 oranında arttırmıştır. Talc mikropartikülleri ise inkübasyonun 120.saati temel alındığında kontrol grubu ile benzer aktivite göstermiştir. Ancak diğer saatlerde Talc mikropartikülleri içeren erlenlerden elde edilen ksilanaz aktivitesi kontrol erlenlerine göre yüksektir. Örneğin inkübasyonun 72.saati incelendiğinde Talc mikropartikülleri ksilanaz aktivitesini kontrol grubuna göre yaklaşık %22 oranında arttırmıştır.

4.1.2 Mikropartiküllerin besin ortamı içerisinde sterilizasyon denemesi

Al_2O_3 ve Talc mikropartiküllerinin ayrı olarak veya üretim ortamı içerisinde otoklav sterilizasyonuna maruz bırakılmasının ksilanaz enzimi üretimine etkisinin incelendiği erlen denemesinde elde edilen enzim aktivitesi sonuçları U/mL cinsinden, kontrol grubuna göre aktivite değişimi de % cinsinden Tablo 4-2’de verilmiştir. Sonuçların karşılaştırmalı grafiği Grafik 4-6’da gösterilmiştir. Gösterilen değerler iki paralel erlenden elde edilen aktivite ortalaması olarak sunulmuştur.

Tablo 4-2: Mikropartiküllerin farklı sterilizasyon denemesi aktiviteleri

<i>Saat</i> <i>Örnek</i>	Ksilanaz Aktivitesi									
	24		48		72		96		120	
	U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%
K	3,07	-	33,93	-	31,58	-	31,53	-	29,81	-
AÖ	3,33	8,47	32,95	-2,89	38,88	23,12	44,03	39,64	38,92	30,56
AS	2,07	-32,57	29,39	-13,38	38,91	23,21	40,89	29,69	41,17	38,11
TÖ	2,03	-33,88	32,54	-4,10	35,35	11,94	38,31	21,50	38,24	28,28
TS	1,46	-52,44	31,94	-5,87	37,20	17,80	41,59	31,91	39,39	32,14



Grafik 4-6: Mikropartiküllerin farklı sterilizasyon denemesine ait aktivite grafiği

Literatürde birçok kaynakta (Anteck, Blatkiewicz, et al., 2016; Bala and Singh, 2016; Driouch et al., 2012; Driouch, Roth, et al., 2010; Driouch, Sommer, et al., 2010; Germec et al., 2017; Kaup et al., 2008; Kowalska et al., 2017; J. Yang et al., 2016; Yatmaz et al., 2016) mikropartiküller besin ortamından ayrı olarak, genellikle bir tampon çözelti içerisinde steril edildikten sonra, steril koşullar altında üretim ortamına eklenmiştir. Bu denemede yapılan aktivite analizi sonuçlarına göre, Tablo 4-2’de görüldüğü üzere Al_2O_3 ve Talc mikropartiküllerinin üretim ortamı içerisinde veya ayrı olarak steril edilmesinin ksilanaz aktivitesinde önemli bir fark oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle sonraki tüm denemelerde Al_2O_3 ve Talc mikropartikülleri üretim ortamı içerisinde steril edilmiştir.

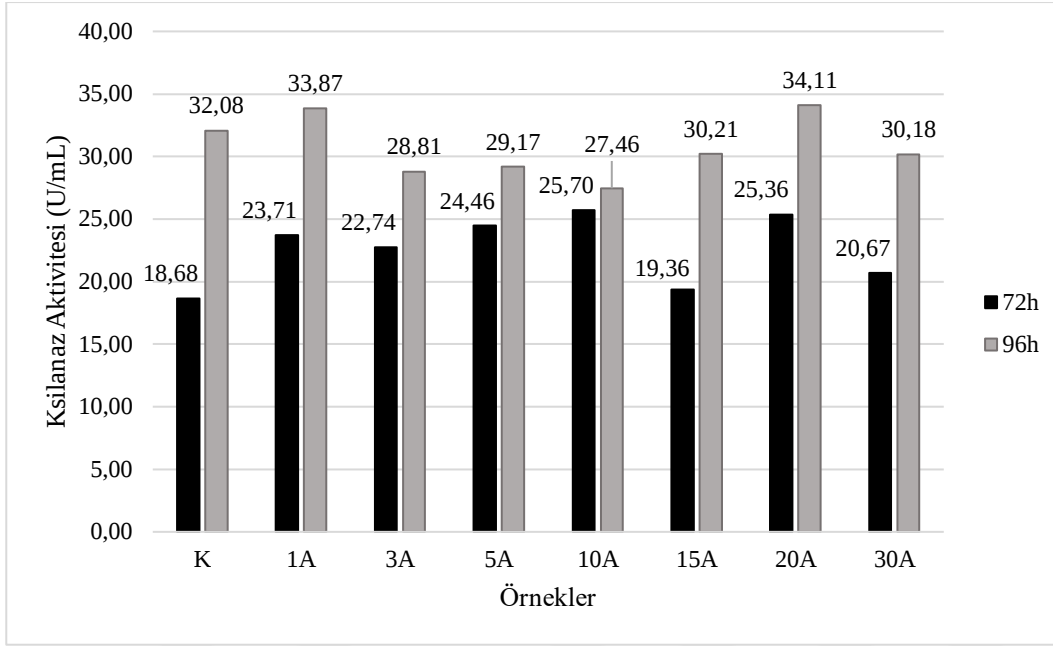
Bu denemede Al_2O_3 ve Talc mikropartiküllerinin ksilanaz aktivitesine olumlu etkisi görülmektedir. En yüksek ksilanaz aktivitelere üretimin 96. saatinde ulaşılmıştır. Besin ortamıyla birlikte steril edilen Al_2O_3 mikropartikülleri içeren erlenlerde 44,03 U/mL ile kontrol erlenlerine göre %39,64 daha yüksek ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir. Besin ortamıyla birlikte steril edilen Talc mikropartikülleri içeren erlenlerde ise 38,31 U/mL ile kontrol erlenlerine göre %21,50 daha yüksek ksilanaz aktivitesine ulaşılmıştır.

4.1.3 Al₂O₃ mikropartikülleri konsantrasyon denemesi

Bu denemede, malt çimi içeren besin ortamında farklı Al₂O₃ mikropartikül konsantrasyonlarının ksilanaz enzimi üretimine etkisi incelenmiştir. Erlen üretiminde alınan örneklerden ölçülen ksilanaz aktivitesi değerleri 3 paralelin ortalaması alınarak ve kontrol grubuna oranla aktivite değişimleri % üzerinden hesaplanarak Tablo 4-3'te verilmiştir. Çizilen karşılaştırma grafiği Grafik 4-7'de gösterilmiştir.

Tablo 4-3: Al₂O₃ mikropartikülleri konsantrasyon denemesinden elde edilen enzim aktiviteleri

Örnek	72.saatteki ksilanaz aktivitesi		96.saatteki ksilanaz aktivitesi	
	U/mL	%	U/mL	%
K	18,68	-	32,08	-
1A	23,71	26,93	33,87	5,58
3A	22,74	21,73	28,81	-10,19
5A	24,46	30,94	29,17	-9,07
10A	25,70	37,58	27,46	-14,40
15A	19,36	3,64	30,21	-5,83
20A	25,36	35,76	34,11	6,33
30A	20,67	10,65	30,18	-5,92



Grafik 4-7: Al_2O_3 mikropartikülleri konsantrasyon denemesi aktivite grafiği

Yapılan analizler sonucunda, inkübasyonun 72. saati temel alındığında kontrole göre en iyi sonuç 10 g/L Al_2O_3 mikropartikül konsantrasyonunda, %37,58 artış sağlanarak elde edilmiştir. Tüm mikropartikül konsantrasyonlarında kontrole göre daha yüksek ksılanaz aktivitesi elde edilirken, en az aktivite artışı 15 g/L Al_2O_3 mikropartikül konsantrasyonunda %3,64 olarak gerçekleşmiştir.

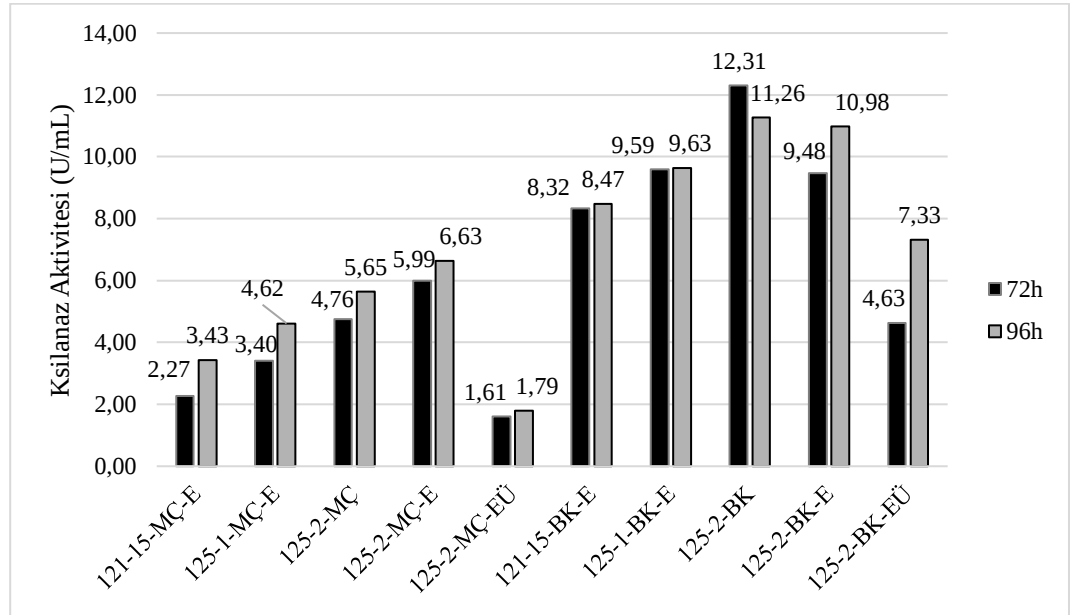
İnkübasyonun 96. saati temel alındığında ise en düşük ksılanaz aktivitesine 10 g/L Al_2O_3 mikropartikülü konsantrasyonunda 27,46 U/mL, en yüksek ksılanaz aktivitesine ise 20 g/L Al_2O_3 mikropartikülü konsantrasyonunda 34,11 U/mL olarak ulaşılmıştır. 3, 5 ve 10 g/L Al_2O_3 mikropartikülü konsantrasyonlarında daha düşük ksılanaz aktivitesi elde edilmesine rağmen diğer mikropartikül konsantrasyonlarında ksılanaz aktivitesi açısından önemli bir fark görülememiştir.

4.1.4 Isıl işlem ile malt çiminden ksılan ekstraksiyon denemesi

Malt çimi ve buğday kepeğine ısı işlem uygulanarak ksılan ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstrakt besin ortamında kullanılmıştır. Yapılan erlen üretiminden alınan örneklerin, ksılanaz aktivitesi analizleri sonucu elde edilen değerler Tablo 4-4'te, çizilen karşılaştırma grafiği Grafik 4-8'de verilmiştir.

Tablo 4-4: Isıl işlem ile malt çiminden ksılan ekstraksiyonu denemesinden elde edilen aktivite değerleri

Örnek	72.saattteki ksılanaz aktivitesi (U/mL)	96.saattteki ksılanaz aktivitesi (U/mL)
121-15-MÇ-E	2,27	3,43
125-1-MÇ-E	3,40	4,62
125-2-MÇ	4,76	5,65
125-2-MÇ-E	5,99	6,63
125-2-MÇ-EÜ	1,61	1,79
121-15-BK-E	8,32	8,47
125-1-BK-E	9,59	9,63
125-2-BK	12,31	11,26
125-2-BK-E	9,48	10,98
125-2-BK-EÜ	4,63	7,33



Grafik 4-8: Isıl işlem ile malt çiminden ksılan ekstraksiyonu denemesi aktiviteleri

Ksılan ekstraksiyonunun başarısı, elde edilen ekstraktlar ile yapılan üretimlerde ulaşılan ksılanaz aktivitesi değerleri ile bağlantı kurularak değerlendirilmiştir. Ksılanaz aktivitelerinin, malt çiminin ekstraksiyon yapılmadan substrat olarak kullanıldığı önceki denemelere göre düşük kaldığı görülmüştür. Bu nedenle malt çiminden ve buğday kepeğinden istenilen seviyede ksılan ekstraksiyonu gerçekleştirilemediği tahmin edilmektedir. Daha yüksek miktarda ksılan ekstraksiyonu gerçekleştirebilmek ve daha yüksek ksılanaz aktivitesine ulaşabilmek için ekstraksiyon koşullarının iyileştirilmesi gerekmektedir. Literatürdeki çalışmalarda (Merali et al. 2013; Thomsen et al. 2008; Vázquez et al. 2005), 165°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda daha verimli ksılan ekstraksiyonu gerçekleştirilebildiği görülmektedir.

Yetersiz ekstraksiyon gerçekleşmesine rağmen, saptanan ksılanaz aktivitesi değerleri ile bağlantı kurulduğunda, aynı koşullar altında malt çimine oranla buğday kepeğinden daha fazla ksılan ekstrakte edilebildiği çıkarımı yapılabilir. Grafik 4-8'de görüldüğü üzere, aynı koşullarda yapılan ekstraksiyon denemeleri sonucu yapılan üretimlerde, buğday kepeği ekstraktlarında malt çimi ekstraktlarının yaklaşık 2 katı ksılanaz aktivitesi elde edilmiştir.

Isıl işlem süresinin artması ekstraksiyonu olumlu etkilemiş ve ksılanaz aktivitesinde bir miktar artış sağlamıştır. Substratlara uygulanan ön işleme göre de ekstraksiyonun veriminin etkilendiği görülmektedir. Eleme işleminin ardından partikül boyutları 0,75 milimetrenin üzerinde olan malt çimi ve buğday kepeğinden elde edilen ekstraktlar, üretim ortamında en düşük performansları göstermiştir. Bu sonuçtan substrat partiküllerinin boyutlarının büyümesinin ksılan ekstraksiyonunu olumsuz yönde etkilediği çıkarılmaktadır. Partikül boyutları 0,75 milimetrenin altında olan malt çimi, eleme işlemi uygulanmayan malt çimine göre daha iyi ekstraksiyon sonucu vermiştir. Buğday kepeğinde ise tam tersi olarak elenmemiş buğday kepeğinden, partikül boyutu 0,75 milimetrenin altında olan buğday kepeğine göre daha fazla ksılan ekstrakte edilebilmiş ve yapılan üretimde daha yüksek ksılanaz aktivitesine ulaşılmıştır.

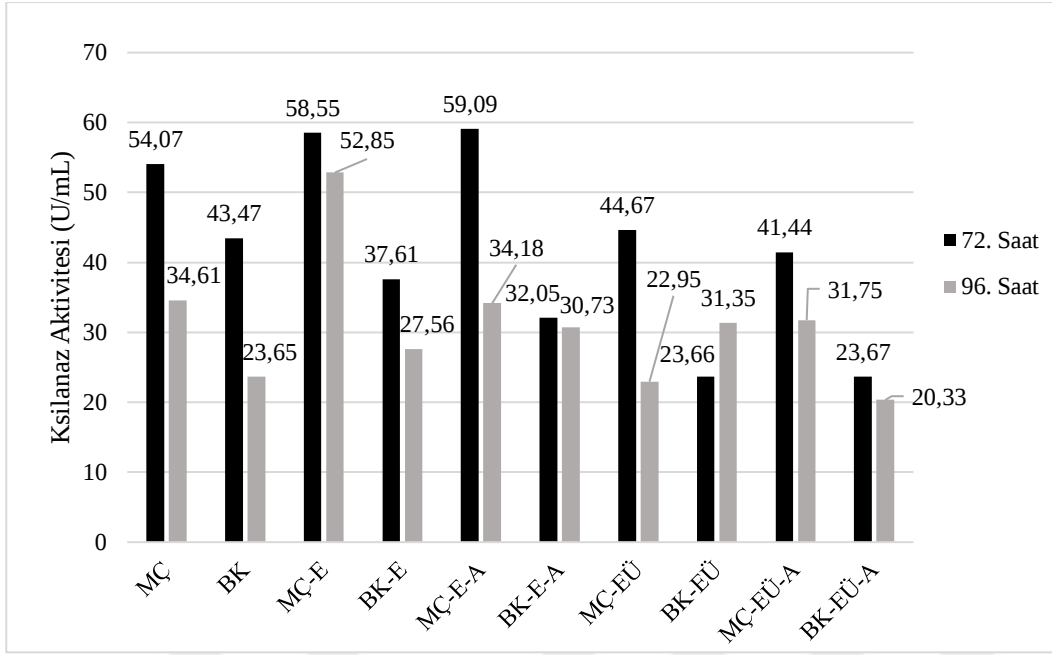
Ekstraksiyon verimi ve yapılan üretimler sonucu ksılanaz aktivite değerleri, yetersiz bulunduğundan ekstraktlar kullanılarak mikropartiküllü üretim denemeleri gerçekleştirilmemiştir.

4.1.5 Malt çimi ve buğday kepeğine ön işlem denemesi

Üretim ortamında karbon ve azot kaynağı olarak kullanılan malt çimi ve buğday kepeğine “3.2.5.5 Malt çimi ve buğday kepeğine ön işlem denemesi” başlığında anlatıldığı gibi ön işlem uygulanmıştır. Örneklerin analizlerinden elde edilen ksilanaz aktivitesi sonuçları 2 paralelin ortalaması olarak Tablo 4-5’te, çizilen grafik Grafik 4-9’da verilmiştir.

Tablo 4-5: Malt çimi ve buğday kepeği ön işlem denemesinden elde edilen enzim aktiviteleri

Örnek	72.saatteki ksilanaz aktivitesi (U/mL)	96.saatteki ksilanaz aktivitesi (U/mL)
MÇ	54,07	34,61
BK	43,47	23,65
MÇ-E	58,55	52,85
BK-E	37,61	27,56
MÇ-E-A	59,09	34,18
BK-E-A	32,05	30,73
MÇ-EÜ	44,67	22,95
BK-EÜ	23,66	31,35
MÇ-EÜ-A	41,44	31,75
BK-EÜ-A	23,67	20,33



Grafik 4-9: Malt çimi ve buğday kepeği ön işlem denemesine ait aktivite grafiği

Bu denemede, substratlara uygulanan ön işlemin durumuna göre mikropartiküllerin etkisi incelenmiştir. Malt çimi ile yapılan üretimlerde genel olarak buğday kepeği ile yapılan üretimlere göre daha yüksek ksilanaz aktivitesine ulaşıldığı görülmektedir. Tek istisna olarak, malt çimi ve buğday kepeğinin 0,75 mm partikül çapından büyük fraksiyonu (MÇ-EÜ, BK-EÜ) ile yapılan üretimlerin 96.saatinde, buğday kepeğinden 31,35 U/mL ksilanaz aktivitesi elde edilirken malt çiminden 22,95 U/mL ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir. Denemenin bütününe bakıldığında, malt çimine oranla daha düşük ksilanaz aktiviteleri elde edildiğinden buğday kepeği ile çalışmalara son verilmiştir.

Elenmiş malt çiminin partikül çapı 0,75 milimetreden küçük fraksiyonu (MÇ-E) ile yapılan üretimlerde, elenmemiş malt çimi (MÇ) ile yapılan üretimlere göre daha yüksek ksilanaz aktivitesine ulaşılmıştır. MÇ-E kodlu erlenler ve 10 g/L Al_2O_3 mikropartiküllerinin eklenmiş versiyonu olan MÇ-E-A kodlu erlenler karşılaştırıldığında, üretimin 72.saatinde ksilanaz aktivitesi açısından önemli bir fark yoktur. Üretimin 96.saatinde, 72.saate göre ksilanaz aktivitelerinde düşüş yaşanmıştır. MÇ-E-A kodlu erlenlerde bu düşüş daha keskin olmuştur.

Elenmiş malt çiminin partikül çapı 0,75 milimetreden büyük fraksiyonu (MÇ-EÜ) ile yapılan üretimlerde ise ksilanaz aktivitesi MÇ ve MÇ-E kodlu erlenlere göre daha düşük kalmıştır. Bunun nedeni olarak malt çiminin büyük partiküllerinin

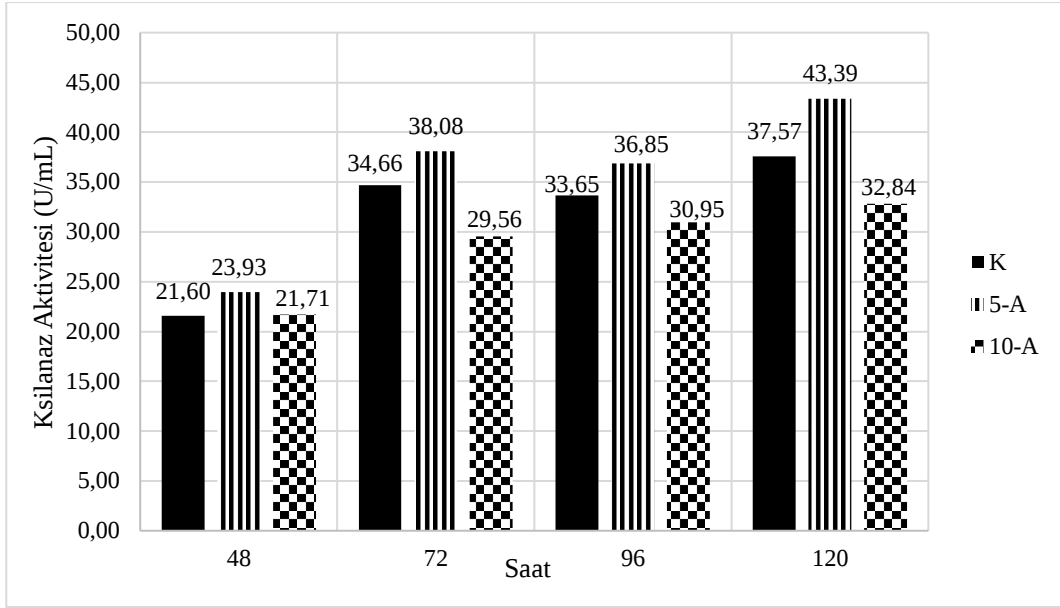
ksılan açısından daha yetersiz olması düşünülmektedir. Malt çiminin büyük partiküllerinde selülozik yapıların daha fazla olmasının bu duruma sebep olabileceği tahmin edilmektedir. MÇ-EÜ kodlu erlenler ve 10 g/L Al_2O_3 mikropartiküllerinin eklenmiş versiyonu olan MÇ-E-A kodlu erlenler karşılaştırıldığında üretimin 72.saatinden ksılanaz aktivitesi açısından önemli bir fark görülmemiştir. Üretimin 96.saatinden ksılanaz aktivitelerinde düşüş yaşanmıştır. MÇ-EÜ kodlu erlenlerde bu düşüş daha keskin olmuştur.

