

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**UNLU MAMULLER SEKTÖRÜNE YÖNELİK
KSİLANAZ ENZİMİNİN KATI KÜLTÜR
FERMENTASYONU İLE ÜRETİMİ**

Gizem Ezgi TEKKOL

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sayıt SARGIN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 26.01.2018

Bornova-İZMİR

2018

Gizem Ezgi TEKKOL tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Unlu Mamuller Sektörüne Yönelik Ksilanaz Enziminin Katı Kültür Fermentasyonu İle 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 26.01.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri: İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Sayıt SARGIN

Raportör Üye : Prof. Dr. Gaye ÖNGEN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Seval Dağbağlı

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Unlu Mamuller Sektörüne Yönelik Ksilanaz Enziminin Katı Kültür Fermentasyonu İle 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.

26 / 01 / 2018

İmzası

Gülen

Adı-Soyadı

Gülen Epi Tekel

ÖZET

UNLU MAMULLER SEKTÖRÜNE YÖNELİK KSİLANAZ ENZİMİNİN KATI KÜLTÜR FERMENTASYONU İLE ÜRETİMİ

TEKKOL, Gizem Ezgi

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sayıt SARGIN

Ocak 2018, 77 sayfa

Bu çalışmada, katı kültür fermentasyon yöntemi ile ksilanaz enzimi üretiminde üretim koşulları optimize edilmiştir. *Aspergillus niger* fungus kültürü ile yapılan ksilanaz enzimi üretimlerinde çeşitli tarımsal atıklar (buğday kepeği, yulaf kepeği, pirinç kepeği, mısır koçanı, talaş, malt çimi) substrat olarak kullanılmış, temel substrat, inorganik azot kaynağı ve miktarı ile birlikte başlangıç nem oranının ksilanaz aktivitesine etkisi belirlenmiştir. Maksimum enzim aktivitesi optimum koşullarda (diamonyum hidrojen fosfat ekli mineral tuz solüsyonu ile nemlendirilmiş malt çimi, başlangıç nem oranı %70) 759.15 U/g kuru substrat olarak elde edilmiştir. Tepsili biyoreaktör üretimlerinde inokulasyon ve havalandırma debisi üzerine çalışılmıştır. Optimum koşullarda, 0.1 ml spor süspansiyonu/g substrat inokulasyon ve 2.5 L/dak havalandırma debisi ile ksilanaz aktivitesi 1312.04 U/g kuru substrat olarak elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: ksilanaz, malt çimi, *Aspergillus niger*, katı kültür fermentasyonu



ABSTRACT**PRODUCTION OF XYLANASE ENZYME BY SOLID STATE
FERMENTATION FOR BAKERY INDUSTRY**

TEKKOL, Gizem Ezgi

MSc in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sayıt SARGIN

January 2018, 77 pages

In this study, production conditions for xylanase enzyme production in solid culture fermentation were optimized. Various agroindustrial wastes (wheat bran, oat bran, rice bran, corn kob, sawdust, malt sprout) were used as substrate for production of xylanase from *Aspergillus niger*. Effect of substrate, inorganic nitrogen source, amount of inorganic nitrogen source and initial moisture content (%) to xylanase production were determined. Maximum enzyme activity (759.15 U/g dry substrate) was obtained at optimum conditions (malt sprout, diammonium hydrogen phosphate added mineral salt solution, initial moisture ratio 70%). Inoculation ratio and aeration flow rate were studied for xylanase production in tray bioreactor. Under optimum conditions (0.1 ml spore suspension/g substrate inoculation, 2.5 L/min aeration flow rate) xylanase activity was determined as 1312.04 U/g dry substrate.

Keywords: xylanase, malt sprout, *Aspergillus niger*, solid state fermentation



TEŞEKKÜR

Bu tezin oluşum sürecinin her aşamasında, değerli önerileri, yardımları ve manevi desteğiyle tez konusunun belirlenmesinden yazımına kadar her zaman yanımda olan danışmanım Doç. Dr. Sayıt SARGIN'a, tez çalışmam sırasında vakitlerini ayırarak desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Gaye ÖNGEN ve Dr. Şevket KARAÇANCI'ya, çalışmalarım sırasında deneyimlerimden faydalandığım, yardımlarıyla her zaman yanımda olan Dr. Işık ÇOBAN'a, manevi desteklerinden ötürü Dr. Emek ASLAN ve Yrd. Doç. Dr. İsmail Hakkı AKGÜN'e, çalışmalarından faydalandığım Dr. Burak ALTINEL'e, tez çalışmam sırasında emeği geçen Özge AKYÜZ'e, yardımlarını ve manevi desteğini her daim hissettiğim çalışma arkadaşım Dilek ŞAHİNBAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmasının yürütülmesi için gerekli imkanı sağlayan E.Ü. Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'ne ve tez çalışmasının yürütülmesini 1150052 no'lu 1003 projesi ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

Son olarak çalışmalarım boyunca beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1.Ksilan	4
2.1.1.Ksilanın yapısı	4
2.1.2.Ksilanın çeşitleri	4
2.1.3.Ksilanın enzimatik hidrolizi	6
2.2.Ksilanaz Enzimi	6
2.2.1.Ksilanaz enziminin sınıflandırılması	7
2.2.2.Ksilanaz enzimi üreten mikroorganizmalar	8
2.2.3.Ksilanaz enzimi uygulama alanları	12

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.4.Ksilanaz enzimi üretimi	16
2.3.Ölçek Büyütme	23
2.3.1.Reaktör tasarım parametreleri	23
2.3.2.Katı kültür fermentasyonunda kullanılan biyoreaktörler	24
3.MATERYAL VE METOT	28
3.1.Materyal	28
3.1.1.Mikroorganizma	28
3.1.2.Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve kimyasallar	28
3.1.3.Kullanılan cihazlar	30
3.2.Metot	32
3.2.1. <i>Aspergillus niger</i> spor solüsyonunun hazırlanması	32
3.2.2.Erlenmayerde üretim	32
3.2.3.Biyoreaktör üretimleri	35
3.2.4.Enzim ekstraksiyonu	36
3.2.5.Enzim aktivitesi tayini	36
3.2.6.Protein tayini	38

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.7.Nem tayini	38
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1.Erlenmayerde Üretim	39
4.1.1.Karbon kaynağı seçimi	39
4.1.2.Başlangıç nem oranının belirlenmesi	41
4.1.3.Azot kaynağı seçimi	45
4.1.4.İki farklı karbon kaynağının ve iki farklı azot kaynağının yüzsdesel oranlarının belirlenmesi	47
4.1.5.Buğday kepeği, yulaf kepeği ve malt çimi yüzsdesel oranlarının belirlenmesi	52
4.1.6.İnorganik azot kaynağı olarak kullanılacak (NH ₄) ₂ HPO ₄ miktarının belirlenmesi	54
4.1.7. Farklı başlangıç nem oranlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi	56
4.2.Biyoreaktörde Üretim	58
4.2.1.Tepsili biyoreaktörde inokulasyonun ksilanaz üretimine etkisi	58
4.2.2.Biyoreaktörde havalandırma hızının ksilanaz üretimine etkisi	62
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	66

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

KAYNAKLAR DİZİNİ68

ÖZGEÇMİŞ77



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Ksilopiranosil rezidüleri ile birlikte β -1,4-ksilan yapısı	4
2.2. Arobinoksilan yapısı	5
2.3. Ksilanolitik enzimlerin etkilediği ksilan bölgeleri	6
2.4. KKF nin özelliklerini gösteren sistem	20
2.5. Tepsili biyoreaktörlerin şematik gösterimi	25
2.6. Tepsili biyoreaktörde kütle ve ısı transferi	26
2.7. Döner tamburlu biyoreaktör	26
2.8. Kolon biyoreaktör	27
3.1. Tepsili biyoreaktör (A) ve tepsileri (B)	35
4.1. Katı kültür fermentasyonu üretimlerinde kullanılan karbon kaynaklarının 5 ve 12 no'lu suşlar için ksilanaz üretim performansları	40
4.2. 5 no'lu <i>A. niger</i> ile üretimlerde kullanılan karbon kaynaklarının farklı başlangıç nem değerlerinin ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi	42
4.3. 12 no'lu <i>A. niger</i> ile üretimlerde kullanılan karbon kaynaklarının farklı başlangıç nem değerlerinin ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi	42
4.4. Buğday kepekli ortamda farklı azot kaynaklarının ksilanaz üretimine etkisi	45
4.5. Faktöryel tasarımda teorik değere karşı gerçek değer grafiği.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.6. Azot kaynağı (a) ve karbon kaynağı (b) konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi	50
4.7. Yüzde 100 DAHF yüzde oranı seçildiğinde karbon kaynağı yüzde oranlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi	51
4.8. Karbon kaynağı yüzdesel oranlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi	52
4.9. Üretim ortamına eklenen $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ yüzde oranlarının (ağırlık DAHF/ağırlık kuru substrat) ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi	55
4.10. Farklı başlangıç nem değerlerinde ksilanaz aktiviteleri (U/g kuru substrat)	56
4.11. Tepsili biyoreaktörde 0.1 ml /g substrat spor inokulasyonu ile üretim	58
4.12. Tepsili biyoreaktörde 0.2 ml /g substrat spor inokulasyonu ile üretim	59
4.13. Tepsili biyoreaktörde 0.4 ml /g substrat spor inokulasyonu ile üretim	60
4.14. Tepsili biyoreaktörde 2.5 L/dk havalandırma hızı ile üretim	62
4.15. Tepsili biyoreaktörde 5 L/dk havalandırma hızı ile üretim	63
4.16. Tepsili biyoreaktörde 10 L/dk havalandırma hızı ile üretim	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Çeşitli bakteriyel kaynaklardan üretilen ksilanazların karakteristik özellikleri	9
2.2. Çeşitli fungal kaynaklardan üretilen ksilanazların karakteristik özellikleri ...	10
2.3. Ksilanazların endüstriyel uygulamaları ve ticari üreticileri	13
2.4. Farklı mikroorganizmaların çeşitli substratlar ile ksilanaz üretimi	18
3.1. Ksiloz kalibrasyon grafiğinin hazırlanması	37
4.1. Ksilanaz üretiminde kullanılan substratların elde edildiği tarımsal ürünlerin Türkiye’de üretim miktarları 2016 yılı verileri	39
4.2. Katı kültür fermentasyonu üretimlerinde kullanılan karbon kaynaklarının 5 ve 12 no’lu suşlar için ksilanaz enzim aktiviteleri (U/ml ekstrakt, U/g kuru substrat)	40
4.3. Tarımsal atıkların nem içerikleri	41
4.4. Katı kültür fermentasyonu ile ksilanaz üretimlerinde kullanılan karbon kaynaklarının 5 ve 12 no’lu suşlar için farklı başlangıç nem oranlarında ksilanaz enzim aktiviteleri (U/ml ekstrakt, U/g kuru substrat)	43
4.5. Buğday kepekli ortamda farklı azot kaynaklarının ksilanaz üretimine etkisi	46
4.6. Tek faktörlü tesadüf parselleri modelinden elde edilen sonuçlar	46
4.7. Genel Faktöryel Tasarım Programında denemeye alınan kombinasyonlar ...	47

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.8. Design Expert programı kullanılarak yapılan denemeden elde edilen yanıtlar	48
4.9. Varyans analizi (ANOVA)	49
4.10. ‘İki faktörlü Tesadüf Parselleri’ modeline göre yapılan varyans analizi sonuçları	51
4.11. Karbon kaynağı yüzdesel oranlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi	53
4.12. Malt çiminin içeriği	54
4.13. Üretim ortamına eklenen $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ yüzde oranlarının (ağırlık DAHF/ağırlık kuru substrat) ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi	55
4.14. Farklı başlangıç nem değerlerinde ortalama ksilanaz aktiviteleri (U/ml ekstrakt, U/g kuru substrat) ve pH değerleri	56
4.15. Tepsili biyoreaktörde 0.1 ml /g substrat spor inokulasyonu ile üretim aktivite (U/g kuru substrat), protein (mg/g kuru substrat) ve nem oranı (%) sonuçları	58
4.16. Tepsili biyoreaktörde 0.2 ml /g substrat spor inokulasyonu ile üretim aktivite (U/g kuru substrat), protein (mg/g kuru substrat) ve nem oranı(%) sonuçları	60
4.17. Tepsili biyoreaktörde 0.4 ml /g substrat spor inokulasyonu ile üretim aktivite (U/g kuru substrat), protein (mg/g kuru substrat) ve nem oranı (%) sonuçları	61

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.18. Tepsili biyoreaktörde 2.5 L/dk havalandırma hızı ile üretimin aktivite (U/g kuru substrat), protein (mg/g kuru substrat) ve nem oranı (%) sonuçları	62
4.19. Tepsili biyoreaktörde 5 L/dk havalandırma hızı ile üretimin aktivite (U/g kuru substrat), protein (mg/g kuru substrat) ve nem oranı (%) sonuçları	63
4.20. Tepsili biyoreaktörde 10 L/dk havalandırma hızı ile üretimin aktivite (U/g kuru substrat), protein (mg/g kuru substrat) ve nem oranı (%) sonuçları	64
5.1. Erlenmayer ve biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu (KKF) ile ksilanaz enzimi üretimi optimizasyon parametreleri ve elde edilen aktivite değerleri (U/g kuru substrat)	66



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
kDa	Kilodalton
pI	İzoelektrik noktası
°C	Santigrat derece
U	Enzim ünitesi
g	Gram
L	Litre
ml	Mililitre
M	Molarite
N	Normalite
dk	Dakika
ClO ₂	Klor dioksit
Cl ₂	Klor gazı
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Diamonyum hidrogen fosfat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
NH ₄ NO ₃	Amonyum nitrat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
KKF	Katı kültür fermentasyonu
VO	Vogel ortamı
DAHf	Diamonyum hidrojen fosfat



1. GİRİŞ

Enzimler, metabolik süreçleri hızlandıran spesifik yapı taşlarıdır. Reaksiyon hızını 10 milyondan 10 trilyon kata kadar hızlandırabilirler. Rekombinant teknoloji ve protein mühendisliği sayesinde enzimlerin çeşitli endüstriyel ve tıbbi amaçlarla kullanımı yaygınlaşmıştır. Hızla gelişen enzim teknolojisiyle beraber mikrobiyal enzimler ilgi odağı haline gelmiştir. Mikrobiyal enzimler ekonomik oluşu, yüksek verimi, sürekliliği, ürün modifikasyonu ve optimizasyonunun kolaylığı, mikrobiyal büyümenin kolaylığı, stabilite ve yüksek katalitik aktivite gibi avantajları sayesinde, gıda, içecek, temizlik, tekstil, kağıt, yakıt, ilaç gibi birçok biyoteknolojik alanda anahtar rol oynar (Gurung et al., 2013).

Endüstriyel enzimler açısından 2014 yılı için yaklaşık 4.2 milyar dolar olarak hesaplanan küresel piyasanın 2015-2020 yılları arasında yaklaşık %7 yıllık büyüme oranıyla 6.2 milyar dolara ulaşacağı öngörülmektedir (Singh et al., 2016). 2050 yılına kadar dünya nüfusunun 6.9 milyardan 9.1 milyara yükseleceği ve gıda talebinin %70 artacağı belirtilmektedir (Birleşmiş Milletler Ekonomi ve Sosyal Daire Başkanlığı, http://www.un.org/waterforlifedecade/food_security.shtml). Mevcut durumda endüstriyel enzim pazarında gıda ve içecek alanı baskındır ve 2020 yılında 2.3 milyar dolar değerinde olacağı düşünülmektedir (Singh et al., 2016). Kaliteli gıda ihtiyacının karşılanması enzimlerin, aroma, renk, tekstür ve besin değeri yüksek gıda üretimi için kullanılması ile başarılacaktır (Neidleman 1984).

Ksilan, β -1,4 bağlı D-ksilopiranosil kısımlarını içeren hemiselüloz yapılarından biridir. Ksilanın hidrolizi endo- β -1,4-ksilanaz ve β -D-ksilosidaz hidrolitik enzimleri sayesinde başılır (Nigam, 2013). Ksilanazların sınıflandırılması için çeşitli yöntemler kullanılsa da, Karbonhidrat-Aktif Enzim (CAZy) veritabanına göre ksilanazlar (EC 3.2.1.8), glikosid hidrolaz (GH) ailesi 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 ve 62 olarak sınıflandırılabilir (Collins et al., 2005).

Ksilanaz enzimi üretiminde tarım sınai atıkları ucuzluğu, kolay bulunabilirliği ve enzim üretimine uygunluğu sayesinde hammadde olarak tercih edilir. Lignosellozik maddeler, lignin, selüloz, hemiselüloz, pektin yapılarını içermesinden ötürü geçen birkaç on yıl boyunca ucuz bir hammadde olarak enzim üretiminde kullanılmıştır. Gıda endüstrisi tarafından açığa çıkarılan atıkların çoğu yiyecek olarak tüketilemeyen lignoselülozik atıktır. Gerektiğinde uygun ön

işlemler ile bu atıklar mikroorganizmalardan enzim üretiminde kullanılabilen hammaddeler haline gelirler (Ravindran and Jaiswal, 2016).

Ksilanaz enziminin birçok çalışmada fungus, bakteri, maya, deniz yosunu, kabuklu deniz canlısı, salyangoz gibi kaynaklardan üretildiği gösterilmiştir. Fakat ana kaynak olarak ksilanazlar fungal ve bakteriyel kaynaklardan üretilir. Kaynağa göre özellikleri değişen ksilanazlar birbirinden farklı birçok endüstriyel uygulama için kullanılır (Mandal, 2015; Burlacu et al., 2016).

Ksilanazların ilk olarak 1980'li yıllarda hayvan yemi katkısı olarak ve sonrasında gıda, tekstil kağıt endüstrilerinde kullanımına başlanmıştır. Mevcut durumda selülozlar ile birlikte ksilanazlar dünya enzim pazarının %20'sini oluşturmaktadır (Polizeli et al, 2005). Ksilanaz enzimlerinin günümüzde kağıt, hayvan yemi, biyoyakıt, gıda katkısı, meyve suyu, bira ve ekmekçilik endüstrisi gibi geniş bir uygulama alanı mevcuttur. Türkiye'de genel olarak gıda endüstrisinde alt sektör dağılımlarına bakılırsa un ve unlu mamuller gıda sanayinin %65'ini oluşturmakta, günlük üretilen 82 milyon ekmeğin 77 milyon 340 bini tüketilmektedir (Demiraslan, 2013).

Ekmekçilik endüstrisinin gelişimine paralel olarak ksilanolitik enzimlerin ekmekçilik endüstrisindeki rolü ve önemi son yirmi otuz yıllık süreçte artmıştır. Buğday ununda bulunan pentozanlar (arobinoksilan, beta glukon vb.) ekmek yapımını önemli derecede etkilemektedir. Arobinoksilanlar, sınıflandırılırken suda ekstrakte olabilme özellikleri dikkate alınmaktadır. Suda ekstrakte olan arobinoksilanlar, hamurdaki gluten ağ yapısını geliştirerek, hamurun gaz tutma kapasitesini ve stabilitesini arttırırken, suda ekstrakte olmayan arobinoksilanlar ise çözünür özellik kazanmaları durumunda, absorbladıkları suyun bir kısmını serbest hale geçirirler ve buna bağlı olarak suyun hamur içindeki dağılımını iyileştirmektedir (Saeed et al., 2011). Ksilanaz enzimi ksilanın β -1,4-glikozidik bağlarını rastgele bir şekilde parçalayabilmektedir. Bu sebeple ksilanazlar buğday ununda bulunan pentozanları parçalayarak hamurdaki polisakkarit yapısını kırmakta, böylelikle ekmek yapımında olumlu etkilerini göstermektedir. Ksilanazlar, hamurun reolojik özelliklerini iyileştirmekte, daha yumuşak ve daha kolay bir yoğurulma sağlamaktadır (Camacho and Aguilar, 2003; Ahmad, 2009). Ksilanaz enzimi, hamurun sertliğini azaltarak hacmini arttırmakta ve tekdüze ekmek kırıntısı oluşumunu sağlamaktadır. Bunun yanında hamurun işlenebilirliğini artırarak, ekmek üretiminde kullanılan makine parçalarına zarar vermesi önlenmekte ve bu sayede üretim koşullarının iyileşmesi sağlanmaktadır

(Ahmad, 2009). Ekmekçilik sektöründe kullanılan ksilanaz enzimi, genellikle D-ksiloz içeren substratlara etki eden GH11 ksilanaz ailesinde yer almaktadır (Biely et al., 1997).

Bu çalışmada öncelikli olarak unlu mamuller sektörüne yönelik ksilanaz enziminin (endo- β -1,4-ksilanaz) katı kültür fermentasyonu yolu ile üretimi amaçlanmıştır. Ksilanaz enziminin katı kültür fermentasyonu ile üretim koşullarının optimizasyonun sağlanması için, çeşitli tarımsal atıklar (Buğday kepeği, yulaf kepeği, pirinç kepeği, mısır koçanı, talaş, malt çimi) substrat olarak kullanılmış, bunun yanında gerekli azot kaynağı ve miktarı belirlenmiş, başlangıç nem oranının ksilanaz üretimine etkisi incelenmiştir. Laboratuvar ölçeğinde tepsili biyoreaktörde inokulasyon ve havalandırmanın ksilanaz enzimi üretimine etkisi çalışılmıştır.

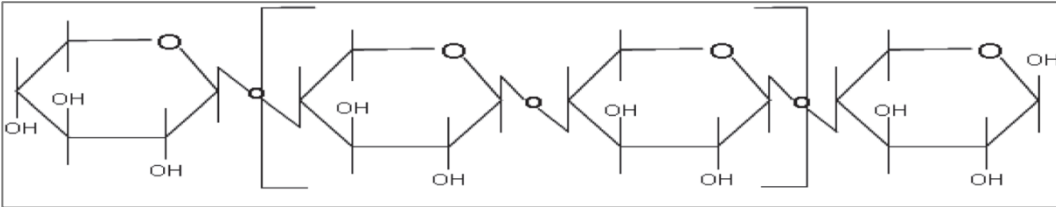
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Ksilan

Ksilan, heterojen yapıda, lineer olarak β -1,4-D-ksilopiranosil rezidüleri ve kısa yan zincir dallanmalarından oluşan bir polisakkarittir (Bajaj and Manhas, 2012; Petzold-Welcke et al., 2014). Selüloz, hemiselüloz (çoğunlukla ksilan) ve ligninden oluşan bitki hücre duvarında en bol bulunan ikinci polisakkarittir (Butt et al., 2008; Ahmad, 2009).

2.1.1. Ksilanın yapısı

Ksilan doğal olarak yapısında glukoz, ksiloz, mannoz galaktoz arobinoz, fukoz, glukuronik asit ve galaktronik asit bulundurabilen kompleks bir heteropolimerdir (Heinze et al., 2003). Ksilan alındığı kaynaklara göre içerdiği bileşiklerin oranı değişebilir. Birchwood ksilanı %89.3 ksiloz, %1 arobinoz, %1.4 glukoz %8.3 anhidrouronik asit içerirken, buğday arobinoksilanı %65.8 ksiloz, %33.5 arobinoz, %0.1 mannoz, %0.1 galaktoz ve %0.3 glukoz içerir (Mandal, 2015). Ksilanın yapısı orjinine göre ne kadar değişiklik gösterirse gösterebilir α -1,4-D-ksiloz iskeletinin taşıyıcıdır. Lignin ksilana ester bağı ile bağlanır ve farklı yapıların ksilan iskeletine bağlanmasıyla çeşitli ksilan yapıları ortaya çıkmış olur (Butt et al., 2008).



Şekil 2.1. Ksilopiranosil rezidüleri ile birlikte β -1,4-ksilan yapısı (Butt et al., 2008).

2.1.2. Ksilanın çeşitleri

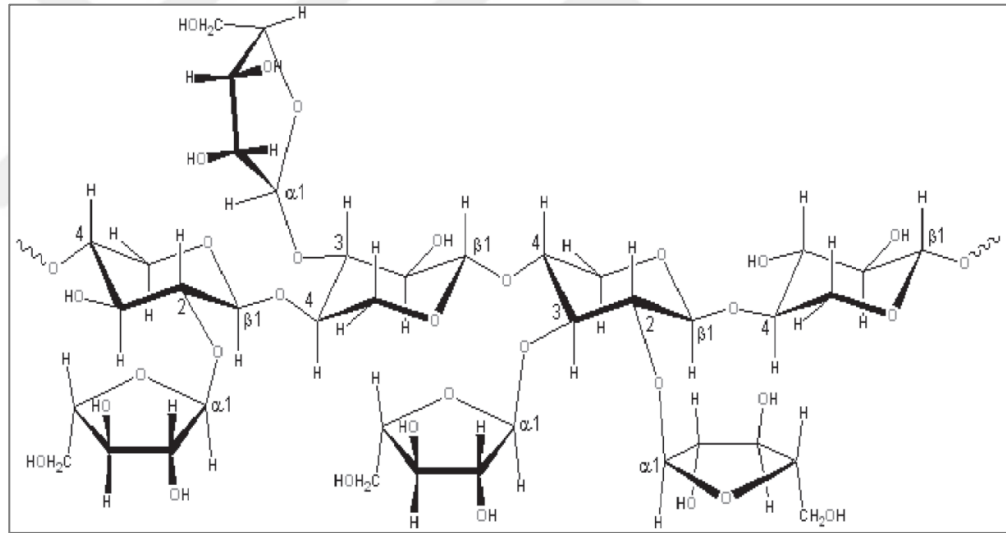
Ksilan iskeletinde bulunan yaygın altbirimlere göre ksilan homoksilan, arobinoksilan, glukuronoksilan, glukuronoarobinoksilan veya galaktoglukuronoarobinoksilan olarak kategorize edilebilir. Homoksilanlar sadece ksilosil zincirlerinden oluşur fakat doğada yaygın değildir. Hasır otu, sakız tohumu (guar seed husks), tütün sapı gibi sınırlı kaynaklardan elde edilir (Sunna and Antranikian, 1997). Arobinoksilanlar yan zincir olarak α -L-arobinofuranosil altbirimlerine sahiptir. Özel durumlarda hububatlar, ksilosil rezidüleri ile beraber arobinosil alt birimlerine sahiptir. Glukuronoksilanlar alt birim olarak α -D-glukuronik asit veya onun 4-O-metil eterine sahiptir. Glukuronoarobnoksilan α -

D-glukuronik asid veya onun 4-O-metil eterine ek olarak α -L-arabinoz yapısını içerir. Galaktoglukuronoarobinoksilanlar ise kompleks oligosakkarit zincirlerinin üzerinde β -D-galaktopiranosil dallanmalarından oluşur ve genellikle çok yıllık bitkilerde bulunur (Motta et al., 2013).

Ksilan yan zincirlerindeki heterojenite, çözünürlük, fiziksel özellikler diğer hemiselülozik bileşikler ile bağlanma ve enzimatik parçalanma gibi özelliklerini etkiler. Örneğin, tek yıllık bitkilerde bulunan endospermik arabinoksilanlar (pentozanlar) ın dallanma yapılarından ötürü suda ve alkali çözeltilerde çözünürlüğü, lignoselülozik ksilanlara göre yüksektir (Kulkarni et al., 1999).

2.1.2.1. Arobinoksilan

Arobinoksilanlar, β -(1-4)-bağlı D-ksilopiranozil (Xylp) moleküllerine A-L-arobinofuranosil moleküllerinin eklenmesiyle oluşmuş bir yapıdır (Izydorczyk and Dexter, 2008).



