

***Aspergillus terreus* KSİLANAZ ÜRETİM KOŞULLARININ
BATIK ve KATI KÜLTÜRDE İSTATİSTİKİ METODLARLA
OPTİMİZASYONU ve KARŞILAŞTIRILMASI**

Nermin GÜMÜŞTAŞ

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji
Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ
Eylül-2015**

TC
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aspergillus terreus KSİLANAZ ÜRETİM KOŞULLARININ BATIK ve KATI
KÜLTÜRDE İSTATİSTİKİ METODLARLA OPTİMİZASYONU ve
KARŞILAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Nermin GÜMÜŞTAŞ

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı: Yüksek Lisans

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ

KARAMAN – 2015

TEZ ONAYI

Nermin GÜMÜŞTAŞ tarafından hazırlanan “*Aspergillus terreus* ksilanaz üretim koşullarının batık ve katı kültürde istatistiki metodlarla optimizasyonu ve karşılaştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ

Juri Üyeleri

İmza:

Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Kamil Özdağ Fen Fak.
Biyoloji Bölümü



Doç. Dr. Gökhan KARS

Selçuk Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü



Yrd. Doç. Dr. Abdullah Tahir BAYRAÇ

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Mühendislik Fak.
Biyomühendislik Bölümü

Tez Savunma Tarihi: 17/09/2015

Yukarıdaki sonucu onaylarım


Prof. Dr. Fevzi KILIÇEL

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Nermin GÜMÜŞTAŞ



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Aspergillus terreus* KSİLANAZ ÜRETİM KOŞULLARININ BATIK ve KATI KÜLTÜRDE İSTATİSTİKİ METODLARLA OPTİMİZASYONU ve KARŞILAŞTIRILMASI**

Nermin GÜMÜŞTAŞ

**Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Aytac KOCABAŞ
Eylül, 2015, 62 sayfa**

Bu çalışmanın amacı öncelikle, ksilanaz üretim şartlarının tarımsal atık olan mısır koçanı kullanılarak *Aspergillus terreus* NRRL 1960 ile hem batık hem de katı fermentasyon kültürlerinde istatistikî metod olarak Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak Tepki Yüzey Metodolojisi yardımıyla optimizasyonu ve sonrasında her iki kültürün ksilanaz üretim seviyelerine göre kıyaslanmasıdır.

Her iki kültür ortamı için beş farklı değişkenin üç seviyesi belirlenmiştir. Batık kültür için bu değişkenler aşı oranı, potasyum fosfat, NaCl, karbon kaynağı (mısır koçanı) ve azot kaynağı konsantrasyonlarıdır. Potasyum fosfat, NaCl konsantrasyonları yerine nem oranı ve pH değişkenleri diğer üç değişken ile birlikte katı kültür için kullanıldı.

Optimize edilmiş sonuçlar ksilanaz aktivitesini batık kültür için 21 IU/mL ve katı kültür için 24 IU/mL olarak gösterdi. Değişkenlerin seviyeleri batık kültür için, karbon kaynağı 4 g/mL, aşı oranı %10, azot kaynağı 0,4 g/mL, potasyum fosfat 0,02 g/mL ve sodyum klorür 0,02 g/mL; katı kültür için, karbon kaynağı 2 g, nem oranı 6 mL (3X), azot kaynağı 0,2 g/mL, aşı oranı 3 mL ve pH 5 olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Ksilanaz, *Aspergillus terreus*, Tepki yüzey metodolojisi, Optimizasyon, Batık kültür fermantasyonu, Katı kültür fermantasyonu.

ABSTRACT

Ms Thesis

***Aspergillus terreus* KSİLANAZ ÜRETİM KOŞULLARININ BATIK ve
KATI KÜLTÜRDE İSTATİSTİKİ METODLARLA OPTİMİZASYONU ve
KARŞILAŞTIRILMASI**

Nermin GÜMÜŞTAŞ

**Karamanoğlu Mehmetbey University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

**Supervisor: Assist. Prof. Dr. Aytaç KOCABAŞ
September, 2015, 62 pages**

The aim of this study was firstly, optimization of xylanase production conditions on corn cob as a agricultural waste from *Aspergillus terreus* NRRL 1960 in both submerged and solid state fermentation cultures by the help of Responce Surface Methodology using Box-Behnken experimental design as a statistical method and after that, the comparison of both fermentation culture with respect to xylanase production level.

Three levels of five different variables were tested for both fermentation culture. The variables for submerged fermentation culture were inoculation amount, potassium phosphate, NaCl, carbon source (corn cob) and nitrogen source concentrations. Instead of potassium phosphate, NaCl concentrations, moisture content and pH were used as the variables besides other three variables for solid state fermentation culture.

The optimized results showed that the xylanase activity of submerged culture was 21 IU/mL and 24 IU/mL for solid-state culture. The variables levels were determined as 4 g/mL corn cob, 10 % inoculation, 0.4 g/mL nitrogen source, 0.02 g/mL potassium phosphate and 0.02 g/mL NaCl for submerged culture and 2g corn cob, 6 mL (3X) moisture content, 0.02 g/mL nitrogen source, 3 mL inoculation amount and pH 5 for solid-state culture.

Key Words: Xylanase, *Aspergillus terreus*, Response surface methodology, Optimization, Submerged fermentation, Solid state fermentation

ÖN SÖZ

Bu çalışmada batık ve katı kültür fermantasyon yöntemleriyle elde edilen ksilanaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği üretim koşullarının tespiti ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar ile en yüksek aktiviteyi sağlayan faktörler ve miktarları, geleneksel kullanıma sahip olan batık kültüre alternatif olarak yakın zamanda kullanılmaya başlanmıştır. Katı kültürün verimlilik üstünlüğü sayesinde bundan sonraki birçok bilimsel çalışmalara ışık tutarak zaman, iş gücü ve maddi kaybı önleyeceği ve enzim üretim maliyetini azaltacağı inancıyla başarılar diler, saygılar sunarım.

Öncelikle, bu çalışmada araştırma ve kendimi geliştirmeme olanak sağlayan, bana her konuda değerli bilgi ve önerileri ile yol gösteren ve büyük emek sarf eden danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Ayrıca bu çalışma için 212T143 nolu proje kapsamında destek veren Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca, laboratuvarında bana yardımcı olan Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü değerli hocam Doç. Dr. Muhammad AASIM'a ve mikrobiyoloji laboratuvar çalışma arkadaşlarım Davut BOZAN, İbrahim SAVRAN, Yasemin BAŞKAYA, Ömer Faruk KAYA, Ümmühan ÜNLÜ, Serap GÖNEK, Arife TOFUR, Hürü KULAK, Merve Ezgi ESKİ ve diğer laboratuvar çalışanlarına gösterdikleri destek ve anlayıştan dolayı teşekkürü borç bilirim.

Son olarak, teşekkürden daha fazlasını borçlu olduğumu düşündüğüm, fakat burada teşekkürden daha fazlasını öneremeyeceğim, annem Bedriye GÜMÜŞTAŞ, babam Yaşar GÜMÜŞTAŞ, kardeşlerim Süleyman, Muhammet Ali, Ahmet, Yakup ve Mehmet Salih GÜMÜŞTAŞ'a sonsuz destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Nermin GÜMÜŞTAŞ

Eylül, 2015

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖN SÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Lignoselülozik Yapılar	4
2.1.1. Selüloz	6
2.1.2. Lignin.....	7
2.1.3. Hemiselüloz	7
2.3.1.1. Ksilan	8
2.2. Enzimler ve İsimlendirilmesi.....	10
2.3. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Ksilanazlar	11
2.3.1. Ksilanazlar	11
2.3.1.1. Ksilanaz üreten mikroorganizmalar	12
2.3.1.2. Ksilanaz Enzimlerinin Özellikleri	14
2.3.1.3. Ksilanaz Enziminin Moleküler Yapısı.....	15
2.3.1.4. Ksilanazların Bazı Uygulama Alanları	16
MATERYAL ve METOT	19
3.1. Materyaller.....	19
3.2. Metodlar.....	19
3.2.1. Mikroorganizma ve Fermantasyonu	19
3.2.2. Ksilanaz Üretimi için Kültür Ortamının Katı ve Batık Kültür Ortamlarında Optimizasyon Çalışmaları.....	22
3.2.3. Ksilanaz Aktivite Ölçümü	26

4. BULGULAR	27
4.1. Tepki Yüzey Metodolojisi Kullanılarak Batık Kültürde Ksilanaz Üretiminin Optimizasyonu	27
4.2. Tepki Yüzey Metodolojisi Kullanılarak Katı Kültürde Ksilanaz Üretiminin Optimizasyonu	39
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	47
KAYNAKLAR	52
EKLER	58
EK A	58
EK B	59
EK C	60
ÖZGEÇMİŞ	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Türkiye'de toplam ekin üretimleri ve atık miktarları	5
Çizelge 2.2. Farklı lignoselülozik yapılardaki bileşenlerin oranı	5
Çizelge 2.3. Ksilanaz üreten mikroorganizmalar	13
Çizelge 2.4. Ksilanazların potansiyel uygulama alanları	18
Çizelge 3.1. Batık, katı ve ön kültür besiyeri içerikleri	21
Çizelge 3.2. Box-Behnken deney tasarım değerleri	21
Çizelge 3.3. Batık kültür fermantasyonu için Box-Behnken deney tasarım değişken ve seviyeleri.....	22
Çizelge 3.4. Batık kültür için oluşturulan deney setleri	23
Çizelge 3.5. Katı kültür için Box-Behnken deney tasarım değişken ve seviyeleri	24
Çizelge 3.6. Katı kültür için oluşturulan deney setleri	25
Çizelge 4.1. Batık kültürden elde edilen ilk set sonuçları	30
Çizelge 4.2. Batık kültür tekrarlar sonrası set tepkileri	35
Çizelge 4.3. Katı kültür tekrarlar sonrası set tepkileri	40
Çizelge 4.4. Batık ve katı kültür için TYM denenen regresyon analiz modelleri ve yüzdeleri	43
Çizelge 5.1. Denklemde tez çalışmasında incelenen optimizasyon süreçlerindeki karşılığı ve değerleri	48
Çizelge 5.2. Batık ve katı kültürde en yüksek aktivite verebileceği tahmin edilen deney setleri ve elde edilen aktivite değerleri	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Genel lignoselülozik yapılar.....	5
Şekil 2.2. Selülozun genel yapısı	6
Şekil 2.3. Selülozun moleküler yapısı	6
Şekil 2.4. Ligninin yapısında bulunan fenilpropan birimleri.....	7
Şekil 2.5. Hemiselülozun yapısı	8
Şekil 2.6. Ksilanın yapısı ve ksilanaz enzimlerinin etki bölgeleri.....	9
Şekil 2.7. Aspergillus terreus'un mikroskopik görüntüsü	13
Şekil 3.1. Mısır koçanlarının öğütülmüş görüntüsü	19
Şekil 3.2. Spor üretim ve sayım aşamaları	20
Şekil 3.3. Spor ekim aşamaları	20
Şekil 4.1. Batık kültür örnek set profilleri	27
Şekil 4.2. Batık kültür doğrusal regresyon analizi.....	32
Şekil 4.3. Batık kültür kare regresyon analizi	32
Şekil 4.4. Batık kültür doğrusal+etkileşimli regresyon analizi	33
Şekil 4.5. Batık kültür tam 2. dereceden regresyon analizi	34
Şekil 4.6. Batık kültür TYM analizi	36
Şekil 4.7. Batık kültür TYM analizi çevresel ve yüzey eğri grafikleri.....	38
Şekil 4.8. Katı kültür set sonucunun doğrusal regresyon analizi.....	41
Şekil 4.9. Katı kültür set sonucunun doğrusal+kare regresyon analizi	41
Şekil 4.10. Katı kültür set sonucunun doğrusal+etkileşimli regresyon analizi	42
Şekil 4.11. Katı kültür set sonucunun tam 2. dereceden regresyon analizi	43
Şekil 4.12. Katı kültür TYM analizi	44
Şekil 4.13. Katı kültür TYM analizi çevresel ve yüzey eğri grafikleri	46

SİMGELER ve KISALTMALAR

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrad
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekaire
nm	Nanometre
mm	Milimetre
mm ²	Milimetrekaire
mm ³	Milimetreküp
%	Yüzde
mM	Milimolar
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
L	Litre
mL	Mililitre
g	Gram
mg	Miligram
IU	Uluslararası Ünite

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
CS	Karbon kaynağı
IA	Aşı miktarı
NS	Azot kaynağı
KP	Potasyum fosfat kaynağı
NA	Tuz miktarı
MR	Nem oranı

pH	Asit-baz derecesi
Rpm	Revolutions per minute (Dakikadaki dönüş hızı)
DNS	Dinitro Salisilik Asit
TYM	Tepki Yüzey Metodu
E.C.	Enzyme Commission
Kons.	Konsantrasyon
Std	Standart
SMF	Batık (sulu) kültür (Submerged Fermentation)
SSF	Katı kültür (Solid-State Fermentation)
IUB	Uluslararası Biyokimya Birliği
NRRL	Northern Regional Research Laboratories (Kuzey Bölgesi Araştırma Laboratuvarı)
<i>A. terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
CSL	Corn Steep Liquor (Mısır şurubu)

1. GİRİŞ

Yeryüzünün neredeyse her yerinde bulunan Aspergilluslar toprakta ve özellikle çürüten organik maddeler üzerinde yayılım gösterirler. Çok düşük nem düzeylerinde gelişemeyen birçok mikroorganizmanın aksine Aspergilluslar rahatlıkla gelişebilmektedirler. Depolanmış tahıl ve tohumlar, unlar, deri ve tekstil ürünleri, orman, ev, endüstriyel ve tarım atıkları üreme gösterdiği materyaller arasında yer almaktadır. Bu kadar geniş yayılım alanına sahip Aspergillus cinsi 185'in üzerinde türe sahiptir (Borsa ve ark., 2015). Koloni renkleri gelişim koşullarına ve türüne göre farklılık göstermektedir. Çok çekirdekli hiflere sahip olan Aspergilluslar bölmeli, ince veya kalın hifli olabilmektedirler. Ayrıca miselyumlarından birçok enzim üretme yeteneğine de sahiptirler. Bu enzimler arasında endüstrinin birçok alanında kullanılan enzimler yer almaktadır. Ürettikleri ksilanaz ve selüloz gibi ekonomik değeri yüksek endüstriyel enzimler sayesinde Aspergillus türlerinin değeri artmaktadır (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003). Aspergillus türlerinden biri olan *Aspergillus terreus*, Aspergillus cinsi, Nidulantes alt cinsine ait ve morfolojik yöntemler kullanılarak laboratuvarında tespit edilebilen, çöl toprağı, mera ve kompost yığınları yanı sıra depolanan mısır, arpa ve fıstık kontaminasyonlarından izole edilebilen, aynı zamanda insanlarda invazif enfeksiyonlara neden olabilen bir toprak saprofitidir. Ayrıca endüstriyel alanda *A. terreus* lovastatin, antihiperkolesterolemik ilaçlar gibi ekonomik olarak önemli olan çeşitli sekonder metabolitleri ürettiğinden bu alanda kullanımı olan bir tür olarak bilinmektedir. Bu türün üyeleri kolonyal morfolojilerinde çeşitlilik göstermektedir. Koloniler parlak turuncudan çeşitli tarçın kahverengi tonlarındaki kolonilere kadar farklı farklı renk çeşitliliği göstererek büyüebilir. Agar üzerinde, *A. terreus*, ağırlıklı sporlanan kolonilerden, kabarık, yetersiz sporlanan fenotiplere kadar çok değişik koloni görünüşleriyle hızla büyüebilmektedir (Balajee, 2009).

Canlı hücreler tarafından sentezlenen enzimler, hücre dışında da etkinlik gösterebilen ve biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen, protein yapıda moleküllerdir. RNA'nın katalitik özelliğine sahip olan küçük bir grubu hariç bütün enzimler protein yapıdadır. Enzimler spesifik olup sadece indüklenmiş uyum içerisindeki substratlara etki edebilirler. Yaşamın devamlılığı için canlının bünyesindeki reaksiyonları enzimler düzenlenmektedir. Olağanüstü katalitik aktiviteye sahip olan enzimler canlının yaşamını sürdürebilmesi için olmazsa olmazları arasındadır. Örnek olarak karbonik anhidraz C

enzimi dakikada 36 milyon moleküle etki ederek ürüne dönüştürebilmektedir. Enzimler substratlarının ancak belirli bir kısmına etki ederek o bölgeden bir veya birkaç atomu veya fonksiyonel bir grubu koparmakta veya eklemektedirler (Anonim, 2015a).

Geçmişten günümüze çok fazla enzim tanımlanmış olmasına rağmen bunlardan belli bir kısmı ticari olarak kullanıma uygun bulunmuştur. Ancak uygun olduğu düşünülen enzimlerin yaklaşık 18 tanesi endüstriyel amaçla üretilmektedir çünkü endüstriyel alanda faydalı olan ve ticari amaçla kullanılan enzimlerin bazı avantajlara sahip olması gerekir. Bu avantajlar; işlem maliyeti bakımından ucuz olması, fiziksel ve kimyasal koşullara bağlı kalmadan en yüksek düzeyde aktivite göstermesi, durabilitesinin (dayanıklılık) yüksek olması, farklı alanlarda kullanılabilmesi, allerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması yani güvenilir olması gerekir (Saltık, 2014).

Endüstrinin neredeyse her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizma kaynaklıdır. Bunun sebebi mikroorganizma kökenli enzimlerin, bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürünleri oluşturmamaları, daha ucuz olmaları, ekstrem koşullarda aktivite gösterebilmeleri ve çok miktarda üretilibilmeleridir. Yüksek yapılı bitkiler vakuollerinde enzim inhibitör benzeri toksik karakterli maddeleri depoladıkları bilinmektedir. Bitkilerden enzim elde edilmesi sırasında vakuollerinde depoladıkları maddeler ürüne karıştıkları için, bitki enzimleri, endüstride enzim kaynağı olarak tercih edilmemektedirler. Dünya genelinde mikrobiyal enzimlerin yüzdelik dağılımları, farmasötik enzimler % 10, toplam proteaz % 46, tripsin % 3, lipaz % 3, amilaz % 18, karbonhidrat parçalayan enzimler % 10 (selülaz ve ksilanaz vs) olarak belirlenmiştir. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanları ise gıdadan tekstile, ekmekten deterjana, içecek üretiminden saflaştırılmasına, yenilenebilir enerji kaynaklarından alkol üretimine, kimya endüstrisinden belki de en önemlisi farklı tekniklerle hastalıkların tedavisinde kullanımı gibi neredeyse tüm alanlara yayılmıştır. (Aygan, 2008).

Özellikle ekmek yapımında enzimler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekmek çeşidine, ekmek yapım yöntemine ve un kalitesine bağlı olarak çeşitli enzimlerin tek tek veya birlikte kullanılması ile ekmeğin bazı özelliklerini iyileştirdiği görülmüştür. Ekmek yapımında kullanılan enzimlerden birisi de ksilanaz'dır. Ksilanaz enzimi, hemiselüloz molekülüne etki ederek hamurun kalitesini yükseltmeleridir (Güner ve Dağlıoğlu, 2008). Ayrıca son yıllarda özellikle selülozdan biyoetanol üretimi en fazla çalışılan konular arasında yer almaktadır. Lignoselülozdan tamamen oligosakkaritlere

dönüşümünün sağlanmasında endoglukanaz ve ksilanaz enzimlerinin birlikte kullanılmasının başarı oranını yükselttiği görülmüştür. Bu alanın giderek önem kazanması selülozu ve hemiselülozu kısa sürede hidrolize edecek enzimlere olan ihtiyacı arttırmaktadır. Ksilanazın diğer ve en önemli kullanım alanı ise kağıt endüstrisidir. Kağıt endüstrisinde normal süreçte hemiselülozdan ligninin uzaklaştırılması için NaOH çözeltisinde yaklaşık 170°C'lik sıcaklıkla iki saat parçalamak gerekmektedir. Buna rağmen molekülden lignin tamamen ayrılmamakta ve kalan lignin kalıntıları nedeni ile elde edilen kağıdın rengi kahverengi görülmektedir. Bu nedenle birçok kimyasal işlem uygulanarak renk giderme işlemi gerçekleştirilir. Beyazlatma işlemlerinde klor da kullanılmakta fakat ligninin tamamen uzaklaştırılmasının mümkün olmadığı bilinmektedir. Klor uygulamasına alternatif olarak son yıllarda ksilanaz enzimi kullanımı hızla yaygınlaşmıştır. Günümüzde özellikle çevreyi koruma amacıyla kağıt endüstrisinde ksilanaz uygulanarak kimyasal kirliliğin önüne geçilmeye çalışılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ksilanaz enzim kullanımıyla toksik organik klorlu bileşiklerin (dioxin gibi) kağıt endüstrisindeki tüketimi azalmış, selüloza zarar vermediği için uygulamada daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Enzimin hidroliz ürünleri arasında yoğun şekilde ksiloz, uzun zincirli ksilo-oligosakkarit ürünleri açığa çıkmaktadır. Oluşan bu ürünler enzimin besin endüstrisinde prebiyotik üretimi için son derece uygun olmasıyla da dikkatleri üzerine çekmeyi başarmıştır. Ksilanaz enzimi meyve suyu üretiminde selülaz ve pektinaz enzimi kullanılmadan tek başına berraklaştırma özelliğinde olup, etkin şekilde kullanılabilir. Ayrıca gıda (unlu mamuller) ve içecek (meyve suyu, kahve), et tavukçuluğunda (yem verimini arttırmak amacıyla, besin katkı maddesi), yem sanayinde (silaj etkinliğini arttırmada) ve biyoteknolojide (protoplast oluşumu, tek hücre protein üretimi, düşük kalorili tatlandırıcılar ve sıvı yakıt üretimi gibi) önemli bir yere sahiptir (Aygan, 2008).

