

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**YERLİ İZOLAT BAZI *BACILLUS* TÜRLERİ KULLANILARAK FARKLI
GIDA VE TARIM ATIKLARINDAN KSİLANAZ ÜRETİMİNİN
OPTİMİZASYONU**

Fatma GÜLER

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2020**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Fatma GÜLER tarafından hazırlanan “Yerli İzolat Bazı *Bacillus* Türleri Kullanılarak Farklı Gıda ve Tarım Atıklarından Ksilanaz Üretiminin Optimizasyonu” adlı tez çalışması 13/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Kamuran AYHAN
Ankara Üniversitesi/Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK
Ankara Üniversitesi/Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Ferruh ERDOĞDU
Ankara Üniversitesi/Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Hüseyin ERTEN
Çukurova Üniversitesi/Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ
Hacettepe Üniversitesi/Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı



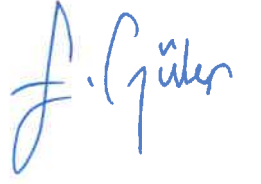
Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

13/01/2020



Fatma GÜLER

ÖZET

Doktora Tezi

YERLİ İZOLAT BAZI *BACILLUS* TÜRLERİ KULLANILARAK FARKLI GIDA VE TARIM ATIKLARINDAN KSİLANAZ ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU

Fatma GÜLER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

Tez çalışması kapsamında toprak, buğday kepeği, çürümüş saman, fıstık kabuğu, buğday sapı, nohut mayası, bitki atıkları, meyve atıkları, elma posası, ekşi hamur mayası ve fıstık kabuğundan 66 adet yerli bakteri örneği izole edilmiştir. İzolatların 39 adedinin Gram pozitif ve basil hücre morfolojisine sahip olduğu, bu izolatların *Bacillus* cinsine ait olabileceği; yüksek ksilanaz aktivitesi gösteren 8 izolatın (3, 39, 45, 46, 64, 65, 66, 67 nolu izolatlar), 16S rRNA testi sonucunda tamamının *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir.

Yüksek ksilanaz aktivitesi gösteren 39 numaralı (13,33 U/mL) ve 67 numaralı (5,57 U/mL) izolatlar seçilerek; çalışmanın Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimizasyon aşaması için, ksilanaz aktivitesine sahip referans bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ile birlikte kullanılmıştır. 39, 67 numaralı izolatlar ve referans bakteri ile ksilanaz enziminin üretimi için besiyeri başlangıç pH değeri, karıştırma devri ve inkübasyon sıcaklığı parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiş olup; bu parametreler Horikoshi besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimize edilmiştir. Optimizasyon denemeleri sonucunda, 39 numaralı izolatın optimum ksilanaz enzim üretim noktası 135 rpm, 30°C ve pH 8; 67 numaralı izolatın optimum ksilanaz üretim noktası ise 127 rpm, 30°C, pH 8 olarak belirlenmiştir. Optimizasyon ile 39 numaralı izolatın enzim aktivitesini 1,31 kat, 67 numaralı izolatın ise 4,21 kat arttırdığı görülmüştür.

Optimum enzim üretim parametrelerinde, Horikoshi besiyerine %2, %5 ve %7 oranlarında, ayrı ayrı elma posası, buğday kepeği ve mısır koçanı ilave edilerek ksilanaz üretimi gerçekleştirilmiştir. En yüksek ksilanaz aktivitesi değerleri, %5 oranında elma posası ilave edilmiş besiyerinde elde edilmiş olup; 39 numaralı izolat için 12,16 U/mL, 67 numaralı izolat için 12,26 U/mL olarak bulunmuştur.

Ocak 2020, 135 sayfa

Anahtar kelimeler: *Bacillus*, ksilanaz, Yanıt Yüzey Yöntemi, optimizasyon, enzim üretimi, gıda ve tarım atıkları

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

OPTIMIZATION OF XYLANASE PRODUCTION FROM DIVERSE AGRICULTURAL WASTES BY INDIGENOUS ISOLATES OF *BACILLUS* SPECIES

Fatma GÜLER

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK

In this thesis, 66 indigenous bacteria samples were isolated from soil, wheat bran, rotten straw, peanut shell, wheat stalk, chickpea dough, plant waste, fruit waste, apple pomace, sour dough, peanut shell. 39 of the bacteria isolates were Gram positive, had *Bacillus* cell morphology and produced spore. 8 of isolates (isolate number: 3, 39, 45, 46, 64, 65, 66, 67), which showed high xylanase activity, were identified as *Bacillus* according to 16S rRNA sequence analysis.

The isolates showing high xylanase activity, isolate no. 39 and 67 with xylanase activity of 13.33 and 5.57 U/mL, respectively, were selected for the optimization step of xylanase production along with the reference xylanase producing strain, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Initial medium pH, agitation speed and incubation temperature parameters were selected as an independent variable and were optimized by using Response Surface Methodology in Horikoshi medium. The optimum xylanase enzyme production points were determined as 135 rpm, 30°C and pH 8 for isolate no. 39; 127 rpm, 30°C, pH 8 for isolate no. 67. With the optimization, isolate no. 39 and 67 increased its xylanase activity 1.31 times and 4.21 times, respectively.

At optimum enzyme production conditions, xylanase production was performed by adding apple pomace, wheat bran and corn cob separately into medium by the ratio of 2%, 5% and 7%. The highest xylanase activity was achieved by the supplementation of 5% apple pomace to the growth medium, and it was 12.16 U/mL for the isolate no. 39 and 12.26 U/mL for the isolate no. 67.

January 2020, 135 pages

Key words: *Bacillus*, xylanase, Response Surface Methodology, optimization, enzyme production, food and agricultural wastes

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam sırasında desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Filiz ÖZÇELİK'e (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı), Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. Hüseyin ERTEN (Çukurova Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. Ferruh ERDOĞDU (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) hocalarıma; tezimi değerlendirerek düzeltilmesine katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Kamuran AYHAN (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ (Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) hocalarıma; çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşan Sayın Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı), Sayın Dr. Öğr. Üyesi N. Işık SEMERCİ (Ankara Üniversitesi, Enerji Mühendisliği Anabilim Dalı), Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOKATLI (Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Sayın Arş. Gör. Dr. Simel BAĞDER ELMACI (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı) hocalarıma; doktora eğitimim sırasında bana beraber çalışma fırsatını veren Sayın Prof. Dr. Eva NORDBERG KARLSSON (Lund Üniversitesi, Biyoteknoloji Birimi) ve Sayın Prof. Dr. Raf DEWIL (KU Leuven, Kimya Mühendisliği Bölümü) hocalarıma; laboratuvar desteğinden dolayı Sayın Arş. Gör. Bilal AĞIRMAN'a (Çukurova Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı); eğitim hayatım boyunca motivasyonlarını eksik etmeyen değerli arkadaşlarım Seval ERDOĞAN KOÇ, Bilgihan BABATÜRK, Pınar GÖKALP ELFETKUYU, İrem Nur Gamze ÖZBİLGİN ve Merve Sılanur YILMAZ'a; eğitim hayatımda ve kararlarımda beni her zaman destekleyen sevgili annem Ayşe GÜLER, babam İbrahim GÜLER, kardeşlerim Nermin ERDİN, Kevser ZEKİ, Mustafa GÜLER'e ve eğitim hayatım boyunca kıymetli bilgileri ile hayatıma vizyon ve değer katmış öğretmenlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması 18L0443001 proje kodu ile Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından desteklenmiştir.

Fatma GÜLER
Ankara, Ocak 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Enzim Üretimi ve Ekonomik Potansiyeli	5
2.2 Enzimlerin Yapısı ve Sınıflandırılması	7
2.3 Gıda Sanayisinde Enzim Kullanımı	8
2.4 Ksilanaz Kullanım Alanları	9
2.5 Endüstriyel Enzim Üretim Prosesi	12
2.6 Lignoselülozik Atıklar	16
2.7 Ksilanaz Üretimi.....	18
2.8 <i>Bacillus</i> Türleri ile Yapılan Ksilanaz Çalışmaları	21
2.9 Ksilanaz Üretimine Etki Eden Faktörler	25
2.10 Deneysel Tasarım	27
2.10.1 Yanıt Yüzey Yöntemi.....	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	33
3.1 Materyal.....	33
3.1.1 Çalışmada kullanılan izolatlar	33
3.1.2 Gelişme ve muhafaza besiyerleri	34
3.1.3 Ksilanaz üretim besiyerleri	34
3.1.4 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda ve tarımsal atıklar	35
3.2 Yöntem	36
3.2.1 İzolasyon	36
3.2.2 Gram boyama ve koloni morfolojisinin belirlenmesi	36
3.2.3 <i>Bacillus</i> cinsine ait olan örneklerin saptanması	37

3.2.4 Ksilanaz aktivitesi tayini	38
3.2.5 İzolatların ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi.....	40
3.2.6 İzolatların büyük hacimde geliştirilerek aktivitelerinin belirlenmesi ve genotipik tanımlanması yapılacak izolatların seçilmesi.....	40
3.2.7 İzolatların genotipik tanımlanması	40
3.2.8 Optimum gelişme parametrelerinin Horikoshi besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi ile belirlenmesi.....	42
3.2.9 Toplam proteinin belirlenmesi.....	43
3.2.10 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda ve tarımsal atıkların hazırlanması	44
3.2.11 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda ve tarım atıklarının bileşim analizi.....	46
3.2.12 Yanıt Yüzey Yöntemi ile deney tasarımı ve gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde ksilanaz üretimi	50
3.2.13 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda/tarımsal atık konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi.....	52
3.2.14 İstatistiksel yöntemler	53
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	54
4.1 Değişik Kaynaklardan Bakterilerin İzolasyonu ve Gram Boyama Testi Sonuçları.....	54
4.2 İzolatların Spor Varlığının Belirlenmesi Analizi Sonuçları.....	55
4.3 Ksilanaz Aktivitesine Sahip İzolatların Belirlenmesi	56
4.4 İzolatların Hücre ve Koloni Morfolojilerinin Belirlenmesi.....	58
4.5 İzolatların Ksilanaz Aktivite Değerleri	63
4.6 İzolatların 16S rRNA Gen Dizi Analizi ile Cins ve Türlerinin Belirlenmesi.....	65
4.7 Filogenetik Ağaç Çizimi.....	66
4.8 İzolatlarla Ksilanaz Enzimi Üretiminde Yanıt Yüzey Yöntemi Analiz Sonuçları.....	66
4.9 İzolatlarla Ksilanaz Enzimi Üretiminde Yanıt Yüzey Yöntemi Varyans Analizi Sonuçları.....	69
4.10 İzolatların Ksilanaz Aktivitesine Ait Yanıt Yüzey Grafiklerinin Değerlendirilmesi.....	77

4.11 Horikoshi Besiyerinde Ksilanaz Üretimi için Optimum Noktanın Belirlenmesi	82
4.12 Ksilanaz Üretim Besiyerine İlave Edilen Gıda ve Tarımsal Atıkların Bileşim Analizi Sonuçları	85
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	99
KAYNAKLAR	104
EKLER	119
EK 1 16S rRNA PCR Ürünlerinin Agoroz Jeldeki Görünümleri	120
EK 2 Çalışmada İzole Edilen Bakteri Örneklerinin Baz Dizilimleri	121
EK 3 Çalışmada Kullanılan Gıda ve Tarımsal Atıkların Bileşimi	127
EK 4 39 Numaralı İzolata ait Farklı Oranlarda Gıda/Tarımsal Atık İlave Edilen Besiyerindeki Ksilanaz Aktivitesi Varyans Analizi ve Çoklu Karşılaştırma Sonuçlarının Çizelgeleri	128
EK 5 67 Numaralı İzolata ait Farklı Oranlarda Gıda/Tarımsal Atık İlave Edilen Besiyerindeki Ksilanaz Aktivitesi Varyans Analizi ve Çoklu Karşılaştırma Sonuçlarının Çizelgeleri	131
ÖZGEÇMİŞ	134

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
dk	Dakika
rpm	Dakikada devir
U	Enzim ünitesi
g	g-kuvveti
g	Gram
v/v	Hacim/hacim
KDa	Kilodalton
kg	Kilogram
w/v	Kütle/hacim
w/w	Kütle/kütle
L	Litre
m ³	Metreküp
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ mol	Mikromol
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molarite
nm	Nanometre
N	Normalite
R ²	Regresyon Katsayısı
sn	Saniye
°C	Santigrat
cm	Santimetre

Kısaltmalar

ABS	Absorbans
ATP	Adenozin Trifosfat
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
BSA	Bovine Serum Albumin
TSB	Tryptic Soy Broth
CuSO ₄	Bakır Sülfat
FeSO ₄	Demir Sülfat

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTSB	Diluted Tryptic Soy Broth
DNS	Dinitrosalisilik Asit
Na ₂ HPO ₄	Disodyum Fosfat
EC	Enzim Komisyonu (Enzyme Commission)
GDO	Genetiği Değiştirilmiş Organizma
HCl	Hidroklorik Asit
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
CO ₂	Karbondioksit
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
MnCl	Mangan Klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum Bihidrojen Fosfat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PCA	Plate Count Agar
rDNA	Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
NAOH	Sodyum Hidroksit
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NaCl	Sodyum Klorür
H ₂ SO ₄	Sülfürik Asit
UV	Ultraviyole
RSM	Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Endüstriyel ölçekte enzim üretim prosesi.....	14
Şekil 2.2 Bitki hücresinin temel yapısı	17
Şekil 2.3 Ksilanın yapısı ve enzimlerin etki ettiği bölgeler	18
Şekil 3.1 Ksiloz standart kurvesi.....	39
Şekil 3.2 BSA standart kurvesi	44
Şekil 3.3 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda/tarımsal atıkların öğütülmesinde ve elenmesinde kullanılan cihazlar a) Öğütücü, b) Blender, c) Laboratuvar tipi değirmen, d) Elek sistemi	45
Şekil 3.4 Glikoz standart kurvesi	48
Şekil 3.5 Ksiloz standart kurvesi.....	48
Şekil 3.6 Arabinoz standart kurvesi	48
Şekil 4.1 3, 39, 43, 44, 45 ve 46 nolu izolatların Nutrient Agar besiyerinde 28°C’de 24 saat inkübasyon sonucu elde edilen tek koloni morfolojisi	60
Şekil 4.2 48, 63, 64, 65, 66 ve 67 nolu izolatların Nutrient Agar besiyerinde 28°C’de 24 saat inkübasyon sonucu elde edilen tek koloni morfolojisi	61
Şekil 4.3 İzolatların Gram boyama sonucu ışık mikroskopundaki hücre morfolojisi görüntüsü (a-39, b-48, c-63 numaralı izolatlar).....	62
Şekil 4.4 a) İzolatların TSB besiyerinde 28°C’de 24 saat inkübasyon sonucu gelişme görünümü, b) 39 numaralı izolatın TSB Broth besiyerindeki gelişme görünümü ve besiyeri yüzeyinde zar görüntüsü	63
Şekil 4.5 Yerli izolatların filogenetik ağaç üzerinde gösterimi.....	66
Şekil 4.6 39 nolu izolata ait Horikoshi besiyerinde elde edilen ksilanaz aktivitesi deneysel sonuçlarıyla model sonuçlarının karşılaştırılması	72
Şekil 4.7 67 nolu izolata ait Horikoshi besiyerinde elde edilen ksilanaz aktivitesi deneysel sonuçlarıyla model sonuçlarının karşılaştırılması	74
Şekil 4.8 39 nolu izolata ait, inkübasyon sıcaklığı (°C) ve karıştırma devrinin (rpm) ksilanaz enzim aktivitesine etkisi	77
Şekil 4.9 39 nolu izolata ait, besiyeri başlangıç pH değeri ve inkübasyon sıcaklığının (°C) ksilanaz enzim aktivitesine etkisi.....	78

Şekil 4.10 39 nolu izolatta, besiyeri başlangıç pH değeri ve karıştırma devrinin (rpm) ksilanaz enzim aktivitesine etkisi.....	79
Şekil 4.11 67 nolu izolatta, inkübasyon sıcaklığı (°C) ve karıştırma devrinin (rpm) ksilanaz enzim aktivitesine etkisi.....	80
Şekil 4.12 67 nolu izolata ait, inkübasyon sıcaklığı (°C) ve besiyeri başlangıç pH değerinin ksilanaz enzim aktivitesine etkisi.....	81
Şekil 4.13 67 nolu izolata ait, besiyeri başlangıç pH değeri ve karıştırma devrinin (rpm) ksilanaz enzim aktivitesine etkisi.....	81
Şekil 4.14 39 nolu izolat ile ksilanaz üretimi için bağımsız değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile hesaplanan optimum değerleri.....	82
Şekil 4.15 67 nolu izolat ile ksilanaz üretimi için bağımsız değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile hesaplanan optimum değerleri.....	83
Şekil 4.16 39 ve 67 nolu izolatlara ait ksilanaz üretiminin Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimizasyonu öncesi ve sonrası elde edilen ksilanaz aktivite değerleri (U/mL).....	84
Şekil 4.17 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen kurutup öğütülmüş gıda ve tarımsal atıkların görüntüsü. Soldan sağa; elma posası, mısır koçanı, buğday kepeği.	85
Şekil 4.18 39 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde pH 6,1, 135 rpm, 30°C’de gelişme koşullarındaki ksilanaz aktivitesi (U/mL).....	94
Şekil 4.19 67 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde pH 8, 127 rpm, 30°C gelişme koşullarındaki ksilanaz aktivitesi (U/mL).....	95
Şekil 4.20 39 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde pH 6,1, 135 rpm, 30°C’de gelişme koşullarındaki ksilanaz aktivitesi ve spesifik aktivite sonuçları, (EP: Elma posası, BK: Buğday kepeği, MK: Mısır koçanı).....	97
Şekil 4.21 67 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde pH 8, 127 rpm, 30°C gelişme koşullarındaki ksilanaz aktivitesi ve spesifik aktivite sonuçları, (EP: Elma posası, BK: Buğday kepeği, MK: Mısır koçanı).....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Enzimlerin sınıflandırılması.....	8
Çizelge 2.2 Ksilanazı ticari olarak üreten başlıca firmalar ve kullanıldığı ürünler	10
Çizelge 3.1 Kullanılan izolatlar ve elde edildiği kaynaklar	33
Çizelge 3.2 Horikoshi besiyeri bileşimi	35
Çizelge 3.3 Gıda/tarımsal atık ilaveli besiyeri bileşimi	35
Çizelge 3.4 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda ve tarımsal atıkların temin edildiği kaynaklar	36
Çizelge 3.5 Modifiye DTSB Agar besiyeri bileşimi	38
Çizelge 3.6 Modifiye DTSB besiyerine eklenen tuz çözeltisi	38
Çizelge 3.7 Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri	43
Çizelge 3.8 Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımı	44
Çizelge 3.9 39 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri.....	51
Çizelge 3.10 39 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımı	51
Çizelge 3.11 67 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri.....	52
Çizelge 3.12 67 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımı	53
Çizelge 4. 1 İzolatların Gram boyama sonuçları.....	54
Çizelge 4.2 İzolatların spor varlığının belirlenmesi analizi sonuçları.....	56
Çizelge 4.3 İzolatların ksilanaz aktivite sonuçları (U/mL)	57
Çizelge 4.4 İzole edilen bakteri örneklerinin hücre ve koloni morfolojileri.....	58
Çizelge 4.5 İzolatların 50 mL Horikoshi besiyerindeki ksilanaz aktivite sonuçları	64
Çizelge 4.6 Çalışmada izole edilen bakteri örneklerinin 16S rRNA dizi analiz sonuçları.....	65

Çizelge 4.7 39 nolu izolata ait Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeli ile yapılan deney tasarımı sonuçları	68
Çizelge 4.8 67 nolu izolata ait Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeli ile yapılan deney tasarımı sonuçları	68
Çizelge 4.9 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 referans suşa ait Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeli ile yapılan deney tasarımı sonuçları	69
Çizelge 4.10 39 nolu izolata ait Yanıt Yüzey Yöntemi ile belirlenen tahminlenen regresyon katsayıları	70
Çizelge 4.11 39 nolu izolata ait Yanıt Yüzey Yöntemi varyans analizi sonucu	71
Çizelge 4.12 67 nolu izolata ait Yanıt Yüzey Yöntemi ile belirlenen tahminlenen regresyon katsayıları	73
Çizelge 4.13 67 nolu izolata ait Yanıt Yüzey Yöntemi varyans analizi sonucu	73
Çizelge 4.14 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 referans suşa ait Yanıt Yüzey Yöntemi ile belirlenen tahminlenen regresyon katsayıları	75
Çizelge 4.15 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 referans suşa ait Yanıt Yüzey Yöntemi varyans analizi sonucu	76
Çizelge 4.16 Şeker standart çözeltilerinin HPLC cihazında 0,5 mL/dk akış hızındaki alıkonma zamanları	85
Çizelge 4.17 Ksilanaz üretiminin Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimizasyonu amacıyla ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda/tarımsal atıkların bileşimi	86
Çizelge 4.18 39 nolu izolata ait elma posası ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımı sonuçları	89
Çizelge 4.19 39 nolu izolata ait elma posası ilaveli besiyerindeki Yanıt Yüzey Yöntemi analiz sonuçları	89
Çizelge 4.20 39 nolu izolata ait elma posası ilaveli besiyerindeki Yanıt Yüzey Yöntemi varyans analizi sonucu	90
Çizelge 4.21 67 nolu izolata ait elma posası ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımı sonuçları	91
Çizelge 4.22 67 nolu izolata ait elma posası ilaveli besiyerindeki Yanıt Yüzey Yöntemi analiz sonuçları	92
Çizelge 4.23 67 nolu izolata ait elma posası ilaveli besiyerindeki Yanıt Yüzey Yöntemi varyans analizi sonucu	92

1. GİRİŞ

Enzimler gıda, tekstil, kağıt, deri, kozmetik, medikal, deterjan ve yem sanayisi gibi çeşitli sanayi dallarında işlem yardımcısı olarak kullanılan protein yapıda biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin gıda ve içecek sanayisinde kullanılma hacmi diğer alanlara göre daha büyük paya sahiptir. 200 mikrobiyel enzim ticari olarak kullanılmakta olup bunlardan 20 çeşit enzimin endüstriyel ölçekte üretildiği bildirilmiştir (Sarrouh vd. 2012). Enzim üretiminin biyokimyası, fermantasyon prosesi ve geri kazanım metotlarının daha detaylı anlaşılmasıyla endüstriyel üretimin artacağı düşünülmektedir. Ülkemizde TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) istatistikleri 2016 yılının ilk 6 ayında 7500 ton enzim ithalatı yapıldığını ve maliyetinin 219,6 milyon TL olduğunu göstermekte olup, bu istatistiklerden enzim ithalat maliyetinin oldukça yüksek olduğu görülebilmektedir (Anonim 2016). Bu nedenle, bu alanda geliştirilecek prosesler katma değerli ürün üretimi açısından gelecek vaat etmektedir.