4.1.6 Al_2O_3 konsantrasyonu ve malt çimi ön işlem denemesi

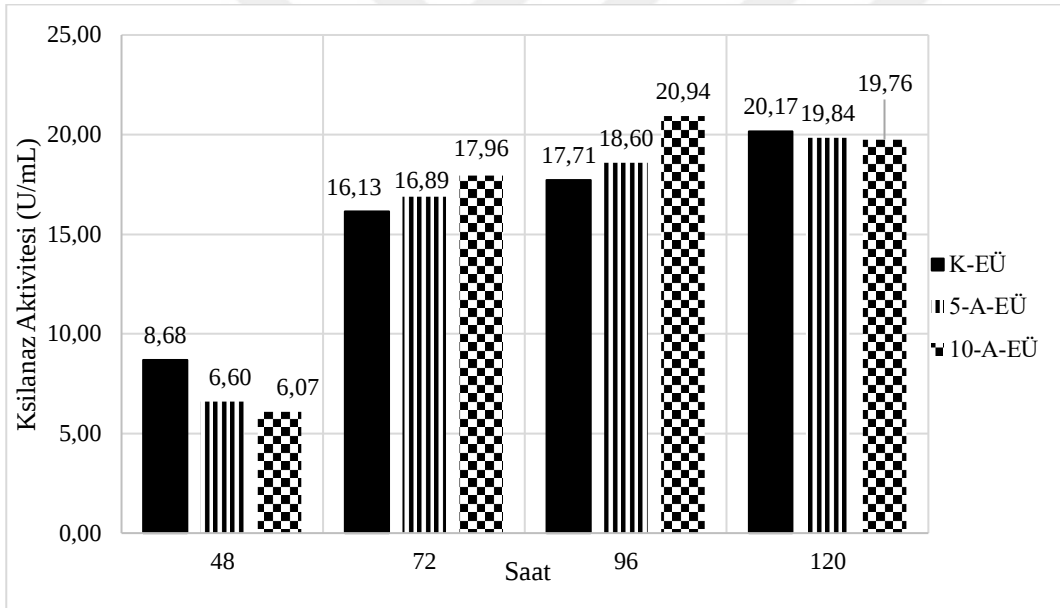
Bu denemede, ön işlem uygulanan ve uygulanmayan malt çimi içeren besin ortamlarında, iki farklı Al_2O_3 mikropartikül konsantrasyonunun ksılanaz enzimi üretimine etkisi incelenmiştir. İki paralel erlenden alınan örneklerin ksılanaz aktivite değerlerinin ortalaması U/mL olarak ve kontrol grubuna oranla aktivite artışları % üzerinden hesaplanarak Tablo 4-6'da verilmiştir. Çizilen grafikler Grafik 4-10 ve Grafik 4-11'de gösterilmiştir.

Tablo 4-6: Al_2O_3 konsantrasyon ve malt çimi ön işlem denemesinden elde edilen enzim aktiviteleri

Örnek	Ksılanaz Aktivitesi							
	48.Saat		72.Saat		96.Saat		120.Saat	
	U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%
K	21,60	-	34,66	-	33,65	-	37,57	-
K-EÜ	8,68	-	16,13	-	17,71	-	20,17	-
5-A	23,93	10,79	38,08	9,87	36,85	9,51	43,39	15,49
5-A-EÜ	6,60	-23,96	16,89	4,71	18,60	5,03	19,84	-1,64
10-A	21,71	0,51	29,56	-14,71	30,95	-8,02	32,84	-12,59
10-A-EÜ	6,07	-30,07	17,96	11,35	20,94	18,24	19,76	-2,03



Grafik 4-10: Al_2O_3 konsantrasyon ve malt çimi ön işlem denemesi ksilanaz aktivitesi grafiği-I



Grafik 4-11: Al_2O_3 konsantrasyon ve malt çimi ön işlem denemesi ksilanaz aktivitesi grafiği-II

Elenmemiş malt çimi ile yapılan üretimlerin 48., 72. ve 96. saatlerinde 5 g/L Al_2O_3 mikropartikülleri bulunan erlenlerde kontrole oranla yaklaşık %10 daha fazla ksilanaz aktivitesine ulaşılmıştır. Üretimin 120. saatinde 5 g/L Al_2O_3 mikropartikülü içeren erlenlerde 43,39 U/mL'ye ulaşan ksilanaz aktivitesi kontrole oranla %15,49 daha yüksek bulunmuştur. 10 g/L Al_2O_3 mikropartikülü içeren erlenlerde ise kontrole oranla yaklaşık %8 ile %15 arasından değişen oranda daha düşük ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir.

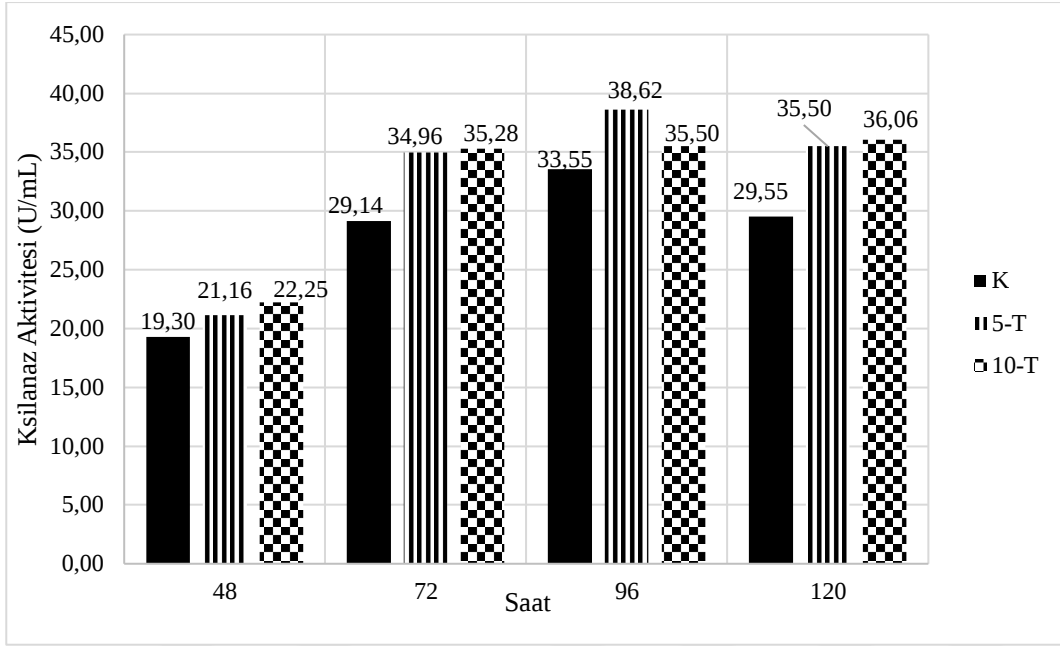
Elenmiş malt çimi ile yapılan üretimlerin 72. ve 96. saatlerinde, mikropartikül içeren erlenlerde kontrol grubuna göre %5 ila %20 arasında değişen oranda daha yüksek ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir. En yüksek ksilanaz aktivitesi 96. saatte 10 g/L Al_2O_3 mikropartikül konsantrasyonunda 20,94 U/mL olarak ölçülmüştür. Bu değer kontrol erlenlerinde elde edilen ksilanaz aktivitesinden %18,24 daha yüksektir.

4.1.7 Talc konsantrasyonu ve malt çimi ön işlem denemesi

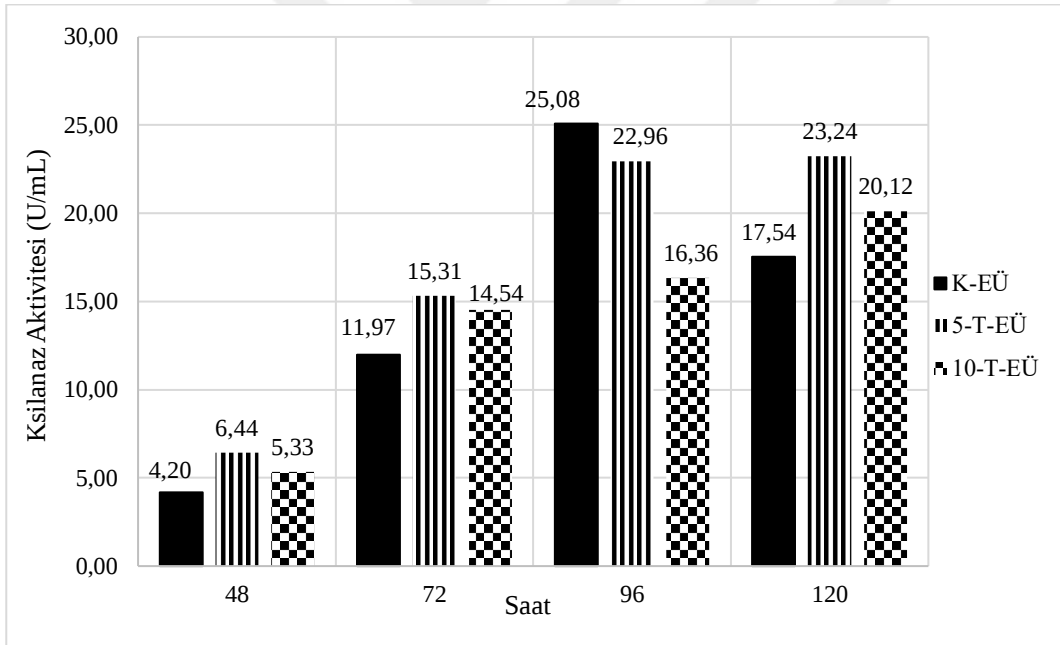
Bu denemede, Ön işlem uygulanan ve uygulanmayan malt çimi içeren besin ortamlarında, iki farklı Talc mikropartikül konsantrasyonunun ksilanaz enzimi üretimine etkisi incelenmiştir. İki paralel erlenden alınan örneklerin ksilanaz aktivite değerleri ortalaması U/mL olarak ve kontrol grubuna oranla aktivite artışları % üzerinden hesaplanarak Tablo 4-7’de verilmiştir. Çizilen grafikler Grafik 4-12 ve Grafik 4-13’te gösterilmiştir.

Tablo 4-7: Talc konsantrasyon ve malt çimi ön işlem denemesinden elde edilen enzim aktiviteleri

Örnek	Ksilanaz Aktivitesi							
	48.Saat		72.Saat		96.Saat		120.Saat	
	U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%
K	19,30	-	29,14	-	33,55	-	29,55	-
K-EÜ	4,20	-	11,97	-	25,08	-	17,54	-
5-T	21,16	9,64	34,96	19,97	38,62	15,11	35,50	20,14
5-T-EÜ	6,44	53,33	15,31	27,90	22,96	-8,45	23,24	32,50
10-T	22,25	15,28	35,28	21,07	35,50	5,81	36,06	22,03
10-T-EÜ	5,33	26,90	14,54	21,47	16,36	-34,77	20,12	14,71



Grafik 4-12: Talc konsantrasyon ve malt çimi ön işlem denemesi ksilanaz aktivitesi grafiği-I



Grafik 4-13: Talc konsantrasyon ve malt çimi ön işlem denemesi ksilanaz aktivitesi grafiği-II

Elenmemiş malt çimi ile yapılan üretimlerde Talc mikropartikülleri içeren tüm erlenlerde ksilanaz aktivitesi kontrol erlenlerine göre daha yüksek ölçülmüştür. En yüksek ksilanaz aktivitesi 96. saatte 38,62 U/mL olarak 5g/L Talc mikropartikülleri içeren erlenlerde elde edilmiştir. Bu aktivite değeri kontrol erlenlerindeki aktivite değerine oranla %15,11 daha yüksektir. Üretimin 120. saatinde ise 10 g/L Talc mikropartikülü konsantrasyonunda 36,06 U/mL ksilanaz

aktivitesi elde edilmiştir. Bu değer aynı saatte kontrol erlenlerinden elde edilen ksilanaz aktivitesine oranla %22,03 daha yüksektir.

Elenmiş malt çimi ile yapılan üretimlerde en yüksek ksilanaz aktivitesine 96. saatte 25,08 U/mL ile kontrol erlenlerinde ulaşılmıştır. Diğer saatlerde Talc mikropartikülleri içeren erlenlerde kontrol erlenlerine oranla daha yüksek ksilanaz aktivitesine ulaşılmıştır. Üretimin 120. saatinde 5 g/L Talc mikropartikülü içeren erlenlerde 23,24 U/mL ile aynı saatteki kontrol erlenlerine oranla %32,5 daha yüksek ksilanaz aktivitesine ulaşılmıştır.

Erlen denemelerinde Al_2O_3 ve Talc mikropartikülleri kullanılarak ksilanaz aktivitesinde beklenen seviyede artış sağlanamamıştır. Ksilanaz aktivitelerindeki fark kontrol erlenlerine oranla ~5 U/mL seviyesindedir. Bazı durumlarda kontrol erlenleri ve mikropartikül içeren erlenlerde çok yakın ksilanaz aktiviteleri, bazı durumlarda ise mikropartikül içeren erlenlerde daha düşük ksilanaz aktiviteleri elde edilmiştir. Üretim ortamlarına eklenen mikropartiküllerin beklenen olumlu etkiyi gösterememesinin nedenleri olarak; malt çimi partiküllerinin Al_2O_3 ve Talc mikropartiküllerinin etkisini azalttığı ve erlenlerin çalkalayıcıdaki karışma düzeninin uygun olmadığı düşünülmektedir.

4.2 Biyoreaktör Denemeleri

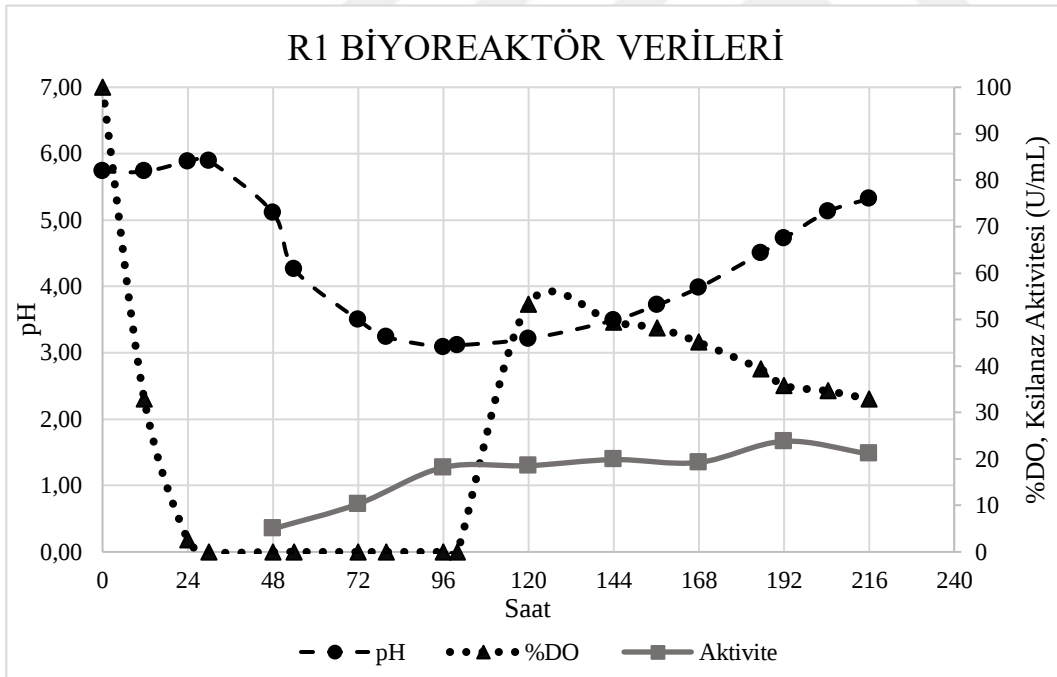
Biyoreaktör denemelerinin üretim koşulları “3.2.6 Biyoreaktör denemeleri” başlığında açıklanmıştır. Biyoreaktör denemelerinin bulgularında: Mikropartikül içermeyen biyoreaktör denemeleri R1 ve R4 olarak, Al_2O_3 mikropartikülü içeren biyoreaktör denemeleri R2, R5 ve R7 olarak, Talc mikropartikülü içeren biyoreaktör denemeleri R3, R6 ve R8 olarak açıklanmıştır (Bkz Tablo 3-9).

4.2.1 Mikropartikül içermeyen biyoreaktör denemeleri

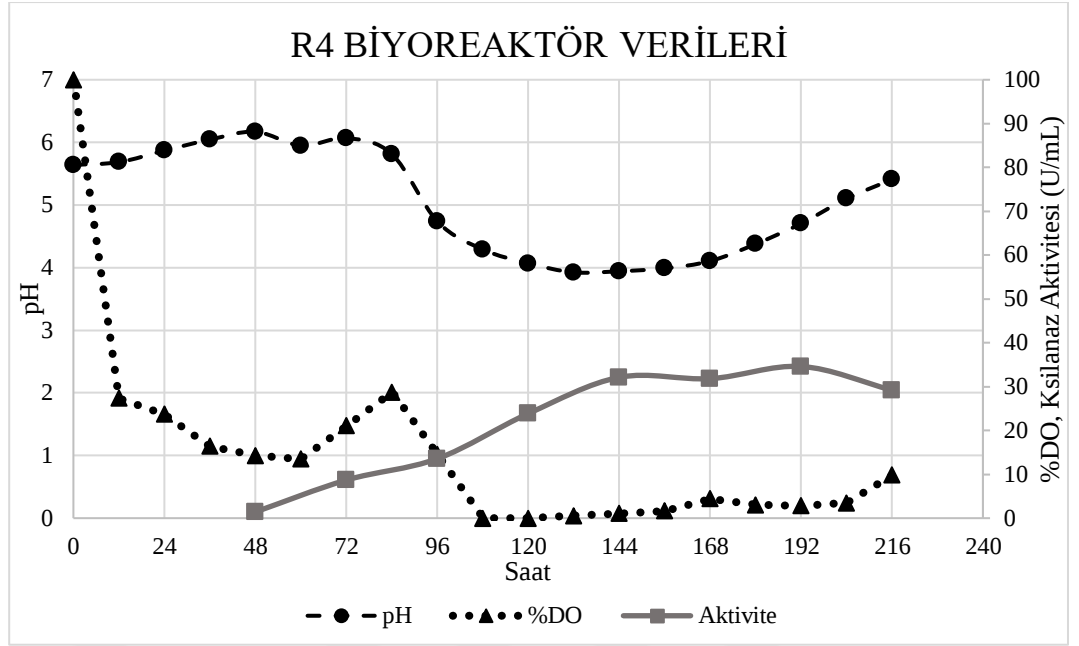
R1 ve R4 üretimlerinden 48.saatten başlanarak 216.saat sonuna kadar 24 saat arayla 20 mL örnek alınmıştır. Alınan örneklerden elde edilen ksilanaz aktivite değerleri Tablo 4-8’de verilmiştir. R1 ve R4 üretimlerinin Aktivite-Zaman, pH-Zaman ve Çözünmüş oksijen(%DO)-Zaman grafikleri çizilmiş (Grafik 4-14 ve Grafik 4-15) ve iki üretimin karşılaştırmalı enzim aktivite grafiği Grafik 4-16’da verilmiştir.

Tablo 4-8: R1 ve R4 denemelerinden elde edilen aktivite değerleri

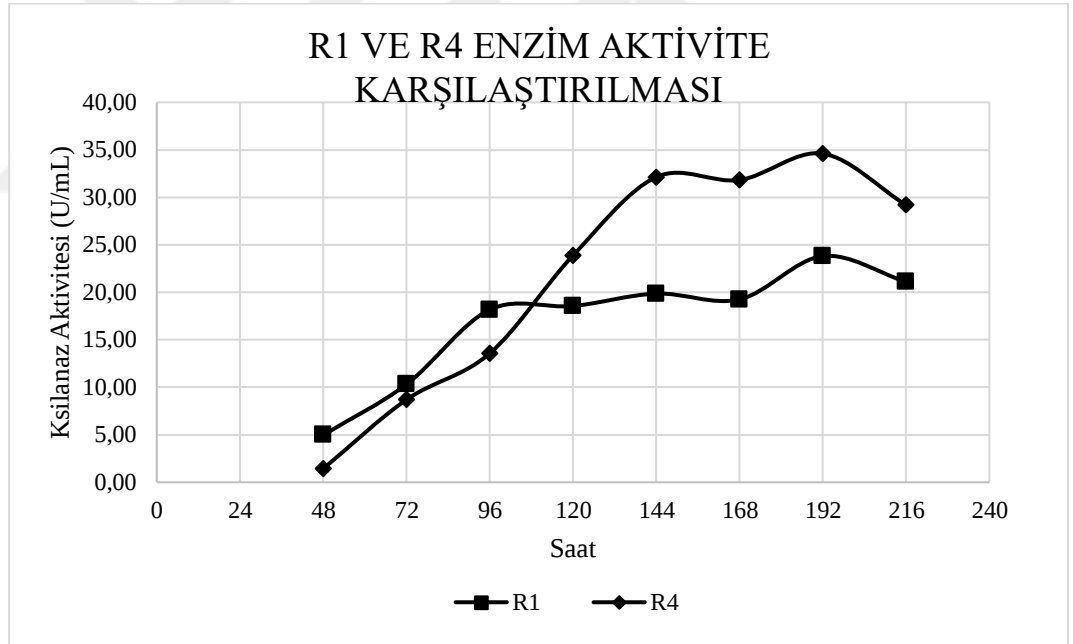
Saat	Ksilanaz Aktivitesi (U/mL)	
	R1	R4
48	4,98	1,44
72	10,32	8,71
96	18,18	13,58
120	18,56	23,88
144	19,87	32,14
168	19,26	31,83
192	23,81	34,60
216	21,11	29,19



Grafik 4-14: R1 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği



Grafik 4-15: R4 pH, %DO, ksılanaz aktivite verileri grafiği



Grafik 4-16: R1 ve R4 karşılaştırmalı enzim aktivite grafiği

Al_2O_3 veya Talc mikropartikülü ilave edilmeyen R1 kodlu biyoreaktör üretiminde partikül boyutu 0,75 milimetreden büyük malt çimi, R4 kodlu biyoreaktör üretiminde ise elenmemiş malt çimi kullanılmıştır. R1 kodlu biyoreaktör üretiminde ksılanaz aktivitesi en yüksek değeri olan 23,81 U/mL'ye 192.saatte ulaşmıştır. R4 kodlu biyoreaktör üretiminde ise en yüksek ksılanaz

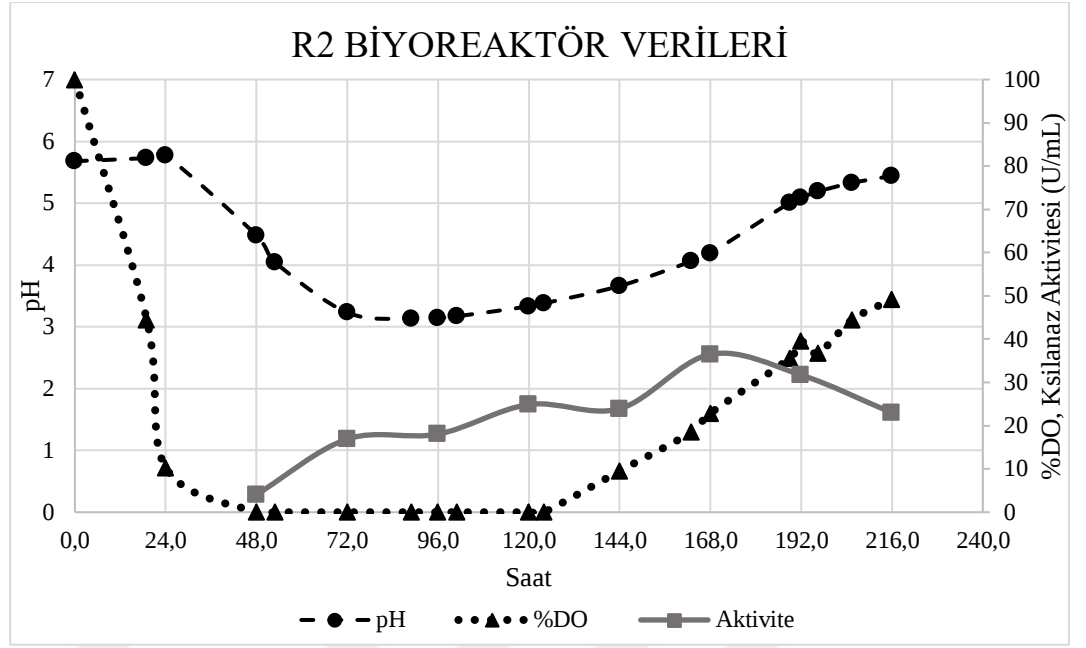
aktivitesi 216.saatte 37,33 U/mL olarak bulunmuştur. R4 kodlu biyoreaktör üretiminde, R1 kodlu biyoreaktör üretiminden %57 daha fazla ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir. Erlen üretimlerinde olduğu gibi, büyük malt çimi partiküllerinde selülozik yapıların daha fazla olduğu ve bu nedenle ksilan açısından daha zengin olan R4 kodlu üretimin daha yüksek ksilanaz aktivitesine ulaştığı düşünülmektedir.