Ksilanaz enzim üretimi üzerinde yapılan çalışmalarda genel olarak sıvı kültür fermentasyon yöntemi kullanılırken, günümüzde katı kültür fermentasyon yönteminin kullanımında da önemli bir artış söz konusudur. Katı kültür fermentasyonu (KKF), birçok araştırmacı tarafından tanımlanmaktadır. Bu tanımlamaların hepsi, bünyesinde yok denecek kadar az sıvıya sahip katı maddelerle ilgili olduğu konusunda aynı fikirdelerdir (Demir ve Tarı, 2014). Verimi yüksek, maliyeti düşük, basit alet ekipman kullanımı ve saflaştırmanın kolay olması katı kültür kullanımının batık kültür

kullanımından üstün kılmaktadır. Ayrıca çok az bir ekonomik değeri olan tarımsal materyaller ve endüstriyel atıklar katı ortamda kullanılarak yüksek ticari değere sahip olan organik asit, protein ve çeşitli enzimlerin üretilmesine olanak sağlamaktadır (Üstok ve ark., 2006).

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Lignoselülozik Yapılar

Ülkemiz yaklaşık 26.350 milyon hektarlık bir tarım alanına sahiptir. Önemli ulusal geliri sağlayan ekonomik kaynağımız tarım sektörüdür. Bu sektörde ise endüstriyel bitkiler büyük ilgi odağı olmuştur. Böylece büyük miktarda üretilen bu bitkilerin atıklarında çok fazladır ve bunların çoğu hasat edildiği yerlerde bırakılmaktadır. Türkiyedeki endüstriyel bitkiler ve atık miktarları Çizelge 2.1. verilmiştir. Çizelgedeki verilere göre en fazla atık buğday ve arpa sapıdır daha sonra mısır ve pamuk atıkları takip etmektedir. Ancak mısır ve pamuk atıklarının yenilenebilir olarak kullanılabilir olduğu için buğday ve arpa atıklarına göre 4 kat daha fazladır. Bunun nedeni buğday ve arpa atıklarının hayvan yemi olarak da kullanılmasıdır. (Kocabaş, 2010). Bu nedenle tarım ve orman endüstrisinden yılda yaklaşık 40 milyon ton lignoselüloz atık meydana gelmektedir. Oluşan bu lignoselülozik atıkların küresel karbon döngünün gerçekleştirilebilmesi için ayrıştırılması gerekmektedir (Özben, 2014).Doğadaki karbonun ana deposu olan bitki hücre duvarları üç temel polimerik bileşene sahiptir. Hücre duvarını oluşturan ve hücreye sertlik veren lignoselülozik yapı; selüloz, hemiselüloz, lignin ve diğer (protein, çözünen şeker, mineraller gibi) küçük bileşenlerinden oluşmaktadır. Lignoselülozun iki temel bileşeni olan selüloz ve hemiselüloz fotosentezle oluşturulmaktadır. Bu iki karbonhidrat molekülü kovalent çapraz bağlar aracılığıyla karbonhidrat olmayan lignin molekülü bağlanır (Şekil 2.1.) (Özben., 2014). Bununla beraber hücre duvarındaki bu bileşenlerin oranı büyüme mevsimi boyunca değişiklik gösterir. Bu değişikliğin nedenleri ise bitkinin doku tipine, yaşına, türlerine ve tür içi farklı dokulara sahip olmasına bağlıdır. Sert odunlardaki selüloz ve hemiselüloz oranları yumuşak odunlardan daha yüksektir. Yumuşak odundaki lignin içeriği ise sert odundan daha yüksektir. Otlar odunsu bitkilere oranla

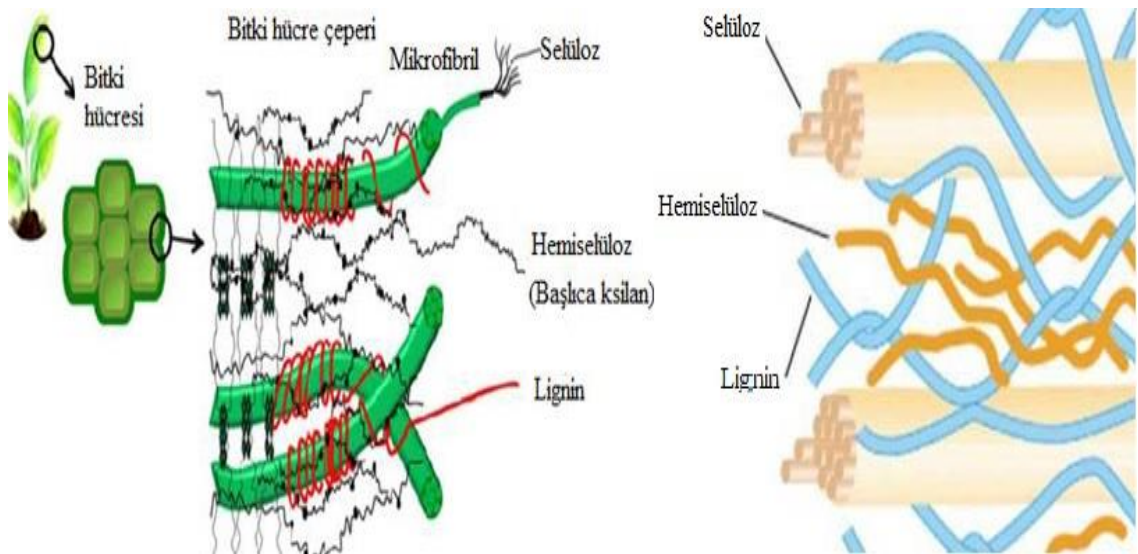
hemiselüloz bakımından zengin (% 25-50), lignin (% 10-30) ve selüloz (% 25-40) bakımından ise daha fakirdir (Çizelge 2.1.) (Güder, 2014).

Çizelge 2.1. Türkiye'de toplam ekin üretimleri ve atık miktarları (Kocabaş, 2010)

Ekin	Atık Tipi	Üretim (ton)	Toplam Atık (ton)		Kullanılabilir Atık (ton)	Kullanılabilirlik (%)
			Teorik	Gerçekleşen		
Buğday	Saman	22.439.042	29.170.755	23.429.907	3.514.486	15
Arpa	Saman	8.327.457	9.992.98	8.963.012	1.344.452	15
Mısır	Sap	2.209.601	5.911.902	4.970.259	2.982.155	60
	Koçan		596.592	1.907.307	1.144.384	60
Pamuk	Sap	2.292.988	6,317,181	2.520.281	1.512.169	60
Ayçiçeği	Sap	836.269	2.341.554	2.259.121	1.355.472	60

Çizelge 2.1. Farklı lignoselülozik yapılardaki bileşenlerin oranı (Güder, 2014)

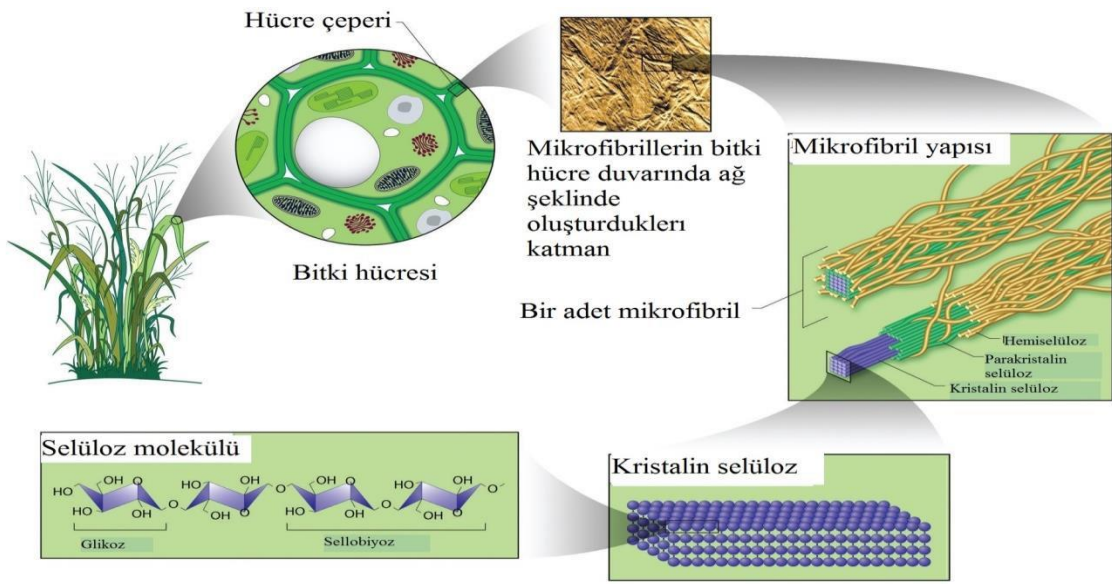
Materyal	Lignin (%)	Selüloz (%)	Hemiselüloz (%)
Yumuşak	25-35	45-50	25-35
Sert odun	18-25	45-55	24-40



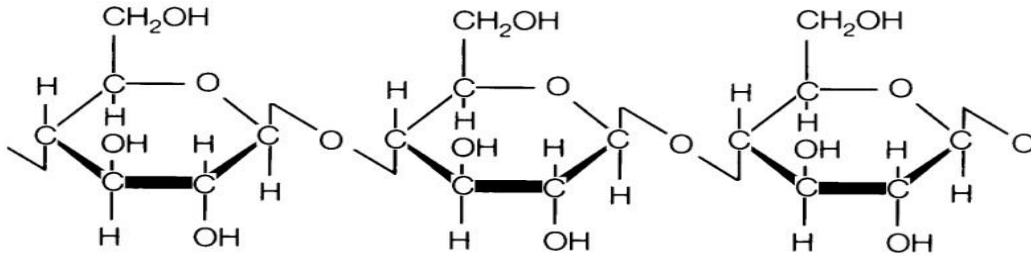
Şekil 2.1. Genel lignoselülozik yapılar (Özben, 2014; Kocabaş, 2010)

2.1.1. Selüloz

Bitki hücrelerinde bulunan hücre duvarının temel bileşenini oluşturan selüloz, glikoz moleküllerinin β -1,4-glikozidik bağlarla bağlanarak meydana getirdiği bir polisakkarittir (Şekil 2.2.). Selüloz zincirleri, lifli yapıyı oluşturmak için, mikrofibriller üzerine kümelenmiştir (Şekil 2.3.) (Ratanakhanokchai ve ark., 2013). Selüloz bitkilerde destek görevinin yanında ototrof canlıların besin kaynağını oluşturmaktadır. Ayrıca kağıt ve tekstil endüstrisinde de çok fazla kullanılmaktadır (Kulkarni ve ark., 1999).



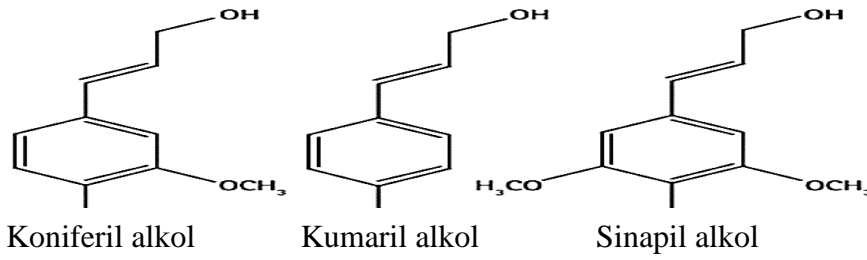
Şekil 2.2. Selülozun genel yapısı (Özben, 2014)



Şekil 2.3. Selülozun moleküler yapısı (Kocabaş, 2010)

2.1.2. Lignin

Hücre duvarının bir diğer bileşeni de lignindir. Bitkiye sertlik ve su geçirmezlik özelliğini veren, doğada selüloz ve hemiselülozdan sonra en fazla bulunan polimerlerden birisidir. Ligninler 4-O-metil-D glukuronik asit ester bağlarıyla ksilana bağlanmaktadır (Ratanakhanokchai ve ark., 2013; Subramaniyan, 2002). Üç farklı fenilpropan birimlerini (p-kumaril, koniferil ve sinapil alkol) içeren amorf yapıda bir heteropolimerdir (Şekil 2.4.) (Güder, 2014).

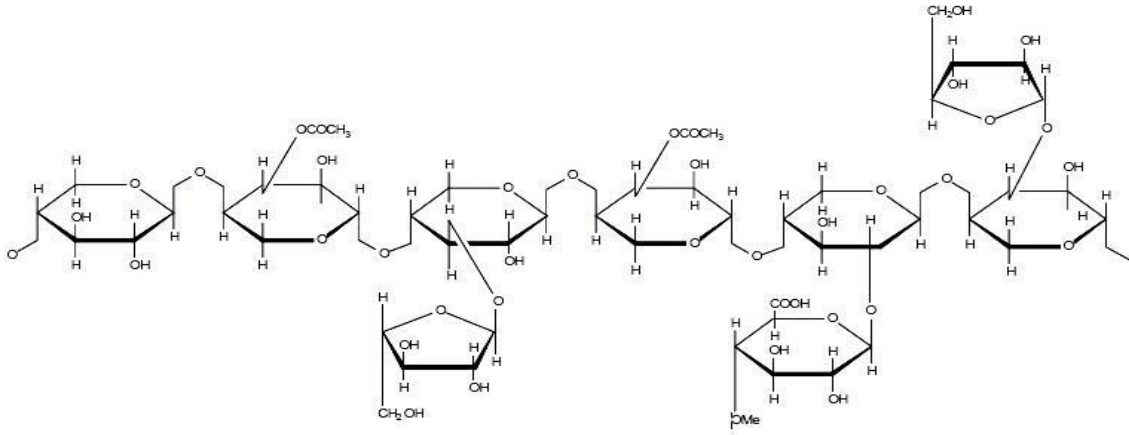


Şekil 2.4. Ligninin yapısında bulunan fenilpropan birimleri (Kocabaş, 2010)

2.1.3. Hemiselüloz

Hemiselüloz, tek ve çok yıllık bitkilerin hücre duvarında selüloz ve ligninle beraber bulunan dallı bir heteropolisakkarittir. Hemiselülozlar, doğadaki toplam biyokütlenin % 30-35'ini oluşturmaktadır. Ayrıca ksilan, hemiselülozun yapısını oluşturan en büyük bileşenidir (Kulkarni ve ark., 1999). Hemiselülozun temel bileşeni ksilan olmakla birlikte, mannan, galaktan ve arabinanları da içeren bir heteropolimerden meydana gelmektedir. Yapısında bu heteropolimerlerle bağlı bulunan, D-ksiloz, D-mannoz, D-galaktoz ve L-arabinoz gibi şeker birimleri de yer almaktadır (Şekil 2.5.). Dolayısıyla şeker asitleri, mannoz, glikoz, galaktoz gibi heksozlar ile ksiloz ve arabinoz gibi pentozlardan oluşan farklı polimerik yapılara sahip kompleks bir karbonhidrattır. Sert odun ve tarımsal bitkilerden (ot ve saman gibi) elde edilen hemiselülozun temel yapısını ksilan oluşturmaktadır. Yumuşak odunda ise bu bileşeni glukomannan oluşturmaktadır. Hemiselüloz, selülozdan daha düşük bir molekül ağırlığında, farklı şekerlerden oluşan, kısa yan zincirler şeklinde dallanmaya sahip kolay hidroliz olabilen bir polimerdir. Selülozun tersine kimyasal açıdan homojen bir yapı göstermemektedir. Hemiselüloz, lignin ve selüloz fibrilleri arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır. Selüloz, hemiselüloz ve

lignin bütünlüğüne daha fazla sertlik kazandırmaktadır. Farklı hemiselüloz bileşenlerin çözünürlüğü sırasıyla mannoz, ksiloz, glikoz, arabinoz ve galaktoz olarak azalmaktadır. Sıcaklık artışıyla hemiselülozun çözünürlüğü ise artmaktadır. Dallanma tekrarı ksilanın kaynağına bağlıdır. Değişik kaynaklardaki ksilanların kompozisyonları farklılık göstermektedir. Örneğin: huş ağacı ksilanı % 89,3 ksiloz, % 1 arabinoz, % 1,4 glikoz, % 8,3 anhidrouronik asit içermektedir. Pirinç kepeği ksilanı % 46 ksiloz, % 44,9 arabinoz, % 6,1 galaktoz, % 1,9 glukoz, % 1,1 anhidrouronik asit içerirken, buğday arabinoksilanı % 65,8 ksiloz, % 33,5 arabinoz, % 0,1 mannoz, % 0,1 galaktoz, % 0,3 glikoz içermektedir. Mısır lifi ksilanı β -1,4 bağı ile bağlı ksiloz birimlerinden oluşmuş karmaşık yapıdaki heteroksilanlardan biridir ve % 48-54 ksiloz, % 33-35 arabinoz, % 5-11 galaktoz, % 3-6 glukouronik asit bileşimine sahiptir (Güder, 2014).

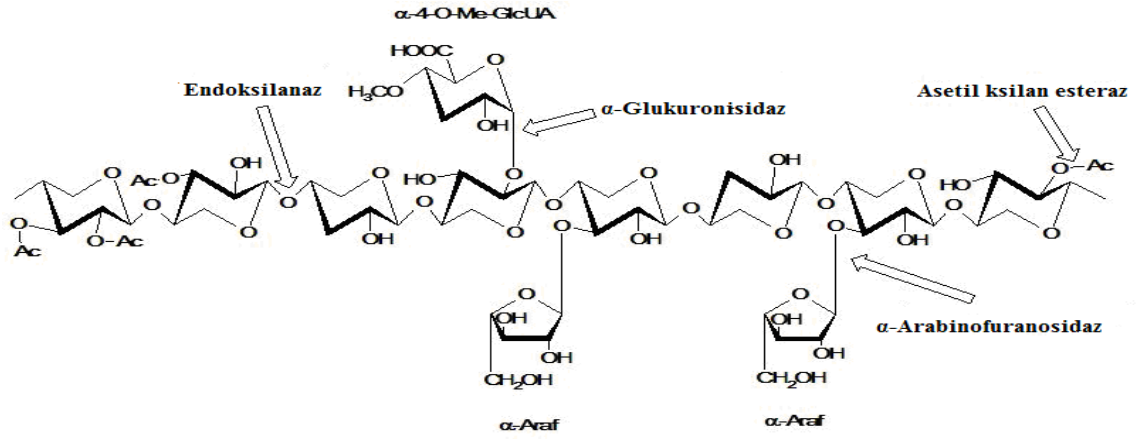


Şekil 2.5. Hemiselülozun yapısı (Özben, 2014)

2.3.1.1. Ksilan

Esas olarak β -1,4 bağı D-ksilopiranoz ünitelerinden oluşan ksilanlar çoğunlukla zincir yapıda farklı gruplar içermekle beraber dallanmış polimerik heteropolisakkaritlerdir (Beg ve ark., 2001). Ksilan, ksilanaz enzimleri ile ksiloz başta olmak üzere diğer oligosakkaritlere parçalanırlar (Aygan, 2008). Hemiselülozun ana bileşenini oluşturan ve bitki hücrelerinin selülozdan sonraki en büyük yapısal polisakkaritidir. Ayrıca ksilanaz enzimlerinin substratıdır. Ksilan doğada en çok bulunan ikinci polisakkarit olup dünyada yenilenebilir karbonun üçte birini oluşturmaktadır (Collins ve ark, 2005). Ayrıca yüksek yapılı bitkilerin hücre duvarındaki hemiselülozik kısmın temel bileşeni olup yüksek potansiyelde kullanışlı son ürünlere parçalanabilen ikinci en büyük kaynaktır (Karaköse ve Esen, 2011). Hücre duvarının ikincil halkasında bulunan ksilan,

fenolik lignin kalıntıları ve diğer polisakkaritlere (glukan, pektin gibi) kovalent bağlanmaktadır. Ksilan molekülü, az miktarda L-arabinoz ve genel olarak da D-ksiloz monomerik biriminden oluşmaktadır (Dhiman ve ark., 2008). Ksilan omurgasını oluşturan temel yapıya bağlı gruplardan en yaygın olanları asetil, arabinozil, galaktozil ve glukuronozil gruplarıdır (Şekil 2.6.) (İnce, 2006).