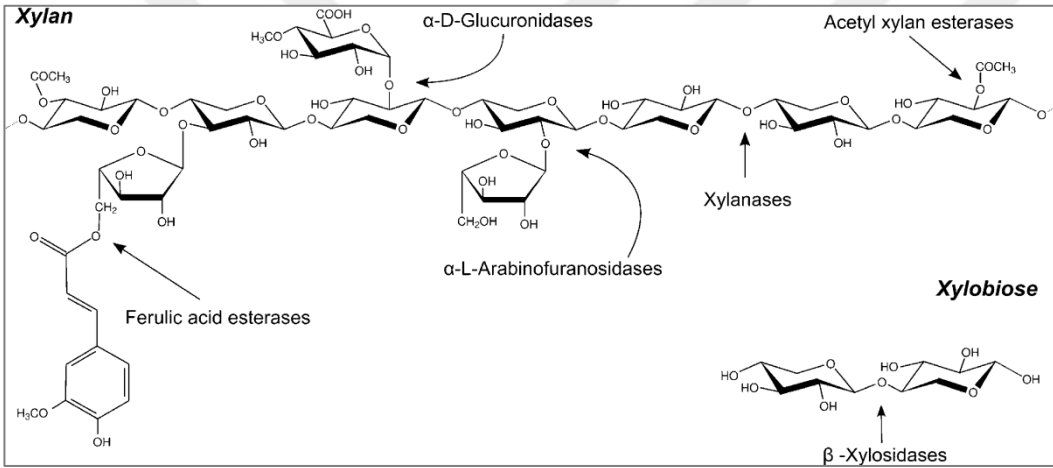
Şekil 2.2. Arobinoksilan yapısı (Butt et al., 2008).

Suda ekstrakte edilebilir arabinoksilan ve suda ekstrakte edilemeyen arabinoksilan olarak sınıflandırılabilirler. Genellikle molekül ağırlıkları değişiklik gösterebilir. Buğdayda bulunan arabinoksilanın molekül ağırlığı 65-66 KDa iken, arpada bulunanın molekül ağırlığı 500 KDa civarındır (Saeed et al., 2011).

Arobinoksilanlar su ile etkileşimlerinden, diğer arabinoksilan molekülleri ve proteinler ile yaptığı çapraz bağlanmalardan ötürü unun kalitesinde önemli bir rol oynar (Saeed et al., 2011).

2.1.3. Ksilanın enzimatik hidrolizi

Heterojen ve karmaşık kimyasal yapısından ötürü ksilanın yıkımı, çeşitli hidrolitik enzimlerin özgül etkileşimleri ile meydana gelir. Ksilan hidrolizi, endoksilanaz (endo-1,4- β -ksilanaz, E.C.3.2.1.8), β -ksilosidaz (ksilan-1,4- β -ksilosidaz, E.C.3.2.1.37), α -glukuronidaz (α -glukosiduronaz, E.C.3.2.1.139), α -arabinofuranosidaz (α -Larabinofuranosidaz, E.C.3.2.1.55) and asetilksilan esteraz (E.C.3.1.1.72) enzimlerini içeren ksilanotik enzim sisteminin çalışmasıyla gerçekleşir. Şekil 2.3 ksilanolitik enzimlerin etkilediği ksilan bölgelerini göstermektedir. Bu enzimlerin tümü ksilanı bileşenlerine parçalar. Bütün ksilanazlar içerisinde endoksilanazlar, glikosidik bağların parçalanması ve kısa ksilooligosakkaritlerin ortaya çıkmasında rol oynar (Verma and Satyanarayana, 2012).



Şekil 2.3. Ksilanolitik enzimlerin etkilediği ksilan bölgeleri (Pastor et al., 2007).

2.2. Ksilanaz Enzimi

Ksilanazlar, moleküler ağırlığı 6-80 kDA aralığında değişen ve pH=4.5-6.5, 40-60 °C sıcaklıkta aktif olan tek zincirli glikoproteinlerdir (Butt et al., 2008). Bir glikosid hidrolaz ailesi üyesi olarak ksilanazlar glikosidik bağın (β -1,4) hidrolizini katalizleyebilen enzimlerdir (Motta et al., 2013).

Ksilanazlar (endo-1,4- β -ksilanaz, EC 3.2.1.8), ksilan iskeletini daha küçük oligosakkaritlere parçalar. Ksilan hidrolizi için anahtar enzimler olan ksilanazların ksilan polimeri boyunca spesifitesi değişebilir. Bir kısmı sadece değişmeyen bölgelerde parçalama yaparken bir kısmı da yan zincirlere etki eder. Birçok ksilanazın ise ksilooligomer affinitesi daha yüksektir (Pastor et al., 2007).

2.2.1. Ksilanaz enziminin sınıflandırılması

Ksilanazların sınıflandırılması çeşitli yöntemler ile yapılmıştır. Bunlar fizikokimyasal özelliklerine göre sınıflandırma (Wong et al., 1988), kristal yapıya göre sınıflandırma (Jeffries, 1996) ve kinetik özelliklere veya substrat özgülüğüne göre sınıflandırma olarak ayrılabilir.

Fizikokimyasal sınıflandırmaya göre ksilanazlar iki gruba ayrılır: Düşük moleküler ağırlıklı (<30 kDa) ve bazik pI'ya sahip ksilanazlar, yüksek moleküler ağırlıklı ve asidik pI'ya sahip ksilanazlar. Fizikokimyasal özelliklerine göre sınıflandırma tüm ksilanazları yeteri kadar tanımlayamaz, bazı istisnalar olabilir, çünkü bütün ksilanazlar aynı zamanda yüksek moleküler ağırlığa ve düşük pI ya veya düşük moleküler ağırlığa ve yüksek pI ya sahip olmayabilir. Bu sebeple enzimin hem birincil yapısını hemde katalitik bölgelerini inceleyen daha eksiksiz bir sistem tanımlanmıştır (Motta et al., 2013).

Enzimlerin özellikleri ve sınıflandırılması hakkında güncellenmiş bilgiler, Karbonhidrat-Aktif Enzim (CAZy) veritabanı ile bulunabilir. Bu, karmaşık karbonhidratları ve gliko-konjugatları üreten ve parçalayan enzimler üzerine uzmanlaşmış bilgi temelli bir kaynaktır. Bu veri tabanı, enzimlerin genetik dizi açıklamaları, aile sınıflamaları ve bilinen işlevleri ile ilgili bilgileri içerir. CAZy veritabanına göre ksilanazlar (EC3.2.1.8), glikosid hidrolaz (GH) ailesi 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 ve 62 olarak sınıflandırılabilir. GH 16, 51 ve 62 aileleri, biri endo-1,4-β-ksilanaz aktivitesinden tamamen farklı iki katalitik bölgeye sahip çift işlevli enzimlerdir (Collins et al., 2005).

GH 10 ve 11 olarak tanımlanan ksilanaz aileleri amino asit dizisi benzerlikleri ve katalitik bölgelerin hidrofobik kümelerinin analizleri temel alınarak ayrılmışlardır (Verma and Satyanarayana, 2012). Bu iki ailenin üyeleri ayrıntılı olarak incelenmiş olsa da, geri kalan ailelerin üyelerinin katalitik özellikleri (5, 7, 8 ve 43) yeni ve çok sınırlı kalmaktadır (Motta et al., 2013).

2.2.1.1. GH 10 ve GH 11 ksilanaz ailesi

GH10 ailesine ait ksilanazlar düşük moleküler ağırlığa, pI=8-9.5 değerine sahipken GH11 ailesine ait ksilanazlar yüksek moleküler ağırlığa, düşük pI değerine sahiptirler. Glikosid hidrolaz ailesi 10 endo-1,4-β-ksilanaz ve endo-1,3-β-ksilanaz (EC 3.2.1.32)'dan oluşur. Bu ailenin üyeleri ayrıca ksilobiyoz ve ksilotriozda bulunan aril β-glikositlere etki ederler. Üstelik bu enzimlerin kısa

ksilooligosakkaritler üzerinde yüksek aktivitesi vardır. Kristal yapı analizlerine göre GH10 ailesi 4 veya 5 substrat bağlama bölgesine sahiptir. Bu ailenin üyeleri (α/β)8-barrel katlanmasında yüksek moleküler ağırlık, düşük pI değerine sahiptir (Biely et al., 1997).

Diğer ksilanazlar ile karşılaştırıldığında GH11 ailesi üyeleri, yüksek substrat seçiciliği ve katalitik verim, küçük boyut ve çeşitli optimum pH ve sıcaklık değerleriyle ilgi çekici özelliklere sahiptir. Bu özellikler GH11 ailesi üyelerini çeşitli koşullar ve uygulamalar için uygun hale getirir (Paes et al., 2012).

GH11 ailesi sadece endo-1,4- β -ksilanazlardan oluşur, bu sebeple bu ailenin üyeleri ‘gerçek ksilanazlar’ olarak adlandırılır. Genellikle D-ksiloz içeren substratlar üzerinde etkili olan bu enzimler yüksek pI, düşük moleküler ağırlık, yer değiştirmeli katalitik mekanizma, katalitik özelliğe iki glutamat ve β -jelly roll katlanmaya sahiptirler (Biely et al., 1997).

Buna ek olarak GH10 ailesi gibi ksilobiyoz ve ksilotriozda bulunan aril β -glikositlere de etki ederler fakat farklı olarak en az yedi substrat bağlama bölgesiyle uzun zincirli oligosakkaritler üzerinde aktiftirler (Motta et al., 2013).

2.2.2. Ksilanaz enzimi üreten mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar, biyolojik olarak aktif ürünleri sentezlemeleri, yüksek hızda çoğalmaları ve insanlar tarafından kontrol edilebilmeleri sebebiyle enzim üretimi için iyi kaynak olarak kabul edilirler (Gote, 2004). Mikrobiyal ksilanazlar yüksek özgülük, ılımlı reaksiyon koşulları, ihmal edilebilir substrat kaybı ve yan ürün oluşumu sebebiyle ksilan hidrolizi için katalizör olarak tercih edilirler (Kulkarni et al., 1999; Qinnge et al., 2004).

1960’lardan itibaren mikrobiyal ksilanazlar ile ilgili çeşitli bildirimler yapılmış olmasına rağmen, 1982 den beri birçok fungal ve bakteriyel mikroorganizmanın ksilan hidrolizi için 1,4- β -D endoksilanaz (E.C. 3.2.18) and β -ksilosidaz (EC.3.2.1.37) sentezlediği rapor edilmiştir (Esteban et al., 1982).

Birçok çalışmada fungus, bakteri, maya, deniz yosunu, kabuklu deniz canlısı, salyangoz gibi kaynaklardan ksilanaz üretildiği gösterilmiştir. Fakat ksilanazlar temel olarak fungal ve bakteriyel kaynaklardan üretilmektedir. Kaynağa göre özellikleri değişen ksilanazlar çeşitli endüstriyel uygulamalar için kullanılmaktadır (Mandal, 2015; Burlacu et al., 2016).

2.2.2.1. Bakteriyel kaynaktan ksilanaz enzimi üretimi

Bacillus, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Pseudoxanthomonas* ve *Rhodothermus* gibi bakteri cinsleri (Beg et al., 2001; Gupta and Kar, 2008; Bajaj and Manhas, 2012; Chapla et al., 2012), *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nonomuraea* gibi aktinomiset grupları (Prakash et al., 2013) yaygın bir şekilde ksilanaz üreticisi olarak rapor edilmiştir. Bakteri ve aktinomisetlerden üretilen ksilanazların etkin pH aralığı 5-9, sıcaklık aralığı 35-60 °C arasında değişmektedir (Beg et al., 2001).

Endüstriyel uygulamalarda alkali tolerans ve termostabilite özelliklerinden dolayı bakteriyel ksilanazlar ilgi çekmektedir. *Bacillus spp.* ile yapılan çalışmalarda alkali pH ve yüksek sıcaklık değerlerinde ksilanaz aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür (Subramaniyan et al., 1997).

Çizelge 2.1. Çeşitli bakteriyel kaynaklardan üretilen ksilanazların karakteristik özellikleri (Mandal, 2015).

Mikroorganizma	Moleküler ağırlık kDa	Optimum pH	Optimum sıcaklık
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	41	5.0	65
<i>Bacillus sp. W-1</i>	21.5	6.0	65
<i>Bacillus circulans WL-2</i>	15	5.5-7.0	-
<i>Bacillus sterothermophilus T-6</i>	43	6.5	55
<i>Bacillus sp. strain BP-7</i>	22-120	6.0	55
<i>Bacillus sp. BP-23</i>	32	5.5	50
<i>Bacillus polymyxa CECT 153</i>	61	6.5	50
<i>Bacillus sp. BPK-1</i>	23	5.5	60
<i>Bacillus sp. NG-27</i>	-	7, 8.4	70
<i>Bacillus sp. SPS-0</i>	-	6.0	75
<i>Bacillus sp. AR-009</i>	23, 48	9-10	60-75
<i>Bacillus sp. NCIM 59</i>	15.8, 35	6.0	50-60
<i>Cellulomonas fimi</i>	14-150	5-6.5	40-45
<i>Cellulomonas sp. 2353</i>	22, 33, 53	6.5	55
<i>Micrococcus sp. AR-135</i>	56	7.5-9	55
<i>Staphylococcus sp. SG-13</i>	60	7.5, 9.2	50
<i>Thermoacetobacterium sp. JW/SLYS 485</i>	24-18	6.2	80
<i>Thermotoga maritiana MSB8</i>	40, 120	5.4, 6.2	92-105

2.2.2.2. Fungal kaynaktan ksilanaz enzimi üretimi

Funguslar (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp.) yüksek verim ve ekstrasellüler enzim üretimi açısından önemli ksilanaz üreticileridir (Nair et al., 2008). Ksilanazlara ek olarak funguslar ksilanın parçalanması için gerekli çeşitli yardımcı enzimleri de salgırlar (Polizeli et al., 2005). Çizelge 2.2 'de çeşitli fungal kaynaklardan üretilen ksilanazların özellikleri verilmiştir.

Beyaz çürükçül funguslar ayrıca geniş bir hemiselülozik maddeye etki eden bir ekstrasellüler ksilanaz üreticisidir (Qinnghe et al., 2004). Böylece gıda kaynağı olarak avantajları varken aynı zamanda ilaç, kozmetik veya gıda sanayinde kullanılabilecek çeşitli metabolitleri de ortaya çıkarabilir (Buswell and Chang, 1994).

Çizelge 2.2. Çeşitli fungal kaynaklardan üretilen ksilanazların özellikleri (Polizeli et al., 2005).

Mikroorganizma	Moleküler ağırlık (kDa)	Optimum pH	Optimum sıcaklık
<i>Aspergillus aculeatus</i>	18, 26, 52	50, 50, 70	4.0, 4.0, 5.0
<i>Aspergillus awamori</i>	39, 23, 26	45–55	4.0–5.5
<i>Aspergillus fischeri</i>	31	60	6.0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	19, 8.5	55	5.5
<i>Aspergillus kawachii</i>	35, 26, 29	60, 55, 50	5.5, 4.5, 2.0
<i>Aspergillus nidulans</i>	22, 34	62, 56	5.5, 6.0
<i>Aspergillus nidulans</i> KK-99	ND	55	8.0
<i>Aspergillus oryzae</i>	35	60	5.0
<i>Aspergillus sojae</i>	33, 36	60, 50	5.0, 5.5
<i>Aspergillus</i> sp.	26	50	5.0
<i>Aspergillus sydowii</i>	33	50	4.0
<i>Aspergillus terreus</i>	ND	50	7.0
<i>Aspergillus versicolor</i>	19	55	6.0
<i>Acrophialophora nainiana</i>	22	55	7.0
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	25, 47, 57	50	5.0–7.0
<i>Cryptococcus</i> sp	22	40	2.0
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	20.8, 23.5	60, 55	6.0
<i>Myceliophthora</i> sp.	53	75	6.0
<i>Penicillium brasilianum</i>	31	ND	ND
<i>Penicillium capsulatum</i>	22	48	3.8
<i>Penicillium</i> sp.	25	50	2.0
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	ND	70–75	4.0–5.0

Fungal alemde çoğunlukla ksilanaz ve β -D-ksilosidaz enzimlerini birlikte üreten *Aspergillus* cinsine ait olan organizmalar literatürde iyi tanımlanmış ve endüstriyel uygulamaları olan mikroorganizmalardır (Wang et al., 2003; Romanowska et al., 2006). Flamentöz funguslar bakteri ve mayalardan üretilen enzimlere göre yüksek aktiviteli ve ekstraselüler enzim üretimi bakımından endüstriyel açıdan önemlidir. Ksilan parçalayan enzimler ile ilgili çalışmalar çeşitli mikroorganizmalar ile devam edilerek geliştirilmektedir (Wang et al., 2003).

Fakat fungal kaynaklı ksilanazların bazı özellikleri sebebiyle endüstriyel uygulamaları zordur. Birçok ksilanaz 50°C'nin altında ve 4-6 pH aralığında etkindir. Bu sebeple alkali pH ve 60 °C nin üstünde çalışılan kağıt endüstrisi gibi alanlarda fungal ksilanazlar kullanılamayabilir (Beg et al., 2000).

Termofilik funguslar yüksek sıcaklıklarda tarımsal materyaller, kompostlar üzerinde gelişebilen bir mikroorganizma grubudur. Kompostlar üzerinde gelişebilmesiyle bitki hücre duvarını parçalayan enzimleri üretmesi mümkündür. Bu sayede endüstride kağıt sektöründe kullanılabilir alkaline aktif ksilanazlar üretilir (Subramanian and Prema, 2002).

Fungal ksilanazlar genellikle selülozlar ile ilişkilidir. Selülozik substrat içeriğinde hemizelüloz olduğundan bu suşlar hem selülaz hemde ksilanaz üretirler. Bu problem ksilan içeriği yoğun karbon kaynağı kullanılarak çözülebilir (Subramanian and Prema, 2000).

Funguslarla ilgili diğer bir problem ise biyoreaktör çalışmalarında ksilanaz veriminin düşük olmasıdır. Karıştırma genellikle ortamın homojenitesini sağlarken fermentörde oluşan kayma gerilimi kuvvetleri fungal biyokütleye zarar verebilir. Yüksek karıştırma hızları ayrıca hiflerin parçalanmasına ve ksilanaz aktivitesinin azalmasına sebep olabilir (Mandal, 2015).

2.2.2.3. Genetik modifiye kaynaktan ksilanaz enzimi üretimi

Endüstriyel uygulamalarda, geniş pH ve sıcaklık aralığında stabil olan, yüksek spesifik aktiviteye ve çeşitli kimyasallara karşı dirence sahip bunun yanında maliyeti düşük, çevre dostu ve kullanımı kolay ksilanaz enzimi ihtiyacı doğmuştur (Qiu et al., 2010; Taibi et al., 2012). Bu sebeple moleküler yaklaşımlar ile istenen özellikler çerçevesinde ksilanaz tasarımları yapılmıştır (Verma and Satyanarayana, 2012).

Rekombinant ksilanaz üretimi amacıyla çeşitli konakçılara ksilanaz kodlayan genler aktarılmaktadır. Bu sayede fermentasyon ile üretilen ksilanazlar istenilen özelliklere sahip olabilmektedir (Kulkarni et al., 1999; Ahmed et al., 2009).

Escherichia coli, en iyi bilinen, manipülasyonu kolay, ucuz ve yüksek miktarlarda ürün alınabilen bir tür olması sebebiyle çoğunlukla konakçı olarak kullanılmaktadır (Jhamb and Sahoo, 2012). Bunun yanında *Lactobacillus* türleri ve *Bacillus subtilis* bakterileri yüksek ekspresyon seviyesine sahip olan türlerdir (Juturu and Wu, 2012).

Protein ekspresyonu için, mayalar post translasyonel modifikasyonlar açısından bakterilere göre daha uygun konakçılardır. Genellikle kullanılan maya türleri *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris*'tir (Ahmed et al., 2009).

Filamentöz funguslar ise genellikle verimli ksilanaz üreticileri olduğundan, verimi yükseltmek veya uygun koşullarda çalışabilen ksilanaz üretimi amacıyla konakçı olabilirken, aynı zamanda gen kaynağı olarak kullanılabilir (Ahmed et al., 2009). *P. Griseofulvum*'dan alınan ksilanaz geni *A. oryzae*'de başarılı bir şekilde eksprese edilmiştir (Nevalainen et al, 2005).

2.2.3. Ksilanaz enzimi uygulama alanları

Ksilanazlar son yıllarda çeşitli endüstriyel ve biyoteknolojik alanlarda uygulanabilirlik potansiyeli açısından ilgi çekici olmuştur (Subramaniyan and Prema 2000, 2002; Beg et al., 2000, 2001). İlk olarak 1980'li yıllarda hayvan yemi katkısı olarak ve sonrasında gıda, tekstil kağıt endüstrilerinde kullanımına başlanan ksilanazlar, selülozlar ile birlikte şimdilerde dünya enzim pazarının %20'sini oluşturmaktadır (Polizeli et al, 2005).

Endüstriyel enzimler için küresel piyasa 2014 yılı için yaklaşık 4.2 milyar dolar olarak hesaplanmıştır. 2015-2020 yılları arasında bu miktarın yaklaşık %7 yıllık büyüme oranıyla 6.2 milyar dolara ulaşacağı öngörülmektedir (Singh et al., 2016). Birleşmiş milletler ekonomi ve sosyal daire başkanlığı (UNDESA) nın verilerine göre 2050 yılına kadar dünya nüfusu 6.9 milyardan 9.1 milyara yükselecek ve gıda talebi %70 artacaktır (http://www.un.org/waterforlifedecade/food_security.shtml). Kaliteli gıda ihtiyacı enzimlerin, aroma, renk, tekstur ve besin değeri yüksek gıda üretimi için kullanılması ile sağlanacaktır (Neidleman, 1984). Mevcut durumda endüstriyel

enzim pazarında gıda ve içecek alanı baskındır ve 2020 yılında 2.3 milyar dolar değerinde olacağı öngörülmektedir (Singh et al., 2016).

Çizelge 2.3. Ksilanazların endüstriyel uygulamaları ve ticari üreticileri (Kumar et al., 2017).

Ticari isim	Üretici	Uygulama alanı
Bleachzyme F	Bicon, Hindistan	Kağıt endüstrisi
Pulpzyme	Novozymes, Danimarka	Kağıt endüstrisi
Ecopulp	RohnEnzyme0Y, Finlandiya	Kağıt endüstrisi
Ecozyme	Thomas Swan, İngiltere	Kağıt endüstrisi
Cartazyme	Sandoz, Charlotte, İsviçre	Kağıt endüstrisi
Optipulp L-8000	Solvay Interlox, Amerika	Kağıt endüstrisi
GS-35, HS70	Iogen, Canada	Kağıt endüstrisi
Rholase 7118	Rohm, Almanya	Gıda endüstrisi
Multifect XL	Genencor, Hollanda	Gıda endüstrisi
Sternzym HC 46	Stern-Enzym, Meksika	Gıda endüstrisi
Sanzyme X	Sankyo, Japonya	Gıda endüstrisi
Ceremix	Novo Nordisk, Danimarka	Gıda endüstrisi
Solvay pentonase	Solvey Enzymes, Kanada	Gıda endüstrisi
SanzymePX, Alpelase F	Sankyo, Japonya	Yem endüstrisi
Bio-Feed Plus	Novo Nordisk, Danimarka	Yem endüstrisi
Enzekoxylanase	Enzyme Development, Amerika	Yem endüstrisi
Ecosane	Biotech, Tayland	Yem endüstrisi
Grindazyme GP e GV	Danisco Ingredients, Hindistan	Yem endüstrisi
Biofeed	Novo Nordisk, Danimarka	Yem endüstrisi
Allzym PT	Alltech, Amerika	Yem endüstrisi
Grindazyme GP 5000	Danisco Ingredients, Danimarka	Yem endüstrisi
Amano 90	Amano, Japonya	İlaç endüstrisi
Xylanase 250	HankyoBioindustryCo.Ltd, Japonya	Fırın endüstrisi
Gammazym X4000L	Gamma Chemie GmbH, Almanya	İçecek endüstrisi

2.2.3.1. Kağıt endüstrisi

Kağıt hamurundan ligninin uzaklaştırılma işlemiyle üretilen kağıt daha parlak ve beyaz bir görünüme kavuşur. Bu işleme ağartma işlemi adı verilir. Ağartma işlemi hem kimyasal hem biyolojik yol ile gerçekleştirilebilir. Fakat kimyasal yolda çeşitli klorin tabanlı kimyasallar (ClO_2 , Cl_2) kullanıldığından bu çevre kirliliğine sebep olur. Çevre kirliliğini azaltmak amacıyla kağıt endüstrisinde mikroorganizmalar veya mikrobiyal enzimlerin kullanılmasıyla bio-

ağartma işlemi yapılmaktadır (Sharma et al., 2015; Kumar et al., 2017; Walia et al., 2017).

2.2.3.2. Hayvan yemi endüstrisi

Hayvan yemine ksilanaz eklenmesi ile hayvanlarda sindirim işlemi artar böylece sağlık açısından faydalı olur. Örneğin tavuk yemleri buğday, çavdar ve diğer tahılları içermektedir. Bunlar tam olarak sindirilmesi zor olan besinlerdir. Ksilanaz kısmi olarak tahılların sert dış kabuğuna etki ederek sindirimi artırabilir (Twomey et al., 2003). Bunun yanında hemiselülozları küçük şekerlere parçalaması sebebiyle az miktarda besinden yeterli miktarda enerji sağlanmış olur. Hayvan yeminde kısmi ksilan hidrolizi ile ruminal sindirim sistemi tarafından selülozun parçalanması ve böylelikle besin değerinin artışı gerçekleşir (Wu and Ravindran, 2004).

2.2.3.3. Biyoyakıt üretimi

Ksilanaz ve diğer hidrolitik enzimler lignoselülozik materyalden biyo yakıt üretimi için kullanılabilir (Stalin et al, 2012). Biyakütleden lignini uzaklaştırma işlemiyle selüloz ve hemizelülozun açığa çıkmasını takiben parçalanma ve şeker oluşturma sonrasında da fermentasyonu ile etanol ve ksilitol gibi yakıtlar üretilebilir (Kumar et al., 2017).

2.2.3.4. Gıda katkısı üretimi

Endoksilanazlar ksilanı hidrolizleyerek sonucunda ksilooligosakkaritleri çıkarırlar ve bu prebiyotik etkiye sebep olur. Bu maddeler kalın bağırsakta yararlı bakteriler olarak adlandırılan bifidobakterilerin çoğalmasına, diğer zararlı bakterilerin ise baskılanmasına sebep olurlar. Bu nedenle ksilooligosakkaritler soya sütü, çay, kahve gibi içeceklerle, kek, bisküvi, puding gibi atıştırmalıklara katkı maddesi olarak eklenirler. Yapılan çalışmalarda ksilooligosakkaritlerin sarkoma-180 ve diğer tümörleri muhtemelen bağışıklık sistemini dolaylı yoldan stimüle ederek inhibe ettiği belirtilmiştir. Bu yararları sebebiyle ksilanaz ürünü olan ksilooligosakkaritler ilaç sektörü açısından ilgi çekicidir (Aachary and Prapulla, 2011).

2.2.3.5. Meyve suyu ve bira endüstrisi

Diğer hidrolitik enzimler ile birlikte ksilanazlar içeceklerde türbiditenin azalması ve klarifikasyon işlemi için kullanılırlar. Endo-1,4- β - ksilanazlar vizkoziteyi azaltarak sebze ve meyvelerden sularının ekstraksiyonu ve filtrasyonu işlemine yardımcı olurlar. Bunun yanında ksilanazlar arpadan fermente edilebilir

şeker üretimi için uygun olduğundan bira endüstrisinde yararlıdır (Kalim et al., 2015).