Enzimler, önceleri bitki ve hayvan dokularından elde edilirken, günümüzde daha çok mikroorganizmalar kullanılarak üretilmektedir. Endüstride katalitik fonksiyonları, belirli substratlara spesifik olmaları, çeşitli proses koşullarında çalışabilmeleri ve çevre dostu olmaları sebebiyle kimyasallara oranla daha çok tercih edilmektedir. Ksilanaz enziminin üretimi ilk olarak *Aspergillus foetidus* küfü kullanılarak gerçekleştirilmiş; ardından farklı küf, bakteri ve maya kullanılarak üretildiği ve saflaştırıldığı bildirilmiştir (Whistler ve Masak 1955). Üretimde en çok *Aspergillus*, *Penicillium*, *Bacillus*, *Trichoderma* ve *Streptomyces* cinsleri üzerinde durulmuş olup, bu türlere ait çalışmalar bulunmaktadır (Fengxia vd. 2008, Juturu ve Wu 2012, Kumar vd. 2012, Murugan vd. 2015, Anthony vd. 2016, Adıgüzel ve Tuncer 2016a, Boonchuay vd. 2016). Küfler ile yapılan enzim üretiminin uzun generasyon süresi, yüksek viskozitedeki polimerleri sentezlemeleri ve düşük oksijen transferinden dolayı zor olduğu bildirilmiştir (Annamalai vd. 2009). Enzim üretiminde *Bacillus* türlerinin ürünü doğrudan fermantasyon ortamına bırakmaları nedeniyle saflaştırma maliyeti açısından avantaj sağladıkları; kolay izole edilebilme ve tanımlanabilme, hızlı gelişme ve kısa fermantasyon süresinden dolayı tercih edildikleri bildirilmiştir (Çerçi vd. 2011). Bu

nedenle ksilanaz üretiminde, diğer mikroorganizmalara kıyasla, *Bacillus* türlerinin öne çıktığı görülmekte olup; bu çalışmada *Bacillus* türleri tercih edilmiştir.

Ksilanaz enzimi genel olarak gıda, kağıt, yem üretimi ve atık su arıtım proseslerinde kullanılmaktadır. Gıda sanayisinde işlem yardımcısı olarak kullanılan ksilanaz enzimi, ekmek üretiminde hacim artışını sağlamakta, hamuru daha yumuşak hale getirerek makineyle işlenebilirliğini kolaylaştırmaktadır. Meyve ve sebze suyu üretiminde pektinazlarla birlikte berraklaştırma amaçlı kullanılmaktadır. Bira üretiminde arpanın hidrolize olmasını kolaylaştırmakta, vizkoziteyi düşürerek bulanıklığın azaltılmasını sağlamaktadır. Diğer önemli bir kullanım alanı ise yem endüstrisidir (Kıran vd. 2006). Ayrıca, prebiyotik özellik gösteren fonksiyonel ksilooligosakkaritlerin üretiminde de kullanılmaktadır (Aronsson vd. 2017). Kağıt endüstrisinde ksilanazla ön işlem yapılması, ağartma kimyasallarından klor bileşiklerinin önemli derecede indirgenmesine ve çevre kirliliğinin azaltılmasına olanak sağlamıştır (Christov vd. 1999).

Endüstriyel enzim üretim aşamaları; inoküle edilecek mikroorganizmanın aktif hale getirilmesi, fermantasyon, enzimin fermantasyon ortamından ayrılması, saflaştırılması ve piyasada satılabilir ticari formülasyon haline getirilmesi olarak sıralanabilmektedir (Whitehurst ve Oort 2010). Enzim üretiminde fermantasyon ortamında substrat olarak çeşitli kimyasal formülasyonlar kullanılmakta, bu substratların enzim üretim maliyetinin %30-40'ını oluşturduğu belirtilmektedir. Dolayısıyla; substrat maliyetini düşürmek amacıyla gıda prosesleri sonucu arta kalan ya da tarımsal faaliyetler sonucu oluşan lignoselülozik atıkların enzim üretiminde substrat olarak değerlendirilmesi hem ekonomi hem de çevre açısından avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle; bu çalışmada da ülkemizde gıda sanayide en fazla açığa çıkan atıklardan olan elma posası ve içerdiği ksilan miktarından dolayı substrat olarak kullanıldığında daha yüksek ksilanaz aktivitesi gösterdiği bildirilen tarımsal atıklardan mısır koçanı ve buğday kepeği atıkları ksilanaz üretim ortamında karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Mikrobiyel enzimler, doğal ya da rekombinant olsalar dahi kontrollü koşullarda fermantasyon işlemiyle üretilmektedirler (Çerçi vd. 2011). Günümüzde endüstriyel enzimlerin genetiği değiştirilmiş organizmalardan (GDO) üretildiği bilinmekle beraber

hem GDO hem de genetiği değiştirilmemiş organizmaların bir takım avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Rekombinant olan mikroorganizmalar yüksek verimde enzim sentezleme, son ürün saflığının yüksek olması gibi üretici için çeşitli avantajlar sunmakta olup, daha çok tercih edilmektedir (Whitehurst ve Oort 2010). Öte yandan, genetiği değiştirilmemiş mikroorganizmaların en önemli avantajı ise tüketici tarafından yüksek kabul görmesidir. Bu çalışmada yerli izolatlar kullanılarak ksilanaz enziminin üretimi çalışılmıştır.

Enzim üretiminde biyoproses koşullarının optimize edilmesi, proses ekonomisi ve verimi açısından önem taşımaktadır. Bu sebeple, deneysel çalışmalara etki eden değişkenlerin belirlenmesi gerekmektedir. Ancak birden fazla değişken bulunması ve bu değişkenlerin etkisini incelemek çalışmayı güç hale getirmekte, bu nedenle deneysel tasarımlardan yararlanılmaktadır (Muluk vd. 2009, Baş 2010). Böylece, bağımlı değişken üzerine etki eden koşullar düzenlenmektedir. Doğru bir tasarım, belirli sayıdaki deneyden maksimum bilgi elde edilmesine olanak vermektedir. Deneysel tasarım yöntemlerinden bazıları tam faktöriyel tasarımlar, kısmi faktöriyel tasarımlar, rastsallaştırılmış tasarımlar, Plackett-Burman tasarımları, Yanıt Yüzey Tasarımları gibi tasarımlardır (Büyüktopçu 2012). Ksilanaz ile ilgili çalışmalarda enzim aktivitesi çok çeşitli değerlerde bulunmuş olup, bu durum enzim üretiminde başta kullanılan mikroorganizmanın özellikleri gibi enzim aktivitesini etkileyen birçok proses değişkeni olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada, literatürde ksilanaz üretimi ile ilgili çalışmalarda en yaygın kullanılan Yanıt Yüzey Yöntemi deneysel tasarımı proses koşullarını optimize etmek amacıyla kullanılmıştır.

Bu çalışmanın temel amacı ülkemizin farklı bölgelerden ve farklı kaynaklardan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin ksilanaz aktivitelerinin belirlenmesi, ksilanaz üretim potansiyeli gösteren izolatların moleküler olarak tanımlanması ve ülkemiz kültür koleksiyonuna kazandırılmasıdır. Yanıt Yüzey Yöntemi deneysel tasarımı ile inkübasyon sıcaklığı, karıştırma devri ve besiyeri başlangıç pH değerleri bağımsız değişkenlerinin ksilanaz aktivitesine etkisi incelenmiş olup enzim üretim koşullarının optimize edilmesi hedeflenmiştir. Optimum fermantasyon parametrelerinin

belirlenmesinden sonra, seçilen gıda ve tarım atıklarının fermantasyon ortamında karbon kaynağı olarak kullanılması olanakları araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Enzim Üretimi ve Ekonomik Potansiyeli

Enzimler, biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen biyolojik katalizörlerdir. Büyük çoğunluğu protein yapıdadır. Kimyasal reaksiyonların hızını arttırarak kendileri değişmeksizin reaksiyondan çıkmaktadırlar. Enzimler birçok endüstriyel proseste işlem yardımcısı olarak kullanılmaktadır. Kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi için gereken aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandırırlar. Enzimler, önceleri bitki ve hayvan dokularından elde edilirken biyoteknoloji çalışmalarının gelişmesiyle elde edildiği kaynaklar ve enzim çeşitleri de artmıştır. Endüstride enzimler katalitik fonksiyonları, belirli substratlara spesifik olmaları ve çeşitli proses koşullarında çalışabilmelerinden dolayı kimyasallara göre tercih edilebilir hale gelmiştir. Analitik çalışmalarda yüksek saflıkta enzim kullanılırken, sanayide kısmi saflaştırılmış enzimler kullanılmakta ve büyük bir çoğunluğu mikroorganizmalardan üretilmektedir.

Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak gıda proseslerinin iyileştirilmesi yönündeki çabalar uzun yıllardır sürmektedir. Enzim, emülsüfayır ve starter kültürler gıdanın fonksiyonunu iyileştirmede, besleyici değeri, tat, tekstür ve duyuşal özelliklerinin geliştirilmesinde kullanılan biyoteknolojik ürünlerdir. Günümüzde yeni ürün geliştirme ve üretim maliyetinin düşürülmesi amacıyla enzimler gıda proseslerinde etkin şekilde rol oynamakta, gıda sanayisinde ekmek, peynir ve alkollü içecek üretiminde kullanılmaktadır. Gıda proseslerinde enzimler geleneksel üretimde kullanılan sentetik kimyasallara alternatif olup, reaksiyonlarının spesifik olmasından dolayı daha az yan ürün oluşturmaları çevre dostu olmalarını sağlamakta ve enerji kullanımını azaltmaktadır. Enzimlerin belirli koşullarda çalışma özelliği gıdanın bileşimini bozabilecek proses koşullarının oluşmasını da engellemektedir (Whitehurst ve Oort 2010).

Enzimlerin kullanım alanları gıda üretiminin yanısıra, kâğıt endüstrisi, kişisel bakım ürünleri, yem, deri, kozmetik, medikal, deterjan, tekstil sanayileri ve genetik çalışmalar olarak sayılabilmektedir (Schafer vd. 2007). Danimarkalı araştırmacı Christian Hansen

peynir üretiminde kullanılmak üzere buzağuların midelerinden rennin (kimosin) ekstrakte ederek endüstriyel enzim çalışmalarının ilk adımını atmıştır. Tüm dünyada, 1980-1983 yılları arasında bu konuda çalışan 300 küçük ölçekli firma mevcut iken, biyoteknoloji konusunda çalışmaların artmasıyla şirketlerin sayısında artış gözlenmiştir. Toplam 1200 firmanın enzim üretimi konusunda faaliyet gösterdiği bildirilmektedir. Firma sayısı Amerika'da en fazla iken, Japonya ve Kanada da bu konuda ön sıralarda yer almaktadır (Kıran vd. 2006). Enzim kullanımının gıda ve diğer sanayi dallarındaki yaygınlığı ve ekonomik değeri arttıkça endüstriyel enzim üretimi konusu önemli çalışma alanı haline gelmiştir. Endüstriyel enzim üretiminin yapıldığı ülke sayısının düşük olması, diğer pek çok ülkenin bu konuda dışa bağımlı olduğunu göstermektedir (Wiseman 1987, Kıran vd. 2006).

Günümüzde 4000 adet enzim olduğu bilinmekle beraber 200 mikrobiyel enzim ticari olarak kullanılmaktadır. Buna karşın yalnızca 20 çeşit enzimin endüstriyel ölçekte üretildiği bilinmektedir. Enzim üretiminin biyokimyası, fermantasyon prosesi ve geri kazanım metotlarının anlaşılmasıyla endüstriyel üretimin artacağı öngörülmektedir. Dünyada 12 ana enzim üreticisi bulunmakta ve ticari enzimlerin %75'i 3 ana şirket tarafından üretilmektedir. Bunlar; Danimarka kökenli Novozymes (%45), Amerika kökenli DuPont (Danimarka kökenli Danisco firmasının 2011'de devralımıyla) ve İsviçre kökenli Roche firmalarıdır. Bölgesel perspektifte değerlendirildiğinde, Kuzey Amerika enzim kullanımının en yoğun olduğu bölge olup Batı Avrupa ikinci sırada yer almaktadır. Çin'de de enzim kullanım oranı yüksek iken, 2010 yılında Çin'deki 100 enzim firması dünya pazarının %1'inden daha düşük oranda (700 bin ton) enzim üretimi yapmıştır. Avusturya Federal Çevre Ajansı, 2002 yılında gıda sanayisinde 158 enzimin, teknik amaçlı çalışmalarda 64 enzimin, yem sanayisinde 57 enzimin, 24 çeşit enzimin ise her üç sanayide de kullanıldığını rapor etmiştir. Enzimlerin nişasta prosesi, deterjan üretimi, tekstil sanayi, biyoteknoloji ve genetik alanlarındaki bilimsel çalışmalar gibi çeşitli alanlarda uygulamaları bulunurken gıda ve içecek sanayisi pazarda baskın konumdadır. Bu durum da gelişmekte olan ekonomiye sahip ülkeler için avantaj sağlamaktadır. Endüstriyel enzimlerin %75'ini hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Enzim pazarının %70'lik payında karbohidraz, proteaz ve lipazlar yer almaktadır.

Ayrıca protezlar en hızlı büyüyen grup, lipazlar ise yüksek büyüme potansiyeline sahip grup olarak görülmektedir (Li vd. 2012, Sarrouh vd. 2012).

2.2 Enzimlerin Yapısı ve Sınıflandırılması

Enzimler globüler yapıda proteinlerdir, moleküler ağırlığı 6-250 KDa ve 60 ile 2500 adet aminoasitten oluşmaktadır. Enzimin reaksiyona girdiği molekül substrat olarak adlandırılmaktadır. Birçok enzim substratından daha büyük boyuttadır ve bu nedenle enzimin küçük bir kısmının dahi reaksiyona girmesi reaksiyonun gerçekleşmesi için yeterlidir. Genellikle, katalitik prosesi sağlayan 3-4 aminoasitten oluşan bu kısma aktif bölge denilmekte ve substrat bu bölgeden enzime bağlanmaktadır. Bağlanma prensibi anahtar-kilit modeliyle açıklanmıştır (Fischer 1894). Ancak, enzimlerin substratla interaksyonu her bağlanmada yeniden şekillendiği için bu teori enzim substrat ilişkisini açıklamada yetersiz kalmış olup sonraları daha sonra indüklenen uyum modeli ile açıklanmaktadır (Koshland 1958). Bu modelde substratın sabit bir aktif bölgeye değil, aminoasit yan zincirlerinin oluşturduğu aktif kısma bağlandığı kabul edilmektedir. Enzimler, katalizledikleri reaksiyonlara göre Enzim Komisyonu (Enzyme Commission) tarafından daha öncesinde 6 ana gruba sınıflandırılmakta iken, 2018 yılında bu sınıflandırmaya translokazlar ismiyle yeni bir sınıf eklenmiştir (Anonymous 2019a). Enzim sınıfları ve katalizledikleri reaksiyonlar çizelge 2.1'de verilmiştir.

Sınıflandırmada her bir enzime 4 sayıdan oluşan bir numara (EC kodu) verilmekte olup birinci numara sınıfını, ikinci numara reaksiyona giren bağ sayısını, 3 ve 4. numaralar ise bağın spesifikliğini göstermektedir (Tunail 2009). Genellikle, enzimin isimlendirilmesi enzimin etki ettiği substratın adının sonuna -az eki getirilmesiyle yapılmaktadır (Bayındırlı 2010). Ksilanazların isimlendirilmesi endo-1,4- β -ksilanazlar olarak yapılmakta olup EC 3.2.1.8 kodu kullanılmaktadır. Ksilanazlar, bitki hücresinde hemiselüloz yapıda bulunan ksilanın iç bağlarını parçalayan enzimlerdir. Bu enzimler ksilan molekülünün polimerizasyon derecesini azaltırlar.

Çizelge 2.1 Enzimlerin sınıflandırılması

Enzim Sınıfı	Katalizlediği Reaksiyon	Örnekler
EC1: Oksidoredüktazlar	$A^- + B \leftrightarrow A + B^-$	Katalaz
EC2: Transferazlar	$AB + C \leftrightarrow A + BC$	Transglutaminaz
EC3: Hidrolazlar	$AB + H_2O \leftrightarrow AH + BOH$	Ksilanaz Selülaz Lipaz
EC4: Liyazlar	$A - B \leftrightarrow A=B + X-Y$ $\begin{array}{c} \quad \\ X \quad Y \end{array}$	Pektin liyaz
EC5: İzomerazlar	$\begin{array}{c} X \quad Y \quad Y \quad X \\ \quad \quad \quad \\ A - B \leftrightarrow A - B \end{array}$	Glikoz izomeraz
EC6: Ligazlar	$A + B \leftrightarrow AB$	DNA ligaz
EC7: Translokazlar	$A + B + ATP \leftrightarrow AB + ADP + P_i$	Transporter (ATP fosfohidrolaz)

Hidrolize edilecek bağ, substratın zincir uzunluğu ve dallanma derecesine göre belirlenmektedir (Reilly 1981, Puls ve Poutanen 1989, Li vd. 2000). Glikoz hidrolaz ailesinin 10 (F grubu) ve 11 (G grubu) grubu içinde sınıflandırılmaktadırlar (Collins vd. 2005). Ksilanaz enzimlerinin sınıflandırılması reaksiyon sonunda oluşan son ürüne, molekül ağırlığına, izoelektrik noktasına ve enzimin çalıştığı optimum koşullara göre yapılmaktadır (Wong vd. 1988). F grubunda (Grup 10) sınıflandırılan endoksilanazlar yüksek moleküler ağırlıklı, selüloz bağlantı bölgesine sahip olan ve katalitik kısmı peptitlere bir bağlayıcı ile bağlanan enzimlerdir. G grubunda (Grup 11) sınıflandırılan endoksilanazlar ise düşük molekül ağırlığına sahip olup, izoelektrik noktalarına göre alkalın ve asidik olmak üzere 2 alt gruba ayrılmaktadır (Törrönen and Rouvinen 1997, Bajpai 2014).