Şekil 2.6. Ksilanın yapısı ve ksilanaz enzimlerinin etki bölgeleri (Motta ve ark., 2014)

Selüloz, hemiselüloz ve ligninin genel özellikleri ve bu özellikler arasındaki farklılıkları bir arada göstermek için Çizelge 2.3. hazırlanmıştır. Çizelge incelendiğinde selüloz ve hemiselülozun polisakkarit, ligninin ise heteropolimer yapıda olduğu, selülozun tek şeker grubundan ve bu şeker grubunun ise glikoz olduğu, hemiselülozun farklı şeker gruplarından meydana geldiği verilmiştir. Monomerler arasında glikozidik bağlar olduğu gösterilmiştir. Ligninin ise farklı alkol gruplarının ester bağlarıyla bağlanarak meydana geldiği verilmiştir. Selülozun yapısında dallanmanın olmadığını bunun aksine hemiselüloz ve ligninin yapısında dallanmaların olduğu verilmiştir. Doğada polimerlerin bulunma sırasına bakıldığında ise selüloz ilk, hemiselüloz ikinci ve ligninin üçüncü sırada olduğu gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Lignoselülozik yapılar, genel özellikleri ve bu özelliklerin farklılıkları

Yapı Birimleri	Lignoselülozik Yapılar						Lignin	
	Selüloz	Hemiselüloz				Galaktan		Arabinan
		Ksilan						
	Glikoz	Ksiloz	Arabinoz	Uronik Asit	6 C'lu Monomerler		Kumaril Alkol Koniferil Alkol Sinapil Alkol	
Bağ	Glikozidik	Glikozidik					Ester	
Dallanma Durumu	Yok	Var					Var	
Doğada Polimerlerinin Bulunma Sırası	1. Sırada	2. Sırada					3. Sırada	
Polimer Yapı	Polisakkarit	Heteropolisakkarit					Heteropolimerik	

2.2. Enzimler ve İsimlendirilmesi

Enzimler girdiği tepkimelerde denge konumunu ve denge sabitini değiştirmeden, aktivasyon enerjisini düşürerek kısa sürede tepkimenin gerçekleşmesini sağlamaktadırlar (Wilson ve Walker, 2010). Başka bir deyişle enzimler canlı organizmalar tarafından sentezlenen, yan ürün oluşturmadan biyokimyasal tepkimeleri katalizleyerek % 100 ürün verimi sağlayan genel olarak protein yapıdaki moleküllerdir. Hücre içi koşullar sağlandığında, laboratuvar koşullarında da tepkime gösterebilmektedirler. Normalde laboratuvar koşullarında gerçekleşmesi uzun süren bazen de yüksek basınç, sıcaklık, asidik ve bazik ortam gerektiren tepkimeler enzimler sayesinde çok kısa sürede gerçekleşebilmektedir. Hücre içerisinde binlerce tepkimenin hızını düzenleyen enzimler özgün moleküllerdir (Kıran, 2006). Ayrıca birden fazla gruptan oluşmaktadırlar. Enzimin tamamına holoenzim denir. Holoenzim iki ana kısımdan oluşmaktadır. Protein yapıda olan apoenzim ve protein yapıda olmayan, metal iyonlarından oluşan kofaktör ile organik molekül kompleksinden oluşan koenzim kısmıdır. Kalsiyum, magnezyum, potasyum ve çinko gibi mineraller kofaktör olarak bazı enzimlerin aktiviteleri için şarttır (Yıldırım ve ark., 2010). Her enzimin farklı yapıda aktif bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgelere spesifik olarak bağlanabilen maddelere substrat denir. Aktif bölge ise belirli aminoasitlerin oluşturduğu fonksiyonel yan grup taşıyan substratı ürüne dönüştürmek için bağlanan ve enzimin katalitik potansiyelinde görevli bölgesidir (Nelson ve Cox, 2005).

2.3. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Ksilanazlar

Çoğu enzimler substratlarının sonuna –az ekini alarak (lipaz, üreaz, fosfataz, maltaz, amilaz, ksilanaz vb.) ve genel adlarıyla (pepsin, tripsin) da isimlendirilebilmektedirler (Yıldırım ve ark., 2010). Ayrıca Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından enzimlerin aktivite gösterdiği kimyasal tepkimenin tipine göre sistematik olarak isimlendirilirler. Bu isimlendirme dört sayılı bir kod numarası ve başında enzim komisyonundaki baş harflerini temsil eden (Enzim Komisyon (EC)) eki konularak isimlendirilmektedir. Örneğin ekzo β -1,4-D ksilosidaz enzimi (EC 3.2.1.37) (Wilson ve Walker, 2010). Enzim komisyonu raporuna göre enzimler katalizledikleri reaksiyona göre 6 ana gruba ayrılır ve kod numaraları ile tanımlanırlar. E.C. (Enzim Komisyon) ön eki ile başlayan numaralar noktalarla birbirinden ayrılmış 4 temel ögeyi ifade etmektedirler.

1. İlk rakam, enzimin altı sınıftan hangisine ait olduğunu belirtir
 2. İkincisi, enzimin alt sınıfını (Subclass) ifade eder
 3. Üçüncü rakam, ikinci alt grubu (Sub-Subclass)
 4. Dördüncü rakam ise enzimin sub-subclass içindeki seri numarasını ifade eder.
- Örneğin E.C. 3.2.1.1 fungal alfa-amilaz enziminin kod numarası ile ifade edilmesidir. Bu sisteme göre ilk rakamın ifade ettiği sınıflar kısaca aşağıdaki gibidir.

E.C.1. Oksidoredüktazlar : Oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarında

E.C.2. Transferazlar : Grup transferlerinde

E.C.3. Hidrolazlar : Hidrolitik reaksiyonlarda

E.C.4. Liyazlar : Çift bağlara grup ekleme veya grup ayırmada

E.C.5. İzomerazlar : İzomerizasyon reaksiyonlarında

E.C.6. Ligazlar : ATP'nin parçalanmasıyla bağ yapan enzimlerdir ya da diğer fosfatlardan yararlanarak bunlardaki pirofosfat bağının parçalanması sonucu iki molekül arasındaki yeni bağların meydana gelmesini sağlayan enzim gruplarıdır (Aygan, 2008).

2.3.1. Ksilanazlar

Ksilanaz, hemiselülozun ana bileşeni olan ksilanın hidrolizinde görevli olan enzimdir. Ancak kompleks moleküler yapıya sahip olan ksilanın tamamen ksiloza dönüşümünü sağlamak için farklı enzim grupları gerekmektedir. β -1,4-Endoksilanaz, β -1,4-Ksilozidaz, α -L-Arabinofuranozidaz, α -Glukuronidaz, Asetil Ksilan Esteraz ve Fenolik

Asit (Ferulik ve p-Kumarik asit) Esteraz gibi enzimlerin bulunduğu ksilani parçalayan sisteme ksilanolitik enzim sistemi denir (Subramaniyan ve Prema, 2000).

1.E.C.3.2.1.8: Ksilan iskeletindeki iç glikozid bağları rast gele kıran β -1,4-endoksilanazlar

2.E.C.3.2.1.37: Ksilooligosakkaritleri indirgen olmayan uçlarından kıran β -D-ksilosidazlar

3.E.C.3.2.1.55: Ksilandaki arabinoz yan zincirlerini hidrolize eden α -L-arabinofuranosidazlar

4. E.C.3.1.1.72: Asetat gruplarını serbestleştiren asetil-ksilan esterazlar

5. E.C. 3.1.1.73: Ferulik asit esterazlar

6.E.C.3.2.1.139: Ksiloz gruplarından glukuronik asit yan zincirlerini ayıran α -D-glukuronidazlar

7. p-kumarik asit esterazlar (E.C. 3.1.1.-)

8. Ekzo- β -1,4-ksilanazlar (α -1,4-D-ksilan ksilohidrolazlar) (İnce, 2006).

Endoksilanazlar mikroorganizma ve bitkisel kaynaklı olabilmektedirler. Buna bağlı olarak bitkisel kaynaklı endoksilanazların meyve olgunlaşma dönemi sonlarına doğru üretildikleri belirlenmiştir. Bazı yüksek yapılı hayvanlarında ksilanaz üretebildiği saptanmıştır. Ekzo-1,4- β -D Ksilosidaz enzimi (EC 3.2.1.37) indirgen olmayan uçtan D-ksiloz birimlerini kopararak 1,4- β -D-ksilo-oligosakkarit hidrolizini katalizler. Ksilanın hidrolizi sırasında ksilozun koparılmasını sağlayan endoksilanazların, β -ksilosidaz tarafından kolayca hidrolize edilebilen ksilobioza (Xylobiose) karşı aktiviteleri yoktur. α -Arabinofuranosidazlar (EC 3.2.1.55), arabinanların, arabinoksilanların ve arabinogalaktanların indirgenmeyen α -L-Arabinofuranosil ucunu hidrolize ederler (Subramaniyan ve Prema, 2000).

2.3.1.1. Ksilanaz üreten mikroorganizmalar

Ksilanın hidrolizinden sorumlu olan enzim ksilanaz gruplarıdır. Bu enzim ancak hemiselulozun büyük bir kısmını oluşturan ksilanın varlığında ve bu ortamlarda çoğalan mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Bakteriler, mayalar, filamentli küfler gibi pek çok mikroorganizma, ksilanın kolayca hidrolize olmasını sağlayan β -1,4-endoksilanaz ve β -1,4-ksilosidazı üretmektedir (Kanwar ve Devi, 2012; Juturu ve Wu, 2012). Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin daha çok tercih nedenleri; yüksek aktivite,

düşük maliyet, stabilite, az yan ürün, yüksek oranda üretim ve istenilen saflığa sahip olmasıdır (Saltık, 2014).

Bakteriyel ksilanazlar, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında kararlılığını koruyabilme özelliğine sahiptir. Bu nedenle endüstride en çok tercih edilen enzim kaynakları ksilanazlardır. Benzer şekilde aktinomisetlerden izole edilen ksilanazlar, tepkime parametrelerinin geniş aralığında aktif durumda olmaktadır. Fungal ksilanazlar ise pH 4-6 arasında değişen asidik pH şartlarında kararlıdır. Bununla beraber, sayıca daha az olan bazı küf türlerinden üretilen ksilanazlar, yüksek alkali pH değerlerinde aktiftirler ve bunlar asidik fungal ksilanazlara göre verimleri daha azdır (Dhiman ve ark., 2008). Ksilanaz üreten bazı mikroorganizmalar Çizelge 2.4. de verilmektedir. Çizelge incelendiğinde küflerin daha fazla türü ksilanaz enzim ürettiği ifade edilmektedir. Bu küflerden birisi *Aspergillus terreus*'tur.



Şekil 2.7. *Aspergillus terreus*'un mikroskopik görüntüsü (Anonim, 2015b)

Şube: Mantarlar

Bölüm: Ascomycota

Sınıf: Eurotiomycetes

Takım: Eurotiales

Aile: Trichocomaceae

Cins: *Aspergillus*

Tür: *A. Terreus*

A. Terreus yukarıda verilen sistematığe sahiptir (Anonim, 2015b).

Çizelge 2.4. Ksilanaz üreten mikroorganizmalar (Kocabaş, 2010)

KÜF	BAKTERİ	MAYA
<i>Filamentous fungi</i> <i>Aeromanas sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>A. awamori</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. kawachii</i> <i>A. nidulans</i> <i>A. niger</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. terreus</i> <i>Chaetomium globosum</i> <i>Humicola insolens</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>P. purpurogenum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Rhizomucor pusillus</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Schizophyllum commune</i> <i>Trichoderma sp.</i> <i>T. harzianum</i> <i>T. koningii</i> <i>T. longibrachiatum</i> <i>T. reesei</i> <i>Thermomyces</i> <i>Lanuginosus</i>	<i>Aeromonas caviae</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>B. acidocaldarius</i> <i>B. circulans</i> <i>B. pumilus</i> <i>B. stearothermophilus</i> <i>B. subtilis</i> <i>Cellulomanas fimi</i> <i>Clostridium sp.</i> <i>C. acetobutylicum</i> <i>C. stercorarium</i> <i>Micrococcus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Thermoanaerobacterium sp.</i> <i>Thermotoga sp.</i> <i>T. maritima</i> <i>T. thermarum</i> Actinomycete <i>Streptomyces sp.</i> <i>S. thermoviolaceus</i> Archaea <i>Thermococcus zilligii</i> <i>Pyrodictium abyssii</i>	<i>Aureobasidium</i> <i>pullulans</i> <i>Pichia stipitis</i> <i>Trichosporon cutaneum</i>

2.3.1.2. Ksilanaz Enzimlerinin Özellikleri

Ksilanaz enzimlerinin özelliklerini aşağıdaki gibi 10 madde olarak sıralanabilir.

1. Ksilanazların, hem hidrolitik aktiviteden sorumlu olan katalitik bölümlerinin hem de substrat bağlama ve termal stabiliteden sorumlu olan katalitik etkisi bulunmayan bölümlerinin oldukları
2. Genel olarak, fungal orijinli ksilanazların asidik pH'da (pH 4-6), bakteri ve aktinomiset kaynaklı ksilanazların ise daha geniş bir pH aralığında (pH 5-9) etkili oldukları
3. Farklı kaynaklardan elde edilen endoksilanazlarının izoelektrik noktalarının pI 3-10 aralığında değiştiği
4. Fungal ksilanazların genellikle bakteriyel ksilanazlardan daha düşük ısı dirence sahip oldukları
5. Ksilanazların optimum sıcaklığının 35-60°C gibi çok geniş bir aralıkta değiştiği, bununla beraber, optimum sıcaklığın 70-90°C olan ksilanazların da bulunduğu
6. Ksilanazların çözünürlüğünün düşük amonyum sülfat konsantrasyonlarında sıcaklıkla birlikte arttığı

7. Çeşitli kaynaklardan sağlanan ksilanazların bileşimlerinde baskın olarak aspartik ve glutamik asitler, glisin, serin ve treonin bulunduğu
8. Ksilanaz ve β -ksilosidaz aktivitelerinin ksilooligosakkaritlerin zincir uzunluğuna bağlı olduğu; ksilanaz aktivitesinin azalan zincir uzunluklarıyla genel olarak azalırken, β -ksilosidaz aktivitesinin arttığı
9. Dallanma derecesi yüksek ksilozun, polisakkaritlerin ksilanaz aktivitesini genellikle engellediği
10. Ksilanaz çeşitliliğinin incelendiği çalışmalarda, molekül ağırlıkları ve pH değerleri arasında, sabit bir ilişki bulunması dikkat çekmiş; küçük molekül ağırlıklı ksilanazların bazik, büyük molekül ağırlıklıların ise asidik olduğu saptanmıştır (İnce, 2006).

2.3.1.3. Ksilanaz Enziminin Moleküler Yapısı

Aspergillus terreus'a ait ksilanaz enziminin moleküler yapısı incelendiğinde, tam uzunluktaki ksilanaz geni 326 aminoasit dizisi uzunluğunda proteini sentezleyen fungal glikozil hidrolaz aile 10 ait olarak tespit edilmiştir. Ksilanazların Aile 10 üyeleri çoğunlukla endo-ksilanazlardan oluşur ve yüksek bir moleküler ağırlığa (>30kDa) sahiptirler. Aile 11 ksilanaz üyeleri ise düşük molekül ağırlığından (<30kDa) oluşmaktadırlar (Chantasingh, 2006). Aşağıda *Aspergillus terreus* BCC129 suşunun Aile 10 üyelerine ve *Aspergillus terreus* Li-20 suşunun Aile 11 üyelerine ait ksilanaz enzimlerinin tam kodları verilmektedir.

Aspergillus terreus BCC129 suşunun ksilanaz aile 10 mRNA, tüm kodu;

```
ATGGTTCGTCTTACTGTTCTTGCAGGATTCCTTTTGACCTCAGCAGCATGCTCTGCTTGC GTAATTGGCG
AGCGCCAGGCGGCTTCGAGCATCAACAATGCCTTCAAAGCCAAAGGCAAGAAGTACTTTGGCACCTGTGG
TGACCAGGGCACGCTGTCCGACTCGACCAACTCGGCCATCGTCAAGGCCGATTTTGGACAGCTCACCCCG
GAAAACAGCATGAAGTGGGATGCGACTGAGCCGAATCGCGGTCAAGTTCAGCTTTGGTGGTGCTGATTACT
TGGTTAACTACGCCGCATCGAACGGCAAGATGATCCGCGGTCACTCTAGTGTGGCATTCCCAGCTTCC
GGGATGGGTCCAGGGCATCACGGACAAGAATACGTTGACCTCGGTCTTGAAGAACCACATCACCACCGTC
ATGCAGCGCTACAAAGGCAAGGTCTATGCATGGGACGTGGTGAATGAGATCTTCAACGAGGATGGCTCCT
TGCGAAAGAGTGTGTTCTACAACGTCCTCGGCGAGGACTTTGTCCGCATTGCCTTTGAGACCGCCCGGTC
GGTCGATCCCCAGGCTAAGCTCTACATCAATGATTACAACCTCGATAATGCCAACTACGCAAAGACCAAG
GGAATGGCCGATCATGTCCGCAAGTGGATCTCACAGGGTATTCCAATTGACGGAATCGGATCGCAGACCC
ATCTTGGTCTGGCGGATCCTGGACCGTTAAAGATGCCTTGAACACTCTTGCTTCCCTCCGGTGTCTTCTGA
AGTCGCCATTACCGAGCTCGACATTGCCGGTGCCAGCTCTACCGACTACGTGAACGTTGTCAACGCCTGC
CTGAGTGTCTCCAAATGTGTTGGAATTACTGTCTGGGGCGTTTCTGATAAGTACTCCTGGCGCTCGAACG
ACAAGCCTTTGTTGTTTGATAGCAACTTCCAGCCCAAGGCTGCTTACAACGCAATTATCTCCGCCTTGTA
A (Anonim, 2015c).
```

Aspergillus terreus Li-20 suşunun endo-beta-1,4-ksilanaz mRNA, tüm kodu;

ATGGTTTCGTCTTACTGTTCTTGCAGGATTCCCTTTTGACCTCAGCAGCATGCTCTGCTTGCGTGATTGGCG
AGCGCCAGGCGGCTGCGAGCATCAACAATGCCTTCAAAGCCAAAGGCAAGAAGTATTTTGGCACCTGTGG
TGACCAGGGCACGCTGTCCGACTCGACCAACTCGGCCATCGTCAAGGCCGATTTTGGACAGCTCACCCCG
GAAAACAACATGAAGTGGGATGCGACTGAGCCGAATCGCGGTCAAGTTCAGCTTTGGTGGTGCTGATTACT
TGGTTAACTACGCCACATCGAACGGCAAGATGATCCGTGGTCACACTCTAGTGTGGCATTCCCAGCTTCC
GGGATGGGTCCAGGGCATCACGGACAAGAATACGTTGACCTCGGTCTTGAAGAACCACATCACCACCGTC
ATGCAGCGCTACAAAGGCAAGATCTATGCATGGGACGTGGTGAATGAGATCTTCAACGAGGATGGCTCCT
TGCGAAAGAGTGTGTTCTACAACGTCCTCGGCGAGGACTTTGTCCGCATTGCCTTTGAGACCGCCCGGTC
GGTCGATCCCCAGGCTAAGCTCTACATCAATGATTACAACCTCGATAATGCCAACTGCGCAAAGACCAAG
GGAATGGCCGATCATGTCCGCGAGTGGATCTCACAGGGTATCCCAATTGACGGAATCGGATCCCAGACCC
ATCTTGGTTCCTGGCGGATCCTGGACCGTTAAAGATGCCTTGAACACTCTTGCTTCCCTCCGGTGTTCGGA
AGTCGCCATTACTGAGCTTGACATTGCTGGTGCCAGCTCTACTGACTACGTGAACGTTGTGAACGCCTGC
CTGAGTGTCTCAAATGTGTTGGAATTACTGTCTGGGGCGTTTCTGATAAGTACTCCTGGCGCTCGAACG
ACAAGCCTTTGTTGTTTGTATAGCAACTTCCAGCCCAAGGCTGCTTACAACGCAATTATCTCCGCCTTATA
A (Anonim, 2015d).

2.3.1.4. Ksilanazların Bazı Uygulama Alanları

Mikroorganizma kaynaklı ksilanolitik enzimler, endüstriyel işlemlerindeki biyoteknolojik potansiyellerinden dolayı büyük bir ilgi odağı haline gelmiştir. Ksilanazlar kağıt, kağıt hamuru, gıda ve hayvan yemi gibi endüstrilerde yoğun olarak kullanılmasından dolayı temel endüstriyel enzim olma yolunda önemlidir. Bu enzim türü, endüstride ekonomik değeri yüksek ürünlerin elde edilmesinde büyük bir öneme sahiptir (Beg ve ark, 2001). Ksilanaz enziminin kullanım alanları kısaca aşağıdaki gibi maddelenebilir.

1. Pektinolitik enzim sistemleriyle birlikte çalışan ksilanolitik enzim sistemleri, jüt ve kenevir gibi lif bitkilerinin reçine benzeri maddelerden ayrıştırılmasıdır. Ksilanaz-pektinaz kombinasyonu sayesinde odun işleme sektöründeki ilk basamak olan kabuktan ayırma işleminde kullanılabilir (Aygan, 2008).