4.2.2 Al₂O₃ mikropartikülleri içeren biyoreaktör denemeleri

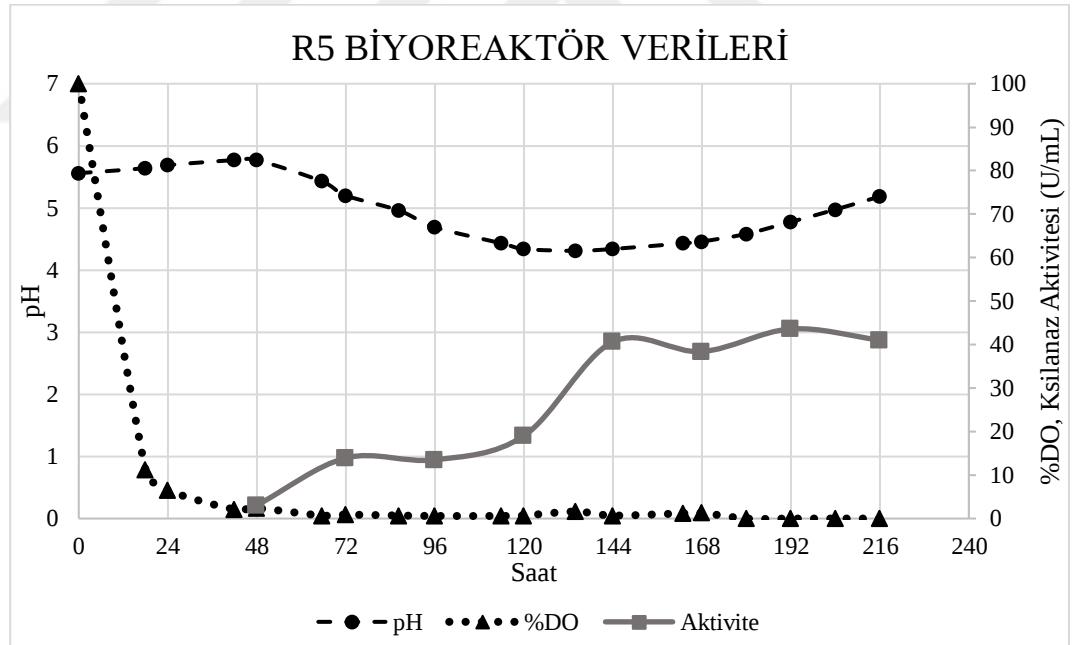
R2, R5 ve R7 üretimlerinden 48.saatten başlanarak 216.saate kadar 24 saat aryla 20 mL örnek alınmıştır. Alınan örneklerden elde edilen ksilanaz aktivite değerleri Tablo 4-9’da verilmiştir. R2, R5 ve R7 üretimlerinin Aktivite-Zaman, pH-Zaman ve Çözünmüş oksijen(%DO)-Zaman grafikleri çizilmiş (Grafik 4-17, Grafik 4-18 ve Grafik 4-19) ve 3 üretimin karşılaştırmalı enzim aktivite grafiği Grafik 4-20’de verilmiştir.

Tablo 4-9: R2,R5 ve R7 denemelerinden elde edilen aktivite değerleri

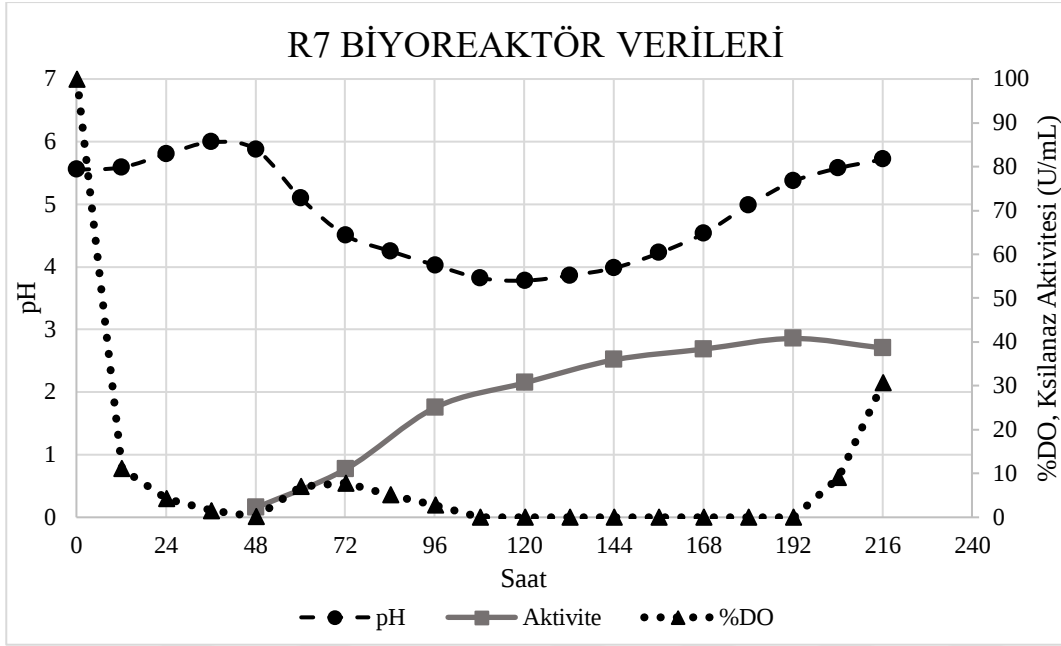
Saat	Ksilanaz Aktivitesi (U/mL)		
	R2	R5	R7
48	4,08	3,05	2,22
72	16,90	13,93	10,98
96	18,05	13,50	25,05
120	24,89	19,00	30,68
144	23,92	40,63	35,93
168	36,50	38,40	38,37
192	31,71	43,60	40,80
216	22,98	41,05	38,62



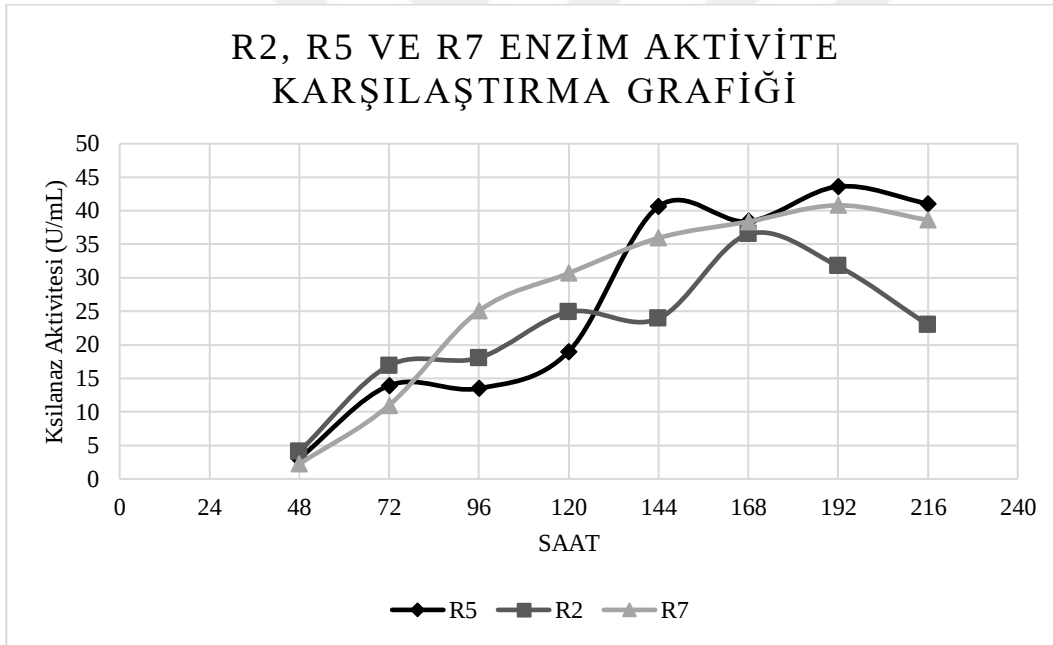
Grafik 4-17: R2 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği



Grafik 4-18: R5 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği



Grafik 4-19: R7 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği



Grafik 4-20: R2, R5 ve R7 karşılaştırmalı enzim aktivite grafiği

Elenmiş malt çimi kullanılan R2 kodlu biyoreaktör üretiminde ksilanaz aktivitesi en yüksek değeri olan 36,50 U/mL'ye 168.saatte ulaşmıştır. Elenmemiş malt çimi kullanılan R5 kodlu biyoreaktör üretiminde en yüksek ksilanaz aktivitesi 192.saatte 43,60 U/mL, R7 kodlu biyoreaktör üretiminde en yüksek ksilanaz aktivitesi ise 40,80 U/mL olarak bulunmuştur. 10 g/L Al_2O_3 mikropartikül konsantrasyonu içeren R5 kodlu üretimde ksilanaz aktivitesinin, 5 g/L Al_2O_3

mikropartikül konsantrasyonu içeren R7 kodlu üretimden yaklaşık %7 daha yüksek olduğu görülmüştür.

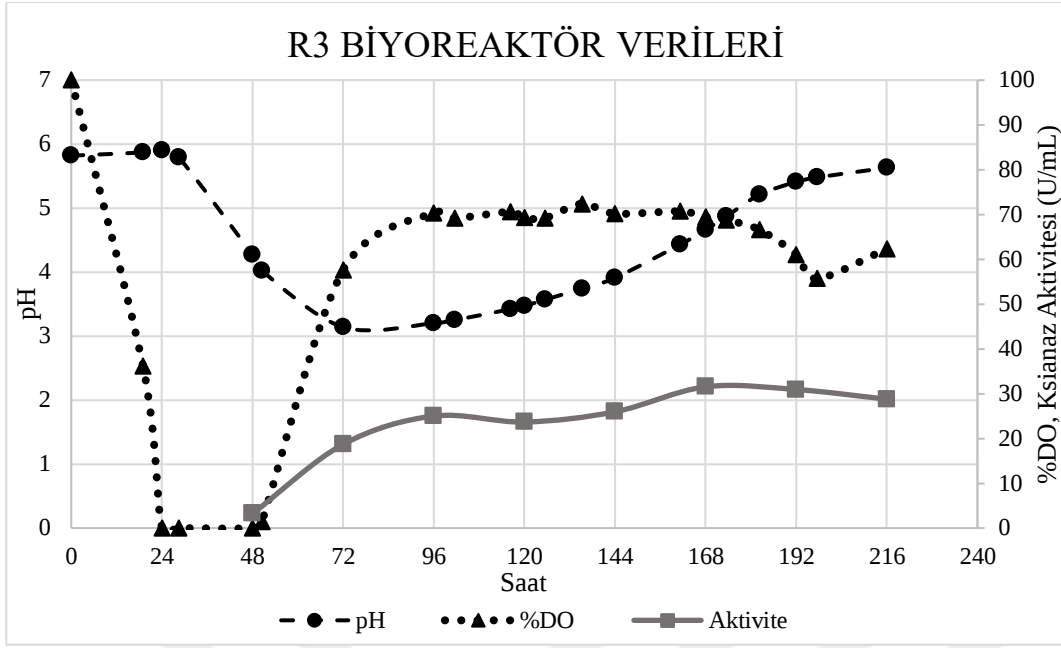
Erlen ve mikropartikülsüz biyoreaktör üretimlerinde olduğu gibi, 0,75 mm'den büyük malt çimi partikülleri ile yapılan üretimler ksilanaz aktivitesi açısından geride kalmıştır. Mikropartikülsüz biyoreaktör denemelerinde elenmiş (0,75mm'den büyük) ve elenmemiş malt çimiyle yapılan üretimler (R1 ve R4) arasında ksilanaz aktivitesi açısından %56 oranında bir fark bulunmaktadır. Ancak 10 g/L Al_2O_3 mikropartiküllerinin ilave edildiği, elenmiş ve elenmemiş malt çimiyle yapılan biyoreaktör üretimlerinde (R2 ve R5) ksilanaz aktivitesi farkı %19'a gerilemiştir. Bu sonuca göre, Al_2O_3 mikropartiküllerinin elenmiş malt çimi içeren ortamda daha olumlu etki ettiği düşünülmektedir.

4.2.3 Talc mikropartikülleri içeren biyoreaktör denemeleri

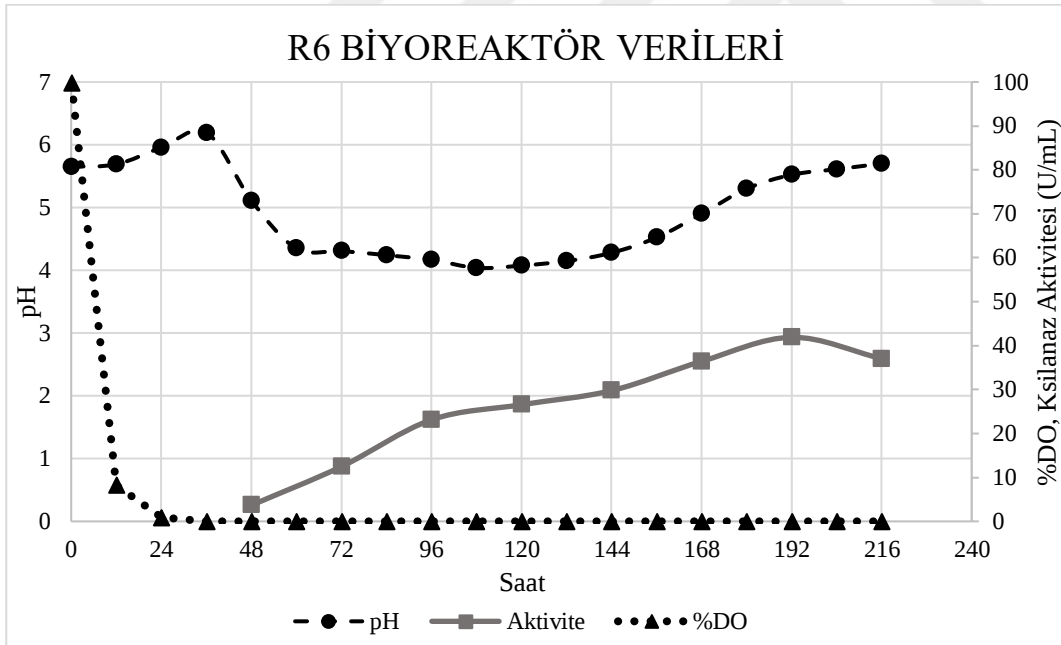
R3, R6 ve R8 üretimlerinden 48.saatten başlanarak 216.saat sonuna kadar 24 saat arayla 20 mL örnek alınmıştır. Alınan örneklerden elde edilen enzim aktivite değerleri Tablo 4-10'da verilmiştir. R3, R6 ve R8 üretimlerinin Aktivite-Zaman, pH-Zaman ve Çözünmüş oksijen(%DO)-Zaman grafikleri çizilmiş (Grafik 4-21, Grafik 4-22 ve Grafik 4-23) ve 3 üretimin karşılaştırmalı grafiği Grafik 4-24'de verilmiştir.

Tablo 4-10: R3,R6 ve R8 denemelerinden elde edilen aktivite değerleri

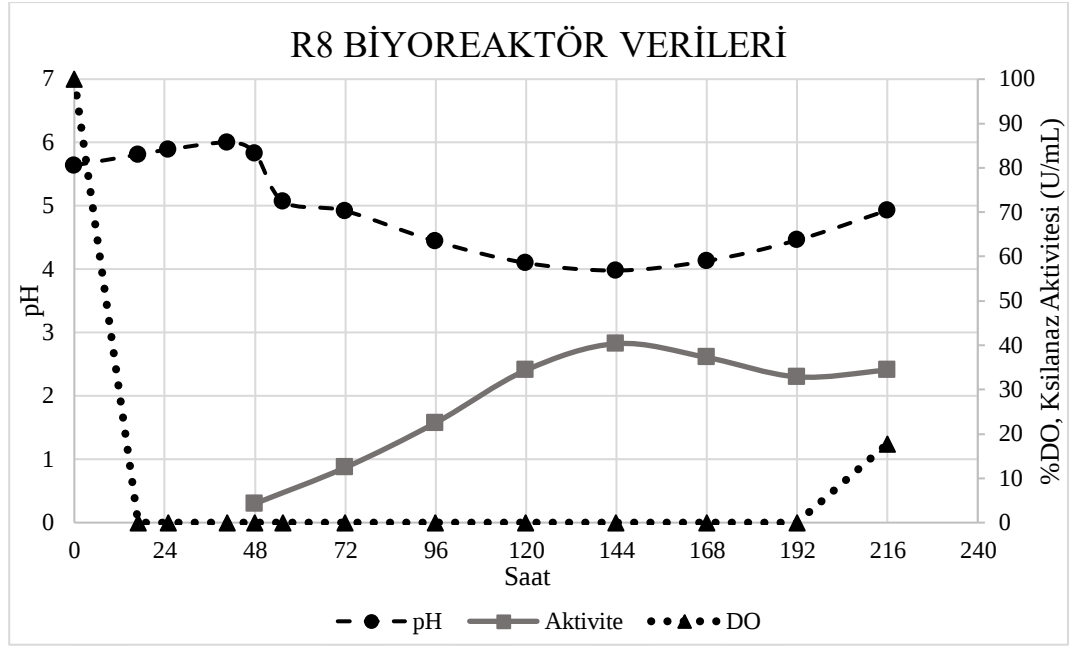
Saat	Ksilanaz Aktivitesi (U/mL)		
	R3	R6	R8
48	3,23	3,70	4,29
72	18,69	12,49	12,43
96	25,01	23,14	22,53
120	23,68	26,56	34,39
144	25,96	29,77	40,36
168	31,54	36,43	37,26
192	30,93	41,89	32,87
216	28,78	37,01	34,39



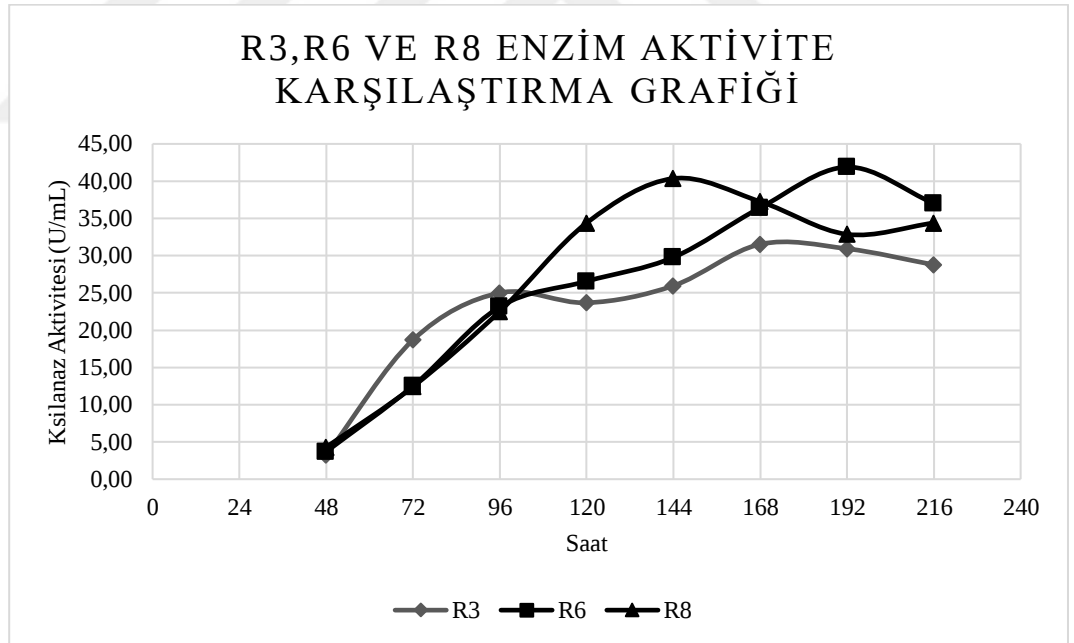
Grafik 4-21: R3 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği



Grafik 4-22: R6 pH, %DO, ksilanaz aktivite verileri grafiği



Grafik 4-23: R8 pH, %DO, ksılanaz aktivite verileri grafiği



Grafik 4-24: R3,R6 ve R8 karşılaştırmalı enzim aktivite grafiği

Elenmiş malt çimi kullanılan R3 kodlu biyoreaktör üretiminde ksılanaz aktivitesi en yüksek değeri olan 31,54 U/mL'ye 168.saatte ulaşmıştır. Elenmemiş malt çimi kullanılan R6 kodlu biyoreaktör üretiminde en yüksek ksılanaz aktivitesi 192.saatte 41,89 U/mL, R8 kodlu biyoreaktör üretiminde ise en yüksek ksılanaz

aktivitesi 144. saatte 40,36 U/mL olarak bulunmuştur. 10 g/L Talc mikropartikül konsantrasyonu içeren R6 kodlu üretimde ksilanaz aktivitesinin, 5 g/L Talc mikropartikül konsantrasyonu içeren R8 kodlu üretimden yaklaşık %4 daha yüksek olduğu görülmüştür.