2.3 Gıda Sanayisinde Enzim Kullanımı

Gıda sanayisinde enzimler fırıncılık, içecek, süt, diyet ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Kirk vd. 2002). Gıda sanayisinde kullanılan enzimlerin endüstriyel üretimi 1874 yılında başlamış iken büyük ölçekli üretim 1960'lı yıllarda

gerçekleştirilmiştir (Leisola vd. 2002). Enzimler, peynir prosesinde pıhtılaştırma gibi biyokimyasal ön işlemlerde kullanıldığı gibi glikoz şurubu vb. çeşitli ürünlerin üretiminde de kullanılabilir. Gıda işlemede enzimlerin sayıca az bir kısmı gıda katkısı (lizozim, invertaz) olarak kullanılırken, büyük çoğunluğu işlem yardımcısı olarak kullanılmaktadır (Li vd. 2012). Enzim destekli ekstraksiyon, enzimlerin yeni kullanım alanlarından biridir. Organik çözücülerin çevresel risk oluşturduğu bilinmektedir (Teo vd. 2010). Enzim destekli ekstraksiyon işlemi ekstraksiyon süresini hızlandırırken ayrıca polisakkarit, yağ, doğal pigmentler, aroma maddelerinin ekstraksiyon verimini artırmaktadır (Puri vd. 2012). Örneğin pektinaz, selüloz ve hemiselüloz enzimleri meyve suyu ve bira üretiminde hücre duvarlarını degrade ederek su ekstrakte edilebilirliğinin artırılmasında kullanılmaktadır (Karasu vd. 2015).

Enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar, %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Karbohidrazlar grubunda α -amilaz üretimi %13 ile önemli bir yer tutmaktadır (Wiseman 1987). Gıda endüstrisinde proteazlar, invertaz, pektinazlar, amilazlar, glutaminaz ve tannaz yaygın kullanılmaktadır. Nişasta endüstrisinde enzim kullanımının, deterjan endüstrisinden sonra ekonomik olarak 2. sırada geldiği bildirilmiştir (Akkara ve Tosun 2014, Hua ve Yang 2016). Yıllık %10,4 büyüme ile 2016 yılında küresel gıda sanayi enzim talebinin 1,8 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmiştir (Adrio ve Demain 2014). Bu durum da gelişmekte olan ekonomiye sahip ülkeler için avantaj sağlamaktadır. Gıda sanayi enzimlerinde en büyük paya 401,8 milyon dolarla süt ve süt ürünleri grubu sahiptir. Ülkemizde, 2015 yılında ithal edilen toplam enzim miktarı 10 bin tondur ve maliyeti 285,9 milyon TL'dir. İhraç edilen enzim miktarı ise 5 bin ton iken getirisi 66,9 milyon TL olarak verilmiştir. 2016 yılının ilk 6 ayına ait rakamlar; 7,5 bin ton enzim ithalatının maliyetinin 219,6 milyon TL, ihraç edilen 4,6 bin ton enzim miktarının ülkemize getirisinin 63,6 milyon TL olduğunu göstermektedir (Anonim 2016).

2.4 Ksilanaz Kullanım Alanları

Ksilanaz enzimi genel olarak gıda, kağıt, yem üretimi ve atık su arıtım proseslerinde kullanılmaktadır. Günümüzde ksilanaz enzimini üreten başlıca firmalar ve üretilen ksilanazın kullanım amacı çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Ksilanazı ticari olarak üreten başlıca firmalar ve kullandığı ürünler (Bajpai 2014, Anonymous 2019b, Anonymous 2019c, Anonymous 2019d, Anonymous 2019e)

Firma adı	Enziminin ticari adı*	Kullanıldığı ürün	Kullanım amacı
Novozymes	Panzea	Ekmek	Ekmekte hacim artışı, hamur stabilitesinin iyileştirilmesini sağlar.
	Ultraflo Max, OndeoPro, Ceremix Plus MG	Bira	Viskoziteyi düşürür, kolay ve hızlı filtrasyon sağlar, ekstrakt verimini artırır.
	Viscozyme	Biyoetanol	Biyoetanol üretiminde kullanılan buğday, arpa ve çaydarın içeriğindeki nişasta olmayan polisakkaritten, arabinoksilan ve beta-glukanlardan kaynaklı viskozite artışını azaltarak proseste işlem kolaylığı sağlar.
	BG Max	Biyogaz	Önişlem ve anarebik fermanstasyon aşamasında kullanılmaktadır.
Dupont	Power Bake	Ekmek ve unlu mamüller	Hamuru güçlendirir.
	Laminex	Bira	Filtrasyonu kolaylaştırır.
	Axtra Zap	Yem	Diyet lifte enkapsüle olmuş çözünür ve çözünmeyen formdaki ksilanı parçalar.
	Danisco Xylanase	Yem	Diyet lifteki arabinoksilanın sindirimini artırır.
AB Enzymes	Rohalase	Unlu mamüller	Nişasta-gluten kompleksinin ayrılmasıyla viskoziteyi düşürür.
	Veron	Unlu Mamüller	Hamur prosesinde çözünmez formdaki ksilanın çözünmesini sağlar, ekmek prosesinde CO ₂ 'nin ekmekte kalarak ekmeğin hacminin artışını ve gluten stabilitesini sağlar.
	Ecopulp	Kağıt	Kimyasal kullanımını azaltarak kağıtta istenen parlaklığın elde edilmesini sağlar.
	Econase Xt	Yem	Yemdeki diyet lifi parçalayarak beslenmede maksimum enerji sağlar.
Advanced Enzymes	SEBake BX5, SEBAmyl	Unlu mamüller	Ekmek hacminin artışını sağlar.
	SEBake Crisp Plus	Bisküvi	Fermente bisküvilerde ve gofretlerde glutenin ayarlanmasını sağlar.
	ViscoSEB HTX	Unlu mamüller	Tahıllardan nişastanın etkili bir şekilde ayrılmasını ve viskozitenin azaltılmasını sağlar.
	Proganozyme, SEBMalt Barley	Bira	Birada viskozitenin azaltılmasını ve filtrasyon kolaylığı sağlar.

*Ticari enzim içeriğinde ksilanazın yanı sıra diğer enzimler de bulunabilmektedir.

Ksilanazların ekmeğin kalitesine olumlu etkisi bulunmaktadır. Suda çözünmeyen arabinoksilanın parçalanmasını sağlayarak hamurda arabinoksilanın tuttuğu suyun

serbest kaldığı, böylece kabarmayı arttırdığı, hamuru daha yumuşak hale getirerek makineyle işlenebilirliğini kolaylaştırdığı bilinmektedir (Kıran vd. 2006). Ekmek kalitesine etkisi ekmek hacmindeki artış ve ekmek içi yapısındaki iyileşme şeklinde görülmekte, bu işlem amilazın da beraber kullanımıyla daha etkin hale gelmektedir. Bu sayede un kalitesindeki çeşitlilikten doğacak sorunların önüne geçilebileceği belirtilmektedir (Kıran vd. 2006, Yeğin ve Büyükkilleci 2015). Meyve ve sebze suyu üretiminde, şıra ve meyve suyunun arıtılmasında kullanılmaktadır (Kıran vd. 2006). Ksilanaz, pektinazlarla birlikte meyve suyunda berraklaştırma amaçlı kullanılmaktadır.

Ksilanaz, bira üretiminde arpadaki arabinoksilanların parçalanmasını sağlayarak arpanın hidrolize olmasını kolaylaştırmakta, vizkoziteyi düşürerek bulanıklığın azaltılmasına katkıda bulunmakta ve ksilitol üretiminde de kullanılmaktadır. Ksilooligosakkaritler prebiyotik özelliğe sahiptir. Çeşitli çalışmalar ksilooligomerlerin üretimine ilginin büyük olduğu bildirilmiştir (Yeğin ve Büyükkilleci 2015, Aronsson vd. 2017, Linares-Pasten vd. 2018). Enzimin, bitkisel yağ ve nişasta üretiminde de kullanıldığı belirtilmiştir (Saraçoğlu 2010). Ayrıca *Aureobasidium pullulans*'dan elde edilen ksilanaz, yüzey aktif bir bileşen olan alkil glikozidazın ksilandan üretilmesinde kullanım bulmuştur (Beg vd. 2001).

Kağıt endüstrisinde ağartma işleminde klor kullanımının sınırlandırılması nedeniyle ksilanaz kullanımı yaygınlaşmıştır (Lin vd. 1999, Beg vd. 2001). Ksilanazla ön işlem yapılması klor gibi ağartma kimyasallarının daha az kullanılmasına olanak sağlamıştır (Christov vd. 1999). Ağartma işleminde, ksilanın %20'sini seçici olarak uzaklaştırdığı ve klorlu ağartma kimyasallarını büyük oranında azalttığı bildirilmiştir (Chen vd. 1996, Kıran vd. 2006). Bu enzimden en fazla kraft (ambalaj kağıdı) hamurunun ağartma işlemlerinde yararlanılmaktadır (Bajpai 1999).

Ksilanaz, yem endüstrisinde çavdarla beslenen piliçler için ağırlık kazancında ve yemlerin dönüştürülmesindeki etkinliğini arttırmaktadır (Wong vd. 2000, Kıran vd. 2006). Nusairat vd. (2018) piliç yemlerinde *Bacillus* cinsi bakterilerin ve ksilanaz enziminin beraber kullanımında bağırsak sağlığını iyileştirdiğini bildirmişlerdir.

Ksilanın tek hücre proteini, enzim, sıvı ve gaz yakıtlar, solventler ve şeker şurubu yapımında ve mikrobiyolojik proseslerde substrat olarak kullanımı onun önemini arttırmaktadır (Kuhad ve Singh 1993, Beg vd. 2001, Yeğin ve Büyükkilleci 2015).

Ksilanın parçalanıp, biyoetanol üretiminde kullanımının mümkün olduğu bilinmektedir. Mikrobiyel ksilanazlar mannaz, ligninaz, glukonaz gibi enzimlerle sinerjik etki göstererek lignoselülozik yapının biyodöngüsünü sağlamakta olup lignoselülozik materyalden yakıt üretiminde ekonomik olarak önemli potansiyele sahiptir (Kulkarni vd. 1999, Beg vd. 2001, Saraçoğlu 2010). Tarım ve gıda endüstrilerinin atıklarında yüksek miktarlarda ksilan bulunduğundan, ksilanaz enzimi atık sudaki ksilanın ksiloza dönüştürülmesi için de kullanılmaktadır (Wong vd. 2000, Beg vd. 2001). Gıda sanayi kullanımı amaçlı ksilanazın kg fiyatı 10 ile 80 \$ arasında değişmektedir (Anonymous 2019f).

2.5 Endüstriyel Enzim Üretim Prosesi

Gıda üretiminde mikrobiyel enzim kullanımı çok uzun yıllardır var olan bir uygulamadır. Japonlar koji üretimi için *Aspergillus* cinsi küfü kullanmışlar ve bu proses endüstriyel enzimin ilk üreticilerine ilham olmuştur (Kitamoto 2002). *Aspergillus* cinsinin amilaz, proteaz ve fitaz enzimlerini salgıladıkları bilinmektedir (Fujita vd. 2003). Ancak fungusların uzun generasyon süresi, yüksek viskozitedeki polimerleri sentezlemeleri ve düşük oksijen transferi kullanımlarını sınırlandırmaktadır (Annamalai vd. 2009).

Mikrobiyel fermantasyon prosesi, ticari enzim üretimi gerçekleştirilmeden önce sitrik asit ve aminoasit üretimi için geliştirilmiş olup enzim üreticileri tarafından kendi proseslerine adapte edilmiştir (Röhr vd. 1983). Genetik çalışmalar ile mikroorganizmalar büyük çaplı üretime uygun hale getirilmiş olup güvenlik sınıfı 1 olan mikroorganizmalar ticari enzim üretimi için kullanılmaktadır (Rastall 2007). Günümüzde endüstriyel enzimlerin genetiği değiştirilmiş organizmalardan (GDO) üretildiği bilinmektedir. Rekombinant olan mikroorganizmalar yüksek verimde enzim

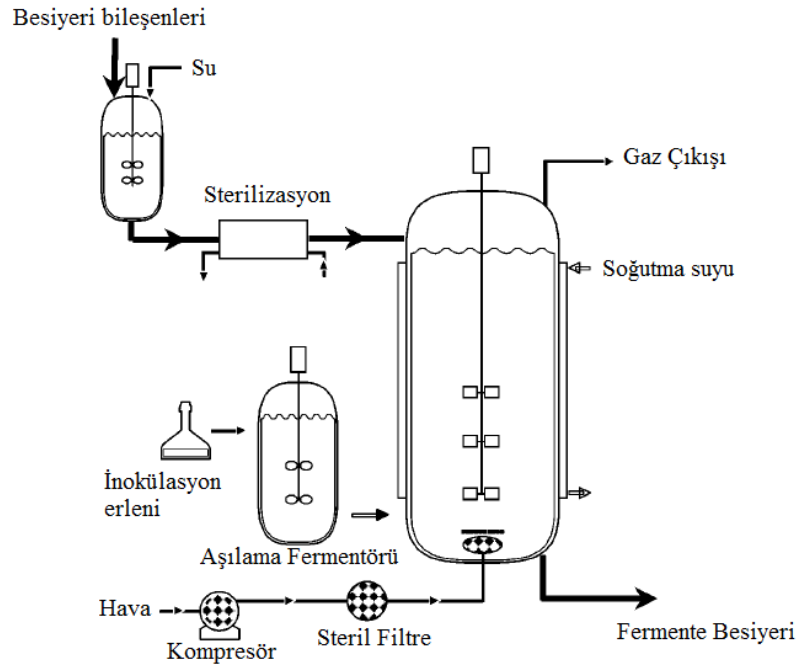
sentezlenmesi, son ürün saflığının yüksek olması gibi hem üretici hem de tüketici için çeşitli avantajlar sunmasından dolayı tercih edilmektedir (Whitehurst ve Oort 2010). Ayrıca, gıda, nişasta ve detarjan sanayisinde enzimlerin yaklaşık %60'dan daha fazlasını rekombinant ürünlerin oluşturduğu bildirilmiştir (Bennett 1998).

Fermantasyon prosesi, yüzey fermantasyonu ya da derin kültür fermantasyonu olarak yapılmaktadır. Ancak, yüzey fermantasyonunun daha çok işçilik gerektirdiği ve enzimin besi ortamından geri kazanımındaki zorluğundan dolayı, çoğunlukla derin kültür fermantasyonu kullanılmaktadır (Rana ve Bhat 2005). Ayrıca endüstriyel enzim üretiminin %90'ının derin kültür yöntemi ile yapıldığı bildirilmektedir (Kapoor vd. 2008). Bunun başlıca sebepleri; kısa gelişme süresine bağlı olarak kontaminasyon riskinin düşük olması, sürekli üretimde aynı biyoreaktör hacmi için derin kültür yöntemine göre başlangıç yatırım maliyetinin düşük olması, gelişmenin daha kontrollü yapılabilmesinden dolayı yüksek substrat dönüşümünün olması, ölçek büyütme metotlarının gelişmiş olması ve düşük işçilik maliyetli proses izleme olarak sıralanmaktadır (Hölker vd. 2004).

Enzim üretiminin başlıca aşamaları, mikroorganizmanın aktifleştirilmesi ve inokülüm hazırlanması, fermantasyon, enzimin fermantasyon ortamından ayrılması, saflaştırılması ve enzimin formülasyonu şeklinde sıralanır. Kültürler, en yaygın yöntem olarak genelde depolanarak muhafaza edilmektedir. Dolayısıyla enzim üretimine başlayabilmek için mikroorganizmanın öncelikle çoğaltılması gerekmektedir. Depolamada gliserol, dimetilsülfoksit gibi kriyoprotektan olan kimyasallar, kültürü koruma amacıyla ilave edilebilmektedir. Kültürler kısa süreli depolama amacıyla -20°C, -70°C'de depolanabilmekte iken uzun süreli depolamalarda sıvı azot kullanılmaktadır. Bu tür depolamalar kültürün yıllarca korunmasını sağlamaktadır (Whitehurst ve Oort 2010). Enzim fermantasyonu, genellikle 30-300 m³'lük fermentörlerde gerçekleştirilmektedir. Fermentördeki üretimi optimize etmek için ana fermantasyon tankından önce inokülasyon tankı kullanılarak, mikroorganizmanın ana tankta çoğalması için geçen süre kısaltılmaktadır. Çoğalma fazında iken de ana tanka aktarılmaktadır. Geleneksel inokülüm tankları ana tanktan 10 kat daha küçük hacimde olacak şekilde birkaç tanktan

oluşurken, günümüzde kültürler depolama vialinden doğrudan ana üretim tankına inoküle olacak şekilde de dizayn edilebilmektedir (Rastall 2007).

Fermantasyon aşaması enzim üretiminde temel işlemlerden biridir. Enzim salgılanmasının bazen mikrobiyel gelişme sırasında, bazen ise de çoğalma fazının yavaşladığı ya da durduğu sırada gerçekleştiği bildirilmiştir (Whitehurst ve Oort 2010). Proseste sterilizasyon, ısıl işlem ya da filtrasyonla yapılmaktadır. Isıl sterilizasyon sürekli sistemlerde yüksek sıcaklık kısa süre (150°C, 3-5 dk), kesikli sistemlerde ise kısmen düşük sıcaklık uzun süre (121°C, 30-60 dk) uygulanmalarıyla yapılmaktadır. Çözünmeyen besiyeri bileşeni içeren besiyerleri, genellikle kesikli sistemle sterilize edilmektedir. Sıvı besiyeri ve besleme çözeltileri için sürekli sterilizasyon yapılması gereklidir. Sisteme giren hava ise filtreler ile sterilize edilmektedir (Whitehurst ve Oort 2010). Fermantasyon prosesi şematik olarak şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1 Endüstriyel ölçekte enzim üretim prosesi (Hjort 2007)

Endüstriyel enzim proseslerinin büyük çoğunluğu aerobik prosesler olup, bu proseslerde gerekli enerjiyi sağlamak için elektron alıcısı olarak oksijene ihtiyaç duyulmaktadır. Oksijen ihtiyacı, proseste oksijen kütle transferi ve ısının uzaklaştırılması konularıyla

beraber değerlendirilmektedir. Oksijen sıvı içinde yukarı doğru hareket ettiği için tankın dibinden basınçla verilmekte, gaz fazdan sıvı faza transfer edilmektedir. Mikrobiyel faaliyet sonucu oluşan karbondioksit ise sıvı fazdan gaz faza transfer edilmektedir. Proseste ısınma, karıştırmayı sağlayan motordan kaynaklı mekanik ısınma ve mikrobiyel gelişmeden kaynaklı metabolik ısınma şeklindedir. Metabolik ısınma aerobik fermantasyonda daha fazladır. Bunu uzaklaştırmak için ceketli fermentörler kullanılmakla beraber büyük hacimli fermentörlerde ise fermentör içine borular da eklenmektedir (Whitehurst ve Oort 2010).

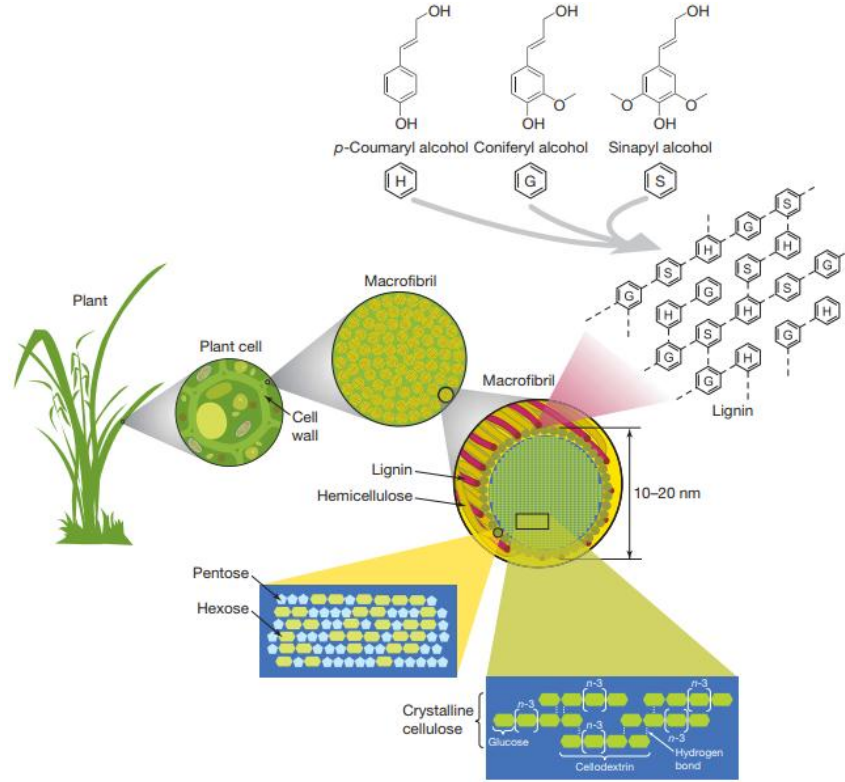
Fermantasyon sıvı besiyerinde enzim dışında mikrobiyel hücre, rDNA bulunduğu ve enzim konsantrasyonu düşük olduğu için doğrudan kullanımı ve depolanması uygun değildir. Ayrıca besiyerindeki yüksek su içeriği ile proteaz ve peptidazların bulunması enzimin parçalanmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle enzimin besiyeri ortamından ayrılması gerekmektedir. Mikrobiyel enzimler ya proteazlar gibi hücre dışı (extracellular) ya da glikoz oksidaz gibi hücre içi (intracellular) salgılanabilmektedir (Whitehurst 2010). Hücre içi sentezlenen enzimlerin çözünebilir formda elde edilmesi için hücrenin parçalanması gerektiğinden endüstriyel üretim için çoğunlukla tercih edilmemekte olup hücre dışına salgılananlar, doğrudan besiyerine bırakıldıklarından avantajlı konumdadır (Rastall 2007). Ayırma proseslerine, genel olarak alt akım/geri kazanım (downstream) prosesleri denilmektedir. Bu proses sırasında filtre yardımcıları, tamponlar ve çökteltici gibi materyaller gereklidir.