2. Tavuk eti elde etmek için üretilen tavukların, kaynağı çavdar olan yemlerle beslenmesi kilo kaybına neden olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak da çavdar kaynaklı yemlerin bağırsak akışkanlığını artırma etkisine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu sektörde çavdar ile yapılan yemlere ksilanaz uygulanarak bağırsak viskozitesini düşürdüğü ve böylece yemden daha fazla yarar elde edildiği görülmüştür. Dolayısıyla kilo artışı sağlanmıştır.

3. Diğer bir uygulama alanı olan kağıt hamuru beyazlatma amacıyla kullanımıdır. Geleneksel beyazlatma ajanı olarak klor kullanılırken çevreye verdiği fazla zarardan ötürü bu kimyasalın kullanımını azaltmak ve kağıt hamurundan lignini ayırmak için

ksilanaz enzimi en güzel alternatif bir yol olmuştur. Enzim uygulaması kağıt hamurunun fibrilasyonunu ve su tutuşunu artırır, işlenmemiş kağıt hamurunda çırpma ya da dövme sayısını düşürür, hurda kağıt hamurunda bağları onarır, çözünen hamurdan ksilanın selektif giderimini sağlar. Ksilanazlardan ayrıca odun hamurunda biyobeyazlatma, sentetik ipek üretiminde ise hamurdan selüloz eldesinde faydalanılır (Beg ve ark., 2001).

4. Ksilanazların ekmek üretimine katkısı; tadı ve aroması, kabuk ve ekmek içi yapısı, tazeliği ve raf ömrü, ürün hacmini arttırmak gibi olumlu yönde etkileri sıralanabilir. Ayrıca enzimler sadece son ürünün kalitesini değil hamur işleme özelliğini de iyileştirirler (Güner, 2008). Ekmek hacminin kaliteye etkisini araştıran Maat ve arkadaşlarının 1992'de yaptığı çalışmada, ekmeğin hacmini arttırmak kalitesini yükselttiğini tesbit etmişlerdir.

5. Meyve sularının üretimi ve berraklaştırılması amacıyla pektinaz ve selüloz ile birlikte aynı anda ksilanaz da kullanılır. Ayrıca geviş getiren hayvanların beslenmesinde yem bitkilerin ön işlemlerinde ksilanaz kullanılarak yemlerin sindirimini kolaylaştırdığı ve dolayısıyla yemlerden daha yüksek oranda fayda sağlandığı görülmüştür (Gilbert ve Hazlewood, 1993).

6. Ksilanolitik enzim sistemindeki enzim grupları lignoselülozik materyallerden etanol gibi biyolojik yakıt üretimi sağlamaktadır. Karbonhidrat polimerlerinin ayrışmasını takiben lignin, hemiselüloz ve selülozun da ayrışarak etanol üretiminde kullanılacak serbest şekerlerin üretimi gerçekleştirilir. Sonuçta etanol üretimi için beş ve altı karbonlu şeker olan pentozlar ve heksozlardan oluşan karışım fermentasyon için kullanılır. İkinci nesil biyoyakıtlar lignoselülozik maddelerin dönüşümü sonucu oluşan temel ürünlerdir. Yenilenemeyen kaynak olan fosil yakıtlara, piyasa değeri açısından yüksek ve yenilenebilir bir yakıt olan etanol alternatif olarak tespit edilmiştir. Biyoetanol üretiminde ilk adım, lignoselülozik hammaddeden selüloz ve hemiselülozu serbest bırakmak için ligninin giderilmesini içerir. İkinci adımda ise, serbest şekerlerin oluşumu için karbonhidrat polimerinin yıkımı ve daha sonra etanol üretimi için beş ve altı karbonlu şekerlerin karışımı ile fermentasyon gerçekleştirilmektedir (Motta ve ark., 2013).

Özetle ksilanaz enziminin endüstriyel kullanım alanları aşağıdaki Çizelge 2.5.'te verilmiştir.

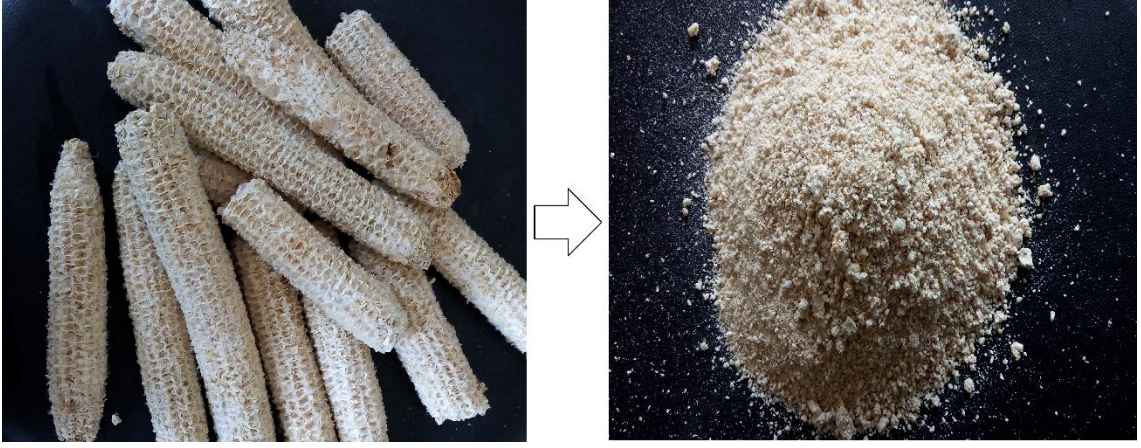
Çizelge 2.5. Ksilanazların potansiyel uygulama alanları (Saltık, 2014)

ENDÜSTRİSİ	UYGULAMA ALANI	FONKSİYONU
Tekstil	Jüt, kendir, keten ve rami işlenmesi	Enzimatik reaksiyonlar ile yüzey düzleştirimi
Hayvan beslemesi	Domuz, kümes hayvanları gibi geviş getirmeyen ve geviş getiren hayvan yemleri	Nişasta içermeyen polisakkaritlerin içeriğini azaltır, bağırsak akışkanlığını azaltarak hayvanın protein ve nişastadan maksimum faydalanmasını sağlar.
Kağıt ve kağıt hamuru üretimi	Kağıt hamuru ağartılması	Kağıt imalatı esnasında klorun ve toksik disakkaritlerin kullanımlarının azaltılması
	Biyolekelerin giderilmesi	Alkali özellikteki kimyasal maddelerin kullanımını azaltmak ve biyoleke çıkarılması süreçlerinin kolaylaştırmak
Fırıncılık ve ekmek	Hamur ve pastacılık ürünleri ve nişastadan gluten ayrıştırılması	Pasta hamuru akışkanlığının azaltılması ve gluten topaklanmasının artırılmasını sağlayarak ayrımı. Hamur esneklik ve dayanıklılığını artırır.
Meyve ve sebze işleme süreçleri, demleme, şarap imalatı	Meyve ve sebze suyu, nektar ve püre eldesi ile bitkisel yağ, şarap imalatı	Meyve suları akışkanlığını azaltıcı ve yumuşatıcı özelliği ile kaliteyi artırır.
Biyodönüşüm	Evsel, endüstriyel ve tarımsal atıkların çevreyi koruma amaçlı yapılan girişimlerin yanında bu atıklardan kullanılabilir ürünlerin üretimi	Çöp arıtımı, biyoetanol, biyolojik yakıt ve zararsız kimyasallar gibi fermente edilebilen ürünlerin üretimi

MATERYAL ve METOT

3.1. Materyaller

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma Aldrich (Almanya) ve Merck (Almanya) kimyasal şirketlerinden; lignoselülozik madde olarak mısır koçanı kullanılmış olup Adana ilinden temin edilmiştir. Mısır koçanları öğütülerek 2 mm çapındaki eleklerden geçirilmiştir (Şekil 3.1.). Öğütülen mısır koçanları çeşme suyuyla yıkanarak kurutma işleminden geçirilmiştir. Mısır koçanı % 35 hemiselüloz % 32 selüloz ve % 20 lignin içermektedir (Kocabaş, 2010).

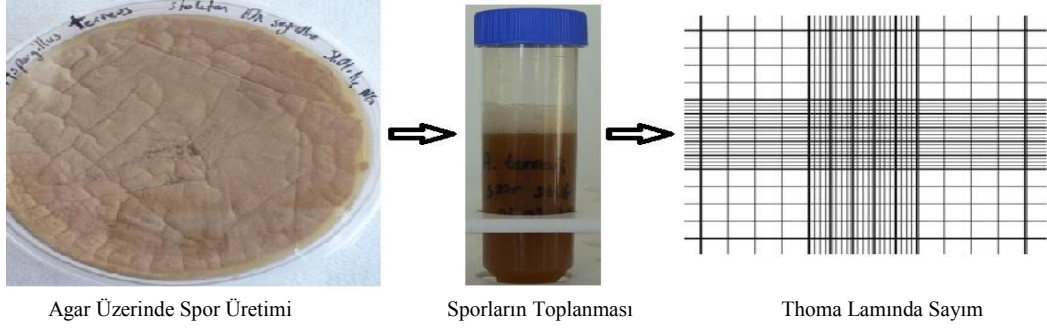


Şekil 3.1. Mısır koçanlarının öğütülmüş görüntüsü

3.2. Metodlar

3.2.1. Mikroorganizma ve Fermantasyonu

Çalışmalarda mezofilik bir küf olan *Aspergillus terreus* NRRL 1960 kullanılmıştır. Mikroorganizma yayma plak yöntemiyle Saboroz Dextroz Agar (Ek A, Çizelge A.1) ekimi yapılarak 35°C sıcaklıkta bir hafta boyunca, spor oluşturma kadar inkübe edilmiştir. Oluşan sporlar steril koşullarda uygun hacimde izotonik solüsyon (% 0,9 NaCl) ile toplanarak stoklanmıştır. Stoklardaki spor sayısının belirlenmesinde Thoma lamı ile mikroskopik sayım yöntemi kullanılmıştır. Sayım işlemi bittikten sonra +4°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2. Spor üretim ve sayım aşamaları

Sporların uyandırılması ve ana kültürlere aşılması için % 10 glikoz içeren ön kültür (Çizelge 3.2.) hazırlanmıştır. Spor stoklarından ön kültüre 10^7 spor/mL olacak şekilde ekilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde 24 saat süreyle 35°C ve 175 rpm çalkalama hızında inkübe edilmiştir. Süre sonunda ön kültürden ana kültürlere aşılama işlemi, setlerde verilen miktara göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Spor ekim aşamaları

Batık kültür fermantasyonu için son hacim 100 mL olacak şekilde ana kültüre (Çizelge 3.1.) uygun aşılama yapılmıştır. Kati kültür (Çizelge 3.1.) fermantasyonunda ise belirlenen miktarda aşılama yapılmıştır. Batık ve kati kültür fermantasyonu için ana kültür ortamında; 1000 mL hacimde; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,033; CSL (Corn Steep Liquor) 0,5 mL olarak sabit tutulmuştur (Çizelge 3.1.). CSL (Mısır şurubu); çözünür mısır, zengin vitamin, mineral, aminoasit ve diğer büyüme uyarıcıları içeren % 50 (a/a) vizkoziteye sahiptir (Anonim, 2015e). Batık kültürde çalışmanın amacına göre aşılama oranı 10-30 mL, KH_2PO_4

konsantrasyonu 0,2-0,8 g/L, NaCl konsantrasyonu 0,2-0,6 g/L, karbon kaynağı (mısır koçanı) 20-40 g/L, azot kaynağı (NH₄NO₃) ise 2-4 g/L aralıklarında değişen değerler kullanılmıştır. Katı kültürde ise aşılama oranı 1-3 mL; nem oranı [100*(g su/g substrat kuru ağırlık)] % 2-3; başlangıç pH değeri 5-9; karbon kaynağı (mısır koçanı) 20-40 g/L; azot kaynağı (NH₄NO₃) oranı (g NH₄NO₃ / g substrat kuru ağırlık) 0,2-0,6 aralıklarında değişen değerlerde kullanılmıştır. Mısır koçanı öğütülüp, 2 mm elekten geçirilerek ana kültürlerde karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Batık, katı ve ön kültür besiyeri içerikleri

Kimyasal	Ön Kültür Konsantrasyon (g/L)	Batık Ana Kültür Konsantrasyon (g/L)	Katı Ana Kültür Konsantrasyon (g/L)
Glikoz	25	-	-
Mısır Koçanı*		30	30
CSL(Mısır Şurubu)	0,5	0,5	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	5	5	5
NH ₄ NO ₃ *	2	3	4
NaCl*	0,4	0,4	0,4
ZnSO ₄ .H ₂ O	0,004	0,033	0,033
KH ₂ PO ₄ *	0,1	0,5	0,5
CaCl ₂ .H ₂ O	-	1	1
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	0,06	0,06

*Değişkenlerin "0" kodlu konsantrasyonları verilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları istatistiksel yöntemlerle analiz edilmiştir. Bunun için Tepki Yüzek Metodu (Response Surface Methodology) Box-Behnken (Box ve Behnken, 1960) deney tasarımı kullanılmış ve tepki olarak ksilanaz üretimi üzerinden analizler R-Studio program aracılığıyla yapılmıştır. Her bir kültür ortamı için denenen değişken sayısı aşağıda belirtildiği gibi 5'tir ve her bir değişken 3 seviyede denenmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Box-Behnken deney tasarım değerleri

	-1		0		+1	
	Batık	Katı	Batık	Katı	Batık	Katı
Karbon Kaynağı Miktarı	% 20	20 g	% 30	30 g	% 40	40 g
Aşı Miktarı	% 10	1 mL	% 20	2 mL	% 30	3 mL
Azot Kaynağı Miktarı	2 g/L	2 g/L	3 g/L	4 g/L	4 g/L	6 g/L
KH ₂ PO ₄ Konsantrasyonu	0,2 g/L	-	0,5 g/L	-	0,8 g/L	-
NaCl Konsantrasyonu	0,2 g/L	-	0,4 g/L	-	0,6 g/L	-
Nem Oranı	-	2	-	2,5	-	3
Başlangıç pH Değeri	-	5	-	7	-	9

3.2.2. Ksilanaz Üretimi için Kültür Ortamının Katı ve Batık Kültür Ortamlarında Optimizasyon Çalışmaları

Batık kültür için belirlenen değişkenler; karbon kaynağı konsantrasyonu, aşı miktarı, azot kaynağı, fosfat kaynağı ve tuz konsantrasyonudur. Box-Behnken deney tasarımında kullanılacak değerler Çizelge 3.3.'de verilmiştir. Bunun yanında katı kültür için belirlenen değişkenler; karbon kaynağı konsantrasyonu, nem miktarı, azot kaynağı konsantrasyonu, (pH) asit-baz konsantrasyonu, aşı miktarıdır ve tasarımda kullanılacak değerler Çizelge 3.5.'de verilmiştir. Her bir değişken için 3 seviye mevcuttur ve bu seviyeler “-1”, “0” ve “+1” olarak kodlanmıştır. Kodlama şu şekilde gerçekleştirildi: belirlenen değişkenin orta değeri “0” olarak seçilir ve kodlanır. Değişken için kullanılacak diğer parametreler eğer “0”dan az veya alt seviyede ise “-1” ve eğer “0”dan çok veya üst seviyede ise “+1” olarak kodlanır. Örneğin, azot kaynağı konsantrasyonu parametresi için belirlenen seviyeler 3, 4 ve 5 g/L'dir. Bu değerlerden 4 g/L “0” olarak kodlanır ve daha az miktarı ifade eden 3 g/L “-1” olurken, daha çok miktarı ifade eden 5 g/L “+1” olarak kodlanır. Bu kodlama sistemindeki “-1”, “0” ve “+1” kodları değişkenin seviyelerini gösterir.

Her bir kültür ortamının optimizasyonunda 5 farklı değişken ve bunların 3 seviyesi mevcut olduğundan Box-Behnken deney tasarımında 2 merkezli bir plan oluşturulduğunda her bir kültür için 42 setlik bir deney planı ortaya çıkmaktadır (Çizelge 3.4. ve Çizelge 3.6.).

Çizelge 3.3. Batık kültür fermantasyonu için Box-Behnken deney tasarım değişken ve seviyeleri

	Kodu	-1	0	1
Karbon kaynağı konsantrasyonu (g/L)	CS	20	30	40
Aşı oranı (mL)	IA	10	20	30
Azot kaynağı konsantrasyonu (g/L)	NS	2	3	4
Potasyum fosfat kaynağı konsantrasyonu (g/L)	KP	0,2	0,5	0,8
Tuz (NaCl) konsantrasyonu (g/L)	NA	0,2	0,4	0,6

Çizelge 3.4. Batık kültür için oluşturulan deney setleri (IA:Aşı miktarı, CS:Karbon, NS:Azot , KP:Potasyum Fosfat ve NA: Sodyum klorür konsantrasyonunu simgelemektedir)

Run.No	Std.No	CS	IA	NS	KP	NA
1	22	1	0	0	-1	0
2	24	1	0	0	1	0
3	17	0	-1	0	0	-1
4	7	-1	0	1	0	0
5	23	-1	0	0	1	0
6	1	-1	-1	0	0	0
7	33	0	-1	0	-1	0
8	38	0	0	1	0	-1
9	40	0	0	1	0	1
10	21	-1	0	0	-1	0
11	25	-1	0	0	0	-1
12	35	0	-1	0	1	0
13	20	0	1	0	0	1
14	41	0	0	0	0	0
15	8	1	0	1	0	0
16	4	1	1	0	0	0
17	36	0	1	0	1	0
18	32	0	1	1	0	0
19	31	0	-1	1	0	0
20	3	-1	1	0	0	0
21	34	0	1	0	-1	0
22	12	0	0	1	1	0
23	11	0	0	-1	1	0
24	13	0	0	0	-1	-1
25	14	0	0	0	1	-1
26	29	0	-1	-1	0	0
27	9	0	0	-1	-1	0
28	39	0	0	-1	0	1
29	27	-1	0	0	0	1
30	5	-1	0	-1	0	0
31	6	1	0	-1	0	0
32	10	0	0	1	-1	0
33	18	0	1	0	0	-1
34	30	0	1	-1	0	0
35	42	0	0	0	0	0
36	26	1	0	0	0	-1
37	2	1	-1	0	0	0
38	16	0	0	0	1	1
39	15	0	0	0	-1	1
40	37	0	0	-1	0	-1
41	19	0	-1	0	0	1
42	28	1	0	0	0	1

Çizelge 3.5. Katı kültür için Box-Behnken deney tasarım değişken ve seviyeleri

	Kodu	-1	0	1
Karbon konsantrasyonu (g)	CS	20	30	40
Nem Oranı (mL)	MR	2X	2,5X	3X
Azot kaynağı (g/L)	NS	0,2	0,4	0,6
pH	pH	5	7	9
Aşı Oranı (mL)	IA	1	2	3

Yukarıda verilen Çizelge 3.5. incelendiğinde nem oranı satırındaki X, C kaynağının kuru ağırlığını temsil etmektedir. Katı hal fermantasyonu için hazırlanan ana kültürün değişkenlerinden biri olan nem oranının ayarlanması sırasında, mısır koçanı kuru ağırlığının (X'in) önündeki katsayısı katı hacmi (mL olarak) kadar ana kültür mısır koçanına eklenip karıştırılarak ortamın nemliliği sağlanmıştır.

