

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DERİN KÜLTÜRDE UNLU MAMULLER
SEKTÖRÜNE YÖNELİK KSİLANAZ ENZİMİ
ÜRETİMİ**

Dilek ŞAHİNBAŞ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sayıt SARGIN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 26.01.2018

Bornova-İZMİR

2017

Dilek ŞAHİNBAŞ tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Derin Kültürde Unlu Mamuller Sektörüne Yönelik Ksilanaz Enzimi Üretimi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 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 ÖZGEN



Üye

:Yrd.Doç. Seval DAĞBAĞLI



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

26 / 01 / 2018

İmzası



Adı-Soyadı

Dilek SAHINBAS



ÖZET

DERİN KÜLTÜRDE UNLU MAMULLER SEKTÖRÜNE YÖNELİK
KSİLANAZ ENZİMİ ÜRETİMİ

ŞAHİNBAŞ, Dilek

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sayıt SARGIN

Aralık 2017, 73 sayfa

Bu tezde derin kültür fermantasyonu ile unlu mamuller sektörüne yönelik ksilanaz enzimi üretimi için optimum üretim ortamı ve koşulları belirlenmiştir. *Aspergillus niger* fungusu ile yapılan üretimlerde, tarımsal atıklar (buğday kepeği, malt çimi, mısır koçanı, pirinç kepeği, talaş, yulaf kepeği) substrat olarak kullanılmıştır. Seçilen karbon ve azot kaynaklarının üretim ortamındaki konsantrasyonları belirlenmiştir. Maksimum aktivite (76,16 U/ml), %5 malt çimi (ağırlık/hacim) konsantrasyonunda elde edilmiştir. İki litre karıştırmalı tank biyoreaktörde yapılan üretimlerde ise inokulasyon oranı, havalandırma hızı, karıştırma hızı, çözünmüş oksijen parametreleri belirlenmiş ve maksimum spesifik aktivite (164.70 U/mg) %30 çözünmüş oksijen, 0,5-1 vvm havalandırma hızında, 96 saat inkübasyonda elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: ksilanaz, malt çimi, derin kültür fermantasyonu, *Aspergillus niger*



ABSTRACT

PRODUCTION OF XYLANASE ENZYME BY SUBMERGED FERMENTATION FOR BAKING INDUSTRY

ŞAHİNBAŞ, Dilek

MSc in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sayit SARGIN

December 2017, 73 pages

In this thesis, optimum production media and conditions for the production of xylanase in submerged culture fermentation has been determined. Different agricultural wastes (wheat bran, malt sprouts, corn cobs, rice straw, sawdust, oat bran) was used as substrate for production from *Aspergillus niger*. Concentration of carbon and nitrogen sources was determined. Maximum activity (766,16 U/ml) was obtained at 5% (w/v) malt sprout concentration. Inoculation size, aeration and stirred rate and dissolved oxygen parameters were optimized in 2 liters stirred tank bioreactor and maximum specific activity (164,70 U/mg) was measured at 30% dissolved oxygen, 0,5-1 vvm aeration rate and 96 hours of incubation period.

Key words : xylanase, malt sprout, submerged culture fermentation, *Aspergillus niger*



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince değerli fikir ve yol göstericiliğiyle her türlü destek ve katkıları için danışman hocam Doç.Dr. Sayıt SARGIN'a, çalışmanın yürütülmesinde ve yönlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr Gaye ÖNGEN ve Dr.Şevket KARAÇANCI'ya, uygulamadaki yardımlarından ve manevi desteğinden dolayı Özge AKYÜZ, Dr. Emek ASLAN, Dr. Işık ÇOBAN, Yrd. Doç.Dr. İsmail Hakkı AKGÜN'e, ekipman desteği için Doç.Dr. Suphi Ş. ÖNCEL'e teşekkür etmeyi borç bilirim. Lisans ve yüksek lisans tez dönemlerim boyunca birlikte yürüttüğümüz çalışmalarda, desteğini ve yardımını hiç esirgemeyen ve her zaman yanımda olan çok değerli arkadaşım Biyomühendis Gizem Ezgi TEKKOL'a, manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan tüm arkadaşlarıma ve başta, hayatım boyunca sağladıkları destekle başarılarımın sebebi aileme, sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde destek sağlayan 115O052 nolu proje kapsamında TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

x



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XX
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Ksilan.....	3
2.2. Ksilanazlar.....	5
2.2.1. Ksilanolitik enzimler.....	5
2.2.2 Ksilanaz sınıflandırılması.....	6
2.2.3. Ksilanaz kaynakları.....	9
2.2.4 Kullanım alanları.....	12
2.2.5 Ticari ksilanazlar.....	16
2.2.6 Ksilanaz inhibitörleri.....	18
2.3 Ksilanaz Üretim Parametreleri.....	19
3. MATERYAL VE METOD.....	24
3.1 Materyal.....	24
3.1.1. Mikroorganizma.....	24
3.1.2. Substratlar.....	24
3.1.3. Kullanılan kimyasallar ve çözeltiler.....	24
3.1.4 Kullanılan cihazlar.....	26
3.2 Metod.....	27
3.2.1 Erlenmayerlerde üretim.....	27
3.2.2 Biyoreaktörlerde üretim.....	30
3.2.3 Üretim sonrası işlemler.....	31
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	35

4.1 Karbon Kaynağı Seçimi	35
4.2 Azot Kaynağı Seçimi	36
4.3 İki farklı Karbon ve İki Farklı Azot Kaynağının Yüzde Oranlarının Belirlenmesi	38
4.4 Karbon ve Azot Kaynaklarının Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	42
4.5 Malt Çiminin Karbon Kaynağı Olarak Denenmesi ve Azot Kaynağı Konsantrasyonunun Belirlenmesi	47
4.6 Biyoreaktörde Üretim	52
4.6.1 İnokulasyon oranı optimizasyonu	52
4.6.2 Çözünmüş oksijen oranı optimizasyonu	55
5.ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	65
EKLER.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Arobinoksilanın yapısı.....	4
2.2 Farklı enzimlerin ksilan zincirinde etki ettiği bölgeler	5
3.1 Ksiloz kalibrasyon eğrisi	33
3.2 Protein kalibrasyon eğrisi	34
4.1 Ksilanaz enzimi üretiminde azot ve karbon kaynağı yüzdesel oranlarının etkileşimleri	40
4.2 Karbon kaynakları yüzdesel oranlarının üretime etkilerinin ortalamaları	41
4.3 Ksilanaz enzimi üretiminde hata dağılım grafiği	44
4.4 Karbon ve azot kaynağı konsantrasyonlarının birbiri ile etkileşimleri ..	45
4.5 Çalkalamalı kültürde karbon kaynakları yüzdesel oranlarının etkilerinin ortalamaları	45
4.6 Üretim ortamında %3 (a) ve %5 (b) karbon kaynağı konsantrasyonları seçildiğinde farklı azot kaynağı konsantrasyonlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi	46
4.7 MÇ ve DAHF konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi	49
4.8 MÇ ve DAHF konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi	50
4.9 %5 ağırlık/hacim MÇ kullanılan ortamlarda DAHF konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi.....	51
4.10 %2.5 (hacim/hacim) inokülasyon oranında yapılan üretimin aktivite ve protein değerleri	53

4.11	%5 (hacim/hacim) inokülasyon oranında yapılan üretimin aktivite ve protein değerleri	53
4.12	%10 (hacim/hacim) inokülasyon oranında yapılan üretimin aktivite ve protein değerleri	53
4.13	Yüzde 10 Ç.O ile yapılan üretimin karıştırma ve havalandırma hızı değerleri	55
4.14	Yüzde 10 Ç.O ile yapılan üretimin aktivite ve protein değerleri.....	56
4.15	Yüzde 30 Ç.O ile yapılan üretimin karıştırma ve havalandırma hızı değerleri	57
4.16	Yüzde 30 Ç.O ile yapılan üretimin aktivite ve protein değerleri.....	57
4.17	Yüzde 50 Ç.O ile yapılan üretimin karıştırma ve havalandırma hızı değerleri	58
4.18	Yüzde 50 Ç.O ile yapılan üretimin aktivite ve protein değerleri.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Farklı mikroorganizmalardan elde edilen ksilanaz enzimleri ve özellikleri...8	
2.2 <i>Aspergillus niger</i> endoksilanazları ve β -ksilosidaz fiziksel özellikleri 11	
2.3 Farklı mikroorganizmalardan elde edilen ksilanaz enziminin ekmek hacmi üzerindeki etkileri 16	
2.4 Ticari ksilanazların üretici firmaları ve kullanım alanları 16	
2.5 Derin kültür fermantasyonunda fungal türlerin laboratuvar ve pilot ölçekte ksilanaz üretimleri karşılaştırması 20	
3.1 Üretim ortamına eklenen vogel tuz çözeltisi içeriği 27	
3.2 Ksiloz kalibrasyon grafiği için çözelti hazırlanması 32	
3.3 Çözeltinin ksiloz konsantrasyonları ve OD520 değerleri 33	
4.1 Kullanılan karbon kaynaklarının 5 ve 12 no'lu suşlar için ksilanaz aktiviteleri ve pH değerleri 35	
4.2 Kullanılan azot kaynaklarının 5 ve 12 no'lu suşlar için ksilanaz aktiviteleri ve pH değerleri 37	
4.3 Varyans analizi(1) 38	
4.4 İki farklı karbon ve iki farklı azot kaynağının yüzde oranlarının ksilanaz aktivite ve pH değerleri 39	
4.5 Karbon ve azot kaynaklarının farklı konsantrasyonlarının aktivite ve pH değerleri 42	
4.6 Varyans analizi(2) 44	

4.7 Ksilanaz üretiminde MÇ ve DAHF konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi(1)	48
4.8 Ksilanaz üretiminde MÇ ve DAHF konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi	49
4.9 %5 ağırlık/hacim MÇ kullanılan ortamlarda DAHF konsantrasyonlarının aktivite değerleri	51
4.10 Farklı inokulasyon oranlarında spesifik aktivite ve verimlilik değerleri.....	54
4.11 Farklı çözünmüş oksijen denemelerinin spesifik aktivite ve verimlilik değerleri	59

1. GİRİŞ

Toplam biyokütlenin yaklaşık %30-35'ini oluşturan hemiselülozun başlıca bileşeni olan ksilan, endüstride geniş kullanım alanına sahiptir. Bu sebeple ksilanın enzimatik hidrolizi önem kazanmıştır (Sargın, ve Öngen, 2003). Karmaşık kimyasal yapısı nedeniyle ksilanın hidrolizinde farklı spesifiteye ve mekanizmaya sahip çeşitli hidrolitik enzimler görev alır. Ksilanazlar, arabinoksilan zincirlerine rasgele noktalardan etki ederek polimer yapıyı ksilobioz ve ksiloz oligomerlerine ve bunların çeşitli alt birimlerine parçalarlar (Güner ve Dağlıoğlu,2008).

Ksilanazların, hayvan yemi, meyve suyu ve şarap endüstrisi, kağıt endüstrisi, atık arıtımı gibi endüstriler için lignoselülozik materyallerin basit şekerlere dönüşümünü sağladığından biyoteknolojik uygulamalarda kullanımı artmıştır (Bajaj ve Manhas, 2012). Gıda endüstrisinde yaygın olarak ekmekçilik sektöründe hamurunun reolojik özelliklerini iyileştirerek ekmek hacminin artırılması işleminde kullanılmaktadır (Yeğin,2017). Ekmekçilikte kullanılan ksilanazlar suda çözünmeyen arabinoksilanlara etki ederek absorbladıkları suyun serbest hale geçmesine sebep olurlar. Böylece hamurun yumuşaklığı artarak işlenebilirliği artar ve ekmek iç yapısı iyileşerek daha yüksek hacimli ürün elde edilmiş olur (Güner ve Dağlıoğlu,2008). Ülkemizde ekmek üretimi gıda endüstrisinde büyük bir pazarı oluşturmaktadır. Sağlık Bakanlığı 2010 yılı verilerine göre Türkiye’de, kişi başına yıllık ekmek tüketimi 72 kg’dır. Ülkemizde ekmeğin temel gıda maddesi olması sebebiyle ekmekçilik önemli bir sektördür (Boyacıoğlu,2010)

Ksilanazlar, selülaz ve pektinazla birlikte dünya enzim marketinin %20’sini oluştururlar.Katı kültür ve sıvı kültür fermantasyonu ile üretilenler fakat ticari olarak üretilen ksilanazların %90’ı sıvı kültür fermantasyonu ile üretilmektedir. Sıvı kültür fermantasyonunda üretim parametrelerinin kontrolün, ölçek büyütme ve üretim sonrasında saflaştırmanın daha kolaydır (Yeğin ve Büyükkilleci,2015; Polizelli ve vd.,2005)

Ksilanaz enzimi üretiminin verimliliği için, kullanılan substrat önemli bir parametredir ve proses maliyetinin %30-40'ını oluşturur. Bu sebeple ksilan içeriği yüksek lignoselülozik materyallerin substrat olarak kullanımı ekonomik bir proses sağlamaktadır (Yeğın, 2017)

Bu çalışmada, tarımsal atıklar substrat olarak kullanılarak unlu mamuller sektörüne yönelik ksilanaz enziminin sıvı kültür fermantasyonu ile üretimi, optimum üretim ortamı ve proses koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

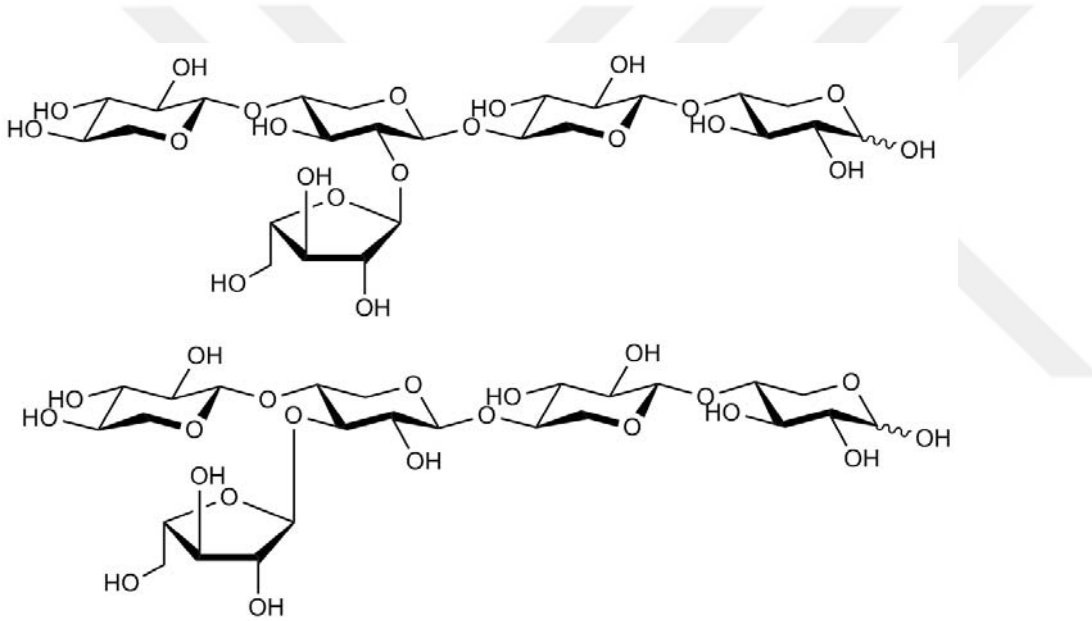
2.1. Ksilan

Kompleks bir karbonhidrat olan hemiselüloz; ksilan, ksiloglukan, glukomannan, galaktoglikomannan ve arobinogalakattan bileşenlerinden oluşur. Ksilan doğada ikinci en yaygın bulunan polisakkarittir. Bitkilerde yaygın olarak bulunan ksilan; lignin ve selülaz ile birlikte kovalent ve non-kovalent bağlanarak bitki hücre duvarını oluşturur Sert odunlu bitkilerde toplam kuru ağırlığın %15-30, yumuşak odunlu bitkilerde %7-12'sini oluşturur (Motta vd., 2013). Sert odunlu bitkilerde bulunan ksilan O-asetil-4-O-metilglukuronoksilandır ve en az 70 β -ksilopiranoz biriminin β -1,4-glukozidik bağlarla bağlanması ile oluşmuştur. Sert odunlu bitkilerdeki ksilan yüksek oranda asetillenmiştir. Asetil grupları ksilanın suda çözünabilirliğinden sorumludur. Yumuşak odunlu bitkilerde yer alan ksilan arabino-4-O-metilglukuronoksilandır, sert odunlu ksilanlara göre daha yüksek oranda 4 -O-metilglukuronik asit içerirler (Beg vd., 2001; Motta vd., 2013).

Ksilanlar yan zincirlerine göre, homoksilanlar, glukuronoksilanlar, arobinoglukuronoksilanlar, arobinoksilanlar ve heteroksilanlar olarak ayrılırlar (Ho, 2014). Birçok ksilan heteropolisakkarittir ve ana zincire bağlı farklı alt gruplar içeren yan zincirlerden oluşur. Ksilan iskeletine bağlı yaygın alt gruplar asetil, arobinozil ve glukoronizildir (Chakdarr vd., 2016; Beg vd., 2001). Arobinoksilanlar; α -L-arobinofuranozil ünitelerinden oluşan yan zincirlere sahiptir. Glukuronoksilanlar; α -D-glukuronik asit ve onun 4-O-metil eter türevlerine sahiptir. Glukorono arobinoksilanlar; hem α -D-glukuronik asit hem ; α -L-arobinofuranozil gruplarına sahiptirler (Burlacu vd., 2016) Bu yan zincirler ksilan molekülünün çözünürlük, üç boyutlu yapı ve reaktivitesini belirler (Motta vd., 2013). Homoksilanlar ksilozil alt ünitelerinden oluşurlar ve doğada yaygın olarak bulunmazlar (Beg vd., 2001). Homoksilanlar genellikle deniz yosunlarında, glukuronoksilanlar sert odunlu bitkilerde, arobinoksilanlar yumuşak odunlu bitkilerde bulunurlar. Arobinoksilanlar, glukuronoarobinosilanlar ve

hetetoksilanlar tahıllarda bulunurlar. Tahıl ksilanları D-glukorunik asit içerir (Ho, 2014) .

Arobinoksilanlar, buğday, çavdar, arpa, yulaf, pirinç, sorgum gibi bitkilerde bulunur. (Harris ve Ramalingam., 2010). Buğday ununda bulunan hemiselüloz %85 oranında arabinoksilan formundadır (Güner ve Dağlıoğlu, 2008) Arobinoksilanlar suda çözünebilen ve çözünemeyen arobinoksilanlar olmak üzere ikiye ayrılır ve hamur reolojisinde ve ekmek kalitesinde önemli rol oynar. Tahıl ksilanları büyük oranda L-arobinoz içerir. Arobinoz ksilan iskeletine α -1,2 yada α -1,3 bağları ile kısa yan zincir ile bağlanır. Arobinoz yan zincirine α -1,2 bağlı ksiloz ve β -1,4 bağlı galaktoz birimleri vardır (Ahmad, 2009; Butt vd., 2008)



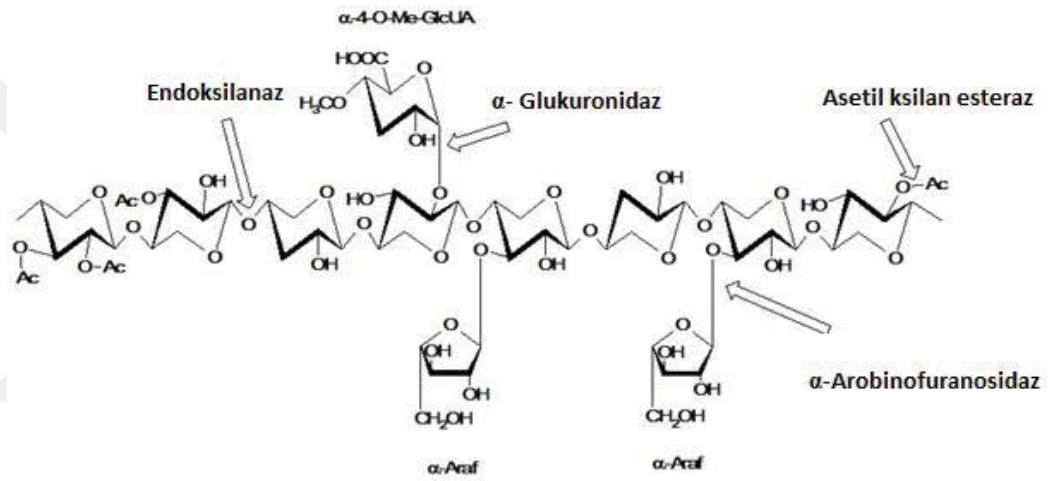
Şekil 2.1 Arobinoksilanın yapısı (<https://www.megazyme.com>)

Ksilanın hidrolizi, ksiloz gibi kıymetli ürünlerin eldesinde önemlidir (Ho,2014).

Kompleks kimyasal yapısı sebebiyle ksilanın hidrolizinde birçok enzim görev alır. Ksilanın hidrolizinde görev alan hidrolitik enzimler; endoksilanaz (endo-1,4- β -ksilanaz, E.C.3.2.1.55), β -ksilosidaz (ksilan-1,4- β -ksilosidaz E.C.3.2.1.37), α -glukuronidaz (E.C.3.2.1.139), α -arobinofranosidaz (α -L-arobinofuranosidaz, E.C.3.2.1.55) ve asetilksilan esteraz (E.C.3.1.1.72) dır. Ksilanın hidrolizinde endoksilanazlar glikozidik bağlara etki ettiği için en önemli

enzimlerdir. Ksilanaz ksilanın rastgele hidroliziyle ksiloolisakkaritler oluşturur. β -ksilosidazlar, ksiloolisakkaritlerin indirgenemeyen uçlarından ksiloz üniteleri açığa çıkarır. Ksilanın hidrolizi asetil esterazların ksilan iskeletine β -1,4 bağlı D-ksilozlardan asetil alt üniteleri ayırması ile tamamlanır (Motta vd., 2013).