2.2.3.6. Ekmekçilik endüstrisi

Karbonhidrat hidrolize edici enzimler yaygın olarak ekmekçilik endüstrisinde ekmek özelliklerini iyileştirici olarak kullanılırlar. Ksilanolitik enzimlerin kullanımı son birkaç on yılda ekmekçilik endüstrisindeki etkinlikleri sebebiyle artmıştır (Ahmad, 2009). Nişasta dışındaki polisakkaritlerin enzimatik hidrolizi hamurun reolojik özelliklerini, ekmeğin özgül hacmini ve kırıntı sertliğini iyileştirmektedir (Harris and Ramalingam, 2010).

Ksilanazlar, buğday unundaki hemiselülozu parçalar, suyun yeniden açığa çıkmasını dolayısıyla hamurun daha yumuşak ve daha kolay yoğurulmasını sağlar (Camacho and Aguilar, 2003). Ksilanaz, suda ekstrakte edilemeyen hemiselüloz moleküllerini ekstrakte edilebilen forma dönüştürür. Bu sayede açığa çıkan moleküller suyu bağlayarak hamurun sertliğini azaltır, hacmini artırır ve daha iyi ve tekdüze ekmek kırıntısı oluşumunu sağlar. Bunun yanında hamurun işlenebilirliğini artırarak, makine parçalarına zarar vermesi önlenir ve üretim koşullarının iyileşmesi sağlanır (Ahmad, 2009). Ayrıca yüksek miktarlarda arabinoksilooligosakkarit açığa çıkması sağlık açısından da yararlı etki gösterir (Harris and Ramalingam, 2010).

Ksilanazın ekmek hacmindeki olumlu etkisi suyun pentozan fazdan salınarak glüten faza geçmesiyle gerçekleşir. Glüten fraksiyonlarında ki artış (hemiselülozdan ayrılan) ile suyla birleşince esnekliği artırır. Bu olumlu etkinin sebebi aynı zamanda son fermentasyon sırasında enzimin viskoziteyi azaltması daha fazla genişmeye sebebiyet vermesiyle gaz tutma kapasitesinin artmasıdır (Martinez-Anaya and Jimenez, 1997; Harris and Ramalingam, 2010). Serbest kalan su aynı zamanda hamurda bulunan çeşitli polimer bağlarda etki eder. Arobinoksilan ve glüten arasında var olan bağlar (kuvvetli kovalent bağ) arobinoksilanların parçalanmasını takiben bir gevşeme gösterir bu sayede hamurun işlenebilirliği artar. Ksilanaz enziminin aşırı dozda kullanıldığı durumlarda, unda bulunan pentozanlar fazlaca parçalanır buda hamurun su tutma kapasitesiyle beraber viskozitesinin azalmasına ve bunun sonucu olarak cıvık bir hamur oluşumuna neden olur (Güner ve Dağlıoğlu, 2008).

Suda ekstrakte edilebilen arobinoksilanların varlığı viskozite ve gaz tutma kapasitesinin artışı sebebiyle ekmek hamuru için önemlidir. Kırıntı tekstürü

ısıtma sırasında gaz kabarcıklarının hapsolmasıyla doğrudan ilişkilidir (Saeed et al., 2011). Hemiselülozların yapısında bulunan suda ekstrakte edilemeyen arobinoksilanlar ekmekçilikte negatif etkiye sebep olur. Dahası, suda çözünebilen arobinoksilanlar karıştırma ve ısıtma gibi stres koşullarında proteinlerin korunmasında yardımcıdır (Abdel-Aal et al., 2002; Labat et al., 2002).

Dünya genelinde mikrobiyal enzimler fırıncılık endüstrisinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Ekmekçilik sektöründe kaliteli ürüne ulaşmak için enzimlerin kullanılması talebi gün geçtikçe artmaktadır. Fırıncılık endüstrisinin pazar payının 2019 yılında %8.2 yıllık büyüme oranıyla 695.1 milyon dolara ulaşması beklenmektedir (Singh et al., 2016).

Türkiye’de ise genel olarak gıda endüstrisinde alt sektör dağılımlarına bakılırsa un ve unlu mamuller gıda sanayinin %65’ini oluşturmaktadır. Türkiye’de ekmek, unlu ürünler içerisinde önemli bir yere sahiptir. Günlük üretilen 82 milyon ekmeğin 77 milyon 340 bini tüketilmektedir (Demiraslan, 2013).

2.2.4. Ksilanaz enzimi üretimi

Fermentasyon bakteriyel ve fungal çeşitli mikroorganizmalar ile kompleks substratların basit bileşiklere biyolojik dönüşümüdür. Bununla birlikte mikroorganizmalar bu biyolojik dönüşüm sırasında antibiyotik, peptit, enzim veya büyüme faktörleri gibi sekonder metabolitler denilen çeşitli bileşikler salgırlar. Fermentasyon, enzim üretimi için birincil yöntemdir. Uygun substratların fermentasyonu ile bakteri, maya, fungus gibi mikroorganizmalar enzimleri üretirler (Subramaniyam and Vimala, 2012).

Ksilanaz enziminin çeşitli endüstriyel proseslere uygulanması ticari üretim bazında bazı kısıtlara sahiptir. Substratın zor bulunması, pH aralığı, termal stabilite, ürün inhibisyonu ve maliyet gibi sorunlar ortaya çıkabilmektedir (Walia et al., 2017). Ticari uygulamalar kullanılabilmesi için, ksilanazın ucuz olması, üretimi aşamasında yüksek seviyelerde exprese olması ve prosesi daha ekonomik hale getirmek verimli bir şekilde salgılanması gereklidir (Deesukon et al., 2011).

Genellikle ksilonolitik enzimler doğal koşullar altında üretilebilen enzimlerdir. Fakat bazı mikroorganizmalar glukoz veya ksiloz gibi karbon kaynakları tarafından indüklenebilir veya katabolik represyona uğrayabilir (Walia et al., 2017). Ksilan literatürde en iyi indükleyici olarak gösterilmektedir (Taibi et al., 2012; Guleria et al., 2013; Walia et al., 2017).

2.2.4.1. Ksılanaz enzimi üretim stratejileri

Ksılanaz üretiminde karbon kaynağı, sıcaklık pH, ortam içeriği gibi önemli birçok parametre vardır. Bu parametreler genellikle kullanılan mikroorganizmaya göre değişkenlik gösterir. Uygun parametre seçimi mikroorganizmanın çoğalmasını ve ürün konsantrasyonunun artmasını sağlar (Ho, 2014).

Mikroorganizma seçimi yapılırken bakılması gereken en önemli kriter ürettiği ksılanazın endüstride kullanıma uygunluğudur. Endüstriye uygunluk açısından termofilik mikroorganizmalar ksılanaz üretimi için tercih edilmektedir (Ravindran and Jaiswal, 2016). Kullanılan suşlar patojenik ve toksijenik olmayacak şekilde karakterize edilerek güvenli hale getirilir (Pariza and Johnson, 2001). Endüstride kullanılan önemli enzimler öncelikle *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* içeren küçük bir grup bakteriyel ve fungal suştan elde edilir. Bu mikroorganizmalar çeşitli metabolitlerin ticari üretiminde ve metabolik faaliyetlerin anlaşılmasında endüstriyel ölçekte üretimler için önemli bir rol oynar. Bunun yanında genetik modifikasyon yapılarak çeşitli enzimlerin üretimi sağlanabilir (Olempska-Beer et al., 2006).

Ortam içeriği ksılanaz aktivitesi üzerinde kritik bir parametredir. Farklı karbon kaynaklarının ksılanaz aktivitesi üzerine etkisini çalışan Seyis ve Aksöz (2005)'e göre, *Trichoderma harzianum* 1073 D3 fungusunun sıvı kültürde ksılanaz üretiminde glikoz ile karşılaştırıldığında sükroz daha yüksek ksılanaz biyosentezine neden olmaktadır. Sıvı kültürde *Aspergillus niger*'den ksılanaz üretiminde çeşitli karbon ve azot kaynakları arasından ksılan ve maya ekstraktının maksimum ksılanaz aktivitesini verdiği raporlanmıştır (Tallapragada and Venkatesh, 2011). Karbon kaynağının yanında ortama organik veya inorganik azot kaynağı eklenmesi mikroorganizmanın büyümesini artıracığından ksılanaz üretimini de artıracaktır. Ek olarak kompleks tarımsal hammaddelerin ksılanaz üretimi için uygun olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmektedir. Buğday kepeği, pirinç kepeği, şeker pancarı küspesi, arpa, talaş, mısır gibi tarımsal hammaddeler ksılanaz enzimi üretimini indükleyici substratlardır (Ho, 2014).

Kültür koşulları arasında ksılanaz üretim performansı üzerinde etkisi en fazla olan parametre sıcaklıktır. Genel olarak *Aspergillus* spp fungusları 25-45 °C arasında inkübe edilirler (Ho, 2014). Djekrif-Dakhmouche ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmaya göre *Aspergillus niger* ATCC 16404 suşu için 30°C inkübasyon sıcaklığı optimumdur. Buna benzer çalışmalarda *A. niger* GCBT7 (Ali

et al., 2002), *A. niger* 326 (Maciel et al, 2008), *A. foetidus* (Shah and Madamwar, 2005) suşları için uygun büyüme sıcaklığının 30°C olduğu gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. Farklı mikroorganizmalardan çeşitli substratlar ile ksilanaz üretimi (Motta et al., 2013).

Mikroorganizma	Ksilanaz	Kültür koşulları	Ortam
<i>Penicillium canescens</i>	18,895.0 IU/g	pH 7.0; 30°C	Soya küspesi ve kazein pepton
<i>Streptomyces sp.</i> P12-137	27.8 IU/ml	pH 7.2; 28°C	Buğday kepeği ve KNO ₃
<i>Thermomyces lanuginosus</i> SD-21	8,237.0 IU/g	pH 6.0; 40°C	Mısır koçanı, buğday kepeği ve (NH ₄) ₂ SO ₄
<i>Penicillium fellutanum</i>	39.7 IU/ml	30°C	Yulaf ksilanı, üre, pepton ve maya özütü
<i>Penicillium furcatum</i>	7.5 IU/ml	pH 6.5; 30°C	Buğday kepeği
<i>Acremonium furcatum</i>	33.1 IU/ml	30°C	Yulaf ksilanı, üre, pepton ve maya özütü
<i>Aspergillus niger</i> PPI	16.0 IU/ml	pH 5.0; 28°C	Yulaf ve üre
<i>Cochliobolus sativus</i> Cs6	1,469.4 IU/g	pH 4.5; 30°C	Buğday samanı ve NaNO ₃
<i>Bacillus circulans</i> D1	8.4 IU/ml	pH 9.0; 45°C	Şeker kamışı küspesi
<i>Streptomyces sp.</i> strain lb 24D	1,447.0 IU/ml	pH 7.5; 28°C	Domates posası
<i>Paecilomyces themophila</i> J18	18,580.0 IU/g	pH 6.9; 50°C	Buğday samanı ve maya özütü

Ksilanaz aktivitesi üzerinde pH değerinin etkisi büyüktür. Özellikle enzimin salgılanması kısmında önemli rol oynar. Funguslar genel olarak 5.0-8.0 pH değeri arasında büyüebilirler. *A. niger* için ise uygun pH 6.5 değeridir. Maciel ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmada nispeten asidik pH 6.0 nın fermentasyon prosesi sırasında funguslar için uygun pH değeri olduğu görülmüştür. *A. niger* fungusu için en iyi başlangıç pH aralığı 5-6 dır (Djekrif-Dakhmouche et al., 2006).

2.2.4.2. Sıvı kültür fermentasyonu ile ksilanaz enzimi üretim

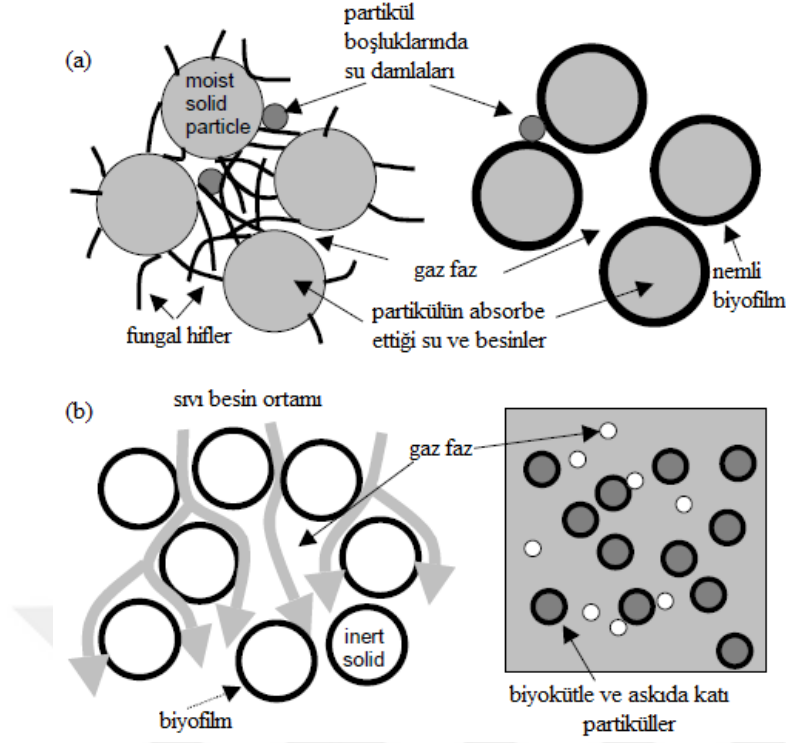
Sıvı kültür fermentasyonunda seçilen mikroorganizmalar, kapalı bir cam kültür kabında gerekli konsantrasyonlarda besin içeren, optimize edilmiş sıvı ortam içinde, yüksek oksijen konsantrasyonları ile kültive edilirler. Kullanılan karbon kaynağı içeriği tanımlanmış glukoz, sükroz gibi maddeler olabileceği gibi tarımsal hammaddeler ve atıklarda olabilir (Ho, 2014). İnkübasyon sıcaklığı ve ortam pH sı gibi büyüme koşulları, bu fermentasyon prosesi için ayarlanabilir. Mikroorganizmanın büyümesini takiben istenilen enzim üretilir. Endüstriyel alanda enzim üretimi için sıvı kültür fermentasyonu evrenseldir (Renge et al., 2012).

Endüstriyel enzimlerin %75 inden fazlası sıvı kültür fermentasyonu ile üretilir. Bunun sebebi bilinen bir yöntem olmasının yanı sıra, kullanılan besin kaynaklarının kolay bulunması, oksijen ve besin transferinin verimli olması, genel olarak inkübasyon süresinin kısa olması ve ayırma saflaştırma işlemlerinin daha az basamak gerektirmesi gösterilebilir (Subramaniyan and Vimala, 2012; Irfan et al., 2016).

Endüstriyel olarak ksilanaz enzimi üretiminde sıvı kültür fermentasyonunun kullanılması, bu alan üzerinde yapılan çalışmaları artırmıştır. Haq ve arkadaşlarının (2004) yaptığı çalışmada *Aspergillus niger*'den optimum kültür koşullarında (48 saat inkübasyon süresi, 30°C inkübasyon sıcaklığı, başlangıç pH değeri 5.0) ksilanaz aktivitesi 260 U/ml olarak bulunmuştur. *Penicillium citrinum*'dan ksilanaz üretiminde RSM ile yapılan optimizasyon çalışması sonucunda optimum sıcaklık değeri 29 °C, pH değeri 7.49, karıştırma hızı 209 rpm, substrat konsantrasyonu %75 olduğu gösterilmiştir (Ghoshal et al., 2011).

2.2.4.3. Katı kültür fermentasyonu ile ksilanaz enzimi üretim

Katı kültür fermentasyonu (KKF), mikroorganizmanın serbest su bulunmayan besi ortamında hem fiziksel destek hem de besin kaynağı olan katı materyal üzerinde kültivasyonudur. Fakat hücre büyümesini desteklenmesi adına ortamda yeteri kadar su bulundurulmalıdır (Pandey et al., 2001). Katı substrat partikülleri arasında su damlacıkları ve ya partiküller üzerine ince bir su tabakası olabilir, fakat daha çok partiküller arası boşluk gaz faz ile doludur. Sistemde mikrobiyal büyüme için var olması gereken su partiküller tarafından absorbe edilmiştir (Mitchell et al., 2006; Renge et al., 2012).



Şekil 2.4. KKF nin özelliklerini gösteren sistem. (a) Nemli katı partiküller, sürekli bir gaz faz ve filamentöz fungusları içeren KKF sistemi. (b) Katı substrat ile yapılan fakat KKF olmayan fermentasyon sistemi (Mitchell et al., 2006).

KKF de temel olarak porlu katı substrat yatağı mikroorganizmanın gelişebilmesi için geniş yüzey alanı ve kolay gaz alışverişi sağlamalıdır. Bunun yanında katı substrat su moleküllerine yüksek afiniteli olmalı, yüksek su tutabilmeli ve yüksek hızlı biyokimyasal reaksiyonlara izin vermelidir (Dhiman et al., 2008).

Birçok organizma hem sıvı hem de katı kültür fermentasyonu ile ekstraselüler enzim üretmektedir. Bakteri ve filamentöz funguslar doğası gereği odun, tohum, sap, kök veya yapraklarda çoğalabilirler. Çeşitli bir grup enzim endüstriyel ölçekte sıvı kültür fermentasyonu ile üretilmesine karşın endüstriyel düzeyde KKF ile üretim yaygın değildir (Kaplan, 2015). Ksilanaz üretiminde pek çok filamentöz fungus potansiyel ksilanaz üreticisi olarak gösterilmektedir. Fakat endüstriyel ölçekte *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* ve *Trichoderma spp* genel olarak kullanılan funguslardır. Ksilanaz üretiminde KKF ekonomik bir sistem olması bakımından dikkat çekici bir fermentasyon yöntemidir (Ho, 2014).

2.2.4.4. Katı kültür fermentasyonu üretim parametreleri

Herhangi bir fermentasyon sistemi açısından substrat seçimi en önemli faktördür. Substrat seçimi maliyet ve bulunabilirlik gibi birçok faktöre bağlıdır (Pandey et al., 2001; Renge et al., 2012). KKF prosesinde genellikle karbon ve enerji kaynağı olarak ham doğal maddeler kullanılır. Diğer yandan maliyet açısından verimli, ekonomik prosesler için tarımsal atıklar enzim üretiminde karbon kaynağı olarak rol alır. KKF de kullanılan endüstriyel substratlara örnek olarak buğday kepeği, pirinç kepeği, mısır kepeği, mısır koçanı, buğday samanı, pirinç samanı, pirinç kabuğu, hurma çekirdeği posası ve soya fasulyesi tarımsal atıkları verilebilir (Pandey et al., 2008; Ho, 2014).

Buğday kepeği *Aspergillus niger* spp.' den ksilanaz üretiminde sıklıkla kullanılan bir substrattır. Venkatesh ve Tallapragada'nın (2009) yaptığı çalışmada pirinç kepeği, soya kepeği ve talaş ile karşılaştırıldığında buğday kepeğinin *A. niger*'den ksilanaz üretimi için optimum substrat kaynağı olduğu gösterilmiştir. Malt çiminin içeriğindeki azot miktarının yüksek olması sebebiyle ksilanaz enzimi üretiminde kullanılabileceği bildirilmiştir (Sargın, 2003).

Substratın partikül boyutu, katı kültür fermentasyon prosesi sırasında mikrobiyal büyüme kapasitesinin yanında, kütle ve ısı transferini etkileyen önemli bir faktördür. Partikül boyutuna ilişkin olarak fermentasyon sırasında sabit kalmadığı ve azalmaya eğilimli olduğu bilinmelidir. Misel oluşumu substrat boyutunu değiştiren ana sebeptir (Pandey et al., 2008). Tarımsal atıkların substrat olarak kullanıldığı durumlarda mikrobiyal büyümenin artırılması için substrat bir ön muamele gerektirebilir. Öğütme ile partikül boyutu azalacağından mikrobiyal büyüme için daha büyük yüzey alanı sağlar. Bununla birlikte partikül boyutunun optimum bir aralıkla olması gerekir. Çok küçük partikül boyutu misellerin oluşması ve gelişmesi için yeterli alan sağlayamaz, bunun yanında kütle ve ısı transferi problemlerine sebep olabilir (Renge et al., 2012; Kapılan, 2015).

Nem, KKF ve biyolojik materyalin özellikleri ile doğrudan ilişkili bir faktördür. Canlı hücrenin metabolik faaliyetleri için gerekli olduğundan KKF de substratın nem oranı önemlidir (Pandey et al., 2008). Düşük nem içeriği KKF sonrasında alt akım işlemleri için daha verimli bir yol sunar. KKF de yüksek besin içerikli katı substratlar kullanıldığından nem içeriğinin düşük olması bakteriyel kontaminasyonları engeller. Bu sayede filamentöz fungusların katı substrata penetre olması ve kolonileşmesi kolaylaşır (Hölker et al., 2004).

Havalandırma, heterojen sistemlerde ki ısı ve kütle transferi problemleri ve aerobik sistemlerdeki oksijen ihtiyacı sebebiyle katı kültür fermentasyonunda üretimi etkileyen parametrelerdir. Havalandırma biyoreaktöre oksijen sağlarken karbon dioksit ve diğer uçucu metabolitlerin reaktörden uzaklaşmasını sağlar. Havalandırma hızı mikroorganizmanın büyüme gereksinimleri, gaz ve uçucu metabolit oluşumu ve ısı oluşumu gibi faktörler göz önünde bulundurularak belirlenir. Bazı üretim parametreleri ve ortam karakteristikleri (basınç, karıştırma, substratın gözenekliliği ve derinliği, ortamın nem içeriği, reaktör geometrisi..) oksijen transfer hızını etkileyebilir (Krishna, 2005).

2.2.4.5. Katı kültür fermentasyonunun sıvı kültür fermentasyonu ile karşılaştırılması

Ksilanaz üretimi genellikle sıvı kültür fermentasyonu ile yapılırsa da, katı kültür fermentasyonu çoğu zaman daha avantajlı olabilmektedir.

- Ekonomik bir yöntemdir; genellikle tarımsal atıklar kullanılabilirdiğinden üretim maliyeti sıvı kültür fermentasyonuna göre daha düşüktür.
- Fermentasyon ortamından ötürü, fermentasyon verimi, son ürün konsantrasyonu ve ürün stabilitesi yüksektir.
- Substratın nem oranı düşük olduğundan bakteriyel kontaminasyon riski düşüktür.
- Kompleks makine sistemlerine ihtiyaç yoktur.
- Kullanılan reaktör hacmi küçüktür. Düşük su hacimlerinde, yüksek ürün verimi ve düşük enerji ihtiyacıyla çalışılır.
- Yatırım maliyeti ve tekrarlayan harcama miktarı daha azdır. En önemli avantajlarından biri hem tesis kurulma aşamasında hem de proses sırasında maliyetin düşük olmasıdır.
- Kültivasyon sonunda enzimler substrattan kolay, ucuz ve uygun bir tampon kullanılarak ayrılır (Pandey et al., 2001; Hölker et al., 2004).

Bunların yanında KKF nin bazı dezavantajları mevcuttur.

- İnkübasyon süresi genellikle daha uzundur.
- Katı kültür fermentasyonunda karıştırma yapılamadığından besin ve oksijen dağılımı homojen bir şekilde sağlanamaz.
- Substrat boyutunun optimize edilmesi amacıyla ön işlem uygulanması hammadde maliyetini artırır (Kapılan, 2015).

2.3. Ölçek Büyütme

Biyoprosesin ölçek büyütülmesi, ilgili biyoürünün ekonomik olarak devamlılığını garanti eden kritik bir aşamadır. Burada amaç, biyoreaktörün büyüklüğünün artırılması ile laboratuvar veya pilot ölçekte yapılan bütün aşamalarda elde edilen çıktılarının olabildiğince korunmasıdır. Sadece biyoreaktörün büyüklüğündeki artışla değil, aynı zamanda biyoreaktörün ve diğer cihazların maliyetleri, çıktıları ve basitliği dikkate alınmalıdır (Desobgo et al., 2016).

Ölçek büyütme erlenmayerden laboratuvar ölçekte biyoreaktöre, sonrasında pilot ölçek ve endüstriyel ölçek biyoreaktöre kadar birkaç basamakta gerçekleşir. Ölçek büyürken bütün parametrelerin oranlı büyümesi veya korunabilmesi mümkün değildir. Her bir ölçek büyütme basamağında sterilizasyon, havalandırma, karıştırma hacim artışından kaynaklı biyoreaktörün çap ve yüksekliği gibi parametrelerin tasarımı daha karmaşık bir hal alır (Desobgo et al., 2016).

2.3.1. Reaktör tasarım parametreleri

İdeal bir üretim yapılması amacıyla bir biyoreaktör tasarımında dikkat edilmesi gereken şartlar aşağıda verilmiştir.

- Biyoreaktör yapımında kullanılan materyal sağlam, korozyona dayanıklı olmalı, mikroorganizmaya toksik olmamalıdır.
- Kontaminasyonu engellemek adına, mikroorganizmaların dışarıdan sisteme girişine ve üretim mikroorganizmasının dışarı çıkışına izin vermeyecek şekilde tasarlanmalıdır.

- Sıcaklık, havalandırma, su aktivitesi gibi üretim parametrelerinin kontrolü sağlanmalıdır.

- Üretim ortamında homojenite sağlanmalıdır.

- Substrat hazırlığı, sterilizasyon, inokulasyon, ürün kazanımı, yükleme ve boşaltma gibi işlemlerin yapılabilmesi için imkan tanınmalıdır.

- Maliyeti düşük olmalıdır (Durand, 2003).

2.3.2. Katı kültür fermentasyonunda kullanılan biyoreaktörler

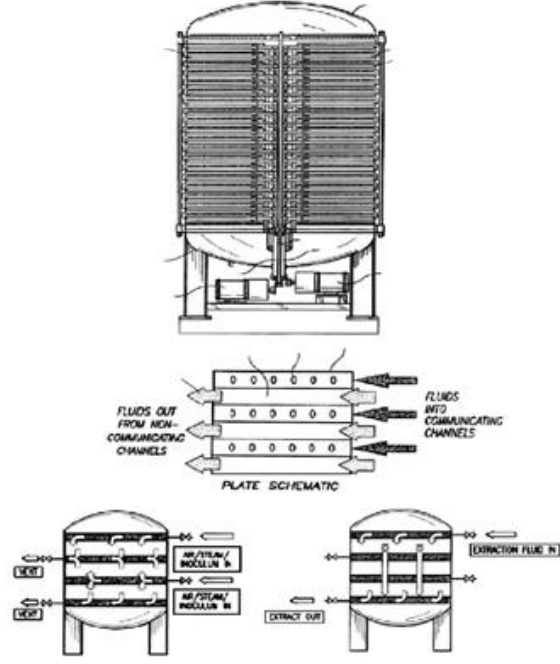
KKF işlemlerinde kullanılan reaktör tipleri genel olarak üç ana başlıkta toplanabilir.

- Tepsili biyoreaktörler
- Döner tamburlu biyoreaktörler
- Kolon biyoreaktörler (Pandey et al., 2001).