Çizelge 3.6. Katı kültür için oluşturulan deney setleri (CS: Karbon kaynağı konsantrasyonu; MR: Nem miktarı; NS:Azot kaynağı konsantrasyonu; pH: Asit-baz konsantrasyonu; IA: Aşı miktarı)

Run.No	Std.No	CS	MR	NS	pH	IA
1	22	1	0	0	-1	0
2	24	1	0	0	1	0
3	17	0	-1	0	0	-1
4	7	-1	0	1	0	0
5	23	-1	0	0	1	0
6	1	-1	-1	0	0	0
7	33	0	-1	0	-1	0
8	38	0	0	1	0	-1
9	40	0	0	1	0	1
10	21	-1	0	0	-1	0
11	25	-1	0	0	0	-1
12	35	0	-1	0	1	0
13	20	0	1	0	0	1
14	41	0	0	0	0	0
15	8	1	0	1	0	0
16	4	1	1	0	0	0
17	36	0	1	0	1	0
18	32	0	1	1	0	0
19	31	0	-1	1	0	0
20	3	-1	1	0	0	0
21	34	0	1	0	-1	0
22	12	0	0	1	1	0
23	11	0	0	-1	1	0
24	13	0	0	0	-1	-1
25	14	0	0	0	1	-1
26	29	0	-1	-1	0	0
27	9	0	0	-1	-1	0
28	39	0	0	-1	0	1
29	27	-1	0	0	0	1
30	5	-1	0	-1	0	0
31	6	1	0	-1	0	0
32	10	0	0	1	-1	0
33	18	0	1	0	0	-1
34	30	0	1	-1	0	0
35	42	0	0	0	0	0
36	26	1	0	0	0	-1
37	2	1	-1	0	0	0
38	16	0	0	0	1	1
39	15	0	0	0	-1	1
40	37	0	0	-1	0	-1
41	19	0	-1	0	0	1
42	28	1	0	0	0	1

3.2.3. Ksilanaz Aktivite Ölçümü

Ana kültürden her gün 2 mL örnek alınmıştır. Batık kültürden örnekler direk 2 mL'lik ependorflara alınmıştır. Katı kültürden örnek alınımında ise yıkama yöntemi kullanılmıştır. Yıkama yönteminde; katı kültür fermantasyon ortamına 5-15 mL sodyum fosfat tamponu ilave edilerek çalkalanmıştır. Tamponlu kültürün tamamı kurutma kağıdıyla süzümüştür. Süzülerek elde edilen ham enzim örnekleri 5000 g`de 4-6°C` de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler ve besiyerindeki çözünmeyen parçacıklar ayrılmıştır. Pellet kısmı atılarak süpernatant kısmı ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzim aktivitesi için substrat olarak % 1'lik kayın ağacı ksilanı 50 mM pH 7,0 fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Ksilanın çözünürlüğünün az olması sebebiyle 1 g kayın ağacı ksilanı 80 mL tampon çözeltisinde manyetik karıştırıcı üzerinde kaynayıncaya kadar karıştırılmış ve 2-3 dakika kaynama sonrası ısıtma işlemi durdurulmuş ancak karıştırma işlemine gece boyu oda sıcaklığında devam edilmiştir. Hazırlanan solüsyon aynı tampon çözeltiyle 100 mL' ye tamamlanmış, 5000 g' de 20 dakika santrifüj edilerek çözünmeyen ksilan parçacıkları uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan substrat çözeltisi 1 hafta 4-6 °C'de saklanarak kullanılmıştır (Bailey ve ark., 1992).

Ksilanaz aktivitesi, enzimatik reaksiyon sırasında ortaya çıkan, indirgenmiş şeker konsantrasyonu ölçülerek belirlenmiştir. *Aspergillus terreus*'tan elde edilen ksilanaz enziminin optimum aktivite sıcaklığı daha önce yapılan çalışmalarda 40 °C olduğu görülmüştür. Bu sebeple her ikiside 40 °C sıcaklıkta dengelenmiş; uygun şekilde seyreltilmiş 1 mL enzim ve 10 mL substratın karıştırılması ile gerçekleştirilmiştir (Özben, 2014). Uygun zamanlarda reaksiyon çözeltisinden alınan 1 mL örnek üzerine 1,5 mL dinitrosalisilik asit çözeltisi (DNSA) eklenerek hemen durdurulmuştur. Renk oluşumu için tüpler kaynayan suya yerleştirilmiş, 5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda örnek tüpler buz banyosunda hemen soğutulmuştur. Lp İtaly 96 pleytlere önce blank (kör) bulunan tüpten 200 µL alınarak kuyucuğa yerleştirilmiştir. Bu işlemi takiben enzimlerin bulunduğu tüplerden aynı şekilde 200 µL alınarak kuyucuklara yerleştirilmiştir. 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans değerleri ölçümüştür. Ksilanaz aktivitesi oluşturulan ksiloz standart grafiği ve elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanmıştır (Miller, 1959).

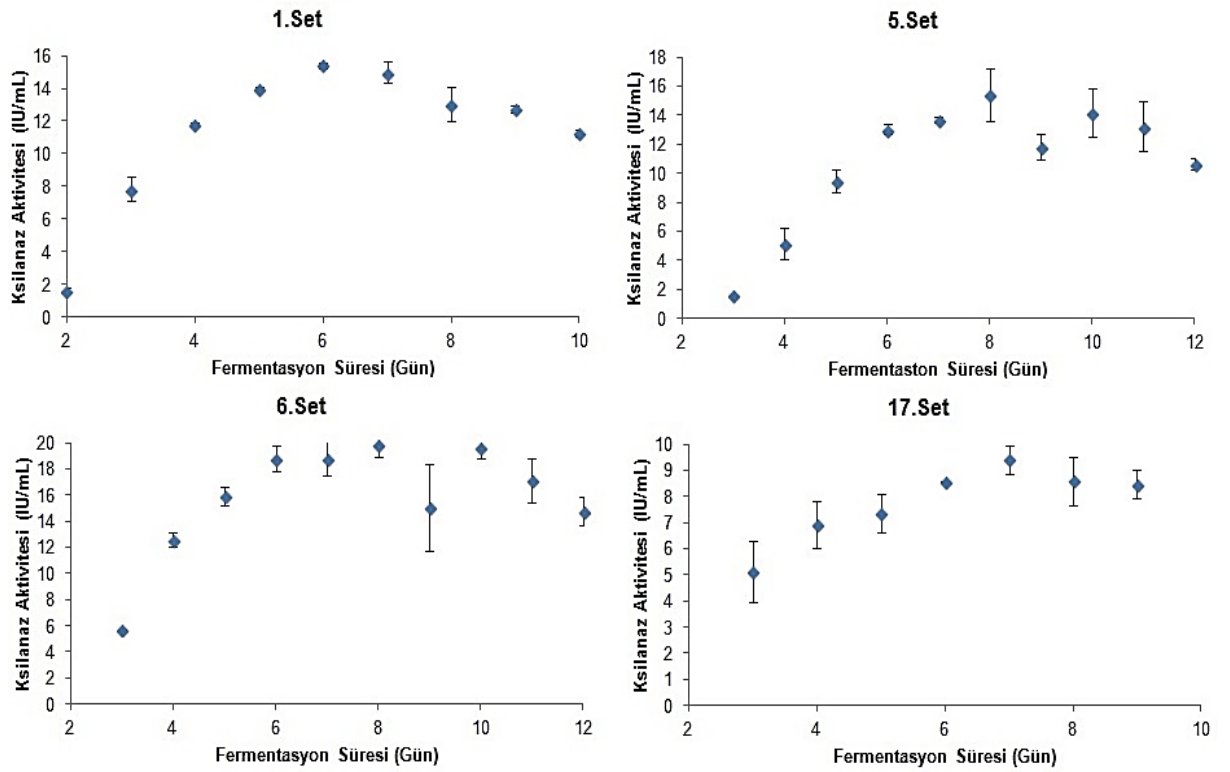
DNSA reaktifi Ek B'de verilen içerik ve oranları ile hazırlanmıştır. DNSA yönteminde indirgeyici şekerlerin belirlenebilmesi için standart olarak ksiloz kullanılmıştır (Ek B).

Bir birim ksilanaz aktivitesi (IU) 40°C’de reaksiyon şartlarında 1 dakikada 1 µmol ksiloz üretebilen enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

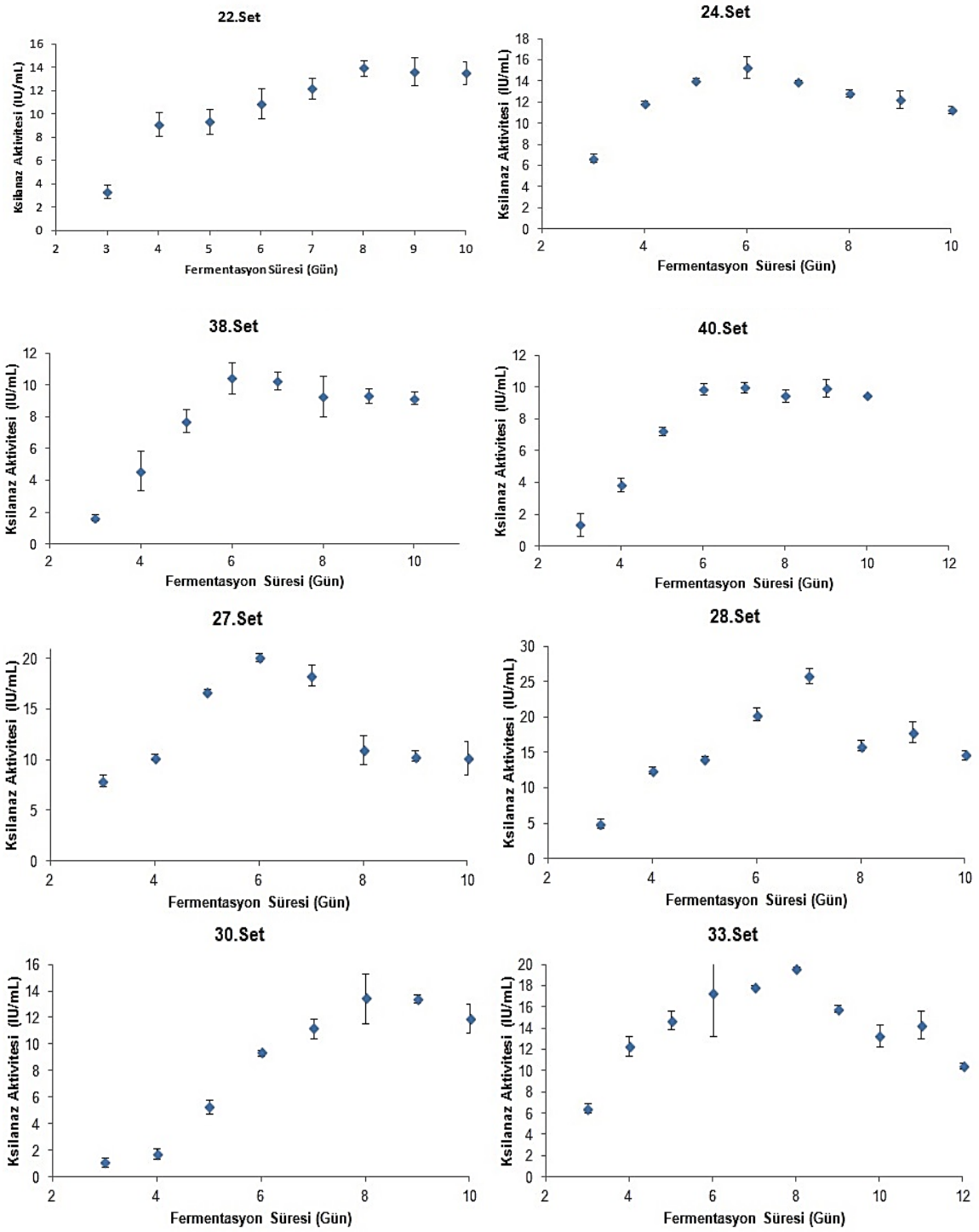
4. BULGULAR

4.1. Tepki Yüzey Metodolojisi Kullanılarak Batık Kültürde Ksilanaz Üretiminin Optimizasyonu

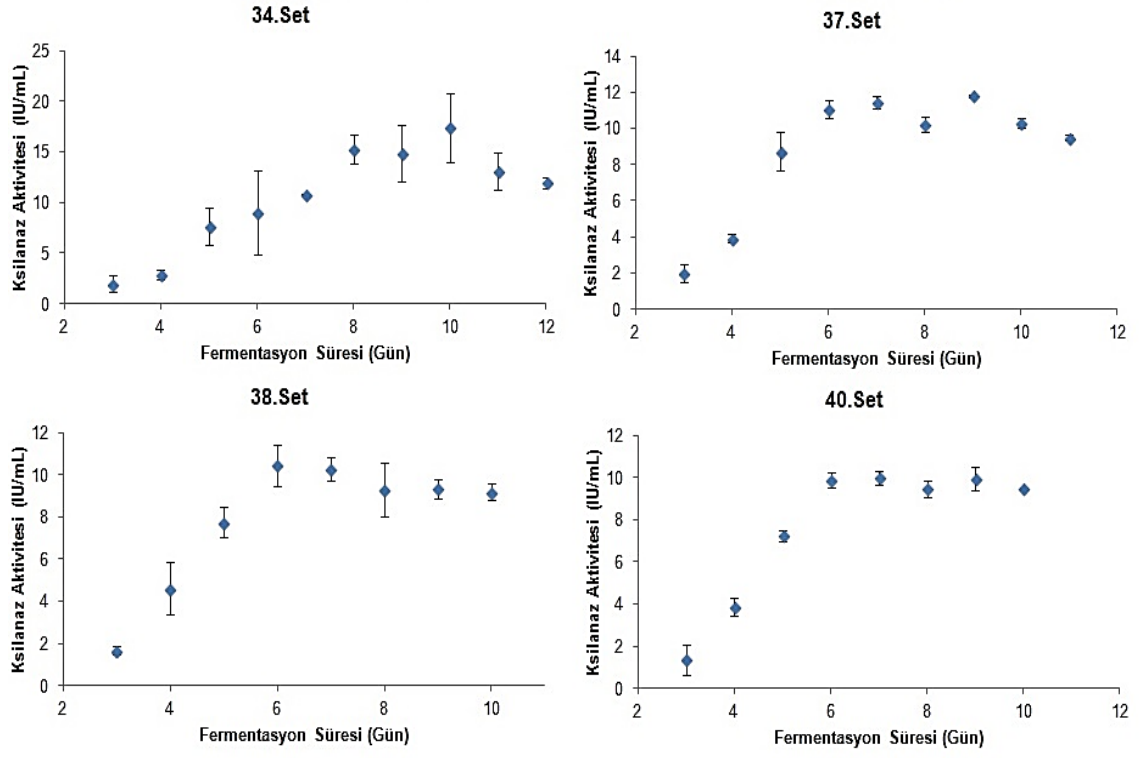
Öncelikle çalışmalara batık kültür setleriyle başlandı. Ana kültüre ekim yapıp üretim aşaması başladıktan sonra ksilanaz aktivitesi günlük olarak takip edildi. Ölçümler, aktivitelerin düştüğü güne kadar takip edilip her setin en yüksek aktivitesi tespit edildi. Batık kültür örnek set profilleri Şekil 4.1.’de sunulmaktadır.



Şekil 4.1. Batık kültür örnek set profilleri



Şekil 4.1. Batık kültür örnek set profilleri (Devamı)



Şekil 4.1. Batık kültür örnek set profilleri (Devamı)

Her bir set için en yüksek aktiviteler belirlendikten sonra Çizelge 4.1. verilen tablo elde edildi.

Çizelge 4.1. Batık kültürden elde edilen ilk set sonuçları

Run.No	Std.No	CS	IA	NS	KP	NA	En Yüksek Aktivite (IU/mL)
1	22	1	0	0	-1	0	13,97
2	24	1	0	0	1	0	15,3
3	17	0	-1	0	0	-1	9,4
4	7	-1	0	1	0	0	18
5	23	-1	0	0	1	0	14,03
6	1	-1	-1	0	0	0	15,44
7	33	0	-1	0	-1	0	19,61
8	38	0	0	1	0	-1	10,45
9	40	0	0	1	0	1	9,97
10	21	-1	0	0	-1	0	12,92
11	25	-1	0	0	0	-1	11,01
12	35	0	-1	0	1	0	14,64
13	20	0	1	0	0	1	12,63
14	41	0	0	0	0	0	11,32
15	8	1	0	1	0	0	14,41
16	4	1	1	0	0	0	22,24
17	36	0	1	0	1	0	17,41
18	32	0	1	1	0	0	11,22
19	31	0	-1	1	0	0	23,02
20	3	-1	1	0	0	0	13,54
21	34	0	1	0	-1	0	17,38
22	12	0	0	1	1	0	17,3
23	11	0	0	-1	1	0	19,01
24	13	0	0	0	-1	-1	12,27
25	14	0	0	0	1	-1	11,08
26	29	0	-1	-1	0	0	16,26
27	9	0	0	-1	-1	0	17,27
28	39	0	0	-1	0	1	11,88
29	27	-1	0	0	0	1	20,13
30	5	-1	0	-1	0	0	15,4
31	6	1	0	-1	0	0	19,83
32	10	0	0	1	-1	0	18,9
33	18	0	1	0	0	-1	10,39
34	30	0	1	-1	0	0	13,45
35	42	0	0	0	0	0	9,94
36	26	1	0	0	0	-1	22,21
37	2	1	-1	0	0	0	18,38
38	16	0	0	0	1	1	12,03
39	15	0	0	0	-1	1	12,63
40	37	0	0	-1	0	-1	11,8
41	19	0	-1	0	0	1	9,46
42	28	1	0	0	0	1	25,83

Daha sonra TYM (Tepki Yüzey Metodu) kullanılarak en uygun regresyon modelini belirlemek üzere mevcut 4 model üzerinde regresyon analizleri gerçekleştirildi (Şekil 4.2.-4.5.). Analizler sırasında hem modelin uygunluğu hem de optimizasyon çalışmalarının yeterliliğini tespit etmek için öncelikle R-kare (R-Sq) değerine bakıldı. R-kare değeri regresyon sabiti olup seçilen bağımsız değişkenler ve uygulanan model arasındaki etkileşimi göstermektedir. R-kare değerinin 1'e yakın ya da % 90'ın üzerinde olması gerekmektedir. R-kare değeri, uygulanan modelin elde edilen verilerin ne kadarını tanımlayıp açıklayabildiğini göstermektedir. Örnek olarak % 90 R-kare değeri verilerin % 90'nını açıklayabilirken % 10'luk bir kısmını açıklayamamaktadır. Bunun yanında yine uygulanan modelin uygulanabilirliğini gösteren diğer bir değer ise Lack of Fit (LOF) (Uyum Eksikliği) değeridir. Dolayısıyla bu değer anlamlı olmaması beklenmektedir. Diğer bir deyişle, LOF p değerinin 1'e yakın olması gerekmektedir. Diğer bir önemli değer ise ayarlanmış R-kare (R-Sq(adj)) değeri olup, bu değer R-kare değerinden farkının % 5'ten fazla olmaması uygulanan model ile optimizasyonun anlamlı olduğunu göstermektedir.

Denenen modeller sırasıyla; 1. doğrusal model, 2. doğrusal+kare model, 3. doğrusal+etkileşimli model ve 4. tam ikinci dereceden modeldir. Bu modellere ilişkin R-kare (R^2 veya R-Sq) değerleri ve ilgili bilgiler Şekil 4.2.-4.5'te verilmiştir. Tepki yüzey metodunda uygulanan regresyon modelinin tasarımı ne kadar tanımlayıp açıklayabildiğini regresyonun R^2 değeri göstermektedir. Öncelikle Batık kültür fermantasyonları için bakıldığında; Örnek olarak doğrusal regresyonun R-kare değeri % 12'dir. Bunun anlamı, uygulanan model, tasarımın sadece % 12'sini açıklayabilmekte fakat bunun yanında % 88 uygulanan modelle açıklanamamaktadır. Bu bilgiye dayanarak elde edilen R-kare değerlerine baktığımızda lineer için % 12, doğrusal+kare için % 39, doğrusal+etkileşim için % 21 ve tam 2. dereceden modelde ise % 48'dir. Bu sonuçlardan yola çıkarak en anlamlı modelin tam 2. dereceden regresyon model olduğu bulundu ve bundan sonraki tepkiler bu model üzerinden analiz edildi.