Önceki erlen ve biyoreaktör üretimlerinde olduğu gibi, 0,75 mm'den büyük malt çimi partikülleri ile yapılan üretimler ksilanaz aktivitesi açısından geride kalmıştır. 10 g/L Talc mikropartiküllerinin ilave edildiği elenmemiş malt çimiyle yapılan biyoreaktör üretiminde, elenmiş malt çimiyle (0,75mm'den büyük) yapılan biyoreaktör üretiminden %33 daha fazla ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir. Bu fark mikropartikülsüz biyoreaktör denemelerinde %56 oranındadır. Bu sonuca göre, elenmiş ve elenmemiş malt çimiyle yapılan üretimler arasındaki ksilanaz aktivitesi farkının azalmasının, Talc mikropartiküllerinin etkisiyle olduğu düşünülmektedir.

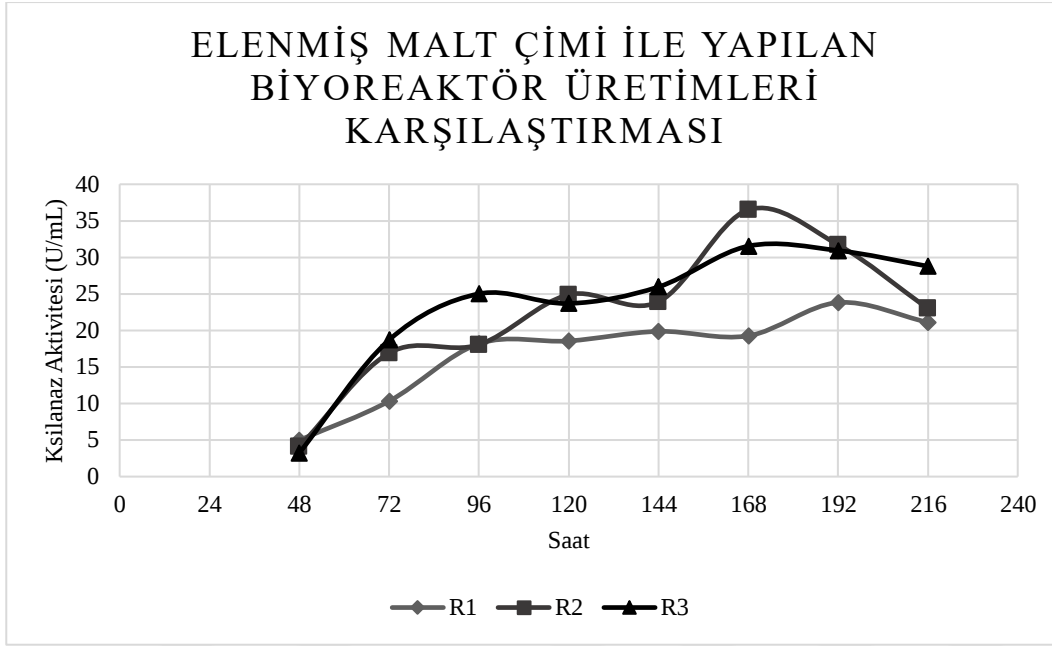
Biyoreaktör üretimlerinin kendi içinde farklı şekillerde karşılaştırılmasına yönelik çeşitli grafikler çizilmiştir. Biyoreaktör üretimleri aktivite karşılaştırması Tablo 4-11'de verilmiştir. R2 ve R3 denemelerinde R1; R5, R6, R7 ve R8 denemelerinde ise R4 kontrol grubu olarak kabul edildiğinde enzim aktivitelerinde kontrol grubuna oranla meydana gelen aktivite artışları % olarak hesaplanmış ve Tablo 4-12'de verilmiştir. Biyoreaktör denemelerine ait çeşitli karşılaştırma grafikleri Grafik 4-25 ve Grafik 4-26'da verilmiştir.

Tablo 4-11: Biyoreaktör üretimlerinden elde edilen enzim aktivitesi karşılaştırmaları

Saat	Ksilanaz Aktivitesi (U/mL)							
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
48	4,98	4,08	3,23	1,44	3,05	3,70	2,22	4,29
72	10,32	16,90	18,69	8,71	13,93	12,49	10,98	12,43
96	18,18	18,05	25,01	13,58	13,50	23,14	25,05	22,53
120	18,56	24,89	23,68	23,88	19,00	26,56	30,68	34,39
144	19,87	23,92	25,96	32,14	40,63	29,77	35,93	40,36
168	19,26	36,50	31,54	31,83	38,40	36,43	38,37	37,26
192	23,81	31,71	30,93	34,60	43,60	41,89	40,80	32,87
216	21,11	22,98	28,78	29,19	41,05	37,01	38,62	34,39

Tablo 4-12: Ksilanaz enzim aktivitesi %artış verileri

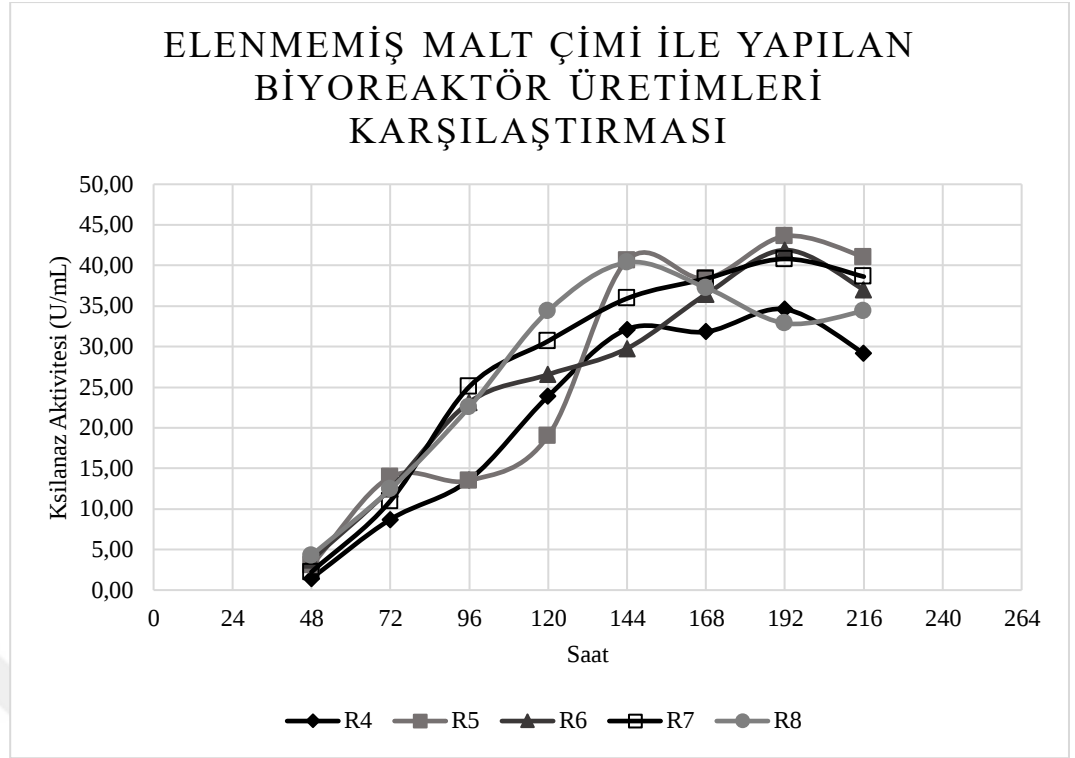
Saat	Ksilanaz Aktivitesi % Artışı					
	R2	R3	R5	R6	R7	R8
48	-18,07	-35,14	111,81	156,94	54,17	197,92
72	63,76	81,10	59,93	43,40	26,06	42,71
96	-0,72	37,57	-0,59	70,40	84,46	65,91
120	34,11	27,59	-20,44	11,22	28,48	44,01
144	20,38	30,65	26,42	-7,37	11,79	25,58
168	89,51	63,76	20,64	14,45	20,55	17,06
192	33,18	29,90	26,01	21,07	17,92	-5,00
216	8,86	36,33	40,63	26,79	32,31	17,81



Grafik 4-25: R1, R2 ve R3 enzim aktivitesi karşılaştırma grafiği

Elenmiş malt çimi (0,75mm'den büyük) ile yapılan üretimlerde 10 g/L Al_2O_3 ve Talc mikropartikülleri içeren biyoreaktörlerden, mikropartikül içermeyen biyoreaktöre göre daha yüksek ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir. Al_2O_3 mikropartikülleri içeren üretimdeki en yüksek ksilanaz aktivitesi, mikropartikül içermeyen üretimdeki en yüksek ksilanaz aktivitesi ile karşılaştırıldığında (R1 için 192. saat 23,81 U/mL, R2 için 168. saat 36,5 U/mL) %53 oranında daha yüksektir. Talc mikropartikülleri içeren üretimde ise mikropartikül içermeyen üretimle karşılaştırıldığında (R1 için 192. Saat 23,81 U/mL, R3 için 168. 31,54 U/mL) ksilanaz aktivitesi %32 daha yüksektir.

Bu sonuçlar incelendiğinde elenmiş malt çimi ile yapılan biyoreaktör üretimlerinde ortama mikropartikül ilavesinin ksilanaz aktivitesini olumlu yönde etkilediği görülmektedir. 10 g/L konsantrasyonda, Al_2O_3 mikropartikülleri Talc mikropartiküllerine oranla ksilanaz aktivitesi üzerinde daha olumlu etki göstermiştir. Ayrıca mikropartikül ilave edilen biyoreaktör üretimlerinde ksilanaz aktivitesi 168. saat yakınlarında en yüksek ksilanaz aktivitesi değerine ulaşırken kontrol üretiminde en yüksek ksilanaz aktivitesine 192. saat yakınlarında ulaşılmaktadır. Daha yüksek ksilanaz aktivitesine daha erken saatlerde ulaşılması iyi bir avantaj olarak nitelendirilebilir.



Grafik 4-26: R4, R5, R6, R7 ve R8 enzim aktivitesi karşılaştırma grafiği

Elenmemiş malt çimi ile yapılan üretimlerde 5 ve 10 g/L Al_2O_3 ve Talc mikropartikülleri içeren biyoreaktörlerden, mikropartikül içermeyen biyoreaktöre göre daha yüksek ksılanaz aktivitesi elde edilmiştir. 10 g/L Al_2O_3 mikropartikülleri içeren üretimdeki en yüksek ksılanaz aktivitesi, mikropartikül içermeyen üretimdeki en yüksek ksılanaz aktivitesi ile karşılaştırıldığında (R4 için 192. saat 34,60 U/mL, R5 için 192. saat 43,60 U/mL) %26 oranında daha yüksektir. 5 g/L Al_2O_3 mikropartikülleri içeren üretimdeki en yüksek ksılanaz aktivitesi, mikropartikül içermeyen üretimdeki en yüksek ksılanaz aktivitesi ile karşılaştırıldığında (R4 için 192. saat 34,60 U/mL, R7 için 192. saat 40,80 U/mL) %18 oranında daha yüksektir.

10 g/L Talc mikropartikülleri içeren üretimdeki en yüksek ksılanaz aktivitesi, mikropartikül içermeyen üretimdeki en yüksek ksılanaz aktivitesi ile karşılaştırıldığında (R4 için 192. saat 34,60 U/mL, R6 için 192. saat 41,89 U/mL) %21 oranında daha yüksektir. 5 g/L Talc mikropartikülleri içeren üretimdeki en yüksek ksılanaz aktivitesi, mikropartikül içermeyen üretimdeki en yüksek ksılanaz aktivitesi ile karşılaştırıldığında (R4 için 192. saat 34,60 U/mL, R8 için 144. saat 40,36 U/mL) %17 oranında daha yüksektir.

Elenmiş (0,75mm'den büyük) ve elenmemiş malt çimi ile yapılan biyoreaktör üretimlerinin ksilanaz aktiviteleri incelendiğinde, Al_2O_3 ve Talc mikropartiküllerinin enzim aktivitesine etkisinin, elenmiş malt çimi içeren ortamda daha fazla olduğu net bir şekilde görülmektedir. Elenmiş malt çimi ile yapılan biyoreaktör üretimlerinde üretim ortamına 10 g/L konsantrasyonda Al_2O_3 mikropartiküllerinin eklenmesi ksilanaz aktivitesini %53 arttırmıştır. Elenmemiş malt çimi ile yapılan biyoreaktör üretimlerinde ise 10 g/L konsantrasyonda Al_2O_3 mikropartiküllerinin eklenmesi ksilanaz aktivitesini %26 oranında arttırabilmiştir. Elenmiş malt çimi ile yapılan üretimlerde malt çiminden gelen partikül miktarının, elenmemiş malt çimi ile yapılan üretimlerde malt çiminden gelen partikül miktarından daha az olduğu söylenebilir. Daha çok malt çimi partikülünün olmasının, elenmemiş malt çimi içeren üretimlerde mikropartiküllerin etkilerini azalttığı ve aradaki bu farkın oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Elenmiş malt çiminin (0,75mm'den büyük) kullanıldığı mikropartikül içeren üretimlerde, en yüksek ksilanaz aktivitelerine ulaştıkları noktalar karşılaştırıldığında (R2 için 168. saat 36,50 U/mL, R3 için 168. saat 31,54 U/mL) Al_2O_3 mikropartiküllerinin kullanıldığı üretimde Talc mikropartiküllerinin kullanıldığı üretime kıyasla %16 daha yüksek ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir.

Elenmemiş malt çiminin (0,75mm'den büyük) kullanıldığı 10 g/L mikropartikül içeren üretimlerde, en yüksek ksilanaz aktivitelerine ulaştıkları noktalar karşılaştırıldığında (R5 için 192. saat 43,60 U/mL, R6 için 192. saat 41,89 U/mL) Al_2O_3 mikropartiküllerinin kullanıldığı üretimde Talc mikropartiküllerinin kullanıldığı üretime kıyasla %4 daha yüksek ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir. 5 g/L mikropartikül içeren üretimlerde ise, en yüksek ksilanaz aktivitelerine ulaştıkları noktalar karşılaştırıldığında (R7 için 192. saat 40,80 U/mL, R8 için 144. saat 40,36 U/mL) Al_2O_3 mikropartiküllerinin kullanıldığı üretimde Talc mikropartiküllerinin kullanıldığı üretime kıyasla %1 daha yüksek ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir.

Al_2O_3 mikropartiküllerinin 5 ve 10 g/L konsantrasyonlarında kullanıldığı biyoreaktör üretimlerinin en yüksek ksilanaz aktiviteleri karşılaştırıldığında (R5 43,60 U/mL, R7 40,80 U/mL) birbirlerine çok yakın olduğu görülmektedir. 10 g/L Al_2O_3 mikropartikül konsantrasyonundaki en yüksek ksilanaz aktivitesi 5 g/L Al_2O_3

mikropartikül konsantrasyonundaki en yüksek ksilanaz aktivitesinden %7 daha yüksektir.

Talc mikropartiküllerinin 5 ve 10 g/L konsantrasyonlarında kullanıldığı biyoreaktör üretimlerinde en yüksek ksilanaz aktivite değerleri (R6 41,89 U/mL, R8 40,36 U/mL) arasında önemli bir fark görülmemektedir. 10 g/L Talc mikropartikül konsantrasyonundaki en yüksek ksilanaz aktivitesi 5 g/L Talc mikropartikül konsantrasyonundaki en yüksek ksilanaz aktivitesinden %4 daha yüksektir.

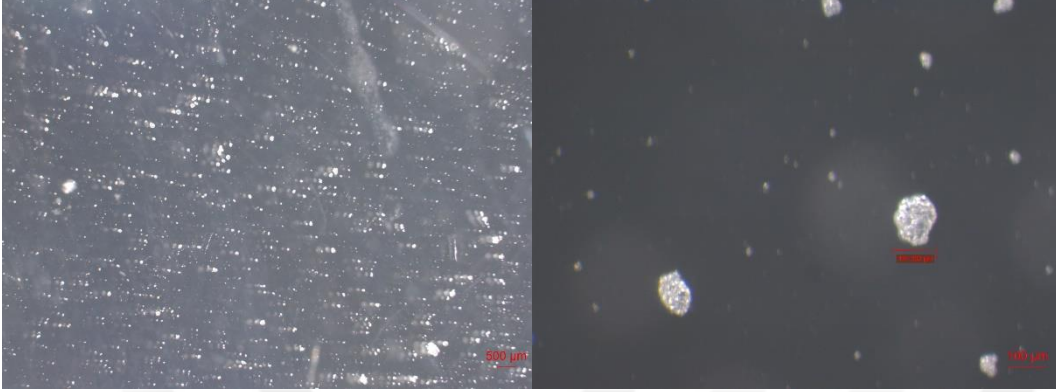
Biyoreaktör denemelerinde Al_2O_3 ve Talc mikropartikülleri kullanılarak erlen denemelerine göre daha fazla ksilanaz aktivitesi artışı sağlanmıştır. Biyoreaktör denemelerinde, mikropartiküllerin etkisinin erlen üretimlerine göre daha iyi olmasının sebebi olarak, daha etkin karıştırma ve havalandırma düzeni olması düşünülmektedir.

4.3 Biyoreaktör Örnekleri ve Mikropartiküllerin Mikroskopta Görüntülenmesi

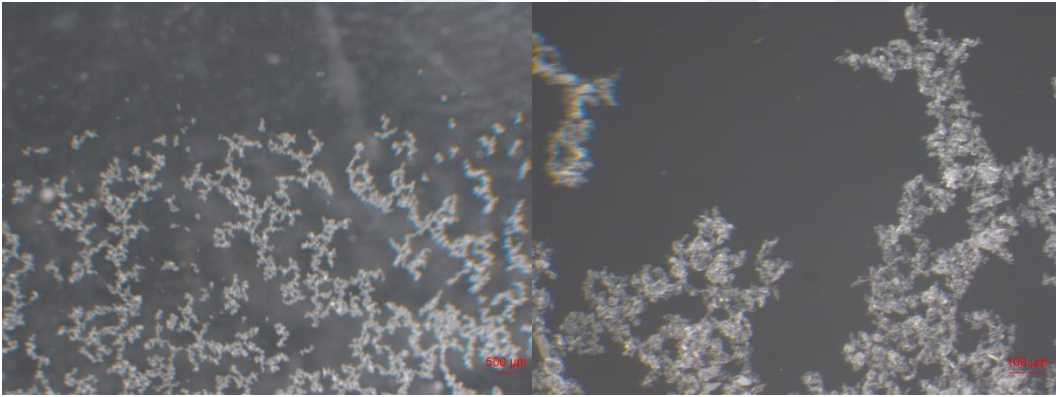
“3.2.8 Biyoreaktör örneklerinin mikroskopta görüntülenmesi” başlığında anlatıldığı şekilde biyoreaktör örneklerinin ve çalışmada kullanılan mikropartiküllerin (Al_2O_3 ve Talc) stereo mikroskop altında görüntüleri kaydedilmiştir.

4.3.1 Mikropartiküllerin stereo mikroskop görüntüleri

Kaydedilen Al_2O_3 görüntüleri Şekil 4-1, Talc görüntüleri Şekil 4-2’de verilmiştir.



Şekil 4-1: Al_2O_3 mikroskop görüntüleri (solda 10X, sağda 100X büyütme)



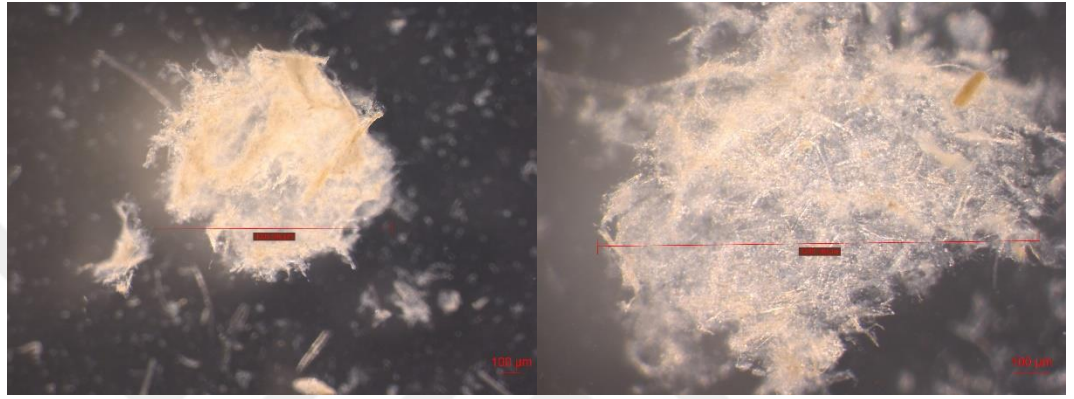
Şekil 4-2: Talc mikroskop görüntüleri (solda 10X, sağda 100X büyütme)

Görüntülerden anlaşılabileceği gibi, Al_2O_3 mikropartikülleri $120\ \mu\text{m}$ 'ye kadar ulaşabilen heterojen partikül çaplarıyla, Talc mikropartiküllerine oranla daha büyüktür ve statik ortamda kümelenme oluşturmamışlardır.

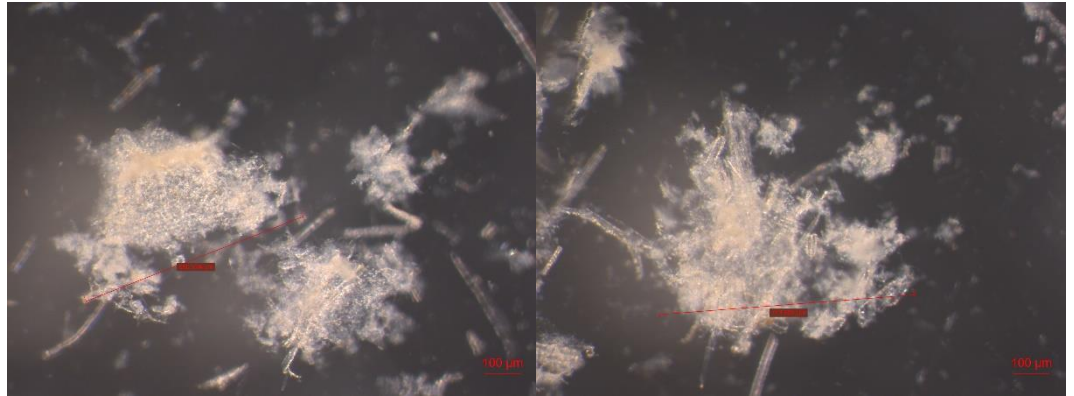
Talc mikropartikülleri statik ortamda kümelenmeler oluşturmuşlardır ve Al_2O_3 mikropartiküllerine oranla boyutları oldukça küçüktür. Stereo mikroskopta kullanılan büyütme oranlarıyla Talc mikropartiküllerinin boyutları hakkında bir veriye ulaşılammıştır.