2.3.2.1. Tepsili biyoreaktörler

Tepsili biyoreaktör, genellikle sıcaklık ve nemin kontrol edilerek havalandırmanın yapıldığı bir biyoreaktör tipidir. Tepsiler ağaç, metal veya plastik materyalden yapılabilir. Tepsinin üst tarafı açık iken alt tarafı havalandırmayı sağlamak amacıyla gözeneklidir. Tepsiler çoğunlukla bir tepsi diğerinin üstüne olacak şekilde belli bir boşluk bırakarak yerleştirilir (Pandey et al., 2001; Krishna, 2005). Şekil 2.5’de tepsili biyoreaktörlerin şematik gösterimi verilmektedir.

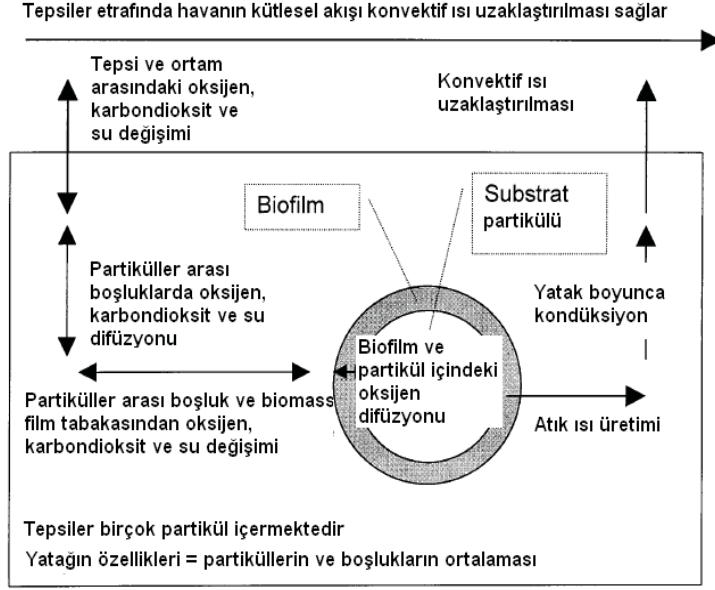
Tepsilerin etrafında bağıl nem ve sıcaklığı kontrol altında tutulan hava, sürekli olarak sirküle edilmektedir. Su sirkülasyonlu ısı değiştirici sistemleri bu biyoreaktörlerde kullanılabilir. Substratlar ince bir tabaka halinde düz tepsilere yayılmaktadır. Karıştırma işlemi kesikli olarak elle yapılabilmektedir (Mitchell et al., 2000).



Şekil 2.5. Tepsili biyoreaktörlerin şematik gösterimi (Durand, 2003).

Tepsili biyoreaktör tasarımlarında bazı kısıtlar vardır. Özellikle bu biyoreaktörlerde ısı ve kütle aktarım sorunları olduğu belirtilmektedir. Üretim sırasında sistemde sıcaklık ve oksijen gradientleri oluşabilmektedir. Tepsideki ısı ve kütle aktarım sorunları sistemin verimini etkilemektedir. Tepsi yüksekliğinin artırılmasıyla verim arttırılamamaktadır. Substrat katmanının orta noktasındaki sıcaklık yükselmeleri ve bağlı olarak mikrobiyal büyümenin yavaşlaması bunun en önemli nedenlerinden biridir. Bu sorunu aşabilmek adına substrat kalınlığı optimizasyonu yapılabilir (Sargın, 2003; Mitchell et al., 2006). Şekil 2.6'da tepsili biyoreaktörde kütle ve ısı transferi şematik olarak gösterilmiştir.

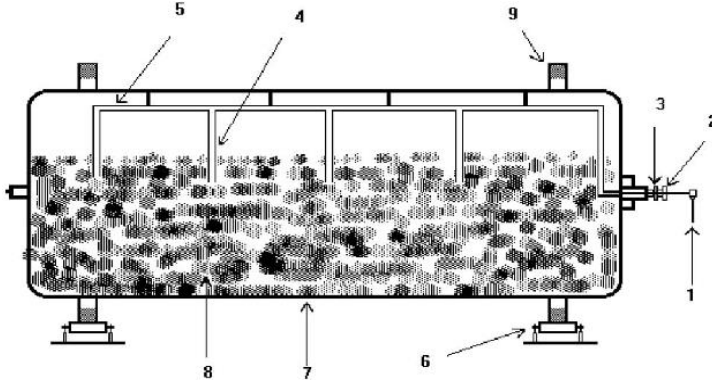
Bu reaktörlerin yatırım masrafları ve teknoloji ihtiyacı düşük olmasına karşılık, üretim sırasında ve sonrasındaki işçilik giderleri yüksektir. Bunun için işçilik masraflarının düşük olduğu ülkelerde tercih edilmesi gereken bir üretim sistemidir. Ayrıca bu üretim sisteminin bir başka dezavantajı da kapasite arttırımının ancak tepsi sayısının arttırımıyla mümkün olabilmesidir (Krishna, 2005).



Şekil 2.6. Tepsili biyoreaktörde kütle ve ısı transferi (Mitchell et al., 2000).

2.3.2.2. Döner tamburlu biyoreaktörler

Döner tamburlu biyoreaktörler, bir substrat yatağı, bir gaz boşluğu ve tambur duvarından oluşan, kompleks, aynı zamanda engeller içerebilen ve havalandırmanın reaktör girişinden içeriye sağlandığı sistemlerdir (Krishna, 2005). Şekil 2.7’de döner tamburlu biyoreaktörlerin şematik gösterimi verilmiştir.



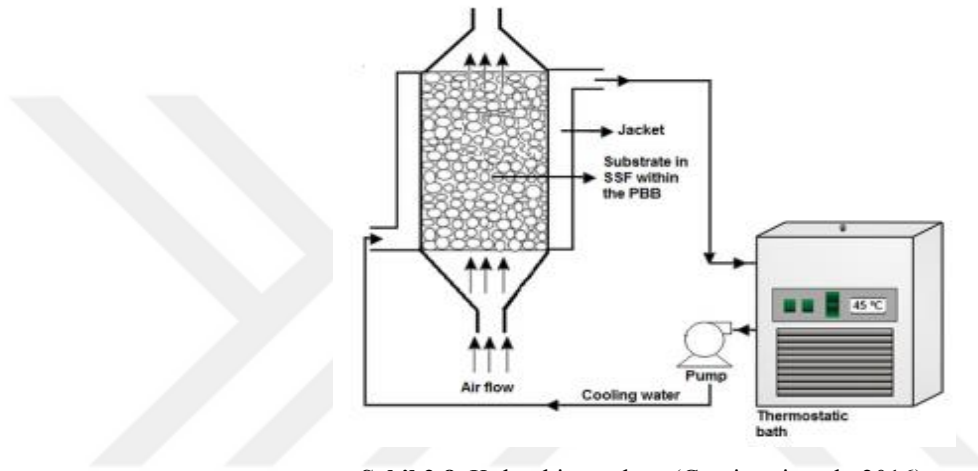
Şekil 2.7. Döner tamburlu biyoreaktör. (1) Hava girişi, (2) döner eklem, (3) manşon, (4) hava nozulu, (5) hava hattı, (6) tekerlek, (7) döner tambur, (8) katı ortam, (9) rim (Durand, 2003).

Bazı olası tasarım özellikleri; engel içermesi, dönme yönünün periyodik olarak ters çevrilmesi, dairesel olmayan tamburlu kesitlerin kullanılması veya tambur ekseninin eğimli olmasıdır. Tasarım değişkenleri; biyoreaktörü uzunluk ve yarıçapı, merkez ekseninin yataya eğimi, karıştırmanın büyüklüğü (hız) ve şekli (engel), havalandırmanın giriş ve çıkışı, su ceketli olup olmaması gibi parametrelerdir (Mitchell, 2006).

Proses sırasında ise substrat yükü, beslenen hava debisi ve nemi, dönme hızı gibi parametrelere dikkat edilmelidir (Sargın, 2003).

2.3.2.3. Kolon biyoreaktörler

Kolon biyoreaktörler, silindirik bir kolon, genellikle gevşek bir biçimde kolonun üst kısımlarına kadar yüklenen substrat ve aşağıdan başlanarak yatak boyunca kuvvetli bir şekilde havalandırılmadan oluşur. Havalandırma yatağın içerisine sokulmuş delikli hava hattıyla olabilir (Pandey et al, 2001).



Şekil 2.8. Kolon biyoreaktör (Casciatori et al., 2016).

Proses kısıtları göz önünde bulundurulduğunda havalandırmanın bir sonucu olarak, bu reaktörlerde gradyan oluşumunun önlenmesi mümkün değildir. Oksijen gradyanlarına kıyasla sıcaklık gradyanları verimi etkileyen daha büyük bir kısıttır. Her ne kadar bu gradyanlar buharlaşmayı teşvik etse ve bu şekilde atık metabolik ısıyı uzaklaştırabilse de biyokütlenin kuruması büyümeyi engeller. Kurumayı önlemek için su kullanılması yatağın karıştırılmamasından dolayı verimli değildir (Krishna, 2005).

Kolon biyoreaktörlerin avantajları proses kontrolünün daha kolay olması, substrat yatağının yükseltilebilmesi ve aseptik koşullara imkan sağlamasıdır (Krishna, 2005).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizma

Bu çalışmada TÜBİTAK MAM (Marmara Araştırma Merkezi) Gıda Enstitüsü (MAM-GE) Küf Koleksiyonunda (KK) bulunan *Aspergillus section Nigri* Küf Koleksiyonu'ndan temin edilmiş olan *Aspergillus niger* suşu kullanılmıştır. Mikroorganizmalar *Aspergillus niger* 5 ve *Aspergillus niger* 12 olarak kodlanmıştır. Kùltürler tüp içerisinde patates dekstroz agar (PDA) içeren eğik agarlarda, +4°C'de saklanmıştır.

3.1.2. Kullanılan besiyerleri, çözeltiler ve kimyasallar

Aspergillus niger izolatlarının geliştirilmesi ve spor oluşturulmasında, geliştirilen hücre ve sporların inokulum olarak hazırlanmasında, optimizasyon çalışmaları sırasında erlen üretimlerinde, kullanılan tüm besiyerleri, çözelti ve kimyasallar, 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Katı kültür biyoreaktör üretim ortamları ise buhar jeneratöründen kızgın buhar beslenerek biyoreaktör içerisinde 121 °C'de 30 dakika steril edilmişlerdir.

3.1.2.1. Patates dekstroz agar (PDA)

Aspergillus niger suşunun saklanması, geliştirilmesi ve sporlanma oluşumu için, ticari olarak hazır halde satılan patates dekstroz agar ortamı 39g/L olacak şekilde kullanılmıştır.

3.1.2.2. Katı kültür üretim ortamları

Söke Un Aş.'den temin edilen buğday kepeği (BK), perakende satış noktasından temin edilen pirinç kepeği (PK) ve yulaf kepeği (YK), Çimpet Ltd.'den temin edilen mısır koçanı (MK), Türk Tuborg Bira ve Malt Sanayii A.Ş. İzmir fabrikasından temin edilen malt çimi (MÇ) ve talaş (T) ile optimizasyon çalışmaları yapılmış, malt çimi ile reaktör çalışmaları sürdürülmüştür.

3.1.2.3. Nemlendirme sıvısı

Katı kültür üretim ortamının neminin ayarlanmasında nemlendirme sıvısı olarak modifiye vogel ortamı kullanılmıştır. Modifiye vogel ortamı; $C_6H_5Na_3O_{7.2}H_2O$ 2.5 g/L, KH_2PO_4 5.0 g/L, $MgSO_{4.7}H_2O$ 0.2 g/L, $CaCl_{2.2}H_2O$ 0.1 g/L, NH_4NO_3 2.0 g/L (VO) ile $C_6H_5Na_3O_{7.2}H_2O$ 2.5 g/L, KH_2PO_4 5.0 g/L, $MgSO_{4.7}H_2O$ 0.2 g/L, $CaCl_{2.2}H_2O$ 0.1 g/L (VO1) olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.1.2.4. Tween 80 çözeltisi

Erlenmayerlere ve biyoreaktörlere spor inokulasyonu yapmak amacıyla agarlı besi ortamında çoğaltılan sporları ortamdan toplamak için gerçekleştirilen işlemlerde kullanılmak üzere %0,1 Tween 80 (hacim/hacim) çözeltisi hazırlanmıştır.

3.1.2.5. Ksilanaz aktivite tayin çözeltileri

Çözelti A: 25 g susuz sodyum karbonat, 25 g sodyum potasyum tartarat ve 200 g susuz sodyum sülfat tartılıp; 800 ml distile suda çözülerek son hacmi 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti B: 30 g bakır sülfat pentahidrat tartılıp, 4 damla konsantre sülfürik asit içeren 200 ml distile suda çözülmüştür. Çözelti C: 50 g amonyum molibdat tartılıp, 900 ml distile suda çözülmüştür ve üzerine dikkatli bir şekilde 42 ml konsantre sülfürik asit ilave edilmiştir. Aynı bir yerde 6 g sodyum arsenat heptahidrat tartılıp 50 ml distile suda çözülmüş ve daha sonra hazırlanan ilk karışımın üstüne ilave edilmiştir. Son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Çözünme gerçekleşmemiş ise çözelti 55°C'ye kadar ısıtılmıştır. Çözelti D: 1 ml çözelti B, 25 ml çözelti A'ya ilave edilmiştir. Çözelti E: Çözelti C analizden hemen önce distile su ile 5 kat seyreltilmiştir. 1M pH 4.7 sodyum asetat tamponu: 82 g susuz sodyum asetat tartılıp 800 ml distile suda çözülerek pH 4.7 olana kadar glisial asetik asit ilave edilmiştir. Son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

%1'lik arobinoksilan substrat: 1 g "medium viscosity wheat arabinoxylan" (orta viskoz buğday arobinoksilan) tartılıp, üzerine 6 ml % 95 v/v etanol ve 80 ml soğuk distile su ilave edilmiştir. 120°C'ye kadar ısıtılmış karıştırıcının üzerine konularak 15 dakika çözünmesi için karıştırılmıştır. Çözündükten sonra üzerine 10 ml sodyum asetat tamponu (1 M, pH 4.7) ilave edilip son hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır. Mikrobiyal kontaminasyonu önlemek amacıyla birkaç damla toluen ilave edilmiştir.

Stok ksiloz çözeltisi: 0.05 g ksiloz tartılıp, 100 ml, 100 mM, pH 4.7 sodyum asetat tamponu içinde çözünerek hazırlanmıştır.

3.1.3. Kullanılan cihazlar

3.1.3.1. Hassas terazi

Precisa XB22A hassas terazi, besiyeri ve karışımların hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.2. Kaba terazi

KERN KB kaba terazi, besiyeri ve karışımların hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.3. pH metre

Mettler Toledo Seven Easy pH metre, hazırlanan karışım ve besiyerlerinin pH değerlerinin kontrol edilmesi ve ayarlanması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3.4. Isıtmalı manyetik karıştırıcı

Heidolph MR Hei-Standard ısıtmalı manyetik karıştırıcı, besiyeri ve diğer karışımların homojenitesinin sağlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.5. Otoklav

Hirayama Hiclave HV-85L otoklav, gerekli ortamların sterilizasyonun sağlanması ve işlemler sonucunda ortaya çıkan mikrobiyolojik atıkların öldürülmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.1.3.6. İnkübatör

Sanyo MIR-153 inkübatör *Aspergillus niger* suşunun kültürasyonu için istenilen sıcaklıklarda kullanılmıştır.

3.1.3.7. Mikroskop

Olympus CX31RTSF tri-oküler mikroskop, aşı kültüründe *Aspergillus* sporlarının sayımı amacıyla kullanılmıştır.

3.1.3.8. Etüv

Memmert marka etüv nem tayini sırasında biyoreaktörden alınan örneklerin kurutulmasında kullanılmıştır.

3.1.3.9. Su banyosu

Memmert marka su banyosu, aktivite tayini sırasında uygun sıcaklıkların sağlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.10. Spektrofotometre

Amesham Biosciences ultrospec 1100 pro spektrofotometre aktivite tayini ölçümlerinde kullanılmıştır.

3.1.3.11. Biyoreaktörler

Bakon Makina & Mühendislik Ltd. Şti. (İZMİR) firması tarafından imal edilen beş tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.1.3.12. Hava şartlandırıcı

Alge Metal San. Tic. Ltd. Şti. (İZMİR) firmasında imalatı gerçekleştirilen hava şartlandırıcı, katı kültür üretimlerinde nem oranının sabitlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.1.3.13. Öğütücü

Brook Crompton seri öğütücü malt çiminin toz haline getirilmesi için kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. *Aspergillus niger* spor solüsyonunun hazırlanması

Aspergillus niger suşu, erlenmayer üretimleri için 10 ml'lik tüplerde 6 ml PDA ortamında, biyoreaktör üretimleri için 250 ml' lik erlenmayer flasklarda 150 ml PDA ortamında yatık agarda 30°C'de 6-7 gün inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Çoğaltılan kültür tüplerine 5 ml, erlenmayere ise 100 ml steril Tween-80 çözeltisi eklenmiştir ve homojen spor solüsyonu elde edilmiştir. Katı kültür üretim ortamına inokule edilen spor miktarı 10^8 spor/ml olacak şekilde spor sayımı sonrasında gerekli seyreltmeler yapılarak inokulasyona hazır hale getirilmiştir.

3.2.2. Erlenmayerde üretim

Erlenmayerlerde yapılan tüm üretimlerde 250 ml hacimli erlenmayerler kullanılmıştır. Substrat ya da substrat karışımı 5 g olacak şekilde, aksi belirtilmedikçe VO nemlendirme sıvısı olarak kullanılmıştır. Havan ve havaneli yardımıyla substrat nemlendirilerek başlangıç nem değeri yine aksi belirtilmedikçe %70 (ağırlık/ağırlık) olarak ayarlanmıştır. Nemlendirme sıvılarının pH ayarlaması gereken durumlarda 1 N HCl ve 1 N NaOH çözeltileri kullanılmıştır. Erlenmayerlerin ağız kısımları pamuk tıpa ile kapatıldıktan sonra alüminyum folyo ile kaplanmış ve 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmişlerdir. Sterilizasyon bitiminde erlenler oda sıcaklığında bekletilerek soğutulmuş ve inokulasyon işlemine hazır hale getirilmişlerdir.

Optimizasyon çalışmalarıyla, katı kültürde ksilanaz üretimi için optimum karbon kaynağı ve azot kaynağı seçilmiş, azot kaynağı miktarı ve başlangıç nem oranı belirlenmiştir.

3.2.2.1. İnokulasyon

Stok *Aspergillus niger* suşları (5 ve 12) PDA içeren eğik olarak hazırlanmış ortamlara transfer edilmiş ve 30°C'de 7 gün süre ile inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda agar yüzeylerine 5 ml % 0.1 (hacim/hacim) steril Tween 80 eklenmiştir. Sporlar öze yardımıyla agar yüzeyinden kazanmış, steril bir cam şişe içerisinde spor süspansiyonları toplanmış ve thoma lamı kullanılarak sayımı yapılmıştır. Üretim ortamı içeren erlenmayerlerin her birine aseptik koşullarda hazırlanan spor süspansiyonundan (10^8 spor/ml) 2 ml transfer edilmiştir. İnokulumun homojen bir şekilde dağılması amacıyla erlenmayerler,

substrat partiküllerini üst kısımlara sıçratmamak koşuluyla karıştırılmışlardır. İnokulasyon işlemi tamamlanan erlenmayerler 30°C’de 96 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Her bir üretim için en az 2 tekrar yapılmıştır.

3.2.2.2. Karbon kaynağı seçimi

KKF ile ksilanaz enzimi üretiminde en uygun karbon kaynağı seçimi için kullanılan substratlar BK, YK, PK, MK ve T dir. Erlenmayerlerde karbon kaynağı seçimi işleminde belirtilen koşullarda üretimler gerçekleştirilmiş ve ksilanaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Karbon kaynağı seçimi denemelerinde 5 ve 12 no’lu suşların her ikisi de kullanılmıştır. Denemede üç tekrar çalışılmıştır.

3.2.2.3. Başlangıç nem oranının belirlenmesi

KKF de farklı karbon kaynakları ile nem denemesinde % 50- 75 arasında değişen farklı nem değerleri kullanılmıştır. Her bir substrat için farklı nem aralıkları seçilirken substratların nem absorblama kapasiteleri dikkate alınmıştır. Üretimde 2 tekrar çalışılmıştır.

3.2.2.4. Azot kaynağı seçimi

Daha önceki denemelerde seçilen karbon kaynaklarından BK ile farklı organik (malt çimi, soya unu, mısır küspesi, üre) ve inorganik ((NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, (NH₄)₂HPO₄-DAHF) azot kaynaklarının ksilanaz üretimine etkisi incelenmiştir. Bu denemelerde çalkalamalı kültür çalışmalarında elde edilen veriler baz alınarak karbon kaynağının miktarı başına eklenecek azot miktarı 0.33 g/5 g substrat olarak belirlenmiştir. Optimum nem oranında (%60) VO1 ortamına hesaplanan miktarlarda azot kaynakları eklenmiş ve 2 tekrarlı üretimler gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.5. İki farklı karbon kaynağı ve iki farklı azot kaynağının yüzdesel oranlarının belirlenmesi

Design Expert 7.0.0 ‘General Factorial Design’ programı ile ksilanaz üretimi için kullanılacak karbon (buğday kepeği ve yulaf kepeği) ve azot kaynağı ((NH₄)₂HPO₄ ve malt çimi) yüzdesel oranlarının optimizasyonun yapılması amacıyla aşağıdaki kombinasyonlar denenmiştir. Üretim koşulları daha önce belirlenen üretim koşullarıyla aynı olup yalnızca başlangıç nem oranı BK ve YK

için ortalama bir değer olan %55 olarak VO1 ortamı ile ayarlanmıştır (VO1 ortamına DAHF ve MÇ yüzdelerinin toplamı 0.33 g azot kaynağı/5g substrat olacak şekilde eklenmiştir). Karbon ve azot kaynağının 5 farklı yüzdesel oranı Design Expert 7.0.0 General Factorial Design programı kullanılarak yapılmıştır.

3.2.2.6. Buğday kepeği, yulaf kepeği ve malt çimi yüzdesel oranlarının belirlenmesi

Literatürde malt çimi oranının arttırılmasının ksilanaz üretimini teşvik ettiği yönünde bildirimler bulunmaktadır (Sargin, 2003). Bu sebeple karbon kaynağı olarak BK - MÇ ve (%25 BK- %75YK) – MÇ nin belirli yüzdeleri ile deneme deseni kurulmuştur. Denemede kullanılan yüzdeler toplam substrat 5 g olacak şekilde, %0, 25, 50, 75, 100 olarak ayarlanmıştır. Üretimlerde ortam nem değeri VO1 ile % 55'e getirilmiştir. Üretim koşulları yukarıda belirtildiği gibidir. Kontrol erleni olarak DAHF eklenmiş VO1 ile nemlendirilmiş BK ve %25 BK-%75 YK kullanılmıştır.

3.2.2.7. Azot kaynağı olarak kullanılacak $(NH_4)_2HPO_4$ miktarının belirlenmesi

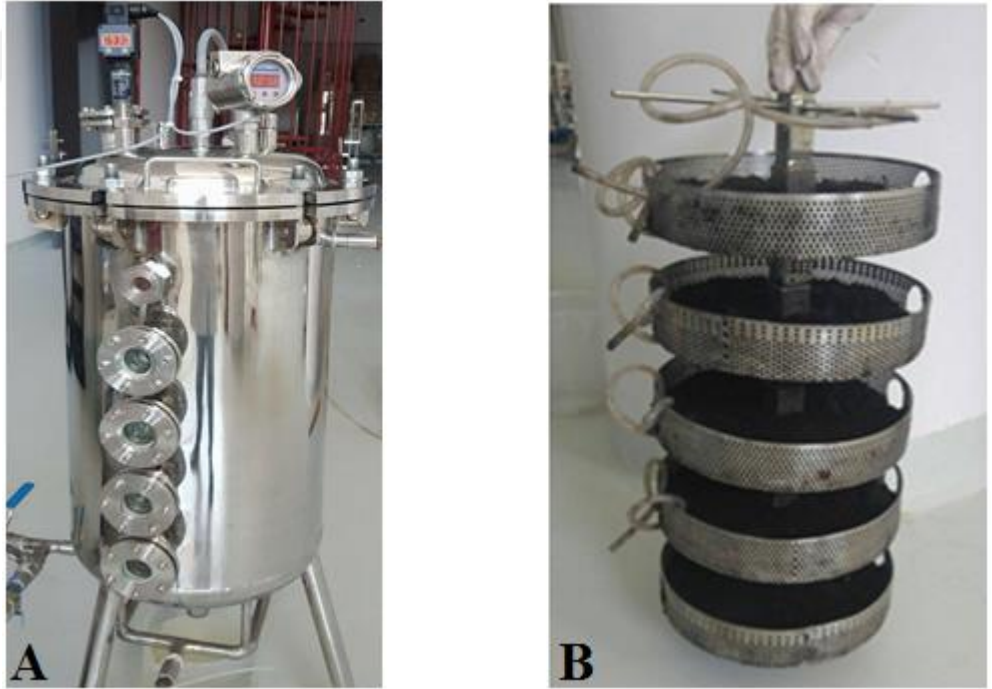
Ksilanaz enzimi üretim ortamı azot kaynağı miktarının belirlenmesinde malt çimi karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Üretim ortamı nem içeriği VO1 ile % 55 nem değerine ayarlanmıştır. Üretim koşulları yukarıda belirtildiği gibidir. Eklenen DAHF miktarı %0, 2, 6, 10, 15, 20 (ağırlık DAHF/ağırlık substrat) olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.2.8. Farklı başlangıç nem oranlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi

Başlangıç nem oranının etkisini görebilmek amacıyla malt çimi, DAHF eklenmiş VO1 ile istenilen nem değerlerine (%50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85) ayarlanmıştır. Üretim koşulları yukarıda belirtildiği gibidir. Denemede üç tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır.

3.2.3. Biyoreaktör üretimleri

Katı kültür fermentasyonu ile yüzeyden havalandırılan tepsili biyoreaktörde besi ortamı (malt çimi – MÇ) başlangıç nem içeriği VO1 ile %2 (g DAHF/ g MÇ) kullanılarak % 70 (ağırlık/ağırlık) olarak ayarlanmıştır. Bu amaçla tepsi başına aksi belirtilmedikçe 150 g substrat ile doldurulan 5 tepsi hazırlandıktan sonra biyoreaktöre yerleştirilmiştir. Üretim ortamı üzerine direkt kızgın buhar (135°C) beslenerek 121°C’de 15 dakika yerinde sterilize edildikten sonra biyoreaktör, ceketten su geçirilerek üretim sıcaklığına (30°C) getirilmiştir. Biyoreaktördeki katı ortamlar 1×10^8 spor/ml spor inokulasyonu ile aşılandıktan sonra havalandırılmıştır. Tepsili biyoreaktör üretim sistemi Şekil 3.1’de sunulmuştur. Biyoreaktörden (5 farklı tepsiden) alınan örneklere aşağıda belirtildiği gibi ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ksilanaz aktivitesi ve protein tayini yapılmış, düzenli aralıklarla içerdiği nem miktarı ölçülmüştür. Katı kültür fermentasyonu ile biyoreaktör üretimlerinde inokulasyon ve havalandırma hızı denemeleri gerçekleştirilmiştir. Beş farklı tepsiden alınan örneklerin aktivite, protein ve nem değerlerinin ortalaması alınarak grafikler oluşturulmuştur.



Şekil 3.1. Tepsili biyoreaktör (A) ve tepsileri (B).