Terimler	Katsayı	SE Katsayısı	T	P
Sabitler	15,0800	0,6410	23,526	0,000
CS	1,9812	1,0385	1,908	0,064
IA	-0,4969	1,0385	-0,478	0,635
NS	-0,1019	1,0385	-0,098	0,922
KP	-0,2594	1,0385	-0,250	0,804
NaCl	0,9969	1,0385	0,960	0,344

S = 4,154 R-Sq = 11,9% R-Sq(adj) = 0,0%

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regrasyon	5	83,898	83,898	16,7797	0,97	0,448
Doğrusal	5	83,898	83,898	16,7797	0,97	0,448
Residuel hata	36	621,253	621,253	17,2570		
Lock-of-Fit	35	620,301	620,301	17,7229	18,61	0,182
Saf Hata	1	0,952	0,952	0,9522		
Toplam	41	705,151				

Şekil 4.2. Batık kültür doğrusal regresyon analizi

Terimler	Katsayı	SE Katsayısı	T	P
Sabitler	10,6300	2,6356	4,033	0,000
CS	1,9812	0,9318	2,126	0,042
IA	-0,4969	0,9318	-0,533	0,598
NS	-0,1019	0,9318	-0,109	0,914
KP	-0,2594	0,9318	-0,278	0,783
NaCl	0,9969	0,9318	1,070	0,293
CS*CS	4,6529	1,6582	2,806	0,009
IA*IA	2,3054	1,6582	1,390	0,174
NS*NS	2,6138	1,6582	1,576	0,125
KP*KP	2,4121	1,6582	1,455	0,156
NaCl*NaCl	-0,3029	1,6582	-0,183	0,856

S = 3,727 R-Sq = 38,9% R-Sq(adj) = 19,2%

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regrasyon	10	274,474	274,474	27,4474	1,98	0,072
Kare	5	83,898	83,898	16,7797	1,21	0,329
Residuel hata	5	190,575	190,575	38,1151	2,74	0,036
Lock-of-Fit	31	430,677	430,677	13,8928		
Saf Hata	30	429,725	429,725	14,3242	15,04	0,202
Toplam	1	0,952	0,952	0,9522		
	41	705,151				

Şekil 4.3. Batık kültür kare regresyon analizi

Terimler	Katsayı	SE Katsayısı	T	P
Sabitler	15,0800	0,7153	21,082	0,000
CS	1,9812	1,1589	1,710	0,099
IA	-0,4969	1,1589	-0,429	0,672
NS	-0,1019	1,1589	-0,088	0,931
KP	-0,2594	1,1589	-0,224	0,825
NaCl	0,9969	1,1589	0,860	0,398
CS*IA	1,4400	2,3178	0,621	0,540
CS*NS	-2,0050	2,3178	-0,865	0,395
CS*KP	0,0550	2,3178	0,024	0,981
CS*NaCl	-1,3750	2,3178	-0,593	0,558
IA*NS	-2,2475	2,3178	-0,970	0,341
IA*KP	1,2500	2,3178	0,539	0,594
NS*KP	0,5450	2,3178	0,235	0,816
NS*NaCl	-0,8350	2,3178	-0,360	0,722
KP*NaCl	-0,1400	2,3178	-0,060	0,952
NaCl*NaCl	0,1475	2,3178	0,064	0,950

S = 4,636 **R-Sq = 20,8%** R-Sq(adj) = 0,0%

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regrasyon	15	146,445	146,445	9,7630	0,45	0,943
Doğrusal	5	83,898	83,898	16,7797	0,78	0,573
Etkileşimli	10	62,547	62,547	6,2547	0,29	0,977
Residuel hata	26	558,706	558,706	21,4887		
Lock-of-Fit	25	557,754	557,754	22,3102	23,43	0,162
Saf Hata	1	0,952	0,952	0,9522		
Toplam	41	705,151				

Şekil 4.4. Batık kültür doğrusal+etkileşimli regresyon analizi

Terimler	Katsayı	SE Katsayısı	T	P
Sabitler	10,6300	2,961	3,591	0,002
CS	1,9812	1,047	1,893	0,072
IA	-0,4969	1,047	-0,475	0,640
NS	-0,1019	1,047	-0,097	0,923
KP	-0,2594	1,047	-0,248	0,807
NaCl	0,9969	1,047	0,952	0,352
CS*CS	4,6529	1,863	2,498	0,021
IA*IA	2,3054	1,863	1,238	0,229
NS*NS	2,6138	1,863	1,403	0,175
KP*KP	2,4121	1,863	1,295	0,209
NaCl*NaCl	-0,3029	1,863	-0,163	0,872
CS*IA	1,4400	2,093	0,688	0,499
CS*NS	-2,0050	2,093	-0,958	0,349
CS*KP	0,0550	2,093	0,026	0,979
CS*NaCl	-1,3750	2,093	-0,657	0,518
IA*NS	-2,2475	2,093	-1,074	0,295
IA*KP	1,2500	2,093	0,597	0,557
IA*NaCl	0,5450	2,093	0,260	0,797
NS*KP	-0,8350	2,093	-0,399	0,694
NS*NaCl	-0,1400	2,093	-0,067	0,947
KP*NaCl	0,1475	2,093	0,070	0,944
NaCl*NaCl				

S = 4,187 R-Sq = 47,8% R-Sq(adj) = 0,0%

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regrasyon	20	337,020	337,020	16,8510	0,96	0,534
Doğrusal	5	83,898	83,898	16,7797	0,96	0,466
Kare	5	190,575	190,575	38,1151	2,17	0,096
Etkileşimli	10	62,547	62,547	6,2547	0,36	0,952
Residuel hata	21	368,131	368,131	17,5300		
Lock-of-Fit	20	367,179	367,179	18,3589	19,28	0,178
Saf Hata	1	0,952	0,952	0,9522		
Toplam	41	705,151				

Şekil 4.5. Batık kültür tam 2. dereceden regresyon analizi

Bu modelleme sonucunda R-kare değerlerinin düşük olması sebebiyle tekrar edilecek setler belirlendi. Tekrar edilecek setlerin belirlenmesinde kullanılan kriter, o setin tepkisinin residual değerinin büyüklüğüdür. Residual değer ne kadar büyükse modele uyumluluğu o kadar düşüktür. Bunun yanında tekrar setler belirlenirken residual değerlere ek olarak yüzey eğrileri de göz önüne alındı. Batık kültür fermantasyonları için tekrar edilen set sonuçlarından elde edilen tepkiler Çizelge 4.2. ve bu tepkilerin analizleri Şekil 4.6.-4.13.'de verildi.

Çizelge 4.2. Batık kültür tekrarlar sonrası set tepkileri

Run.No	Std.No	CS	IA	NS	KP	NA	En Yüksek Aktivite (IU/mL)
1	22	1	0	0	-1	0	21,04
2	24	1	0	0	1	0	18,1
3	17	0	-1	0	0	-1	9,4
4	7	-1	0	1	0	0	13,27
5	23	-1	0	0	1	0	14,03
6	1	-1	-1	0	0	0	15,44
7	33	0	-1	0	-1	0	15,89
8	38	0	0	1	0	-1	10,45
9	40	0	0	1	0	1	9,97
10	21	-1	0	0	-1	0	12,92
11	25	-1	0	0	0	-1	11,01
12	35	0	-1	0	1	0	14,64
13	20	0	1	0	0	1	8,3
14	41	0	0	0	0	0	11,32
15	8	1	0	1	0	0	20,94
16	4	1	1	0	0	0	19,01
17	36	0	1	0	1	0	11,5
18	32	0	1	1	0	0	11,22
19	31	0	-1	1	0	0	16,14
20	3	-1	1	0	0	0	10,08
21	34	0	1	0	-1	0	12,25
22	12	0	0	1	1	0	15,14
23	11	0	0	-1	1	0	8,01
24	13	0	0	0	-1	-1	12,27
25	14	0	0	0	1	-1	11,08
26	29	0	-1	-1	0	0	9,79
27	9	0	0	-1	-1	0	9,31
28	39	0	0	-1	0	1	6,02
29	27	-1	0	0	0	1	9,88
30	5	-1	0	-1	0	0	8,92
31	6	1	0	-1	0	0	13,11
32	10	0	0	1	-1	0	14,52
33	18	0	1	0	0	-1	10,39
34	30	0	1	-1	0	0	6,1
35	42	0	0	0	0	0	9,94
36	26	1	0	0	0	-1	15,38
37	2	1	-1	0	0	0	18,38
38	16	0	0	0	1	1	12,03
39	15	0	0	0	-1	1	12,63
40	37	0	0	-1	0	-1	3,06
41	19	0	-1	0	0	1	14,28
42	28	1	0	0	0	1	18,84

	Tahmin	Std. Hata	t Değeri	Pr(> d)	
Durdurma	10,630	0,480	22,162	0,000	***
CS	3,078	0,170	18,151	0,000	***
IA	-1,569	0,170	-9,254	0,000	***
NS	2,896	0,170	17,075	0,000	***
KP	-0,394	0,170	-2,322	0,030	*
NA	0,494	0,170	2,915	0,008	**
CS:IA	1,498	0,339	4,415	0,000	***
CS:NS	0,870	0,339	2,565	0,018	*
CS:KP	-1,013	0,339	-2,985	0,007	**
CS:NA	1,148	0,339	3,383	0,003	**
IA:NS	-0,308	0,339	-0,907	0,375	
IA:KP	0,125	0,339	0,369	0,716	
IA:NA	-1,743	0,339	-5,138	0,000	***
NS:KP	0,480	0,339	1,415	0,172	
NS:NA	-0,610	0,339	-1,799	0,086	.
KP:NA	0,148	0,339	0,435	0,668	
CS^2	4,178	0,302	13,844	0,000	***
IA^2	1,050	0,302	3,478	0,002	**
NS^2	-1,104	0,302	-3,658	0,001	**
KP^2	2,095	0,302	6,944	0,000	***
NA^2	-1,185	0,302	-3,928	0,001	***
Anlamlı Kodlar	0 '***'	0,001 '**'	0,01 '*'	0,05 '.'	0,1 ''
S = 0,6783	R-Sq = 98,5%	R-Sq(adj) = 97,0%			

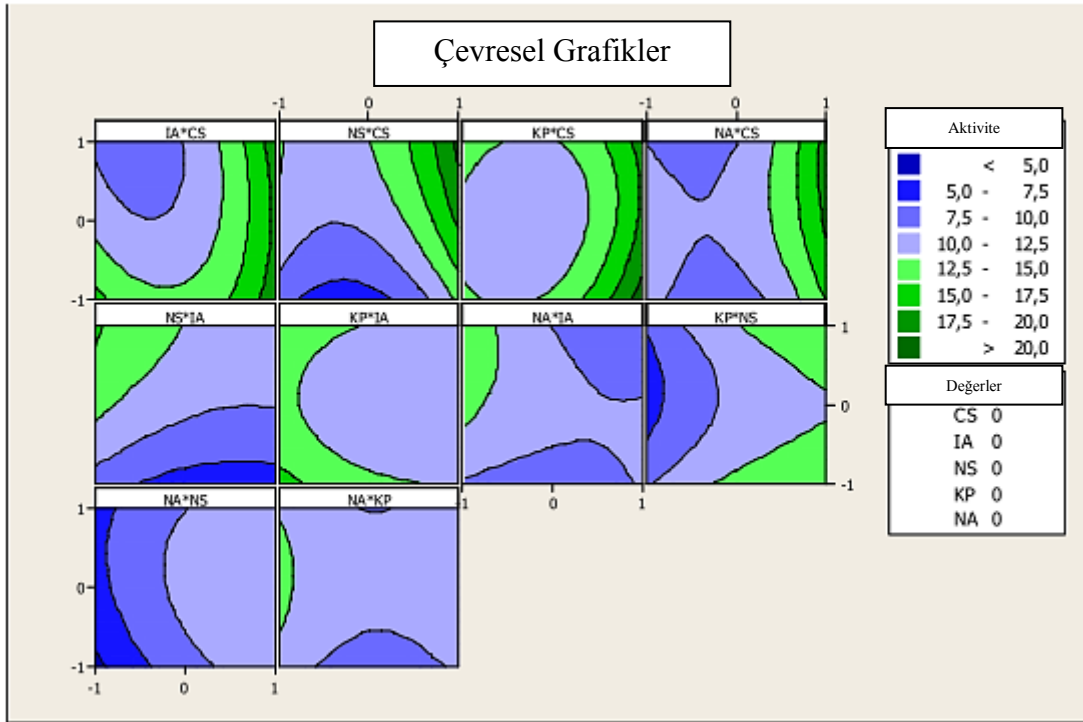
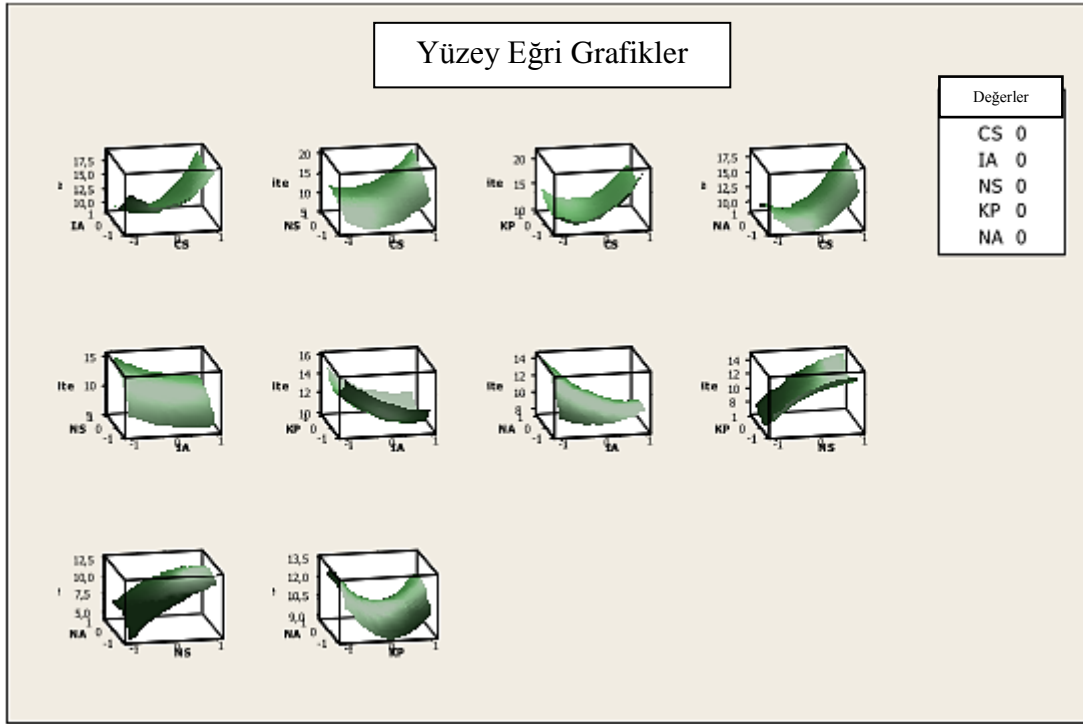
Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regrasyon	20	621,758	621,758	31,088	67,560	0,000
Doğrusal	5	331,550	331,550	66,310	144,110	0,000
Kare	5	253,760	253,760	50,752	110,300	0,000
Etkileşimli	10	36,448	36,448	3,645	7,920	0,000
Residuel hata	21	9,663	9,663	0,460		
Lock-of-Fit	20	8,711	8,711	0,436	0,460	0,845
Saf Hata	1	0,952	0,952	0,952		
Toplam	41	631,421				

CS	IA	NS	KP	Na
-0,513	0,621	1,215	-0,159	-0,819

Şekil 4.6. Batık kültür TYM analizi

Şekil 4.6. Batık kültür TYM analizi (Devamı)

Sıra	Std.Sıra	Aktivite	Fit	SE Fit	Residuel	St Resid
1	22	21,040	21,388	0,480	-0,348	-0,72
2	24	18,100	18,575	0,480	-0,475	-0,99
3	17	9,400	9,827	0,480	-0,427	-0,89
4	7	13,270	12,652	0,480	0,618	1,29
5	23	14,030	14,444	0,480	-0,414	-0,86
6	1	15,440	15,846	0,480	-0,406	-0,85
7	33	15,890	15,863	0,480	0,027	0,06
8	38	10,450	11,352	0,480	-0,902	-1,88
9	40	9,970	11,121	0,480	-1,151	-2,40 R
10	21	12,920	13,206	0,480	-0,286	-0,60
11	25	11,010	11,198	0,480	-0,188	-0,39
12	35	14,640	14,826	0,480	-0,186	-0,39
13	20	8,300	7,677	0,480	0,623	1,30
14	41	11,320	10,630	0,480	0,690	1,44
15	8	20,940	20,548	0,480	0,392	0,82
16	4	19,010	18,864	0,480	0,146	0,30
17	36	11,500	11,937	0,480	-0,437	-0,91
18	32	11,220	11,595	0,480	-0,375	-0,78
19	31	16,140	15,348	0,480	0,792	1,65
20	3	10,080	9,713	0,480	0,368	0,77
21	34	12,250	12,474	0,480	-0,224	-0,47
22	12	15,140	14,604	0,480	0,536	1,12
23	11	8,010	7,852	0,480	0,158	0,33
24	13	12,270	11,587	0,480	0,683	1,42
25	14	11,080	10,504	0,480	0,576	1,20
26	29	9,790	8,942	0,480	0,848	1,77
27	9	9,310	9,600	0,480	-0,290	-0,60
28	39	6,020	6,550	0,480	-0,530	-1,10
29	27	9,880	9,891	0,480	-0,011	-0,02
30	5	8,920	8,600	0,480	0,320	0,67
31	6	13,110	13,017	0,480	0,093	0,19
32	10	14,520	14,431	0,480	0,089	0,19
33	18	10,390	10,173	0,480	0,217	0,45
34	30	6,100	6,418	0,480	-0,318	-0,66
35	42	9,940	10,630	0,480	-0,690	-1,44
36	26	15,380	15,059	0,480	0,321	0,67
37	2	18,380	19,008	0,480	-0,628	-1,31
38	16	12,030	11,788	0,480	0,242	0,50
39	15	12,630	12,281	0,480	0,349	0,73
40	37	4,060	4,341	0,480	-0,281	-0,59
41	19	14,280	14,300	0,480	-0,020	-0,04
42	28	18,840	18,343	0,480	0,498	1,04



Şekil 4.7. Batık kültür TYM analizi çevresel ve yüzey eğri grafikleri

Batık kültür için TYM ile oluşturulan deney tasarımından elde edilen veriler değerlendirildiğinde ikinci dereceden model uygun görüldü ve bu modelin kabul edilebilirliği ANOVA analizleri sonucu onaylandı. R-Kare değerimiz % 98,5 olarak bulundu. Buna göre modelimiz sadece etkileşimlerin % 1,5'lik kısmını

açıklayamamaktadır. Elde edilen sonuçlarda F değeri 67,6 olarak ve p değeri 0 olarak bulundu. F değerinin büyük olması ve bu değere ait p değerinin çok küçük olması uygulanan modelin doğruluğunu ortaya koymaktadır. Bunun yanında ayarlanmış R-kare değeri % 97, LOF p değeri 0,845 olarak bulundu. Bu sonuçlardan elde edilen veriler ile uygulanan modelin TYM analizinde anlamlı oldukları tespit edildi.

4.2. Tepki Yüzey Metodolojisi Kullanılarak Katı Kültürde Ksilanaz Üretiminin Optimizasyonu

Batık kültür fermantasyonları için uygulanan regresyon analiz modellerinin hepsi katı kültür fermantasyonları içinde birebir takip edildi. Elde edilen R-kare değerlerine bakıldığında doğrusal için % 22, doğrusal+kare için % 26, doğrusal+etkileşim için % 40 ve tam 2. dereceden modelde ise % 44 olduğu görüldü. Sonuçlara bakıldığında en anlamlı (uygun) modelin tam 2. dereceden regresyon model olduğuna karar verildi. Nedenine bakıldığında ise tepki yüzey metodunda (TYM) uygulanan regresyon modelinin, tasarımı en yüksek yüzdeyle (% 44) açıklayabildiği diğer modellere kıyasla daha güvenilir olmasıdır. Bundan sonraki tepkiler tam 2. dereceden regresyon modeli üzerinden analiz edildi. Analiz sonuçları aşağıdaki Çizelge 4.3. ve Şekil 4.8.-4.13.'da verilmektedir.