4.3.2 Biyoreaktör örneklerinin stereo mikroskop görüntüleri

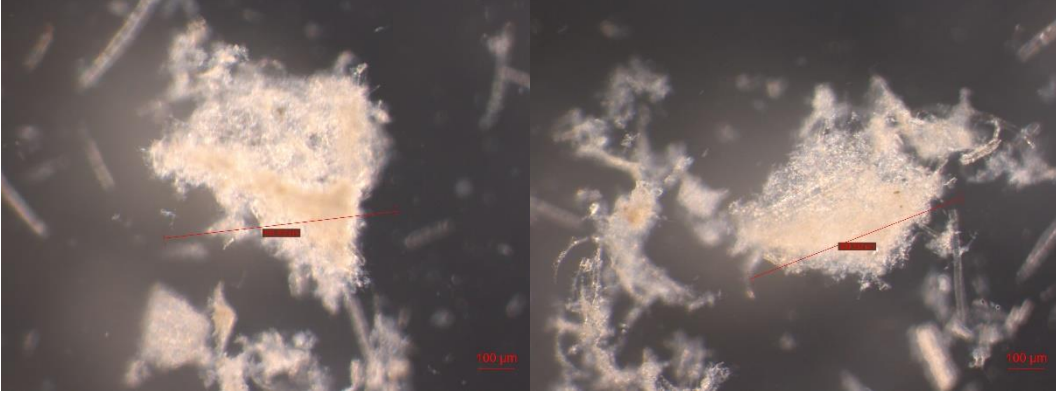
R1 üretimine ait görüntüler Şekil 4-3:Şekil 4-7, R2 üretimine ait görüntüler Şekil 4-8:Şekil 4-12, R3 üretimine ait görüntüler Şekil 4-13:Şekil 4-17, R4 üretimine ait görüntüler Şekil 4-18:Şekil 4-22, R5 üretimine ait görüntüler Şekil 4-23:Şekil 4-27, R6 üretimine ait görüntüler Şekil 4-28:Şekil 4-32, R7 üretimine ait görüntüler Şekil 4-33: Şekil 4-37 ve R8 üretimine ait görüntüler Şekil 4-38:Şekil 4-42 aralığında verilmiştir.



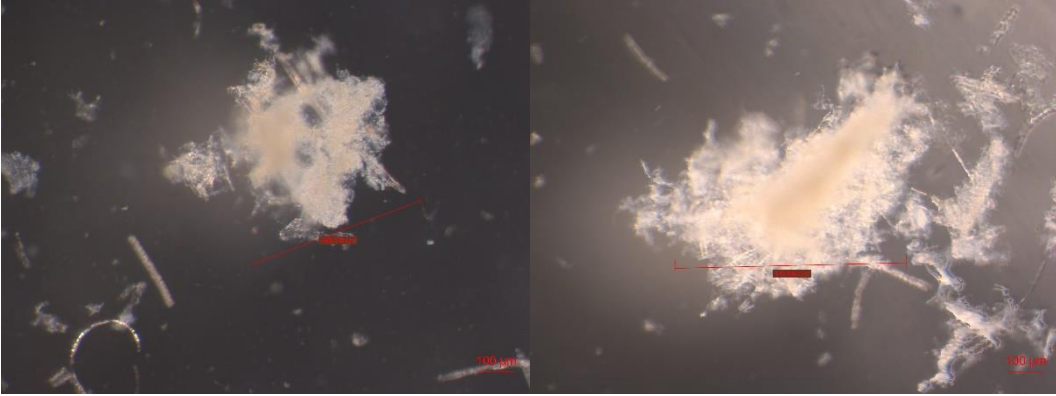
Şekil 4-3: R1 120.saat mikroskop görüntüleri (solda 50X 1335µm, sağda 100X büyütme 1233µm)



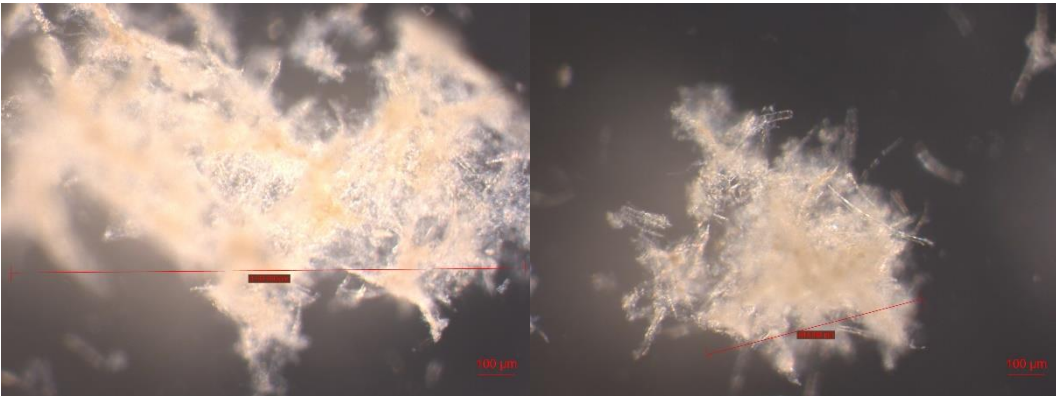
Şekil 4-4: R1 144.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 650 µm, sağda 714 µm)



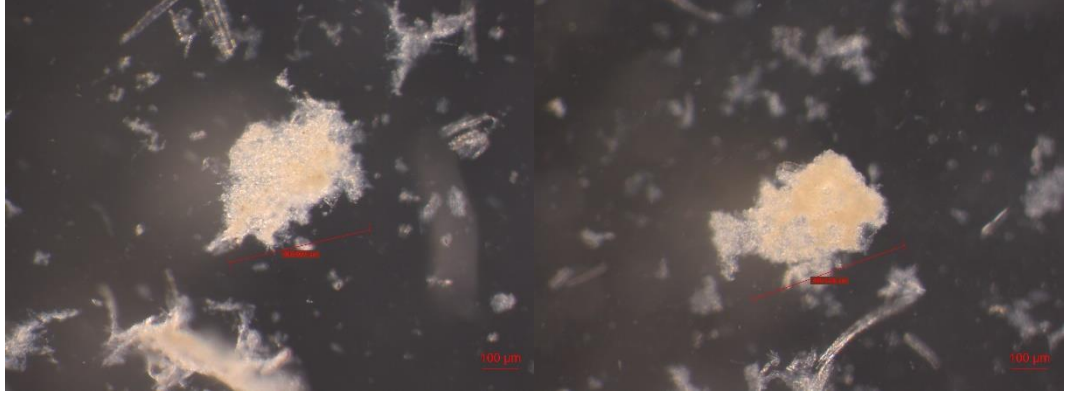
Şekil 4-5: R1 168.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 651 μm , sağda 629 μm)



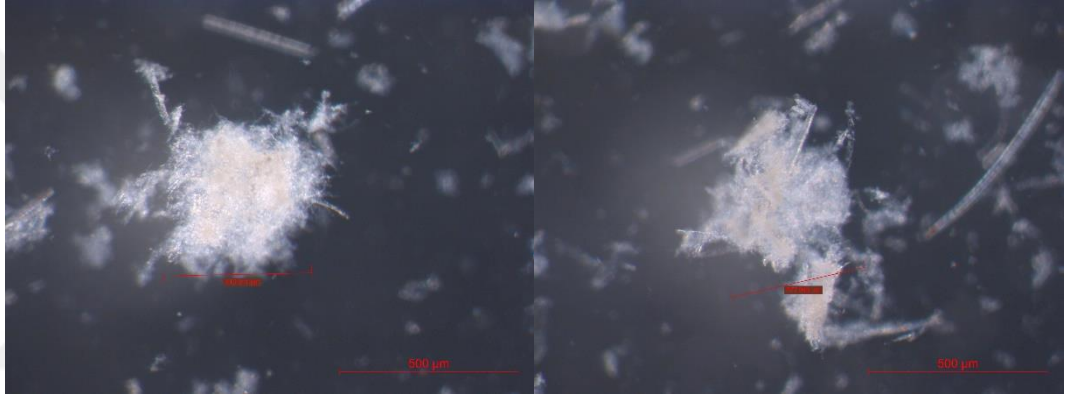
Şekil 4-6: R1 192.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 495 μm , sağda 642 μm)



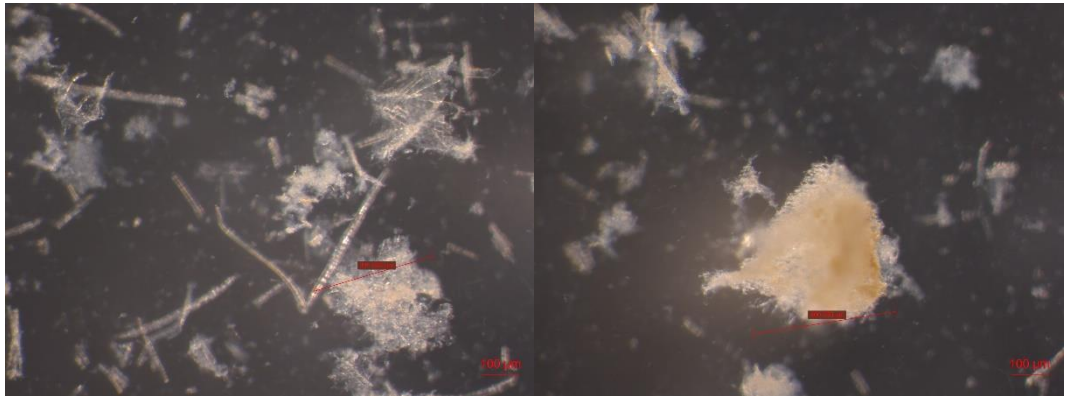
Şekil 4-7: R1 216.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 1432 μm , sağda 619 μm)



Şekil 4-8: R2 120.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 406 μm , sağda 450 μm)



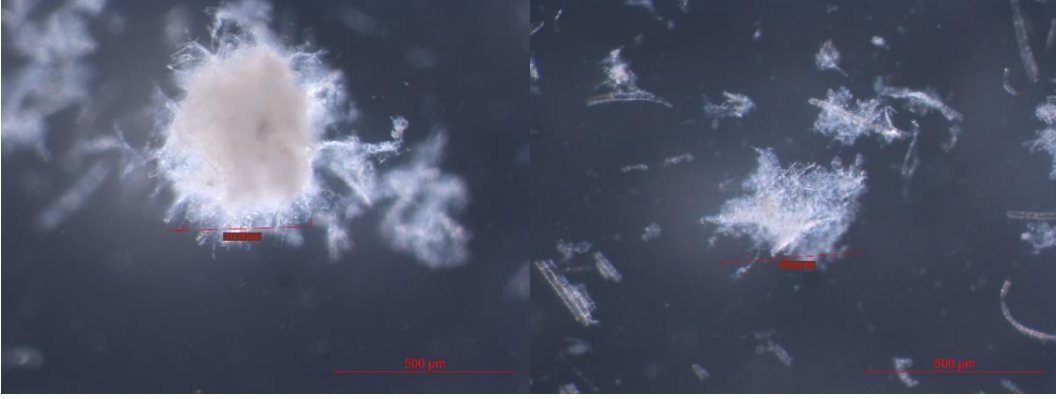
Şekil 4-9: R2 144.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 415 μm , sağda 378 μm)



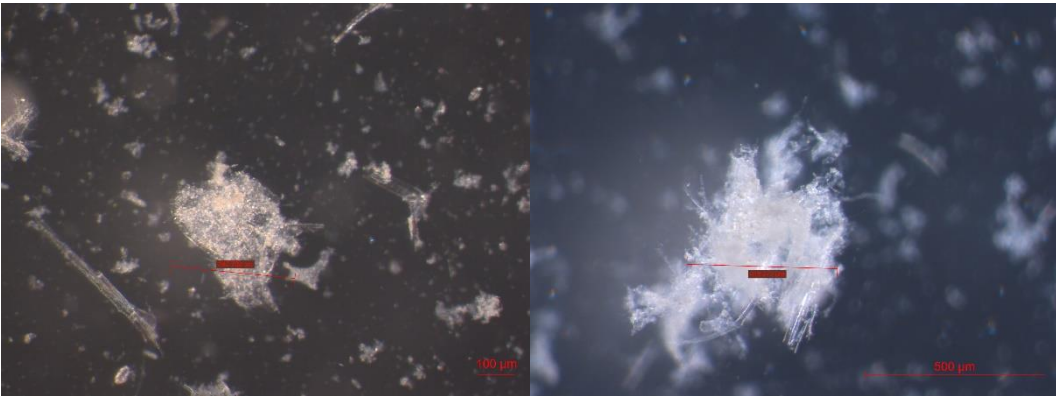
Şekil 4-10: R2 168.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 345 μm , sağda 401 μm)



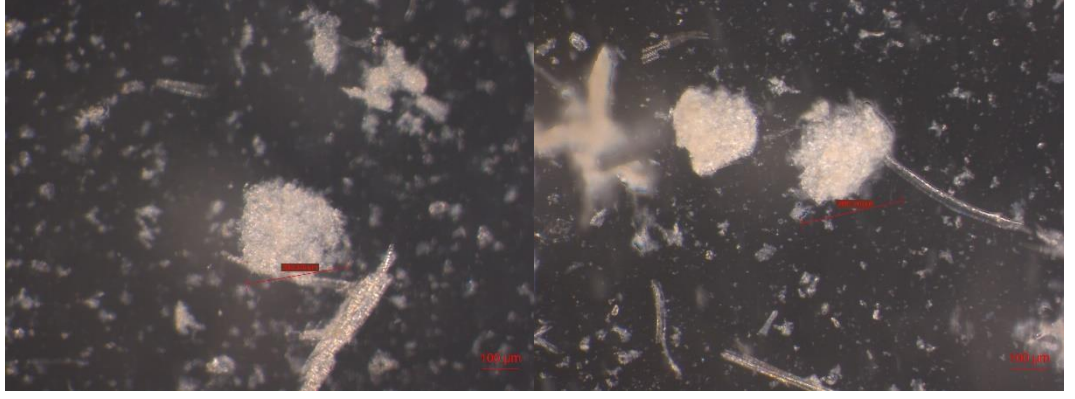
Şekil 4-11: R2 192.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 443 μm , sağda 395 μm)



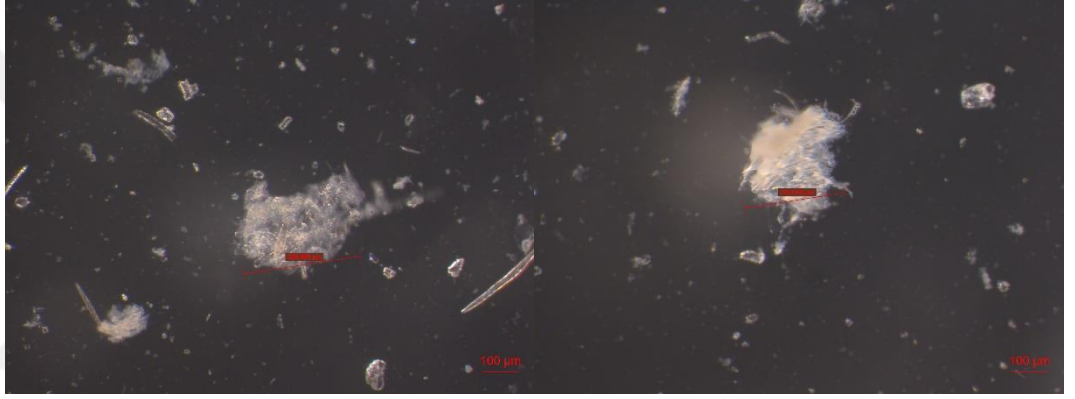
Şekil 4-12: R2 216.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 411 μm , sağda 376 μm)



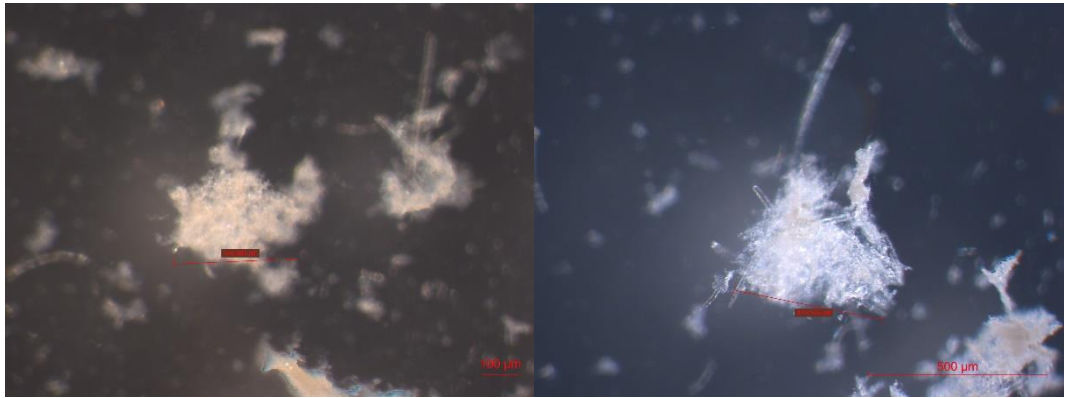
Şekil 4-13: R3 120.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 348 μm , sağda 418 μm)



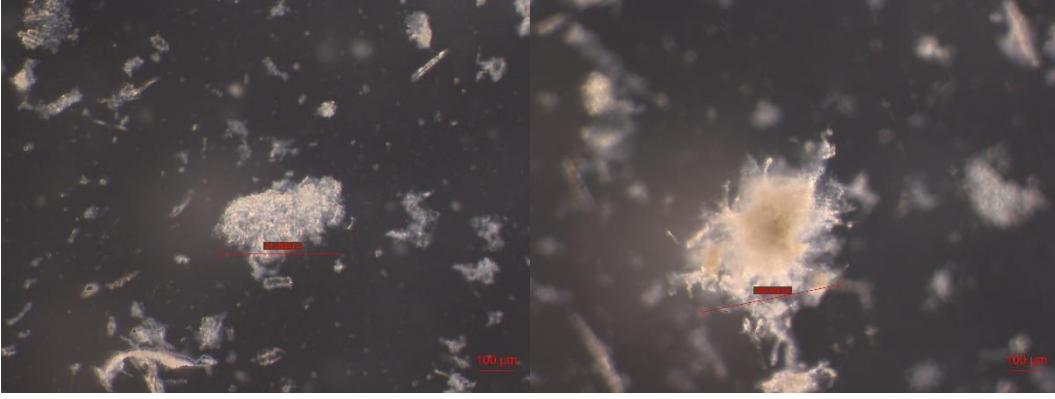
Şekil 4-14: R3 144.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 292 μm , sağda 288 μm)



Şekil 4-15: R3 168.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 330 μm , sağda 283 μm)



Şekil 4-16: R3 192.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 355 μm , sağda 424 μm)



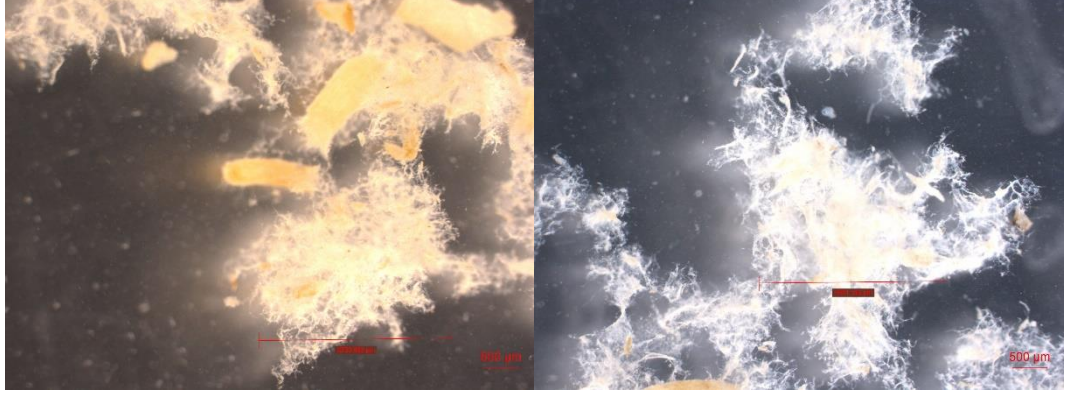
Şekil 4-17: R3 216.saat mikroskop görüntüleri (100X büyütme, solda 342 µm, sağda 389 µm)

Elenmiş malt çimi (0,75mm'den büyük) ile yapılan biyoreaktör denemelerinde, üretim ortamındaki mikroorganizmaların görüntüleri Şekil 4-3 ve Şekil 4-17 arasında görülmektedir. Mikroorganizma morfolojileri, literatürde yer alan rekombinant *Aspergillus niger* ile mikropartiküllerin kullanıldığı, glukoamilaz ve fruktofuranosidaz enzimlerinin üretildiği çalışmalarda (Driouch et al., 2012; Driouch, Roth, et al., 2010; Driouch, Sommer, et al., 2010) morfolojiler ile benzerlik göstermektedir.

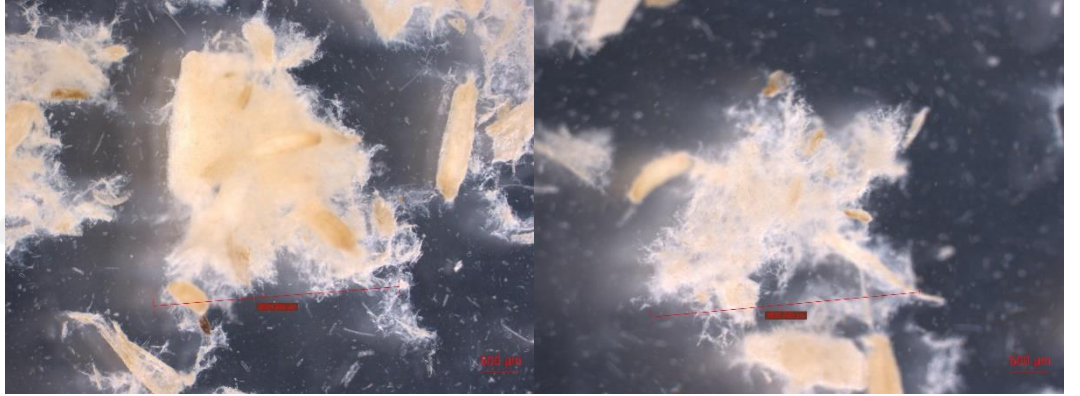
Kontrol biyoreaktör üretiminde (Şekil 4-3:Şekil 4-7), 10 g/L Al_2O_3 mikropartikülleri içeren biyoreaktör üretiminde (Şekil 4-8:Şekil 4-12) ve 10 g/L Talc mikropartikülleri içeren biyoreaktör üretiminde (Şekil 4-13:Şekil 4-17) mikroorganizmalar, kompakt ve sıkı pellet morfolojisine benzer gözükmemektedir. Kontrol biyoreaktör üretiminde ortamdaki malt çimi partikülleri, mikropartiküllü biyoreaktör üretimlerinde ise hem ortamdaki malt çimi partikülleri hem de mikropartiküllerin etkisiyle sıklığını bir miktar kaybetmiş mikroorganizma pelletleri de bulunmaktadır.