3.2.3.1. Tepsili biyoreaktörde inokulasyonun ksilanaz üretimine etkisi

İnokulasyon oranının KKF' de ksilanaz üzerine etkisini görebilmek amacıyla yukarıdaki gibi hazırlanan üretim ortamı, sırasıyla 0.1, 0.2, 0.4 ml /g substrat spor inokulasyonu ile aşılandıktan sonra 5 L/dak debi ile havalandırılmıştır.

3.2.3.2. Biyoreaktörde havalandırma hızının ksilanaz üretimine etkisi

Havalandırma hızının KKF' de ksilanaz üzerine etkisini görebilmek amacıyla yukarıdaki gibi hazırlanan üretim ortamı, 0.1 ml /g substrat spor inokulasyonu ile aşılandıktan sonra 2.5, 5, 10 L/dak debi ile havalandırılmıştır. Havalandırma hızı denemelerinde hava şartlandırıcı kullanılarak başlangıç nem oranının üretim süresince sabit tutulması amaçlanmıştır.

3.2.4. Enzim ekstraksiyonu

Üretim sonunda alınan örnekler üzerine distile su 1:5 (ağırlık:hacim) oranında eklenmiş ve belirli aralıklarla cam baget ile karıştırılarak temas yüzeyi arttırılmış ve 30 dakika süreyle bekletilmiştir. Bu işlemi takiben tüm içerik bir filtre kağıdı yardımıyla süzölmüş ve elde edilen ekstrakt 10 dakika boyunca 9000 devir/dakika hızında santrifüj edilerek ksilanaz enzim aktivitesi ölçümü yapılmıştır.

3.2.5. Enzim aktivitesi tayini

Ksilanaz aktivite tayininde, metod olarak Nelson-Somogyi indirgen şeker analizini temel alan (Somogyi, 1952) ve Megazyme firması tarafından modifiye edilen aktivite tayini protokolü takip edilmiştir [https://secure.megazyme.com/files/Booklet/T-XAX_DATA.pdf].

Su banyosunda 40°C'de, 1 dakika ön ısıtmaya bırakılan 500 µl substrat eklenmiş tüpe, uygun oranlarda seyreltilmiş enzim örneğinden 200 µl eklenmiştir ve su banyosunda 40°C'de, 5 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon 500 µl çözelti D ilavesiyle durdurulmuş ve tekrar karıştırılarak kaynar su banyosunda 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler 5 dakika soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra örneklerin üzerine 3 ml çözelti E ilave edilerek tekrar karıştırılmıştır.

Tüm örnekler oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiş ve spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Kör olarak 200 µl enzim örneği yerine 200 µl 100 mM, pH 4.7 sodyum asetat tamponu kullanılmıştır.

Ksilanaz aktivite değerinin hesaplanması: Aktivite deneyi sonunda tüplerde açığa çıkan indirgen şeker miktarı ksiloz kalibrasyon grafiği çiziminden elde edilen doğrunun eğiminin aşağıdaki formülde yerine konulması ile hesaplanmıştır.

$$\text{AKTİVİTE (U/ml)} = \left(\frac{\text{absorbans} * 5}{\text{eğim} * \text{inkübasyon süresi}} \right) * \text{seyreltme}$$

Bu formülde;

Absorbans = Köre karşı okunmuş reaksiyon çözeltisinin absorbans değeri

Eğim = Farklı ksiloz konsantrasyonlarına karşı çizilmiş grafiğin eğim değeri

İnkübasyon süresi = Enzim ve substratın reaksiyona girdiği süre (5 dakika)

Seyreltme = Enzimin substrat ile reaksiyona girmeden önceki ön seyreltme anındaki seyreltme faktörü

Enzim Hacmi = Enzimin substrat ile reaksiyona girmeden önceki hacmi (0.2 ml)'dir.

Ksiloz kalibrasyon grafiği için örnek hazırlanması Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Ksiloz kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

	Kör	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5
Ksiloz stok çözeltisi (µl)	0	200	400	600	800	1000
100mM sodyum asetat tampon (µl)	1000	800	600	400	200	0
Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu (µmol/0.2ml)	0	0,12	0,26	0,40	0,52	0,66

3.2.6. Protein tayini

Protein miktarının belirlenmesinde Merck Bradforn Protein Kiti kullanılmıştır. Katı bovine serum albumin (BSA) derişimi 0.1 mg/ml olacak şekilde saf su ile çözülmüştür. Hazırlanan ana stok çözeltisi ile 0.1 mg/ml BSA derişimine ek olarak, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02 ve 0.01 mg/ml derişimde kalibrasyon çözeltileri saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin 250 µl'si ile Bradford çözeltisinin 2500 µl'si karıştırılıp iki dakika beklenmiş ardından spektrofotometrede 595 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Protein miktarları kalibrasyon grafiği çiziminden elde edilen doğrunun eğiminin aşağıdaki formülde yerine konulması ile hesaplanmıştır.

$$\text{Protein konsantrasyonu(mg/ml)} = \left(\frac{\text{eğim}}{\text{absorbans}(595\text{nm})} \right) * \text{seyreltme faktörü}$$

3.2.7. Nem tayini

Üretimde başlangıç nem miktarlarının ayarlanmasında ve alınan örneklerin nem miktarının belirlenmesinde etüv kullanılmıştır. Örnekler tartımları yapılarak etüve konulmuş, 80°C'de 24 saat bekletilmiş ve son tartımları yapılmıştır. Nem içeriği yüzde olarak hesaplanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Erlenmayerde Üretim

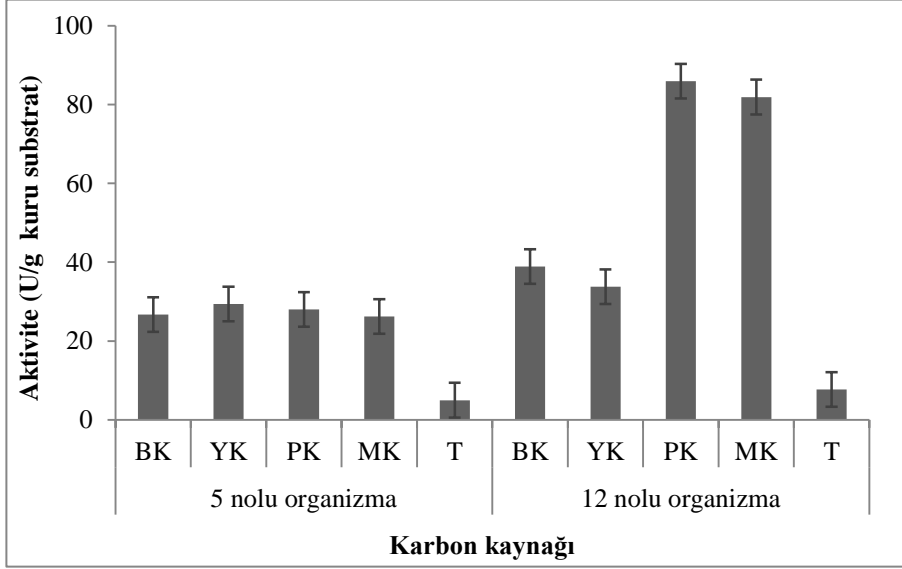
4.1.1. Karbon kaynağı seçimi

Katı kültür fermentasyonu ile ksilanaz enzimi üretiminde en uygun karbon kaynağı seçimi için buğday kepeği, yulaf kepeği, pirinç kepeği, mısır koçanı ve talaş gibi substratlar ile deneme kurulmuştur. Literatürde buğday kepeği, yulaf kepeği, mısır koçanı (Dobrev et al., 2007; Ahmad et al., 2009), pirinç kepeği ve talaşın (Venkatesh and Tallapragada, 2009) ksilanaz üretiminde kullanılabileceği gösterilmiştir. Karbon kaynağı seçiminde literatür verilerinin yanında tarımsal ürünün ülkemizdeki üretim durumu göz önüne alınmıştır. Çizelge 4.1'de denemelerde kullanılan karbon kaynaklarının kaynağını oluşturan tarımsal ürünlerin ülkemizdeki üretim potansiyelleri verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ksilanaz üretiminde kullanılan substratların elde edildiği tarımsal ürünlerin Türkiye'de üretim miktarları 2016 yılı verileri (<http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BUGEM.pdf>).

Tarımsal ürün	Üretim miktarı (1000 ton)
Buğday	20.600
Arpa	6.700
Yulaf	225
Çeltik	920

Erlenmayerlerde karbon kaynağı seçimi denemesinde alt bölüm 3.2.2.'de belirtilen koşullarda 3 tekrarlı üretimler gerçekleştirilmiştir. Üretimlerin başlangıç nemi %70 olacak şekilde ayarlanmıştır. Üretimler sonunda ksilanaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Karbon kaynağı seçimi için yapılan denemelerde 5 ve 12 no'lu suşların her ikisi de kullanılmıştır. Elde edilen aktivite değerleri (U/g kuru substrat) Şekil 4.1'de, ortalama aktivite değerleri (U/ml ekstra ve U/g kuru substrat) Çizelge 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Katı kültür fermentasyonu üretimlerinde kullanılan karbon kaynaklarının 5 ve 12 no'lu suşlar için ksilanaz üretim performansları.

Çizelge 4.2. Katı kültür fermentasyonu üretimlerinde kullanılan karbon kaynaklarının 5 ve 12 no'lu suşlar için ksilanaz enzim aktiviteleri (U/ml ekstrakt, U/g kuru substrat).

		Ortalama aktivite (U/ml ekstrakt)	Ortalama aktivite (U/g kuru substrat)	Ortalama pH
5 no'lu organizma	BK	5.34	26.72	7.03
	YK	5.88	29.39	7.07
	PK	5.60	28.02	5.6
	MK	5.25	26.25	5.79
	T	1.00	4.99	4.58
12 no'lu organizma	BK	7.78	38.92	6.96
	YK	6.75	33.76	7.11
	PK	17.19	85.94	5.4
	MK	16.38	81.89	5.23
	T	1.54	7.7	4.31

Beş farklı karbon kaynağı ve iki farklı *Aspergillus niger* suşu ile yapılan karbon kaynağı seçimi denemelerinde, 12 no'lu mikroorganizma 5 no'lu mikroorganizmaya göre daha yüksek ksilanaz üretim performansı göstermiştir. Buğday kepeği, yulaf kepeği, pirinç kepeği ve mısır koçanı 5 no'lu *A. niger* ile üretimde benzer aktivite değerleri (26.72 ± 0.80 , 29.39 ± 6.55 , 28.02 ± 4.2 , 26.25 ± 2.23 U/g kuru substrat) vermiştir. 12 no'lu *A. niger* ile üretimlerde pirinç kepeği ve mısır koçanında yüksek ksilanaz aktivitesi (85.94 ± 6.49 , 81.89 ± 12.01

U/g kuru substrat) gözlenmiştir. Michelin ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada, mısır koçanı ksilanaz üretimi için indükleyici olarak kullanılmıştır. Yapılan bir çok çalışmada buğday kepeği kullanılan diğer tarımsal atıklara göre yüksek ksilanaz aktivitesi göstermiştir (Okafor et al., 2007; Hmida-Sayari et al., 2012; Guimaraes et al., 2013). Talaş ise bu denemede tüm substratlara bakıldığında en düşük ksilanaz aktivitesi gösteren substrat olmuştur. Talaşın bu üretimler için uygun olmadığı görülüp bundan sonraki denemelerde substrat olarak kullanılmamıştır. Bu denemede buğday kepeği ile elde edilen ksilanaz aktivitesi, mısır koçanı ve pirinç kepeğinin gerisinde kalmıştır. Katı kültür fermentasyonunda nem oranının optimizasyonu önemlidir. Optimum nem oranından düşük nem değerlerinin besin diffüzyonunu, mikrobiyal büyümeyi, enzim stabilitesini negatif etkilediği, yüksek nem değerlerinin ise partikül aglomerasyonuna, gaz tranfer problemlerine ve bakteriyel kontaminasyona sebep olduğu literatürde belirtilmiştir (Krishna, 2005). Erlen üretimlerine ilişkin deneysel tasarım planlamasında 5 no'lu kültürün tüm substratlarda benzer aktivite sergilediği görülmüştür. Bunun sebebi olarak katı substratlar için nem oranının optimizasyonu gerekliliği gösterilebilir (Krishna, 2005). Başlangıç nem oranının substrat performansını etkileyen başlıca parametrelerden birisi olması dolayısıyla tüm substratların farklı başlangıç nem değerlerinin ksilanaz üretimine etkisinin belirlenmesine karar verilmiştir.

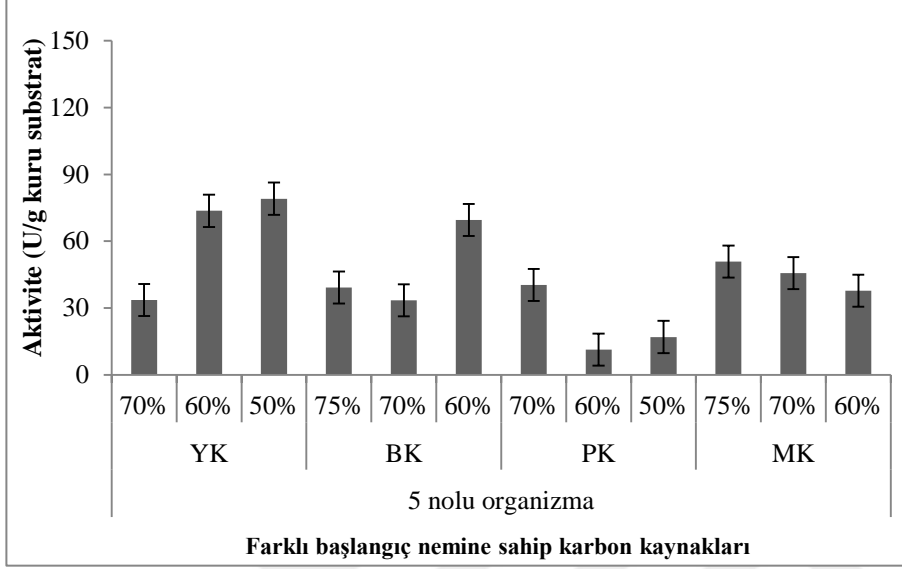
4.1.2. Başlangıç nem oranının belirlenmesi

Başlangıç nem oranının katı kültür fermentasyonu ile yapılan üretimlerde önemli parametrelerden birisi olduğu bilinmektedir. Farklı karbon kaynakları ile nem denemesinde yulaf kepeği, buğday kepeği, pirinç kepeği ve mısır koçanı için %50-75 arasında değişen farklı nem değerleri kullanılmıştır. Her bir substrat için farklı nem aralıkları seçilirken substratların nem absorblama kapasiteleri dikkate alınmıştır. Substrat olarak kullanılan tarımsal atıkların nem tayini yapılmış, nem içerikleri Çizelge 4.3'de sunulmuştur.

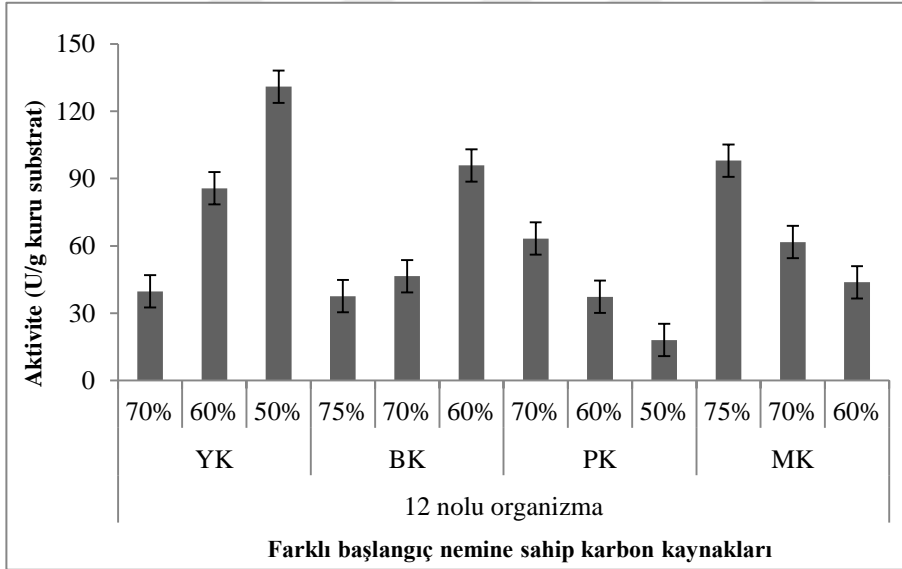
Çizelge 4.3. Tarımsal atıkların nem içerikleri

Substrat	Buğday kepeği	Yulaf kepeği	Mısır koçanı	Pirinç kepeği	Malt çimi
Yüzde nem (%)	9.45	10.3	9.52	9.19	7.76

Beş no'lu *A. niger* ile elde edilen aktivite değerleri (U/g kuru substrat) Şekil 4.2'de, 12 no'lu *A. niger* ile elde edilen aktivite değerleri (U/g kuru substrat) Şekil 4.2'de, ortalama aktivite değerleri (U/ml ekstrakt ve U/g kuru substrat) Çizelge 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.2. 5 no'lu *A. niger* ile üretimlerde kullanılan karbon kaynaklarının farklı başlangıç nem değerlerinin ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi.



Şekil 4.3. 12 no'lu *A. niger* ile üretimlerde kullanılan karbon kaynaklarının farklı başlangıç nem değerlerinin ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi.

Katı kültür fermentasyonunda başlangıç nem oranı optimize edilen parametreler arasındadır (Park et al., 2002; Liu et al., 2008; Soliman et al., 2012; Vimalashanmugam and Viruthagiri, 2014). Elde edilen sonuçlara bakıldığında kendi içinde yulaf kepeği en yüksek aktivite değerini %50 başlangıç nem oranında

verirken (5 no'lu 79.10±1.41 U/g kuru substrat, 12 no'lu 130.93±4.11 U/g kuru substrat), buğday kepeği %60 başlangıç nem oranında (5 no'lu 69.60±13.53U/g kuru substrat, 12 no'lu 95.87±5.19 U/g kuru substrat), pirinç kepeği %70 başlangıç nem oranında (5 no'lu 40.43±0.76 U/g kuru substrat, 12 no'lu 63.25±7.79 U/g kuru substrat) ve mısır koçanı %75 başlangıç nem oranında (5 no'lu 50.92±1.62 U/g kuru substrat, 12 no'lu 98.01±23.39 U/g kuru substrat) yüksek ksilanaz üretim performansı göstermiştir.

Çizelge 4.4. Katı kültür fermentasyonu ile ksilanaz üretimlerinde kullanılan karbon kaynaklarının 5 ve 12 no'lu suşlar için farklı başlangıç nem oranlarında ksilanaz enzim aktiviteleri (U/ml ekstrakt, U/g kuru substrat).

			Ortalama aktivite (U/ml ekstrakt)	Ortalama aktivite (U/g kuru substrat)	Ortalama pH
5 no'lu organizma	YK	70%	6.73	33.65	6.81
		60%	14.73	73.66	5.88
		50%	15.82	79.10	5.21
	BK	75%	7.84	39.20	6.77
		70%	6.71	33.54	6.75
		60%	13.92	69.60	5.77
	PK	70%	8.09	40.43	5.45
		60%	2.27	11.36	5.05
		50%	3.41	17.04	4.05
	MK	75%	10.18	50.92	6.00
		70%	9.15	45.75	5.74
		60%	7.57	37.83	4.75
12 no'lu organizma	YK	70%	7.95	39.74	6.60
		60%	17.14	85.68	5.50
		50%	26.19	130.93	4.97
	BK	75%	7.52	37.60	6.75
		70%	9.30	46.48	6.61
		60%	19.17	95.87	5.69
	PK	70%	12.65	63.25	5.22
		60%	7.46	37.29	4.90
		50%	3.61	18.03	3.14
	MK	75%	19.60	98.01	5.51
		70%	12.34	61.72	4.13
		60%	8.76	43.80	3.83

Park ve arkadaşlarının (2002) pirinç kepeği ve *A.niger* ile yapmış olduğu çalışmada ksilanaz üretimi için optimum koşullarda başlangıç nem oranı %65'tir. Soliman ve arkadaşları (2012) ise ksilanaz üretiminde arpa kepeği için optimum başlangıç nem oranını %75 olarak elde etmiştir.

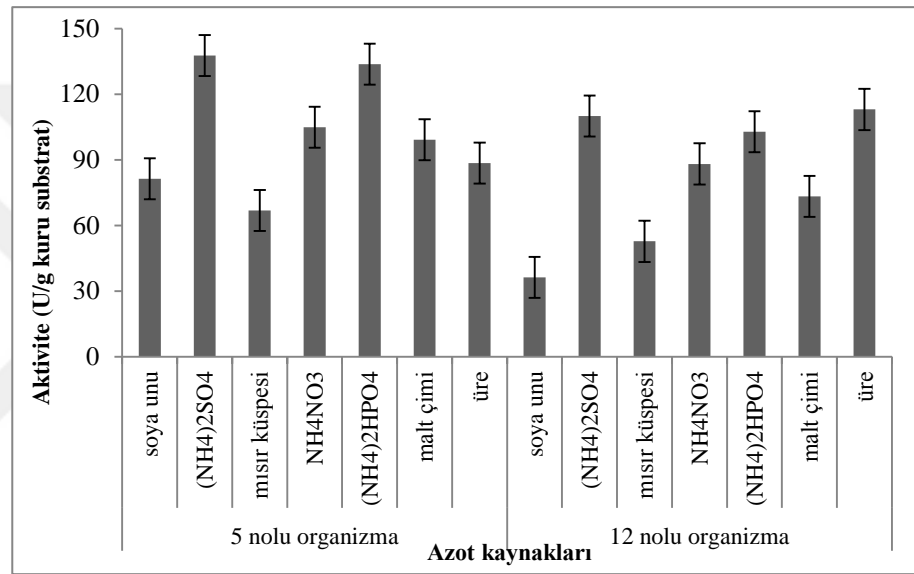
Genel olarak sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, yulaf kepeği ile yapılan üretimlerde yüksek aktivite elde edilirken, sonrasında buğday kepeği ve mısır koçanı yakın ksilanaz üretim performansı göstermiştir. Pirinç kepeği kullanılan diğer üç substratın gerisinde kalmıştır. Bunun sebebinin pirinç kepeğinin nemlendirildiğinde topaklanma eğilimi göstermesi, organizmanın penetre olamaması, böylelikle hem büyümeyi, hem de oksijen ve besin iletimini negatif etkilemesi olduğu düşünülmektedir. Fakat yulaf kepeği, buğday kepeği ve mısır koçanı nemlendirildiğinde daha gözenekli bir yapı sergilediğinden organizmanın penetrasyonu gerçekleşmiş, kütle ve ısı transferi sorunları aşılmıştır. Denemeler iki farklı suş ile yapıldığından suş farkından kaynaklı performans değişiklikleri de gözlenmiştir. *Aspergillus niger* 12'nin, katı kültürde ksilanaz enzimi üretiminde *Aspergillus niger* 12 suşuna göre daha yüksek performans gösterdiği belirlenmiştir.

Erlen üretimlerinin ileri optimizasyon çalışmalarında karbon kaynağı olarak buğday kepeği ve yulaf kepeğinin farklı miktarlarının denenmesine karar verilmiştir. Mısır koçanı kullanılan üretimde %75 nem değerinde yüksek aktivite elde edilmesine karşın bu ortamda pH düşüşleri yüksektir. Literatürde yüksek pH değerlerinde ksilanaz üretiminin arttığı görülmüştür (Cao et al., 2008). Bu sebeple %60 nem değerinde benzer ksilanaz aktivitesi veren maliyet ve bulunabilirlik açısından daha uygun olacağı düşünülen buğday kepeği ile azot kaynağı seçimi çalışmaları yapılmıştır.

4.1.3. Azot kaynağı seçimi

Karbon kaynağı olarak buğday kepeği ile farklı organik (malt çimi, soya unu, mısır küspesi, üre) ve inorganik ((NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, (NH₄)₂HPO₄-DAHF) azot kaynaklarının ksilanaz üretimine etkisi incelenmiştir. Karbon kaynağının yanında ortama organik veya inorganik azot kaynağı eklenmesi mikroorganizmanın büyümesini, dolayısıyla ksilanaz üretimini de artıracığı literatürde belirtilmiştir (Ho, 2014; Irfan et al., 2014). Bu denemelerde çalkalamalı kültür çalışmalarında elde edilen veriler baz alınarak karbon kaynağının miktarı başına eklenecek azot miktarı 0.33 g/5 g kuru substrat olarak belirlenmiştir. VO1 ortamına hesaplanan miktarlarda azot kaynakları eklenmiş, optimum nem oranını (%60) sağlayacak şekilde karbon kaynağı nemlendirilmiştir. Denemede üretimler iki tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.4'de, ortalama aktiviteler (U/ml ekstrakt, U/g kuru substrat) Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, 5 no'lu suş ile yapılan üretimlerde genel olarak 12 no'lu suşa göre yüksek ksilanaz üretim performansı gözlenmiştir. Azot kaynaklarının etkilerinde bakıldığında inorganik azot kaynaklarından $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ benzer ve yüksek ksilanaz aktivitesi gösterirken (5 no'lu organizma için; 137.71 ± 8.28 ve 133.69 ± 5.84 U/g kuru substrat, 12 no'lu organizma için; 110.03 ± 7.14 ve 102.79 ± 12.51 U/g kuru substrat), organik azot kaynaklarından malt çimi ve üre, soya unu ve mısır küspesine göre yüksek ksilanaz aktivitesi (5 no'lu organizma için; 99.16 ± 0.54 ve 88.51 ± 1.73 U/g kuru substrat, 12 no'lu organizma için; 73.35 ± 11.69 ve 113.02 ± 1.73 U/g kuru substrat) göstermiştir.



Şekil 4.4. Buğday kepekli ortamda farklı azot kaynaklarının ksilanaz üretimine etkisi.

Azot kaynağı farklılığının ksilanaz üretimini etkilediği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Modi ve arkadaşlarının (2011) yapmış olduğu çalışmada karbon kaynağı olarak buğday samanı ve *A. niger* ile ksilanaz enzimi üretiminde pepton, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, üre, NaNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl gibi azot kaynaklarının etkisi denenmiş maksimum ksilanaz aktivitesi NH_4NO_3 – üre kombinasyonunda elde edilmiştir. Lemos ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmada ise karbon kaynağı olarak şeker kamışı küspesi kullanılmış, optimum azot kaynağının pepton, üre $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile karşılaştırıldığında NaNO_3 olduğu görülmüştür.

Azot kaynağının seçiminde ayrıca TARIST istatistik programı kullanılarak ‘Tek faktörlü Tesadüf Parselleri’ modeline göre yapılan varyans analizinde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6’daki gibidir.

Çizelge 4.5. Buğday kepekli ortamda farklı azot kaynaklarının ksilanaz üretimine etkisi.

		Ortalama aktivite (U/ml ekstrakt)	Ortalama aktivite (U/g kuru substrat)	Ortalama pH
5 no'lu organizma	Soya unu	16.28	81.39	6.34
	(NH ₄) ₂ SO ₄	27.54	137.71	5.52
	Mısır küspesi	13.37	66.85	6.00
	NH ₄ NO ₃	20.98	104.90	5.95
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	26.74	133.69	5.54
	Malt çimi	19.83	99.16	6.01
	Üre	17.70	88.51	6.26
12 no'lu organizma	Soya unu	7.26	36.29	6.66
	(NH ₄) ₂ SO ₄	22.01	110.03	5.90
	Mısır küspesi	10.55	52.76	6.32
	NH ₄ NO ₃	17.63	88.13	6.20
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	20.56	102.79	5.73
	Malt çimi	14.67	73.35	6.32
	Üre	22.60	113.02	6.39

Çizelge 4.6. *A. niger* 12 için tek faktörlü tesadüf parselleri modelinden elde edilen sonuçlar.