Farklı kaynaklardan elde edilen ksilanaz enzimlerinin farklı yapı ve kompozisyona sahip olması sebebiyle ksilanın tam hidrolizi ksilanolitik enzimlerin sinerjistik çalışması ile gerçekleşir (Ahmad,2009; Butt vd., 2008)



Şekil 2.2 Farklı enzimlerin ksilan zincirinde etki ettiği bölgeler (Motta vd.,2013)

2.2. Ksilanazlar

Ksilanazlar, 4.5-6.5 pH aralığında, 40-60°C sıcaklıkta aktif olan 6-80 kDa büyüklüğünde, tek zincirli glikoproteinlerdir (Ahmad, 2009 ve Butt vd., 2008). Ksilanın hidrolizinde görevli bu enzimler genellikle mikroorganizmalar tarafından bitki hücre duvarının yıkımı için üretilirler. Ksilanazlar ayrıca algler, protozoalar, böcekler, kabuklular ve bitki tohumlarında da bulunabilirler (Polizeli vd., 2005; Corral vd., 2006)

2.2.1. Ksilanolitik enzimler

Endo-1,4- β -ksilanazlar (1,4- β -D-ksilan, ksilanohidrolaz, E.C.3.2.1.8), ksilan iskeletinde glikozidik bağları kırar. Ksilan rastgele olarak kırılmaz fakat

hidrolizin olacağı bağın seçimi substrat molekülünün zincir uzunluğu, dallanma derecesi, yan grupların varlığına göre değişir.

β -ksilosidazlar (β -D-ksilosidaz, E.C.3.2.1.37); Molekül ağırlığı 26-360 kDa arasında değişen monomerik, dimerik yada tetramerik yapıda olabilirler. B-ksilosidazlar genellikle ksikanı hidrolize etmezler, en iyi substratları ksilobiozlardır, p-nitrofenil ve o-nitrofenil- β -D-ksilopiranosit gibi yapay subbstratlara etki eder. Termostabilitesi geniş enzimlerdir.

α -Glukuronidaz (E.C.3.2.1.131); Glukuronoksilanda bulunan glukuronik asit ve β -D-ksilopiranozil grupları arasındaki α -1,2 bağlarını hidroliz eder. Substrat spesifitesi mikrobial kaynağa göre değişebilir

α -Arobinofuranosidaz; β -D-ksilopiranozil2in 2 ve 3. Pozisyonundaki L-arobinoz rezidülerini ayırırlar.

Asetilksilan esteraz (E.C.3.1.1.6); Asetile ksilanın 2 ve 3. Pozisyonundaki ksiloz birimlerindeki O-asetil altünitelerini ayırır (Harris vd., 2010; Burlacu vd., 2016).

2.2.2 Ksilanaz sınıflandırılması

Glikozit hidrolaz üyesi olan ksilanazlar; β -1,4 glikozidik bağları hidrolizleyerek hemiasetal şeker oluştururlar. Ksilanazlar; moleküler ağırlık ve izoelektrik noktası, kristal yapı ve kinetik özelliklerine (substrat spesifitesi ve ürün profili) göre sınıflandırılabilirler. Fakat güncellenen enzim karakteristiği ve sınıflandırma bilgilerine göre karbonhidrat-aktif enzim veritabanı (CAZy); enzimleri kompleks karbonhidrat ve glukokonjugatları yıkma ve yapma özelliklerine göre sınıflandırır. CAZy veritabanına göre ksilanazlar (E.C.3.2.1.8) glikozit hidrolaz ailesi 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51, 62 ile ilişkilidir. Bu ailelerden 5, 7, 8, 10, 11 endo-1,4- β -ksilanaz aktivitesi gösteren katalitik domaine sahiptir. GH 10 ailesine ait ksilanazlar düşük molekül ağırlıklı, izoelektrik noktası 8-9.5, GH 11 ksilanzları ise yüksek molekül ağırlığı ve daha düşük izoelektrik noktaya sahip enzimlerdir (Shahi vd., 2016; Motta vd., 2013).

GH 10 ailesi endo-1,4- β -ksilanaz ve endo-1,3- β -ksilanazlardan oluşur. Bu aile üyeleri agrikolik bağlardaki ksilobioz ve ksilotriozların aril β -glikozitlerini hidrolizleme özelliğine sahiptir. Substrat bağlanma bölgelerinin küçüklüğü sebebiyle kısa oligosakkaritlerde yüksek aktiviteye sahiptir. Kristal yapı analizleri ve kinetik analizlere göre GH10 ksilanaz ailesi 4 yada 5 substrat bağlanma bölgesine sahiptir (Motta vd., 2013).

Diğer ksilanazlarla karşılaştırıldığında GH 11 üyeleri; yüksek substrat selektivitesi, yüksek katalitik verim, küçük boyut, optimum pH ve sıcaklık çeşitliliği gibi özelliklere sahip olması sebebiyle çeşitli şartlar ve uygulamalara uygundur. GH 11 ailesi, sadece D-ksiloz içeren substratlarda aktif olduğundan “gerçek ksilanazlar” olarak adlandırılırlar. Aile 10’a benzer olarak aril β -glikozitlerini hidrolizleme özelliğine sahiptir. GH 10 ailesi, GH11 ailesine göre yüksek katalitik çeşitlilik ve düşük substrat spesifitesine sahiptir (Motta vd., 2013; Collins vd., 2005).

GH 10 enzimleri yan zincire yakın ksiloz bağlarını hidrolize eder, GH 11 ailesi ise arobinoksilan iskeletinin değiştirilemez bölgelerini kırar. GH 10 ailesi ksilan iskeletindeki fonksiyonel gruplarca daha az engellenmiş olduğundan yan grupları kırabilirler. Ksilanın yan zincirlerinin farklılığının ksilanazlar tarafından tanınması ksilanın yıkımında substrat spesifitesi açısından önemlidir (Paes vd., 2012).

Ksilanazlar birçok farklı üç boyutlu yapıya sahip olabildiğinden bağlanma bölgelerinin belirlenmesi zordur, sadece iki bağlanma bölgesi iyi karakterize edilebilmiştir. Glikozil hidrolazların aktif bölgeleri genellikle tirozin ve tiptofan gibi aromatik rezidüler içerirler (Törrören ve Rouvinen, 1997).

Ksilanolitik enzimlerin çeşitliliği, birçok mikroorganizmanın farklı enzimler üretmesinden kaynaklanmaktadır. Bu enzimler; fizyokimyasal özelliklerine, yapısına, spesifik aktivitesine ve verimine göre ayrılabilirler (Collins vd., 2005).

Çizelge 2.1 Farklı mikroorganizmalardan elde edilen ksilanaz enzimleri ve özellikleri (Harris ve Ramalingam, 2010)

Mikroorganizma	Moleküler ağırlık (kDa)	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)	pI
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	41	5	65	7.3
<i>Bacillus sp.strain BP-23</i>	43	6.5	55	7.9
<i>Bacillus sp.strain K-1</i>	22-120	6	55	7-9
<i>Bacillus sp. SPS-0</i>	61	6.5	50	4.7
<i>Staphylococcus sp. SG-13</i>	23	9-10	60-75	-
<i>Thermotoga maritime MSB8</i>	14-150	5- 6.5	40-45	4.5- 8.5
<i>Aspergillus niger</i>	13.5-14	5.5	45	9
<i>Aspergillus nidulans</i>	22-34	2- 5.5	50-60	3.5- 6.7
<i>Aspergillus fumigatus</i>	39,23, 26	4.0, 5.0	50,70	-
<i>Penicillium purpurogenum</i>	20.8, 23.5	8	40	-
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	33,23	4	50	3.4
<i>Trichoderma reesei</i>	25.5	7,3.5	60,50	8.6, 5.9
<i>Aureobasidium pullulans Y-2311-1</i>	25	4.4	54	9.4
<i>Cryptococcus albidus</i>	48	5	25	-
<i>Streptomyces T7</i>	23.8-40.5	6-7	55-60	4.8-8.3
<i>Streptomyces thermoviolaceus OPC-520</i>	20	4.5-5.5	60	7.8

2.2.3. Ksilanaz kaynakları

Bakteri ve asidomisetlerden üretilen ksilanazlar geniş pH (5-9) ve sıcaklık aralığında (35-60°C) etkilidirler. Soğuğa dayanıklı, termostabil yada alkalostabil ksilanaz gibi çeşitli ksilanazların üretiminde bakteriyel türler kullanılır. Bu açıdan bakteriyel ksilanazlaar fungal ksilanazlara göre avantajlıdır. Bakteriyel türler arasında *Bacillus sp.* alkali pH ve yüksek sıcaklıkta en yüksek ksilanaz aktivitesini göstermektedir. Bakteriyal ksilanazlar genellikle GH10 ailesine aitken, fungal ksilanazlar GH11 ailesine aittir. Üç boyutlu yapıları ile de bakteriyal ve fungal ksilanazlar farklılık gösterir, bakteriyal ksilanazlar genellikle β -sheet, fungal ksilanazlar α -heliks yapıdadır (Chakdar vd., 2016; Burlacu vd., 2016).

Funguslar; yüksek verimli ekstraselüler ksilanaz enzimi eldesinde önemli üreticilerdir. Bakteri ve mayalarla karşılaştırıldığında daha yüksek enzim aktivitesine sahiplerdir. Fakat fungal kaynaktan elde edilen ksilanazlar, bazı endüstriyel uygulamalar için uygun olmayan karakteristik özelliklere sahiptir. Fungal ksilanazların birçoğu 50°C sıcaklığın altında ve pH 4-6 aralığında etkilidirler. Bu sebeple kağıt endüstrisi gibi yüksek sıcaklık ya da alkali pH gerektiren uygulamalarda kullanılamazlar. Ksilanaz izoenzimleri üreten tipik mikroorganizmalardan biri 15 ekstraselüler ksilanaz üreten *Aspergillus niger*'dir (Collins vd., 2005; Burlacu vd., 2016).

Ksilanın mikroorganizmalar tarafından hidrolizi 19.yüzyılda, ksilanaz enziminin ilk olarak üretimi ve saflaştırılması ise yarım yüzyıl öncesinde *Aspergillus foetidus* ile gerçekleştirilmiştir. Sonrasında yapılan çalışmalarda *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Bacillus sp.*, *Trichoderma sp.* ve *Streptomyces sp.* en çok kullanılanlardır. Endüstriyel boyutta ksilanaz üretimi temel olarak *Aspergillus sp.* ve *Trichoderma sp.* kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Yeğin ve Büyükkilleci, 2015)

Ksilanaz üretiminde funguslar, bakterilerden elde edilen ksilanazlara göre daha yüksek verime sahip olduğu ve ksilanın degradasyonunda yardımcı enzimler de üretebildiği için sıklıkla tercih edilen mikroorganizmalardır (Prabhu vd., 2017)

Mikroorganizmalar ksilanın depolimerizasyonu için birden fazla tip endo- β -1,4-ksilanaz üretirler. Lignoselüozlardaki ksilozik bağların tamamı, ksilanolitik enzimlerce ulaşılabilir değildir. Bazı bağlara ulaşılabilirlik hidroliz süresi boyunca değişebilir. Ksilanın hidrolizinde her enzimin spesifik fonksiyonları vardır (Wong vd.,1988; Biely vd., 1997).

2.2.3.4 *Aspergillus niger*

Aspergillus türleri doğada yaygın bulunan filamentli bir küf türüdür. Bu filamentli fungus organik materyallerin üzerinde sıcaklık, pH ve su aktivitesine bağlı olarak aerobik olarak gelişir. Filamentli funguslar, bakteri ve mayalara göre daha düşük su aktivitesinde gelişebilirler, bu sebeple katı kültür fermantasyonunda sıklıkla kullanılırlar. Termotolerant bir organizma olan *Aspergillus niger*, bir septumla birbirinden ayrılan hif yapıları içeren misellere sahiptir. Konidipor denilen siyah eşeysiz sporlarla çevrili sarı ya da beyaz koloniler üretirler. Raper and Fennel *Aspergillus* türünü konidiosporlarının rengine göre sınıflandırmışlardır. Kahverengi ve siyah sporlara sahip tür *Aspergillus niger* grubu olarak adlandırılmıştır. Fakat bu grubun üyeleri çok fazla çeşitlilik gösterebilir, sadece birkaçı belirgin özellikleri sebebiyle ayrılır (Ramli, 2015; Schuster vd.,2002)

Aspergillus niger 14600 gen içeren bir genoma sahiptir ve bunun 200 geni polisakkarit degradasyonu ile ilgilidir. *A. niger*, biyoteknolojik proseslerde sıklıkla kullanılan GRAS (Generally Regarded As Safe) statüsünde bir mikroorganizmadır. FDA (Food and Drug Administration) , *Aspergillus niger*'den elde edilen sayısız enzimin (α -amilaz, selüloz, amiloglukosidaz, katalaz, glukoz oksidaz, lipaz ve pektinaz, proteaz gibi) gıdalarda kullanımına izin vermiştir (Ramli, 2015; Silva vd., 2011; Soares vd.,2012)

Hidrolitik enzimlerin üretilmesinde sıklıkla kullanılan *A.niger* endüstriyel uygulamalarda bakteri ve mayalardan daha fazla yere sahiptir Elde edilen en yüksek ksilanaz aktivitesi *Aspergillus niger* IME-216den elde edilen genin *Saccharomyces cerevisiae*'de ifade edilerek üretim yapılması ile elde edilmiştir. Transgenik mayanın ksilanaz aktivitesinin 1.5 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Kalim vd.,2015)

Aspergillus niger endüstriyel olarak ilk kez 1919 yılında sitrik asit üretiminde kullanılmıştır. Genellikle içecek endüstrisinde kullanılan sitrik asitin yanından *Aspergillus niger* enzim kaynağı bakımından zengindir. İlk kez pektinaz, proteaz ve amiloglikosdaz enzimleri katı kültür fermantasyonu ile üretilmişlerdir. 1932 yılında *Aspergillus niger* gibi filamaentli fungusların da derin kültürde kültive edilebilmesinin mümkün olduğu görülmüştür. Derin kültürde filamentli fungusun kullanımı ilk kez 1942 yılında *Penicillium chrysogenum*'den penisilin üretimi için kullanılmıştır. 1950'den sonra fungal üretimler katı kültür fermantasyonundan karıştırmalı tank proseslerine geçmişlerdir. *Aspergillus niger* kullanılarak, selülaz ve hemiselülaz gibi enzimler karıştırmalı tanklarda ticari olarak üretilmişlerdir (Schuster vd.,2002).

Aspergillus niger doğada yaygın olarak bulunan patojen olmayan bir mikroorganizmadır. İnsanlar her gün, herhangi bir hastalık geçirmeden *A.niger* sporlarına maruz kalmaktadır. *A.niger*'in insan vücudunda kolonize olması ile ilgili sadece birkaç vaka bulunmaktadır ve bu hastaların tamamı bir hastalık geçmişine sahiptir. *A.niger*'in patojenik potansiyelinin belirlenmesi için yapılan hayvan deneylerinde patojen ve toksik özellik taşımadığı görülmüştür (Sewalt vd., 2016; Schuster vd.,2002)

Endüstriyel olarak önemli birçok enzim *Aspergillus* türlerinden üretilmektedir. Fungal enzim üretiminde model organizma olması sebebiyle bu türün önemi büyüktür (Subramaniyam ve Vimala, 2012). *Aspergillus niger*'den elde edilen ksilanaz ve β -ksilosidaz enzimlerinin özellikleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. *Aspergillus niger* endoksilanazları ve β -ksilosidaz fiziksel özellikleri (Vries ve Visser, 2002)

Enzim	Moleküler Ağırlık (kDa)	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)	pI
Ksilanaz	33	4.0	50	4.2
Ksilanaz I	20.8	5.0	55	6.7
Ksilanaz II	13	6.0	45	8.6
Ksilanaz III	13	5.5	45	9.0
Ksilanaz IV	14	4.9	45	4.5
Ksilanaz V	28	5.0	42	3.65
B-ksilosidaz		5	75	-
B-ksilosidaz	122	3.8- 4.0	70	4.9

2.2.4 Kullanım alanları

2.2.4.1 Bivoyağartma

Ksilanazlar okside edici kimyasalları %20-40 oranında indirgeyebilir. Bu sebeple kağıt endüstrisinde kullanılan dioksin gibi organoklorin kirliliklerin giderimini, ksilanazın kullanım alanlarından biridir. Ksilanaz selüloza zarar vermediğinden kağıdın dayanırlığını (sertliğini) etkilemez. En yaygın kağıt hamuru prosesi Kraft ya da sülfat prosesidir. Bu süreçte odun parçaları (cips, yonga), 170°C'de 2 saat boyunca $\text{Na}_2\text{S}/\text{NaOH}$ solüsyonuna maruz bırakılarak ligninin degradasyonu sağlanır. Ksilanaz hücre duvarına penetrasyona yardımcı olarak odun parçaları içerisindeki ligninin polimerini parçalanmasını sağlar. Bu işlem sonunda kağıt hamuru, lignin degradasyonunun sebep olduğu karakteristik kahverengi rengini alır. Kağıt hamurunun ağartılma işlemi için klor kullanılarak lignin kalıntıları su ya da çözünebilir alkali ürünlere çevrilir. Fakat bu işlem atık su kirliliğine sebep olur. Kağıt hamuru işleminden sonra ksilanın büyük kısmı fibrillerde kalır. Ksilanaz bu fibrillerdeki ksilanı parçalayarak yapının

geçirgenliğini artırır. Geçirgenliğin artması ligninin daha yüksek oranda ağartılmasına yardımcı olur. Ksilanazın ağartma işleminde ilk kullanımı Viikari ve ark. (1986) tarafından klor kullanımı azaltmak amacıyla denenmiştir (Harris ve Ramalingam, 2010; Mandal, 2015; Paes vd., 2012)

2.2.4.2 Hayvan yemi;

Ksilanazın hayvan yemlerine eklenmesi sindirilebilirliği artırarak hayvan sağlığını olumlu yönde etkiler. Tavuk yemleri buğday ve çavdar gibi tamamen sindirilmesi zor tahıllar içerir. Bu tahıllar bağırsaklardaki viskoziteyi artırır. Ksilanaz tahılların kısmi sindirimini sağlayarak viskoziteyi düşürür. Bu daha az yemle daha fazla enerji alımını sağlayarak kilo ve yem verimini artırır. Yemin kısmi parçalanması selülozun ulaşılabilirliğini artırarak yemin besin değerini artırır. Fakat ksilanın tamamen uzaklaştırılması istenilen bir durum değildir, hemiselüloz liflerinin uzaklaştırılması bağırsak hastalıklarını artırabilir (Harris vd., 2010; Mandal, 2015) Kanatlı kümes hayvanları üretiminde ksilanaz-11 kokteylinin yemlere eklenmesiyle beslenme performansı, sindirim, immun parametreler ve bağırsak mikroflarası üzerinde olumlu etkileri vardır.(Paes vd., 2012)

2.2.4.3 Meyve ve sebze suları;

Meyve ve sebze suyu üretimi ekstraksiyon, durultma (clearing) ve stabilizasyon basamakları içerir.1930'larda narenciye suları üretilmeye başlandığında verim düşüktü ve filtrasyon problemleri vardı. Meyve sularının kimyasal içeriği ile ilgili bilgi ve mikrobiyal enzimlerin kullanımı arttıkça problem çözüldü. Şimdilerde ksilanaz, selüloz, amilaz, pektinaz gibi enzimler; meyve ve sebzelerin sıvılaştırılması; meyve posasının stabilizasyonu; aromalar, esansiyel yağlar, vitaminler, mineraller, reklendiricilerin artırılması; viskozitenin azaltılması, substratların hidroliziyle fiziksel ve kimyasal olarak durultulması amacıyla kullanılarak verimi artırır. Tahıl biyoteknolojisinin yanında ksilanaz meyve suyu durultma işlemlerinde de kullanılmaktadır. Çözülemeyen materyalleri %27 oranında azalmasıyla meyve suyu yapımındaki verimi artırmıştır. Ksilanazlar ayrıca bira yapım prosesinde de kullanılır. Sıvının içerdiği viskoz arabioksilan miktarını azaltarak, bira maltının filtrasyon performansını artırır. Ksilanaz inhibitörleri, bira teknolojisinde karışıma buğday ekstraktı eklendiğinde ksilanazın

malt üzerindeki aktivitesinin azalmasıyla keşfedilmiştir. Bugün buğdayın yüksek oranda ksilanaz inhibitörü içerdiği bilinmektedir (Coşkun,2010; Paes vd., 2012).

2.2.4.4 Farmasötik endüstri;

Ksilanazın hidrolitik ürünleri, ksilooligosakkarit olarak bilinir ve bu ürünler farmasötik endüstride kullanılabilirler. Ksilooligosakkaritler, gastrointestinal sistemde hidrolize ya da absorbe olmaz, bu durumda bağırsak bakterilerinin aktivitelerini uyarır ve prebiyotik etki yapar. Bu durumun fizyolojik avantajları; kolesterolü düşürmek, gastrointestinal sistemin sağlığı, kalsiyumun biyolojik aktivitesini geliştirme, yiyeceklerin besinsel değerini artırmadır (Shahi vd., 2016).