Kontrol biyoreaktör üretiminde gelişen fungal hiflerin birbirlerine tutunarak büyük pelletler oluşturduğu görülmektedir. Bazı pelletlerin çapları 1000 µm'nin üzerine çıkarken genellikle 600-700 µm aralığında çaplara sahip pelletler oluşmuştur. 10 g/L Al_2O_3 mikropartikülleri eklenen üretimlerde, mikroorganizma pelletlerinin çaplarının 350-450 µm aralığında olduğu görülmüştür. Aynı şekilde 10 g/L Talc mikropartikülleri eklenen üretimlerde, mikroorganizma pelletlerinin çapları 275-425 µm aralığındadır. Genel olarak elenmiş malt çimi (0,75mm'den büyük) kullanılan biyoreaktör üretimlerinde, üretim ortamına mikropartikül ilavesi,

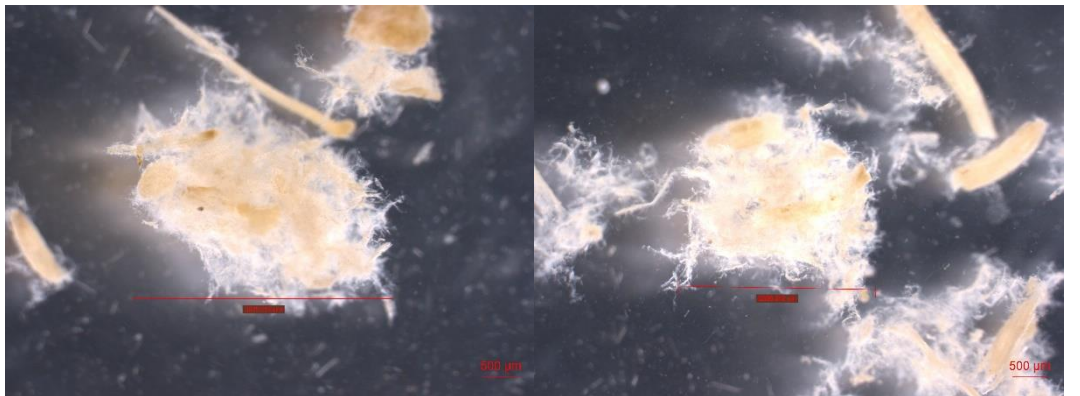
literatürdeki çalışmalara (Driouch, Roth, et al., 2010; Driouch, Sommer, et al., 2010) benzer şekilde, pellet çaplarında küçülme sağlamıştır.



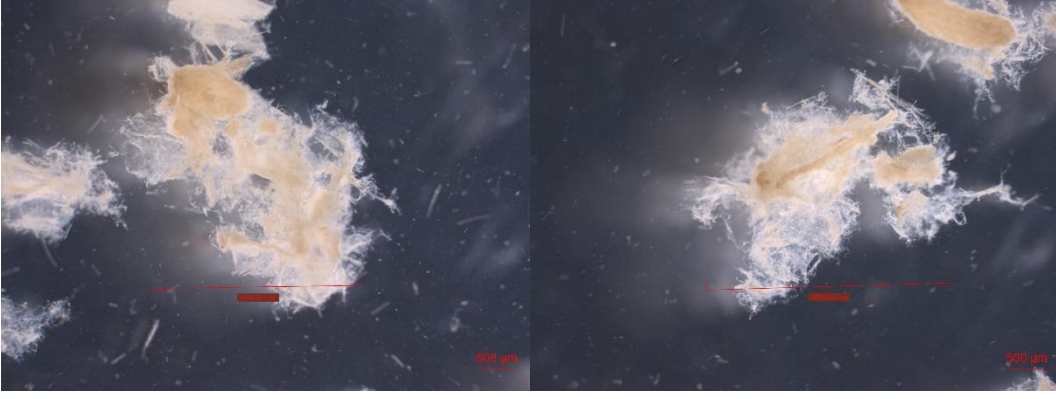
Şekil 4-18: R4 120.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 2754 µm, sağda 2681 µm)



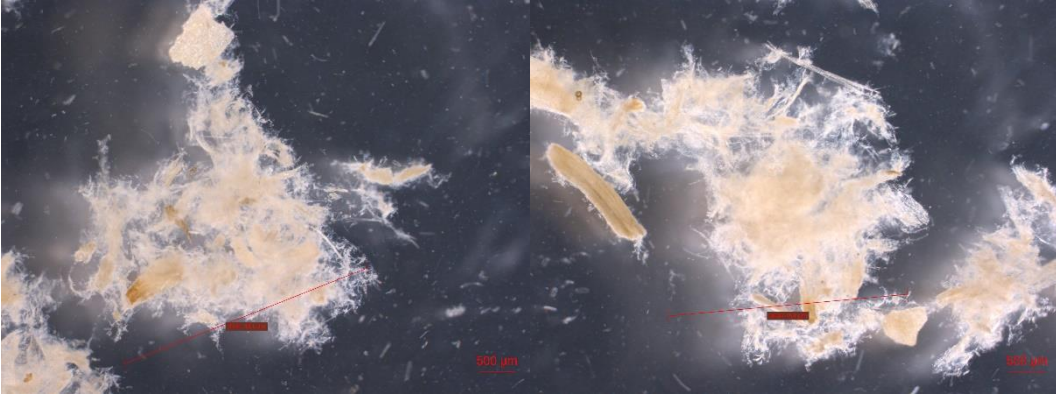
Şekil 4-19: R4 144.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 3525 µm, sağda 3850 µm)



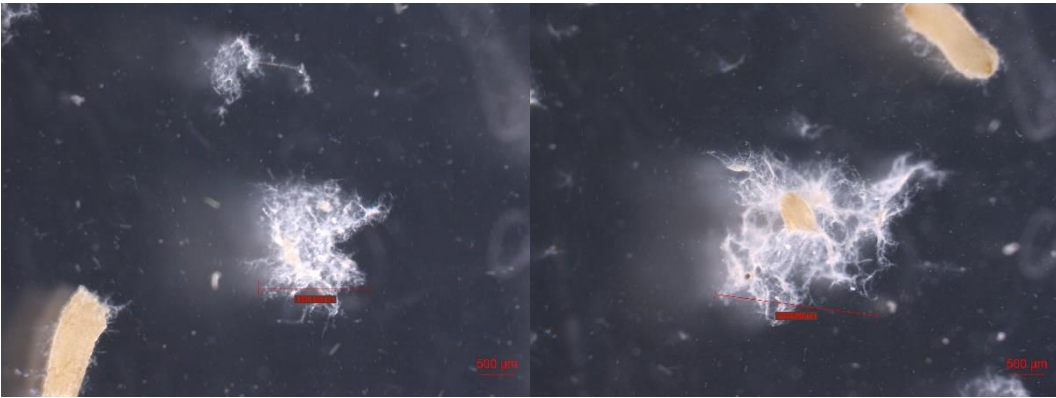
Şekil 4-20: R4 168.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 3696 µm, sağda 2827 µm)



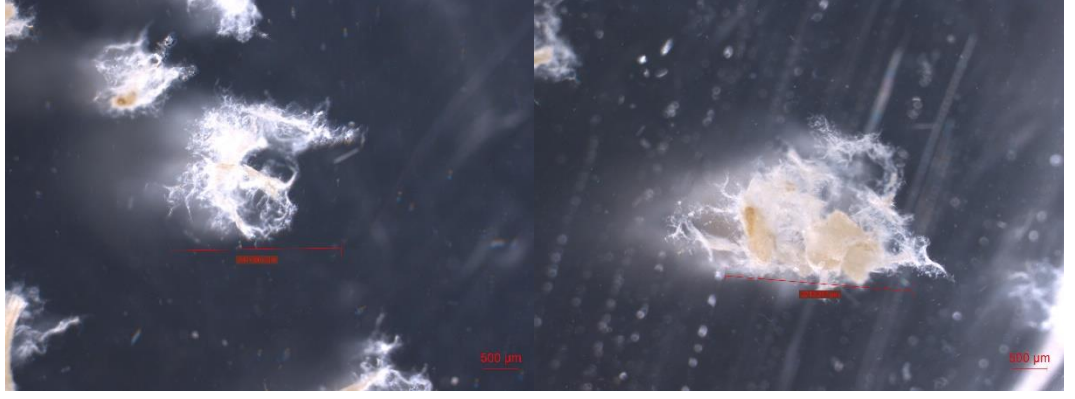
Şekil 4-21: R4 192.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 3037 μm , sağda 3465 μm)



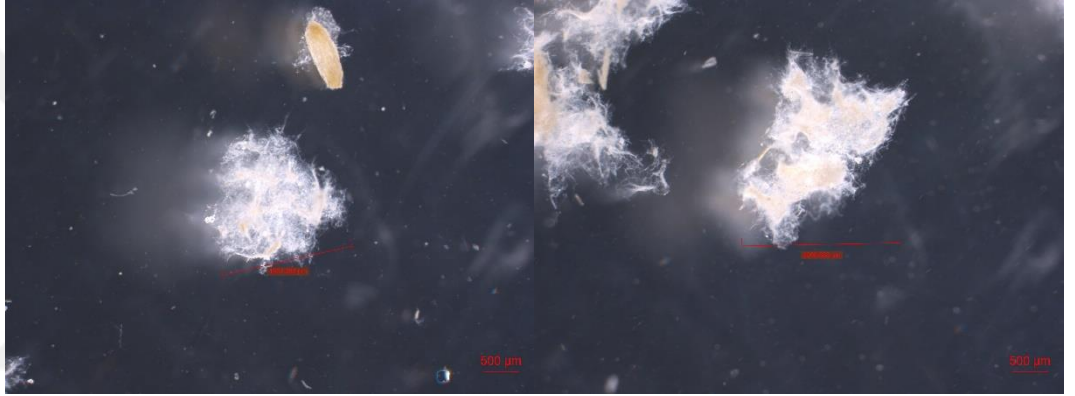
Şekil 4-22: R4 216.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 3731 μm , sağda 3434 μm)



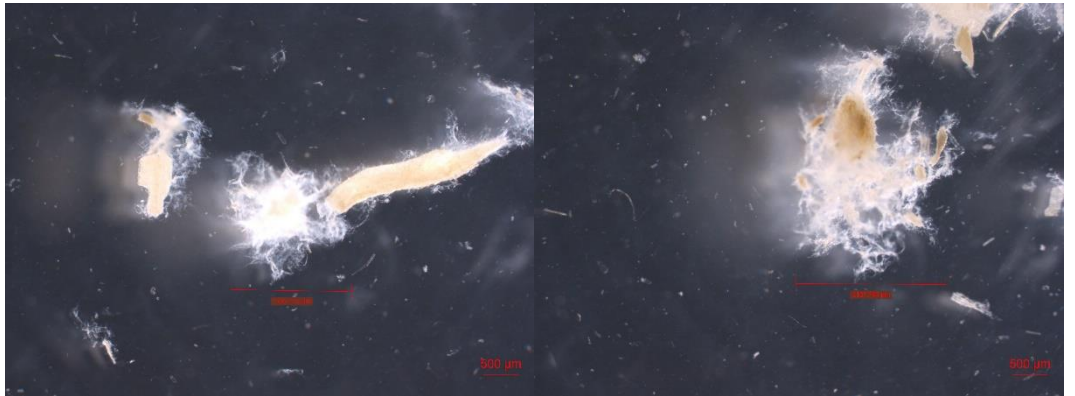
Şekil 4-23: R5 120.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 1609 μm , sağda 2340 μm)



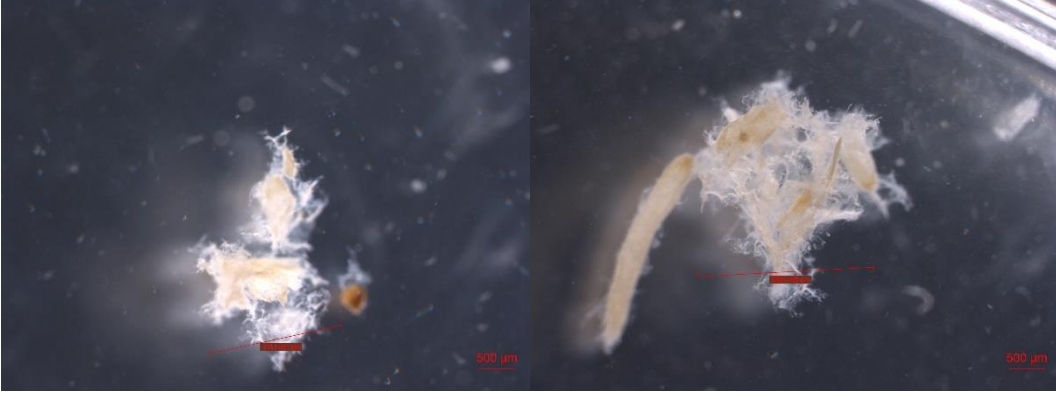
Şekil 4-24: R5 144.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 2428 μm , sağda 2712 μm)



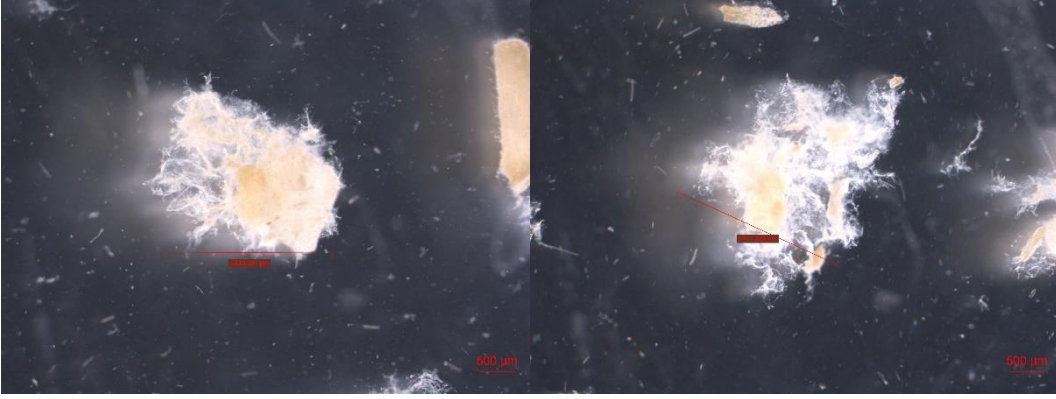
Şekil 4-25: R5 168.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 1902 μm , sağda 2269 μm)



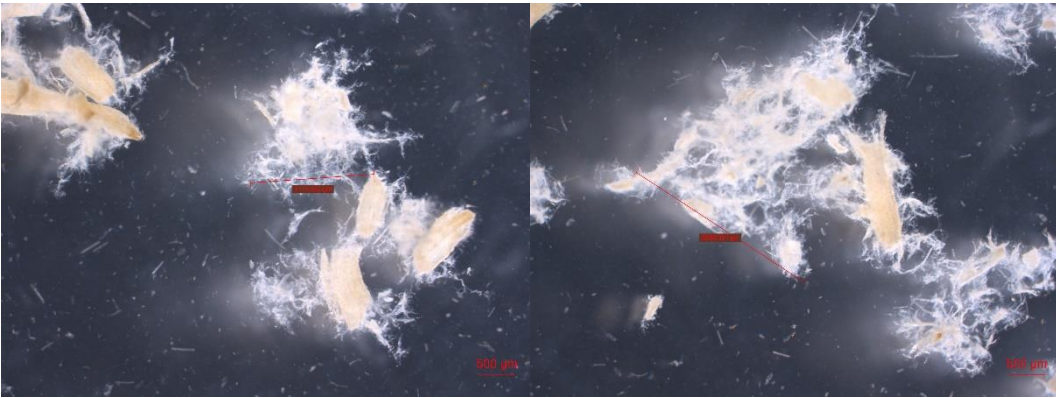
Şekil 4-26: R5 192.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 1732 μm , sağda 2361 μm)



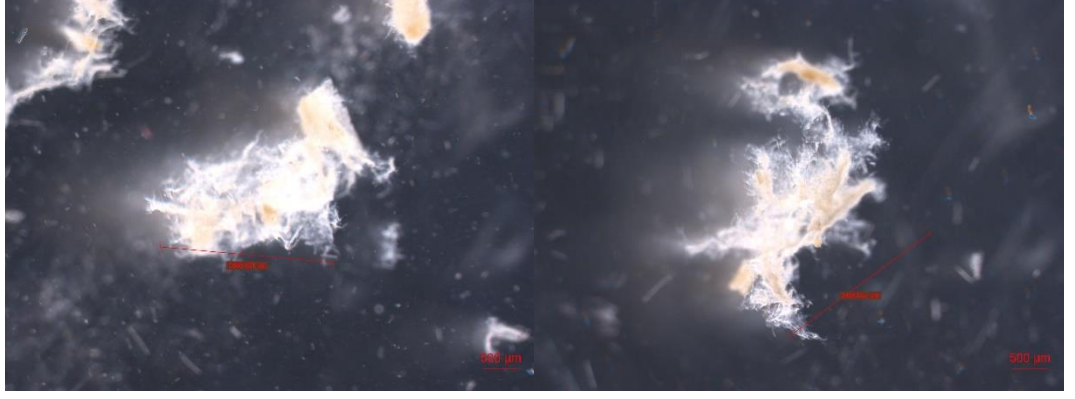
Şekil 4-27: R5 216.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 1919 µm, sağda 2525 µm)



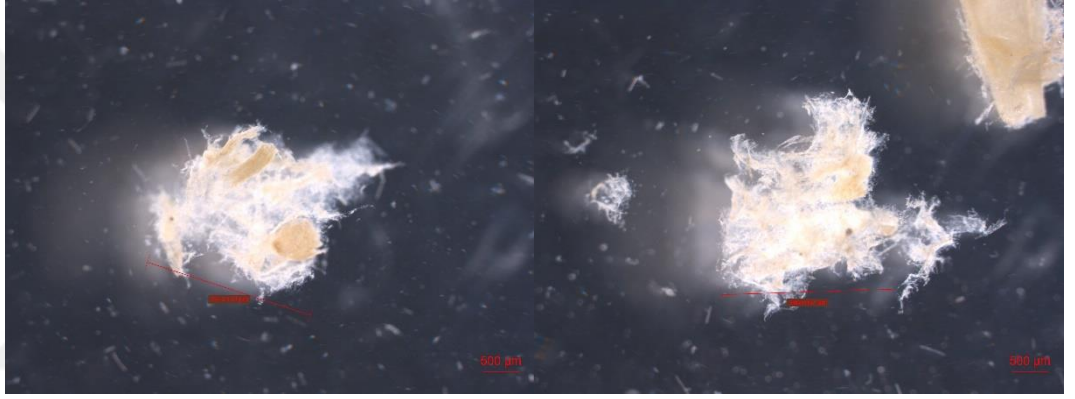
Şekil 4-28: R6 120.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 2413 µm, sağda 2477 µm)



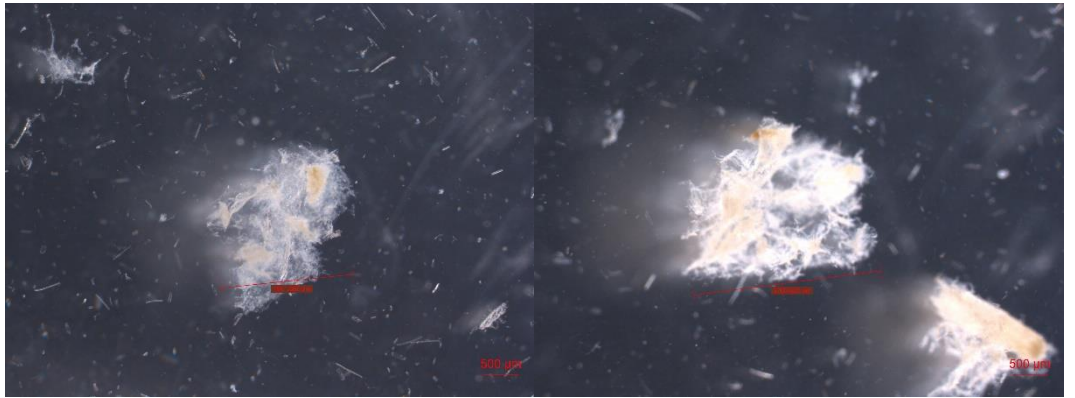
Şekil 4-29: R6 144.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 1772 µm, sağda 2858 µm)



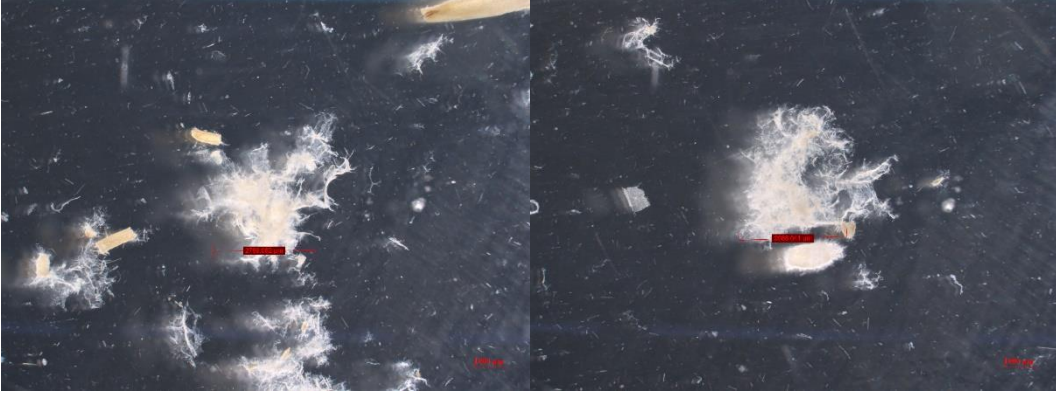
Şekil 4-30: R6 168.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 2488 μm , sağda 2499 μm)