Soya unu	36.30 d
(NH ₄) ₂ SO ₄	110.03 a
Mısır küspesi	52.76 cd
NH ₄ NO ₃	88.13 ab
(NH ₄) ₂ PO ₄	102.80 ab
Malt çimi	73.35 bc
Üre	113.02 a

LSD_{0.05} 33.15

Azot kaynaklarının enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelendiğinde; üre, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂PO₄ ve NH₄NO₃ azot kaynağı olarak kullanıldığında sırası ile 113.02, 110.03, 102.8 ve 88.13 U/g kuru substrat aktivite değerleri elde edilmiştir. Bu dört azot kaynağı ile elde edilen değerlerin tamamı en yüksek gruba girmiştir. Bu durumda azot kaynakları arasında fark oluşmaması sebebiyle çalışmalara (NH₄)₂PO₄ (DAHF) ile devam edilmesine karar verilmiştir. Organik azot kaynağı ise malt çimi seçilmiştir. Malt çimi oranının arttırılmasının ksilanaz üretimini teşvik ettiği yönünde bildirimler de bulunmaktadır (Sargın, 2003). Elde edilen tüm veriler ışığında seçilen iki adet karbon kaynağı (BK ve YK) ve iki adet azot kaynağının (DAHF ve MÇ) optimum oranlarını belirlemek üzere deneme yapılmıştır.

Şekil 4.4’de görülen sonuçlarda 5 no’lu organizma ile yapılan üretimler daha yüksek ksilanaz aktivitesi vermiş olsa dahi bu sonuçların yanında ekmek üretimine yönelik çalışmalarında yapılması gerekmiştir. İçinde 5 ve 12 no’lu suşlarında bulunduğu çeşitli *A. niger* suşlarından üretilen ham ksilanaz enzimlerinin, buğday ekmeği (normal ekmek) ve tam buğday ekmeği üretiminde kullanılan un ve hamur üzerindeki etkileri Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Hububat İşleme ve Mühendisliği Bilim Dalı Laboratuvarı’nda yürütülen çalışmalar ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 12 no’lu ksilanaz enziminin buğday unu ve tam buğday ununun farinograf özellikleri ile buğday ekmeği ve tam buğday ekmeğinin nitelikleri üzerinde diğer enzimlere kıyasla en olumlu etkileri gösterdiğine ve bu sebeple optimizasyon çalışmalarına 12 no’lu suş ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.1.4. İki farklı karbon kaynağının ve iki farklı azot kaynağının yüzdesel oranlarının belirlenmesi

Ksilanaz üretimi için kullanılacak karbon (buğday kepeği ve yulaf kepeği) ve azot kaynağı ((NH₄)₂HPO₄ ve malt çimi) yüzdesel oranlarının optimizasyonun yapılması amacıyla Design Expert 7.0.0 ‘Genel Faktöryel Tasarım’ programı kullanılmış, Çizelge 4.7’deki kombinasyonlar denenmiştir.

Çizelge 4.7. Genel Faktöryel Tasarım Programında denemeye alınan kombinasyonlar.

Buğday kepeği ve yulaf kepeği yüzdeleri	Malt çimi ve (NH ₄) ₂ HPO ₄ yüzdeleri
% 0 BK - % 100 YK	% 0 DAHF - % 100 MÇ
% 25 BK - % 75 YK	% 25 DAHF - % 75 MÇ
% 50 BK - % 50 YK	% 50 DAHF - % 50 MÇ
% 75 BK - % 25 YK	% 75 DAHF - % 25 MÇ
% 100 BK - % 0 YK	% 100 DAHF - % 0 MÇ

Üretim koşulları daha önce belirlenen üretim koşullarıyla aynı olup yalnızca başlangıç nem oranı BK ve YK için ortalama bir değer olan %55 olacak şekilde VO1 ortamı ile ayarlanmıştır (VO1 ortamına DAHF ve MÇ yüzdelерinin toplamı 0.33 g azot kaynağı/5g kuru substrat olacak şekilde eklenmiştir). Design Expert 7.0.0 Genel Faktöryel Tasarım programı kullanılarak karbon ve azot kaynağının 5 farklı yüzdesel oranı deneme planına alınmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.8’de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. Design Expert programı kullanılarak yapılan denemeden elde edilen yanıtlar.

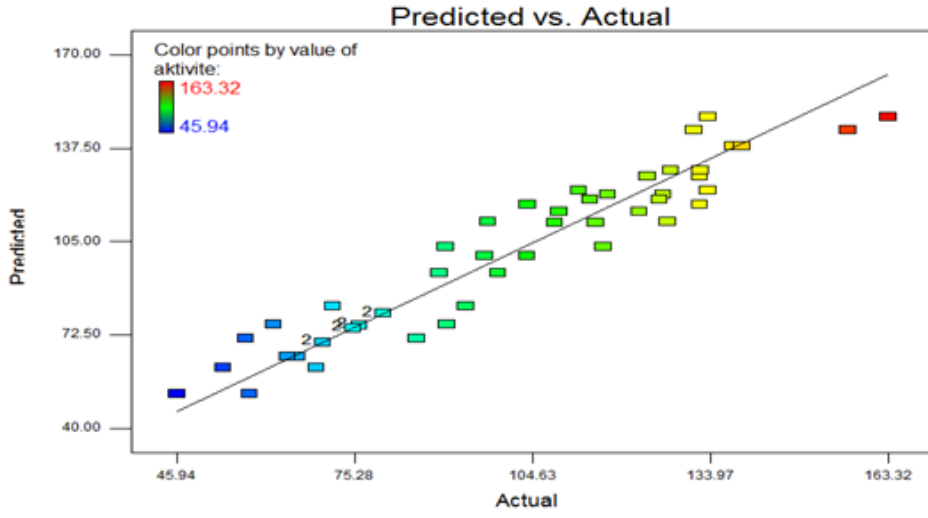
Std	Run	Block	Factor 1 A:Karbon kaynagi %	Factor 2 B:Azot kaynagi %	Response 1 Ksilanaz aktivitesi U/g üretim ortamı
49	1	Block 1	%0 BK-%100 YK	%0 DAHF-%100 MÇ	57.89
46	2	Block 1	%50 BK-%50 YK	%0 DAHF-%100 MÇ	75
47	3	Block 1	%25 BK-%75 YK	%0 DAHF-%100 MÇ	65.84
31	4	Block 1	%100 BK-%0 YK	%25 DAHF-%75 MÇ	89.28
11	5	Block 1	%100 BK-%0 YK	%75 DAHF-%25 MÇ	103.83
44	6	Block 1	%75 BK-%25 YK	%0 DAHF-%100 MÇ	70
50	7	Block 1	%0 BK-%100 YK	%0 DAHF-%100 MÇ	45.94
24	8	Block 1	%75 BK-%25 YK	%50 DAHF-%50 MÇ	103.67
8	9	Block 1	%25 BK-%75 YK	%100 DAHF-%0 MÇ	133.54
19	10	Block 1	%0 BK-%100 YK	%75 DAHF-%25 MÇ	126.18
10	11	Block 1	%0 BK-%100 YK	%100 DAHF-%0 MÇ	131.24
3	12	Block 1	%75 BK-%25 YK	%100 DAHF-%0 MÇ	133.54
43	13	Block 1	%75 BK-%25 YK	%0 DAHF-%100 MÇ	70
25	14	Block 1	%50 BK-%50 YK	%50 DAHF-%50 MÇ	125.57
17	15	Block 1	%25 BK-%75 YK	%75 DAHF-%25 MÇ	137.67
42	16	Block 1	%100 BK-%0 YK	%0 DAHF-%100 MÇ	61.87
16	17	Block 1	%50 BK-%50 YK	%75 DAHF-%25 MÇ	116.23
1	18	Block 1	%100 BK-%0 YK	%100 DAHF-%0 MÇ	132.16
12	19	Block 1	%100 BK-%0 YK	%75 DAHF-%25 MÇ	132.16
13	20	Block 1	%75 BK-%25 YK	%75 DAHF-%25 MÇ	122.21
9	21	Block 1	%0 BK-%100 YK	%100 DAHF-%0 MÇ	156.66
34	22	Block 1	%75 BK-%25 YK	%25 DAHF-%75 MÇ	80
30	23	Block 1	%0 BK-%100 YK	%50 DAHF-%50 MÇ	53.59
45	24	Block 1	%50 BK-%50 YK	%0 DAHF-%100 MÇ	75
32	25	Block 1	%100 BK-%0 YK	%25 DAHF-%75 MÇ	98.93
5	26	Block 1	%50 BK-%50 YK	%100 DAHF-%0 MÇ	127.41
29	27	Block 1	%0 BK-%100 YK	%50 DAHF-%50 MÇ	68.91
7	28	Block 1	%25 BK-%75 YK	%100 DAHF-%0 MÇ	163.32
33	29	Block 1	%75 BK-%25 YK	%25 DAHF-%75 MÇ	80
36	30	Block 1	%50 BK-%50 YK	%25 DAHF-%75 MÇ	85.45
23	31	Block 1	%75 BK-%25 YK	%50 DAHF-%50 MÇ	96.78
14	32	Block 1	%75 BK-%25 YK	%75 DAHF-%25 MÇ	109.03
15	33	Block 1	%50 BK-%50 YK	%75 DAHF-%25 MÇ	90.27
2	34	Block 1	%100 BK-%0 YK	%100 DAHF-%0 MÇ	123.58
26	35	Block 1	%50 BK-%50 YK	%50 DAHF-%50 MÇ	114.09
35	36	Block 1	%50 BK-%50 YK	%25 DAHF-%75 MÇ	57.27
28	37	Block 1	%25 BK-%75 YK	%50 DAHF-%50 MÇ	126.95
27	38	Block 1	%25 BK-%75 YK	%50 DAHF-%50 MÇ	97.24
22	39	Block 1	%100 BK-%0 YK	%50 DAHF-%50 MÇ	108.27
37	40	Block 1	%25 BK-%75 YK	%25 DAHF-%75 MÇ	76
21	41	Block 1	%100 BK-%0 YK	%50 DAHF-%50 MÇ	115
39	42	Block 1	%0 BK-%100 YK	%25 DAHF-%75 MÇ	93.57
38	43	Block 1	%25 BK-%75 YK	%25 DAHF-%75 MÇ	76
40	44	Block 1	%0 BK-%100 YK	%25 DAHF-%75 MÇ	71.67
48	45	Block 1	%25 BK-%75 YK	%0 DAHF-%100 MÇ	64.16
18	46	Block 1	%25 BK-%75 YK	%75 DAHF-%25 MÇ	139.2
4	47	Block 1	%75 BK-%25 YK	%100 DAHF-%0 MÇ	112.25
20	48	Block 1	%0 BK-%100 YK	%75 DAHF-%25 MÇ	116.99
41	49	Block 1	%100 BK-%0 YK	%0 DAHF-%100 MÇ	90.5
6	50	Block 1	%50 BK-%50 YK	%100 DAHF-%0 MÇ	132.31

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek aktivite değeri %25 BK - %75 YK, %100 DAHF - %0 MÇ kombinasyonunda, 163.32 ± 12.24 U/g kuru substrat' dir. Design Expert 7.0.0 Genel Faktöryel Tasarım programı kullanılarak yapılan denemenin Prob>F değeri 0,05'ten küçük olduğundan (0,0001) model anlamlı çıkmıştır. Çizelge 4.9'da varyans analizinin (ANOVA) sonuçlarına yer verilmiştir.

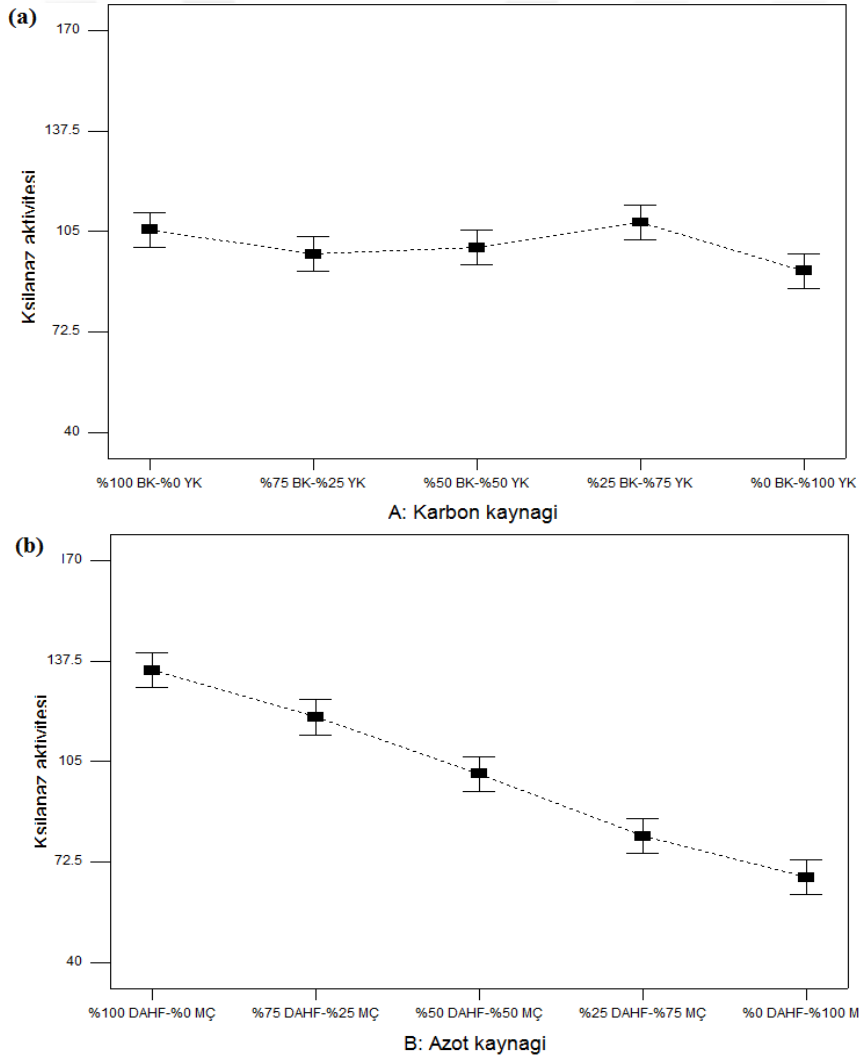
Çizelge 4.9. Varyans analizi (ANOVA).

ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Classical sum of squares - Type II]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	37836.63	24	1576.53	10.52	< 0.0001	significant
<i>A-Karbon kaynagi</i>	1573.58	4	393.40	2.62	0.0587	
<i>B-Azot kaynagi</i>	29878.21	4	7469.55	49.83	< 0.0001	
AB	6384.83	16	399.05	2.66	0.0137	
Pure Error	3747.51	25	149.90			
Cor Total	41584.14	49				
Std. Dev.	12.24		R-Squared	0.9099		
Mean	100.68		Adj R-Squared	0.8234		
C.V. %	12.16		Pred R-Squared	0.6395		
PRESS	14990.05		Adeq Precision	11.148		

Çizelge 4.9'da gösterilen varyans analizinde (ANOVA) modelin anlamlı olduğu görülmüştür. Karbon kaynağı yüzdesel oranlarının ksilanaz enzimi üretimi üzerinde etkisi yoktur. Azot kaynağı yüzdesel oranlarının ise ksilanaz enzimi üretimi üzerinde etkili faktör olduğu görülmüştür. Modelin R² değeri 0.9099, standart sapması 12.24'tür. Şekil 4.5 teorik değerlere karşı gerçek değerleri gösteren bir grafikdir. Şekil 4.5'te de görüldüğü gibi, teorik ve gerçek değerler uyumludur. Şekil 4.6'da ise azot ve karbon kaynağı konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi gösterilmiştir.

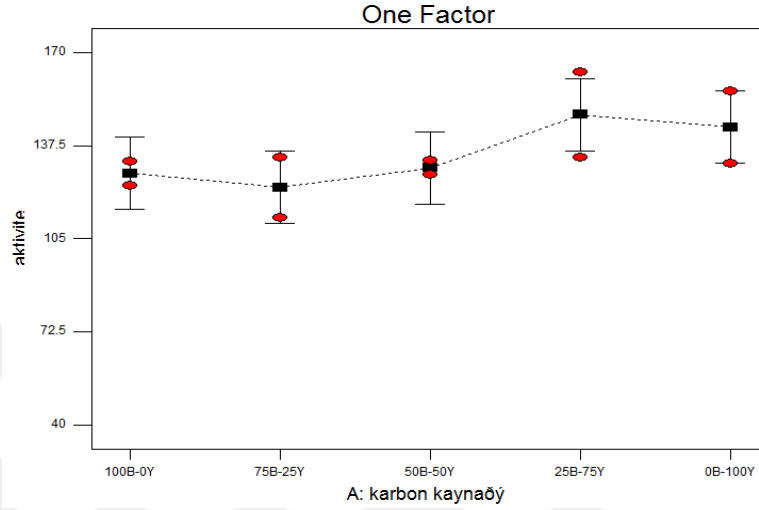


Şekil 4.5. Faktöryel tasarımda teorik değere karşı gerçek değer grafiği.



Şekil 4.6. Azot kaynağı (a) ve karbon kaynağı (b) konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi.

Azot kaynaklarının ksilanaz aktivitesi üzerindeki etkisinin ortalaması alındığında karbon kaynağı yüzdesel oranları arasındaki ksilanaz aktivitesi değerleri arasında istatistiksel fark yoktur (Şekil 4.6.a). Karbon kaynaklarının ksilanaz aktivitesi üzerindeki etkisinin ortalaması alındığında azot kaynakları arasında en yüksek aktivite %100 DAHF kullanıldığında elde edilmiştir (Şekil 4.6.b).



Şekil 4.7. Yüzde 100 DAHF yüzde oranı seçildiğinde karbon kaynağı yüzde oranlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi.

Azot kaynağı olarak %100 DAHF yüzde oranı seçildiğinde ortaya çıkan sonuç karbon kaynaklarının yüzdesel oranlarının aktivite üzerinde etkisi olmadığıdır (Şekil 4.7).

Ayrıca TARIST istatistik programı kullanılarak “İki faktörlü Tesadüf Parselleri” modeline göre varyans analizi yapılmıştır. Karbon kaynaklarının enzim aktiviteleri üzerine etkisi incelendiğinde istatistiksel olarak aralarındaki farkın Şekil 4.7’ye benzer şekilde önemli çıkmadığı görülmüştür. Varyans analizinde elde edilen veriler Çizelge 4.10’da sunulmuştur.

Çizelge 4.10. ‘İki faktörlü Tesadüf Parselleri’ modeline göre yapılan varyans analizi sonuçları.

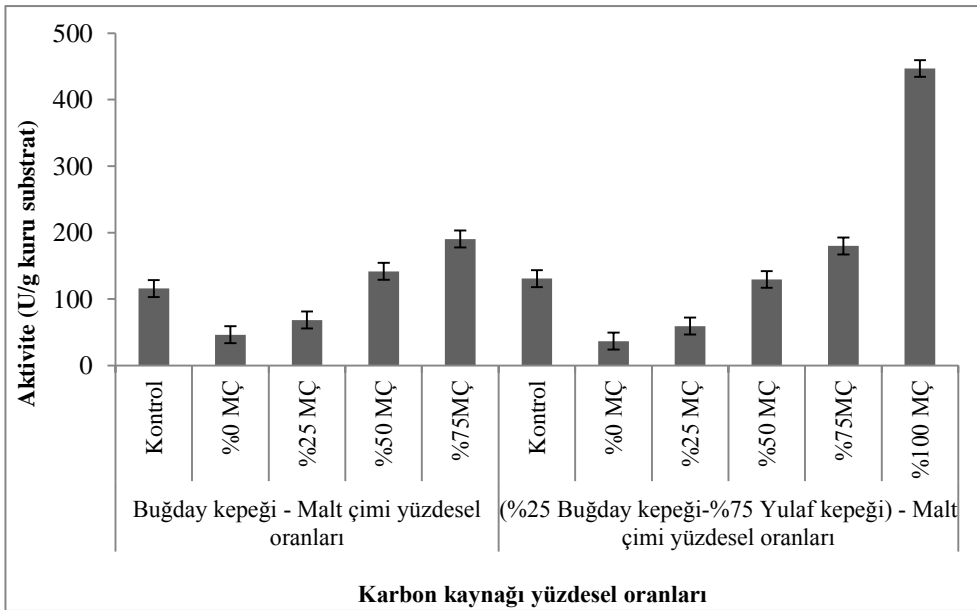
Karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine etkisi		Azot kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine etkisi
%100 BK %0 YK	99.40 a	%0 DAHF %100 MÇ 71.56 c
%75 BK %25 YK	100.15 a	%25 DAHF %75 MÇ 75.83 c
%50 BK %50 YK	100.02 a	%50 DAHF %50 MÇ 100.08 b
%25 BK %75 YK	99.40 a	%75 DAHF %25 MÇ 116.99 b
%0 BK %100 YK	92.27 a	%100 DAHF %0 MÇ 135.46 a
LSD_{0.05} 17.80		LSD_{0.05} 17.80

Azot kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde %100 DAHF - %0 MÇ uygulamasında ksilanaz aktivitesinin en yüksek değere (135.46 ± 12.24 U/g kuru substrat) ulaştığı tespit edilmiştir.

Elde edilen tüm sonuçlar göz önünde alındığında, DAHF'in azot kaynağı olarak kullanılabilmesine, karbon kaynağı için ise buğday kepeği, yulaf kepeği ve malt çimini içeren bir deneme planıyla optimizasyon çalışmasına devam edilmesine karar verilmiştir.

4.1.5. Buğday kepeği, yulaf kepeği ve malt çimi yüzdesel oranlarının belirlenmesi

Literatürde katı kültür fermentasyonunda buğday kepeğine ek olarak malt çimi oranının artırılmasının ksilanaz üretimini teşvik ettiği yönünde bildirimler bulunmaktadır (Sargın, 2003). Bu sebeple karbon kaynağı olarak BK - MÇ ve (%25 BK- %75YK) – MÇ nin belirli yüzdeleri ile deneme deseni kurulmuştur. Denemede kullanılan yüzdeler toplam substrat 5 g olacak şekilde, %0, 25, 50, 75, 100 olarak ayarlanmıştır. Üretimlerde ortam nem değeri VO1 ile %55'e getirilmiştir ve ek olarak herhangi bir azot kaynağı kullanılmamıştır. Üretim koşulları alt bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibidir. Kontrol erleni olarak DAHF eklenmiş VO1 ile nemlendirilmiş BK ve %25 BK - %75 YK kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.8'de, ortalama aktiviteler Çizelge 4.11'de sunulmuştur.



Şekil 4.8. Karbon kaynağı yüzdesel oranlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi.

Çizelge 4.11. Karbon kaynağı yüzdesel oranlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi.

Karbon kaynağı yüzdeleri	Ortalama aktivite (U/ml ekstrakt)	Ortalama aktivite (U/g kuru substrat)	Ortalama pH
%100 BK (Kontrol)	23.20	116.02	6.35
%100 BK-%0 MÇ	9.27	46.33	6.32
%75 BK-%25 MÇ	13.72	68.58	6.36
%50 BK-%50 MÇ	28.37	141.86	6.14
%25 BK-%75 MÇ	38.09	190.44	6.10
%25 BK-%75 YK (Kontrol)	26.19	130.94	6.44
%100 (%25BK-75YK)-%0 MÇ	7.34	36.70	6.38
%75 (%25BK-75YK)-%25 MÇ	11.88	59.42	6.53
%50 (%25BK-75YK)-%50 MÇ	25.92	129.60	6.24
%25 (%25BK-75YK)-%75 MÇ	36.00	180.00	6.18
%0 (%25BK-75YK)-%100 MÇ	89.38	446.90	6.06

Elde edilen veriler incelendiğinde kontrol üretimine göre buğday kepeği-malt çimi yüzdesel oranlarından malt çimi yüzdesi arttıkça aktivite değeri artmıştır. DAHF içeren VO1 ile nemlendirilmiş %100 buğday kepeği kullanılan kontrol ortamında ksilanaz aktivite değeri 116.02 ± 3.24 U/g kuru substrat iken, %50 BK-%50 MÇ ve %25 BK-%75 MÇ ortamlarında azot kaynağı eklenmeksizin gözlenen aktivite değerleri 141.86 ± 18.69 ve 190.44 ± 13.05 U/g kuru substrat'tır. Aynı şekilde kontrolüyle karşılaştırılırsa (%25 buğday kepeği, %75 yulaf kepeği)-malt çimi yüzdesel oranlarından malt çimi yüzdesi arttıkça aktivite değeri (U/g kuru substrat) artmıştır. DAHF içeren VO1 ile nemlendirilmiş %25 buğday kepeği, %75 yulaf kepeği kullanılan kontrol ortamında ksilanaz aktivite değeri 130.94 ± 6.19 U/g kuru substrat iken, %25 (%25BK-75YK)-%75 MÇ ortamında azot kaynağı eklenmeksizin gözlenen aktivite değeri 180.00 ± 29.49 U/g kuru

substrat'tır. Genel itibariyle bakılırsa %100 malt çimi kullanılan VO1 ile nemlendirilen substrat, karbon kaynağı olarak buğday kepeğini ve yulaf kepeğini geride bırakmıştır (446.90 ± 28.38 U/g kuru substrat). Yüzde 100 malt çimi kullanılan ortamın en yüksek aktivite değerini vermiş olması literatür ile karşılaştırıldığında ilginç bir veridir. Genellikle malt çimi organik azot kaynağı olarak kullanılmaktadır (Dobrev et al., 2007).

Yapılan literatür çalışmalarında ksilanaz üretimi için karbon kaynağı olarak tarımsal atıklar ikili yada üçlü kombinasyonlar halinde veya tek başına kullanılabilir. Jin ve arkadaşlarının (2012) yapmış olduğu çalışmada buğday kepeği, buğday samanı ve mısır koçanı arasından %30 buğday kepeği-%70 mısır koçanı kombinasyonu maksimum aktiviteyi vermiştir. Bunun yanında malt çiminin yüksek protein içeriği sebebiyle ksilanaz üretimini teşvik ettiği gösterilmiştir (Dobrev et al., 2007). Malt çimi ve buğday kepeğinin azot içeriği Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Malt çiminin içeriği.