Enzimin besiortamından ayrılması santrifüj, döner vakum filtre; elde edilen enzimin konsantre edilmesi ise uygun moleküler ağırlıkta ayırmayı yapan sentetik membranların kullanıldığı filtrasyon, evaporasyon gibi yöntemlerle yapılmaktadır. Bu işlemler sonunda enzim ortamdan ayrılrsa bile ortamda prostesten gelen proses yardımcı maddeleri, köpük kırıcılar ve mikroorganizma tarafından üretilen diğer bileşenlerin kalıntıları bulunmaktadır. Bu nedenle saflaştırma işlemi (polish filtration, diafiltration, chromatography) uygulanmaktadır (Shan vd. 1996, Ramsden vd. 1998, Whitehurst ve Oort 2010). Enzim üretim prosesinde hangi saflaştırma yönteminin tercih edileceği maliyetine göre değişkenlik göstermektedir (Linder vd. 2004).

Enzim üretiminin son aşaması ticari enzimin formülasyonudur. Enzim gıda üretiminde kullanıma ve depolamaya uygun olacak şekilde sıvı ya da katı forma getirilmektedir. Enzimin katı haldeki formülasyonunda sıvı enzim konsantresi çeşitli stabilize edici maddeler ilave edilerek püskürtmeli kurutma yöntemi ile yapılmaktadır (Rastall 2007). Püskürtmeli kurutma uzun yıllardır kullanılmakta ve en çok tercih edilen yöntem olmakla beraber dondurarak kurutma yöntemi de çeşitli faydalar sağlamaktadır. Ancak, daha pahalı bir yöntem olduğu bilinmektedir. Sıvı formülasyon katı formülasyonla kıyaslandığında, içerisinde su bulunmasından dolayı stabilizasyonun sağlanması açısından daha zordur. Stabilizör olarak protein yapının denatüre olmasını engelleyen sakkaroz, glikoz, dekstroz, şeker alkoller ve polioller kullanılmaktadır. Bu kimyasalların yüksek konsantrasyonda su aktivitesini kontrol ettikleri ve böylece mikrobiyel gelişmenin kontrolünde rol oynadıkları da bilinmektedir. Bu kimyasallar, enzim konsantre edildikten sonra filtrasyon aşamasında ilave edilmektedir. Filtrasyonla iyi çözünmemiş katı parçacıklar ayrılmakta ve mikrobiyel yük azaltılmaktadır. Elde edilen son ürün genellikle şeffaf ya da amber renginde olmaktadır. Gıda uygulamalarında kullanılan enzimler, genellikle birkaç enzim çeşidini içeren karışımlar olup koruyucu olarak sodyum benzoat ve potasyum sorbat ilave edilmektedir (Whitehurst ve Oort 2010).

2.6 Lignoselülozik Atıklar

Enzim üretiminde maliyetin %30-40'ını besiyortamı oluşturduğundan, gelişme ortamında karbon kaynağı olarak gıda sanayisi ve çeşitli tarım atıklar gibi lignoselülozik maddelerin kullanılması ve besiyortamı optimizasyonu konusunda pek çok çalışma bulunmaktadır. Dünyada 3,0-4,2 milyon ton ile en fazla elma posası atığı açığa çıkmakta, ikinci sırada ise 2,8 milyon ton ile zeytin posası atığı bulunmaktadır. Pirinç kabuğu atığının yıllık 120 bin ton olduğu bildirilmiştir (Ravindran ve Jaiswal 2016). 2014 yılı verilerine göre, ülkemizde gıda hazırlama ve ürünlerinin bitkisel atıkları ile park ve bahçe atıkları yıllık toplam 461,9 bin tondur (Anonim 2016). Yıllık $10-50 \times 10^{12}$ ton lignoselülozik madde bitkiler tarafından oluşturulmaktadır (Claassen vd. 1999). Lignoselülozik maddeler selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşmakta olup, şekil 2.2'de genel yapısı verilmiştir.

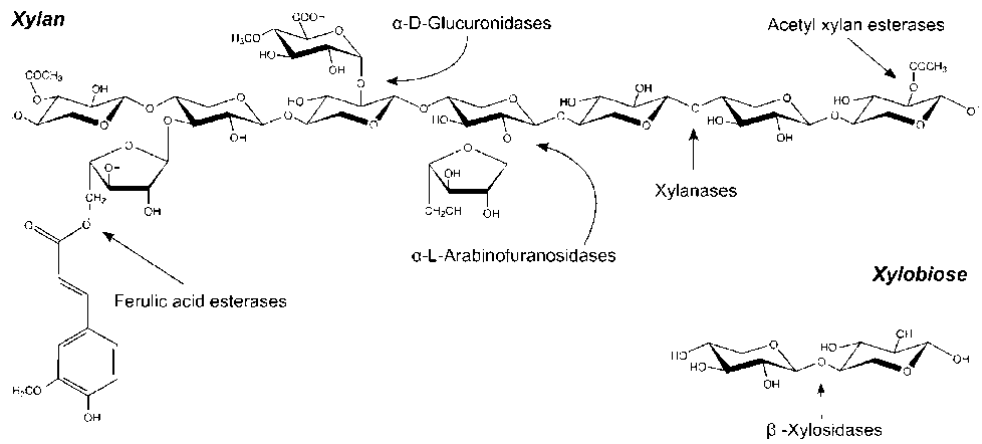


Şekil 2.2 Bitki hücresinin temel yapısı (Rubin 2008)

Hemiselülozun yapısında temel olarak ksilan, mannan, galaktan ve arabinan heteropolimerleri bulunmaktadır. Hemiselülozların adlandırma ve sınıflandırılması, polimer parçalandığında elde edilen şekere göre yapılmaktadır. Ksilan parçalandığında pentoz, bir şeker olan ksiloz açığa çıkmaktadır (Ebringerova ve Heinze 2000, Bajpai 2014). Ksilan, bitki hücre duvarında orta lamellada bulunan hemiselülozun temel bileşenidir. Ksilan, lignin ve selüloza kovalent ve kovalent olmayan bağlarla bağlıdır. Bu bağlar selüloz mikrofibrillerinin bozunmasını engelleyerek bitki hücre duvarının yapısal bütünlüğünü sağlamaktadır (Coughlan ve Hazlewood 1993, Biely 1985).

Ksilanın toplam biyokütlenin yaklaşık %20-30'unu oluşturduğu bilinmektedir (Ruanglek vd. 2007, Salles vd. 2000). Heterojen ve kompleks yapısından dolayı ksilanın tam olarak parçalanması için çok çeşitli hidrolitik enzimler gereklidir (Coughlan ve Hazlewood 1993, Biely 1985). Bu enzimler; endo- β -1,4-ksilanaz (EC.3.2.1.8), β -ksilosidaz (EC.3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidaz (EC.3.2.1.55), α -glukoronidaz (EC.3.2.1.139), asetil ksilan esteraz (EC.3.1.1.72), ferulik asit esteraz (EC.3.1.1.73) ve

p-kumarik asit esterazdır (EC.3.1.1) (Yeğin ve Büyükkilleci 2015). Bu enzimler ksilan ana zincirine ve yan zincirlerine etki edenler olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Ksilan anayapısının parçalanması polimere bağlanan ksilanaz ve ksilosidazlara bağlıdır. Ksilanazlar, ksilanın iç bağlarını kırarak kısa oligosakkaritlere parçalarlar, ksilosidazlar ksilobioz ve ksilooligomerleri ksiloz ünitelerine parçalarlar. Ksilan yan zincirleri ise L-arabinofuronozidazlar, D-glukoronidazlar, asetil ksilan esteraz, ferulik asit esteraz ve *p*-kumarik asit esterazlar tarafından parçalanır (Şekil 2.3) (Coughlan ve Hazlewood 1993, Biely 1985).



Şekil 2.3 Ksilanın yapısı ve enzimlerin etki ettiği bölgeler (Pastor vd. 2007)

2.7 Ksilanaz Üretimi

Ksilanazlar bakteri, maya, küf vb. çeşitli kaynaklardan üretilmekle beraber küflerin endüstriyel ksilanaz üretimi için temel kaynak olduğu belirtilmiştir (Beg vd. 2001). Ksilanazlar, hem katı kültür fermantasyonu (solid state fermentation) hem de sıvı derin kültür fermantasyonu (submerged fermentation) ile üretilebilmektedir (Çerçi vd. 2011). Endüstriyel enzim üretiminde uygun üretici mikroorganizmanın elde edilmesinden sonra, ikinci aşama besiyeri bileşimi ve üretim koşullarının optimize edilmesidir. Mikrobiyel enzimler kontrollü koşullarda fermantasyon işlemiyle üretilirler. Günümüzde recombinant mikroorganizmalardan üretilen enzimlerin çoğunun ekstraselüler olduğu ve fermantasyon ortamına bırakıldığı bildirilmiştir (Çerçi vd. 2011). Endüstriyel uygulamalardaki sorunların en önemlisi enzim üretim maliyeti olduğundan üretimde maliyeti düşürücü substrat kullanılması yönünde çalışmalar

gerçekleştirilmekte, bu amaçla tarımsal ve gıda sanayi atıklarının kullanılması üzerine yoğunlaşmaktadır (Saraçoğlu 2010).

Ksilanaz enziminin üretimi ve saflaştırılması, ilk olarak *Aspergillus foetidus* küfü kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Whistler ve Masak 1955). Mikrobiyal ksilanaz üretiminde en çok *Aspergillus*, *Penicillium*, *Bacillus*, *Trichoderma* ve *Streptomyces* cinsleri üzerinde durulmuş olup bu türlere ait çalışmalar yapılmıştır (Fengxia vd. 2008, Juturu ve Wu 2012, Kumar vd. 2012, Murugan vd. 2015, Anthony vd. 2016, Adıgüzel ve Tuncer 2016a, Boonchuay vd. 2016). Endüstride *Aspergillus* ve *Trichoderma* alt türleri kullanılmış, ardından moleküler tekniklerle enzimden sorumlu genlerin *Lactobacillus*, *Bacillus*, *E. coli*'ye ekspresyonu çalışılmıştır. Mayalarda *Saccharomyces cerevisiae*'ya çeşitli türlerden (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus nidulans* ve *Aspergillus niger*) ekspresyon gerçekleştirilmesine karşın stabil olmayan ekspresyon düzeyleri, proteinlerin periplazmik bölgede kalması, genlerin maya fizyolojisi ve strese tepkileri üzerinde olumsuz etkilerinin olmasından dolayı üretimi pratik olmamıştır (Juturu ve Wu 2012). Buna rağmen *Pichia pastoris*'te ksilanaz ekspresyon çalışmaları yapılmıştır (Liu ve Liu 2008, Hea vd. 2010, Birijlall vd. 2011, Karaoglan vd. 2014, Elgharbi vd. 2015).

Ksilanaz üretiminde bakterilerden *Bacillus*, *Streptomyces* ve *Acetobacter* cinslerine ait çalışmalar bulunmaktadır (Murugan vd. 2015, Anthony vd. 2016, Adıgüzel ve Tuncer 2016a, Boonchuay vd. 2016). *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* ve *B. stearothermophilus*'un gıdalarda konak mikroorganizma olarak kullanılmalarının güvenli olduğu bildirilmiştir. Sanayide *Bacillus* cinsine ait tür ve alt türler tarafından sentezlenen enzim sayısının 10'dan fazla olduğu bildirilmektedir. *Bacillus* türlerinin enzim üretiminde ürünü doğrudan fermantasyon ortamına bırakması saflaştırma maliyeti açısından oldukça büyük avantaj olarak görülmekte ayrıca kolay izole edilebilme ve tanımlanabilme, hızlı gelişme ve kısa fermantasyon süresinden dolayı tercih edildikleri bildirilmektedir (Çerçi vd. 2011). Bu nedenle ksilanaz üretiminde bakterilerden *Bacillus* türlerinin öne çıktığı görülmektedir.

Endüstriyel ksilanaz üretiminin yaklaşık olarak %90'ı sıvı kültür fermantasyonu tekniğiyle yapılmaktadır (Çerçi vd. 2011). Sıvı kültür fermantasyonu yüksek saflıkta üretimini mümkün kılmaktadır (Bajpai 2014). Katı kültür fermantasyonu ile ksilanaz üretimi yapılan çalışmalarda tarımsal ve gıda sanayi atıkları karbon kaynağı olarak mikrobiyel substratta kullanılmıştır. Küflerin daha düşük su aktivitesinde gelişebilmelerinden dolayı katı kültür fermantasyonunda çoğunlukla küflerin tercih edildiği bildirilmiştir. Katı kültür fermantasyonu tekniğiyle yapılan üretimlerde diğer yöntemlere göre daha yüksek enzim aktiviteleri elde edilmektedir. Bu yöntemde üretim maliyetlerinin düşük, basit teknoloji kullanımı, atık sıvı miktarının az olması vb. avantajları bulunmaktadır (Yegin vd. 2011). Fermantasyon sırasında oksijen, karbondioksit, nem, pH düzeylerinin kontrol edilebilmesi için gelişmiş sistemlerin bulunmaması ölçek büyütmeyi zorlaştırmaktadır (Aguilar vd. 2008). Sıvı kültür fermantasyon tekniğinde bu parametrelerin kontrolü ve üretilen metabolitlerin saflaştırılması, çoğunlukla daha kolay olmaktadır (Yeğin ve Büyükkilleci 2015).

Ksilanolitik enzimler, bitkide selüloz ve ligninle birleşmiş halde bulunan ksilanın hidrolizini katalizleyen hemiselülozik enzimler olduğundan, bakteri kaynaklı enzimlerin üretiminde mısır unu, çavdar kepeği ve kavuzu, pirinç kavuzu ve kabuğu, mısır koçanı, pirinç samanı, ağaç talaşı, buğday kepeği ve diğer bitkisel atıklar substrat olarak kullanılmaktadır. Katı ve sıvı kültür fermantasyonunda, buğday kepeği ile oldukça yüksek verimlilik sağlanmıştır (Nagar vd. 2012, Yegin vd. 2014). Bunun buğday kepeğinin yüksek ksilan içeriğinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (Nagar vd. 2012).

Yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak ksilanaz enziminin değişik koşullardaki üretimi, enzim üretiminin indüklenebilirliği, enzim karakterizasyonu, saflaştırma, enzim ekspresyonu arttırılması gibi konularda yoğunlaşmıştır (Beg vd. 2001, Saraçoğlu 2010). Kağıt endüstrisine yönelik üretilen ksilanazın yanında, özellikle selülaz aktivitesini minimum seviyede içeren üretilere eğilim artmıştır.

2.8 *Bacillus* Türleri ile Yapılan Ksilanaz Çalışmaları

Bacillus türleri α -amilaz ve proteazlar gibi gıda işlemlerinde kullanılan enzimlerin üretiminde konak mikroorganizma olarak kullanılmaktadır. *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus stearothermophilus*'un gıdalarda konak hücre olarak kullanılmalarının güvenli olduğu bildirilmiştir (Çerçi vd. 2011). Enzim üretiminde substrat maliyetinin yüksek olması, araştırmacıları substrat formülasyonuna gıda/tarımsal atıkların kullanımıyla ilgili çalışmalara yönlendirmiştir. Bu doğrultuda ksilanaz üretim çalışmalarında özellikle ksilan içeriği yüksek tahıl ürünlerinin kabuk, sap, yaprak bölgeleri kullanılmıştır. Sıvı kültür fermantasyon yöntemiyle gıda/tarımsal atıkların karbon kaynağı olarak kullanıldığı çalışmalarda buğday kepeği, mısır koçanı, pirinç kavuzu ve sapı, arpa ve yulaf kavuzu öne çıkmaktadır. Dolayısıyla, ilave edilen atığın ksilan miktarı ve bileşiminin aktiviteyi etkilediği görülmektedir. Çeşitli kaynaklardan izole edilmiş *Bacillus* türleri kullanılarak sıvı kültür fermantasyon tekniğiyle ksilanaz üretimine dair pek çok çalışma bulunmaktadır.

Sa-Pereira vd. (2002) kaplıcadan izole ettikleri *Bacillus subtilis* ile besiyerine ilave edilen yulaf kavuzu ksilanının, ksilanaz üretimine olan sinerjik etkisini incelemişlerdir. Optimum ksilanaz aktivitesine 50°C'de ve pH 6,0'da 12 U/mL olarak ulaşmışlardır. Damiano vd. (2006), izole ettikleri alkalifilik *B. licheniformis* suşu ksilanazının optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerlerini, sırasıyla 7,0 ve 11,0 ile 70 ve 75°C olarak bildirmişlerdir.

Battan vd. (2007) *Bacillus pumilus*'tan ısı-stabil ksilanaz enzimini buğday kepeği (%2, w/v) ilaveli besiyerinde, pH 8,0, 37°C'de sıvı kültür fermantasyon yöntemiyle üretmiştir. Üretim koşulları optimize edildikten sonra aktivitenin 13 kat (5,407 U/mL) arttığı görülmüştür. Üretilen ksilanazın 70°C'de nötraldan alkali pH'ya kadar stabil olduğu saptanmıştır. Poorna ve Prema (2006) *B. pumilus*'tan tarımsal atıklarla ksilanaz üretimini, sıvı kültür ve katı kültür fermantasyon yöntemiyle karşılaştırmıştır. Katı kültür fermantasyon yöntemiyle daha yüksek miktarda ksilanaz elde edilmiş, en yüksek

aktiviteyi 50°C'de pH 6,5-7,0'da göstermiştir. Bu özelliğiyle kağıt endüstrisine uygun olduğu saptanmıştır.

Alkalifilik *Bacillus pumilus*'tan sıvı kültür fermantasyon tekniğiyle ksilanaz üretim koşullarının optimizasyonunun çalışıldığı araştırmada, maksimum ksilanaz aktivitesi başlangıç pH 9,0, karıştırma 200 rpm, %1,25 (v/v) inokülasyon oranında, buğday kepeği kullanılarak 1220,0 U/mL; buğday sapı kullanıldığında ise 900,0 U/mL olarak bulunmuştur (Kapoor vd. 2008). Aygan ve Arıkan (2009), *Bacillus* sp. X13 suşu ile yaptıkları çalışmada enziminin pH 6,0'da ve 40°C'de optimum aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Gupta ve Kar (2009) ksilozun, termofilik *Bacillus* türlerinin ksilanaz üretiminde buğday kepeği ve mısır koçanını karbon kaynağı olarak kullanıldığı sıvı kültür ve katı kültür fermantasyon yöntemiyle üretimine etkisini incelemişlerdir. Katı kültür fermantasyon tekniğinde, buğday kepeği kullanılan besiyeri çeşitli minerallerle desteklendiğinde ksiloz, ksilanaz sentezini %44,01 oranında arttırırken, maya ekstraktı ilavesi aktiviteyi %12,89 oranında düşürdüğü bildirilmiştir. Sıvı kültür fermantasyon tekniğiyle üretimde ise buğday kepeğinin kullanıldığı besiyerinde hem mineral hem de maya ekstraktı destekli ksiloz ilavesi enzim sentezini arttırdığı gösterilmiştir. Mısır koçanının kullanıldığı katı kültür fermantasyon tekniğiyle üretimde hem mineral hem de maya ekstraktı besiyerine ksiloz ilavesi üretimi, sırasıyla %26,92, %23,90 oranında baskılanmıştır. Mısır koçanının kullanıldığı sıvı kültür fermantasyon tekniğinde de ksiloz ilavesinde baskılanma olduğu gösterilmiştir.