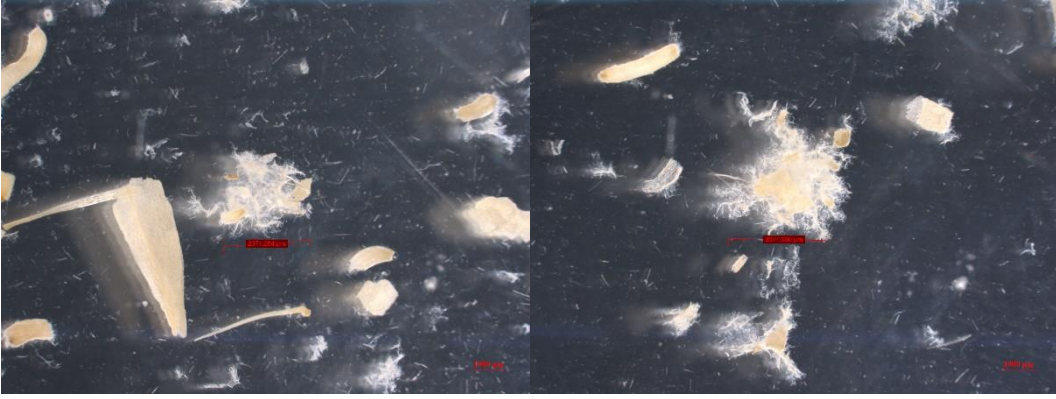
Şekil 4-31: R6 192.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 2445 μm , sağda 2465 μm)



Şekil 4-32: R6 216.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 1901 μm , sağda 2704 μm)



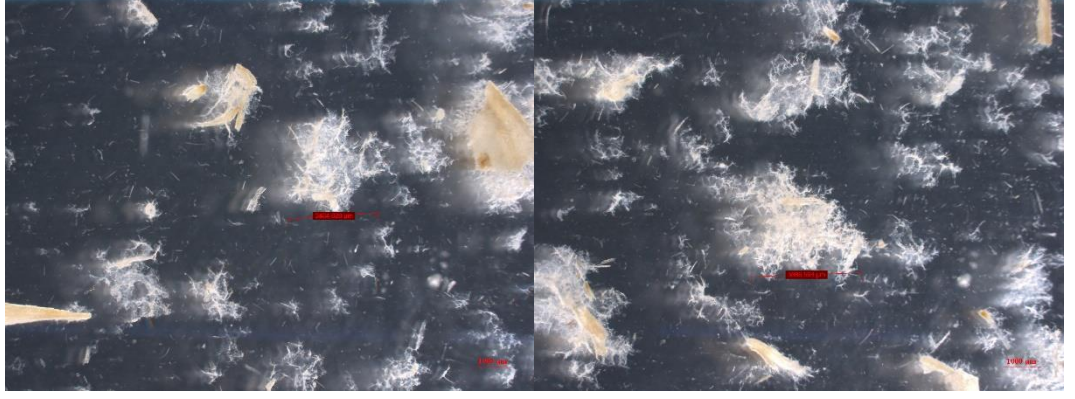
Şekil 4-33: R7 120.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 2789 μm , sağda 2988 μm)



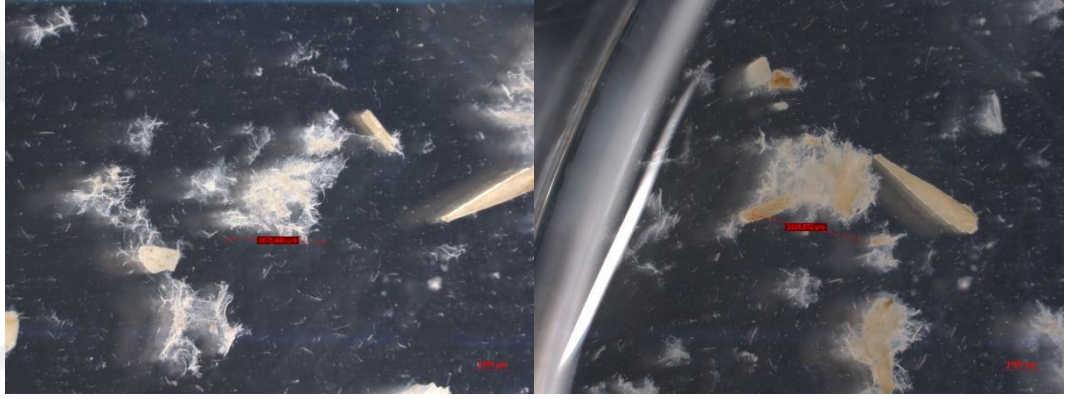
Şekil 4-34: R7 144.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 2371 μm , sağda 3071 μm)



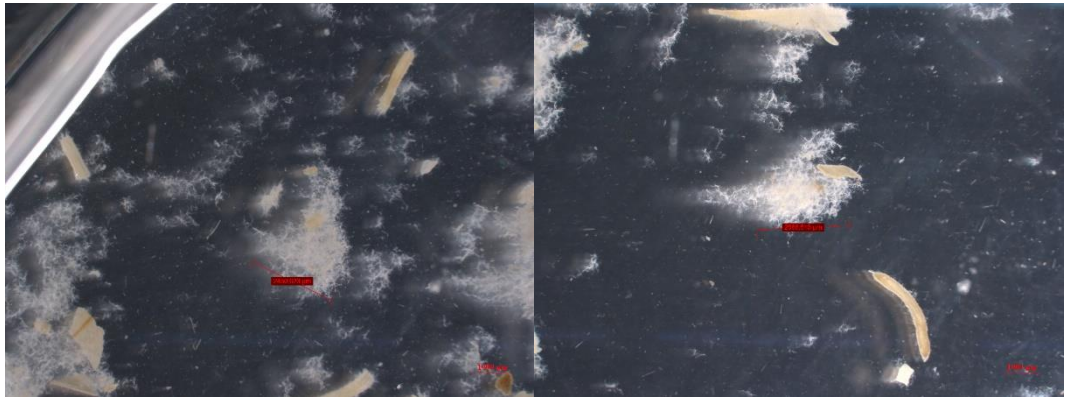
Şekil 4-35: R7 168.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 2155 μm , sağda 2457 μm)



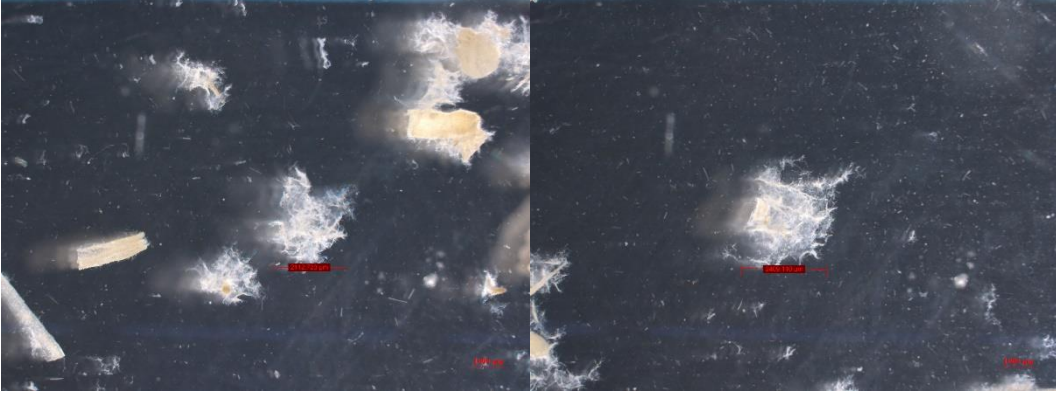
Şekil 4-36: R7 192.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 2485 µm, sağda 3087 µm)



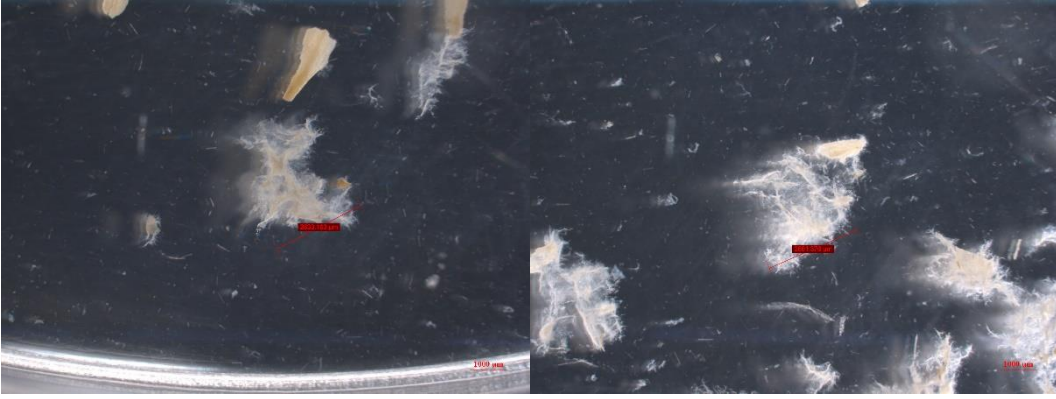
Şekil 4-37: R7 216.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 2875 µm, sağda 3007 µm)



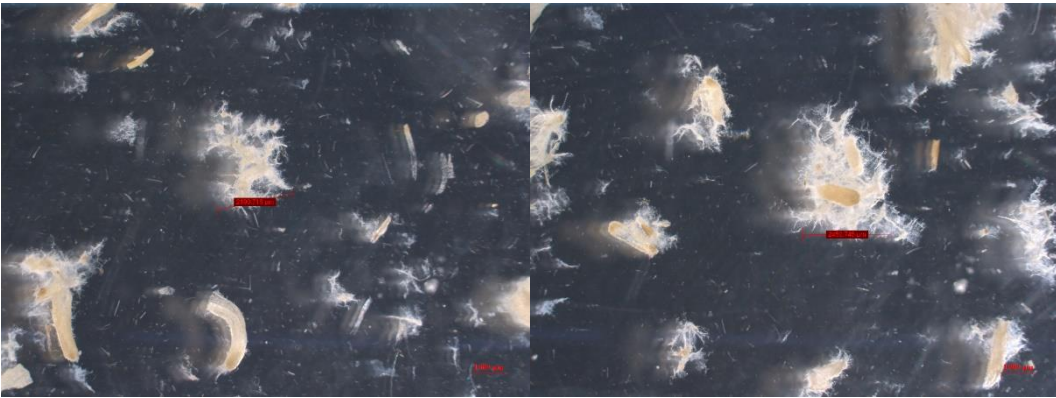
Şekil 4-38: R8 120.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 2451 µm, sağda 2567 µm)



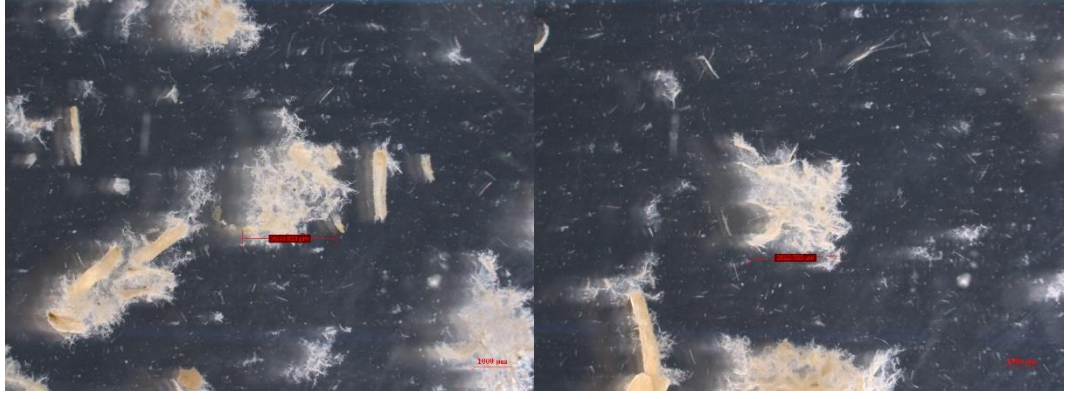
Şekil 4-39: R8 144.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütleme, solda 2113 μm , sağda 2409 μm)



Şekil 4-40: R8 168.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütleme, solda 2633 μm , sağda 2661 μm)



Şekil 4-41: R8 192.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütleme, solda 2191 μm , sağda 2451 μm)



Şekil 4-42: R8 216.saat mikroskop görüntüleri (10X büyütme, solda 2634 µm, sağda 2623 µm)

Elenmemiş malt çimi ile yapılan biyoreaktör denemelerinde, üretim ortamındaki mikroorganizmaların görüntüleri Şekil 4-18 ve Şekil 4-42 arasında görülmektedir. Mikroorganizma morfolojileri, literatürde yer alan rekombinant *Aspergillus niger* ile mikropartiküllerin kullanıldığı, glukoamilaz ve fruktofuranosidaz enzimlerinin üretildiği çalışmalarda (Driouch, et al., 2010; Driouch, et al., 2010) morfolojiler ile benzerlik göstermektedir.

Kontrol biyoreaktör üretiminde (Şekil 4-18:Şekil 4-22), 10 g/L Al_2O_3 mikropartikülleri içeren biyoreaktör üretiminde (Şekil 4-23:Şekil 4-27), 10 g/L Talc mikropartikülleri içeren biyoreaktör üretiminde (Şekil 4-28:Şekil 4-32), 5 g/L Al_2O_3 mikropartikülleri içeren biyoreaktör üretiminde (Şekil 4-33:Şekil 4-37) ve 5 g/L Talc mikropartikülleri içeren biyoreaktör üretiminde (Şekil 4-38:Şekil 4-42) mikroorganizmaların, pellet morfolojisi ile dağılmış misel morfolojisi arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca malt çimi partiküllerinin fungal hiflere yapışarak büyük ağsı mikroorganizma-malt çimi yapılarını oluşturduğu görülmüştür.

Kontrol biyoreaktör üretiminde ağsı mikroorganizma yapıları ve malt çimi partikülleri yapışarak çapları 2500-4000 µm aralığında değişen yapılar oluşturmuştur. 10 g/L Al_2O_3 mikropartikülleri ilave edilen biyoreaktör üretiminde ağsı mikroorganizma yapılarının çapları 1500-2800 µm aralığında ölçülmüştür. 10 g/L Talc mikropartikülleri ilave edilen biyoreaktör üretiminde ağsı mikroorganizma yapılarının çapları 1700-3000 µm aralığında ölçülmüştür. 5 g/L Al_2O_3 mikropartikülleri ilave edilen biyoreaktör üretiminde ağsı mikroorganizma yapılarının çapları 2000-3200 µm aralığında ölçülmüştür. 5 g/L Talc mikropartikülleri ilave edilen biyoreaktör üretiminde ağsı mikroorganizma

yapılarının çapları 2000-3000 µm aralığında ölülmüştür. Genel olarak elenmemiş malt imi kullanılan ve mikropartikül eklenen biyoreaktör üretimlerinde ağısı mikroorganizma yapılarının çapları literatürdeki çalışmalara (Driouch, et al., 2010; Driouch, et al., 2010) benzer şekilde küçülmüştür. Aynı zamanda literatürdeki çalışmalara (Driouch, et al., 2010; Driouch, et al., 2010) benzer şekilde Al₂O₃ ve Talc mikropartiküllerinin konsantrasyonu arttırıldığında (5 g/L'den 10 g/L'ye) daha küçük çaplarda ağısı mikroorganizma yapılarına rastlanmıştır.

Bütün biyoreaktör üretimlerinde pellet ve ağısı mikroorganizma yapıları birçok farklı boyutta oluşmuştur. Biyoreaktör üretimlerinde, literatürdeki kaynakların (Antecka, et al., 2016; Bala and Singh, 2016; Driouch et al., 2012; Driouch, et al., 2010; Driouch, et al., 2010; Germec et al., 2017; Kaup et al., 2008; Kowalska et al., 2017; J. Yang et al., 2016; Yatmaz et al., 2016) aksine mikroorganizma yapılarının boyutları heterojen bir dağılım göstermektedir. Literatürdeki bu çalışmalarda mikroorganizmaların genellikle rekombinant olması ve besin ortamı bileşenlerinin tamamen suda çözünebilir sentetik ortamlar olması nedeniyle bu farkın oluştuğı düşünölmektedir. Bu nedenle eldeki verilerle literatürdeki kaynaklar arasında tam bir karşılaştırma yapılamamaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında üretim ortamına mikropartiküller ilave edilerek fungal morfolojinin etkilenmesi ve bu durumun üretilen ksilanaz aktivitesinde meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir.

İlk olarak CaCO_3 'ın mikropartikül olarak kullanılması durumunda ksilanaz aktivitesinin olumsuz yönde etkilendiği görülmüştür. Bu nedenle CaCO_3 ile çalışmalara devam edilmemiştir.

Mikropartikül olarak kullanılan Al_2O_3 ve Talc, besin ortamı içerisinde otoklav sterilizasyonuna bırakıldığında, üretim süresince ksilanaz enzimi aktivitesinde olumsuz etki yaratmadığı görülmüştür. Bu sonuçla beraber, sonraki üretimlerde mikropartiküller besin ortamında içerisinde steril edilmiştir.

Ön işlem olarak eleme uygulanan malt çiminin partikül boyutu 0,75mm'den büyük kısmıyla yapılan üretimlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi değerleri, elenmemiş malt çimiyle yapılan üretimlerde elde edilen ksilanaz aktivitesi değerlerinden düşük kalmıştır.

Biyoreaktör denemelerinde Al_2O_3 ve Talc mikropartikülleri, erlen denemelerine göre daha olumlu sonuç vermiştir. Erlen denemelerinde, mikropartikül içeren üretimlerde ksilanaz aktivitesi, kontrol üretimlerine göre zaman zaman düşük kalmıştır. Biyoreaktör denemelerinde ise mikropartiküllü üretimlerde ksilanaz aktivitesi, kontrol üretimlerine göre net bir şekilde yüksektir.

Al_2O_3 ve Talc mikropartikülleri malt çimi gibi kompleks ve suda çözünmeyen üretim ortamına eklendiklerinde, *Aspergillus niger*'in derin kültürdeki morfolojisini etkileyerek ksilanaz aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Al_2O_3 mikropartikülleri 5 ve 10 g/L konsantrasyonlarda, Talc mikropartiküllerine oranla ksilanaz aktivitesine daha olumlu etki etmiştir.

Al_2O_3 mikropartiküllerinin üretim ortamına 10 g/L konsantrasyonda eklendiğinde ölçülen ksilanaz aktivitesi, 5 g/L konsantrasyonda eklendiğinde ölçülen ksilanaz aktivitesine göre daha yüksektir. Aynı şekilde Talc mikropartiküllerinin de 10 g/L konsantrasyondaki performansının 5 g/L konsantrasyondaki performansına oranla daha iyi olduğu görülmüştür.

Kompleks bir substrat olan malt çiminin besin ortamındaki partiküllerinin, ortama ilave edilen Al_2O_3 ve Talc mikropartiküllerinin etkisini değiştirdiği gözlemlenmiştir. Ön işlem olarak eleme uygulanan malt çiminin partikül boyutu 0,75mm'den büyük kısmıyla yapılan üretimlerde, ortama eklenen mikropartiküllerin ksilanaz aktivitesini daha yüksek oranda arttırdığı görülmüştür.

Yapılan görüntüleme analizleri sonucunda Al_2O_3 ve Talc mikropartiküllerinin 5 ve 10 g/L konsantrasyonlarda üretim ortamına ilavesi mikroorganizma pelletlerinin boyutlarını küçültmüştür. Üretim ortamında 10 g/L konsantrasyonda eklenen mikropartiküller, 5 g/L konsantrasyona oranla daha etkili olup mikroorganizma pelletlerinin boyutlarını daha fazla küçültmüştür.

Tablo 5-1: Elenmiş malt çimi ile yapılan biyoreaktör üretimlerinde verimlilik değerleri

Biyoreaktör Üretimleri	R1	R2	R3
Verimlilik (U/mL.h)	0,124	0,217	0,188

Tablo 5-2: Elenmemiş malt çimi ile yapılan biyoreaktör üretimlerinde verimlilik değerleri

Biyoreaktör Üretimleri	R4	R5	R6	R7	R8
Verimlilik (U/mL.h)	0,180	0,227	0,218	0,212	0,280

Yapılan biyoreaktör üretimlerinde elde edilen en yüksek ksilanaz aktiviteleri inkübasyon sürelerine bölünerek verimlilik değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan verimlilik değerleri Tablo 5-1 ve Tablo 5-2'de verilmiştir. Mikropartiküller ilave edilen tüm biyoreaktör üretimlerinde verimlilik değerleri, kontrol üretimlerine (R1 ve R4) oranla daha yüksektir.