2.2.4.5.Biyoyakıt üretiminde;

Lignoselülozik materyalden etanol ve ksilitol gibi biyoyakıtların üretimin ksilanaz kullanılabilir. Etanol üretiminin biyolojik prosesinde lignoselülozun delignifikasyonu işleminde ksilanaz, mannaz, ligninaz, ksilosidaz, glukanaaz, glikosidaz gibi enzimler kullanılır. Karbonhidrat polimerlerinin depolimerizasyonu sonucu açığa çıkan şekerler fermantasyon için kullanılır. İkinci nesil biyoyakıt üretimi kignoselülozik materyalin yıkımı ve fermantasyonu ile etanol üretimi stratejisine temeline dayanmaktadır. Kimyasal proseslere göre daha yüksek dönüşüm verimi sağlayarak fermantasyon için gerekli şekerin konsantrasyonunu artırır. Enzimatik yöntemin kullanılmasının önündeki engel maliyettir (Souza vd., 2011; Mandal, 2015; Paes vd., 2012)

2.2.4.6 Unlu mamuller;

Nişasta türevli ve nişasta türevli olmayan karbonhidratları hidrolize eden enzimler ekmekçilik endüstrisinde iyileştirici olarak kullanılırlar. Ekmek yapımındaki etkinliği sebebiyle ksilanolitik enzimlerin kullanımı son yıllarda giderek artmıştır. Bunların arasında ksilanaz-11 unlu mamuller sektörü için; proses süresini kısalttığı, ayırma ve ürün kalitesini artırdığı için en çok ilgi duyulan enzimlerdendir. Diğer kullanım alanlarında olduğu gibi ksilanazın işlevselliği pH, ısı direnç, substrat spesifitesi ve inhibitör duyarlılığı gibi fizikokkimyasal özelliklerine bağlıdır. Unlu mamuller sektöründe farklı ailelerden ksilanazların olduğu enzim karışımları kombinasyonları kullanılır. Ksilanaz 11'in

raf ömrünü artırdığı, ekmek hacmini %24' e kadar artırdığı kanıtlanmıştır (Ahmad, 2009; Paes vd., 2012).

Makarna prosesinde ksilanaz-10 ve ksilanaz -11'in durum buğdayı irmiğine etki etmesi sebebiyle kullanılmaktadır. Ksilanaz 10 ve 11 nişata ve glutene etki ederek gluten verimini ve birikimini geliştirir (Paes vd., 2012) .

Ksilanaz suda çözünemeyen hemiselülozları suda çözünebilir forma çevirerek gluten ağlarının elastisitesini artırır, ekmek tektürünü iyileştirir ve hacmini artırır, hamurda suyu bağlar, hamurun sertliğini azaltır, daha uniform bir yapı oluşumunu sağlar. Üretim şartlarını iyileştirerek hamurun makinelerce işlenişini iyileştirir. Hamurun hazırlanması aşamasında gluten topaklanmaya sebep olur. Bu fazda ksilanazın eklenmesi gluten yapılarını kırarak reolojik özellikleri ve uzama kabiliyetini (esneklik) iyileştirir (Ahmad, 2009).

Ksilanazın ekmek üzerindeki en önemli etkilerinden biri hamurun yumuşaklığını artırma ve bayatlamayı geciktirerek raf ömrünü artırmasıdır. Ekmek tazeliğinde nemin önemi büyüktür. Ekmeğin ideal nemi %35-40 olmalıdır. Ekmek nemi %30' un altına düştüğünde, ısıtılsa da tekrar tazeliği sağlanamaz. *Thermomyces lanuginosus ksilanazı* ile yapılan bir çalışmada ekmeğin neminin %29.4'dan %34.5'e yükseldiği görülmüştür. Suda çözünebilir arobinoksilana etki eden ksilanazların ekmek kalitesi üzerinde negatif bir etkisi vardır. Yumuşaklık arobinoksilanların parçalanmasının, su salınımını sağlaması sebebiyle, dolaylı bir etkisidir. *Thermotoga maritima*'dan elde edilen ksilanaz B'nin ekmeğin spesifik hacmini artırdığı görülmüştür. 120 ppm ksilanaz B ekmek hacmini %60 oranında artırmıştır. Ekmek denemelerinde ksilanaz, peroksidaz, glikoz oksidaz ve bunların kombinasyonun denenmiş; en iyi hamur özellikleri, ekmek hacmi ve tektürünü ksilanaz ve peroksidaz kombinasyonu sağlamıştır (Butt vd., 2008).

Ksilanazın, geleneksel emülsifierler, katkı maddeleri, oksidantlar yerine kullanımı artmıştır. Hamur özelliklerini iyileştirmenin yanında ekmeğin görünüş özelliklerini de (hacim renk, çıtırılık ve aroma gibi duyuşal özellikleri) de geliştirir (Romanowska vd., 2006). Ksilanaz ekmek yapımında α -amilaz, glikoz oksidaz ve proteazla birlikte kullanılabilir (Harris vd., 2010).

Ksilan endohidrolazları farklı fonksiyonel özelliklere sahiptir. Örneğin; *Bacillus subtilis* (GT 11 ailesi) ve *Aspergillus niger* (GT10) ksilanazı ekmek uygulamalarında farklı davranır. *B.subtilis* ksilanazı arabinoksilan iskeletini yan dallanma yapmayan bölgelerden kırarken; *A.niger* ksilanazı dallanma bölgelerine de etki ederek *B.subtilis* ksilanazından daha küçük üniteler oluşturur. Suda çözünebilir arabinoksilanı deşere edebilen *A.niger* ksilanazı, hamurun viskozitesini azaltarak çözünebilir arabinoksilanın moleküler ağırlığını artırır. Bu durum gluten birikimini artırarak daha büyük gluten agregatları oluşturur. Fakat *B.subtilis* ksilanazı suda çözünmeyen arabinoksilana etki ederek hamurun viskozitesini artırır ve gluten agregat oluşumunu azaltır. Bu ksilanazın çözünmeyen arabinoksilanlarda etkili olması ekmek yapım prosesinde iyi bir performans sağlar (Butt vd., 2008).

Çizelge 2.3 Farklı mikroorganizmalardan elde edilen ksilanaz enziminin ekmek hacmi üzerindeki etkileri (Butt vd.,2008)

Mikroorganizma kaynağı	Hacim artışı (%)	Doz
<i>Aspergillus foetidus</i>	53	12000 U/kg un
<i>Aspergillus niger</i> IBT-90	13	500 U/kg un
<i>Aspergillus sp. FP-470</i>	30	25 ppm
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	41.1	40 ppm
<i>Thermotoga maritima</i>	60.3	120ppm

2.2.5 Ticari ksilanazlar

Ticari ksilanazlar Japonya, Finlandiya, Almanya, İrlanda, Danimarka, Kanada, Amerika’da endüstriyel ölçekte üretilmektedir. Ksilanaz 1980’lerde kullanılmaya başlanmış ve ilk kullanım alanı olarak hayvan yemi, sonrasında gıda, tekstil ve kağıt endüstrilerinde yer bulmuştur. Ksilanaz, selüloz ve pektinazla birlikte dünya enzim marketinin %20’sini oluşturmaktadır (Polizelli vd., 2005). Ticari olarak ksilanaz üreten firmalar Çizelge 2.4 te gösterilmiştir.

Çizelge 2.4 Ticari ksilanazların üretici firmaları ve kullanım alanları (Polizelli vd., 2005; Beg vd., 2001; Walia vd., 2017)

Ürün Adı	Üretici Firma	Uygulama Alanı
Allzym PT	Alltech	Hayvan yemi
Amano 90	Amano Farmasötik	Farmasötik analiz ve Gıda
Bio-Feed Plus	Novo Nordisk	Hayvan yemi
Resinase	A/S	Selüloz ve Kağıt endüstrisi
Bleachzyme	Biocon,Hindistan	Selüloz ve Kağıt endüstrisi
Cartazyme	Clariant, UK	Selüloz ve Kağıt endüstrisi
EcopulpX-200	Primalco	Kağıt hamuru ağartma
Ecosane	Biotec	Hayvan yemi
Ecozyme	Thomas Swan, UK	Selüloz ve Kağıt endüstrisi
Grindazym	Danisco Ingredients	Kuş ve domuz yemi
Irgazyme 40	Nalco-Genencor, Ciba, -Geigy	Kağıt ve yem endüstrisi
Multifect XL	Genencor	Gıda endüstrisi
Pulpzyme	Novozymes, Danimarka	Selüloz ve Kağıt endüstrisi
Solvay pentonase	Solvay Enzymes	Nişasta ve Ekmek endüstrisi
Sternzym HC46	Stern-Enzym	Ekmek endüstrisi
Sumizyme X	Shin Nihon	Hayvan yemi ve ekmekçilik
Xylanase	Seikagaku	Karbonhidrat yapı analizleri
Xylanase	Granotec do Brazil	Gıda endüstrisi
Xylanase GS35	Iogen	Selüloz kağıt hamuru ağartma
Biobrite	Iogen	Selüloz ve kağıt endüstrisi
Ecopulp	Alko Rajamaki, Finlandiya	Kağıt hamuru ağartma
Cartazyme	Sandoz, Charlotte, N.C. and Basle, İsviçre ve İngiltere	Kağıt hamuru ağartma
Irgazyme 40–4X	Genercor, Finlandiya	Kağıt hamuru ağartma
VAI Xylanase	Voest Alpine, Avustralya	Kağıt hamuru ağartma

2.2.6 Ksilanaz inhibitörleri

Bitkiler kompleks polisakkaritleri hidroliz edebilen birçok enzime sahiptir. Bu endojen enzimler, bitki savunmasında görev alan protein inhibitörleri tarafından kontrol edilir. Tahıl tohumlarındaki ksilanaz aktivitesi inhibitörleri ilk kez 1990'ların sonunda yayınlanmıştır. Ksilanaz aktivitesinin buğday unu proteinleri tarafından inhibe edildiğini ve bu inhibisyonun ısıya duyarlı olduğunu açıklamışlardır.

Tahıldan izole edilen, farklı yapı ve özelliğe sahip iki tip inhibitör vardır: ksilanaz inhibitör proteini (XIP-I) ve *Triticum aestivum* ksilanaz inhibitörü (TAXI) (Payan vd., 2003; Juge vd.,2004)

2.2.6.1 XIP-I

XIP proteini glikosile, monomerik, molekül ağırlığı 29kDa, pI 8.8 olan basit bir proteindir. Buğdaydan elde edilen iki ksilanaz inhibe edici protein de aynı spesifik N-terminal aminoasit uca sahiptir. Yapılan kromotografi çalışmaları XIP inhibitörünün en az beş izoformu olduğunu göstermektedir. XIP 'nin üç boyutlu yapı analizi, bu proteinin tipik glikozit hidrolaz ailesine ait olduğunu göstermiştir. XIP-I, fungal ve bakteriyel ksilanaz 10 ve 11 enzimleri üzerinde denemiş ve test edilen tüm fungal ksilanazlarda etkili olduğu görülmüştür (Payan vd., 2003; Juge vd.,2004)

2.2.6.2 TAXI

TAXI tip protein; buğday (*Triticum aestivum*), durum buğdayı (*Triticum durum*), arpa (*Hordeum vulgare*), çavdarda (*Secale cereale*) bulunur. 40kDa molekül ağırlığına sahip heterodimerik bir proteindir. Özellikle GH11 ksilanaz ailesinde etkilidir. Yapılan kristalografi analizleri ile bu spesifikliğin TAXI inhibitöründe bulunan histidinin ksilanaz aktif bölgesinde glutamat rezidüleri ile etkileşime girmesinden olduğu anlaşılmıştır. Son çalışmalar, bu inhibitörlerle yapısal olarak benzerlik göstermeyen, taumatin ailesine ait üçüncü bir tip buğday inhibitörü olduğunu (TLXI) göstermektedir (Fierens vd., 2007).

Tahıl tohumlarının işlenmesinde ksilanaz gibi enzimlerin önemi giderek artmaktadır. Üreticiler, mikroorganizmalardan elde edilen bu enzimlerde yüksek

performans aramaktadır. Buğday unu, ekmekçilikte önemli bir yere sahip ksilanaz enziminin inhibitörlerini içermektedir (Gebrurers vd., 2005).

2.3 Ksilanaz Üretim Parametreleri

Fermantasyon birçok enzimin üretiminde öncelikli olarak kullanılan tekniktir. Sıvı kültür fermantasyonu, genellikle bakteriyel enzimlerin üretimlerinde kullanılır, katı kültür fermantasyonu ise daha düşük su ihtiyacı olan funguslar için daha uygundur. Endüstriyel enzimlerin %75'inden fazlası sıvı kültür fermantasyonu ile üretilmektedir. Bunun ilk sebebi sıvı kültürün modifiye mikroorganizmalar için daha uygun olması ve katı kültürde fermantasyonu için donanım eksikliğidir (Subramaniyam vd., 2012).

Endüstriyel olarak değerli enzimler için en kritik özellik, organizmanın GRAS statüsünde (generally regarded as safe) olmasıdır. GRAS mikroorganizmalar listesinde 50'den az bakteri ve fungus vardır. Bakterilerde *Bacillus* türleri, *Lactobacillus*, *Streptomyces* türleri; mayalarda *Saccharomyces cerevisiae*, filamantli funguslarda *Aspergillus*, *Mucor* ve *Rhizopus* gibi türler.(Hatti-Kaul, 2009)

Ksilanaz üreticisi birçok mikroorganizma olmasına rağmen sadece birkaçı endüstriyel üretim için kullanılmaktadır. Market talebinin karşılanabilmesi için, ksilanaz üretiminin verimi artırılmalıdır. Bu sebeple maksimum ksilanaz verimini elde etmek için üretim ve saflaştırma parametrelerinin optimize edilmesi gerekmektedir (Gupta, 2016; Satrayana, 2013). Ksilanaz üretimlerinin %80-90'ı, mikrobiyal biyokütle ve substratın homojen şekilde dağılması sebebiyle derin kültürde üretilmektedir (Ho,2014).

Çizelge 2.5 Derin kültür fermantasyonunda fungal türlerin laboratuvar ve pilot ölçekte ksilanaz üretimleri karşılaştırması (Gupta, 2016; Satyanarayana, 2013)

Mikroorganizma	Substrat	Üretim modu	Ksilanaz aktivitesi (U L ⁻¹)	Verimlilik (U L ⁻¹ sa ⁻¹)
<i>Aspergillus niger</i>	Mısır koçanı ksilanı	Kesikli (2L)	290,000	3820
<i>Aspergillus oryzae</i>	Sülfite likörü	Kesikli (15)	199,000	13,100
<i>Thermomyces lanuginosus</i> DSM 1035	Yulaf kepeği hidrolizatı	Kesikli (2L)	210,000	4380
<i>Thermomyces lanuginosus</i> MC 134	Mısır koçanı	Kesikli (5L)	2,010,000	13,950
<i>Trichoderma reesei</i>	Yulaf kepeği hidrolizatı	Yarı – kesikli (5L)	1,350,000	14,060
<i>Melanocarpus albomyces</i>	Çözünebilir buğday kepeği ekstraktı	Kesikli (14L)	550,000	22,000

Derin kültür fermantasyonu, fermantasyon koşullarının kontrolüne imkan verir. Yüksek saflık istenen enzimlerin üretiminde derin kültür fermantasyonu kullanılır çünkü katı kültür fermantasyonunda kompleks ortamların kullanımı, ksilan degrades edici enzimlerin sinerjistik etki göstererek üretilmesini sağlar. Bu sebeple katı kültür fermantasyonu ile üretilen enzimler genellikle hayvan yemi alanında yer bulmaktadır (Motta vd., 2013).

Katı kültür fermantasyonunun sıvı kültüre göre; düşük maliyet, düşük kontaminasyon riski, enzim stabilitesi, fungusların doğal habitatına benzerlik göstermesi, daha yüksek spesifik aktiviteye sahip enzim üretimi, proteince zengin yan ürünlerin oluşması gibi avantajları vardır (Motta vd., 2013).

Sıvı kültürde ısı ve kütle transferi daha verimli ve efektiftir. Derin kültür fermantasyon sistemlerinde performansın artırılması için havalandırma ve oksijen transferini etkileyen parametrelerle ilgili bilginin artırılması ve fermantasyon ekipmanlarının tasarımının geliştirilmesi gerekmektedir (Ho,2014).

Uygun ortam içeriği ksilanaz üretiminde hayati bir rol oynamaktadır. Fermantasyon proseslerinin maliyetinin uygun olması gerekmektedir (Ho,2014). Maksimum ksilanaz üretimini destekleyen uygun ve ekonomik ortam formülasyonu büyük ölçekli üretimlerde gereklidir (Gupta, 2016; Satyanarayana, 2013).

Ortam optimizasyonu büyük ölçekte metabolitlerin üretiminde en kritik parametredir. 1970'lerden önce kullanılan metodlar, pahalı ve zaman kaybına sebep olan yöntemlerdi. Fakat bugünlerde kullanıman matematiksel/istatistiksel teknikler ile yapılan ortam optimizasyonu daha verimli, etkili, ekonomiktir ve daha güvenilir sonuçlar vermektedir (Singh vd., 2017). Fizyolojik besinsel büyüme faktörlerinin optimizasyonu ve istatistiksel yaklaşımı için yanıt yüzey metodolojisi (RSM) sık kullanılan bir uygulamadır. (Gupta, 2016; Satyanarayana, 2013)

Substrat seçimi; fermantasyon prosesinin seçiminde ve ksilanaz üretiminin başarısında önemlidir. Bu sebeple saf ksilan, yüksek verimle ve selektif olarak ksilanaz üretiminde iyi bir substrattır. Fakat büyük ölçekte bu tip substratlar maliyetlidir. Büyük ölçekte buğday kepeği, mısır koçanı, arpa kepeği gibi lignoselülozik substratlar ksilana alternatif olabilmektedir (Motta vd., 2013).

Fungal ksilanaz üreticileri; mısır koçanı, mısır küspesi, buğday kepeği, pirinç kepeği, şeker kamışı küspesi gibi çok çeşitli lignoselülozik substratları kullanabilirler. Katı kültür fermantasyonda bu substratların kullanımı ucuz ve

uygundur, fakat sıvı kültürde; tripton, pepton, maya ekstraktı, soya unu gibi organik nitrojen kaynaklarının üretimi artışı görülmüştür. Temel nutrientler dışında; vitaminler, mineraller ve iz elementler gibi mikronutrientlerin de üretimi artırdığı görülmüştür (Gupta, 2016; Satyanarayana, 2013)

Katı kültür fermantasyonunda, biyokütle ve ksilanaz enzimi üretimi; mikroorganizma, inokülasyon miktarı, sıcaklık, oksijen difüzyonu, inkübasyon süresi, kullanılan substrat ve önışlemi, su aktivitesi, nemi, pH gibi birçok faktöre bağlıdır. Diğer yandan derin kültür fermantasyonunda; sıcaklık, pH, karıştırma hızı, çözünmüş oksijen ksilanaz üretimini etkileyen en kritik parametrelerdir.

Enzim stabilitesi fermantasyon ortamının pH'sı tarafından kontrol edilir. Bu sebeple organizmaya spesifik maksimum büyüme hızını devam ettirmek için pH optimum değerinde olmalıdır. Funguslar yüksek alkalifilik mikroorganizmalardır, geniş pH aralığında (5.0 – 10.0) aktif olabilirler, fakat bakteriyel ksilanazların dar bir pH aralığı vardır (Sambamurthy, 2006; Gupta, 2016; Satyanarayana, 2013)

Her fermantatif proses için mikroorganizma gelişimine ve üretilen ürüne özel bir optimum sıcaklık değeri vardır. Enzim aktivitesi sıcaklıkla doğrudan etkilenmektedir. Bütün fermantasyonlar ısı üretir. Derin kültürde; mikrobiyal aktiviteden kaynaklı $3-15 \text{ kW/m}^3$ ısı açığa çıkar. Bunun yanında mekanik karıştırma 15 kW/m^3 'den fazla ısı üretir. Bu sebeple, reaktörde sıcaklık artışının kültüre zarar vermesini engellemek amacıyla soğutma yapılmalıdır. Isının uzaklaştırılma işlemi özellikle endüstriyel ölçekte çok zordur. Isı uzaklaştırma işleminin başarısı; ısı değiştiricinin yüzey alanına, fermantasyon sıvısı ile soğutma suyu arasındaki sıcaklık farkına, sıvıların cinsine ve türbülantına bağlıdır (Soetaert vd., 2010; Satyanarayana, 2013).

Fermantasyonda oksijen kullanımı; mikroorganizmanın türüne, hücre konsantrasyonuna ve substratın çeşidine göre değişmektedir. Oksijen tedariği; en az oksijen ihtiyacı kadar olmalıdır. Oksijen ihtiyacını karşılamak özellikle viskoz fermantasyon sıvılarında ve yüksek oksijen ihtiyacı olan hücre konsantrasyonunun fazla olduğu durumlarda daha zordur. Genel olarak fermantörde oksijen

ihtiyacının sağlanması havalandırma hızı, karıştırma hızı ve fermantasyon sıvının özelliklerine bağlıdır. Büyük ölçekli fermentörlerde özellikle oksijen ihtiyacı $4-5 \text{ kg m}^{-3} \text{ sa}^{-1}$ 'den fazla ise oksijen transferi zordur. Kritik oksijen seviyesinin altında, oksijen mikrobiyal büyümeyi sınırlar. Kritik çözünmüş oksijen seviyesi; mikroorganizmaya, kültür sıcaklığına ve okside olan substrata bağlıdır (Soetaert vd.,2010).