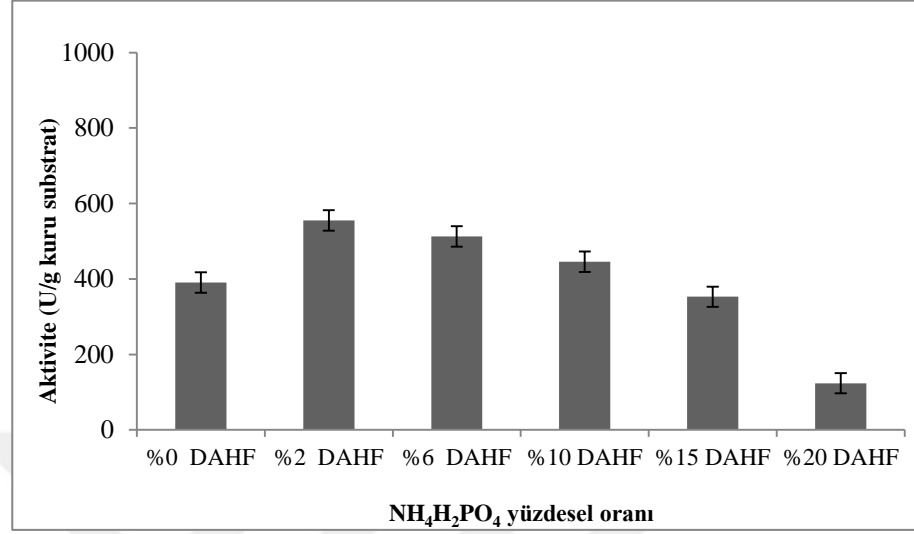
Karbon	%72.97
Azot	%6.33

Deneme 4.1.4. ve 4.1.5. sonuçları incelendiğinde karbon kaynağı olarak 7 TL/kg maliyeti bulunan yulaf kepeği ve maliyeti yüksek olmasa (0.5 TL/kg) dahi elde edilen aktivite değerleri malt çimine göre düşük seviyelerde kalmasından dolayı, aktivite sonuçları, bulunabilirlik ve maliyet parametrelerinin tümü düşünüldüğünde malt çiminin temel substrat olarak (2016 yılı birim fiyatı 0.6-0.7 TL/kg'dır), DAHF'ın ise temel substrata ek, inorganik azot kaynağı olarak kullanılmasına ve optimizasyon çalışmalarının bu bağlamda devam edilmesine karar verilmiştir.

4.1.6. İnorganik azot kaynağı olarak kullanılacak $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ miktarının belirlenmesi

Ksilanaz enzimi üretim ortamı inorganik azot kaynağı miktarının belirlenmesinde MÇ temel substrat olarak kullanılmıştır. Substrat nem içeriği VO1 ile %55 nem değerine getirilmiştir. Üretim koşulları yukarıda belirtildiği gibidir. Eklenen DAHF miktarı %0, 2, 6, 10, 15, 20 (ağırlık DAHF/ağırlık substrat) olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da, ortalama

aktivite değerleri (U/ml ekstrakt ve U/g kuru substrat) izelge 4.13'de sunulmuştur.



şekil 4.9. Üretim ortamına eklenen NH₄H₂PO₄ yzde oranlarının (ağırlık DAHF/ağırlık kuru substrat) ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi.

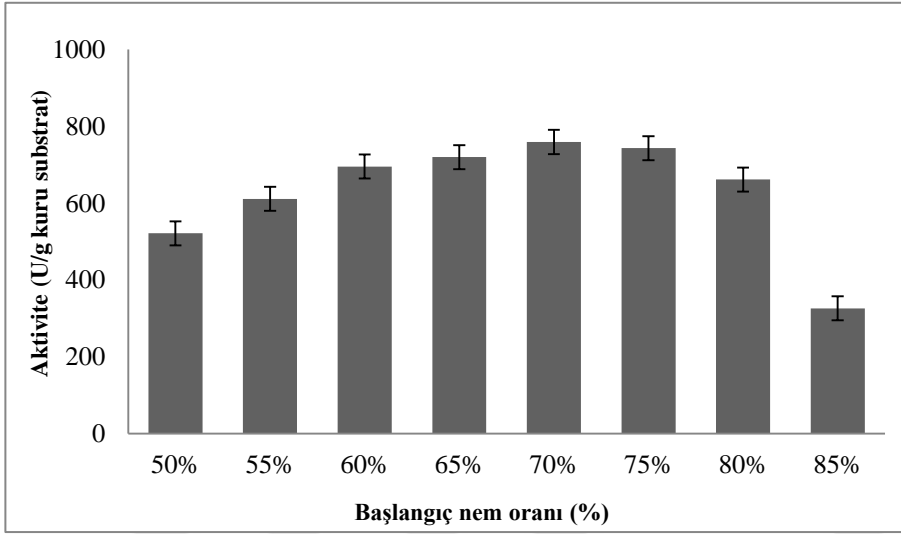
Çizelge 4.13. Üretim ortamına eklenen NH₄H₂PO₄ yzde oranlarının (ağırlık DAHF/ağırlık kuru substrat) ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi.

DAHF yzde oranı	Ortalama aktivite (U/ml ekstrakt)	Ortalama aktivite (U/g kuru substrat)	Ortalama pH
0%	78.09	390.46	5.89
2%	111.06	555.28	5.56
6%	102.59	512.95	5.31
10%	89.15	445.75	5.20
15%	70.57	352.86	4.86
20%	24.71	123.56	5.85

Elde edilen sonuçlara bakıldığında %2 DAHF eklenmiş VO1 ile nemlendirilmiş malt imi ortamı bu denemede ksilanaz üretim performansı açısından en yzsek değer olan 555.28±39.74 U/g kuru substrat'a ulaşmıştır. Azot kaynağı yzdesi arttıķı ksilanaz üretim performansının dűřtűęü gürzlmektedir.

4.1.7. Farklı başlangıç nem oranlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi

Başlangıç nem oranının etkisini görebilmek amacıyla malt çimi, DAHF eklenmiş VO1 ile nem değerleri %50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 olacak şekilde ayarlanmış, üç tekrar çalışılmıştır. Üretim koşulları yukarıda belirtildiği gibidir. Deneme bulguları Şekil 4.10'de, ortalama aktivite değerleri Çizelge 4.14'de sunulmuştur.



Şekil 4.10. Farklı başlangıç nem değerlerinde ksilanaz aktiviteleri (U/g kuru substrat).

Çizelge 4.14. Farklı başlangıç nem değerlerinde ortalama ksilanaz aktiviteleri (U/ml ekstrakt, U/g kuru substrat) ve pH değerleri.

Nem (%)	Ortalama aktivite (U/ml ekstrakt)	Ortalama aktivite (U/g kuru substrat)	Ortalama pH
50%	104.27	521.37	4.80
55%	122.24	611.18	5.60
60%	139.09	695.44	5.88
65%	143.94	719.69	6.15
70%	151.83	759.15	6.21
75%	148.62	743.12	6.25
80%	132.31	661.53	6.24
85%	65.23	326.14	5.94

Bu çalışmanın sonucunda, %65-75 oranında nemlendirilen erlenlerde benzer ve yüksek aktivite değerleri elde edilmiştir (719.69±48.73, 759.15±36.46,

743.12±28.36 U/g kuru substrat). Bunun yanında %60-80 arasında genel olarak birbirine yakın ve yüksek ksilanaz aktivitesi gözlenmiştir. En yüksek aktivite değeri olan 759.15±36.46 U/g kuru substrat %70 nem oranında görülmüştür.

Literatürde katı kültür fermentasyonunda farklı substratlar ile çeşitli optimum başlangıç nem oranları bulunmuştur. Liu ve arkadaşlarının (2008) yanıt yüzey metodolojisi ile yapmış olduğu çalışmada, başlangıç nem oranı optimizasyonu yapılmış ve üretimi en fazla etkileyen faktörün bu olduğu görülmüştür. Üretim ortamı olarak elma posası ve pamuk tohumunun kullanıldığı çalışmada başlangıç nem oranı %50-67 arası denenmiş maksimum aktivite değeri %62 nem oranında görülmüştür. Dai ve arkadaşları (2011) ise başlangıç nem oranını optimize etmek amacıyla merkezi kompozit tasarımını kullanmış, %53-67 aralığında denemeler kurmuş ve maksimum aktivite değerini (917.7 U/g kuru substrat) %61 nem oranında elde etmiştir. Venkatesh ve Tallapragada (2009), buğday kepeği ile katı kültür fermentasyonunda başlangıç nem optimizasyonu yapmış, %50, 75, 100, 150 nem aralığında en yüksek aktivite değerini %75 oranında gözlemlemiştir.

Başlangıç nem oranı katı kültür fermentasyonu için kritik bir parametredir. Nem oranı arttıkça oksijen ve besin transferi, azaldıkça ise mikroorganizmanın büyümesi olumsuz etkilenebilir. Bu sebeple optimize edilmesi gereken parametrelerin başında gelmektedir (Venkatesh and Tallapragada, 2009).

Bu denemede %65-75 aralığında yüksek aktivite değerleri elde edildiği ve bu aktivite değerlerinin yakın değerler olduğu görülmüştür. Katı kültür fermentasyonunda geniş bir nem aralığında çalışmak özellikle biyoreaktör üretimleri açısından büyük önem taşımaktadır. Biyoreaktörlerde havalandırılan üretim ortamı süreç boyunca nem kaybına uğrayabilmektedir. Bu sebeple nispeten yüksek nem değerleri ile üretimin başlatılması ve nem kaybı sebebiyle aktivite kaybının önlenmesi mümkün olacaktır.

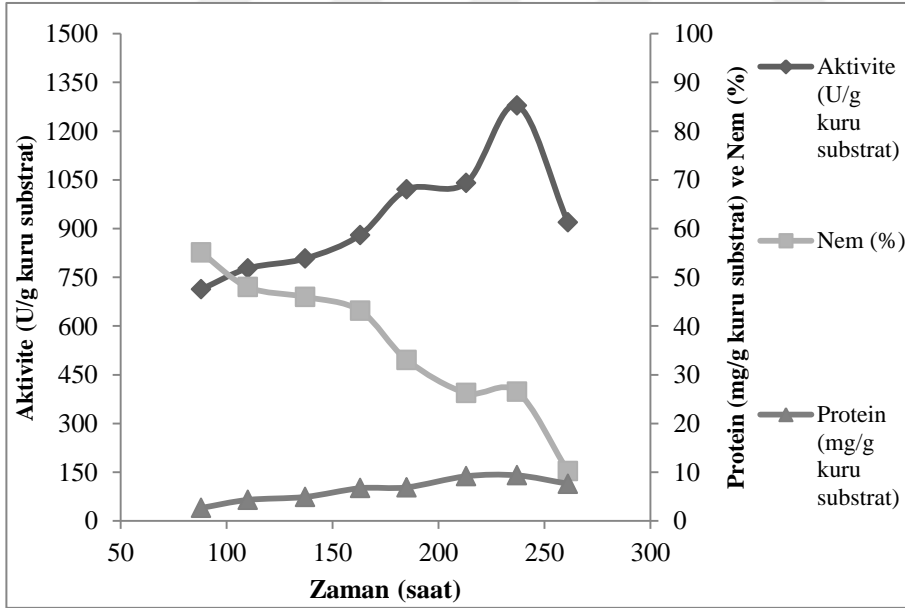
Erlenmayerlerde optimizasyon çalışmalarının sonucunda katı kültür fermentasyonu ile ksilanaz üretiminde biyoreaktör denemeleri, ksilanaz aktivitesinin maksimum olduğu %70 başlangıç nem oranı ile gerçekleştirilmiştir.

4.2. Biyoreaktörde Üretim

Yüzeiden havalandırılan beş tepsili biyoreaktörde katı kültür fermentasyon besin ortamı (malt çimi – MÇ) başlangıç nem içeriği VO1 ile %2 (ağırlık DAHF/ ağırlık substrat) kullanılarak başlangıç nem oranı %70 olacak şekilde ayarlanmıştır. Biyoreaktör üretimlerinde inokulasyon ve havalandırma hızı denemeleri gerçekleştirilmiştir. Üretim koşulları alt bölüm 3.2.3’ de anlatıldığı gibidir.

4.2.1. Tepsili biyoreaktörde inokulasyonun ksilanaz üretimine etkisi

Katı Kültür Fermentasyonu ile ksilanaz enzimi üretiminde inokulasyonun ksilanaz aktivitesi üzerine etkisini görebilmek amacıyla hazırlanan üretim ortamı, sırasıyla (hacim/ağırlık) spor inokulasyonu ile aşılandıktan sonra 5 L/dak debi ile havalandırılmıştır. Beş farklı tepside alınan örneklerin aktivite, protein ve nem değerlerinin ortalaması alınmıştır. 0.1 ml /g substrat spor inokulasyonu ile yapılan denemeden elde edilen bulgular Şekil 4.11’de, tüm sonuçlar Çizelge 4.15’de verilmiştir.



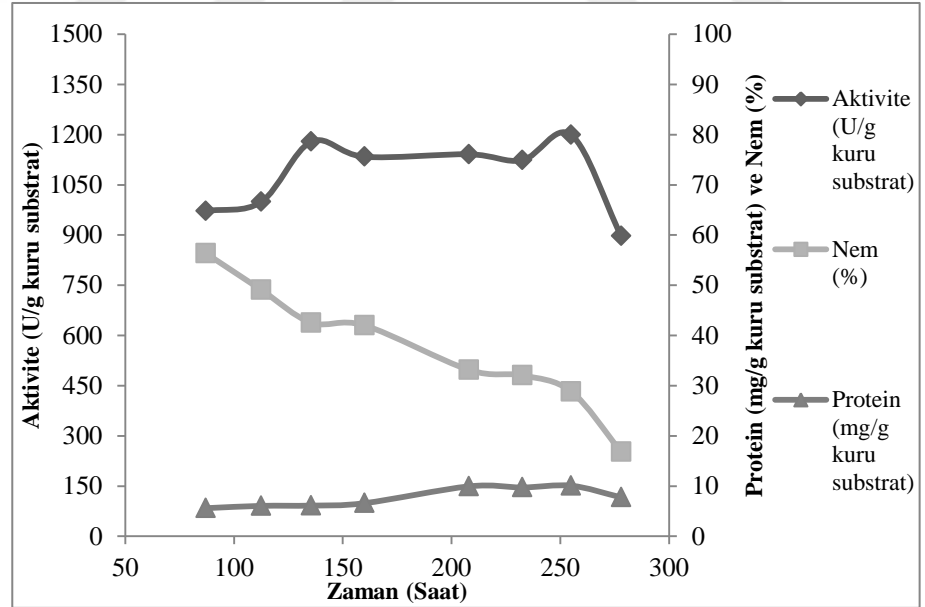
Şekil 4.11. Tepsili biyoreaktörde 0.1 ml /g substrat spor inokulasyonu ile üretim.

Çizelge 4.15. Tepsili biyoreaktörde 0.1 ml /g substrat spor inokulasyonu ile üretimin aktivite (U/g kuru substrat), protein (mg/g kuru substrat) ve nem oranı (%) sonuçları.

Zaman (Saat)	Aktivite (U/g kuru substrat)	Protein (mg/g kuru substrat)	Nem (%)
88	713.01	2.67	55.10
110	777.42	4.32	48.68
137	807.75	4.93	46.00
163	880.32	6.72	43.15
185	1020.28	6.90	33.04
213	1040.66	9.17	26.27
237	1279.39	9.35	26.52
261	919.74	7.63	10.23

Katı kültür fermentasyon ortamına 0.1 ml /g substrat inokulasyon yapıldığında elde edilen maksimum aktivite değeri 237. saatte 1279.39 ± 180.20 U/g kuru substrat, protein miktarı ise 9.35 mg/g kuru substrattır.

0.2 ml /g substrat spor inokulasyonu ile yapılan denemeden elde edilen bulgular Şekil 4.12’de, tüm sonuçlar Çizelge 4.16’ da sunulmuştur.



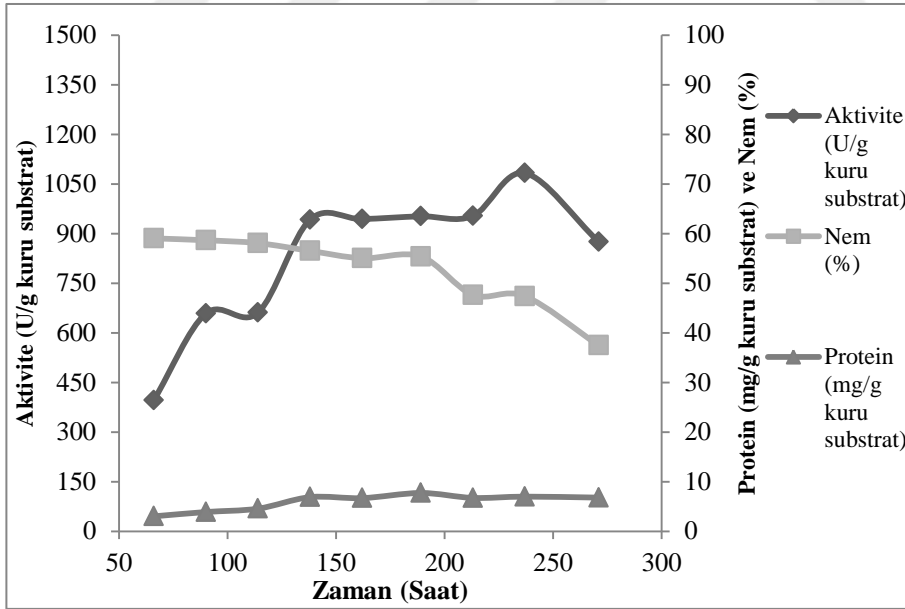
Şekil 4.12. Tepsili biyoreaktörde 0.2 ml /g substrat spor inokulasyonu ile üretim.

Çizelge 4.16. Tepsili biyoreaktörde 0.2 ml /g substrat spor inokulasyonu ile üretimin aktivite (U/g kuru substrat), protein (mg/g kuru substrat) ve nem oranı(%) sonuçları.

Zaman (Saat)	Aktivite (U/g kuru substrat)	Protein (mg/g kuru substrat)	Nem (%)
87	971.63	5.60	56.37
112.5	999.14	6.06	49.08
135.5	1178.78	6.11	42.54
160	1133.83	6.60	42.01
208	1141.34	9.94	33.14
232.5	1123.71	9.73	32.05
255	1199.24	10.07	28.83
278	896.61	7.75	16.81

Katı kültür fermentasyon ortamına 0.2 ml /g substrat inokulasyon yapıldığında elde edilen maksimum aktivite değeri 255. saatte 1199.24 ± 109.84 U/g kuru substrat, protein miktarı ise 10.07 mg/g kuru substrattır.

0.4 ml /g substrat spor inokulasyonu ile yapılan denemeden elde edilen bulgular Şekil 4.13’de, tüm sonuçlar Çizelge 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4.13. Tepsili biyoreaktörde 0.4 ml /g substrat spor inokulasyonu ile üretim.

Çizelge 4.17. Tepsili biyoreaktörde 0.4 ml /g substrat spor inokulasyonu ile üretimin aktivite (U/g kuru substrat), protein (mg/g kuru substrat) ve nem oranı(%) sonuçları.

Zaman (saat)	Aktivite (U/g kuru substrat)	Protein (mg/g kuru substrat)	Nem (%)
66	396.08	3.01	59.05
90	658.39	3.88	58.67
114	660.93	4.56	58.09
138	942.20	6.88	56.53
162	943.99	6.68	55.04
189	952.40	7.72	55.41
213	953.61	6.73	47.66
237	1083.07	6.98	47.39
271	875.24	6.79	37.47

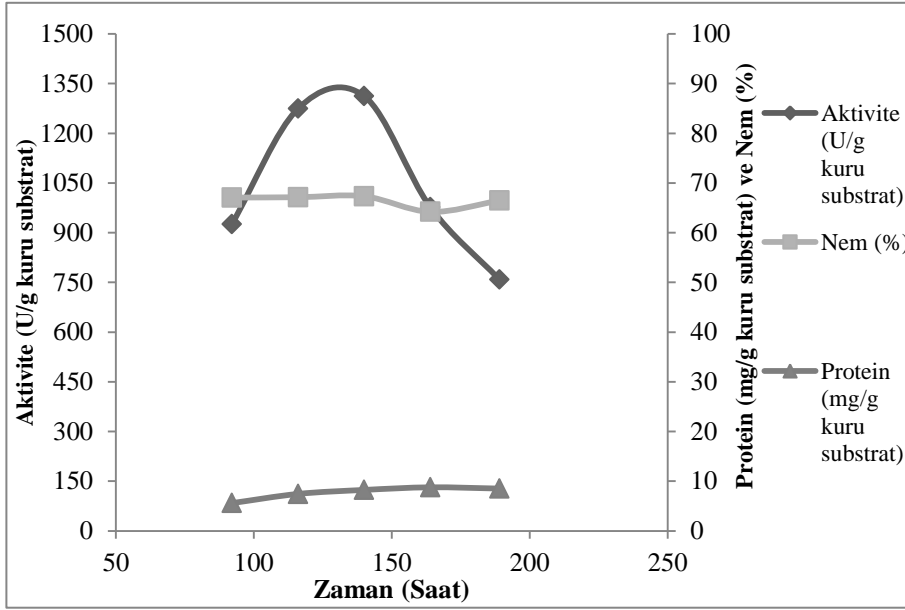
Katı kültür fermentasyon ortamına 0.4 ml /g substrat inokulasyon yapıldığında elde edilen maksimum aktivite değeri 237. saatte 1083.07±215.70 U/g kuru substrat, protein miktarı ise 6.98 mg/g kuru substrattır.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, 0.1, 0.2, 0.4 ml /g substrat spor inokulasyonu çalışılan denemelerde, 0.1 ml /g substrat inokulasyon ile en yüksek ksilanaz aktivitesine ulaşılmıştır (1279.39±180.20 U/g kuru substrat).

Katı kültür fermentasyonunda *Aspergillus niger* ile çalışmalarda $1 \cdot 10^8$ spor/ml içeren spor süspansiyonu ve 0.1 ml /g substrat inokulum ile ksilanaz üretildiği bildirilmiştir (Salihu et al., 2015). Lee ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada ise selüloz üretiminde *Aspergillus niger* fungusu kullanılmış, $1 \cdot 10^8$ spor/ml spor süspansiyonundan 0.2 ml /g substrat inokulasyon yapıldığı belirtilmiştir. Beeraka ve arkadaşlarının (2008) yapmış olduğu çalışmada katı kültür fermentasyonunda ksilanaz üretimi için *Aspergillus fumigatis* kullanılmış, bu çalışmada maksimum ksilanaz aktivitesi 0.2 ml /g substrat inokulasyon oranında gözlenmiştir. Katı kültür fermentasyonunda üretilen enzimin türü ve kullanılan fungusa göre optimum inokulasyon oranı değişiklik göstermektedir.

4.2.2. Biyoreaktörde havalandırma hızının ksilanaz üretimine etkisi

Havalandırma hızının katı kültür fermentasyonu ile ksilanaz üretiminde etkisini görebilmek amacıyla hazırlanan üretim ortamı, 0.1 ml /g substrat spor inokulasyonu ile aşılandıktan sonra sırasıyla 2.5, 5, 10 L/dak debi ile havalandırılmıştır. Havalandırma hızı denemelerinde hava şartlandırıcı kullanılarak başlangıç nem oranının üretim süresince sabit tutulması amaçlanmıştır. Havalandırma hızı 2.5 L/dak olan denemeden elde edilen bulgular Şekil 4.14’de, tüm sonuçlar Çizelge 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.14. Tepsili biyoreaktörde 2.5 L/dk havalandırma hızı ile üretim.

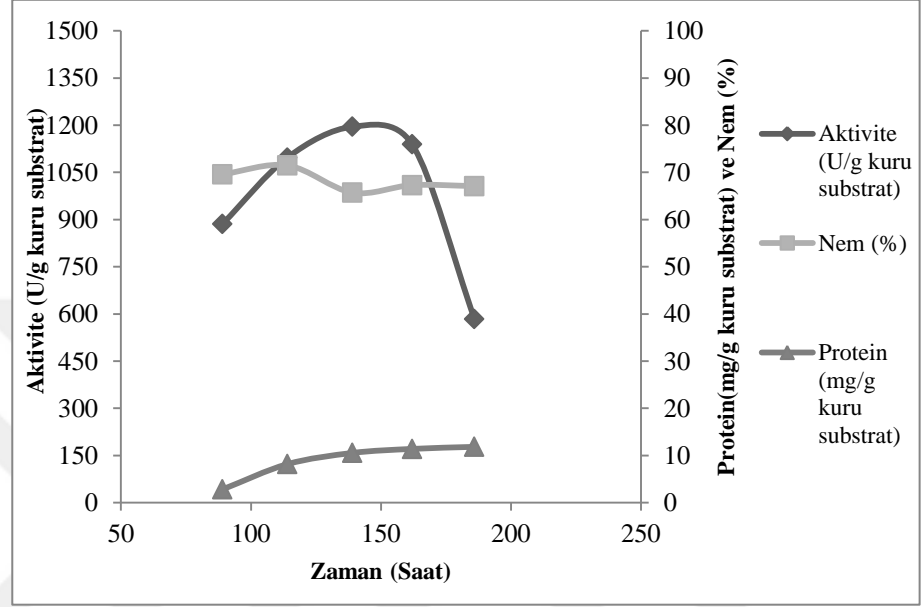
Çizelge 4.18. Tepsili biyoreaktörde 2.5 L/dk havalandırma hızı ile üretimin aktivite (U/g kuru substrat), protein (mg/g kuru substrat) ve nem oranı(%) sonuçları.

Zaman (Saat)	Aktivite (U/g kuru substrat)	Protein (mg/g kuru substrat)	Nem (%)
92	925.47	5.59	67.07
116	1274.25	7.44	67.14
140	1312.04	8.24	67.33
164	976.55	8.77	64.20
189	758.80	8.51	66.45

Şekil 4.14 ve Çizelge 4.18’de görüldüğü gibi hava şartlandırıcı kullanılan üretimde fermentasyon ortamının nem içeriği inkübasyonun 92. ile 189. saatleri arasında benzer sonuçlar vermekte, bu sayede ortam nem dengesi korunmaktadır. Havalandırma hızı 2.5 L/dk iken, maksimum ksilanaz aktivitesi 140. saatte

(1312.04±236.98 U/g kuru substrat) ve maksimum protein miktarı 164. saatte (8.77 mg/g kuru substrat) gözlemlenmiştir.

Havalandırma hızı 5 L/dak olan denemeden elde edilen veriler Şekil 4.15’de, tüm sonuçlar Çizelge 4.19’da verilmiştir.



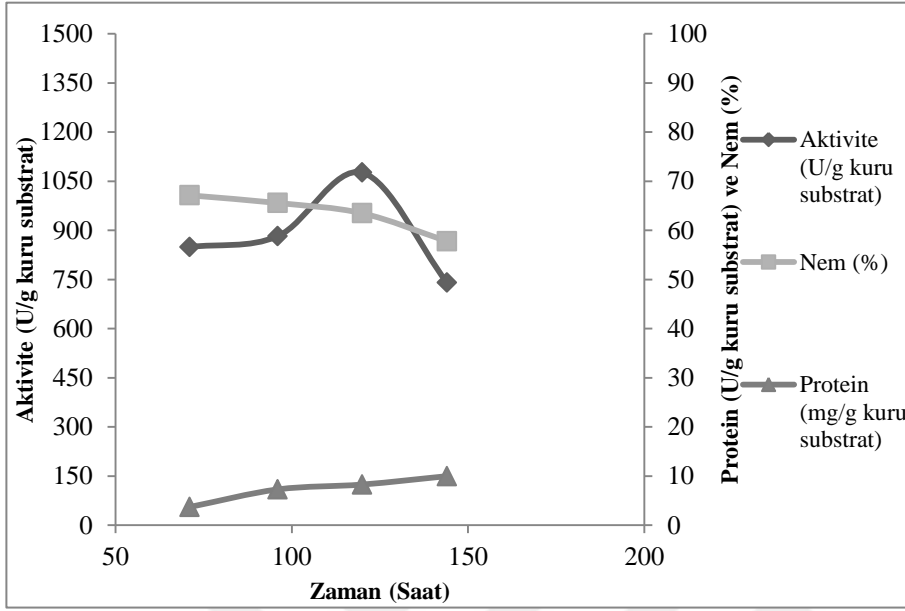
Şekil 4.15. Tepsili biyoreaktörde 5 L/dk havalandırma hızı ile üretim.