Bu çalışmanın devamı olarak birkaç farklı yol önerilebilir. Al_2O_3 ve Talc mikropartiküllerinin daha farklı konsantrasyonlarının denemesi yapılabilir. Malt çimi partiküllerinin de mikropartiküllerin etkisini değiştirdiği görüldüğünden farklı malt çimi konsantrasyonlarının denemesi yapılabilir. Malt çimi partiküllerinin etkisinden kurtulmak için uygun bir ksilan ekstraksiyonu yapılarak, mikropartiküllü üretimler elde edilen ekstrakt ile denenebilir. Son olarak fungal morfolojiye etki eden parametrelerden olan farklı havalandırma ve karıştırma düzenleri de mikropartiküller ile denenebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed, S., Riaz, S., and Jamil, A. (2009). "Molecular cloning of fungal xylanases: An overview". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84(1): 19–35. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2079-4>
- Alexiadis, P., Cohen, D. H., Kozak, R. A., and Avramidis, S. (2007). "Kiln drying Canadian softwoods and hardwoods: Different species - Different problems." *Journal of the Institute of Wood Science*. 17(5): 259–267. <https://doi.org/10.1179/wsc.2007.17.5.259>
- Antecka, A., Bizukojc, M., and Ledakowicz, S. (2016). "Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2148-7>
- Antecka, A., Błatkiewicz, M., Bizukojć, M., and Ledakowicz, S. (2016). "Morphology engineering of *Basidiomycetes* for improved laccase biosynthesis." *Biotechnology Letters*. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2019-6>
- Antranikian, G. (1997). "Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria." *Critical Reviews in Biotechnology*. <https://doi.org/10.3109/07388559709146606>
- Bajpai, P. (2009). "Xylanases A2 - Schaechter, Moselio." *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*: 600–612. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00165-6>
- Bala, A., and Singh, B. (2016). "Cost-effective production of biotechnologically important hydrolytic enzymes by *Sporotrichum thermophile*." *Bioprocess and Biosystems Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1502-8>
- Baraznenok, V. A., Becker, E. G., Ankudimova, N. V., and Okunev, N. N. (1999). "Characterization of neutral xylanases from *Chaetomium cellulolyticum* and their biobleaching effect on eucalyptus pulp." *Enzyme and Microbial Technology*, 25(8–9): 651–659. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00091-5)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bataillon, M., Nunes Cardinali, A. P., Castillon, N., and Duchiron, F. (2000). "Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0." *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4): 187–192. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00143-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00143-X)
- Bhalla, A., Bischoff, K. M., and Sani, R. K. (2015). "Highly thermostable xylanase production from a thermophilic *Geobacillus* sp. strain WSUCF1 utilizing lignocellulosic biomass." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3(JUN). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00084>
- Burlacu, A., Cornea, C. P., and Israel-Roming, F. (2016). "Microbial xylanase : A review." *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, XX, 335–342.
- Busse-Wicher, M., Gomes, T. C. F., Tryfona, T., Nikolovski, N., Stott, K., Grantham, N. J., Bolam, D. N., Skaf, M. S., and Dupree, P. (2014). "The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*." *Plant Journal*, 79(3): 492–506. <https://doi.org/10.1111/tpj.12575>
- Carmona, E. C., Brochetto-Braga, M. R., Pizzirani-Kleiner, A. A., and Jorge, J. A. (1998). "Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*." *FEMS Microbiology Letters*, 166(2): 311–315. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13906.x>
- Chadha, B. S., Ajay, B. K., Mellon, F., and Bhat, M. K. (2004). "Two endoxylanases active and stable at alkaline pH from the newly isolated thermophilic fungus, *Myceliophthora* sp. IMI 387099." *Journal of Biotechnology*, 109(3): 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.12.010>
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., and Srivastava, A. K. (2016). "Bacterial xylanases: biology to biotechnology." *3 Biotech*. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0457-z>
- Chandra Raj, K., and Chandra, T. S. (1996). "Purification and characterization of xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1." *FEMS Microbiology Letters*, 145(3): 457–461. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(96\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(96)00452-1)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Christakopoulos, P., Nerinckx, W., Kekos, D., Macris, B., and Claeysens, M. (1996). "Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3." *Journal of Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(96\)01619-7](https://doi.org/10.1016/0168-1656(96)01619-7)
- Christov, L. P., and Prior, B. A. (1993). "Esterases of xylan-degrading microorganisms: Production, properties, and significance." *Enzyme and Microbial Technology*, 15(6): 460–475. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90078-G](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90078-G)
- Collins, T., Gerday, C., and Feller, G. (2005). "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases." *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1): 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
- Collins, T., Meuwis, M. A., Stals, I., Claeysens, M., Feller, G., and Gerday, C. (2002). "A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization." *Journal of Biological Chemistry*, 277(38): 35133–35139. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204517200>
- Courtin, C. M., and Delcour, J. A. (2002). "Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making." *Journal of Cereal Science*, 35(3): 225–243. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0433>
- Dekker, R. F. H., and Richards, G. N. (1976). "Hemicellulases: Their occurrence, purification, properties, and mode of action." *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 32(C): 277–352. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60339-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60339-X)
- Deng, P., Li, D., Cao, Y., Lu, W., and Wang, C. (2006). "Cloning of a gene encoding an acidophilic endo- β -1,4-xylanase obtained from *Aspergillus niger* CGMCC1067 and constitutive expression in *Pichia pastoris*." *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 1096–1102. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.02.014>
- Dodd, D., and Cann, I. K. O. (2009). "Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production." *GCB Bioenergy*, 1(1): 2–17. <https://doi.org/10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Driouch, H., Hänsch, R., Wucherpennig, T., Krull, R., and Wittmann, C. (2012). "Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: Targeted morphology engineering using titanate microparticles." *Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1002/bit.23313>
- Driouch, H., Roth, A., Dersch, P., and Wittmann, C. (2010). "Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 2011–2024. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2661-9>
- Driouch, H., Sommer, B., and Wittmann, C. (2010). "Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production." *Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1002/bit.22614>
- Ebringerová, A. (2006). "Structural diversity and application potential of hemicelluloses." *Macromolecular Symposia*, 232: 1–12. <https://doi.org/10.1002/masy.200551401>
- Ebringerová, A., and Heinze, T. (2000). "Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties." *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9): 542–556.
- Farhat, W., Venditti, R. A., Hubbe, M., Taha, M., Becquart, F., and Ayoub, A. (2017). "A Review of Water-Resistant Hemicellulose-Based Materials: Processing and Applications." *ChemSusChem*. <https://doi.org/10.1002/cssc.201601047>
- Fernández-Espinar, M., Piñaga, F., de Graaff, L., Visser, J., Ramón, D., and Vallés, S. (1994). "Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42(4): 555–562. <https://doi.org/10.1007/BF00173920>
- Finnie, S. M., Bettge, A. D., and Morris, C. F. (2006). "Influence of cultivar and environment on water-soluble and water-insoluble arabinoxylans in soft wheat". *Cereal Chemistry*, 83(6): 617–623. <https://doi.org/10.1094/CC-83-0617>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fujimoto, H., Ooi, T., Wang, S. L., Takizawa, T., Hidaka, H., Murao, S., and Arai, M. (1995). "Purification and Properties of Three Xylanases from *Aspergillus aculeatus*". In *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(3): 538–540. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.538>
- Georis, J., Giannotta, F., De Buyl, E., Granier, B., and Frère, J. M. (2000). "Purification and properties of three endo- β -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps". *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4): 178–186. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00141-6)
- Germec, M., Yatmaz, E., Karahalil, E., and Turhan, İ. (2017). "Effect of different fermentation strategies on β -mannanase production in fed-batch bioreactor system". *3 Biotech*. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0694-9>
- Ghanem, N. B., Yusef, H. H., and Mahrouse, H. K. (2000). "Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements". *Bioresource Technology*, 73(2), 113–121. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00155-8)
- Ghareib, M., and Nour el Dein, M. M. (1992). "Purification and general properties of xylanase from *Aspergillus terreus*." *Zentralblatt Für Mikrobiologie*, 147(8): 569–576. [https://doi.org/10.1016/s0232-4393\(11\)80390-2](https://doi.org/10.1016/s0232-4393(11)80390-2)
- Ghosh, M., and Nanda, G. (1994). "Physiological studies on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzymes in *Aspergillus sydowii* MG49". *FEMS Microbiology Letters*, 117(2): 151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06757.x>
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., and Bogel-Łukasik, R. (2010). "Hemicelluloses for fuel ethanol: A review". *Bioresource Technology*, 101,(13): 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W., and Župančič, S. (1996). "Production of fungal xylanases". *Bioresource Technology*, 58(2): 137–161. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00094-6)
- Harris, A. D., and Ramalingam, C. (2010). "Xylanases and its Application in Food Industry: A Review". *Journal of Experimental Sciences*, 1(7): 1–11.
- Hartmann, G., Piber, M., and Koehler, P. (2005). "Isolation and chemical characterisation of water-extractable arabinoxylans from wheat and rye during breadmaking". *European Food Research and Technology*, 221(3–4): 487–492. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-1154-z>
- Hendriks, A. T. W. M., and Zeeman, G. (2009). "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass". *Bioresource Technology*, 100(1): 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Iefuji, H., Chino, M., Kato, M., and Hmura, Y. (1996). "Acid xylanase from yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization, cloning, and sequencing". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60(8): 1331–1338. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.1331>
- Ito, K., Iwashita, K., and Iwano, K. (1992). "Cloning and sequencing of the xynC gene encoding acid xylanase of *Aspergillus kawachii*". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56(8): 1338–1340. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.1338>
- Izydorczyk, M. S., and Biliaderis, C. G. (1995). "Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties". *Carbohydrate Polymers*, 28(1): 33–48. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0144-8617(95)00077-1)
- Jia, J., Yang, X., Wu, Z., Zhang, Q., Lin, Z., Guo, H., Lin, C. S. K., Wang, J., and Wang, Y. (2015). "Optimization of fermentation medium for extracellular lipase production from *Aspergillus niger* using response surface methodology. *BioMed Research International*, 99: 491–498. <https://doi.org/10.1155/2015/497462>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jørgensen, H., Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F., and Olsson, L. (2003). "Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888". *Enzyme and Microbial Technology*, 32(7): 851–861. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00056-5)
- Kalogeris, E., Christakopoulos, P., Kekos, D., and MacRis, B. J. (1998). "Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes". *Journal of Biotechnology*, 60(3): 155–163. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00186-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00186-7)
- Kaup, B. A., Ehrich, K., Pescheck, M., and Schrader, J. (2008). "Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: Increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example". *Biotechnology and Bioengineering*, 99: 491–498. <https://doi.org/10.1002/bit.21713>
- Khanna, P., Sundari, S. S., and Kumar, N. J. (1995). "Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus sp.*". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/BF00704661>
- Kimura, I., Sasahara, H., and Tajima, S. (1995). "Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*". *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(4): 334–339. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)94200-B](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)94200-B)
- Kimura, T., Ito, J., Kawano, A., Makino, T., Kondo, H., Karita, S., Sakka, K., and Ohmiya, K. (2000). "Purification, characterization, and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium sp.*40". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(6): 1230–1237. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1230>
- Kormelink, F. J. M., Searle-Van Leeuwen, M. J. F., Wood, T. M., and Voragen, A. G. J. (1993). "Purification and characterization of three endo-(1,4)- β -xylanases and one β -xylosidase from *Aspergillus awamori*". *Journal of Biotechnology*, 27(3): 249–265. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90089-6](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90089-6)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Koutaniemi, S., Guillon, F., Tranquet, O., Bouchet, B., Tuomainen, P., Virkki, L., Petersen, H. L., Willats, W. G. T., Saulnier, L., and Tenkanen, M. (2012). "Substituent-specific antibody against glucuronoxyran reveals close association of glucuronic acid and acetyl substituents and distinct labeling patterns in tree species". *Planta*, 236(2): 739–751. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1653-7>
- Kowalska, A., Anteck, A., Owczarz, P., and Bizukojć, M. (2017). "Inulinolytic activity of broths of *Aspergillus niger* ATCC 204447 cultivated in shake flasks and stirred tank bioreactor". *Engineering in Life Sciences*, 17: 1006–1020. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600247>
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., and Wösten, H. A. B. (2013). "Development in *Aspergillus*". *Studies in Mycology*, 1–29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>
- Kumar, S., Singh, S. P., Mishra, I. M., and Adhikari, D. K. (2009). "Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass". *Chemical Engineering and Technology*, 32(4): 517–526. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800442>
- Li, X. L., Zhang, Z. Q., Dean, J. F. D., Eriksson, K. E. L., and Ljungdahl, L. G. (1993). "Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1". *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10): 3212–3218.
- Lubertozzi, D., and Keasling, J. D. (2009). "Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression". *Biotechnology Advances*, 27: 53–75. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.001>
- Maalej-Achouri, I., Guerfali, M., Romdhane, I. B. Ben, Gargouri, A., and Belghith, H. (2012). "The effect of *Talaromyces thermophilus* cellulase-free xylanase and commercial laccase on lignocellulosic components during the bleaching of kraft pulp". *International Biodeterioration and Biodegradation*, 75: 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.04.015>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mandal, A. (2015). "Review on Microbial Xylanases and their Applications". *International Journal of Life Sciences*.
- Marquardt, W., Harwardt, A., Hechinger, M., Kraemer, K., Viell, J., and Voll, A. (2010). "The biorenewables opportunity - toward next generation process and product systems". *AIChE Journal*, 56(9): 2228–2235. <https://doi.org/10.1002/aic.12380>
- Merali, Z., Ho, J. D., Collins, S. R. A., Gall, G. Le, Elliston, A., Käsper, A., and Waldron, K. W. (2013). "Characterization of cell wall components of wheat straw following hydrothermal pretreatment and fractionation". *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.023>
- Meyer, V., Wu, B., and Ram, A. F. J. (2011). "Aspergillus as a multi-purpose cell factory: Current status and perspectives". *Biotechnology Letters*, 33: 469–476. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0473-8>
- Monti, R., Terenzi, H. F., and Jorge, J. A. (1991). "Purification and properties of an extracellular xylanase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*". *Canadian Journal of Microbiology*, 37(9): 675–681. <https://doi.org/10.1139/m91-115>
- Moreira, L. R. S., and Filho, E. X. F. (2016). "Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12): 5205–5214. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7555-z>
- Moto, N. K., Yoshino, S., Ohmiya, K., and Tsukagoshi, N. (1999). "Purification and characterization of the overexpressed *Aspergillus oryzae* xylanase, xynF1". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63(10): 1791–1794. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.1791>
- Negahdar, L., Delidovich, I., and Palkovits, R. (2016). "Aqueous-phase hydrolysis of cellulose and hemicelluloses over molecular acidic catalysts: Insights into the kinetics and reaction mechanism". *Applied Catalysis B: Environmental*, 184: 285–298. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2015.11.039>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nieto-Domínguez, M., de Eugenio, L. I., York-Durán, M. J., Rodríguez-Colinas, B., Plou, F. J., Chenoll, E., Pardo, E., Codoñer, F., and Jesús Martínez, M. (2017). "Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase". *Food Chemistry*, 232: 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.149>
- Papagianni, M., Matthey, M., and Kristiansen, B. (1999). "Hyphal vacuolation and fragmentation in batch and fed-batch culture of *Aspergillus niger* and its relation to citric acid production". *Process Biochemistry*, 35(3–4): 359–366. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00079-5)
- Papagianni, M. (2004). "Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes". *Biotechnology Advances*, 22(3): 189–259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005>
- Papagianni, M. (2014). "Characterization of fungal morphology using digital image analysis techniques". *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 6(4): 189–194. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000142>
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De La Rubia, T., and Martínez, J. (2002). "Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview". *International Microbiology*, 5: 53–63. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., and Amorim, D. S. (2005). "Xylanases from fungi: Properties and industrial applications". *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
- Pollet, A., Delcour, J. A., and Courtin, C. M. (2010). "Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families". *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3): 176–191. <https://doi.org/10.3109/07388551003645599>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Puls, J. (1997). "Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis". *Macromolecular Symposia*, 120: 183–196. <https://doi.org/10.1002/masy.19971200119>
- Ryan, S. E., Nolan, K., Thompson, R., Gubitz, G. M., Savage, A. V., and Tuohy, M. G. (2003). "Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*". *Enzyme and Microbial Technology*, 33(6): 775–785. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00176-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00176-5)
- Saeed, F., Pasha, I., Anjum, F. M., and Sultan, M. T. (2011). "Arabinoxylans and arabinogalactans: A comprehensive treatise". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51,(5): 467–476). <https://doi.org/10.1080/10408391003681418>
- Saha, B. C. (2003). "Hemicellulose bioconversion". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5): 279–291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>
- Salles, B. C., Cunha, R. B., Fontes, W., Sousa, M. V., and Filho, E. X. F. (2000). "Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*". *Journal of Biotechnology*, 81(2–3): 199–204. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00280-7)
- Samayam, I. P., and Schall, C. A. (2010). "Saccharification of ionic liquid pretreated biomass with commercial enzyme mixtures". *Bioresource Technology*, 101(10): 3561–3566. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.066>
- Schooneveld-Bergmans, M. E. F., Van Dijk, Y. M., Beldman, G., and Voragen, A. G. J. (1999). "Physicochemical characteristics of wheat bran glucuronoarabinoxylans". *Journal of Cereal Science*, 29(1): 49–61. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1998.0220>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Silva, C. H. C., Puls, J., De Sousa, M. V., and Filho, E. X. F. (1999). "Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* fresenius". *Revista de Microbiologia*, 30(2): 114–119. <https://doi.org/10.1590/S0001-37141999000200005>
- Singh, S., Reddy, P., Haarhoff, J., Biely, P., Janse, B., Pillay, B., Pillay, D., and Prior, B. A. (2000). "Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase". *Journal of Biotechnology*, 81(2–3): 119–128. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00279-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00279-0)
- Subramaniyan, S., and Prema, P. (2002). "Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application". *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1): 33–64. <https://doi.org/10.1080/07388550290789450>
- Taneja, K., Gupta, S., and Chander Kuhad, R. (2002). "Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99". *Bioresource Technology*, 85(1): 39–42. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00064-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00064-0)
- Thomsen, M. H., Thygesen, A., and Thomsen, A. B. (2008). "Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis". *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.054>
- Valenzuela, S. V., Diaz, P., and Pastor, F. I. J. (2014). "Xyn11E from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23: A LppX-chaperone-dependent xylanase with potential for upgrading paper pulps". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13): 5949–5957. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5565-2>
- van Suijdam, J. C., Kossen, N. W. F., and Paul, P. G. (1980). "An inoculum technique for the production of fungal pellets". *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/BF00508608>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vázquez, M. J., Alonso, J. L., Domínguez, H., and Parajó, J. C. (2000). "Xylooligosaccharides: Manufacture and applications". *Trends in Food Science and Technology*, 11(11): 387–393. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00031-0)
- Vázquez, M. J., Garrote, G., Alonso, J. L., Domínguez, H., and Parajó, J. C. (2005). "Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: Evaluation of operational strategies". *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.08.013>
- Walisko, R., Krull, R., Schrader, J., and Wittmann, C. (2012). "Microparticle based morphology engineering of filamentous microorganisms for industrial bio-production". In *Biotechnology Letters*. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0997-1>
- Yang, J., Jiao, R. H., Yao, L. Y., Han, W. B., Lu, Y. H., and Tan, R. X. (2016). "Control of fungal morphology for improved production of a novel antimicrobial alkaloid by marine-derived fungus *Curvularia* sp. IFB-Z10 under submerged fermentation". *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.025>
- Yang, S., Yang, B., Duan, C., Fuller, D. A., Wang, X., Chowdhury, S. P., Stavik, J., Zhang, H., and Ni, Y. (2019). "Applications of enzymatic technologies to the production of high-quality dissolving pulp": A review. In *Bioresource Technology*, 281: 440–448. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.132>
- Yatmaz, E., Karahalil, E., Germec, M., Ilgin, M., and Turhan, İ. (2016). "Controlling filamentous fungi morphology with microparticles to enhanced β -mannanase production". *Bioprocess and Biosystems Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1615-8>
- Yi, X., Shi, Y., Xu, H., Li, W., Xie, J., Yu, R., Zhu, J., Cao, Y., and Qiao, D. (2010). "Hyperexpression of two *Aspergillus niger* xylanase genes in *Escherichia coli* and characterization of the gene products". *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 778–786. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000300030>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

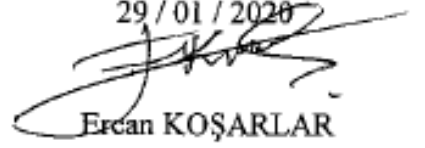
- Zhang, Y. H. Percival. (2008). "Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5): 367–375. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0293-6>
- Zhang, Yi Heng Percival, Ding, S. Y., Mielenz, J. R., Cui, J. B., Elander, R. T., Laser, M., Himmel, M. E., McMillan, J. R., and Lynd, L. R. (2007). "Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions". *Biotechnology and Bioengineering*, 97(2): 214–223. <https://doi.org/10.1002/bit.21386>
- Zhao, L., Yuan, Z., Kapu, N. S., Chang, X. F., Beatson, R., Trajano, H. L., and Martinez, D. M. (2017). "Increasing efficiency of enzymatic hemicellulose removal from bamboo for production of high-grade dissolving pulp". *Bioresource Technology*, 223: 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.034>
- Zhou, X., Li, W., Mabon, R., and Broadbelt, L. J. (2017). "A critical review on hemicellulose pyrolysis". In *Energy Technology*, 5(1): 52–79. <https://doi.org/10.1002/ente.201600327>
- Zhu, X., Sun, J., and Chu, J. (2018). "High-content screening of *Aspergillus niger* with both increased production and high secretion rate of glucose oxidase". *Biotechnology Letters*, 40: 103–110. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2442-y>

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesini sağlayan, engin bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, yol gösteren, yönlendirmeleriyle birçok problemi çözüme kavuşturan, güler yüzünü ve pozitif enerjisini hiç eksik etmeyen değerli danışmanım **Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ÖZGEN**'e teşekkür ederim.

Bu tezin çıkış noktasını oluşturan 115O052 kodlu TÜBİTAK Projesine, proje ekibine ve tez süresince yardımlarını hiç esirgemeyen **Biyoproses Laboratuvarı çalışanlarına** teşekkür ederim.

Çalışmam süresince her zaman yanımda olan, beni motive eden, bana olan desteğini hiçbir zaman bırakmayan yoldaşım **Yüksek Biyomüh. Sibel AKAR**'a ve bugünlere gelebilmemde en büyük pay sahibi **aileme** teşekkür ederim.

29 / 01 / 2020

Ercan KOŞARLAR

ÖZGEÇMİŞ

14/07/1993 yılında Türkiye'nin İzmir ilinde doğdu. 2007-2011 yılları arasında Buca Anadolu Lisesi'nde sayısal opsiyonunda eğitim aldı. İlk yılını İngilizce hazırlık olarak okuduğu Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nde 2011 – 2016 yılları arasında lisans eğitimini aldı. Lisans eğitiminin 2. yılında EÜ Müh. Fak. Biyomühendislik Bölüm hocası Prof. Dr. Rengin ELTEM'in yürütücüsü olduğu "Endüstriyel Mikrobiyoloji" laboratuvarında gönüllü stajını tamamladı. Staj süresince Bacillus suşlarının 30L biyoreaktörlerde üretimi ve üretim sonrası alt-akım işlemlerinin gerçekleştirilmesi çalışmalarında yer aldı. Lisans eğitiminin zorunlu stajını EÜ Nükleer Bilimler Enstitüsü'nde tamamladı. Lisans eğitiminin bitirme tezinde "Lakkaz Enzimi Üretiminde Statik Manyetik Alan Uygulamaları" isimli pratik tezi ortak çalışma ile tamamladı. Tezde, katı kültür fermentasyonu ile üretilen fungal kültürlerin, üretim boyunca farklı konformasyonlarda manyetik alana maruz bırakılmalarının, lakkaz enzimi aktivitesine olan etkisini araştırdı. 03/2016 - 07/2016 tarihleri arasında TÜBİTAK 115O052 numaralı "Unlu Mamul Sektörüne Yönelik Endüstriyel Enzime Ait Ekonomik Üretim Sistemlerinin Geliştirilmesi/İyileştirilmesi (UN-EN)" başlıklı projede *lisans bursiyeri* olarak yer aldı ve mikroorganizma kültür koleksiyonundan mikroorganizma stoğu hazırlanması üzerine çalıştı.

2017 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olan Biyomühendislik Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimi almaya başladı. 12/2017 – 12/2018 tarihleri arasında TÜBİTAK 115O052 numaralı "Unlu Mamul Sektörüne Yönelik Endüstriyel Enzime Ait Ekonomik Üretim Sistemlerinin Geliştirilmesi/İyileştirilmesi (UN-EN)" başlıklı projede *yüksek lisans bursiyeri* olarak yer aldı ve laboratuvar ölçeğinden pilot ölçek biyoreaktörlerde mikroorganizmalardan ksilanaz enzimi üretimi, alt akım işlemleri, enzim aktivite analizleri üzerine çalıştı.

Ayrıca 2016 yılında, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nce düzenlenen Biyomühendislik Günleri etkinliğinde, etkinlik düzenleme komitesi basın komisyonunda görev aldı.