Azeri vd. (2010), ksilanaz üreten *Bacillus* suşlarının tamamının 25-50°C aralığında geliştiklerini, optimum enzim sentezinin 40°C'de olduğunu, 55°C'de ise gelişmenin görülmediğini belirtmişlerdir. Irfan vd. (2012) *B. subtilis* BS05 ile tarımsal atıklar (buğday samanı, pirinç kavuzu, soya fasülyesi keki, mısır koçanı, buğday kepeği, şeker kamışı melası) kullanılarak sıvı kültür fermantasyon yöntemiyle ksilanaz üretimi çalışmıştır. Maksimum ksilanaz aktivitesine şeker kamışı melası ile (439,5 U/mL) 140

rpm karıştırma ile, 37°C'de 48 saat inkübasyon sonunda ulaşılmıştır. Pirinç kabuğu kullanılarak 37°C'de 72 saat fermentasyon sonunda 408,9 U/mL aktiviteye ulaşılmıştır.

Nagar vd. (2012), *B. pumilus* SV-205 ile buğday kepeği kullanılarak katı kültür tekniğiyle 7382,7 U/mL aktivite tespit etmiş, ksilanazın pH 6,0-11,0 arasında 24 saatte %100 stabilitesini koruduğunu gözlemlemiştir. Gandarillas vd. (2012) su örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinde ksilanaz enziminin arpa samanı kullanarak üretilmesini çalışmış, örneklerde en yüksek aktivite değeri 10 U/mL olarak bulunmuştur.

Haddar vd. (2012) *B. mojavensis* ile arpa kepeği kullanarak yaptıkları çalışmada, optimum ksilanaz üretim koşullarına 18,66 g/L arpa kepeği, 1,04 g/L NaCl içeren besiortamında, 176 rpm karıştırma hızı ve 34,08 saatlik inkübasyon süresinde ulaşımlardır. Bu koşullarda maksimum aktivite 7,45 U/mL olarak saptanmıştır. Besiyeri optimizasyonu, üretimde %6,83'lük bir artış sağlamıştır. En yüksek ksilanaz aktivitesi 50°C'de ve pH 8,0'da gözlenmiştir.

Seo vd. (2014) *B. licheniformis* kullanarak %1 (w/v) oranlarında çeşitli tarımsal atıkları minimal nutrient besiyerine ilave etmiş ve ksilanaz, endoglukonaz, β -glukosidaz aktivitelerini incelemişlerdir. Maksimum ksilanaz aktivitesi hindistan cevizi unu ilavesinde 0,34 U/mL olarak bulunmuştur. *B. licheniformis*'in tarımsal atıklardan (özellikle hindistan cevizi unu) biyoetanol üretimine uygun olduğu belirtilmiştir.

Ho ve Heng (2015) sıvı kültür ve katı kültür fermentasyon yöntemiyle *B. subtilis* ATCC 6633 kullanarak çeşitli tarımsal atıklarla (buğday kepeği, pirinç kepeği, arpa kavuzu, mısır koçanı, hindistan cevizi kabuğu, hurma çekirdeği keki) optimum gelişme besiyeri formülasyonu için çalışmıştır. Maksimum aktivite, sıvı kültür fermentasyon yöntemiyle buğday kepeği ve soya fasulyesi kabuğu kullanılarak 48 saatlik inkübasyon sonucu 11,968 U/mL olarak bulunmuştur. Katı kültür fermentasyon yöntemiyle ise soya fasulyesi ve hindistan cevizi kabuğu kullanılarak yapılan üretimde, ksilanaz aktivitesi 18,875 U/mL bulunmuştur. Dolayısıyla bu iki tarımsal atığın katı kültür fermentasyon yönteminde ksilanaz üretimi için etkili substrat olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır.

Ayishal-Begam vd. (2015) mısır kabuğu ilaveli besiyerinde katı kültür fermantasyon yöntemiyle *B. pumilus* (MTCC 10209) ve *Bacillus cereus* (MTCC 10202) ile ksilanaz üretimini karşılaştırmışlardır. Maksimum ksilanaz aktivitesi, sırasıyla 2501,0 U/mL ve 2201,9 U/mL olarak bulunmuştur.

Kaur vd. (2016) izole ettikleri *B. pumilus* ile buğday kepeğinden ksilanaz üretimine besiyeri bileşimi (buğday kepeği, pepton, ksiloz, potasyum nitrat, maya ekstraktı), inkübasyon koşulları (karıştırma, sıcaklık, süre), pH, inokülasyon miktarı ve inokülasyon yaşı gibi 11 değişkenin etkisini araştırmışlardır. Maksimum aktiviteye ulaşılan parametre değerleri; 0,1 g/50 mL ksiloz, 22 saat inkübasyon süresi, 0,1 g/50 mL maya ekstraktı, 0,1 g/50 mL pepton, 30°C inkübasyon sıcaklığı, 0,3 g/50 mL buğday kepeği, 0,1 g/50 mL potasyum nitrat, 0,5 mL/50 mL inokülasyon oranı, 16 saatlik inokülasyon yaşı ve 120 rpm karıştırma hızı olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda maksimum aktivite 1430 U/mL olarak hesaplanmıştır.

Irfan vd. (2016) *Bacillus* türleri ile sıvı kültür yöntemiyle ksilanaz üretimini çalışmışlardır. Fermantasyon 250 mL'lik erlende 140 rpm karıştırma hızında yürütülmüştür. *Bacillus subtilis* maksimum aktiviteyi pH 8,0'da, %2 inokülasyon oranında, 35°C'de 45 saat fermantasyon süresinde göstermiştir. Sakkaroz, pepton ve (NH₄)₂SO₄ ilavesi ksilanaz üretimini desteklemiştir. *Bacillus megaterium* pH 8,0'de, %1,5 inokülasyon oranında, %1,5 substrat konsantrasyonunda, 40°C'de 72 saat inkübasyonda maksimum aktivite göstermiştir. Araştırmacılar, en iyi karbon ve azot kaynağı olarak ksiloz, potasyum nitrat ve malt ekstraktının olduğunu savunmuşlardır.

Helianti vd. (2016) rekombinant *B. subtilis* DB104 kullanarak 4,5 L hacimdeki fermentörde sıvı kültür fermantasyon yöntemiyle %4 oranında mısır koçanı ve tofu peyniri atıkları kullanarak, 37°C'de, 150 rpm karıştırma devrinde 48 saatlik inkübasyonla ksilanaz üretmişler ve maksimum aktiviteyi 601,7 U/mL olarak elde etmişlerdir. Bu değer erlenden üretilenden iki kat yüksek bulunmuştur. Burada elde edilen ksilanazın yem ve ksilooligosakkarit üretimine uygun olduğu saptanmıştır.

2.9 Ksilanaz Üretimine Etki Eden Faktörler

Enzim üretim çalışmalarında, üretimi etkileyen başlıca faktörler; besiyeri pH'sı, inokülasyon oranı ve kültürün yaşı, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, karıştırma hızı, karbon kaynağı türü, azot kaynağı ve iz elementlerin türü ve bunların besiyerindeki konsantrasyonu, başlangıç substrat konsantrasyonu, havalandırma derecesi şeklinde sıralanabilmektedir. Sıvı kültür fermantasyon tekniğinde bu faktörler incelenirken katı kültür fermantasyon tekniğinde sınırlı sayıda faktörün etkisi incelenebildiğinden üretim şartları standartlaştırılamamaktadır. *Bacillus* suşlarıyla yapılan çalışmalarda bu iki yöntem karşılaştırıldığında, katı kültür fermantasyon yöntemiyle elde edilen enzimin aktivitesi daha yüksek bulunmuş, aktiviteler arasındaki farklılık bazı çalışmalarda oldukça yüksek iken bazılarında ise düşük bulunmuştur (Poorna ve Prema 2006, Ho ve Heng 2015). Ayrıca, yalnızca katı kültür fermantasyon tekniğiyle ksilanaz üretiminde oldukça düşük aktivitelerin elde edildiği çalışmalar da bulunmaktadır (Ayishal-Begam vd. 2015, Heck vd. 2005). *Bacillus* türleriyle yapılan bu çalışmalar göz önüne alındığında katı kültür fermantasyon tekniğiyle üretimde, küflerle yapılan çalışmalarda olduğu gibi yüksek aktivite elde edilmemekte, dolayısıyla ölçek büyütme ve daha kolay kontrol edilebilme olanağı sunan sıvı kültür fermantasyon tekniğinin kullanılması avantajlı olarak değerlendirilebilmektedir.

Enzim üretiminde çeşitli saflaştırma işlemleri sonunda elde edilen enzimin pH, sıcaklık ve çeşitli kimyasallara karşı stabilitesini koruması, sanayide kullanımı açısından oldukça önem taşımaktadır. Enzimlerin, enzim-substrat kompleksinden değişmeden ayrılma özelliği onlara tekrar kullanılabilirlik kazandırmakla birlikte, uzun süre belirli sıcaklık ve pH'da stabil kalmalarını gerektirmektedir. Ayrıca, uzun süre depolama koşullarındaki stabiliteleri de önem taşımaktadır. Bu amaçla enzim üretiminde, son üründe yapılan çalışmaların odak noktası, genelde belirli pH ve sıcaklık aralığında stabilite tespitidir.

Sa-Pereira vd. (2002) kaplıcadan izole edilmiş *B. subtilis*'ten elde edilen ksilanazın 60°C'de 3 saat ısı stabil olmasına karşın, sıcaklığın 90°C'ye çıkmasıyla aktivitede 14

dakikada %80 oranında düşüş olduğunu gözlemlemişlerdir. Poorna ve Prema (2006) *B. pumilus*'tan elde ettikleri ksilanazın pH 7,0-8,0 değerlerinde 3 ay boyunca stabilitesini koruduğunu, pH 8,5'te aktivitesinin %65'ini, pH 11,0'de ise %10'nu koruduğunu belirtmişlerdir. Bu özelliğiyle enzimin kağıt endüstrisine uygun olduğu saptanmıştır.

Haddar vd. (2012) *B. mojavensis* ile arpa kepeği kullanarak yaptıkları çalışmada ksilanaz enziminin pH 7,0-9,0'da 24 saatte aktivitesinin %96'sını koruduğunu belirtmişlerdir. Enzimin 30°C ile 60°C aralığında 60 dakikalık inkübasyonu sonucu aktivitesinin %80'ini koruduğu saptanmıştır. Moteshafi vd. (2016) izole ettikleri *B. subtilis*'in ksilanaz üretim potansiyelini araştırdıkları çalışmalarında, enzimin pH 5,0-9,0 aralığında 40°C'de 72 saat sonunda %80 aktivite gösterdiği, gıda ve yem endüstrisine uygun olduğu sonucuna varmışlardır. Battan vd. (2007) *B. pumilus*'dan üretilen ksilanazın 70°C'de nötralden alkali pH'ya kadar stabil olduğunu saptamışlardır.

Haddar vd. (2012) tarafından *B. mojavensis* ile yapılan çalışmada, pH 7,0-9,0'da 24 saatte aktivitenin %96 oranında korunduğu bulunmuştur. Enzimin, 30°C ile 60°C'de 1 saat inkübasyonu sonucu aktivitesinin %80'ini koruduğu saptanmıştır.

Ksilanaz üretimi konusunda ülkemizde son yıllarda, besiyerinde karbon kaynağı olarak gıda/tarımsal atık (buğday kepeği, mısır koçanı, zeytin çekirdeği, fındık kabuğu, yulaf kepeği, biracılıkta kullanılmış arpa atığı, malt filizi, enginar kökü, şeker pancarı posası, pamuk sapı, mısır kabuğu ve hintyağı otu sapı) kullanımı (Adigüzel ve Tunçer 2016a, Adigüzel ve Tunçer 2016b, Yegin vd. 2017), yerli izololatlardan ksilanaz eldesi (Aygan ve Arıkan 2009, Saraçoğlu 2010, Adigüzel ve Tunçer 2016a, Adigüzel ve Tunçer 2016b, Yegin vd. 2014), *Aspergillus niger*'den ksilanaz üretim geninin *Pichia pastoris*'te ekspresyonu (Karaoglan vd. 2014), düşük maliyetli saflaştırma teknikleri (Kocabaş vd. 2015), üretim koşullarının optimizasyonu ve biyoreaktör ölçekli çalışma (Yegin vd. 2017), enzimin ekmekçilik ve meyve suyu üretiminde uygulanması (Adigüzel ve Tunçer 2016a) konularında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar da genellikle küfler (*Scytalidium thermophilum* ATCC 16454,

Aureobasidium pullulans Y-2311-1, *Streptomyces* sp. AOA40, *Actinomadura geliboluensis*) kullanılarak yürütülmüştür.

2.10 Deneysel Tasarım

Deneysel çalışmalara etki eden birden fazla değişken bulunmaktadır ve bu değişkenlerin etkisini incelemek çalışmayı güç hale getirmektedir (Muluk vd. 2009, Baş 2010). Deneysel tasarımın başlıca amaçlarından biri deneysel hataların en aza indirilmesi, böylece bağımlı değişken (yanıt) üzerine etki eden koşulların düzenlenmesidir. Ayrıca alternatif proses seçimi, prosesin regresyon modelinin belirlenmesi, bağımlı değişkeni etkileyen ana faktörlerin bulunması ve prosesin yanıt yüzeyinin şeklinin belirlenmesi de tasarımın amaçları arasında sayılabilmektedir (Büyüktopçu 2012). Bu amaçla, deney tasarımları genel olarak problemin tanımı, bağımlı ya da yanıt değişkenlerin seçimi, bağımsız değişkenlerin ve düzeylerinin seçimi, deneyi tanımlayan matematiksel model seçimi, veri toplama, test istatistiklerinin hesaplanması ve sonuçların yorumu basamaklarından oluşmaktadır (Muluk vd. 2009, Baş 2010). Doğru bir tasarım, belirli sayıdaki deneyden maksimum bilgi elde edilmesini sağlamaktadır. Deney tasarımı gıda, fizik ve mühendislik bilimlerinde genellikle bir prosesin performansını iyileştirmek amacıyla kullanılmaktadır (Bradley 2007). Deneysel tasarım yöntemlerinden bazıları şunlardır; tam faktöriyel tasarımlar, kısmi faktöriyel tasarımlar, rastsallaştırılmış tasarımlar, Plackett-Burman tasarımları, Yanıt Yüzey Tasarımları (Büyüktopçu 2012).

2.10.1 Yanıt Yüzey Yöntemi

Yanıt Yüzeyi Yöntemi (Response Surface Methodology, RSM), deneylerin istatistiksel tasarımında kullanılan bir optimizasyon yöntemidir. G.E.P. Box ve K.B. Wilson tarafından 1951 yılında geliştirilmiş ve ilk kez kimya endüstrisinde uygulanmış olup prosesin geliştirilmesi amacıyla optimizasyon için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin beraber kullanıldığı bir yöntem olarak tanımlanmıştır (Myers ve Montgomery 1995, Bradley 2007). Bezerra vd. (2008) Yanıt Yüzey Yöntemi'ni, deneysel tasarımdan elde edilen deneysel verilerin modelle uyumuna dayalı olan

matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bütünü olarak ifade etmektedirler. Matematiksel modelin uyumu sonucu ortaya çıkan grafiksel perspektiften dolayı da Yanıt Yüzey Yöntemi adını almıştır (Bezerra vd. 2008). Bağımlı değişken üzerinde etkili olan, prosesin bağımsız değişkenleri arasındaki ilişkiyi belirlemek ve bu değişkenlerin istenen yanıtı verdiği seviyelerinin bulunması için kullanılan deneysel modelleme tekniklerini ve optimizasyon tekniklerini içermektedir (Koç ve Kaymak-Ertekin 2010, Büyüktopçu 2012). Bu kapsamda, üzerinde çalışılan sistemdeki koşulların optimizasyonunu tanımlayan doğrusal ya da ikinci dereceden polinomial fonksiyonlar elde edilir (Teo'filo ve Ferreira 2006). Yanıt Yüzey Yöntemi'nin aşamaları şu şekilde gerçekleşmektedir; (a) araştırmacının deneyimi, çalışmanın amacı ve önceki çalışmalar göz önüne alınarak deneysel çalışma alanını etkileyen bağımsız değişkenlerin seçimi, (b) deneysel tasarımın seçimi ve deneylerin oluşturulan deney matrisinde yürütülmesi, (c) elde edilen verilerin polinomial fonksiyon olarak matematiksel ve istatistiksel olarak analizi, (d) model uyumunun değerlendirilmesi, (e) optimum alandaki yönelimin gerekliliğinin ve ihtimalinin doğrulanması, (f) çalışılan değişkenler için optimum değerlerin elde edilmesi (Bezerra vd. 2008).

Değişken seçiminde çalışılan sistemin yanıtını etkileyen birçok değişken bulunduğundan bunları tanımlamak ve etkilerini gözlemlemek pratikte mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla sisteme etkileri büyük olan değişkenlerin seçimi önem kazanmaktadır. Seçilecek tasarım bu değişkenleri ve değişkenlerin birbiriyle önemli olan interaksiyonlarını saptayacak şekilde olmalıdır. Tam ya da kısmi, 2 seviyeli faktöriyel tasarımların kullanılmasının başlıca sebepleri etkin ve ekonomik olmasıdır (Bezerra vd. 2008)

Yanıt Yüzey Yöntemi gıda proseslerinde pullulan üretimi, β -karoten üretimi, enzimatik esmerleşme, patojen bakterilerin inaktivasyonu, püskürtmeli kurutma, fırında kavurma işlemi ve mikrodalga pişirme gibi uygulamalarda kullanılmıştır (Saklar vd. 2001, Demirekler vd. 2004, Goksungur vd. 2004, İyidoğan ve Bayındırlı 2004, Sevimli vd. 2005, Kahyaoglu ve Kaya 2006, Ürküt vd. 2007, Buzrul vd. 2008, Koç 2008). Ayrıca ksilanaz enzimi üretim çalışmalarında da optimizasyon amacıyla kullanılmıştır (Heck

vd. 2005, Fang vd. 2007, Coman ve Bahrim 2011, Haddar vd. 2012, Desai ve Iyer 2017, Yegin vd. 2017).

Yanıt Yüzey Yöntemi uygulaması için üretilmiş programlarda genellikle ikinci dereceden polinomial model kullanılmakta olup ikinci dereceden polinomial bir modelde yalnızca bir tane bölgesel minimum veya bölgesel maksimum noktası olması sebebiyle optimizasyon için ikinci dereceden polinomial bir model kullanımı kolay bir yaklaşımdır (Koç ve Kaymak-Ertekin 2010). Baş ve Boyacı (2007), ikinci dereceden bir modele uygunluğun olmaması durumunda yanıtın ya da bağımsız değişkenlerin dönüşümü yapılarak veya bağımsız değişkenlerin aralıkları uygun bir şekilde değiştirilerek yanıtın eğiliminin bu model ile açıklanmasının sağlanması gerektiğini bildirmektedir. Yanıt Yüzey Yöntemi, Box-Benken ve Merkezi Bileşik Tasarım (Central Composite Design-CCD) olmak üzere iki çeşit tasarım modeli içermektedir. Bu modellerden Box-Benken tasarımını kullanabilmek için en az 3 bağımsız değişkenle, Merkezi Bileşik Tasarım modelinde ise en az 2 bağımsız değişkenle deney tasarlanabilmektedir. Box-Benken Tasarımının avantajı daha az sayıda deney sayısı oluşturmasıdır, fakat elde edilecek cevabın hassasiyetine göre Merkezi Bileşik Tasarımın tercih edilmesinin daha avantajlı olduğu bildirilmektedir. Merkezi Bileşik Tasarım modelinde 3 bağımsız değişkenli ve her bir bağımsız değişkenin 3 seviyeye sahip olması sonucunda 20 adet deney oluşturulmaktadır. Deney sayısı tasarımın tam, kısmi faktöriyel ve tasarımda blok olup olmamasına bağlı olarak değişmektedir. Proses yanıtındaki kavisliğin hesaplanabilmesi için merkez noktalara ek olarak yıldız noktaların da tasarıma katıldığı bir yöntemdir. Yıldız noktaların değeri tasarıma ve faktör sayısına bağlıdır.