Çözünmüş oksijen en önemli üç parametre tarafından kontrol edilir; havalandırma hızı, karıştırma hızı ve gaz basıncı. Karıştırma ve havalandırma hızı üretim prosesinde önemli parametrelerdendir. Bakteriyel türler yüksek karıştırma hızları isterken fungal türlerde yüksek hızlı karıştırma misel gelişimini olumsuz yönde etkilemiştir. (Sambamurthy,2006; Gupta, 2016; Satyanarayana, 2013)

Oksijen seviyesi 'kritik oksijen seviyesi'nden düşük olursa mikroorganizma gelişimi olumsuz olarak etkileir. Bu sebeple kültür ortamında 'uygun aerobik şartlar' sağlanmalıdır.

Derin kültürde gerekli oksijen seviyesi iki metodla sağlanır;

- Reaktör üst boşluğu basıncını yükselterek birim zamanda sağlanan oksijeni kütlege artırmak,
- Reaktöre sağlanan hava hızının artırılması.

Ayrıca havayı oksijence zenginleştirmek de oksijen transfer hızını artırmaktadır (Sambamurthy, 2006)

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1. Mikroorganizma

Ksilanaz enzimi üretimi için TÜBİTAK MAM Küf Koleksiyonundan 200804 (5) , 200803 (12), 200806 no'lu *Aspergillus niger* suşları kullanılmıştır. Kültürler Patates Dekstroz Agar (PDA) içeren eğik agarlarda +4 °C'de stok kültür olarak depolanmıştır.

3.1.2. Substratlar

Yapılan üretimlerde karbon ve azot kaynağı denemeleri için buğday kepeği, yulaf kepeği, pirinç kepeği, mısır koçanı, talaş, malt çimi, mısır küspesi ve soya unu kullanılmıştır. Buğday kepeği Söke Un A.Ş.'den, mısır koçanı ÇİMPET Ltd.'den, malt çimi İzmir TUBORG A.Ş.'den, yulaf kepeği ve pirinç kepeği perakende satış noktalarından temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

3.1.3.1 Ksilanaz aktivitesi tayini çözeltileri

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].

- 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, 24 ml çözelti A'ya ilave edilmiştir.
- Çözelti E: Çözelti C analizden hemen önce distile su ile 5 kat seyreltilmiştir. Hazırlanan çözelti 4°C'de saklanmıştır.
- 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 arabinoksilan substrat: 1 g “orta viskoz buğday arabinoksilan” (medium viscosity wheat arabinoxylan) 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.

3.1.3.2 Üretim ortamı için kullanılan Vogel tuz çözeltisi

2.5 g/L Sodyum sitrat tribazik dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$), 5.0 g/L Monopotasyum fosfate (KH_2PO_4), 0.2 g/L Magnezyum sulfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 2.0 g/L Amonyum nitrat (NH_4NO_3) ve 0.1 g/L kalsiyum klorit dihidrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) kullanılmıştır.

3.1.3.3 Protein tayini çözeltileri

Protein miktarının belirlenmesinde Merck Bradford Protein Kiti kullanılmıştır. Katı bovine serum albumin (BSA) derişimi 0.1 mg/ml olacak şekilde ultrasaf su ile çözülmüştür.

3.1.3.4 İnokulasyon çözeltileri

Tween 80 Çözeltilisi (% 0.1 hacim/hacim): 100 ml distile suya 100µl Tween 80 eklenmiş ve inokulasyon için kullanmadan önce 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilizasyonu yapılmıştır.

Malt ekstrakt (%0,2 ağırlık/hacim): Misel aşısı hazırlığı için 250ml’lik erlenlere 1 gr malt ekstrakt tartılarak 50 ml distlie su ile çözülmüştür. 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilizasyon yapılarak kullanılmıştır.

3.1.4 Kullanılan cihazlar

- Laminar kabin (ESCO Class II)
- Çeker ocak
- Otoklav (Hirayama HV-110L)
- Spektrofotometre (Ulrospec 1100 pro)
- Santrifüjler (Hettich)
- Statik inkübatör (Sanyo)
- Çalkalamalı inkübatör (Sartorius, Cetromat)
- Hassas Terazı (Precisa)
- Terazı (Kern)
- Etüv (Memmert)
- Su banyosu (Memmert)
- pH metre (Mettler Toledo)
- Manyetik Isıtıcı ve Karıştırıcılar (Heidolph)
- Vorteks (Scilogex)
- Buzdolabı (Bosch)
- Mikroskop (Olympus CX31)

3.2 Metod

3.2.1 Erlenmayerlerde üretim

3.2.1.1 Üretim ortamı hazırlığı

Erlenmayerlerde yapılan üretimlerde 250 ml erlenmayerlerde 50 ml üretim ortamı ile çalışılmıştır. Substrat, distile su ve Vogel tuzları ile hazırlanan üretim ortamları 121°C, 15 dakika sterilize edilmiş ve sterilizasyon bitiminde oda sıcaklığında soğutularak inokulasyona hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 3.1 Üretim ortamına eklenen vogel tuz çözeltisi içeriği

Besin elementi	Miktarı (g/l)
$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	2,5
KH_2PO_4	5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
NH_4NO_3	2
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1

3.2.1.2 İnokulasyon

Aspergillus niger PDA içeren yatık agarlarda 30°C’de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda yatık agarlara %0,1 (hacim/hacim) steril Tween 80 çözeltisi eklenerek öze yardımıyla sporlar kazanmıştır. Hazırlanan spor solüsyonları thoma lamı kullanılarak sayılmış 10^8 spor/ml spor süspansiyonu elde edilmiştir. Hazırlanan üretim ortamlarına % 2 (hacim/hacim) oranında spor süspansiyonundan aşılama yapıldıktan sonra inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.3 Üretim koşulları ve örnek alma

İnokulasyonu yapılan üretim ortamları 30°C sıcaklıkta, 200 (dev/dak) çalkalama hızında 96 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üretim

ortamı santrifüjlenerek süpernatant ayrılmış ve üretim sonrası analizleri yapılmıştır.

3.2.1.4 Üretim ortamı optimizasyonu

Karbon kaynağı seçimi: Çalkalamalı kültürde ksilanaz enzimi üretiminde kullanılacak karbon kaynağının belirlenmesi için; buğday kepeği (BK), yulaf kepeği (YK), pirinç kepeği (PK), mısır koçanı (MK) ve talaş (T) denenmiştir. Belirlenen kaynaklar Türkiye’de bulunabilirliği ve maliyeti değerlendirilerek seçilmiştir. Vogel tuzları içeren üretim ortamına karbon kaynağı her erlende % 3 (ağırlık/hacim) olacak şekilde ilave edilmiştir. Hazırlanan ortamlara % 2 (hacim/hacim) oranında spor süspansiyonundan aşılama yapıldıktan sonra 30°C sıcaklıkta, 200 (dev/dak) çalkalama hızında 96 saat süre ile inkübe edilmiştir. Herbir ortam 3 paralel çalışılmıştır.

Azot kaynağı seçimi: Çalkalamalı kültürde ksilanaz enzimi üretiminde kullanılacak azot kaynağının seçimi için 4 adet organik kaynak; soya unu, mısır küspesi, malt çimi (MÇ), üre ve 3 adet inorganik kaynak; (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, (NH₄)₂HPO₄ (DAHF) denenmiştir. 250 ml’lik erlenlerde 50 ml ile çalışılmış, karbon kaynağı olarak BK her erlende % 3 (ağırlık/hacim) olacak şekilde kullanılmıştır. Azot kaynakları ortama 2 g/l olacak şekilde eklenmiştir. Azot kaynaklarının etkisini görebilmek amacıyla Vogel tuzları, NH₄NO₃ eklenmeden hazırlanmış, NH₄NO₃ azot kaynağı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca minerallerin ksilanaz üretimine etkisini ortaya koyabilmek amacıyla deiyonize su ve azot kaynağı (NH₄NO₃, 2 g/L) içeren ortam kullanılmıştır. Hazırlanan ortamlar % 2 (hacim/hacim) oranında spor süspansiyonundan aşılama yapıldıktan sonra inkübe edilmiştir. Herbir ortam 3 paralel çalışılmıştır

İki farklı karbon ve iki farklı azot kaynağının yüzde oranlarının belirlenmesi : Üretim için yüksek aktivite gösteren karbon (BK ve MK) ve azot (MÇ ve DAHF) kaynaklarının seçiminden sonra, bu iki karbon ve azot kaynaklarının yüzdesel oranlarının (%) etkisi denenmiştir. Hazırlanan ortamlarda daha önce belirtilen koşullarda üretimler gerçekleştirilmiştir. Herbir ortam 3 paralel çalışılmıştır. Karbon kaynağının 5 farklı yüzdesi ve azot kaynağının 5

farklı yüzdesi ile Design Expert programı “General Factorial Design” tasarımı aşağıda sunulmuştur

Karbon kaynağı olarak seçilen buğday kepeği (BK) ve mısır koçanı (MK);

- %0 BK - %100 MK (3,0 g/100 ml mısır koçanı)
- %25 BK - %75 MK (0,75 g/100 ml buğday kepeği, 2,25 g/100 ml mısır koçanı)
- %50 BK - %50 MK (1,5 g/100 ml buğday kepeği, 1,5 g/100 ml mısır koçanı)
- %75 BK - %25 MK (2,25 g/100 ml buğday kepeği, 0,75 g/100 ml mısır koçanı)
- %100 BK - %0 MK (3,0 g/100 ml buğday kepeği)

Azot kaynağı olarak seçilen malt çimi (MÇ) ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (DAHf);

- %0 DAHF - %100 MÇ (2,0 g/L malt çimi)
- %25 DAHF - %75 MÇ (0,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1,5 g/L malt çimi)
- %50 DAHF - %50 MÇ (1,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1,0 g/L malt çimi)
- %75 DAHF - %25 MÇ (1,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,5 g/L malt çimi)
- %100 DAHF - %0 MÇ (2,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ olarak denenmiştir.

Karbon ve azot kaynaklarının konsantrasyonunun belirlenmesi: Ksilanaz enzimi üretiminde kullanılan karbon kaynağı (BK) ve azot kaynağı (%50 MÇ-%50 DAHF) konsantrasyonlarının optimizasyonunun yapılması için; BK % 1-5 (ağırlık/hacim), azot kaynağı olarak seçilen MÇ ve DAHF % 0.1-0.8 (ağırlık/hacim) konsantrasyon aralığında denenmiştir. Hazırlanan ortamlarda daha önce belirtilen koşullarda üretimler gerçekleştirilmiştir Karbon kaynağının 5 farklı konsantrasyonu ve azot kaynağının 5 farklı konsantrasyonu ile Design Expert programı “General Factorial Design” tasarımı kullanılarak denemeler yapılmıştır.

Malt çiminin karbon kaynağı olarak denenmesi ve azot kaynağı konsantrasyonunun belirlenmesi: Malt çimi (MÇ) ve azot kaynağı olarak

kullanılan diamonyum hidrojen fosfat (DAHf)' ın konsantrasyonlarının belirlenmesi için; MÇ %1-10 (ağırlık/hacim), DAHF %0-2 (ağırlık/hacim) konsantrasyon aralığında denenmiştir. Üretim ortamına eklenen vogel tuzları ile Bölüm 3.2.1.3'te belirtilen koşullarda üretim yapılmıştır. Her bir ortam 3 paralel çalışılmıştır.

3.2.2 Biyoreaktörlerde üretim

3.2.2.1 Üretim ortamının hazırlanması

Biyoreaktörde yapılan üretimler için 2L ve 10L Sartorius Biostat mekanik karıştırılmalı tank reaktörler kullanılmıştır. Üretim için erlenmayer denemelerinden elde edilen, %5 ağırlık/hacim malt çimi ve vogel tuzları ile hazırlanan optimum üretim ortamı kullanılmıştır. Hazırlanan üretim ortamı biyoreaktör içerisine alınmış ve %0.1 hacim/hacim köpük kırıcı eklenmiştir. Bağlantı hortumları ve havalandırma elemanları yerleştirildikten sonra 121C, 30 dakika steril edilmiştir. Steril edilen reaktörün ceketini sirkülatöre bağlanarak soğutma işlemi yapılmıştır. Havalandırma ve prob bağlantıları yapılan reaktörün üretim ortamı sıcaklığı 30°C'ye düştüğünde inokülasyon yapılmıştır.

3.2.2.2 İnokülasyon

Biyoreaktörlerde üretim için *Aspergillus niger* misel formunda inoküle edilmiştir. Bu sebeple 250 ml erlenmayerlerde 50 ml hacimde % 2 ağırlık/ hacim malt ekstrakt, aşısı ortamı olarak hazırlanır. 121°C, 15 dakika sterilizasyonu yapıldıktan sonra Bölüm 3.2.1.2'de belirtildiği gibi hazırlanan *Aspergillus niger* spor aşısından %2 hacim/hacim eklenir. Aşılama yapıldıktan sonra 30°C sıcaklıkta, 200 (dev/dak) çalkalama hızında 30 saat inkübe edilen ortamlar, inkübasyon sonunda steril cam şişede toplanarak reaktöre inokülasyon için hazır duruma getirilmiş ve aseptik koşullar altında, reaktöre misel inokülasyonu yapılmıştır.

3.2.2.3 Üretim koşulları ve örnek alma

Biyoreaktörün havalandırma işlemi için bir regülatörle havalandırma hızının ayarlanabildiği hava hattına bağlanmış ve reaktör içerisine steril filtreden geçirilerek verilmiştir. Üretim boyunca sıcaklık, sirkülatör ile 30°C'de tutulmuş, pH ve çözünmüş oksijen değerleri kaydedilmiştir. Üretimin başladığı ilk 48 saatten

sonraki her gün aseptik koşullar altında alınan örneklerin üretim sonrası analizleri yapılmıştır.

3.2.2.4 Üretim koşulları optimizasyonu

İki litre hacimli biyoreaktörler kullanılarak yapılan üretimlerde inokulasyon oranı, karıştırma ve havalandırma parametrelerine bağlı çözünmüş oksijen oranı optimizasyonları yapılmıştır.

İnokulasyon oranı : Üretimler 2L hacimli Sartorius Biostat A biyoreaktör kullanılarak yapılmıştır. Ksilanaz enzimi üretiminde kullanılacak misel inokulasyonunun belirlenmesi için Vogel tuzları ve %5 ağırlık/hacim malt çimi kullanılarak hazırlanmış ve steril edilmiş üretim ortamına % 2,5; % 5 ve %10 hacim/hacim inokulasyon oranları denenmiştir. Üretimlerin tamamında havalandırma hızı 1 hacim/hacim/dak, karıştırıcı hızı 300 devir/dakika olarak çalıştırılmıştır.

Çözünmüş oksijen konsantrasyonu: Üretimler 2L hacimli Sartorius Biostat B biyoreaktör kullanılarak yapılmıştır. Çözünmüş oksijen konsantrasyonu etkileyen karıştırıcı hızı ve havalandırma hızı parametreleri kaskat sisteme bağlanarak kontrol edilmiştir. Çözünmüş oksijen seviyesi %10, %30 ve %50 oranlarında denenmiştir. Karıştırıcı hızı 300-800 devir/dakika aralığında, havalandırma hızı 0,1- 1 hacim/hacim/dak aralığında çalışılmıştır. Üretim ortamı olarak optimize edilen %5 ağırlık/hacim malt çimi ve vogel tuzları kullanılmıştır. Sterilizasyonu yapılan reaktöre %10 hacim/hacim oranında misel inokulasyonu ile üretim yapılmıştır. Her gün alınan örneklerin üretim sonrası analizleri yapılmış ve inkübasyon süresi belirlenmiştir.

3.2.3 Üretim sonrası işlemler

3.2.3.1 Süpernatant eldesi ve pH ölçümü

Yapılan üretimler sonunda alınan örneklerle pH metre (Mettler Toledo) ile pH ölçümü yapılmış, örnekler 9000 dev/dak, 4°C'de 10 dak santrifüj edilerek süpernatant ayrılmış ve ksilanaz aktivitesi tayini, protein tayini, indirgen şeker ve toplam şeker tayinleri yapılmıştır.

3.2.3.2 Ksilanaz aktivitesi tayini

Standart eğri hazırlanışı: Bölüm 3.1.3.1’de belirtilen yöntemle hazırlanan ksiloz stoğundan Çizelge 3.2’de gösterilen şekilde miktarlar alınarak standart eğri örnekleri hazırlanmıştır.

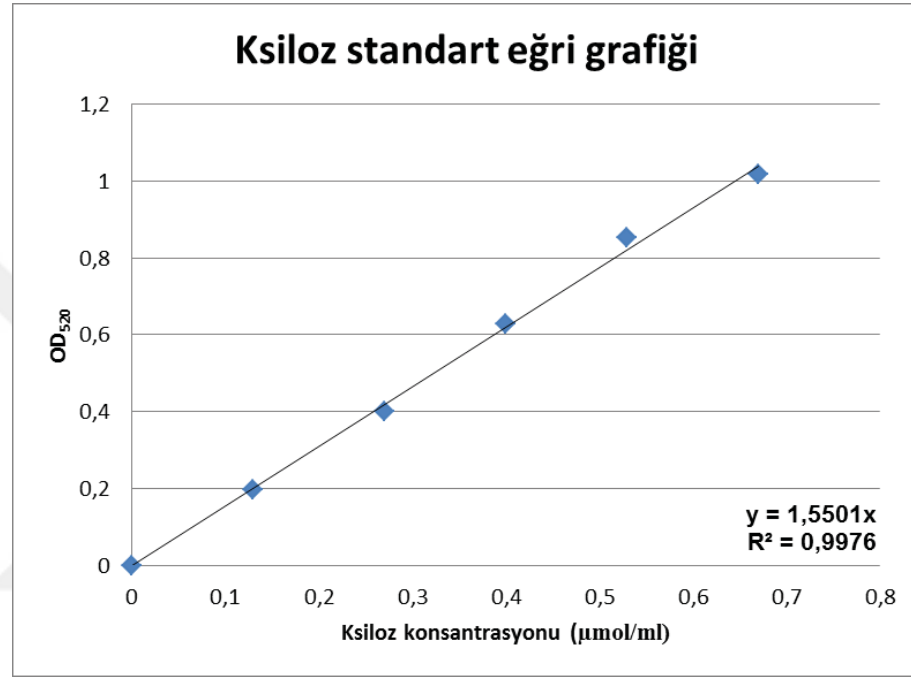
Çizelge 3.2 Ksiloz kalibrasyon grafiği için çözelti hazırlanması

Tüp	Stok ksiloz çözeltisinden alınan miktar (µl)	100 mM, pH 4.7 sodyum asetat tampondan alınan miktar (µl)	Ksiloz konsantrasyonu (µmol/ml)
1	0	1000	0
2	200	800	0,67
3	400	600	1,33
4	600	400	1,99
5	800	200	2,66
6	1000	0	3,33

Yukarıda farklı konsantrasyonlar için hazırlanan herbir tüpe %1’lik orta viskoz buğday arabinoksilan substratından 500 µl eklenmiş ve 40°C’de, 5 dakika ön ısıtmaya bırakılmıştır. Hazırlanan ksiloz çözeltilerinden her bir tüpe 200 µl konularak, su banyosunda 40°C’de, 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 500 µl çözelti D ilave edilmiş ve karıştırılarak kaynar su banyosunda 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler 5 dakika soğumaya bırakılmıştır. Örneklerin üzerine 3 ml çözelti E ilave edilip, tekrar karıştırılmıştır. Tüm örnekler oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek, spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Spektrofotometre körü olarak 1 numaralı tüp kullanılmıştır. Çizelge 3.3’de belirtilen ksiloz konsantrasyonuna karşı okunan absorbans değerleri ile standart eğri çizilmiştir (Şekil 3.1)

Çizelge 3.3 Çözeltilerin ksiloz konsantrasyonları ve OD520 değerleri

Ksiloz konsantrasyonu (μmol/ml)	OD ₅₂₀
0	0
0,13	0,196
0,27	0,4
0,4	0,627
0,53	0,853
0,67	1,018



Şekil 3.1 Ksiloz kalibrasyon eğrisi

Bu grafikteki eğim aşağıdaki formülde belirtilen eğim olarak kullanılmıştır. Aktivite değeri U/ml cinsinden hesaplanmıştır.

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.

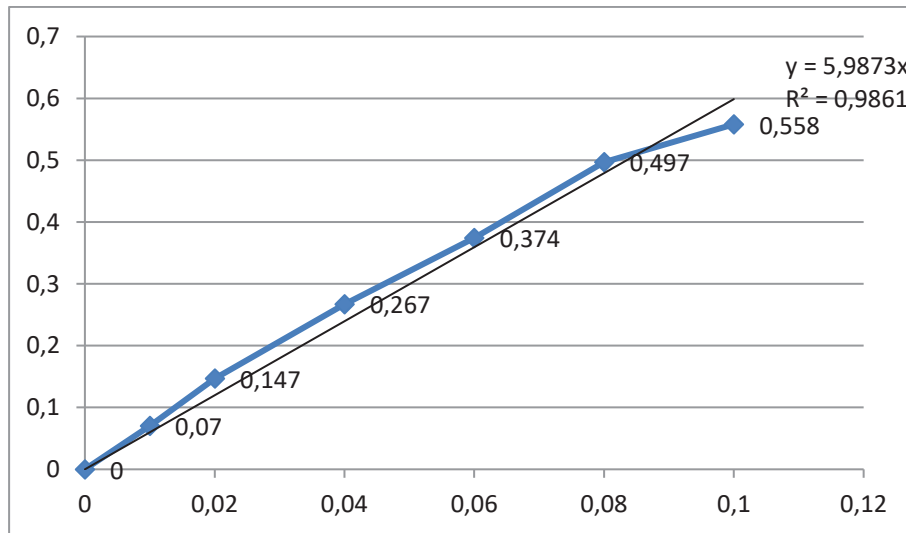
$$\text{Ksilanaz Aktivitesi (Unit/mL)} = \frac{[(\text{OD}_{520}/\text{Eğim}) \times \text{SF}]}{(\text{Enzim hacmi} \times \text{inkübasyon süresi})}$$

Bu formülde;

- OD_{520} = 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)
- SF = Enzimin substrat ile reaksiyona girmeden önceki ön seyreltme anındaki seyreltme faktörü
- Enzim Hacmi = Enzimin substrat ile reaksiyona girmeden önceki hacmi (0.2 ml)'dir.