Çizelge 4.3. Katı kültür tekrarlar sonrası set tepkileri

Run.No	Std.No	CS	MR	NS	pH	IA	En Yüksek Aktivite IU/g
1	22	1	0	0	-1	0	68,18
2	24	1	0	0	1	0	60,02
3	17	0	-1	0	0	-1	59,06
4	7	-1	0	1	0	0	70,23
5	23	-1	0	0	1	0	56,31
6	1	-1	-1	0	0	0	59,99
7	33	0	-1	0	-1	0	60,01
8	38	0	0	1	0	-1	45,04
9	40	0	0	1	0	1	68,88
10	21	-1	0	0	-1	0	90,13
11	25	-1	0	0	0	-1	65,17
12	35	0	-1	0	1	0	51,87
13	20	0	1	0	0	1	88,99
14	41	0	0	0	0	0	71,10
15	8	1	0	1	0	0	50,76
16	4	1	1	0	0	0	72,96
17	36	0	1	0	1	0	57,16
18	32	0	1	1	0	0	56,37
19	31	0	-1	1	0	0	60,09
20	3	-1	1	0	0	0	77,08
21	34	0	1	0	-1	0	90,22
22	12	0	0	1	1	0	49,08
23	11	0	0	-1	1	0	52,60
24	13	0	0	0	-1	-1	56,98
25	14	0	0	0	1	-1	61,11
26	29	0	-1	-1	0	0	45,59
27	9	0	0	-1	-1	0	82,86
28	39	0	0	-1	0	1	65,75
29	27	-1	0	0	0	1	70,22
30	5	-1	0	-1	0	0	69,33
31	6	1	0	-1	0	0	66,27
32	10	0	0	1	-1	0	69,94
33	18	0	1	0	0	-1	60,30
34	30	0	1	-1	0	0	89,14
35	42	0	0	0	0	0	75,50
36	26	1	0	0	0	-1	49,97
37	2	1	-1	0	0	0	54,43
38	16	0	0	0	1	1	49,17
39	15	0	0	0	-1	1	86,28
40	37	0	0	-1	0	-1	60,16
41	19	0	-1	0	0	1	50,33
42	28	1	0	0	0	1	66,23

Terimler	Katsayı	SE Katsayısı	T	P
Sabitler	60,491	2,479	24,397	0,000
CS	-4,375	4,017	-1,089	0,283
MR	10,053	4,017	2,503	0,017
NS	-1,186	4,017	-0,295	0,770
pH	-3,831	4,017	-0,954	0,347
IA	5,489	4,017	1,366	0,180

S = 16,07 **R-Sq = 22,3%** R-Sq(adj) = 11,5%

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regrasyon	5	2662,7	2662,7	532,5	2,06	0,093
Doğrusal	5	2662,7	2662,7	532,5	2,06	0,093
Residuel hata	36	9295,2	9295,2	258,2		
Lock-of-Fit	35	8666,6	8666,6	247,6	0,39	0,880
Saf Hata	1	628,6	628,6	628,6		
Toplam	41	11957,9				

Şekil 4.8. Katı kültür set sonucunun doğrusal regresyon analizi

Terimler	Katsayı	SE Katsayısı	T	P
Sabitler	57,1014	11,956	4,776	0,000
CS	-4,3753	4,227	-1,035	0,309
MR	10,0533	4,227	2,378	0,024
NS	-1,1856	4,227	-0,280	0,781
pH	-3,8305	4,227	-0,906	0,372
IA	5,4890	4,227	1,299	0,204
CS*CS	4,6443	7,522	0,617	0,541
MR*MR	4,5584	7,522	0,606	0,549
NS*NS	2,0376	7,522	0,271	0,788
pH*pH	-0,6079	7,522	-0,081	0,936
IA*IA	-1,7343	7,522	-0,231	0,819

S = 16,91 **R-Sq = 25,9%** R-Sq(adj) = 2,0%

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regrasyon	10	3095,3	3095,34	309,534	1,08	0,404
Doğrusal	5	2662,7	2662,71	532,541	1,86	0,130
Kare	5	432,6	432,64	86,527	0,30	0,908
Residuel hata	31	8862,5	8862,53	285,888		
Lock-of-Fit	30	8234,0	8233,96	274,465	0,44	0,859
Saf Hata	1	628,6	628,57	628,570		
Toplam	41	11957,9				

Şekil 4.9. Katı kültür set sonucunun doğrusal+kare regresyon analizi

Terimler	Katsayı	SE Katsayısı	T	P
Sabitler	60,4911	2,564	23,589	0,000
CS	-4,3753	4,155	-1,053	0,302
MR	10,0533	4,155	2,420	0,023
NS	-1,1856	4,155	-0,285	0,778
pH	-3,8305	4,155	-0,922	0,365
IA	5,4890	4,155	1,321	0,198
CS*MR	17,6662	8,310	2,126	0,043
CS*NS	-7,9162	8,310	-0,953	0,350
CS*pH	5,1659	8,310	0,622	0,540
CS*IA	4,0607	8,310	0,489	0,629
MR*NS	-6,7139	8,310	-0,808	0,426
MR*pH	-0,7549	8,310	-0,091	0,928
MR*IA	3,7007	8,310	0,445	0,660
NS*pH	-0,6833	8,310	-0,082	0,935
NS*IA	-4,2827	8,310	-0,515	0,611
pH*IA	-5,6909	8,310	-0,685	0,500

S = 16,62 R-Sq = 39,9% R-Sq(adj) = 5,3%

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regrasyon	15	4776,6	4776,6	318,4	1,15	0,363
Doğrusal	5	2662,7	2662,7	532,5	1,93	0,124
Etkileşimli	10	2113,9	2113,9	211,4	0,77	0,660
Residuel hata	26	7181,3	7181,3	276,2		
Lock-of-Fit	25	6552,7	6552,7	262,1	0,42	0,866
Saf Hata	1	628,6	628,6	628,6		
Toplam	41	11957,9				

Şekil 4.10. Katı kültür set sonucunun doğrusal+etkileşimli regresyon analizi

Terimler	Katsayı	SE Katsayısı	T	P
Sabitler	57,1014	12,676	4,505	0,000
CS	-4,3753	4,482	-0,976	0,340
NS	10,0533	4,482	2,243	0,036
pH	-1,1856	4,482	-0,265	0,794
IA	-3,8305	4,482	-0,855	0,402
CS*CS	5,4890	4,482	1,225	0,234
MR*MR	4,6443	7,975	0,582	0,567
NS*NS	4,5584	7,975	0,572	0,574
pH*pH	2,0376	7,975	0,255	0,801
IA*IA	-0,6079	7,975	-0,076	0,940
CS*MR	-1,7343	7,975	-0,217	0,830
CS*NS	17,6662	8,963	1,971	0,062
CS*pH	-7,9162	8,963	-0,883	0,387
CS*IA	5,1659	8,963	0,576	0,571
MR*NS	4,0607	8,963	0,453	0,655
MR*pH	-6,7139	8,963	-0,749	0,462
MR*IA	-0,7549	8,963	-0,084	0,934
NS*pH	3,7007	8,963	0,413	0,684
NS*IA	-0,6833	8,963	-0,076	0,940
pH*IA	-4,2827	8,963	-0,478	0,638
	-5,6909	8,963	-0,635	0,532

S = 17,93 R-Sq = 43,6% R-Sq(adj) = 0,0%

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regrasyon	20	5209,2	5209,2	260,46	0,81	0,679
Doğrusal	5	2662,7	2662,7	532,54	1,66	0,189
Kare	5	432,6	432,6	86,53	0,27	0,925
Etkileşimli	10	2113,9	2113,9	211,39	0,66	0,749
Residuel hata	21	6748,7	6748,7	321,36		
Lock-of-Fit	20	6120,1	6120,1	306,00	0,49	0,833
Saf Hata	1	628,6	628,6	628,57		
Toplam	41	11957,9				

Şekil 4.11. Katı kültür set sonucunun tam 2. dereceden regresyon analizi

Elde edilen bütün regresyon analiz modellerinin sonuçlarını birarada görmek adına aşağıdaki tablo oluşturulmuştur.

Çizelge 4. 4. Batık ve katı kültür için TYM denenen regresyon analiz modelleri ve yüzdeleri

Tepki Yüzey Metodunda Denenen Regrasyon Modelleri	R-kare (R ² veya R-Sq) Değerleri %	R-kare (R ² veya R-Sq) Değerleri %
Doğrusal	12	22
Doğrusal+Kare	39	26
Doğrusal+Etkileşimli	21	40
Tam 2. Dereceden	48	44

	Tahmin	Std. Hata	t Değeri	Pr(> t)	
Durdurma	73,300	1,811	40,468	< 2,2e-16	***
CS	-4,353	0,640	-6,797	0,000	***
MR	9,428	0,640	14,723	0,000	***
NS	-3,832	0,640	-5,984	0,000	***
pH	-10,455	0,640	-16,325	0,000	***
IA	5,504	0,640	8,595	0,000	***
CS:MR	0,360	1,281	0,281	0,781	
CS:NS	-4,103	1,281	-3,204	0,004	**
CS:pH	6,416	1,281	5,009	0,000	***
CS:IA	2,802	1,281	2,188	0,040	*
MR:NS	-11,819	1,281	-9,228	0,000	***
MR:pH	-6,230	1,281	-4,864	0,000	***
MR:IA	9,356	1,281	7,305	0,000	***
NS:pH	2,351	1,281	1,835	0,081	.
NS:IA	4,563	1,281	3,562	0,002	**
pH:IA	-10,311	1,281	-8,050	0,000	***
CS^2	-2,798	1,140	-2,456	0,023	*
MR^2	-3,940	1,140	-3,458	0,002	**
NS^2	-6,565	1,140	-5,761	0,000	***
pH^2	-3,246	1,140	-2,849	0,010	**
IA^2	-6,436	1,140	-5,647	0,000	***
---		0,001			
Anlamlı kodlar	0 '***'	'**'	0,01 '*'	0,05 '.'	0,1 ''

S = 2,562 R-Sq = 97,9% R-Sq(adj) = 95,9%

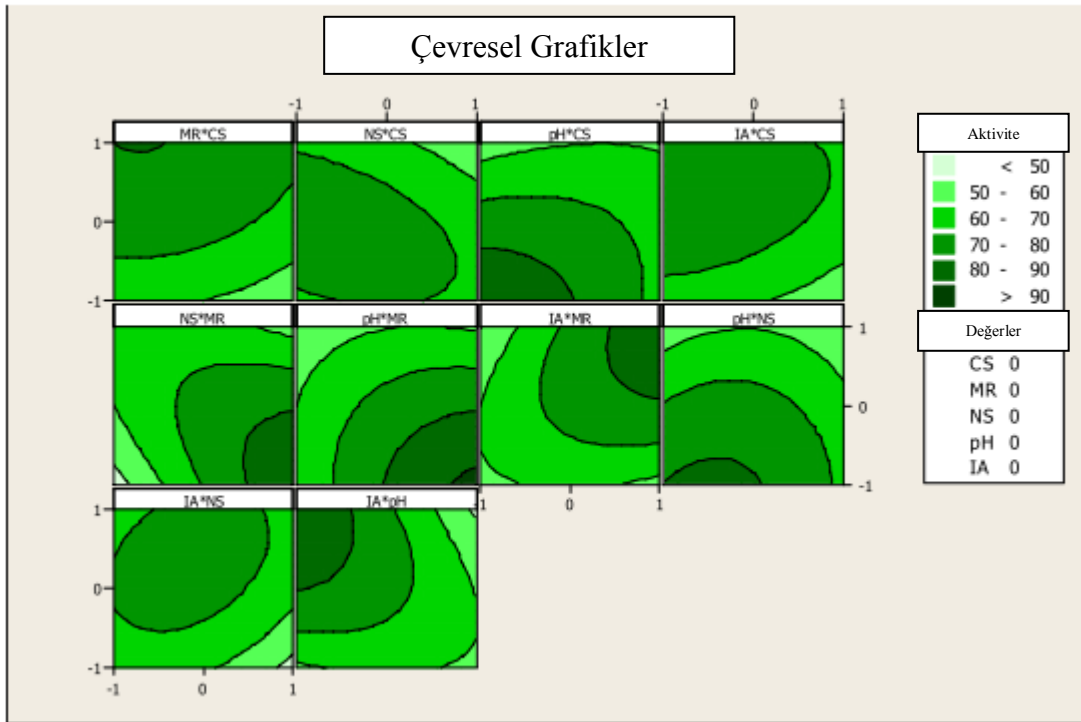
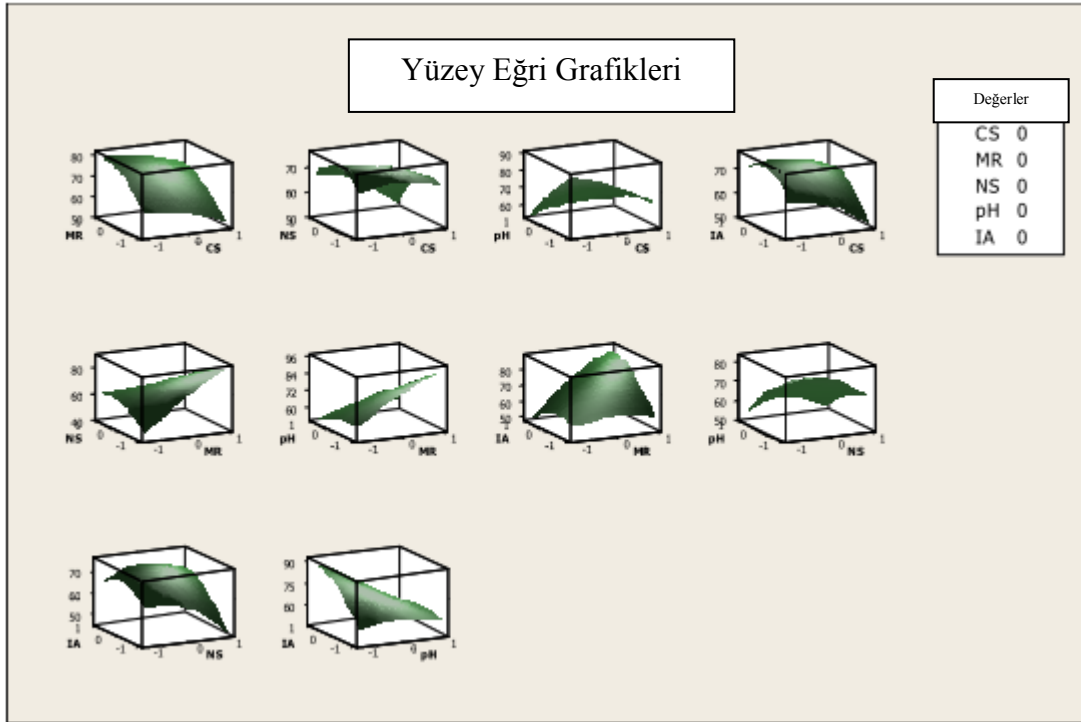
Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regrasyon	20	6366,520	6366,520	318,326	48,510	0,000
Doğrusal	5	4193,910	4193,910	838,782	127,830	0,000
Kare	5	313,940	313,940	62,788	9,570	0,000
Etkileşimli	10	1858,660	1858,660	185,866	28,330	0,000
Residuel hata	21	137,790	137,790	6,562		
Lock-of-Fit	20	128,110	128,110	6,406	0,660	0,767
Saf Hata	1	9,680	9,680	9,680		
Toplam	41	6504,310				

CS	MR	NS	pH	IA
11,306	3,895	-6,877	6,907	-2,250

Şekil 4.12. Katı kültür TYM analizi

Şekil 4.12. Katı kültür TYM analizi (Devamı)

Sıra	Std.Sıra	Aktivite	Fit	SE Fit	Residuel	St Resid
1	22	68,178	66,941	1,811	1,236	0,680
2	24	60,020	58,863	1,811	1,157	0,640
3	17	59,060	57,348	1,811	1,712	0,950
4	7	70,230	68,561	1,811	1,669	0,920
5	23	56,310	54,738	1,811	1,572	0,870
6	1	59,990	61,846	1,811	-1,856	-1,020
7	33	60,010	60,910	1,811	-0,900	-0,500
8	38	45,038	46,400	1,811	-1,363	-0,750
9	40	68,879	66,534	1,811	2,345	1,290
10	21	90,130	88,478	1,811	1,652	0,910
11	25	65,170	65,717	1,811	-0,547	-0,300
12	35	51,866	52,461	1,811	-0,595	-0,330
13	20	88,990	87,212	1,811	1,777	0,980
14	41	71,100	73,300	1,811	-2,200	-1,210
15	8	50,756	51,648	1,811	-0,892	-0,490
16	4	72,960	71,997	1,811	0,963	0,530
17	36	57,155	58,857	1,811	-1,701	-0,940
18	32	56,366	56,572	1,811	-0,206	-0,110
19	31	60,090	61,354	1,811	-1,264	-0,700
20	3	77,080	79,983	1,811	-2,903	-1,600
21	34	90,220	92,226	1,811	-2,006	-1,110
22	12	49,083	51,552	1,811	-2,469	-1,360
23	11	52,596	54,516	1,811	-1,919	-1,060
24	13	56,975	58,258	1,811	-1,283	-0,710
25	14	61,110	57,970	1,811	3,140	1,730
26	29	45,590	45,380	1,811	0,210	0,120
27	9	82,855	80,126	1,811	2,729	1,510
28	39	65,750	65,073	1,811	0,677	0,370
29	27	70,221	71,121	1,811	-0,900	-0,500
30	5	69,333	68,019	1,811	1,314	0,730
31	6	66,272	67,520	1,811	-1,248	-0,690
32	10	69,940	67,761	1,811	2,179	1,200
33	18	60,300	57,493	1,811	2,807	1,550
34	30	89,142	87,874	1,811	1,268	0,700
35	42	75,500	73,300	1,811	2,200	1,210
36	26	49,970	51,407	1,811	-1,437	-0,790
37	2	54,430	52,420	1,811	2,010	1,110
38	16	49,172	48,357	1,811	0,815	0,450
39	15	86,280	89,887	1,811	-3,607	-1,990
40	37	60,160	63,190	1,811	-3,030	-1,670
41	19	50,327	49,644	1,811	0,682	0,380
42	28	66,230	68,020	1,811	-1,790	-0,990



Şekil 4.13. Katı kültür TYM analizi çevresel ve yüzey eğri grafikleri

Batık kültür fermantasyonunda olduğu gibi katı kültür fermantasyonu için de Tepki Yüzey Metodu ile oluşturulan deney tasarımından elde edilen veriler değerlendirildi. En uygun modelin ikinci dereceden model olduğu görüldü ve bu modelin kabul edilebilirliği ANOVA analizleri sonucu onaylandı. R-Kare değeri % 98 olarak bulundu. Buna göre

modelimiz sadece etkileşimlerin % 2'lik kısmını açıklayamamaktadır. Elde edilen sonuçlarda F değeri 48,51 olarak ve p değeri 0 olarak bulundu. F değerinin büyük olması ve bu değere ait p değerinin çok küçük olması uygulanan modelin doğruluğunu ortaya koymaktadır ve bu modelin hata yapma ihtimalinin düşük olduğunu göstermektedir. Bunun yanında ayarlanmış R-kare değeri % 96, LOF p değeri 0,767 olarak bulundu. Bu sonuçlardan elde edilen veriler ile uygulanan modelin TYM analizinde anlamlı olduklarını tespit edildi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Batık kültür sonuçlarına genel olarak bakıldığında, setlere göre en yüksek aktivite gününün değişkenlik gösterdiği tespit edildi. Genel olarak en yüksek aktiviteler, 6. gün ile 11. gün arasında ve 9 ile 25 IU/mL aralığında gözlemlendi. Setler arasında merkez olarak belirlediğimiz (bütün değişkenler için “0” sıfır değerinin kullanıldığı 2 set) en düşük aktiviteye sahip olan setler arasında yer aldı (9,94 ve 11,32 IU/mL). Set sonuçları arasında en yüksek ksilanaz aktivitesi (25,83 IU/mL) merkez sete göre 2,5 kat daha yüksek olarak belirlendi. Dolayısıyla, ölçülen en yüksek aktivitedeki artış, merkez parametrelerle elde edilen ksilanaz aktivitesine göre % 160 fazladır.

Bu sonuçlara bakarak, elde edilen veriler ile uygulanan modelin TYM analizinde anlamlı olduğunu söylemek mümkündür. Analizlerin ve modelin uygunluğu kabul edildikten sonra, artık teorik tepki değeri uygulanan modelin (Tam ikinci derece model) denkleminde hesaplanabilmektedir.

Tam İkinci Dereceden modele ait denklem aşağıda verilmektedir.

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j-2}^k \sum_{j=i+2}^k \beta_{ij} x_i x_j$$

Denklemdede;

Y : Tepki değişkeni (*Her iki kültür içinde ksilanaz aktivite değeri*)

X_i, X_j : Süreç değişkenleri ($i=1,2,\dots,k$) ve ($j=1,2,\dots,k$)

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$: Bilinmeyen regresyon parametreleri (*Şekillerde “Estimate” değerine karşılık gelen değerlerdir*)

β : Analiz programıyla hesaplanan β değerleri (batık kültür için Şekil 4.6.'da ve katı kültür için Şekil 4.12.'de sunulmaktadır.

Çizelge 5.1. Denklem 5.1. denkleminin tez çalışmasında incelenen optimizasyon süreçlerindeki karşılığı ve değerleri

	Batık Kültür		Katı Kültür	
X1	CS	-0,513	CS	11,306
X2	IA	0,621	MR	3,895
X3	NS	1,215	NS	-6,877
X4	KP	-0,159	pH	6,907
X5	NA	-0,819	IA	-2,250

Batık kültürün analizi sonucunda değişkenlerin anlamlılıklarına bakıldığında (p değerinin 0,1'den küçük olması gerekir) IA:NS, IA:KP, NS:KP ve KP:NA etkileşimlerinin anlamsız oldukları görülmektedir. Dolayısıyla bu değerlerin denklemden çıkarılması gerekmektedir. Bunlar haricindeki tüm etkileşimler ve değişkenler modelin açıklanmasında anlamlı değerlere sahiptir. Yalnız modelin eigen değerlerine baktığımızda işaretlerin karışık olduğu görülmektedir. Bunun anlamı, kritik olarak belirlenen noktaların (stationary points) eğer düzlemi (saddle point) üzerinde olduğudur (Şekil 4.6.). Modelin eş yükseklik (çevresel) eğri ve yüzey grafiklerine baktığımızda da noktaların eğer yüzeyinde olduğu tespit edilmektedir (Şekil 4.7.) ve bu kritik değerlere göre aktivite hesaplandığında teorik tepki değeri 12 IU/mL olarak bulundu. Kritik noktaların eğer düzlemi üzerinde olduğu zaten eigen analizi sonucunda biliniyordu. Bu yüzden çevresel eğri ve yüzey eğri grafikleri incelenerek yüksek aktivite verebilecek tahmini üç deney seti belirlendi. Bu setlere ait değişken ve seviyeleri Çizelge 5.2. de verilmektedir. Denenen değişkenler için en yüksek aktivitenin karbon kaynağı 4 g/mL, aşı oranı 10 mL, azot kaynağı konsantrasyonu 0,4 g/mL potasyumfosfat konsantrasyonu 0,02 g/mL, ve sodyumklorür konsantrasyonu 0,02 g/mL) değerleri olduğu tespit edildi (CS:1, IA:-1, NS:1, KP:-1 ve NA:-1). Bu değerler için tekrar hesaplama yapıldığında ise teorik aktivite 21 IU/mL olarak bulundu. Pratik aktivite değeri ise 22 IU/mL olarak tespit edildi.