Çizelge 4.19. Tepsili biyoreaktörde 5 L/dk havalandırma hızı ile üretimin aktivite (U/g kuru substrat), protein (mg/g kuru substrat) ve nem oranı(%) sonuçları.

Zaman (Saat)	Aktivite (U/g kuru substrat)	Protein (mg/g kuru substrat)	Nem (%)
89	885.56	2.81	69.59
114	1096.82	8.17	71.46
139	1194.89	10.54	65.71
162	1138.98	11.40	67.29
186	583.85	11.84	67.09

Havalandırma hızı 5 L/dk iken, maksimum ksilanaz aktivitesi ve protein miktarı 139. saatte (1194.89±250.48 U/g kuru substrat, 11.40 mg/g kuru substrat) gözlemlenmiştir. Fermentasyon ortamının nem içeriği inkübasyonun 89. ile 186. saatleri arasında yakın sonuçlar vermekte, bu sayede bu denemede de ortam nem dengesi korunmaktadır.

Havalandırma hızı 10 L/dak olan denemeden elde edilen veriler Şekil 4.16'da, tüm sonuçlar Çizelge 4.20'de sunulmuştur.



Şekil 4.16. Tepsili biyoreaktörde 10 L/dk havalandırma hızı ile üretim.

Çizelge 4.20. Tepsili biyoreaktörde 10 L/dk havalandırma hızı ile üretimin aktivite (U/g kuru substrat), protein (mg/g kuru substrat) ve nem oranı(%) sonuçları.

Zaman (Saat)	Aktivite (U/g kuru substrat)	Protein (mg/g kuru substrat)	Nem (%)
71	849.24	3.71	67.13
96	882.18	7.29	65.57
120	1076.15	8.29	63.47
144	740.87	9.99	57.80

Havalandırma hızı 10 L/dk iken, en yüksek ksilanaz aktivitesi ve protein miktarı 120. saatte (1076.15 ± 139.74 U/g kuru substrat, 8.29 mg/g kuru substrat) gözlemlenmiştir. Fermentasyon ortamının nem içeriği hava şartlandırıcı kullanılmasına rağmen inkübasyonun son saatlerinde düşmeye başlamıştır, bunun sebebi olarak 10 L/dk havalandırma hızının yüksek bir hız olduğu ve katı üretim ortamını kuruttuğu söylenebilir.

Havalandırma hızı denemelerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında en yüksek ksilanaz üretim performansı 2.5 L/dk havalandırma hızıyla 140. saatte görülmüştür (1312.04 ± 236.98 U/g kuru substrat).

Perez-Rodriguez ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada yatay tüp reaktörde ksilanaz üretimi için mineral tuz solüsyonu ile nemlendirilmiş 20 g mısır koçanı 0.1, 0.2, 0.3 L/dk havalandırma hızları denenmiş maksimum ksilanaz aktivitesi 0.2 L/dk havalandırma hızında görülmüştür. Diaz ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (2009) ise pektinaz, selülaz ve ksilanaz enzimlerinin katı kültür fermentasyonu ile üretiminde *Aspergillus awamori* fungusunu kullanarak döner tamburlu biyoreaktörde üretimler gerçekleştirilmiştir. 250 g üzüm posası üretim ortamı olarak kullanılmış, 0, 9, 120, 200 ml/dk havalandırma hızları denenmiş, 120 ml/dk havalandırma hızında maksimum ksilanaz aktivitesi gözlenmiştir. Yatay biyoreaktörde *Fusarium oxysporum*'dan ksilonolitik enzim üretiminde 2.5 kg üretim ortamı kullanılmış, 5L/dk debiyle havalandırma hızı ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır (Panagiotou, 2003).



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

KKF yöntemiyle ksilanaz enzimi üretim çalışmalarında öncelikle erlenmayer üretimleriyle karbon kaynağı, azot kaynağı, azot kaynağı miktarı ve nem oranı gibi parametreler optimize edilmeye çalışılmış, sonrasında tepsili biyoreaktör üretimleriyle inokulasyon ve havalandırma debisinin ksilanaz enzimi üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çizelge 5.1’de yapılan denemelerden elde edilen bulgular özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. Erlenmayer ve biyoreaktörde katı kültür fermentasyonu (KKF) ile ksilanaz enzimi üretimi optimizasyon parametreleri ve elde edilen aktivite değerleri (U/g kuru substrat).

Parametreler	Optimum Parametre ve En Yüksek Aktivite Değerleri	
	Erlenmayerde üretim	Biyoreaktörde üretim
Karbon kaynağı (Buğday kepeği, Yulaf kepeği, Pirinç kepeği, Talaş, Mısır koçanı, Malt çimi)	Malt çimi	-
Azot kaynağı (Malt çimi, Soya unu, Mısır küspesi, Üre, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3 , $(NH_4)_2HPO_4$)	$(NH_4)_2HPO_4$	-
Azot kaynağı miktarı %0, 2, 6, 10, 15, 20 (ağırlık $(NH_4)_2HPO_4$ /ağırlık substrat)	%2	-
Başlangıç nem oranı (%50-85)	%70	-
İnokulasyon (0.1, 0.2, 0.4 ml spor süspansiyonu /g substrat)	-	0.1 ml/g
Havalandırma debisi (2.5, 5, 10 L/dak)	-	2.5 L/dak
Aktivite değerleri (U/g kuru substrat)	759.15 U/g	1312.04 U/g
Maksimum aktiviteye ulaşılan süre (saat)	96 sa	140 sa

Ksilanaz enzimi endüstride birçok uygulama alanı bulurken, ülkemizde ksilanaz enzimi üretimi yapılmamaktadır. Diğer enzimler ile birlikte ksilanaz da gerekli sektörler için diğer ülkelerden ithalat ile sağlanmakta olup ülkemiz ekonomisine yük getirmektedir. Ksilanazın özellikle gıda sektöründe yaygın kullanımı mevcuttur. Ksilanaz enzimi ekmekte hacim arttırıcı olarak ekme formülasyonunda mutlak yer alan işlem yardımcı maddesidir. Türkiye’de genel olarak gıda endüstrisinde alt sektör dağılımlarına bakılırsa un ve unlu mamuller gıda sanayinin %65’ini oluşturmaktadır (Demiraslan, 2013). Unlu mamuller sektörüne bakıldığında ksilanaz enziminin tahmini ithalat rakamları, ilgili sektör yetkilileri tarafından 240-250 ton/yıl olarak bildirilmiştir. Mali değeri ise yaklaşık 5.5 milyon TL/yıl olarak hesaplanmaktadır.

Yüksek talebi olan bu enzimin düşük maliyetle üretilmesi yine katı kültür fermentasyonu gibi yatırım ve üretim maliyetleri yönünden ekonomik bir yöntemin kullanımıyla mümkün olabilir. KKF verim, yüksek ürün konsantrasyonu, ürünün kolay geri kazanımı ve tarımsal atıkların hammadde olarak kullanılabilmesinden ötürü derin kültür fermentasyonuna kıyasla avantajlıdır. Bunun yanında ölçek büyütme problemlerinin varlığı dezavantajlı bir durumdur. Ksilanaz enzimi üretimi için yapılacak bir yatırımda avantaj, dezavantajlar ve üretim ölçeği göz önüne alınarak KKF üretim sistemleri de alternatif olarak düşünülmelidir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aachary, A.A. and Prapulla, S.G., 2011, Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10:1-16 pp.
- Abdel-Aal, E.S.M., Hucl, P., Chibbar, R.N., Han, H.L. and Demeke, T., 2002, Physicochemical and structural characteristics of flours and starches from waxy and nonwaxy wheats, *Cereal Chem.*, 79(3):458–464 pp.
- Ahmad, Z., 2009, Production and Characterization of Xylanase for Utilization in Baking Industry, Doctor Thesis, National Institute of Food Science and Technology University of Agriculture, 192p.
- Ahmed, S., Riaz, S. and Jamil, A., 2009, Molecular cloning of fungal xylanases: an overview, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84:19–35 pp.
- Ali, S., Haq, I., Ma, Q. and Iqbal, J., 2002, Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor, *Electronic Journal of Biotechnology*, 5(3):258-271 pp.
- Bajaj, B.K. and Manhas, K., 2012, Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1:330–337 pp.
- Beeraka, N., Katikala, P.K., Bobbarala, V. and Tadimalla, P., 2008, Optimization of xylanase production under solid state fermentation by isolated *Aspergillus fumigatus* (MTCC 9372), *Indian Journal of Multidisciplinary Research*, 4(4):507-516 pp.
- Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor, M. and Hoondal, G.S., 2000, Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24:396-402 pp.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. and Hoondal, G.S., 2001, Microbial xylanases and their industrial applications: a review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56:326–338 pp.
- Biely, P., Vrsanska, M., Tenkanen, M. and Kluepfel, D., 1997, Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties, *Journal of Biotechnology*, 57: 151–166 pp.
- Burlacu, A., Cornea, C.P. and Israel-Roming, F., 2016, Microbial xylanase: a review, *Series F. Biotechnologies*, 20:335-342 pp.
- Buswell, J.A. and Chang, S., 1994, Biomass and extracellular hydrolytic enzyme production by six mushroom species grown on soybean waste, *Biotechnology Letters*, 16(12):1317-1322 pp.
- Butt, M.S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z. and Sultan, T., 2008, Xylanases and their applications in baking industry, *Food Technol. Biotechnol.*, 46(1):22–31 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Camacho, N.A. and Aguilar, G.O., 2003, Production, purification, and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in baking, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104:159-171 pp.
- Cao, Y., Meng, D., Lu, J. and Long, J., 2008, Statistical optimization of xylanase production by *Aspergillus niger* AN-13 under submerged fermentation using response surface methodology, *African Journal of Biotechnology*, 7(5):631-638 pp.
- Casciadori, F.P., Bück, A., Thomeo, C. and Tsotsas, E., 2016, Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor, *Chemical Engineering Journal*, 287:103–116 pp.
- Chapla, D., Patel, H., Madamwar, D. and Shah, A., 2012, Assessment of a thermostable xylanase from *Paenibacillus* sp. ASCD2 for application in prebleaching of eucalyptus kraft pulp, *Waste Biomass Valor*, 3:269–274 pp.
- Collins, T., Gerday, C. and Feller, G., 2005, Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, *FEMS Microbiology Reviews*, 29:3–23 pp.
- Dai, X., Liu, M., Jin, H. and Jing, M., 2011, Optimisation of Solid-state Fermentation of *Aspergillus niger* JL-15 for Xylanase Production and Xylooligosaccharides Preparation, *Czech J. Food Sci.*, 29(5):557–567 pp.
- Deesukon, W., Nishimura, Y., Harada, N., Sakamoto, T. and Sukhumsirichart, W., 2011, Purification, characterization and gene cloning of two forms of a thermostable endo-xylanase from *Streptomyces* sp. SWU10, *Process Biochemistry*, 46:2255–2262 pp.
- Demiraslan, V., 2013, Türkiye’de ki un ve unlu mamuller işletmelerinin pazarlama yönetimleri açısından incelenmesi: edirne ili örneği, *Akademik Bakış Dergisi*, 34:1-18 s.
- Desobgo, S.C.Z., Mishra, S., Behera, S.K. and Panda, S.K., 2016, Scaling-up and modelling applications of solid-state fermentation and demonstration in microbial enzyme production related to food industries, *Microbial Enzyme Technology in Food Applications*, 25:452-468 pp.
- Dhiman, S.S., Sharma, J. and Battan, B., 2008, Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review, *BioResources*, 3(4):1377-1402 pp.
- Diaz, A.B., Ory, I., Caro, I. and Blandino, A., 2009, Solid state fermentation in a rotating drum bioreactor for the production of hydrolytic enzymes, *Chemical Engineering Transactions*, 6 p.
- Djekrif-Dakhmouche, S., Gheribi-Aoulmi, Z., Meraihi, Z and Bennamoun, L., 2006, Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder, *Journal of Food Engineering*, 73:190-197 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dobrev, G.T., Pishtiyski, I.G., Stanchev, V.S. and Mircheva, R., 2007, Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design, *Bioresource Technology*, 98:2671–2678 pp.
- Durand, A., 2003, Bioreactor designs for solid state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 13:113–125 pp.
- Esteban, R., Villanueva, I.R. and Villa, T.G., β -D-Xylanases of *Bacillus circulans* WL-12, *Can. J. Microbiol.*, 28:733–739 pp.
- Ghoshal, G., Kamble, A., Shivhare, U.S. and Banerjee, U.C., 2011, Optimization of culture conditions for the production of xylanase in submerged fermentation by *Penicillium citrinum* using response surface methodology, *IJRRAS*, 6(2):132-137 pp.
- Gote, M.M., 2004, Isolation, Purification and characterization of thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146), Doctor Thesis, University of Pune, 169p.
- Guimaraes, N.C.A., Sorgatto, M., Peixoto-Nogueira, S.C., Betini, J.H.A., Zanoelo, F.F., Marques, M.R., Polizeli, M.L.T.M. and Giannesi, G.C., 2013, Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substrate, *SpringerPlus*, 2:1-7 pp.
- Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A. and Shirkot, C.K., 2013, Optimization of cultural conditions for cellulase-free xylanase production by mutant strain of alkalophilic *Cellulosimicrobium* sp. CKMX1 in submerged fermentation, *Appl. Biol. Res.*, 15(2):137–144 pp.
- Gupta, U. and Kar, R., 2008, Optimization and scale up of cellulase free endo xylanase production by solid state fermentation on corn cob and by immobilized cells of a thermotolerant bacterial isolate, *Jordan Journal of Biological Sciences*, 1(3):129-134 pp.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S. and Rai, V., 2013, A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond, *BioMed Research International*, 18 p.
- Güner, K. ve Dağlıoğlu, O., 2008, Ksilanaz enziminin ekmek yapımında kullanımı, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.
- Harris, A.D. and Ramalingam C., 2010, Xylanases and its application in food industry: A review, *Journal of Experimental Sciences*, 1(7):1-11 pp.
- Haq, I., Tasneem, M., Raana, K., Khan, A., Mukhtar, H. and Javed, M., 2004, Optimization of cultural conditions for the production of xylanase by chemically mutated strain of *Aspergillus niger* GCBCX-20, *Int. J. Agri. Biol.*, 6(6):1115-1118 pp.
- Heinze, T., Koschella, A. and Ebringerova, A., 2003, Chemical functionalization of xylan: A short review, *In Hemicelluloses: Science and Technology*, ch20.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hmida-Sayari, A., Taktek, S., Elgharbi, F. and Bejar, S., 2012, Biochemical characterization, cloning and molecular modeling of a detergent and organic solvent-stable family 11 xylanase from the newly isolated *Aspergillus niger* US368 strain, *Process Biochemistry*, 47:1839–1847 pp.
- Ho, H.L., 2014, Effects of medium formulation and culture conditions on microbial xylanase production using agricultural extracts in submerged fermentation (smf) and solid state fermentation (ssf): a review, *Biodiversity, Bioprospecting and Development*, 1(3):1-13 pp.
- Hölker, U., Höfer, M. and Lenz, J., 2004, Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64:175–186 pp.
- Irfan, M., Nadeem, M. and Syed, Q., 2014, One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7:317-326 pp.
- Irfan, M., Asghar, U., Nadeem, M., Nelofer, R. and Syed, Q., 2016, Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp. in submerged fermentation, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9:139-147 pp.
- Izydorczyk, M.S. and Dexter, J.E., 2008, Barley b-glucans and arabinoxylans: molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products—a review, *Food Research International*, 41:850–868 pp.
- Jeffries, T.W., 1996, Biochemistry and genetics of microbial xylanases, *Current Opinion in Biotechnology*, 7:337-342 pp.
- Jhamb, K. and Sahoo, D.K., 2012, Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase, *Bioresource Technology*, 123:135–143 pp.
- Jin, N., Ma, S., Liu, Y., Yi, X., He, R., Xu, H., Qiao, D.R. and Cao, Y., 2012, Thermophilic xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using wheat straw and corn cob, *African Journal of Microbiology Research*, 6(2):2387-2394 pp.
- Juturu, V. and Wu, J.C., 2012, Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications, *Biotechnology Advances*, 30:1219–1227 pp.
- Kalim, B., Böhringer, N., ali, N. And Schaberle, T.F., 2015, Xylanases—from microbial origin to industrial application, *British Biotechnology Journal*, 7(1):1-20 pp.
- Kapilan, R., 2015, Solid state fermentation for microbial products : a review, *Archives of Applied Science Research*, 7(8):21-25 pp.
- Krishna, C., 2005, Solid state fermentation systems - an overview, *Critical Reviews in Biotechnology*, 25:1–30 pp.
- Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M., 1999, Molecular and biotechnological aspects of xylanases, *FEMS Microbiology Reviews*, 23:411-456 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, D., Kumar, S.S., Kumar, J., Kumar, O., Mishra, S.V., Kumar, R., Malyan, S.K., 2017, Xylanases and their industrial applications : a review, *Biochem. Cell. Arch.*, 17(1):353-360 pp.
- Labat, E., Rouau, X. and Morel, M.H., 2002, Effect of flour water-extractable pentosans on molecular associations in gluten during mixing, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 35:185–189 pp.
- Lee, C.K., Darah, I. and Ibrahim, C.O., 2011, Production and optimization of cellulase enzyme using *Aspergillus niger* USM AI 1 and comparison with *Trichoderma reesei* via solid state fermentation system
- Lemos, J.L.S., Fontes M.C.A. and Pereira, N., 2001, Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, In: Davison B.H., McMillan J., Finkelstein M. (eds) Twenty-Second Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. ABAB Symposium. Humana Press, Totowa, NJ.
- Liu, C, Sun, Z., Du, J. and Wang, J., 2008, Response surface optimization of fermentation conditions for producing xylanase by *Aspergillus niger* SL-05, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35:703-711 pp.
- Maciel, G.M., Vandenberghe, L.P.S., Windson, C., Haminiuk, I., Fendrich, R.C., Bianca, B.E.D., Brandalize, T.Q.S., Pandey, A. and Soccol, C.R., 2008, Xylanase production by *Aspergillus niger* LPB 326 in solid-state fermentation using statistical experimental designs, *Food Technol. Biotechnol.*, 46(2):183–189 pp.
- Mandal, A., 2015, Review on microbial xylanases and their applications, *International Journal of Life Sciences*, 4(3):178-187 pp.
- Martinez-Anaya, M.A. and Jimenez, T., 1997, Functionality of enzymes that hydrolyse starch and non-starch polysaccharide in breadmaking, *Z Lebensm Unters Forsch A*, 205: 209-214 pp.
- Michelin, M., Mota, A.M.O., Polizeli, M.L.T.M., Silva, D.P., Vicente, A.A. and Teixeira, J.A., 2013, Influence of volumetric oxygen transfer coefficient (kLa) on xylanases batch production by *Aspergillus niger* van Tieghem in stirred tank and internal-loop airlift bioreactors, *Biochemical Engineering Journal*, 80:19-26 pp.
- Mitchell, D.A., Krieger, N., Stuart, D.M. and Pandey, A., 2000, New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors, *Process Biochemistry*, 35:1211–1225 pp.
- Mitchell, D.A., Krieger, N. and Berovic, M. (eds), 2006, Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation, Springer, 447p.
- Modi, H.A., Acharya, P.B., Chabhadiya, S.B., Shah, A.J. and Acharya, D.K., 2011, Process optimization for xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation, *Int. J. Biotech Biosci*, 1(4):423-430 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Motta, F.L., Andrade, C.C.P. and Santana, M.H.A., 2013, A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications, *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, ch10
- Nair, S.G., Sindhu, R. and Shashidhar, S., 2008, Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions, *African Journal of Microbiology Research*, 2:82-86 pp.
- Nampoothiri, K.M., Baiju, T.V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G. and Pandey, A., 2004, Process Optimization for Antifungal Chitinase Production by *Trichoderma harzianum*, *Process Biochemistry*, 39:1583-1590pp.
- Neidleman, S.L., 1984, Applications of biocatalysis to biotechnology, *Biotechnol Gen Eng Rev.*, 1:1–38 pp.
- Nevalainen, K.M.H., Teo, V.S.J. and Bergquist, P.L., 2005, Heterologous protein expression in filamentous fungi, *Trends in Biotechnology*, 23(9):468-474 pp.
- Nigam, P.S., 2013, Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications, *Biomolecules*, 3:597-611 pp.
- Okafor, U.A., Okochi, V.I., Onyegeme-okereanta, B.M. and Nwodo-Chinedu, S., 2007, Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro – wastes, *African Journal of Biotechnology*, 6(14):1710-1714 pp.
- Olempska-Beer, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D. and DiNovi, M.J., 2006, Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45:144–158 pp.
- Paes, G., Berrin, J.G. and Beaugrand, J., 2012, GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications, *Biotechnology Advances*, 30:564–592 pp.
- Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J. and Christakopoulos, P., 2003, Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation, *Industrial Crops and Products*, 18:37-45 pp.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A. and Nigam, P., 2001, Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, 221p.
- Pandey, A. (eds), Soccol, C.R. (eds) and Larroche, C. (eds), 2008, Current Developments in Solid State Fermentation, Springer Asiatech Publishers Inc., New Delhi, 521p.
- Pariza, M.W. and Johnson, E.A., 2001, Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 33:173–186 pp.
- Park, Y.S., Kang, S.W. Lee, J.S., Hong, S.I. and Kim, S.W., 2002, Xylanase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* mutant using statistical experimental designs, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58:761-766 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pastor, F.I.J., Gallardo, O., Sanz-Aparicio, J. and Diaz., P., 2007, Xylanases: molecular properties and applications, *Industrial Enzymes*, ch5:65–82.
- Perez-Rodriguez, N., Oliveira, F., Perez-Bibbins, Belo, I., Torrado Agraar, A. and Dominguez, J.M., 2014, Optimization of xylanase production by filamentous fungi in solid-state fermentation and scale-up to horizontal tube bioreactor, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 173:803–825 pp.
- Petzold-Welcke, K., Schwikal, K., Daus, S. and Heinze, T., 2014, Xylan derivatives and their application potential – Mini-review of own results, *Carbohydrate Polymers*, 100:80-88 pp.
- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M. and Kapadnis, B., 2013, Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource, *BioMed Research International*, 8p.
- 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, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67:577–591 pp.
- Ravindran, R. and Jaiswal, A.K., 2016, Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: a review, *Bioengineering*, 3(30):1-22 pp.
- Renge, V.C., Khedkar, S.V. and Nandurkar, N.R., 2012, Enzyme synthesis by fermentation method: a review, *Sci. Revs. Chem. Commun.*, 2(4):585-590 pp.
- Romanowska, I., Polak, J. and Bielecki, S., 2006, Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT-90 xylanase for bakery, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69:665–671 pp.
- 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*, 51:467–476 pp.
- Salihu, A., Bala, S.M. and Olagunju, A., 2015, A statistical design approach for xylanase production by *Aspergillus niger* using soybean hulls: optimization and determining the synergistic effects of medium components on the enzyme production, *Jordan Journal of Biological Sciences*, 8(4):319-323 pp.
- Sargın, S., 2003, Katı kültür fermantasyonu ile ksilanaz enzim üretiminin optimum koşullarının belirlenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 120s.
- Seyis, I. and Aksöz, N., 2005, Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55(2):115-119 pp.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. and Mehta, P.K., 2016, Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, *Biotech.*, 6:174 pp

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shah, A.R. and Madamwar, D., 2005, Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21:233–243 pp.
- Sharma, P., Sood, C., Singh, G. and Capalash, N., 2015, An eco-friendly process for biobleaching of eucalyptus kraft pulp with xylanase producing *Bacillus halodurans*, *Journal of Cleaner Production*, 87:966-970 pp.
- Soliman, H.M., Sherief, A.A. and El-Tanash, A.B., 2012, Production of xylanase by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* using some agriculture residues, *International Journal of Agricultural Research*, 7(1): 46-57 pp.
- Subramaniyan, S., Prema, P. and Ramakrishna, S.V., 1997, Isolation and screening for alkaline thermostable xylanases, *J. Basic Microbiol.*, 37(6):431-437 pp.
- Subramaniyan, S. and Prema, P., 2000, Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms, *FEMS Microbiology Letters*, 183:1-7 pp.
- Subramaniyan, S. and Prema, P., 2002, Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application, *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1):33–64 pp.
- Subramaniyan, S. and Vimala, R., 2012, Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study, *I.J.S.N.*, 3(3):480-486 pp.
- Sunna, A. and Antranikian, G., 1997, Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria, *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(1):39-67 pp.
- Stalin, T., Priya, B.S. and Selvam, K., 2012, Ecofriendly application of cellulase and xylanase producing marine *Streptomyces clavuligerus* as enhancer in biogas production from waste, *African Journal of Environmental Science and Technology*, 6(6):258-262 pp.
- Taibi, Z., Saoudi, B., Boudelaa, M., Trigui, H., Belghith, H., Gargouri, A. and Ladjama, A., 2012, Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. strain cpt20 isolated from poultry compost, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 166:663–679 pp.
- Tallapragada, P. and Venkatesh, K., 2011, Isolation, identification and optimization of xylanase enzyme produced by *Aspergillus niger* under submerged fermentation, *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 1(4):137-147pp.
- Twomey, L.N., Pluske, J.R., Rowe, J.B., Choct, M., Brown, W., Mcconnell, M.F. and Pethick, D.W., 2003, The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility, *Animal Feed Science and Technology*, 108:71–82 pp.
- Venkatesh, K. and Tallapragada, P., 2009, Optimization of growth conditions for xylanase production by *aspergillus niger* in solid state fermentation, *Polish Journal of Microbiology*, 58(2):125-130 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Verma, D. and Satyanarayana, T., 2012, Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases, *Bioresource Technology*, 117:360–367 pp.
- Vimalashanmugam, K. and Viruthagiri, T., 2014, Optimization of operating parameters and kinetics of xylanase enzyme production under ssf by *Aspergillus niger* using response surface methodology, *International Journal of ChemTech Research*, 6(7):3558-3572 pp.
- Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A. and Parkash, J., 2017, Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review, 7:11 pp.
- Wang, S., Yen, Y., Shih, I., Chang, A.C., Chang, W., Wu, W. and Chai, Y., 2003, Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151, *Enzyme and Microbial Technology*, 33:917–925 pp.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N., 1988, Multiplicity of 3-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications, *Microbiological Reviews*, 52(3):305-317 pp.
- Wu, Y.B. and Ravindran, V., 2004, Influence of whole wheat inclusion and xylanase supplementation on the performance, digestive tract measurements and carcass characteristics of broiler chickens, *Animal Feed Science and Technology*, 116:129–139 pp.
- Qinnghe, C., Xiaoyu, Y., Cheng, J. and Qiugang, M., 2004, The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Process Biochemistry*, 39:1561–1566 pp.
- Qiu, Z., Shi, P., Luo, H., Bai, Y., Yuan, T., Yang, P., Liu, S. and Yao, B., 2010, A xylanase with broad pH and temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM 41476, and its potential application in brewing industry, *Enzyme and Microbial Technology*, 46:506–512 pp.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs (UNDESA), http://www.un.org/waterforlifedecade/food_security.shtml (Erişim tarihi: 8 Aralık 2017).
- T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü, BÜGEM Faaliyetleri, <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BUGEM.pdf> (Erişim tarihi: 11 Aralık 2017).

ÖZGEÇMİŞ

Gizem Ezgi TEKKOL 1991 yılında Diyarbakır' da doğmuştur. Orta öğrenimini Ziya Gökalp Lisesi' nde tamamlamıştır. Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü' nden 2015 yılında mezun olmuştur.