3.2.3.3 Protein tayini

Standart grafiği hazırlanması: Bölüm 3.1.3.5 'te belirtilfiği gibi hazırlanan BSA stoğundan 0.08, 0.06, 0.04, 0.02 ve 0.01 mg/ml derişimdeki standart eğri çözeltileri ultrasaf su ile hazırlanmıştır. Bu örneklerden alınan 250 µl ile 2500 µl Bradford çözeltisi karıştırılıp iki dakika beklenmiş ve spektrofotometrede 595 nm'deki absorbans değeri ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değeri kulanılarak Şekil 3.2'daki standart grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3.2 Protein kalibrasyon eğrisi

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Karbon Kaynağı Seçimi

Ksilanaz enzimi üretiminde üretim ortamı kompozisyonunun belirlenmesinde karbon kaynağının seçimi için beş farklı tarımsal atık kullanılmıştır. Tarımsal atıkların substrat olarak kullanımının amacı üretim ortamı maliyetinin düşürülerek ekonomik bir üretimin sağlanmasıdır.

Üretim için iki farklı suş *Aspergillus niger* suşu kullanılmış ve üretim sonunda enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Bölüm 3.2.1.4'te belirtildiği şekilde hazırlanan üretim ortamlarından elde edilen enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 4.1'deki gibidir.

Çizelge 4.1 Kullanılan karbon kaynaklarının 5 ve 12 no'lu suşlar için ksilanaz aktiviteleri ve pH değerleri

	KARBON KAYNAĞI	Ksilanaz (U/ml)	pH
5 nolu organizma	BK	10,62	5,87
	YK	10,20	6,01
	PK	4,38	5,68
	MK	8,94	3,18
	T	0,47	4,56
12 nolu organizma	BK	12,30	3,81
	YK	12,57	3,97
	PK	9,33	3,95
	MK	12,62	3,50
	T	1,70	5,52

*Azot kaynağı: 2g/l NH₄NO₃

Yapılan denemeler sonucunda her iki organizma için de buğday kepeği, yulaf kepeği ve mısır koçanı kullanılan üretimlerde ksilanaz aktivitesinin pirinç kepeği ve talaş kullanılan ortama göre yüksek olduğu görülmüştür. Bu kaynakların maliyetleri göz önüne alınarak buğday kepeği ve mısır koçanı üretimde kullanılacak karbon kaynakları olarak seçilmiştir.

Aspergillus niger ile ksilanaz enzimi üretim çalışmalarında tarımsal atıklar sıklıkla kullanılan substratlardır. Buğday kepeği, mısır koçanı, malt çimi, pirinç kepeği, yulaf kepeği ise en sık kullanılan atıklardır. Okafor ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada talaş, şeker kamışı, mısır, buğday kepeği, yulaf kepeği karbon kaynağı olarak kullanılmış ve en yüksek enzim aktivitesi buğday kepeğinde görülmüştür. Diğer ortamlara göre 7 kat fazla (6.47 U/ml) aktivite elde edilmiştir. Benzer bir çalışma yapan Guimaraes ve arkadaşları (2013) karbon kaynağı olarak buğday kepeği, pirinç kepeği, şekerpancarı ve mısır koçanı kullanmış ve en yüksek aktivite buğday kepeğinde (12.36 U/ml) görülmüştür. Farklı oranlarda karıştırılan substratlarda ise en iyi kombinasyonu buğday kepeği ve mısır koçanı karışımının verdiği görülmüştür (20,19 U/ml). Karbon kaynağı seçimi için yapılan çalışmada literatürde yer alan çalışmalara benzer sonuçlar elde edilmiş, en yüksek aktivite buğday kepeği (12,30 U/ml), yulaf kepeği (12,57 U/ml) ve mısır koçanı (12,62 U/ml) kullanılan ortamlarda ölçülmüştür.

4.2 Azot Kaynağı Seçimi

Ksilanaz enzimi üretimi için azot kaynağı seçiminde dört organik, üç inorganik azot kaynağı kullanılmış ve üretim ortamları Bölüm 3.2.1.4'te belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Üretim sonunda enzim aktiviteleri ve pH ölçülmüştür. Sonuçlar Tablo 4.2'deki gibidir.

Çizelge 4.2 Kullanılan azot kaynaklarının 5 ve 12 no'lu suşlar için ksilanaz aktiviteleri ve pH değerleri

	AZOT KAYNAĞI	Ksilanaz (U/ml)	pH
5 nolu kültür	soya unu	19,89	5,39
	(NH ₄) ₂ SO ₄	15,94	5,03
	mısır küspesi	19,08	5,21
	NH ₄ NO ₃	14,30	5,31
	DAHF	21,56	5,34
	MÇ	30,34	4,53
	üre	22,82	4,93
	Distile su	8,20	6,13
12 nolu kültür	soya unu	23,89	4,38
	(NH ₄) ₂ SO ₄	14,79	4,35
	mısır küspesi	18,09	4,04
	NH ₄ NO ₃	14,43	4,82
	DAHF	19,48	4,04
	MÇ	24,78	4,04
	üre	16,26	3,60
	Distile su	8,51	4,02

*Karbon kaynağı: %3(ağırlık/hacim) buğday kepeği

Yapılan denemeler sonunda her iki suş için de en yüksek ksilanaz aktivitesi organik azot kaynağı olarak malt çimi, inorganik azot kaynağı olarak diamonyum hidrojen fosfat kullanılan ortamlarda elde edilmiştir. Ayrıca distile su kullanılan ortamda elde edilen enzim aktivitesi, diğer ortamlarla karşılaştırıldığında Vogel tuzu minerallerinin üretimde aktiviteyi artıran bir etkisi olduğu görülmüş ve bu sebeple üretim ortamlarında kullanılmaya devam edilmiştir.

Karbon kaynağı ve azot kaynağı seçiminde kullanılan 5 ve 12 nolu suşlardan elde edilen enzimlerin, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Hububat İşleme ve Mühendisliği Bilimdalı Laboratuvarı'

nda ekmek üzerindeki etkinlikleri incelenmiş ve 12 nolu suştan elde edilen enzimin tam buğday unu ve buğday unundan yapılan ekmeklerde, farinograf ve hacim özellikleri bakımından daha olumlu etki göstermesi sebebiyle, sonraki çalışmalara bu suşla devam edilmiştir.

4.3 İki farklı Karbon ve İki Farklı Azot Kaynağının Yüzde Oranlarının Belirlenmesi

Karbon kaynağı seçiminde yüksek aktivite gösteren azot kaynaklarının yüzdelерinin belirlenmesi için bölüm 3.2.1.4'te belirtilen desen kullanılmıştır. Üretim sonunda ölçülen aktivite değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Design Expert programı "General Factorial Design" tasarımında Prob>F değeri 0.05'ten küçük olduğundan (0.0001) model anlamlı çıkmıştır.

Tablo 4.3'te gösterilen varyans analizinde (ANOVA) görüldüğü gibi yapılan deneme için, karbon ve azot kaynağının ksilanaz aktivitesi üzerinde etkili faktörlerdir. Fakat F değerlerine bakıldığında azot kaynağının enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin karbon kaynağından fazla olduğu görülmektedir. Modelin R² değeri 0.9257, standart sapması 1.44'tür. R² değeri, bu modelin uygun olduğunu ve varyasyonların %92 sinin model ile açıklanabildiğini göstermektedir.

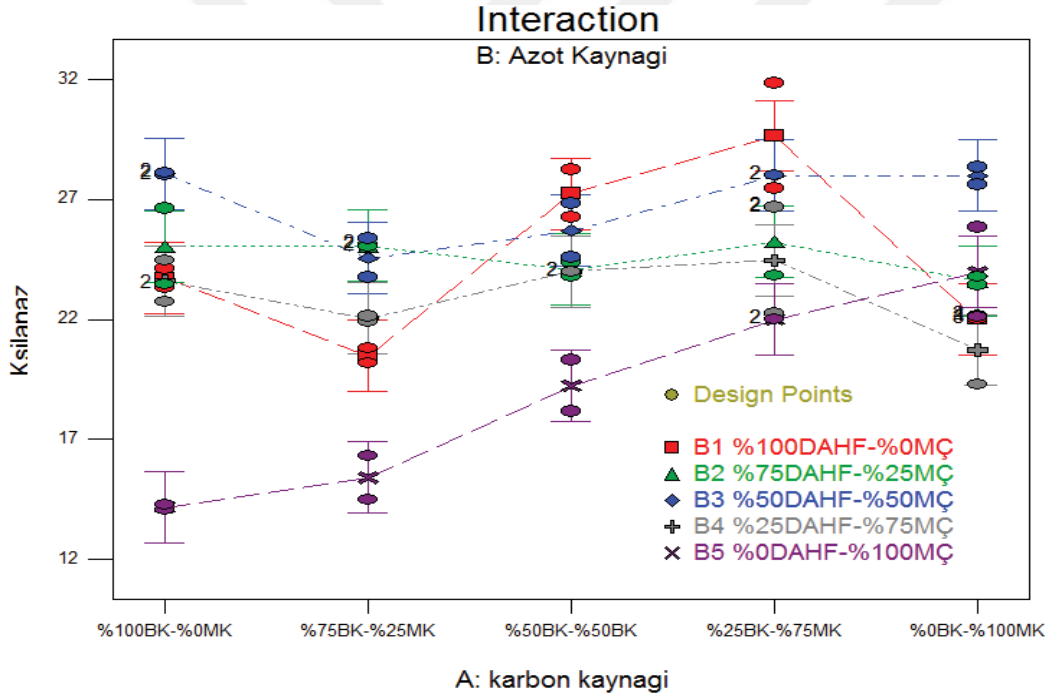
Çizelge 4.3 Varyans analizi(1)

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	645.86	24	26.91	12.98	< 0.0001
A-karbon kayn	102.03	4	25.51	12.30	< 0.0001
B-Azot kaynađ	346.81	4	86.70	41.82	< 0.0001
AB	197.03	16	12.31	5.94	< 0.0001
Pure Error	51.83	25	2.07		
Cor Total	697.69	49			

Çizelge 4.4 İki farklı karbon ve iki farklı azot kaynağının yüzde oranlarının ksilanaz aktivite ve pH değerleri

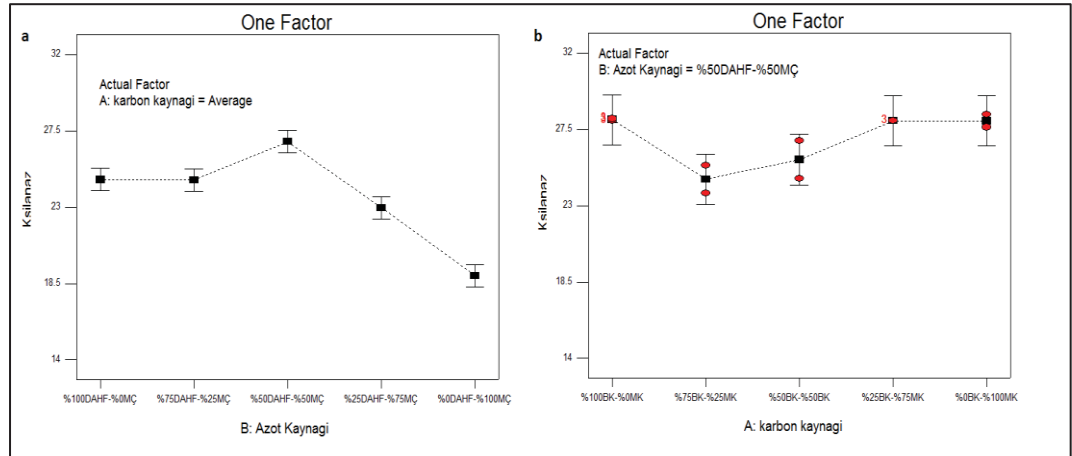
Karbon kaynağı (%3 ağırlık/hacim)		Azot Kaynağı (2g/l)		Ksilanaz (U/ml)	pH
BK (%)	MK (%)	DAHF (%)	MÇ (%)		
100	0	0	100	14.06	3.83
				14.27	3.72
		25	75	22.73	3.85
				24.47	3.68
		50	50	28.02	3.94
				28.12	4.33
		75	25	26.62	4.40
				23.46	4.08
75	25	0	100	23.34	4.00
				24.13	4.00
		25	75	14.49	4.07
				16.32	3.37
		50	50	21.93	3.72
				22.14	3.75
		75	25	23.74	3.56
				25.36	3.81
50	50	0	100	25.11	3.75
				25.02	3.76
		25	75	20.17	3.81
				20.81	3.77
		50	50	18.16	3.16
				20.31	3.33
		75	25	27.11	3.51
				21.72	3.40
25	75	0	100	24.59	3.30
				26.83	3.39
		25	75	23.77	3.46
				24.38	3.38
		50	50	26.25	3.45
				28.24	3.57
		75	25	18.96	2.82
				25.18	2.75
0	100	0	100	22.24	2.94
				26.69	2.97
		25	75	31.38	3.04
				26.23	3.14
		50	50	23.83	3.19
				26.65	3.19
		75	25	27.47	3.06
				31.84	3.02
0	100	0	100	25.85	2.68
				22.11	2.64
		25	75	22.14	3.21
				19.30	3.10
		50	50	28.36	3.25
				27.63	3.10
		75	25	23.43	3.08
				23.77	3.15
0	100	0	100	25.02	3.30
				19.51	3.07

Şekil 4.1 karbon ve azot kaynağı yüzdesel oranlarının birbiri ile etkileşimlerini göstermektedir, x eksenini karbon kaynaklarının yüzdesel oranlarını gösterirken eğrilerde her renk farklı azot kombinasyonunu ifade etmektedir. Herbir azot kombinasyonuna karşılık karbon kombinasyonlarına göre enzim aktiviteleri karşılık enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Buna göre DAHF konsantrasyonunun %0 olduğu durumda enzim aktivitesinin düştüğü, BK'nin farklı konsantrasyonlarının aktivite üzerinde benzer etkiler gösterdiği görülmüştür. Hata barları dikkate alındığında %50DAHF-%50 MÇ konsantrasyonunun diğer azot konsantrasyonlarına göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1 Ksilanaz enzimi üretiminde azot ve karbon kaynağı yüzdesel oranlarının etkileşimleri

Karbon kaynaklarının ksilanaz aktivitesi üzerindeki etkisinin ortalaması alındığında ve faktörler arasındaki etkileşim göz ardı edildiğinde azot kaynağının %50 MÇ-%50 DAHF uygulamasının en yüksek ksilanaz aktivite değerini verdiği (Şekil 4.2(a)) ve buna bağlı olarak incelenen karbon kaynağı konsantrasyonlarından %100BK, %75BK ve %25 BK'nin yakın aktivite değerlerine sahip olduğu (Şekil 4.2(b)) görülmektedir.



Şekil 4.2 Karbon kaynakları yüzdesel oranlarının üretime etkilerinin ortalamaları (a),%50 DAHF-%50 MÇ oranı seçildiğinde karbon kaynağı yüzdesel oranlarının üretime etkisi (b)

Ayrıca TARIST istatistik programı kullanılarak “İki faktörlü Tesadüf Parselleri” modeline göre yapılan varyans analizinde şu sonuçlar elde edilmiştir:

Azot kaynaklarının enzim aktiviteleri üzerine etkisinin ortalaması alındığında elde edilen değerler aşağıda verilmiştir.

- % 0 DAHF-%100 MÇ 18.97 c
- %25 DAHF-%75 MÇ 23.04 b
- %50 DAHF-%50 MÇ 27.03 a
- %75 DAHF-%25 MÇ 24.61 b
- %100 DAHF-%0 MÇ 24.68 b
- $LSD_{0.05}$ 1.97

Azot kaynakları arasında en yüksek grupta 27.03 U/ml ortalama değeri ile %50 DAHF-%50 MÇ azot kaynağı yer almıştır. Bu değerlendirme göz önünde bulundurularak %50 DAHF-%50 MÇ azot kaynağının kullanıldığı karbon kaynakları istatistiksel olarak incelenmiş ve aşağıdaki veriler elde edilmiştir.

- %100 BK-%0 MK 28.07 a
- %75 BK-%25 MK 24.55 a
- %50 BK-%50 MK 25.71 a
- %25 BK-%75 MK 28.81 a
- %0 BK-%100 MK 28.00 a
- $LSD_{0.05}$ 1.97

% 50 DAHF-% 50 MÇ azot kaynağının kullanıldığı BK ve MK'nın karbon kaynağı olduğu ortamlarda, karbon kaynağının farklı yüzdelere kadar ksilanaz enzim aktivitesi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Buna bağlı olarak çalkalamalı kültürde ksilanaz üretiminde maliyet ve bulunabilirlik göz önüne alınarak % 100 BK içeren ortam kullanılmasına karar verilmiştir.

4.4 Karbon ve Azot Kaynaklarının Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Bölüm 3.2.1.4'te belirtildiği gibi hazırlanan ortamlarda üretimler gerçekleştirilmiştir Karbon kaynağının 5 farklı konsantrasyonu ve azot kaynağının 5 farklı konsantrasyonu ile Design Expert programı "General Factorial Design" tasarımı kullanılarak yapılan denemelerin sonuçları (Çizelge 4.5) aşağıdaki gibidir.

Çizelge4.5 Karbon ve azot kaynaklarının farklı konsantrasyonlarının aktivite ve pH değerleri

Karbon kaynağı	Azot Kaynağı	Ksilanaz (U/ml)	pH
BK(%)	% 50 DAHF + % 50 MÇ (%)		
1	0.1	4.98	3.55
		5.81	3.62
	0.2	5.88	4.00
		11.87	3.92
	0.4	8.67	3.69
		9.82	3.55
	0.6	12.06	3.85
		12.97	3.67
	0.8	14.97	3.57
		13.63	3.72
2	0.1	12.97	4.24
		13.76	4.58
	0.2	14.74	4.11
		21.11	4.14
	0.4	13.80	4.04
		13.95	4.26
	0.6	13.29	4.36
		14.17	4.58
	0.8	20.83	4.17
		17.78	4.12
3	0.1	13.51	5.10
		14.25	5.04
	0.2	12.42	5.37
		12.65	5.12
	0.4	20.73	5.00
		21.64	4,73

	0.6	25.41	4.72
		24.47	4.43
	0.8	26.73	4.67
		24.13	4.80
4	0.1	19.44	4.04
		27.55	4.22
	0.2	17.59	4.55
		24.91	4.37
	0.4	16.87	4.50
		23.31	4.33
	0.6	19.35	5.34
		18.31	5.22
	0.8	22.93	4.87
		23.50	4.99
5	0.1	30.20	3.50
		28.37	3.39
	0.2	29.73	3.79
		29.36	3.63
	0.4	26.01	3.91
		22.66	3.90
	0.6	22.96	4.04
		23.65	4.39
	0.8	25.13	4.39
		21.11	4.23

Çizelge 4.6’da gösterilen varyans analizine (ANOVA) bakıldığında yapılan deneme için Prob>F değeri 0.05’ten küçük olduğundan (0.0001) model anlamlı çıkmıştır. Karbon ve azot kaynağının ksilanaz aktivitesi üzerinde etkili faktörler olduğu anlaşılmaktadır. 0,05’ten küçük Prob>F değerleri model terimlerinin anlamlı olduğunu gösterirken, F değerlerine göre karbon kaynağı konsantrasyonunun model üzerinde azot kaynağı konsantrasyonundan daha etkili bir faktör olduğu görülmektedir. Modelin R^2 değeri 0.9316, standart sapması 2.43’tür, bu modelin uygun olduğunu ve varyasyonların %93’ünün model ile açıklanabildiğini göstermektedir.