Model uygunluğunun test edilmesi, elde edilen denklemin ilişkiyi ne derece açıkladığının ve bu denklemleri kullanarak yapılacak tahminlerin hangi derece güvenilir olacağını araştırılması anlamına gelmektedir (İkiz vd. 2000). Böylece, matematiksel denklemin gerçek yanıtla ne derecede yakın sonuçlar verdiğinin tespit edilmesi amacıyla varyasyon katsayısının hesaplanması, regresyon katsayısının (R^2 ya da R-Sq) ve tahminlenmiş regresyon katsayısının hesaplanması (R-Sq(pred)), model uygunsuzluğunun test edilmesi (lack of fit testi), regresyon analizine hipotez testlerinin

uygulanması, hipotez testlerinin regresyon katsayılarına bireysel olarak uygulanması, tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamının (PRESS) hesaplanması, yeterli tahminleme (adequite precision) değerinin hesaplanması ve kalıntı analizi gibi yöntemler uygulanmaktadır (Koç ve Kaymak-Ertekin 2010). Merkezi Bileşik Tasarım'da oluşturulacak model denkleminde, ikinci derece terimler, birinci derece terimler ve ikili etkileşim terimleri bulunabilmektedir (Myers ve Montgomery 2002). Bu terimlerden hangilerinin denkleminde bulunacağı yapılan regresyon analizi sonucu, istatistiksel olarak önem taşıyan interaksiyonlar kullanılarak belirlenmektedir.

Regresyon katsayısı, elde edilen verilerin modelle ne kadar uyumlu olduğunu gösteren bir ölçüttür. Regresyon katsayısının 1,0'a yakın olması istenmektedir. Böylece bağımsız değişkende meydana gelen değişimlerin %100'e yakın oranda tahmin edebilir özellikte olmasıyla güçlü bir model olması arzu edilmektedir (Baş ve Boyacı 2007). Tasarım sonucu denemelerden alınan veriler, regresyon modeline uygulamakta olup, modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hataya, model uygunsuzluğu (lack of fit) denilmektedir. İdeal olarak, istatistiksel açıdan modelin matematiksel formunun uygunsuzluğunun önemsiz yani P değerinin 0,05'ten büyük olması gerekmektedir (Myers ve Montgomery 2002, Box ve Draper 2007, Castillo 2007). Tahminlenmiş regresyon katsayısı değerinin, regresyon katsayısı değerine yakın olması arzu edilmekte olup modelin yeni gözlemleri ne derecede güçlü tahmin edeceğini gösteren bir değerdir. Tahminlenmiş regresyon katsayısı değeri de %0 ile %100 arasında bir değer olarak hesaplanmaktadır. Standart sapma (S) değeri, modelin yanıtı ne kadar iyi tanımladığını gösteren başka bir ölçüttür. Standart sapma değerinin düşük olması arzu edilmektedir (Anonymous 2019g). Modeli değerlendirmede bu katsayıların yanı sıra, modelde seçilen parametrelerin ve bu parametrelerin interaksiyonlarının istatistiksel açıdan önemli olması, sistemi etkileyen parametrelerin seçimi açısından önem taşımakta olup optimum koşulların belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, Yanıt Yüzey Yöntemi'nin optimizasyon amacının yanı sıra proses bağımsız değişkenlerinin ayrı ayrı ve birbirleriyle etkileşimlerinin yanıtlar üzerindeki etkilerini belirlemede de kullanımı bulunmaktadır (Koç ve Kaymak-Ertekin 2010).

Varyans analizi sonucu elde edilen ANOVA tablosunda çeşitli terimler bulunmaktadır. Bu terimler; toplam serbestlik derecesi (total degrees of freedom, DF), ardışık kareler toplamı (sequential sum of squares, Seq SS), düzeltilmiş kareler toplamı (adjusted sum of squares, Adj SS), düzeltilmiş ortalama kareler (adjusted mean square, Adj MS) terimleridir. Toplam serbestlik derecesi, numunedeki gözlem sayısı ile belirlenir. Düzeltilmiş kareler toplamı terimi, cevap verilerindeki varyasyon miktarını belirler. Ardışık kareler toplamı terimi, modelin farklı bölümleri için varyasyon ölçütüdür. Düzeltilmiş kareler toplamından farklı olarak karelerdeki ardışık toplamalar, terimlerin modeldeki sırasına bağlıdır. Düzeltilmiş ortalama kareler terimi tablodaki P değerlerini hesaplamak için kullanılır (Anonymous 2019h).

Yanıt Yüzey Yöntemi uygulanırken yapılan hatalar optimizasyon işleminin yetersiz veya hatalı olmasına neden olmaktadır. Bunlardan bazıları şunlardır; model uygunsuzluğu (lack of fit) testinin istatistiksel olarak önemli olması, model uymadığı halde optimizasyon çalışmasında bu modelin kullanılması eleme denemeleri ve bölge araştırma kısımlarının doğru aralıklarda belirlenmemesi vb. (Koç ve Kaymak-Ertekin 2010).

Ksılanaz ile ilgili çalışmalarda enzim aktivitesi çok çeşitli değerlerde bulunmuş olup bu durum enzim üretiminde başta kullanılan mikroorganizmanın özellikleri gibi aktiviteyi etkileyen birçok faktör olduğunu işaret etmektedir. Bu sonuçlar da araştırmacıları enzim üretiminde koşullarının çeşitli tasarım yöntemleriyle optimizasyonunun çalışılmasına yönlendirmiştir. Merkezi Bileşik Tasarımlar, ikinci dereceden bir tasarımdır ve literatürde ksılanaz üretim optimizasyonu için kullanımına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Heck vd. 2005; Coman ve Bahrim 2011, Garai ve Kumar 2013, Yegin vd. 2017).

Heck vd. (2005), Amazon bölgesinden izole ettikleri *B. circulans* suşuyla katı kültür fermantasyon yöntemi kullanarak ksılanaz üretiminin optimum gelişme, havalandırma ve inkübasyon sıcaklığı koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım (Central Composite Design) ile optimizasyonunu çalışmış, bu tasarım yöntemiyle elde

ettikleri model parametreleri kullanılarak, 3,7 kat daha fazla enzim aktivitesi (0,928 U/mg) elde etmişlerdir.

Kallel vd. (2016) *B. mojavensis* ile Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeli ile besiyerindeki 5 parametrenin optimizasyonunu çalışmışlardır. Bunlar buğday kepeği, amonyum klorür, magnezyum sülfat, inokülasyon oranı ve iyonik olmayan yüzey aktif maddelerdir. Enzim üretiminin optimize olduğu koşullarda (buğday kepeği 60 g/L, amonyum klorür 4 g/L, magnezyum sülfat 0,38 g/L, inokülasyon oranı %1,25 ve noniyonik yüzey aktif madde %0,3) teorik aktivite 45,1 U/mL olarak tahmin edilmiş, deneysel olarak ise 41,94 U/mL aktiviteye ulaşılmıştır. Optimize edilen besiyeri ile 6 kat fazla enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar bu özellikteki ksilanazın meyve suyu ve yem proseslerine uygun olduğunu savunmuşlardır.

Kaur vd. (2016) izole ettikleri *B. pumilus* ile buğday kepeğinden ksilanaz üretiminde, Plackett-Burman deneysel tasarım yöntemiyle besiyeri bileşimi (buğday kepeği, pepton, ksiloz, potasyum nitrat, maya ekstraktı), inkübasyon koşulları (karıştırma, sıcaklık, süre), pH, inokülasyon miktarı ve inokülantın yaşı gibi 11 değişkenin etkisini araştırmış optimum koşullarda maksimum aktivite 1430 U/mL olarak hesaplamışlardır.

Motesafi vd. (2016) izole ettikleri *B. subtilis*'in ksilanaz üretim potansiyelini araştırdıkları çalışmalarında, Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeli ile inkübasyon sıcaklığı, pH ve ksilan konsantrasyonu faktörlerini incelemişlerdir. Optimum koşullarda maksimum ksilanaz aktivitesini 260 U/mL olarak belirlemiş; enzimin, gıda ve yem endüstrisine uygun olduğu sonucuna varmışlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan izolatlar

Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden, değişik kaynaklardan ve çeşitli kişi ve kurumlardan bazı morfolojik ve biyokimyasal testler sonucunda *Bacillus* sp. olarak belirlenen 66 adet yerli izolat temin edilmiştir. Testlerde ksilanaz aktivitesine sahip *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu referans suş olarak kullanılmıştır (Ho 2015, Lai vd. 2015). Çalışma kapsamında izole edilen bakteri örneklerinin kaynakları çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan izolatlar ve elde edildiği kaynaklar

İzolat no.	Kaynağı	İzolat no.	Kaynağı
1	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 (Referans)	35	Nohut Mayası
2	Bilinmiyor (Gazi Üni.)	36	Nohut Mayası
3	Bilinmiyor (Ege Üni.)	37	Nohut Mayası
4	Çürümüş Saman	38	Nohut Mayası
5	Çürümüş Saman	39	Nohut Mayası
6	Çürümüş Saman	40	Bitki Atıkları
7	Çürümüş Saman	41	Bitki Atıkları
8	Çürümüş Saman	42	Bitki Atıkları
9	Toprak	43	Bitki Atıkları
10	Toprak	44	Bitki Atıkları
11	Toprak	45	Buğday Sapı
12	Toprak	46	Buğday Sapı
13	Toprak	47	Buğday Sapı
14	Toprak	48	Meyve Atıkları
15	Toprak	49	Meyve Atıkları
16	Toprak	50	Meyve Atıkları
17	Kepek	51	Meyve Atıkları
18	Kepek	52	Meyve Atıkları
19	Kepek	53	Elma Posası
20	Kepek	54	Elma Posası
21	Kepek	55	Elma Posası
22	Kepek	56	Elma Posası
23	Kepek	57	Ekşi Hamur Mayası
24	Kepek	58	Ekşi Hamur Mayası
25	Nohut Mayası	59	Ekşi Hamur Mayası
26	Nohut Mayası	60	Ekşi Hamur Mayası
27	Nohut Mayası	61	Ekşi Hamur Mayası
28	Nohut Mayası	62	Fıstık Kabuğu
29	Nohut Mayası	63	Fıstık Kabuğu
30	Nohut Mayası	64	Fıstık Kabuğu
31	Nohut Mayası	65	Fıstık Kabuğu

Çizelge 3.1 Kullanılan izolatlar ve elde edildiği kaynaklar (devam)

32	Nohut Mayası	66	Fıstık Kabuğu
33	Nohut Mayası	67	Fıstık Kabuğu
34	Nohut Mayası		

*1 nolu izolat ATCC (American Type Culture Collection, USA)

2 nolu izolat Prof. Dr. Yavuz BEYATLI (Gazi Üniv. Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü)

3 nolu izolat Prof. Dr. İsmail KARABOZ (Ege Üniv. Fen Fak. Biyoloji Bölümü)

9-16 nolu izolatlar Doç. Dr. Ayşe AVCI (Sakarya Üniv. Müh. Fak. Gıda Müh. Bölümü)

25-39 nolu izolatlar Prof. Dr. Hüseyin ERTEN (Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Böl.)’ den temin edilmiştir.

2 nolu izolat Prof. Dr. Yavuz BEYATLI’nın (Gazi Üniv. Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü), 3 nolu izolat Prof. Dr. İsmail KARABOZ’un (Ege Üniv. Fen Fak. Biyoloji Bölümü), 9-16 nolu izolatlar Doç. Dr. Ayşe AVCI’nın (Sakarya Üniv. Müh. Fak. Gıda Müh. Bölümü), 25-39 nolu izolatlar Prof. Dr. Hüseyin ERTEN’in (Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Böl.) kültür koleksiyonundan temin edilmiş olup, belirtilen kişilere teşekkür ederiz.

3.1.2 Gelişme ve muhafaza besiyerleri

İzolatların gelişimi ve muhafazası için Nutrient Broth besiyeri (Merck, Germany) kullanılmıştır. Uzun süreli depolama amacıyla, örnekler %1 inokülasyon oranında Nutrient Broth besiyerinde 28°C’de 24 saat aktifleştirildikten sonra kriyotüplere %30 oranında gliserol ilave edilip -64°C’de muhafaza edilmiştir. Çalışmada, her kullanım öncesi Nutrient Broth besiyerinde 28°C’de 24 saat inkübasyon süresinde aktifleştirilmiştir. Nutrient Broth besiyeri, otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilip kullanılmıştır.

3.1.3 Ksilanaz üretim besiyerleri

Yerli *Bacillus* izolatlarının ksilanaz üretim yeteneklerini belirleme ve Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimizasyon aşamasında ksilan içeren Horikoshi besiyeri kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Gıda/tarımsal atık ilaveli besiyeri bileşimi ise çizelge 3.3’te verilmiştir.

3.1.4 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda ve tarımsal atıklar

Ksilanaz üretim besiyerine karbon kaynağı olarak ilave edilen, gıda ve tarım atıkları olarak seçilen elma posası, buğday kepeği ve mısır koçanının temin edildiği kaynaklar çizelge 3.4’de verilmiştir. Gıda ve tarım atıklarına besiyerine ilave edilmeden önce yapılan işlemler bölüm 3.2.10’da verilmiştir.

Çizelge 3.2 Horikoshi besiyeri bileşimi (Ikura ve Horikoshi 1987)

Bileşen Adı	Miktarı (g/L)
Ksilan (Birchwood, Sigma, USA)	5,00
Maya ekstraktı	5,00
Pepton	5,00
KH ₂ PO ₄	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10

Çizelge 3.3 Gıda/tarımsal atık ilaveli besiyeri bileşimi

Bileşen Adı	Miktarı (g/L)
Gıda/Tarımsal Atık*	5,00
Maya Ekstraktı	5,00
Pepton	5,00
KH ₂ PO ₄	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10

*Besiyerine kurutup öğütülmüş, 650µm partikül boyutunda olan elma posası/buğday kepeği/mısır koçanı %5 w/v oranında ilave edilmiştir.

Çizelge 3.4 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda ve tarımsal atıkların temin edildiği kaynaklar

Gıda ve Tarımsal Atık	Kaynak	Temin Edildiği Tarih (Yıl)
Elma Posası	Göknur Gıda Maddeleri Enrj. İml. İth. ve İhr. San. Tic. A.Ş.	2017
Buğday Kepeği	Katmer Un İrmik San. ve Tic. A.Ş.	2017
Mısır Koçanı	Gölbaşı Semt Pazarı (Gölbaşı/Ankara)	2017

3.2 Yöntem

3.2.1 İzolasyon

Ankara'nın değişik bölgelerinden, 2016 yılının Mayıs-Ekim döneminde farklı ortamlardan steril ambalajlara alınarak laboratuvara getirilen materyalden kepek, saman, fıstık kabuğu gibi kuru olan materyal önce nemlendirilip 48 saat bekletilmiş, örnekler homojen hale getirilip 10 g tartıldıktan sonra 90 mL Nutrient Broth besiyerine ilave edilmiştir. 28°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmış, ardından gelişme gözlenen örnekler arasından spor oluşturan bakterilerin seçilebilmesi için, ısı işlem uygulaması yapılmıştır. Aşılama öncesi, 1:10 oranında seyreltilen örnekler 80°C'deki su banyosunda 10 dk bekletilmiştir. Tek koloni elde etmek amacıyla Nutrient Agar (Merck, Germany) besiyerine yayma ekim yapılmış ve tekrar 28°C'de 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir (Lennette vd. 1985). İnkübasyon sonrasında tipik koloniler Nutrient Broth besiyerine aktarılmış ve 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Gram boyama ve koloni morfolojisinin belirlenmesi

Bacillus cinsine ait mikroorganizmaların hücre morfolojisi, basil ve Gram pozitifdir. Bu nedenle öncelikle deneme kapsamındaki bakterilerin hücre morfolojisi tespit edilmiştir. Bu amaçla, katı ve sıvı formdaki besiyerindeki örnekler CASO (Tryptic Soy) Broth (Merck, Germany) besiyerine öze ile aktarılıp 28°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Ardından, PCA (Plate Count Agar) (Merck, Germany) besiyerine sürme yapılarak

28°C’de 24 saat inkübasyon sonunda gelişen kolonilerden Gram boyama yapılmıştır. Katı koloniden bir miktar steril öze ile alınıp saf su ile lam yüzeyine yayıldıktan sonra preparat havada kurutulup, fikse edilip hazırlanmıştır. Ardından 1 dk kristal viyole ile boyanıp, saf su ile kristal viyole uzaklaştırılmıştır. Lugol çözeltisi damlatılıp 1 dk bekletilip, saf su ile yıkanmıştır. Dekolorizasyon çözeltisi damlatılıp 10-15 sn bekletilmiş, çözelti saf su ile uzaklaştırılmıştır. Son aşamada da safranin damlatılıp 30 sn bekletilmiş ve safranin saf suyla uzaklaştırılmıştır. Preparat havada kuruduktan sonra ışık mikroskopunda (CME Leica, USA) 100X objektifte immersiyon yağı damlatılarak incelenmiştir (Temiz 2000). Her bir örnek iki paralelli çalışılmış olup, referans suş olarak *Bacillus subtilis* ATCC 6633 kullanılmıştır.

İzolatların koloni morfolojik özelliklerini belirlemek amacıyla, aktif kültürden öze ile alınıp Nutrient Agar besiyerine tek koloni oluşacak şekilde sürme yapılmış, ardından 28°C’de 24 saat inkübasyon sonucu Petride elde edilen tek koloni görünümleri incelenmiştir.

3.2.3 *Bacillus* cinsine ait olan örneklerin saptanması

Bacillus cinsinin sporlu olması özelliğinden dolayı, 66 adet bakteri izolatına spor testi uygulanmıştır. Bu amaçla Modifiye DTSB Agar besiyeri hazırlanmıştır (Çizelge 3.5 ve 3.6). Besiyeri nihai pH’sı otoklav sonrasında $7,0\pm 0,2$ olacak şekilde ayarlanmıştır. Gram boyama yapılan koloniler CASO Broth (Merck, Germany) besiyerinde 28°C’de 24-48 saat inkübe edilip, Modifiye DTSB Agar besiyerine yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. 28°C’de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen koloniler kazıma işlemiyle 10 mL steril saf suya aktarılmıştır. İzolatlar 80°C’deki su banyosunda 5 dk bekletilerek ısıl işlem uygulaması yapılmış, sonra 1-2 dk süreyle soğuk suda soğutulmuştur. Ardından PCA besiyerine yayma yöntemiyle ekilip, 28°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir (Hornstra vd. 2007). PCA besiyerinde koloni gelişmesi gözlenen Petriyerler muhtemel *Bacillus* cinsi olarak değerlendirilmiş, referans suş olarak *Bacillus subtilis* ATCC 6633 kullanılmıştır. Her bir deney iki paralelli olarak çalışılmıştır.