Katı kültürün analizi sonucunda, CS:MR etkileşiminin anlamsız olduğu, bunun haricindeki tüm etkileşimler ve değişkenlerin modelin açıklanmasında anlamlı değerlere sahip olduğu görüldü. Modelin eigen değerlerine bakıldığında işaretlerin karışık olduğu

görülmektedir (Şekil 4.12.). Modelin eş yükseklik (çevresel) eğri ve yüzey grafiklerine baktığımızda da noktaların eğer yüzeyinde olduğu tespit edilmektedir (Şekil 4.13.) ve bu kritik değerlere göre aktivite hesaplandığında teorik tepki değeri 22 IU/g olarak bulundu. Kritik noktaların eğer düzlemi üzerinde olduğu zaten eigen analizi sonucunda biliniyordu. Bu yüzden çevresel eğri ve yüzey eğri grafikleri incelenerek yüksek aktivite verebilecek tahmini üç deney seti belirlendi. Bu setlere ait değişken ve seviyeleri Çizelge 5.2. de verilmektedir. Bu setlerde denendikten sonra en yüksek aktivite için denenen değişkenlerin değerleri karbon kaynağı 2 g/mL, aşı oranı 3 mL, azot kaynağı konsantrasyonu 0,2 g/mL nem oranı 3X mL, ve pH 5 (CS:-1, MR:1, NS:-1, pH:-1 ve IA:1) olarak gözlemlendi. Bu değerler için tekrar hesaplama yapıldığında ise teorik aktivite 24 IU/mL olarak bulundu. Hem batık kültür hem de katı kültür için istatistiksel analizler yapılarak optimizasyon çalışması tamamlandı ve teorik aktivite değerleri hesaplandı. Katı kültürün analizi sonucunda kritik değerlere göre aktivite hesaplandığında teorik tepki değeri 22 IU/g olarak bulunmuştur. Pratik aktivite değeri ise 20 IU/mL olarak tespit edildi.

Çizelge 5. 2. Batık ve katı kültürde en yüksek aktivite verebileceği tahmin edilen deney setleri ve elde edilen aktivite değerleri

Batık kültür için yüzey ve çevresel eğriler grafiğinden en yüksek aktivite elde edilebileceği tahmin edilen değişken ve seviyeleri						En yüksek Aktivite (IU/mL)	Teorik Aktivite Değeri (IU/mL)
	CS	IA	NS	KP	NA		
1. set	+1	-1	+1	-1	-1	22	21
2.set	+1	0	+1	-1	0	21	
3. set	+1	0	+1	0	0	16	
Pratik aktivite değeri 22 IU/mL							
Katı kültür için yüzey ve çevresel eğriler grafiğinden en yüksek aktivite elde edilebileceği tahmin edilen değişken ve seviyeleri						En yüksek Aktivite (IU/g)	Teorik Aktivite Değeri (IU/mL)
	CS	MR	NS	pH	IA		
1. set	-1	+1	-1	-1	+1	100	24
2.set	0	+1	0	0	0	105	
3. set	0	+1	0	-1	0	99	
Pratik aktivite değeri 20 IU/mL							

Jain ve arkadaşları (2012) yaptığı çalışmada etanol, asetat ve hidrojen üretiminde batık ve katı kültür fermantasyonları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde katı kültürün batık kültüre üstün geldiği görülmüştür. Bu çalışmayı destekler niteliğinde olan Üstok ve arkadaşlarının (2006) yaptığı araştırmaya bakıldığında Tepki Yüzey Yöntemi

kullanılarak katı substrat, aşılama oranı ve inkübasyon süresi gibi faktörlerin enzim üretimi, spor miktarı ve biyokütle üzerine etkileri incelemiştir. Ayrıca sıvı (SMF) ortamda aynı kültürle yapılan optimizasyon çalışmalarıyla karşılaştırıldığında katı (SSF) kültürün daha yüksek enzim aktivitesi elde edildiği görülmektedir. Aynı şekilde Hölker ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada 1g karbon kaynağıyla hazırlanan batık (sulu) ve katı kültür fermentasyonlarından elde edilen ksilanaz enzim aktivitesini karşılaştırılmış ve katı kültürün daha verimli olduğunu görülmüştür. Bunun nedenini ise şu şekilde açıklamışlardır. Belirli bir süreden sonra suda çözünen partiküller bünyelerinde yer alan vakuollerdeki toksik maddeleri ortama geçmesi ile fermentasyona bırakılan organizmaların ve ürettikleri enzimlerin toksik maddelerden olumsuz yönde etkilenmesidir. Benzer şekilde Ang ve arkadaşlarının (2013) yaptığı araştırma incelendiğinde ise batık kültürde karbon kaynağı olarak kullanılan substratın bünyesinde barındırdığı hemiselülozik yapılar ligninle beraber ksilanın (çalkalamalı inkübatörün çalkalama hızının büyüklüğü, fermentasyon süresince besinlerin ve organizmanın sulu ortamdaki harabiyeti, organizmanın ürettiği atık maddeler gibi) çevresel faktörlerin etkisiyle enzimlerin olumsuz etkilendiğini ortaya koymuşlardır. Bunun nedenini ise fiziksel etkilerin ksilan, ksilanaz ve organizma kayıplarına sebebiyet verdiğini söyleyerek açıklamışlardır. Buna karşılık ipliksi mantarların büyümesi için uygun bir doğal ortam koşulları sağlayan katı hal fermentasyonda bu çevresel etkiler yoktur. Katı kültür fermentasyon ortamında üretilen ksilanaz enzim özelliğinin üstünlüğünü bu şekilde açıklamışlardır.

Bu çalışmada, batık ve katı kültür ortamlarında karbon kaynağı olarak ekonomik değeri olmayan tarımsal atık mısır koçanları kullanılarak, mezofilik bir küf olan *Aspergillus terreus*'tan hücre dışı ksilanazın üretimi gerçekleştirildi. Üretilen ksilanaz aktiviteleri istatistiksel metodlar ile analiz edilerek karşılaştırıldı. Batık ve katı kültürde en yüksek aktivitenin görüldüğü değişkenler ve seviyeleri belirlendi. Katı kültür ksilanaz enzim aktivitesinin batık kültür enzim aktivitesinden daha yüksek olduğu görüldü. Elde edilen ksilanaz verimi literatürde verilen sonuçlarla genel anlamda uyumlu olduğu birçok yapılan çalışmayla görüldü.

Gawande ve Kamat 2001'de yaptığı çalışmada *A. Terreus* küfünün batık kültür fermentasyonundan (SMF) elde ettiği ksilanaz enzim aktivitesini 68,9 IU/mL, Kocabaş 2010'da yaptığı çalışmada 70 IU/mL, Sharma ve arkadaşları 2012 'de yaptığı çalışmada 10,12 IU/mL -77,54 IU/mL olarak tespit etmiştir.

Lakshmi ve arkadaşlarının 2009'da yapmış olduğu çalışmada da *A. Terreus* küfünün katı kültür fermantasyonundan (SSF) elde ettiği ksilanaz enzim aktivitesini 45-115 IU/g, Umsza-Guez ve arkadaşları 2011'de yaptığı çalışmada *Aspergillus awamori* küfünden 80-100 IU/g, Vitcosque ve arkadaşlarının 2012'de yaptığı çalışmada *Aspergillus Niger* küfünden elde ettiği ksilanaz enzim aktivitesi 47.7 IU/g, Ang ve arkadaşlarının 2013'te yaptığı çalışmada *A. Terreus* küfünün 418.70 IU/g olarak tespitetmişlerdi.

KAYNAKLAR

- Ang, S.K., Shaza, E.M., Adibah, Y., Suraini, A.A. ve Madihah, M.S., 2013. Production of Cellulases and Xylanase by *Aspergillus Fumigatus* SK1 Using Untreated Oil Palm Trunk Through Solid State Fermentation. *Process Biochemistry*, 48, 1293–1302.
- Anonim, 2015a. Enzimlerin Genel Özellikleri Nelerdir. http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Enzimler.html - (Erişim tarihi: 09.10.2015).
- Anonim, 2015b. *Aspergillus terreus* kimdir. <http://neolaki.net/kimdir-nerdir/Aspergillus-hakk%C4%B1nda.html> – (Erişim tarihi:07.10.2015)
- Anonim, 2015c. NCBI’da Xylanase *Aspergillus terreus* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/68161137?report=fasta> – (Erişim tarihi: 12.10.2015).
- Anonim, 2015d. NCBI’da Xylanase *Aspergillus terreus* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/380719870?report=fasta> – (Erişim tarihi: 12.10.2015).
- Anonim, 2015e. Sigma Aldrich Mısır Şurubu İçeriği <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c4648?lang=en®ion=TR> - (Erişim tarihi : 12.10.2015).
- Aygan, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* Sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği, *Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana.
- BALAJEE, S.A., 2009. *Aspergillus terreus* Complex, *Medical Mycology* 47 (1), S42-S46.
- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L. ve Hoondal, G., 2001. Microbial Xylanases and Their Industrial Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 326-338.

- BORSA, B.A., ÖZGÜN, G., HOUBRAKEN J. ve ÖKMEN, F., 2015. İmmün Kompetan Bir Hastada *Aspergillus protuberus*'un Neden Olduğu İlk İnatçı Vajinit Olgusu, 23. *ECCMID Kongresi* (27-30 Nisan 2013), 49(1): 130-134, Almanya.
- Castilo, L.R., Mitchell D.A. ve Freire M.G., 2009. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation, *Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), COPPE, Chemical Engineering Program, Caixa Postal 68502, 21941-972 Rio de Janeiro/RJ*, Brezilya.
- Chantasingh, D., Pootanakit, K., Champreda, V., Kanokratana, P. ve Eurwilaichitr, L., 2006. Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*, *Protein Expression and Purification*, 46, 143–149.
- Collins, T., Gerday, C. ve Feller, G., 2004. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. *Federation of European Microbiological Reviews*, 29, 3-23.
- Demir, H. ve Tarı, C., 2014. Tarıma Dayalı Sanayi Atıklarının Katı Kültür Fermantasyonu ile Değerlendirilmesi: Sürece Etki Eden Faktörlere Genel Bakış. *GIDA doi: 10.15237/gida.GD14043 Reviews*, 40 (2): 117-124.
- Dhiman, S.S., Sharma, J. ve Battan, B., 2008. Industrial Applications and Future Prospects of Microbial Xylanases. A Review. *BioResources*, 3 (4), 1377-1402.
- Gawande, P. V. ve Kamat, M. Y., 2001. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application, *Journal of Applied Microbiology*, 87 (4),511–519.
- Gilbert, H.J. ve Hazlewood, G.P. 1993. Bacterial Cellulases and Xylanases. *Journal of General Microbiology*, 139:187-194.
- Güder, S., 2014, *Scytalidium Thermophilum* Ksilanazının Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmet bey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Karaman.

- Güner, K. G., Dağlıoğlu O., 2008, Ksilanaz Enziminin Ekmek Yapımında Kullanımı, *Türkiye 10. Gıda Kongresi*; 21-23 Mayıs, 443, Erzurum.
- Hölker, U., Hölfer, M. Ve Lenz, J., 2009. Biotechnological Advantages Of Laboratory-Scale Solid-State Fermentation With Fungi. *Appl Microbiol Biotechnology*, 64, 175–186.
- İnce, E., 2006. Ksilanaz Üreten Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin İzolasyonları ve Enzimlerinin Özelliklerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Jain, A., Morlok, C.K. ve Henson, J.M., 2012., Comparison of Solid-State and Submerged-State Fermentation for the Bioprocessing of Switchgrass to Ethanol and Acetate by *Clostridium Phytofermentans*, *Appl Microbiol Biotechnol* , 97, 905–917.
- Juturu, V. ve Wu, J.C., 2012. Microbial Xylanases: Engineering, Production and Industrial Applications. *Biotechnology Advances*, 30 (6), 1219-1227.
- Kantarcıoğlu, A.S. ve YÜCEL A., 2003. *Aspergillus* cinsî mantarlar ve invaziv aspergilloz: mikoloji, patogenez, laboratuvar tanımı, antifungallere direnç ve duyarlılık deneyleri, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 34 (3),140-143.
- Kanwar, S.S. ve Devi, S., 2012. Thermostable Xylanases of Microbial Origin: Recent Insights and Biotechnological Potential. *The International Journal of Biotechnology*, 1 (1), 1-20.
- Karaköse, M., ESEN, M., 2011. Atık Mantar Kompostunun Lignoselülozik Enzim Kaynağı Olarak Kullanımı, *Özel Ege Lisesi*, İzmir.
- Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9 (1), 12-19.
- Klemm, D., Schmauder, H.P. ve Heinze, T., 2005. Cellulose., *Biopolymers Online*, Ed:Alexander Steinbüchel. Canada, 275-287.
- Kocabaş, A., 2010. Co-Production of Xylanase and Itaconic Acid by *Aspergillus terreus* NRRL 1960 on Agricultural Biomass and Biochemical Characterization of

Xylanase. *Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

- Kulkarni, N., Shendye, A. ve Rao, M., 1999. Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases, *Federation of European Microbiological Reviews*, 23, 411-456.
- Lakshmi, G.S., Rao, C.S., Rao, R.S., Hobbs, P.J. ve Prakasham, R.S., 2009. Enhanced production of xylanase by a newly isolated *Aspergillus terreus* under solid state fermentation using palm industrial waste: A statistical optimization, *Biochemical Engineering Journal*, 48, 51-57.
- Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., da Silra, MJS., Egmond, MR., Hagemans, MLD., van Garcom, RFM., Hessing, JGM., van Derhondel, C. ve van Rotterdam, C., 1992. Xylanases and their application in baking, *in: Visser J, Beldman G, van Someren MAK, Voragen AGJ*, 349-360.
- Miller, GL, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- 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, Ed:Anuj Chandel. *Intech*, Brezilya, 251-274.
- Nelson, D. ve Cox, M., 2005. Enzimler., *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Çeviri Ed: :Medret Kılıç. , *Palme Yayıncılık*, Ankara, 243-384.
- Özben, N., 2014. *Scytalidium Thermophilum*'dan Ksilanaz Üretiminin Optimizasyonu, Endüstriyel Uygulamalar için Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Karaman.
- Ratanakhanokchai, K., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Kyu, K.L., Sakka, K., Kosugi, A. , ve Mori, Y., 2013. *Paenibacillus Ccurdlanolyticus* Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization., *Biomass Now*, Ed: Miodrag Darko Matovic. *InTech*,Brazil, 369-394.

- Saltık, H., 2014. Fungal Ksilanaz Enziminin E. coli’de Rekombinant Olarak Üretilmesi, *Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat.
- Sargın, S. ve Öngen, G., 2003. Kanatlı Yemi Katkısı Olarak Kullanılan Ksilanaz Enziminin Katı Kültür Fermantasyon Yöntemi ile Üretiminde Ölçek Büyütme Çalışmaları, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40 (3), 145-152.
- Sharma, N., Burgohain, P., Kaushal, R. ve Tandon, D., 2012. Use of Microwave Pretreated Cedrus Deodara Wood Residue as a Substrate for Enhanced Production of Cellulase Free Xylanase From Geotrichum Sp. F3 Isolated From Rural Compost, *J. Microbiol. Biotech*, 2 (4), 621-631.
- Subramaniyan, S. ve Prema, P., 2002. Biotechnonology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology ve Application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22 (1), 33-46.
- Umsza-Guez, M.A., Díaz, A.B., Ory, I., Blandino, A., Gomes,E. ve Caro, I., 2011. Xylanase production by *Aspergillus awamori* under solid state fermentation conditions on tomato pomace, *Braz J Microbiol*, 42(4): 1585–1597.
- Üstok, F.I., Ttari, C. ve Göğüş, N., 2006. Katı Kültür Fermentasyon Yöntemi ile *Aspergillus ssojae* ATCC 20235 Suşundan Üretilen Pektinaz Enziminin Optimizasyonu ve Sıvı Kültür Yöntemiyle Karşılaştırılması, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, 243, Bolu.
- Vitcosque, G.L., Fonseca, R.F., Rodriguez-Zuniga, U.F., Neto, V.B., Couri, S. ve Farinas, C.S., 2012. Production of Biomass-Degrading Multienzyme Complexes under Solid-State Fermentation of Soybean Meal Using a Bioreactor, *Enzyme Research*, 248983.
- Wilson, K. ve Walker, J., 2010. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. *Cambridge University Pres*, 761 p, New York, USA.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B., 2010. Moleküler Biyoloji, *Nobel Yayın Dağıtım*, Ankara, 2, 613.

Yıldız, T., 2008, Farklı Rumen Funguslarına Ait Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Analizi. *Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.*

EKLER

EK A

KATI BESİ YERİ

Çizelge A.1. Saboroz Dextroz Agar Besiyeri Bileşikleri

Kimyasal	Konsantrasyon(g/L)
Saboroz dextroz	30
Agar	15

EK B

DNSA REAKTİFİNİN İÇERİĞİ VE İNDİRGEN ŞEKER ÖLÇÜM YÖNTEMİ

Reaktif İçeriği,

- 36 % Potasyum Sodyum Tartarat ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$)
- 1 % NaOH
- 1 % DNSA (dinitrosalisilik asit)
- 0.2 % Fenol
- 0.05 % Sodyum sülfid (Na_2SO_3)

Reaktif karanlık şişe içerisinde $4^\circ C$ 'de saklanmalıdır.

Yöntem,

- Enzim ve substrat 1:10 oranında karıştırılır.
- 1,5 mL DNSA bulunan tüpler içerisine, 1 mL örnek ilave edilir.
- Tüpler beş dakika kaynayan su banyosunda tutulur ve süre bitiminde hemen buz banyosunda soğutulur.

Tüpler oda sıcaklığına dengelenir ve bir kör numuneye karşı 540 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede okutulur.

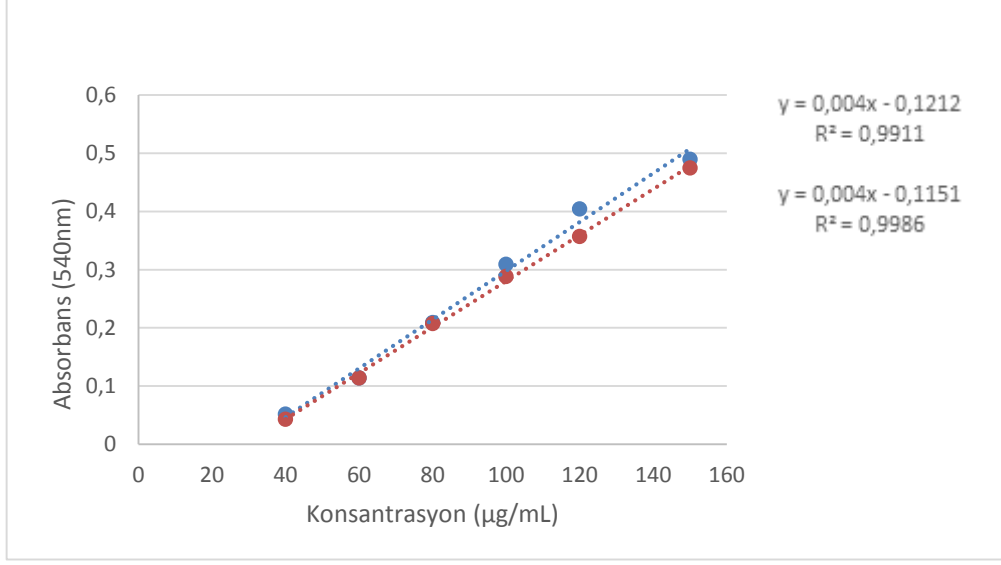
EK C

KSİLOZ STANDART EĞRİSİ

Standart olarak kullanılan 1 mg/mL ksiloz çözeltisi saf su içerisinde hazırlanmış ve -20°C sıcaklıkta stoklanarak saklanmıştır. Stok çözeltilerden distile su ile uygun şekilde seyreltme yapılarak 0-20-40-60-80-100-120-160 µg/mg konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Konsantrasyona bağlı şeker miktarı, 60°C sıcaklıkta 1 mL standart çözeltinin 1,5 mL DNS ile karıştırılmasıyla belirlenmiştir. Şeker miktarına bağlı renk oluşumu 5 dakika kaynatılıp buz banyosunda soğutulmuş gözlemlenmiştir. Renk oluşumu spektrofotometrik olarak 540 nm dalga boyunda absorbans değeri ile ölçülmüş ve standart ksiloz eğrisi elde edilmiştir.

Çizelge C. 1. Ksiloz Seyreltme

Kons. (µg/mL)	Saf su (mL)	Stok ksiloz (mL)	Stok kons. (µg/mL)
0	1	0	
40	0,6	0,4	100
60	0,4	0,6	
80	0,2	0,8	
100	0,5	0,5	200
120	0,4	0,6	
150	0,25	0,75	



Şekil C.1. DNSA Yöntemi ile elde edilen ksiloz standart eğrisi

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Nermin GÜMÜŞTAŞ
Doğum Tarihi ve Yer : 12.06.1986 / TARSUS
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 05459523249
e-mail : nermingumustas@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Niğde Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2010
	Fırat Üniversitesi, Pedagojik Formasyon	2011
Lise	Hacı Dudu Mehmet Gebizli Lisesi	2005

Kongreler

Kongre Adı	Şehir	Tarih
22. Ulusal Biyoloji Kongresi	ESKİŞEHİR	23-27 Haziran 2014
International Congress of Molecular Biology and Biotechnology	SARAY BOSNA	02-06 Haziran 2014