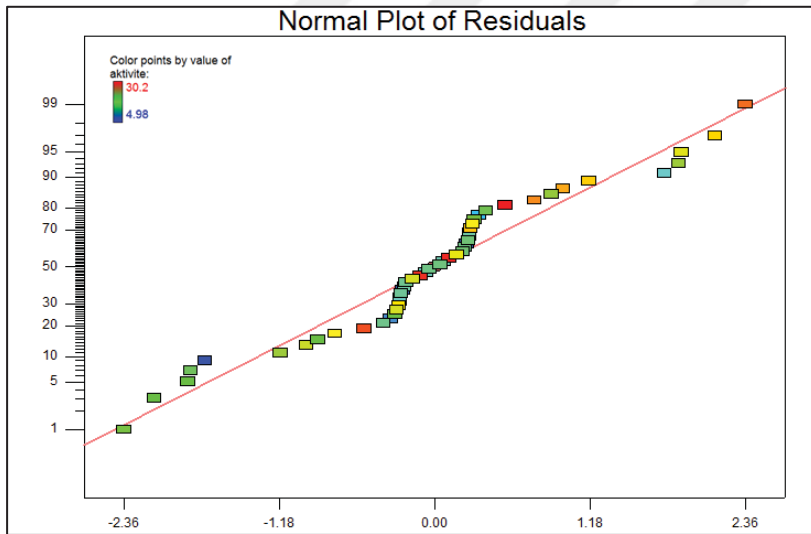
Çizelge 4.6 Varyans analizi(2)
ANOVA for selected factorial model

Analysis of variance table [Classical sum of squares - Type II]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	2005.35	24	83.56	14.19	< 0.0001	significant
A-karbon	1437.90	4	359.48	61.03	< 0.0001	
B-azot	94.52	4	23.63	4.01	0.0120	
AB	472.93	16	29.56	5.02	0.0002	
Pure Error	147.25	25	5.89			
Cor Total	2152.60	49				

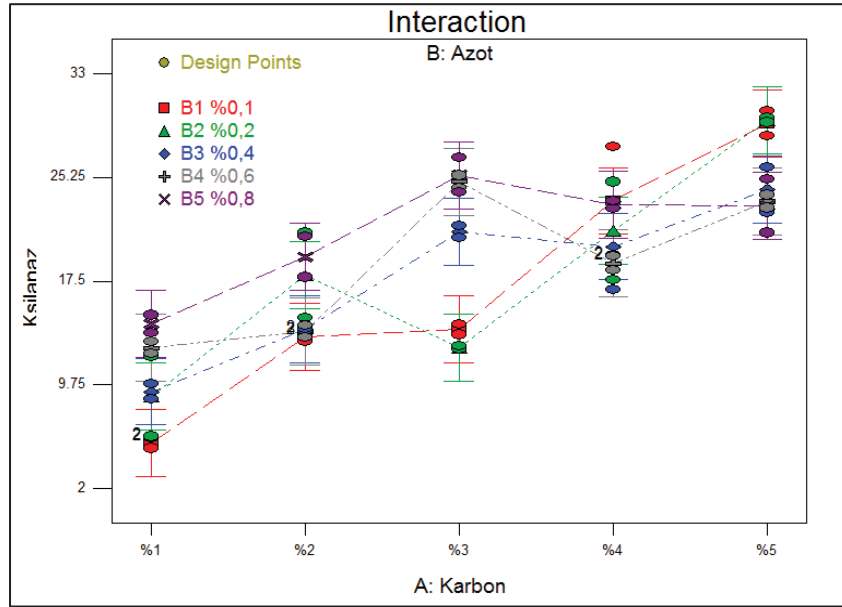
Std. Dev.	2.43	R-Squared	0.9316
Mean	18.52	Adj R-Squared	0.8659
C.V. %	13.11	Pred R-Squared	0.7264
PRESS	589.01	Adeq Precision	14.073

Şekil 4.3 hata dağılımını göstermektedir. Hata dağılımının lineer olması modelin uygunluğunu göstermektedir.



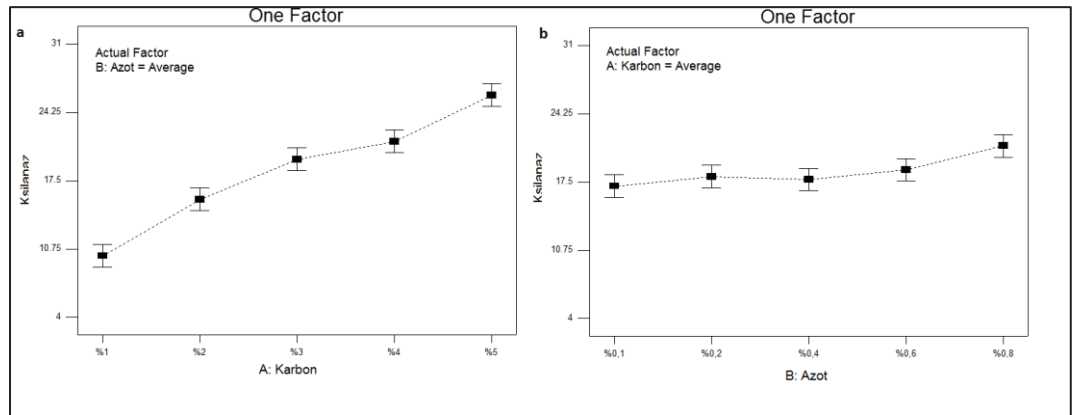
Şekil 4.3. Ksilanaz enzimi üretiminde hata dağılım grafiği

Şekil 4.4 karbon ve azot kaynağı konsantrasyonlarının birbiri ile etkileşimlerini göstermektedir, x eksen karbon kaynaklarının konsantrasyonlarını gösterirken eğrilerde herbir renk farklı azot konsantrasyonunu ifade etmektedir.



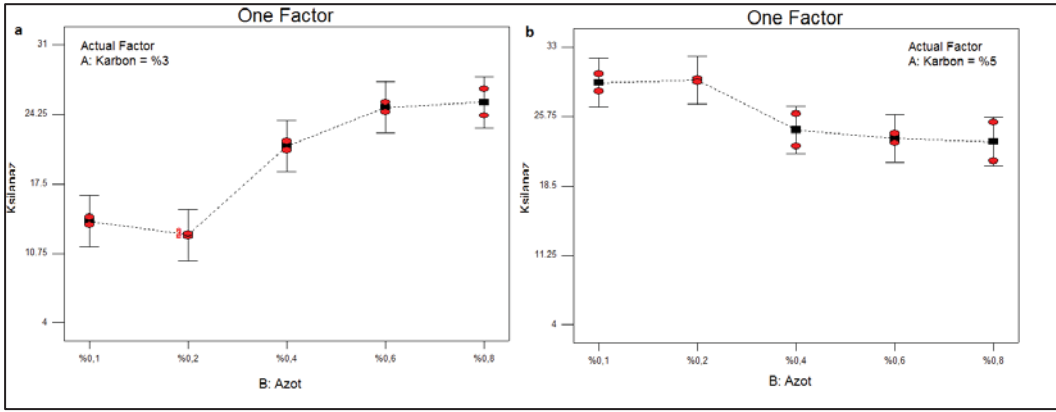
Şekil 4.4. Karbon ve azot kaynağı konsantrasyonlarının birbiri ile etkileşimleri

Azot kaynaklarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisinin ortalaması alındığında karbon kaynağının %5 konsantrasyonunda en yüksek aktivite verdiği (Şekil 4.5 (a)), karbon kaynaklarının aktivite üzerine etkisinin ortalaması alındığında ise azot konsantrasyonlarının aktiviteleri arasında fark olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.5 Çalkalamalı kültürde karbon kaynakları yüzdesel oranlarının etkilerinin ortalamaları (a), %50 DAHF-%50 MÇ oranı seçildiğinde karbon kaynağı yüzdesel oranlarının üretime etkisi (b)

Karbon kaynağının % 3 konsantrasyonu seçilerek azot kaynaklarının konsantrasyonlarının etkisine bakıldığında % 0.6 ile % 0.8'in yüksek aktivite gösterdiği Şekil 4.6 (a)'daki gibi görülmektedir. Karbon kaynağının % 5 konsantrasyonu seçilerek azot kaynaklarının konsantrasyonlarının etkisine bakıldığında % 0.1 ile % 0.2'nin yüksek aktivite gösterdiği şekil 4.6 (b)'deki gibi görülmektedir.



Şekil 4.6. Üretim ortamında %3 (a) ve %5 (b) karbon kaynağı konsantrasyonları seçildiğinde farklı azot kaynağı konsantrasyonlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi

Ayrıca TARIST istatistik programı kullanılarak “İki faktörlü Tesadüf Parselleri” modeline göre yapılan varyans analizinde şu sonuçlar elde edilmiştir:

Karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine etkisinin ortalaması alındığında azot kaynaklarının aktivite üzerine etkisi aşağıda verilmiştir.

- % 0.1 Azot kaynağı 17.08 b
- % 0.2 Azot kaynağı 18.03 b
- % 0.4 Azot kaynağı 17.75 b
- % 0.6 Azot kaynağı 18.66 b
- % 0.8 Azot kaynağı 21.07 a
- $LSD_{0.05}$ 2.24

Azot kaynakları arasında en yüksek grupta 21.07 U/ml ortalama değeri ile % 0.8 azot kaynağı yer almıştır. Bu değerlendirme göz önünde bulundurularak % 0.8 azot kaynağı ile yapılan üretime karbon kaynaklarının etkisi istatistiksel olarak incelenmiş ve aşağıdaki veriler elde edilmiştir.

- % 1 BK 14.30 c
- % 2 BK 19.31 b
- % 3 BK 25.43 a
- % 4 BK 23.22 ab
- % 5 BK 23.12 ab
- $LSD_{0.05}$ 5.02

Azot kaynağı oranı olarak % 0.8 (ağırlık/hacim) kullanılan üretimlerde enzim aktivitesine farklı oranlarda buğday kepeğinin etkisi istatistiksel olarak incelendiğinde % 3, 4 ve 5 oranındaki buğday kepeği oranlarının aynı istatistiksel grupta yer aldığı görülmüştür. Bu nedenle üç farklı buğday kepeği oranı da üretimde önerilebilir çıkmıştır.

Dobrev ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışma sonucunda benzer karbon ve azot kaynakları (mısır koçanı, buğday kepeği, malt çimi, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ve üre) optimum üretim ortamı olarak kullanılmıştır. Ahmad (2009) yaptığı çalışmada buğday kepeğinin farklı konsantrasyonları (%2,5; %3, %3,5) denenmiş ve %3 buğday kepeğinin (ağırlık/hacim) en yüksek aktiviteyi verdiği görülmüştür. Düşük konsantrasyon karbon kaynağının nutrient olarak yetersiz olduğu, yüksek konsantrasyonunun oksijen tranferini olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir. Karunakaran ve arkadaşlarının (2014) lignoselülozik atıklar kullanarak yaptığı ksilanaz enzimi üretim çalışmasında üretim ortamında %3-5 oranında lignoselülozik materyal kullanımının enzim üretimini artırdığı sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmalara benzer olarak buğday kepeğinin %3-5 (ağırlık/hacim) konsantrasyonunun ksilanaz enzimi üretimi için en uygun konsantrasyon olduğu söylenebilmektedir.

4.5 Malt Çiminin Karbon Kaynağı Olarak Denenmesi ve Azot Kaynağı Konsantrasyonunun Belirlenmesi

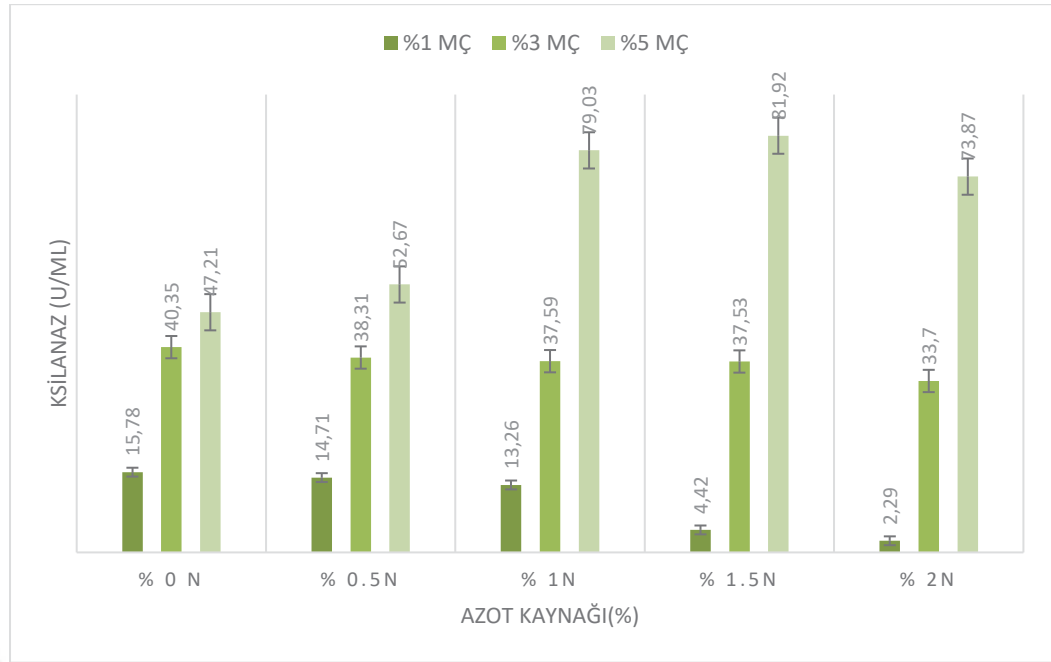
Ksilanaz üretim ortamlarında azot kaynağı olarak kullanılan malt çiminin içerik analizi yapılmış (%72.97 Karbon, %6.32 Azot) ve yüksek karbon içeriği sebebiyle karbon kaynağı olarak kullanımı denenmiştir. Diamonyum hidrojen fosfat ortama azot kaynağı olarak eklenmiştir. Malt çimi ve diamonyum hidrojen fosfatın üretim ortamındaki konsantrasyonunun belirlenmesi için Bölüm 3.2.1.4'te açıklanan şekilde hazırlanan üretim ortamları kullanılmıştır.

Yüzde 1-5 ve 5-10 aralığı ayrı ayrı denemeye alınmıştır. %1-5 (ağırlık/hacim) konsantrasyon denemesi sonucu elde edilen enzim aktiviteleri Çizelge 4.7'deki gibidir

Çizelge 4.7 Ksilanaz üretiminde MÇ ve DAHF konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi

Karbon kaynağı	Azot Kaynağı	Ksilanaz (U/ml)
MÇ (%)	DAHF (%)	
1	0	16.62
		16.03
		14.69
	0.5	16.20
		14.65
		13.28
	1	13.11
		14.39
		12.26
	1.5	4.79
		4.08
		4.39
	2	2.20
		2.84
		1.84
3	0	39.1
		41.96
		40.06
	0.5	37.77
		40.78
		36.39
	1	36.39
		37.96
		38.42
	1.5	38.16
		39.67
		34.75
	2	37.57
		30.36
		33.18
5	0	46.42
		49.18
		46.03
	0.5	53.50
		49.96
		54.55
	1	71.34
		78.29
		87.47
	1.5	86.03
		81.44
		78.29
	2	72.52
		73.31
		75.80

Üretim sonunda farklı konsantrasyonlarda karbon ve azot içeren ortamların aktiviteleri karşılaştırıldığında (Şekil 4.7) %5 (ağırlık/hacim) malt çimi konsantrasyonun en iyi karbon konsantrasyonu olduğu görülmüştür.



Şekil 4.7. MÇ ve DAHF konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi (1)

Maksimum aktivite gösteren %5 (ağırlık/hacim) MÇ konsantrasyonu kontrol grubu olarak yeniden denemeye alınmıştır. MÇ' nin %5-10 (ağırlık/hacim) aralığındaki konsantrasyonu denenmiştir. Minimum ve maksimum ksilanaz aktivitesi değeri veren kombinasyonlar Tablo 4.8 'de sunulmuştur.

Çizelge 4.8 Ksilanaz üretiminde MÇ ve DAHF konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi(2)

Karbon kaynağı	Azot Kaynağı	Ksilanaz (U/ml)
MÇ (%)	DAHF (%)	
5	0	69.84
		73.65
		61.81
	0.5	59.18
		66.15
		60.50
	1	52.87
		46.16
		49.98
	1.5	37.35
		36.89
		38.93
7	0	35.38
		33.73
		32.68
	0.5	25.45
		27.03
		17.62
	1	18.81
		33.73
		27.29
	1.5	25.91
		25.91
		25.65
2		25.59

10	0	30.18
		22.69
		21.31
	0.5	20.85
		18.68
		21.90
	1	20.19
		19.86
		20.78
	1.5	19.73
		15.06
		17.69
	2	15.72
		14.86

Maksimum aktivite değeri %5 (ağırlık/hacim) MÇ, %0 (ağırlık/hacim) DAHF konsantrasyonunda; minimum aktivite değeri %10 (ağırlık/hacim) MÇ, %2 (ağırlık/hacim) DAHF konsantrasyonunda görülmüştür. MÇ ve DAHF konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi şekil 4.8'deki gibidir.



Şekil 4.8 MÇ ve DAHF konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi(2)

Yapılan her iki denemede de en yüksek aktivite değerini veren %5 (ağırlık/hacim) MÇ konsantrasyonu tekrar denemeye alınarak DAHF konsantrasyonu seçimi tekrarlanmıştır. Aktivite değerleri Çizelge 4.9 'daki gibidir.

Çizelge 4.9. %5 ağırlık/hacim MÇ kullanılan ortamlarda DAHF konsantrasyonlarının aktivite değerleri

MÇ (%)	DAHF (%)	Ksılanaz (U/ml)
5	0	76.16
		71.95
	0.5	60.11
		61.82
	1	60.64
		52.48
	1.5	52.09
		57.91
	2	19.07
		11.58

En yüksek ksılanaz aktivitesi %5 MÇ ve %0 (ağırlık/hacim) DAHF konsantrasyonunda 76.16 U/ml olarak ölçülmüştür. DAHF konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi Şekil 4.9’da görülmektedir.



Şekil 4.9. %5 ağırlık/hacim MÇ kullanılan ortamlarda DAHF konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi

Yapılan denemeler sonunda karbon kaynağı olarak %5 (ağırlık/hacim) konsantrasyonda malt çimine azot kaynağı eklemesi yapılmadan kullanımı, devam eden çalışmalarda üretim ortamı olarak seçilmiştir.

4.6 Biyoreaktörde Üretim

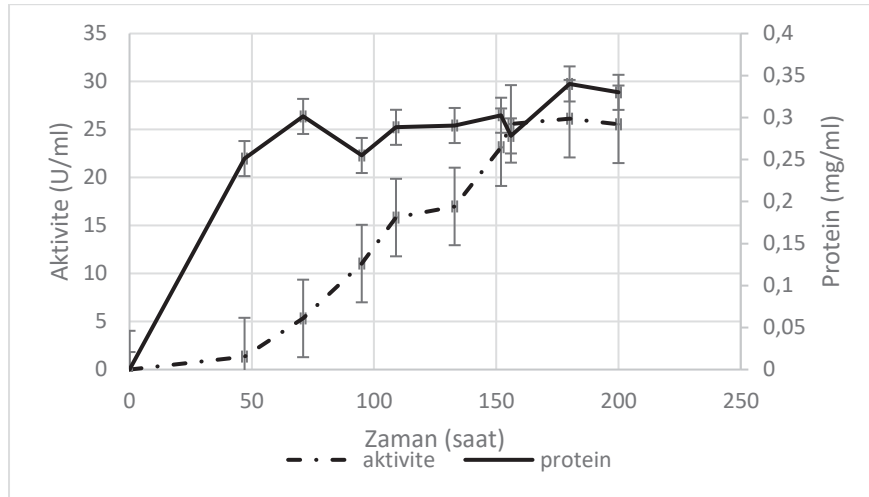
Yapılan optimizasyonlar sonucunda belirlenen üretim ortamı biyoreaktör üretimlerinde kullanılmıştır. Biyoreaktör üretimlerinde inokulasyon oranı ve çözülmüş oksijen konsantrasyonu parametreleri optimize edilmiştir.

4.6.1 İnokulasyon oranı optimizasyonu

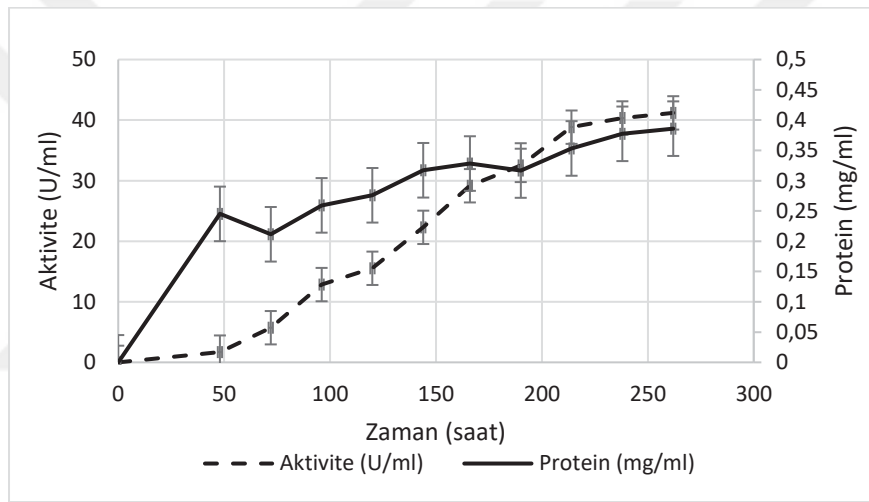
İnokulasyon oranı, ksilanaz üretiminde önemli parametrelerden biridir. İnokulasyon oranının ksilanaz aktivitesine etkisinin incelenmesi amacıyla Bölüm 3.2.2.4'te belirtilen koşullarda üretimler yapılmıştır. Karıştırmalı tank biyoreaktör ile yapılan üretimlerde, üretim boyunca pO_2 ve pH değerleri kaydedilmiş, alınan örnekler enzim aktivitesi ve protein tayini analizleri yapılmıştır. Üretim süresince pH kontrolü yapılmamıştır. Başlangıç pH değerleri 5.0-5,5 aralığındadır (EK1) ve enzim üretimi arttıkça pH değerinde düşüş gözlenmiştir. Aynı koşullarda yapılan üretimlerin oksijen ve pH, değerlerinin inkübasyon süresi boyunca değişim grafikleri EK1'de gösterilmiştir. Sabit havalandırma hızı ile yapılan üretimlerde %100 pO_2 değerinin (EK1) üretimin ilk 24 saatinde biyokütlenin hızlı artışı ve buna bağlı olarak oksijen tüketiminin fazla olması sebebiyle %0'a düştüğü görülmüştür.

Farklı inokulasyon oranlarıyla yapılan üretimlerin aktivite ve protein tayini analizleri yapılmıştır. Yapılan paralel üretimlerin aktivite ve protein değerleri bakımından benzerlik gösterdiği görülmüştür.