Çizelge 3.5 Modifiye DTSB Agar besiyeri bileşimi (Peng vd. 2001)

Bileşen Adı	Miktarı
Tryptic Soy Broth (Merck, Germany)	4,00 g/L
Maya Ekstraktı	0,10 g/L
KH ₂ PO ₄	1,00 g/L
Na ₂ HPO ₄	2,00 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00 g/L
Tuz Çözeltisi	0,06 mL/L
Agar	15,00 g/L

Çizelge 3.6 Modifiye DTSB besiyerine ilave edilen tuz çözeltisi (Peng vd. 2001)

Bileşen Adı	Miktarı (g/L)
MgSO ₄	1,00
MnCl ₂	0,10
FeSO ₄	0,10
CaCl ₂	10,00

3.2.4 Ksilanaz aktivitesi tayini

Ksilanaz enzim aktivitesini tespit etmek amacıyla, bakteri izolatlarının besiyerinde belirlenen gelişme şartlarında inkübasyonunun ardından, süpernatant elde etmek için kültür 10000xg'de 4°C'de 15 dk santrifüj (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Germany) edilmiş, aktivite tayini yapılanaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Battan vd. 2007). Ksilanaz aktivitesinin tayininde Bailey vd. (1992) metodu kullanılmıştır. %0,5 (w/v)'lik ksilan 0,05 M fosfat tamponuyla (pH 7,0) hazırlanmıştır. Ksilan çözeltisi, ksilanın homojen bir şekilde çözülmesi için kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Fosfat

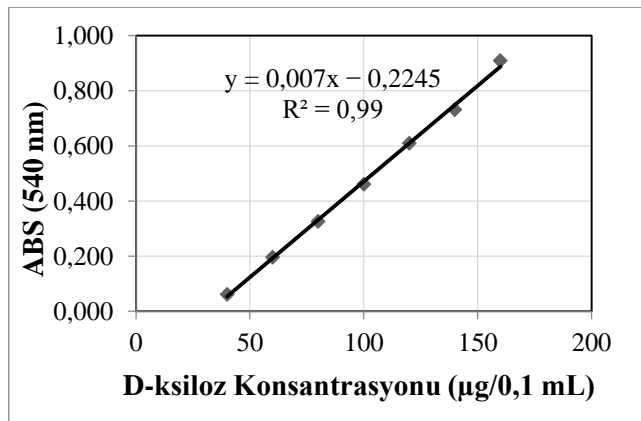
tamponu; 61 mL 0,1 M Na₂HPO₄ ve 39 mL 0,1M NaH₂PO₄.2H₂O çözeltilerinden alınıp çözelti pH değeri 7,0±0,2 olacak şekilde ayarlanarak son hacmi 200 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

Ksilan çözeltisinden 0,9 mL alınıp, 0,1 mL uygun şekilde seyreltilmiş enzim ile 50°C'de 5 dk reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyon 1,5 mL 3,5-dinitro salisilik asit (DNS) çözeltisinin ilavesi ve 15 dk kaynatma ile durdurulup, örnek 1 dk buzlu suda bekletilmiştir. 3,5-dinitro salisilik asit (DNS) çözeltisi bileşimi; 7,48 g/L DNS, 216 g/L K-Na-Tartarat (Rochelle Tuzu) 13,98 g/L NaOH, 5,86 g/L sodyum metabisülfid ve 5,36 mL/L fenol içermektedir. Her örnek için şahit olarak çözelti ve enzim kör yürütülmüştür. Reaksiyon sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarı spektrofotometrede 540 nm'de absorbans okunarak belirlenmiştir. Standart kurve D-ksiloz (Sigma Aldrich, USA) kullanılarak çizilmiştir. D-ksiloz standart kurvesi 40-160 µg/0,1mL aralıkta çizilmiştir (Şekil 3.1). 1 ünite ksilanaz aktivitesi, 1 dakikada 1 µmol ksilozun açığa çıkması için gereken enzim miktarı olarak tanımlanıp, hesaplamada aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır (Akpınar vd. 2009).

$$\text{Aktivite (U/mL)} = (A/150,13) \cdot (1/5) \cdot (1/0,1) \cdot (D)$$

D: Seyreltme oranı

A: Ksiloz miktarı, µg



Şekil 3.1 Ksiloz standart kurvesi

3.2.5 İzolatların ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi

66 adet yerli izolatın ksilanaz aktivitesini belirlemek amacıyla, örnekler 10 mL'lik Horikoshi besiyerine, gelişme besiyerindeki aktif kültürden %1 oranında inoküle edilerek, 28°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda süpernatant elde etmek için kültür 10000xg'de 4°C'de 15 dk santrifüj (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Germany) edilmiş, aktivite tayini yapılana kadar -20°C'de depolanmıştır (Battan vd. 2007). Ksilanaz aktivitesinin tayininde Bailey vd. (1992) metodu kullanılmıştır.

3.2.6 İzolatların büyük hacimde geliştirilerek aktivitelerinin belirlenmesi ve genotipik tanımlanması yapılacak izolatların seçilmesi

Ksilanaz aktivitesine sahip yerel suşlardan seçilmiş 12 izolat, çalışma hacmi artırılarak Horikoshi besiyerinde 250 mL'lik erlenmayere 50 mL besiyeri olacak şekilde geliştirilmiştir. Gelişme besiyerindeki aktif kültürden %1 inokülasyon oranında Horikoshi besiyerine ekim yapılmış, 28°C'de 24 saat çalkalamalı inkübatörde (Sheldon Manufacturing Inc., USA) 150 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda süpernatant elde etmek için kültür 10000xg'de 4°C'de 15 dk santrifüj edilerek, aktivite tayini yapılana kadar -20°C'de depolanmıştır (Battan vd. 2007). Bu ön çalışma sonucunda, ksilanaz üreticisi potansiyeline sahip, diğer izolatlara göre daha yüksek ksilanaz aktivitesi gösteren 8 adet yerli izolat seçilerek, DNA dizi analizi ile moleküler tanımlamaları yapılmak üzere kültüre alınmıştır.

3.2.7 İzolatların genotipik tanımlanması

Çalışma kapsamında izole edilen örnekler arasında yüksek ksilanaz aktivitesine sahip 8 adet yerli izolatın 16S rRNA dizi analizi yapılmıştır. DNA baz dizilimi sonuçları BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, USA) ve MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak değerlendirilmiştir. BLAST programının sonuçları program veri tabanındaki mikroorganizmalara benzerlik yüzdesi, MEGA programının sonuçları ise filoetik ağaç olarak elde edilmiştir.

DNA izolasyonu Bio-Rad Insta-Gene Matrix kit (Bio Rad Laboratories, USA) kullanılarak yapılmıştır. DNA izolasyon basamakları aşağıda verilmiştir;

- Katı besiyerinde geliştirilmiş bakteri örneğinden tek koloni seçilip, 1 mL steril saf suda süspanse edilmiştir.
- 1 dakika 10,000-12,000 rpm'de santrifüj (Thermo Scientific Micro CL17, USA) edilip, süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 200 µL InstaGene matrix ilave edilmiş ve 56°C'de 15-30 dk inkübe edilmiştir.
- 10 saniye vorteks yapıldıktan sonra 100°C'deki suda 8 dk kaynatma işlemi uygulanmıştır.
- 10 saniye yüksek hızda vortekslenip ardından 2-3 dk 10,000–12,000 rpm santrifüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatant -20°C'de depolanmıştır.
- 50 µL PCR reaksiyonu için 5 µL süpernatant olacak şekilde kullanılmıştır.

Bakterilerin 16S rRNA bölgesinin çoğaltılması amacıyla PCR işlemi Techne TC-Plus/02 (United Kingdom) model cihazda yapılmıştır. Primer olarak; Thermo marka fD1 (forward) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve rD1 (reverse) (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') primerleri kullanılmıştır. PCR programındaki amplifikasyon koşulları; başlangıç denatürasyonu 95°C'de 3 dk, 30 döngüden oluşan 94°C'de 1 dk denatürasyon, 54°C'de 45 sn primer bağlanması, 72°C'de 2 dk uzama ve 72°C'de 7 dk son uzama aşamalarından oluşmaktadır (Boyacı Gündüz 2018).

Elde edilen PCR ürünleri, Thermo EC340 Maxicell Primo Elektroforez jel sisteminde (Thermo Scientific, USA) agaroz jelde yürütülmüş, jeller Vilber Lourmat (France) marka Jel Görüntüleme Sisteminde görüntülenmiştir. Jelde Syber Safe DNA Jel Boyası (Invitrogen, S33102), marker olarak 100bp Gene Ruler (Thermo SM0321) kullanılmıştır.

Çalışmanın bu aşamasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hüseyin ERTEN'in laboratuvar desteğinden

yararlanılmıştır. İzolatların 16S rRNA gen dizisi analizi BM Laboratuvar Sistemleri (BM Yazılım Dan. Laboratuvar Sistemleri San. Tic. Ltd. Şti.) firmasına yaptırılmıştır.

3.2.8 Optimum gelişme parametrelerinin Horikoshi besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi ile belirlenmesi

Optimum gelişme parametrelerinin Horikoshi besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi ile belirlenmesi deneyleri, cins ve tür tanımlaması yapılan izolatlar arasından aktivite değerleri göz önüne alınarak; aktivite değeri ve gelişme absorbansı diğerlerinden daha yüksek olan 39 ve 67 numaralı izolatlar ve referans suş olan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun her biri için ayrı ayrı yürütülmüştür.

Horikoshi besiyerinde optimizasyon için başlangıç pH, inkübasyon sıcaklığı ve karıştırma devri bağımsız değişkenleri seçilmiştir. Bağımsız değişkenlerin faktör seviyeleri literatürdeki *Bacillus* türleriyle yapılmış çalışmalar ve yerli izolatlar için ön denemelerde ulaşılan değerler baz alınarak belirlenmiştir (Sa-Pereira vd. 2002, Poorna ve Prema 2006, Battan vd. 2007, Kapoor vd. 2008, Lai vd. 2015). Bu kapsamda yanıt (enzim aktivitesi) üzerine etkisi olan her bir parametre için 3 seviye olacak şekilde inkübasyon sıcaklığı, 30, 35 ve 40°C; karıştırma devri 100, 150, 200 rpm; besiyeri başlangıç pH değeri pH 6, 7 ve 8 olarak belirlenmiştir. Besiyeri başlangıç pH değeri besiyeri sterilizasyonu sonrasında steril 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl çözeltileri ile belirlenen pH seviyelerine ayarlanmıştır. Tasarım, Minitab 16 programında yapılmıştır. Çalışmada, Yanıt Yüzey Yöntemi'yle deney tasarımında Merkezi Bileşik Tasarım (Central Composite Design full-unblocked), bu tasarımın da Yüzey Merkezli (Face Centered) tasarım modeli seçilmiştir. Oluşturulan deney tasarımında, 6 adet merkez noktanın tekrarı olmak üzere toplam 20 adet deney bulunmaktadır. Aktivite sonuçları, elde edilen değerlerin ortalamasını ifade etmektedir. Deney tasarımındaki bağımsız değişkenler ve seviyeleri çizelge 3.7'de, oluşturulan deney tasarımı ise çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.7 Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri

Bağımsız Değişkenler	Değişken Kodları	Seviyeler		
		-1	0	+1
İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	X ₁	30	35	40
Karıştırma Devri (rpm)	X ₂	100	150	200
Besiyeri Başlangıç pH Değeri	X ₃	6	7	8

Deneyler, Horikoshi besiyeri kullanılarak 250 mL'lik erlenmayere 50 mL besiyeri olacak şekilde %1 inokülasyon oranında, 24 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Deneyler 3 tekerrürlü, aktivite ölçümleri ise her bir tekerrürden 2 paralelli olarak yapılmıştır.

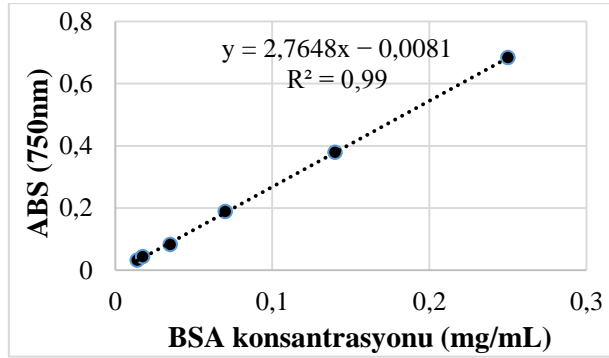
3.2.9 Toplam proteinin belirlenmesi

İzolatların ksilanaz üretimine ait spesifik aktiviteyi belirlemek amacıyla toplam protein tayini Lowry metodu ile yapılmış, standart olarak bovine serum albumin (BSA, Sigma, Germany) kullanılmıştır (Lowry vd. 1951). Analiz için A (20 g Na₂CO₃ ve 4 g NaOH saf suda birlikte çözülüp son hacim 1 L'ye tamamlanmış), B (0,5 g CuSO₄.5H₂O, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülüp son hacim aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlanmış), ve C (50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılmış olup her seferinde kullanılacağı zaman yeniden hazırlanmış) çözeltileri hazırlanmıştır. Folin-Ciocalteu çözeltisi, Folin-Ciocalteu saf su ile 1:2 oranında seyreltilerek elde edilmiştir. Standart protein eğrisi 0,014-0,250 mg/mL aralıkta çizilmiştir (Şekil 3.2).

Uygun şekilde seyreltilmiş 1 mL örneğe, 5 mL C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:2 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 mL ilave edilerek 30 dk oda sıcaklığında bekletilip absorbansları şahite karşı 750 nm'de okunmuştur. Analizde şahit olarak, uygun şekilde seyreltilmiş Horikoshi besiyeri kullanılmıştır. Spesifik aktivite, enzim aktivitesinin toplam protein konsantrasyonuna oranlanması ile hesaplanmıştır.

Çizelge 3.8 Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımı

Deney Sayısı (Run)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Karıştırma Devri (rpm)	Besiyeri Başlangıç pH Değeri
1	35	150	7
2	35	150	8
3	40	100	8
4	35	150	7
5	35	150	7
6	40	200	6
7	35	150	7
8	30	100	8
9	30	200	6
10	35	150	7
11	35	200	7
12	30	100	6
13	40	200	8
14	30	200	8
15	40	150	7
16	40	100	6
17	30	150	7
18	35	150	6
19	35	100	7
20	35	150	7



Şekil 3.2 BSA standart kurvesi

3.2.10 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda ve tarımsal atıkların hazırlanması

Enzim üretim besiyerine, karbon kaynağı olarak sırasıyla buğday kepeği, mısır koçanı ve elma posası ilave edilmiştir. Temin edilen atıklardan elma posası ve mısır koçanı 1

gece boyunca 50°C'deki etüvde (Nüve EV018, Türkiye) kurutulduktan sonra; önce değirmende (Apex-Mill, USA) ardından laboratuvar tip blender (Waring, USA) ve laboratuvar tip değirmende (Perten Instruments, Laboratory Mill 3303, Sweden) öğütülerek oda sıcaklığında depolanmıştır (Şekil 3.3.a, 3.3.b ve 3.3.c). Buğday kepeği kurutulmuş ve öğütülmüş halde temin edildiği için kurutma ve öğütme işlemi uygulanmamıştır. Tüm örneklerin eleme işlemi 650 µm gözenek çapındaki elek (Endecotts, Octagon 200, UK) ile yapılmıştır (Şekil 3.3.d).



a)



b)



c)



d)

Şekil 3.3 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda/tarımsal atıkların öğütülmesinde ve elenmesinde kullanılan cihazlar a) Öğütücü, b) Blender, c) Laboratuvar tipi değirmen, d) Elek sistemi

3.2.11 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda ve tarım atıklarının bileşim analizi

Buğday kepeği, mısır koçanı ve elma posası kurutulup öğütüldükten sonra bileşim analizleri yapılmıştır. Bu örneklerin şeker bileşimi NREL (National Renewable Energy Laboratory) LAP standart analitik metotları ile belirlenmiştir (Sluiter 2005, Sluiter 2008). 0,30 g gıda/tarım atığı tartıldıktan sonra 3 mL %72'lik H₂SO₄ (w/w) ilave edilmiş ve 30°C'deki su banyosunda (Buchi B-100, Switzerland), her 10 dakikada bir cam çubuk ile karıştırılarak, 1 saat bekletilmiştir. Ardından asit konsantrasyonu son durumda %4 H₂SO₄ (w/w) olacak şekilde saf su ilave edilmiş, basınca dayanıklı şişelere aktararak 121°C'deki otoklavda 1 saat bekletilmiştir. Otoklav sonrasında, örnekler cam krozeden (Isolab, Por.4) süzülerek, lignin, şeker bileşimi ve kül analizleri yapılmıştır. Nem tayini ise kurutulup öğütülmüş örneklerden doğrudan ölçülerek yapılmıştır.

Lignin Miktarı Tayini

Otoklav işlemi sonrasında oda sıcaklığındaki örnekler, daraları alınmış cam kroze (Isolab, Por.4) kullanılarak süzülmüş, krozeler 105°C'deki etüvde 1 gece kurutulduktan sonra desikatörde bekletilmiş ve tartımları yapılarak asitte çözünmeyen lignin miktarı hesaplanmıştır. Hesaplama kullanılan eşitlik aşağıda verilmiştir. Asitte çözünen lignin analizi, cam krozeden süzme sonrasında elde edilen filtratın spektrofotometrede 205 nm dalga boyundaki absorbansının kuvartz küvet kullanılarak ölçümüyle yapılmış olup, aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır (Goldschmid 1971). Filtratın 205 nm dalga boyundaki absorbans değeri, 0,7-1,0 aralığında olacak şekilde %4 H₂SO₄ (w/w) ile seyreltilmiş olup, %4 H₂SO₄ (w/w) çözeltisine karşı (Şahit) okuması yapılmıştır. Biyokütlenin absorpsiyon değeri (E) 110 L/g.cm olarak alınmıştır (Van Dongen vd. 2011). Bileşimdeki lignin miktarı asitte çözünen ve çözünmeyen lignin değerlerinin toplamıyla hesaplanmıştır. Analizler 2 tekerrürlü yapılmıştır.

Asitte Çözünmeyen Lignin (AinSL) Miktarı:

$$\% \text{AinSL} = \frac{(A-B)}{C} \times 100$$

Burada;

A: Filtrasyon sonrasında 105°C'deki etüvde 1 gece kurutulan cam kroze ağırlığı (g)

B: Cam kroze darası (g)

C: Analiz edilen örnek miktarı (g)

Asitte Çözünen Lignin (ASL) Miktarı:

$$\% \text{ASL} = \frac{\text{UV}_{\text{abs}} \times \text{Filtrat hacmi (L)} \times \text{Dilüsyon}}{\epsilon \text{ (L/g.cm)} \times \text{Örnek miktarı (g)} \times \text{Spektrofotometre okuma hücresinin ışık yolu (cm)}} \times 100$$

Burada;

UV_{abs}: Uygun dalga boyunda UV-Vis absorpsiyon değeri

Dilüsyon: (Örnek hacmi + Dilüsyon solvent hacmi) / Örnek hacmi

Filtrat hacmi: 0,087 L

ε: Biyokütlenin uygun dalga boyundaki absorpsiyonu (L/g.cm)

Örnek miktarı: 0,30 g

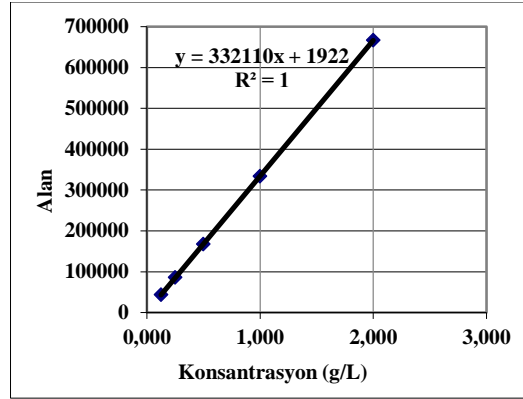
Spektrofotometre okuma hücresinin ışık yolu: 1 cm

Şeker Bileşimi Tayini

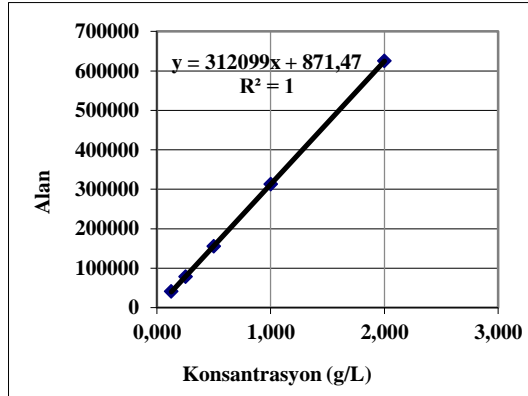
Gıda ve tarım atıklarının bileşimindeki şekerlerin tayini amacıyla, örneklerin cam krozedan süzülmesinin ardından elde edilen filtrat CaCO₃ ile pH 5-6'ya nötrale edilmiştir. Ardından 6000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen sıvı faz 1 gece boyunca 4°C'de bekletildikten sonra şeker analizi için kullanılmıştır. Sıvı faz -20°C'de depolanmıştır. Şeker analizi için Shimadzu HPLC (Yüksek Basıncılı Likit Kromatografi) sistemi kullanılmıştır. Örnekler, 0,45 µm'lik (Millipore Millex-Hv Hydrophilic PvDF) filtreler kullanılarak filtre edilip HPLC'ye enjekte edilmiştir.

Standart kurve oluşturulmasında kullanılan glikoz, ksiloz, arabinoz, standart çözeltileri sırasıyla; 0,125, 0,250, 0,500, 1,00, 2,00 g/L konsantrasyonlarında 2,00 g/L konsantrasyondaki stok çözeltilerden ultrasaf su ile hazırlanmıştır. Standart çözeltilerinin

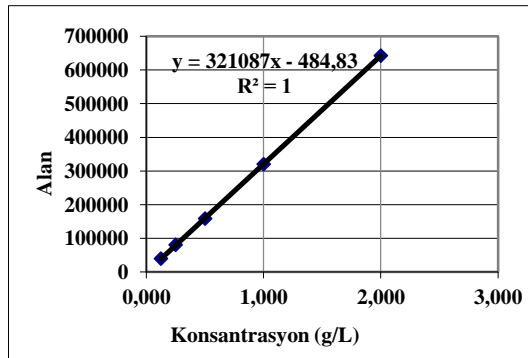
ve mobil fazın hazırlanmasında kullanılan ultrasaf su; vakumlu süzme düzeneği (Millipore, Merck, Germany), vakum pompası (PALL Life Sciences, USA) ve 0,45 µm selüloz nitrat filtre (Sartorius Stedim Biotech, Germany) kullanılarak saf suyun filtrasyonu ile hazırlanmış olup, ardından 1 saat sonikasyon (Jeiotech UC-02, Korea) uygulanmıştır. Kullanılan standart kurveler şekil 3.4, 3.5, 3.6’de verilmiştir.