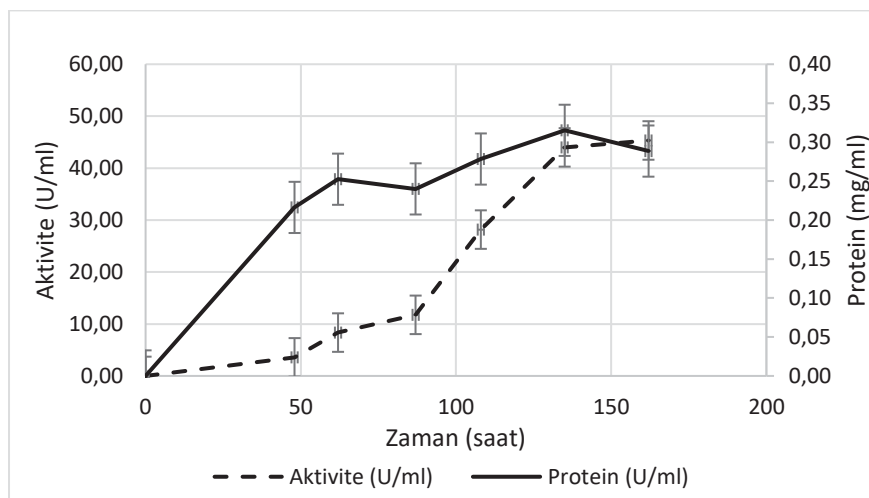
Yüzde 2,5; 5 ve 10 (hacim/hacim) inokulasyon oranlarında zamana bağlı aktivite ve protein değerleri sırasıyla Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de sunulmuştur. Elde edilen maksimum aktivite, protein ve inkübasyon değerlerine göre spesifik aktivite ve verimlilik hesaplanarak üretimler karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.10)



Şekil 4.10. %2.5 (hacim/hacim) inokülasyon oranında yapılan üretimin aktivite ve protein değerleri



Şekil 4.11. %5 (hacim/hacim) inokülasyon oranında yapılan üretimin aktivite ve protein değerleri



Şekil 4.12. %10 (hacim/hacim) inokülasyon oranında yapılan üretimin aktivite ve protein değerleri

İnokulasyon oranı arttıkça elde edilen maksimum aktivitenin, buna bağlı olarak spesifik aktivite ve verimlilik değerlerinin arttığı görülmüştür. Yüzde 10 (hacim/hacim) inokulasyon oranı ile yapılan üretimin verimliliği %5 ve 2,5 (hacim/hacim) inokulasyon oranı ile yapılan üretilere göre yaklaşık iki kat fazladır. Spesifik aktivite değerinin de yüksek olması göz önünde bulundurularak sonraki üretimler için %10 (hacim/hacim) inokulasyon oranı seçilmiştir

Çizelge 4.10. farklı inokulasyon oranlarında spesifik aktivite ve verimlilik değerleri

İnokulasyon oranı (hacim/hacim)	İnkübasyon süresi (saat)	Max. Aktivite (U/ml)	Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Verimlilik (U/ml/sa)
%2,5	156	25,58	0,27	94,74	0,16
%5	214	38,83	0,35	110,00	0,18
%10	135	43,95	0,32	137,34	0,32

Aspergillus niger ile yapılan çalışmalarda inokulasyon oranı % 1-10 aralığında değişmektedir.

Biswas ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada, *Aspergillus niger*'e benzer davranış gösteren filamentli bir fungus olan *Melanocarpus albomyces* ile ksilanaz enzimi üretimi yapılmış ve biyoreaktöre inokulasyon oranı (%2-6) optimizasyonu yapılmış ve %5 hacim/hacim inokulasyon oranı optimum olarak seçilmiştir.

Heinz ve arkadaşlarının (1993) 30 litre biyoreaktör kullanarak yaptığı fungal ksilanaz enzimi üretiminde %10 hacim/hacim, Siedenberg ve arkadaşlarının (1997) 2 litre biyoreaktör kullanarak yaptıkları üretimde %2 (hacim/hacim) inokulasyon oranı kullanmışlardır.

Literatür incelendiğinde aktivite tayin yöntemlerindeki farklar dolayısıyla aktiviteler karşılaştırılamamaktadır. MCleary ve McGeough (2015)'un yaptığı çalışmada, DNS ve Nelson-Somogyi yöntemleri farklı substratlara göre karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaya göre yaklaşım yapıldığında aktivite değerlerinin literatürle benzer olduğu söylenebilmektedir.

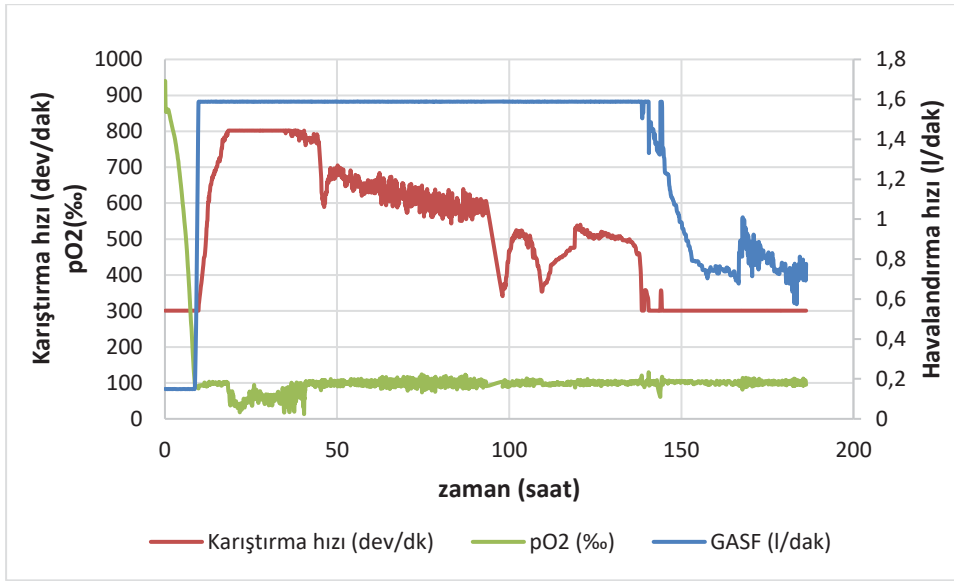
4.6.2 Çözünmüş oksijen oranı optimizasyonu

Çözünmüş oksijen oranının üretime etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.2.2.4’de belirtilen koşullarda üretimler yapılmıştır. Üretimler boyunca karıştırma hızı, havalandırma hızı, pO_2 ve pH değerleri kaydedilmiş ve üretim sonunda aktivite ve protein tayini analizleri yapılmıştır. Başlangıç pH değerleri 5.0-5,5 aralığındadır ve enzim üretimi arttıkça pH değerinde düşüş gözlenmiştir. Üretimlere ait pH grafikleri EK2’de sunulmuştur.

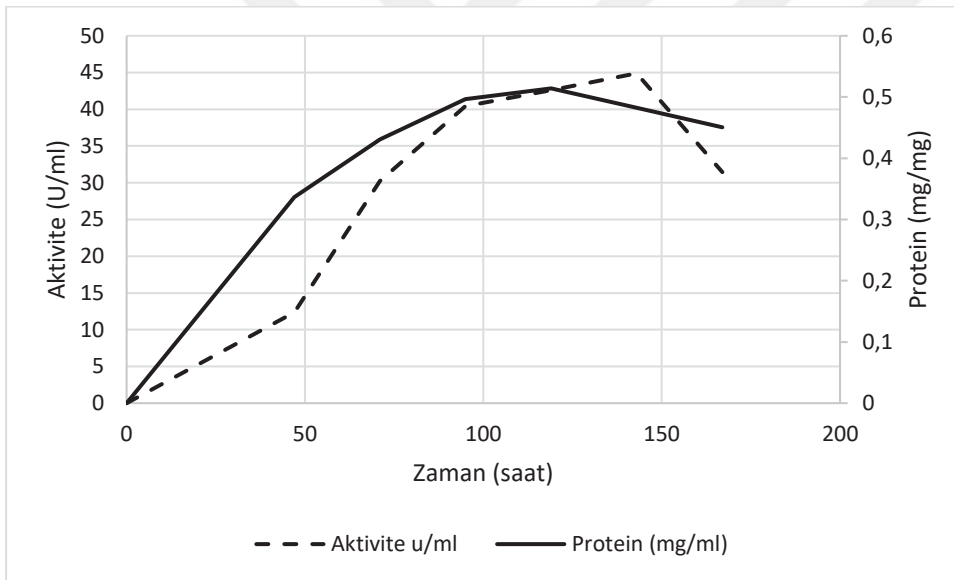
Yüzde 10 Çözünmüş oksijen oranı:

Üretimin ilk sekiz saatinde ortamda bulunan çözünmüş oksijen hızla tüketilmiş ve pO_2 değeri %10’a düşmüştür (Şekil 4.13). Buna bağlı olarak çözünmüş oksijen seviyesinin sabit tutulabilmesi için havalandırma hızı (GASF) artmıştır. Havalandırma hızı maksimum seviyeye ulaştığında (1 vvm) karıştırma hızı artışı ile oksijen seviyesi sabit tutulmuştur. 36. saatten sonra oksijen ihtiyacı azalmış ve karıştırma hızı maksimum değerinden (800 devir/dak) düşmeye başlamıştır. 140.saatın sonunda ise havalandırma hızı tekrar düşüşe geçmiş ve inkübasyon süresi sonuna kadar (167 saat) yaklaşık 0,7 l/dak hızda sabit kalmıştır.

Oksijen tüketimine bağlı olarak mikroorganizmanın, üretimin 0-8 sattinin lag, 8-36 saat aralığı logaritmik, 36-145. saat durgun fazında olduğu söylenebilmektedir. Üretim boyunca alınan örneklerin aktivite ve protein değerleri Şekil 4.14’ te sunulmuştur. En yüksek enzim aktivitesinin (44.89 U/ml) 140-145 saatleri arasında olduğu görülmektedir .



Şekil 4.13. Yüzde 10 Ç.O ile yapılan üretimin karıştırma ve havalandırma hızı değerleri

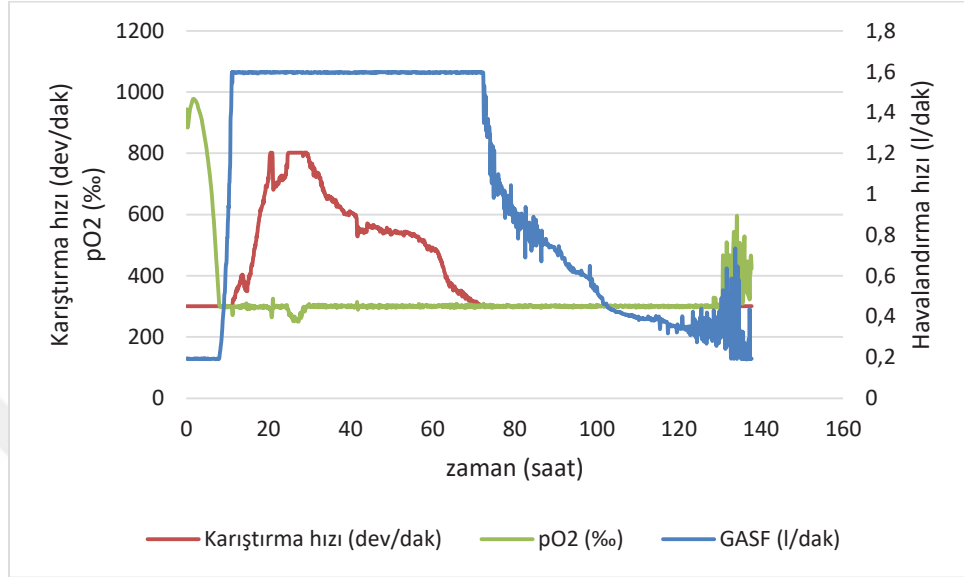


Şekil 4.14. Yüzde 10 Ç.O ile yapılan üretimin aktivite ve protein değerleri

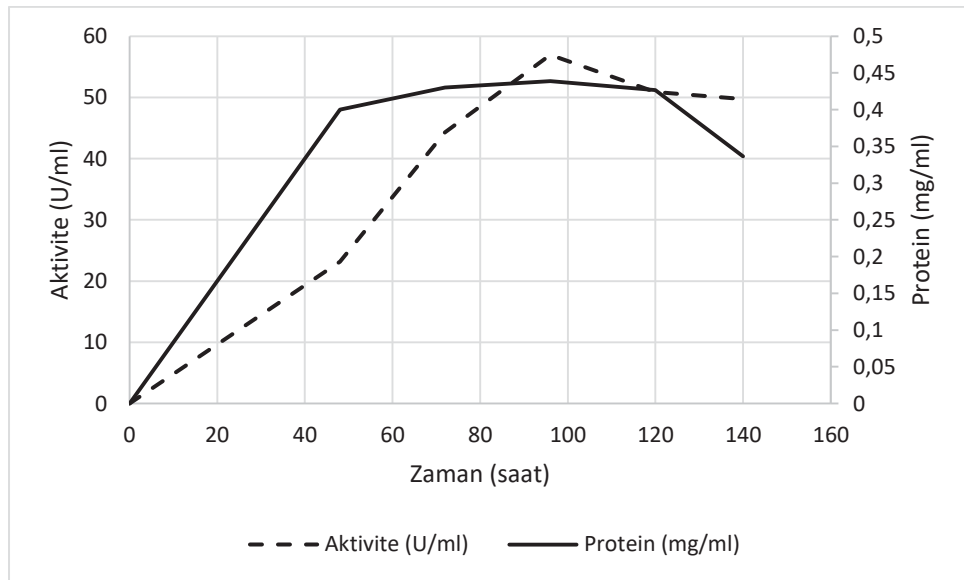
Yüzde 30 Çözünmüş oksijen oranı:

Üretim boyunca kaydedilen karıştırma hızı, havalandırma hızı ve pO2 değerlerinin değişimi Şekil 4.15 'de sunulmuştur. İnkübasyonun ilk 8 saati %10 çözünmüş oksijen denemesi ile benzerlik gösterirken, karıştırma hızı üretimin 24. saatinde maksimum değerine ulaşmış ve 30. Saatten sonra tekrar düşmeye başlamıştır. Buna bağlı olarak logaritmik fazın 8-30, durgun fazın 30-72. saatlerine kaydığı görülmektedir

Üretim boyunca alınan örneklerin aktivite ve protein değerlerine bakıldığında en yüksek aktivite ve protein 96. saatte (56.95 U/ml)) ölçülmüştür (Şekil 4.16).



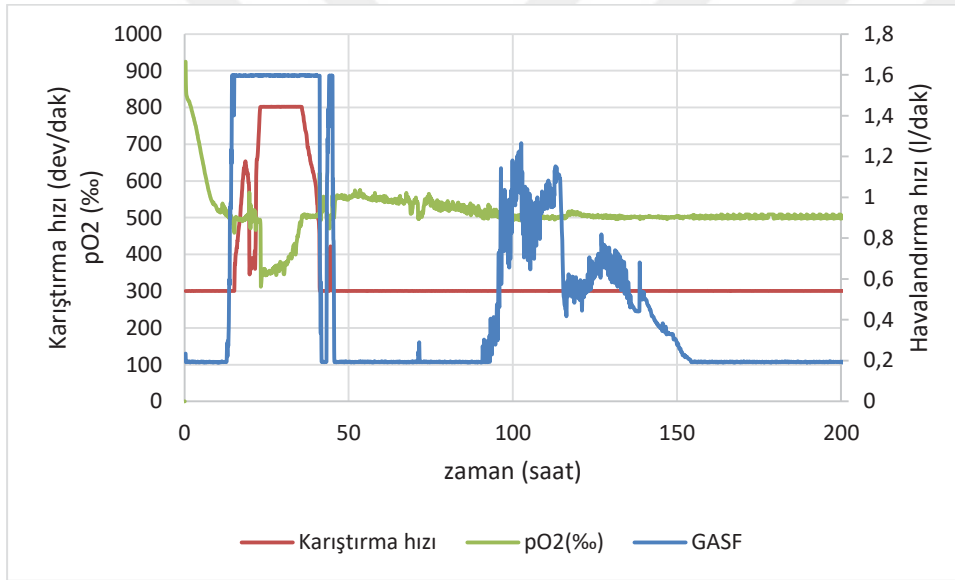
Şekil 4.15. Yüzde 30 Ç.O ile yapılan üretimin karıştırma ve havalandırma hızı değerleri



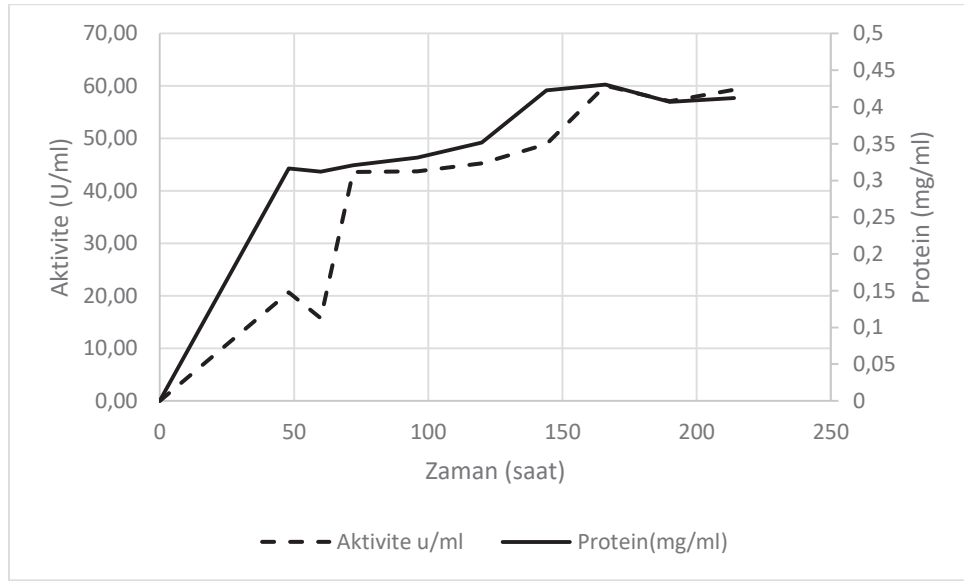
Şekil 4.16. Yüzde 30 Ç.O ile yapılan üretimin aktivite ve protein değerleri

Yüzde 50 Çözünmüş oksijen oranı:

Yüzde 50 çözünmüş oksijene yapıla denemede karıştırma hızı, hacalandırma hızı ve pO₂ değerlerinin zamana bağlı değişimi Şekil 4.17 'de sunulmuştur. Çözünmüş oksijen oranı üretimin 12. Saatinde %50'ye düşmüş ve 12. Saatten sonra havalandırma hızı artmaya başlamıştır. İnkübasyonun 14. saatinde havalandırma hızı maksimum değerine ulaşırken karıştırma hızı artmış ve 35. saatten sonra maksimum değerinden düşmeye başlamıştır. Üretim süresince alınan örneklerin aktivite ve protein tayinleri sonucu aktivite ve protein tayinleri Şekil 4.18 'de görülmektedir. En yüksek ksilanaz aktivitesine üretimin 166. Saatinde (60,07 U/ml) ulaşıldığı görülmüştür



Şekil 4.17 Yüzde 50 Ç.O ile yapılan üretimin karıştırma ve havalandırma hızı değerleri



Şekil 4.18. Yüzde 50 Ç.O ile yapılan üretimin aktivite ve protein değerleri

Yapılan çözünmüş oksijen optimizasyonu denemeleri sonucunda üretimler aktivite spesifik aktivite ve verimlilik değerlerine göre karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.11’de sunulmuştur.

Çizelge 4.11. Farklı çözünmüş oksijen denemelerinin spesifik aktivite ve verimlilik değerleri

Çözünmüş oksijen oranı (%)	İnkübasyon süresi (saat)	Max. Aktivite (U/ml)	Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Verimlilik (U/ml/sa)
%10	143	44,89	0,48	91,66	0,31
%30	96	56,95	0,34	164,70	0,59
%50	166	60,07	0,43	139,69	0,36

Yapılan üretimler karşılaştırıldığında %30 çözünmüş oksijen ile yapılan üretimin spesifik aktivite ve verimlilik değerlerinin diğer üretimlerden daha yüksek olduğu görülmüş ve ksilanaz üretimi için uygun çözünmüş oksijen oranı olarak belirlenmiştir.

Ksilanaz enziminin derin kültürde üretiminde; havalandırma ve karıştırma hızı, çözünmüş oksijen oranını etkiler. Çözünmüş oksijen mikrobiyal

hücrelerin verimliliği açısından önemlidir. Fungal biyokütle arttıkça çözünmüş oksijen ihtiyacı artar, bununla birlikte fermantasyon ortamı viskozitesini artışı kütle transfer verimini engelleyebilir. Oksijenin difüzyonunun sağlanabilmesi için uygun karıştırma ve havalandırma hızı sağlanmalıdır. Yüksek karıştırma hızı mekanik strese sebep olarak ürün oluşumunu etkilerken yüksek havalandırma hızı hava kabarcıklarının sıvı içerisinde kalış süresinin azalmasına ve oksijen yetersizliğine sebep olmaktadır (Biswas ve ark., 2010).

Her üç çözünmüş oksijen denemesinde de (%10, 30, 50) yaklaşık ilk 12 saate çözünmüş oksijen hızla düşmüştür. Bu, hücre konsantrasyonunda artış nedeniyle oksijen tüketiminin artmasından kaynaklıdır. Bu noktada birim zamandaki oksijen tüketimi oksijen transferinden büyüktür.

Biyoreaktörde ksilanaz üretimi için yapılan çalışmalarda kullanılan çözünmüş oksijen oranı mikroorganizmanın formuna, inokulasyon oranı ve yaşına, misel büyüklüğüne göre değişmekle birlikte genel olarak %10-50, havalandırma hızları 0,5- 1,5 vvm aralığındadır.

Michelin ve arkadaşlarının (2013) %10 (hacim/hacim) inokulasyonla yaptığı çalışmada çözünmüş oksijenin zamana bağlı değişimi benzerlik göstermiştir. İlk 12 saatte %5 in altına düşen çözünmüş oksijen karıştırma hızı artırılarak %20’de sabit tutulmuştur. Üretim boyunca pH da ilk 2 günde asidik yan ürünlerin oluşumu sebebiyle düştüğü belirtilmiştir. Bu durum bakteriyel kontaminasyon için önemli bir kontrol olurken enzim stabilitesini etkilemediği ifade edilmiştir. Ksilanaz enziminin düşük pH da uzun süre (30C, 5 gün) stabilitesini koruduğu görülmüş ve maksimum aktivite 11. günde elde edilmiştir.

5.ÖNERİLER

Ksilanaz enzimi; kağıt, yem, gıda ve farmasötik endüstrisi, biyoyakıt üretimi gibi geniş kullanım alanlarına sahiptir. Günümüzde ekmek yapımında kullanılan ve artan ekmek tüketimine bağlı olarak talebi de artan ksilanazın proses koşullarına uygun formda ve ekonomik olarak üretimi de oldukça önemlidir.

Unlu mamuller sektörüne yönelik ksilanaz enzimi üretilen bu çalışmada, çalkalamalı kültürde uygun üretim ortamı seçilerek, biyoreaktörde üretim koşulları belirlenmiştir. yapılan üretimler sonucu elde edilen enzim aktivitesinin literatür düzeyinde kıyaslanabilir sonuçlar verdiği görülmektedir. Ancak üretim prosesinde fungusların kullanıldığı tüm üretim proseslerinde olduğu gibi yaşanan temel sorunlar olduğu ve bu sorunların aşılması için de çeşitli farklı yaklaşımlar geliştirilmesi gerektiği de yadsınamaz. Ticari ksilanaz enzimi üretiminde yaygın olarak kullanılan *Aspergillus niger* filamentli bir fungustur. Karıştırma etkisine göre farklı formlara görülebilen *Aspergillus niger*, pellet oluşumu sebebiyle viskozitenin artışına ve buna bağlı olarak kütle transferinde zorluklar yaşanmasına sebep olabilmektedir. Bu oluşumu engellemek için artırılan karıştırma hızı ise mekanik strese sebep olarak üretim verimini düşürebilmektedir. Bu sebeple mekanik karıştırıcı reaktörlerin yanı sıra farklı reaktör sistemlerinin de üretimlerde alternatif olarak denenmesi ve tüm proseslerin özellikle sıvıya aktarılan güç vb özellikler açısından ekonomik açıdan karşılaştırılması faydalı olacaktır. Ksilanaz üretim veriminin arttırılabilmesi açısından bir başka yaklaşım da kullanılan tarımsal yan ürünlerin çeşitli ön işlemlerden geçirilmesi olabilir.

Mevcut çalışmada kullanılan tarımsal atıklar bir ön işlem uygulamasından geçmemiştir. Hammaddeye uygun fiziksel ve kimyasal ön işlemlerle substrat artırılarak enzim aktivitesinde artış sağlanabilir. Ancak uygulanacak her bir ön işlemin de ek bir maliyet getireceği unutulmamalıdır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

Ahmad, Z., 2009, Production and characterization of xylanase for utilization in baking industry, Doktora tezi, National Institute Of Food Science And Technology University of Agriculture, Pakistan, 8-12 s

Bajaj, B.K., ve 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, 330–337s

Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., ve Hoondal, G. S., 2001, Microbial xylanases and their industrial applications: a review, *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 326–338s

Biely, P., VrSanskh, M., Tenkanen, M., ve Kluepfel, D., 1997, Endo-P - 1,4-xylanase families: differences in catalytic properties, *Journal of Biotechnology*, 57, 151-166s

Biswas, R., Sahai, V., Mishra, S., ve Bisaria, V.S., 2010, Bioprocess strategies for enhanced production of xylanase by *Melanocarpus albomyces* IITD3A on agro-residual extract, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 702–708s

Boyacıoğlu, H., 2010, Ekmek üretiminde kullanılan bazı yeni bileşenler, Okan Üniversitesi, Gıda mühendisliği Bölümü
(<http://www.ankarahalkekmek.com.tr/Dosyalar/62812430250.pdf>) (Erişim tarihi:19.12.17)

Burlacu1, A., Cornea1, C.P., ve Israel-Roming1 F., 2016, Microbial Xylanase: A Review, *Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies*, 20, 335s

Butt, M.S., Nadeem, M.D., Ahmad, Z., ve Sultan, M.T., 2008, Xylanases and their applications in baking industry, *Food Technol. Biotechnol.*, 46 (1), 22–31s

Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P.L., Srivastava, A.K., 2016, Bacterial xylanases: biology to biotechnology, *Biotech*, 6(150)

Collins, T., Gerday, C., ve Feller, G., 2005, Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 3–23s

Corral, O.L., ve Villaseñor-Ortega, F., 2006, Xylanases, *Agricultural and Food Biotechnology*, 37/661, 305-322s

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Coşkun, A., 2010, Endüstriyel enzimler üreten yeni *bacillus* sp. Suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.

- Dobrev, G.T., Pishtiyski, I.G., Stanchev, V.S., 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, 2671–2678s
- Fierens, E., Rombouts, S., Gebruers, K., Goesaert, H., Brijs, K., Beaugrand, J., Volckaert, G., Campenhout, S., Proost, P., Courtin, C.M., ve Delcour, J.A.,** 2007, TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family, *Biochemical Journal*, 403, 583–591s
- Gebruers, K., Courtin, V.M., Moers, K., Noots, I., Trog, I., ve Delcour, J.A.,** 2005, The bread-making functionalities of two *Aspergillus niger* endoxylanases are strongly dictated by their inhibitor sensitivities, *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 417–425s
- 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., ve 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 substract, *SpringerPlus*, 2:380
- Gupta, V.K.,** 2016, Microbial enzyme in bioconversions of biomass, *Biofuel and Biorefinery Technologies*, 3, 182s
- Güner, K.G., ve Dağlıoğlu, O.,** 2008, Ksilanaz Enziminin Ekmek Yapımında Kullanımı, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum, 443-445s
- Harris, A.D., ve Ramalingam, C.,** 2010, Xylanases and its application in food industry: a review, *Journal of Experimental Sciences*, 1:7, 01-11s
- Hatti-Kaul, R.,** 2009, Enzyme production, *Biotechnology*, 5, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)
- Heinz, P., Michael, S., ve Walter, S.,** 1993, Effect of shear rate and culture ph on the production of xylanase by *thermomyces lanuginosus*, *Biotechnology Letters*, 15(4), 405-410s
- 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
- <https://www.megazyme.com> (Erişim tarihi: 18.11.17)
- Juge, N., Payan, F., ve Williamson, G.,** 2004, XIP-I, a xylanase inhibitor protein from wheat: a novel protein function, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1696, 203–211s

Kalim, B., Böhringer, N., Ali, N., ve Schäberle, T.F., 2015, Xylanases—from microbial origin to industrial application, *British Biotechnology Journal*, 7(1), 1-20s

Karunakaran, S., Saravanan, A., Dhanasekaran, S., Senbagam, D., Senthil kumar, B., 2014, Xylanase production from *Aspergillus niger*, *International Journal of ChemTech Research*, 6(9), 4207-4211s

Mandal, A., 2015, Review on microbial xylanases and their applications, *International Journal of Life Sciences*, 4(3), 178-187s

McClearly, B.V., ve McGeough, P., 2015, A comparison of polysaccharide substrates and reducing sugar methods for the measurement of endo-1,4- β -Xylanase, *Appl Biochem Biotechnol*, 177, 1152-1163s

Michelina, M., Motaa, A.M.O., Polizeli, M.L.T.M., Silva, D.P., Vicente, A.A., 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, 19-26s

Motta, F. L., Andrade, C. C. P., ve 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, InTech, DOI: 10.5772/53544

Okafor, U. A., Okochi, V. I., Onyegeme-okereanta, B. M. ve Nwodo-Chinedu, S., 2007, Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro – wastes, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 6 (14), 1710-1714s

Paës, G., Berrin, J.G., ve Beaugrand, J., 2012, GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications, *Biotechnology Advances*, 30, 564–592s

Payan, F., Flatman, R., Porciero, S., Williamson, G., Juge, N., ve Roussel, A., 2003, Structural analysis of xylanase inhibitor protein I (XIP-I), a proteinaceous xylanase inhibitor from wheat, *Biochemical Journal*, 372, 399–405s

Polizeli, M. L. T.M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F. Jorge, J. A., ve Amorim, D. S., 2005, Xylanases from fungi: properties and industrial applications, *Appl Microbiol Biotechnol*, 67, 577–591s

Prabhu, M., ve Li, W.J., 2017, Microbial cellulase and xylanase: their sources and applications, *Advances in Biochemistry and Applications in Medicine*, 1-21s

Ramli, R.B., 2015, Production of crude xylanase from *Aspergillus niger* under solid state fermentation (ssf) by using different agro wastes as substrates, *Malezya Sarawak Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Fakültesi*, 15s

- Romanowska, I., Polak, J., ve Bielecki, S.**, 2006, Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT- 90 xylanase for bakery, *Appl Microbiol Biotechnol*, 69, 665–671s
- Sambamurthy, K.**, 2006, Pharmaceutical Biotechnology, Delhi, 1, 223s
- Sargın, S., ve Öngen, G.**, 2003, Kanatlı yemi katkısı olarak kullanılan ksilanaz enziminin katı kültür fermantasyon yöntemi ile üretiminde ölçek büyütme çalışmaları, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 40 (3), 145-152s
- Satyanarayana, T., Littlechild, J., ve Kawarabayasi, Y.**, 2013, Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology, *Biotechnology of Thermophiles*, 2, 831s
- Siedenberg, D., Gerlacha, S.R., Weigela B., Schugerlb K., Giuseppinb M.L.F., Hunikb, J.**, 1997, Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in stirred tank and airlift tower loop reactors: the influence of stirrer speed and phosphate concentration, *Journal of Biotechnology*, 56(2), 103-114s
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., ve Dijck, P. W. M.**, 2002, On the safety of *Aspergillus niger* – a review, *Appl Microbiol Biotechnol*, 59, 426–435s
- Sewalt, V., Shanahan, D., Gregg, L., Marta, J., ve Carrillo, R.**, 2016, The Generally Recognized as Safe (GRAS) Process for Industrial Microbial Enzymes, *Industrial Biotechnology*, 12(5), 295-300s
- Shahi, N., Hasan, A., Akhtar, S., M. Haris Siddiqui, H.M., Usman Sayeed, U., Kalim, M., ve Khan, A.**, 2016, Xylanase: A promising enzyme, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(3), 334-339s
- Silva, D.M., Batista, L.R., Rezende E.F., Fungaro M.H.P., Sartori, D., ve Alves E.**, 2011, Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy, *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 761-773s
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., ve Tripathi, C. K. M.**, 2017, Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review, *Frontiers in microbiology*, 7(2087).
- Soares, I., Távora, Z., Barcelos R.P., ve Baroni S.**, 2012, *Microorganism Produced Enzymes in the Food Industry*, Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry, 83-94s
- Soetaert, W., ve Vandamme, E.J.**, 2010, *Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success*, 156s
- Souza W.R., Gouvea, P.F., Savoldi, M., Malavazi, I., Bernardes, L.A.S., Goldman, M.H., Vries, R.P., Oliveira, J.V.C., ve Goldman, G.H.**, 2011, Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse, *Biotechnology for Biofuels*, 4(40).

Subramaniyam, R. ve Vimala, R., 2012, Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study, *International Journal of Science and Nature*, 3, 480-486s

Törrönen, A., ve Rouvinen, J., 1997, Structural and functional properties of low molecular weight endo- 1,4- β –xylanases, *Journal of Biotechnology*, 57, 137-149s

Vries, R.P., ve Visser, J., 2001, *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4), 497–522s

Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A., ve Parkash, J., 2017, Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review, *Biotech*, 7(11), 1-12s

Wong, K.Y., Tan, U.L., ve Sadler, J.N., 1988, Multiplicity of 3-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications, *Microbiological Reviews*, 52:3, 305-317s

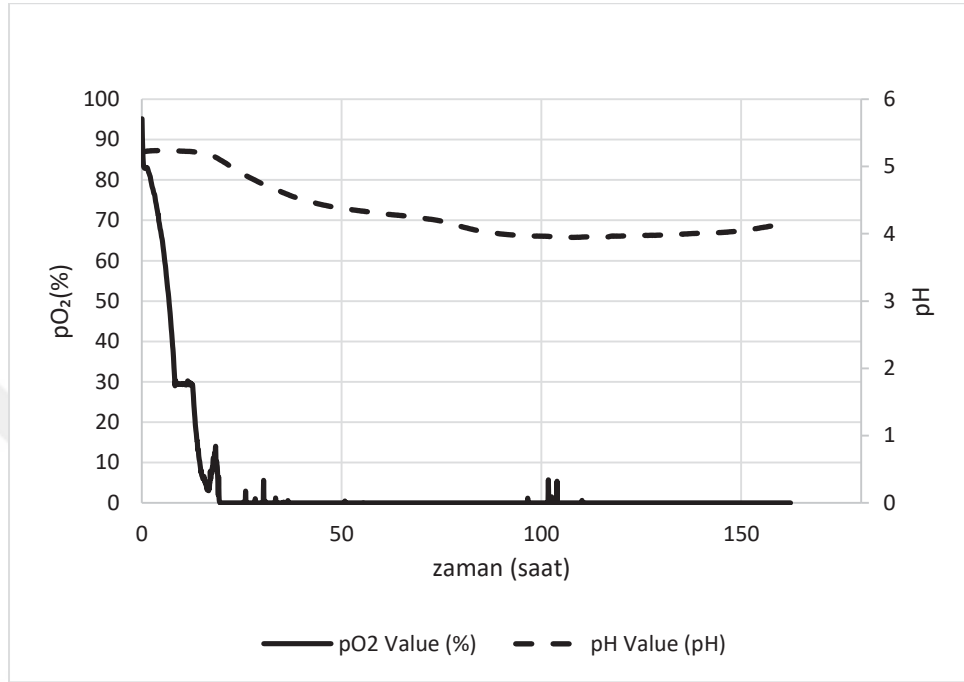
Yeğın, S., ve Büyükkilleci, A.O., 2015, Mikrobiyal Ksilanazlar ve Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları, *Akademik Gıda*, 13(4), 317-326s

Yeğın, S., 2017, Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* on globe artichoke stem: Bioprocess optimization, enzyme characterization and application in saccharification of lignocellulosic biomass, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(4), 41-449s

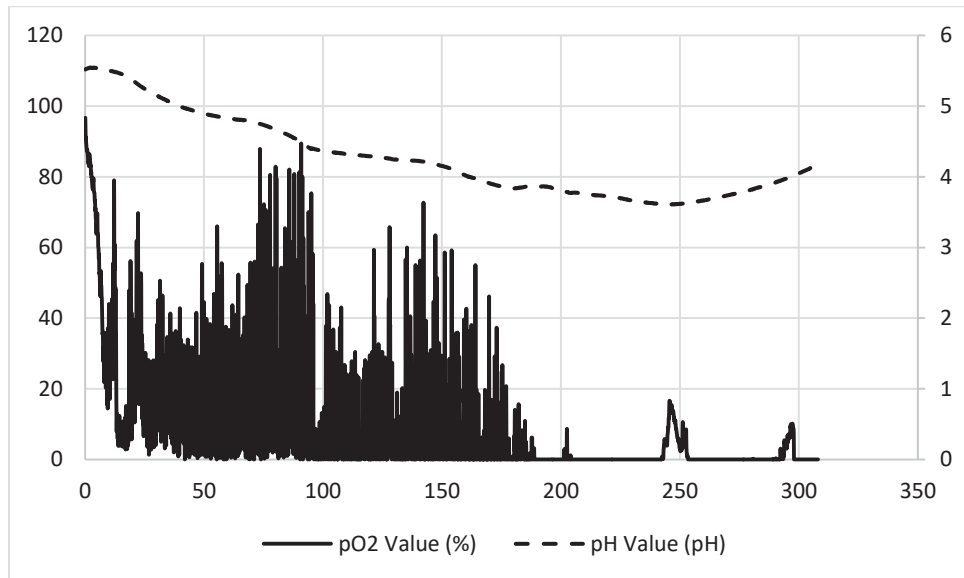


EKLER

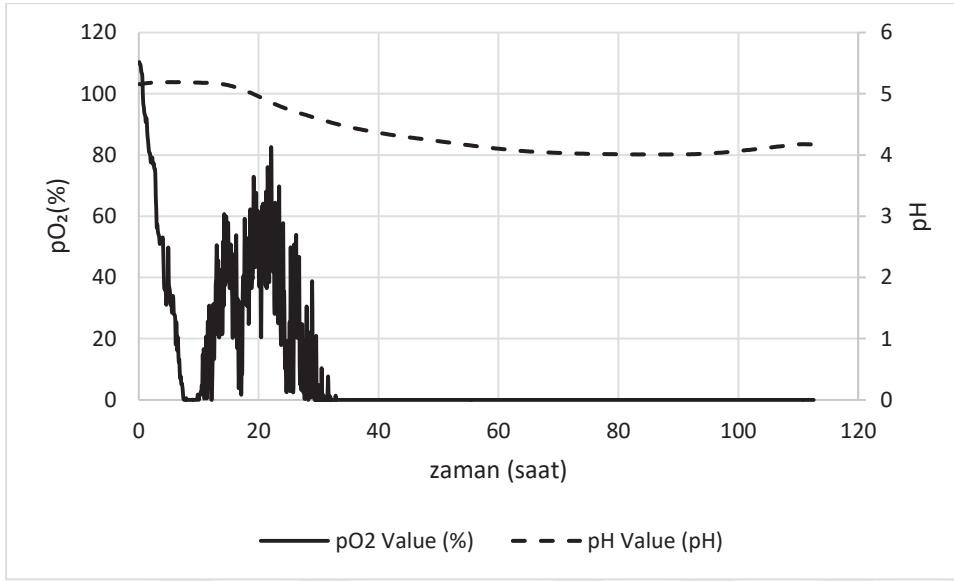
EK1 İnokulasyon oranı denemeleri oksijen ve pHdeğerleri



Şekil 1: %2.5 (hacim/hacim) inokülasyon oranında yapılan üretimin oksijen ve pH değerleri
*1vvm sabit havalandırma hızı ve 300 rpm karıştırma hızı

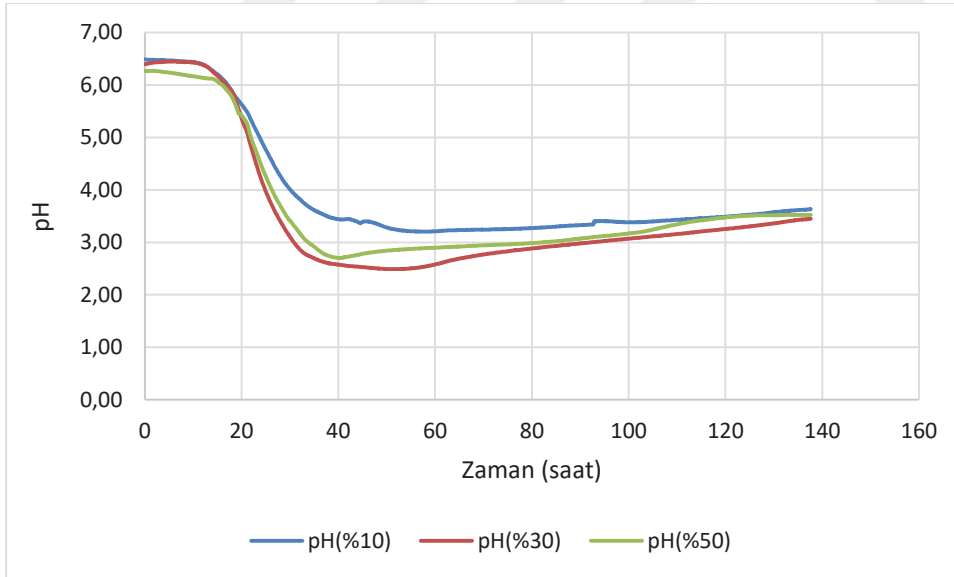


Şekil 2: 5 (hacim/hacim) inokülasyon oranında yapılan üretimin oksijen ve pH değerleri(2)
*1vvm sabit havalandırma hızı ve 300 rpm karıştırma hızı



Şekil 3: %10 (hacim/hacim) inokülasyon oranında yapılan üretimin oksijen ve pH değerleri
*1vvm sabit havalandırma hızı ve 300 rpm karıştırma hızı

EK 2: Çözünmüş oksijen denemeleri pH değerleri



Şekil 1: Çözünmüş oksijen oranı denemeleri pH değişimi

ÖZGEÇMİŞ

Dilek ŞAHİNBAŞ 1991 yılında Ankara’da doğmuştur. İlköğrenimini Ankara, lise öğrenimini Antalya’da tamamlamıştır. 2015 yılında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü’nden ‘Çam Yapraklarından Katı Kültür Fermentasyonu İle Lakkaz Enzimi Üretimi’ Lisans Bitirme Tezi ile mezun olduktan sonra aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır.