Şekil 3.4 Glikoz standart kurvesi



Şekil 3.5 Ksiloz standart kurvesi



Şekil 3.6 Arabinoz standart kurvesi

Gıda ve tarım atıklarının bileşiminde bulunun şekerlerin tayini için, NREL LAP metodu gereği öncelikle Transgenomic CarboSep COREGEL 87P şeker kolonu kullanılmıştır. Fakat bu kolonla yapılan analiz sonuçlarında örnek piklerinde yeterli ayrılma sağlanamadığı için, Transgenomic CarboSep COREGEL 87H3 kolonuyla çalışmaya devam edilmiştir ve daha başarılı sonuçlar alınmıştır. Analizler 2 tekerrürlü yapılmıştır. Shimadzu HPLC cihazının özellikleri ve çalışma koşulları aşağıda verilmiştir:

- Shimadzu HPLC cihazı özellikleri:
 - Pompa (LC-20AD)
 - Oto örnekleyici (SIL-20A HT)
 - Gaz giderici (DGU-20A3)
 - Kolon fırını (CTO-10AS VP)
 - Refraktif indeks dedektör (RID-10A)
 - Kolon (Transgenomic CarboSep COREGEL-87H3)
-
- Shimadzu HPLC cihazında Transgenomic CarboSep COREGEL-87H3 kolonu ile çalışma koşulları:
 - Kolon sıcaklığı: 55°C
 - Kolon maksimum basıncı: 100 bar
 - Mobil faz: 5 mM H₂SO₄ çözeltisi
 - Akış hızı: 0,5 mL/dakika
 - Enjeksiyon miktarı: 20 µL
 - Örnek yürütme süresi: 15 dakika

Kül Miktarı Tayini

Kül tayini, otoklav işlemi sonrasında oda sıcaklığındaki örneklerin, daraları alınmış cam kroze (Isolab, Por.4) kullanılarak süzülmesinin ardından 105°C'de kurutulması ve 575°C'deki kül fırınında (Nevola Reis 130/10, Türkiye) yakılmasıyla belirlenmiştir. Yakma sonrasında krozeler desikatörde soğutulduktan sonra tartımları yapılmıştır. Kül miktarının hesaplanmasında aşağıdaki eşitlikten yararlanılmıştır. Analizler 2 tekerrürlü yapılmıştır.

$$\%K\ddot{u}l = \frac{(A - B)}{C} \times 100$$

Burada;

A: K\ddot{u}l fırınında yakma sonrası cam kroze ağırlığı (g)

B: Cam kroze darası (g)

C: Analiz edilen \ddot{u}rnek miktarı (g)

Nem Miktarı Tayini

\dd{u}rneklerin nem miktarı infrared nem tayin cihazı kullanılarak (Sartorius MA-150, Germany) tayin edilmiştir. Tayin sırasında 1,00 g \dd{u}rnek kullanılmış olup, cihaz nem miktarı sonucunu doğrudan yüzde nem olarak vermektedir. Analizler 2 tekerr\dd{u}rl\dd{u} yapılmıştır.

3.2.12 Yanıt Y\dd{u}zey Y\dd{u}ntemi ile deney tasarımı ve gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde ksilanaz \dd{u}retimi

Ksilanaz \dd{u}retim besiyerine ksilan yerine sırasıyla buğday kepeği, mısır kocanı ve elma posası ilave edilmiş; besiyeri başlangıç pH'sı, ink\dd{u}basyon sıcaklığı ve karıştırma devri bağımsız değişkenler olarak seğıilmiştir. Yapılan deneyler, 250 mL'lik erlenlerde 50 mL elma posası ilaveli besiyerinde (Elma posası 5,0 g/L, maya ekstraktı 5,0 g/L, pepton 5,0 g/L, KH₂PO₄ 1,0 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,1 g/L), %1 inok\dd{u}lasyon oranında, çalkalamalı ink\dd{u}bat\dd{u}rde gerçekleştirilmiştir. 39 nolu izolat için besiyeri başlangıç pH değeri olarak, besiyeri form\dd{u}lasyonu sonucu elde edilen pH 6,1 kullanılmıştır. 67 nolu izolata ait deneylerde ise besiyeri başlangıç pH değeri, besiyeri sterilizasyonu sonrasında steril 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl ç\dd{u}zelteleri ile belirlenen pH seviyelerine ayarlanmıştır.

Optimizasyon için Minitab 16 (Minitab, Inc., USA) programı kullanılmıştır. Yanıt Y\dd{u}zey Y\dd{u}ntemi ile deney tasarımında Merkezi Bileşik Tasarım (Central Composite Design full-unblocked), bu tasarımın da Y\dd{u}zey Merkezli (Face Centered) tasarım çeşidi kullanılmıştır. Oluşturulan deney tasarımında; 6 adet merkez noktanın tekrarı bulunmaktadır. Merkezi Bileşik Tasarım'da kullanılan bağımsız değişkenlerin fakt\dd{u}r seviyeleri Horikoshi besiyerinde yapılan optimizasyon sonrası elde edilen veriler doğrultusunda belirlenmiştir. Deney sonuçlarının

grafiksel çizimi Statistica programında (TIBCO Software Inc., USA) yapılmıştır. Deneyle, 250 mL'lik erlende 50 mL besiyeri ile, inkübasyon çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

39 numaralı izolat için gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde yapılacak tasarımda, bağımsız değişken olarak inkübasyon sıcaklığı ve karıştırma devri seçilmiştir. Bu bağımsız değişkenlerin seviyeleri ise inkübasyon sıcaklığı için 25, 30 ve 35°C; karıştırma devri için 100, 150 ve 200 rpm olarak belirlenmiştir. 39 numaralı izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerindeki deney tasarımının bağımsız değişkenleri ve seviyeleri çizelge 3.9'da, oluşturulan deney tasarımı ise çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.9 39 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri

Bağımsız Değişkenler	Değişken Kodları	Seviyeler		
		-1	0	+1
İnkübasyon sıcaklığı (°C)	X ₁	25	30	35
Karıştırma devri (rpm)	X ₂	100	150	200

Çizelge 3.10 39 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımı

Deney Sayısı (Run)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Karıştırma Devri (rpm)
1	30	150
2	35	100
3	25	150
4	30	150
5	35	200
6	30	200
7	30	150
8	25	100
9	30	100
10	25	200
11	35	150
12	30	150
13	30	150

67 numaralı izolat ile atık ilaveli besiyerinde yapılan tasarımda bağımsız değişken olarak inkübasyon sıcaklığı, besiyeri başlangıç pH değeri ve karıştırma devri kullanılmıştır. Bu bağımsız değişkenlerin seviyeleri ise, Horikoshi besiyerindeki deney tasarım sonuçları göz önüne alınarak sırasıyla; inkübasyon sıcaklığı için 25, 30 ve 35°C; besiyeri başlangıç pH değeri için pH 6, 7 ve 8; karıştırma devri için 100, 150 ve 200 rpm olarak belirlenmiştir.

67 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerindeki deney tasarımındaki bağımsız değişkenler ve seviyeleri çizelge 3.11’de, oluşturulan deney tasarımı ise çizelge 3.12’de verilmiştir.

Çizelge 3.11 67 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri

Bağımsız Değişkenler	Değişken Kodları	Seviyeler		
		-1	0	+1
İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	X ₁	25	30	35
Karıştırma Devri (rpm)	X ₂	100	150	200
Besiyeri Başlangıç pH Değeri	X ₃	6	7	8

3.2.13 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda/tarımsal atık konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi

Gıda/tarımsal atığın besiyerindeki konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Gıda/tarımsal atıklar %2,0-5,0-7,0 (w/v) oranlarında Horikoshi besiyerine ksilan yerine karbon kaynağı amacıyla ilave edilmiştir (Battan vd. 2007, Coman ve Bahrim 2011, Adıgüzel ve Tunçer 2016b). Belirtilen konsantrasyonda besiyerine ilave edilip Yanıt Yüzey Yöntemi ile belirlenmiş optimum gelişme değerlerinde, aktiveleştirme besiyerinden %1 inokülasyon oranında, 250 mL’lik erlende 50 mL besiyeri hazırlanarak çalkalamalı inkübatörde enzim üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.2.14 İstatistiksel yöntemler

Araştırmadan elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için Minitab 16 (Minitab Inc., USA) programı kullanılmıştır. Gruplar arası farklılıkları tespit etmek için çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey Testi kullanılmıştır.

Çizelge 3.12 67 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımı

Deney Sayısı (Run)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Karıştırma Devri (rpm)	Besiyeri Başlangıç pH Değeri
1	30	200	7
2	30	100	7
3	25	100	6
4	30	150	7
5	25	200	6
6	30	150	6
7	35	200	8
8	30	150	7
9	25	200	8
10	30	150	7
11	35	100	6
12	30	150	8
13	25	150	7
14	35	100	8
15	35	200	6
16	30	150	7
17	35	150	7
18	30	150	7
19	25	100	8
20	30	150	7

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Değişik Kaynaklardan Bakterilerin İzolasyonu ve Gram Boyama Testi Sonuçları

Çalışma kapsamında değişik kişi ve kurumlardan temin edilen ve toprak, çürümüş saman, kepek, nohut mayası, bitki atıkları, buğday sapı, meyve atıkları, elma posası, ekşi hamur mayası ve fıstık kabuğundan izole edilen 66 yerli bakteri örneğinden; Gram boyama sonucunda 39 izolatın Gram pozitif ve basil şeklinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 İzolatların Gram boyama sonuçları

İzolat no.	Gram Boyama	Hücre Şekli	İzolat no.	Gram Boyama	Hücre Şekli
1*(Referans)	Gram +	Basil	35	Gram +	Basil
2	Gram +	Basil	36	Gram +	Basil
3	Gram +	Basil	37	Gram -	Kokobasil
4	Gram +	Basil	38	Gram -	Kokobasil
5	Gram +	Basil	39	Gram +	Basil
6	Gram +	Basil	40	Gram -	Kok
7	Gram +	Basil	41	Gram var.	Basil
8	Gram +	Basil	42	Gram +	Basil
9	Gram var.	Basil	43	Gram +	Kokobasil
10	Gram +	Basil	44	Gram -	Kokobasil
11	Gram +	Basil	45	Gram +	Basil
12	Gram +	Basil	46	Gram +	Basil
13	Gram +	Basil	47	Gram +	Kokobasil
14	Gram +	Basil	48	Gram var.	Basil
15	Gram +	Kok	49	Gram -	Kokobasil
16	Gram +	Kok	50	Gram +	Basil
17	Gram +	Basil	51	Gram var.	Basil
18	Gram var.	Basil	52	Gram +	Basil
19	Gram +	Basil	53	Gram +	Basil
20	Gram +	Basil	54	Gram +	Basil
21	Gram +	Basil	55	Gram -	Kok
22	Gram +	Basil	56	Gram -	Kok
23	Gram +	Basil	57	Gram +	Basil
24	Gram var.	Basil	58	Gram +	Basil
25	Gram +	Basil	59	Gram +	Basil
26	Gram -	Basil	60	Gram +	Basil
27	Gram +	Basil	61	Gram +	Basil
28	Gram -	Kok	62	Gram -	Kokobasil
29	Gram -	Kokobasil	63	Gram var.	Basil
30	Gram -	Kok	64	Gram +	Basil
31	Gram var.	Kokobasil	65	Gram +	Basil
32	Gram +	Kok	66	Gram +	Basil
33	Gram +	Kokobasil	67	Gram +	Basil
34	Gram +	Kok			

*Ksilanaz üreten referans bakteri suşu *Bacillus subtilis* ATCC 6633'ü ifade etmektedir.

Bacillus cinsine ait bakterilerin Gram pozitif, hücrelerinin basil şeklinde ve sporlu olduğu bilinmektedir (Moteshafi 2016). Bu nedenle izole edilen bakteri örneklerinin *Bacillus* cinsine ait olma ihtimali yüksek olup, izolatların tanımlanması kapsamında örneklere sporlandırma testi uygulanmıştır (Anonim 2017).

4.2 İzolatların Spor Varlığının Belirlenmesi Analizi Sonuçları

İzolatların tanımlanması kapsamında 66 adet yerli izolata ve referans suş olarak kullanılan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşuna spor varlığının belirlenmesi analizi yapılmış olup, analiz sonuçları çizelge 4.2’de verilmiştir. 57 adet örnek, ısıl işlem sonrasında PCA besiyerinde gelişme göstermiş, dolayısıyla izolatların spor oluşturan bakteri olduğu sonucu elde edilmiş olup, bu izolatlar postansiyel *Bacillus* cinsine ait olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.2 İzolatların spor varlığının belirlenmesi analizi sonuçları

İzolat no.	Spor Varlığı	İzolat no.	Spor Varlığı
1*	Var	35	Yok
2	Var	36	Var
3	Var	37	Var
4	Var	38	Var
5	Var	39	Var
6	Var	40	Var
7	Var	41	Var
8	Var	42	Var
9	Var	43	Var
10	Var	44	Var
11	Var	45	Var
12	Var	46	Var
13	Var	47	Var
14	Yok	48	Var
15	Yok	49	Yok
16	Var	50	Yok
17	Var	51	Var
18	Var	52	Var
19	Var	53	Var
20	Var	54	Var
21	Var	55	Var
22	Var	56	Var
23	Var	57	Yok
24	Var	58	Var
25	Var	59	Var
26	Yok	60	Var
27	Var	61	Var
28	Var	62	Var
29	Var	63	Var
30	Var	64	Var
31	Var	65	Var
32	Var	66	Var
33	Var	67	Var
34	Var		

**Bacillus subtilis* ATCC 6633

4.3 Ksilanaz Aktivitesine Sahip İzolatların Belirlenmesi

Örneklerden, ksilanaz enzim aktivitesine sahip olan izolatları belirlemek amacıyla, 10 mL Horikoshi besiyerinde %1 inokülasyon oranında ekim yapılmış, ardından 28°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Ksilanaz aktivitesi sonuçları çizelge 4.3’te verilmiştir. En yüksek ksilanaz aktivitesine 6,79 U/mL ile 3 numaralı izolatın sahip olduğu

belirlenmiştir. Ksilanaz aktivite değeri 2,00 U/mL'den düşük olan izolatların, önemli bir aktiviteye sahip olmadıkları düşünülmüştür. Çalışmanın ilerleyen aşamalarına ksilanaz aktivite değeri yüksek olarak belirlenen 12 adet izolatla devam edilmiş olup, bunlar sırasıyla; 3, 39, 43, 44, 45, 46, 48, 63, 64, 65, 66, 67 numaralı izolatlardır.

Çizelge 4.3 İzolatların ksilanaz aktivite sonuçları (U/mL)

İzolat no.	Ksilanaz Aktivitesi (U/mL)**	İzolat no.	Ksilanaz Aktivitesi (U/mL)
1*	1,77 ±0,30	35	2,28 ±0,02
2	3,38 ±0,06	36	< 2,00
3	6,79 ±0,01	37	< 2,00
4	< 2,00	38	< 2,00
5	3,13 ±0,09	39	4,42 ±0,02
6	< 2,00	40	< 2,00
7	3,00 ±0,14	41	< 2,00
8	3,36 ±0,09	42	2,70 ±0,08
9	3,67 ±0,06	43	4,18 ±0,05
10	3,30 ±0,07	44	5,77 ±0,06
11	2,98 ±0,09	45	3,97 ±0,11
12	3,10 ±0,07	46	4,11 ±0,00
13	3,21 ±0,01	47	3,13 ±0,04
14	< 2,00	48	5,30 ±0,03
15	< 2,00	49	3,55 ±0,01
16	< 2,00	50	< 2,00
17	< 2,00	51	< 2,00
18	2,91 ±0,03	52	< 2,00
19	3,10 ±0,18	53	< 2,00
20	< 2,00	54	< 2,00
21	3,59 ±0,18	55	< 2,00
22	3,74 ±0,02	56	< 2,00
23	< 2,00	57	< 2,00
24	3,45 ±0,13	58	< 2,00
25	3,61 ±0,01	59	< 2,00
26	2,24 ±1,96	60	< 2,00
27	3,46 ±0,06	61	< 2,00
28	< 2,00	62	< 2,00
29	< 2,00	63	4,18 ±0,10
30	< 2,00	64	4,25 ±0,05
31	< 2,00	65	4,90 ±0,01
32	< 2,00	66	3,93 ±0,01
33	3,81 ±0,09	67	4,57 ±0,06
34	< 2,00		

**Bacillus subtilis* ATCC 6633

**Sonnular aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.4 İzolatların Hücre ve Koloni Morfolojilerinin Belirlenmesi

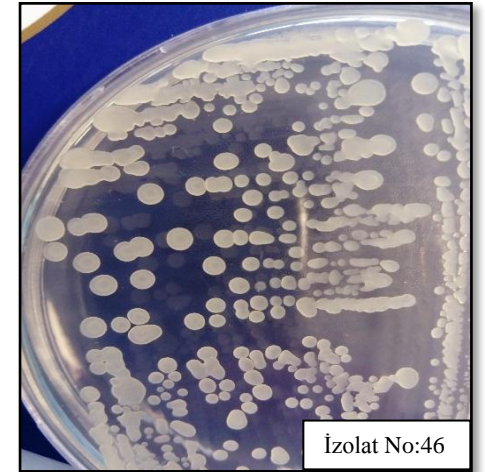
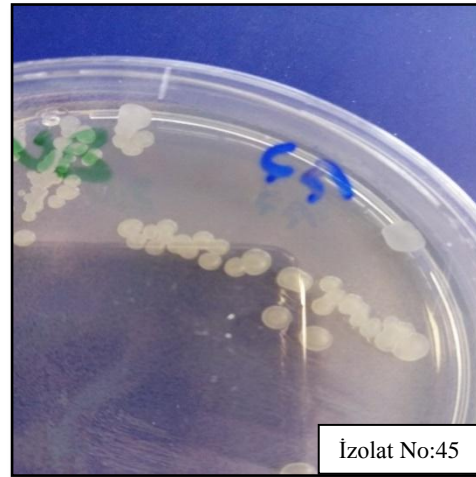
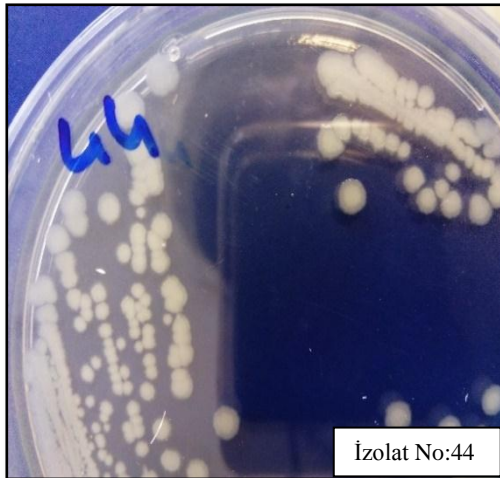
Çalışma kapsamında izole edilen bakteri izolatlarına tanımlama testlerinden biri olan koloni morfoloji testi uygulanmıştır. 12 adet izolatın hücre ve koloni morfolojik özellikleri çizelge 4.4'te, Nutrient Agar besiyerinde 28°C'de 24 saat inkübasyon sonucu elde edilen tek koloni görünüşleri şekil 4.1, 4.2'de verilmiştir. Gram boyama testi sonucunda 3, 39, 45, 46, 64, 65, 66 ve 67 numaralı izolatların Gram pozitif ve hücre şekillerinin basil şeklinde olduğu, dolayısıyla *Bacillus* cinsine ait olabileceği belirlenmiştir. Gram boyama sonucu değişik hücre morfolojisine sahip izolatların her birini temsilen şekil 4.3.a, 4.3.b, 4.3.c'de sırasıyla 39, 48, 63 numaralı izolatlara ait ışık mikroskopuyla elde edilmiş görüntüleri verilmiştir.

Çizelge 4.4 İzole edilen bakteri örneklerinin hücre ve koloni morfolojileri

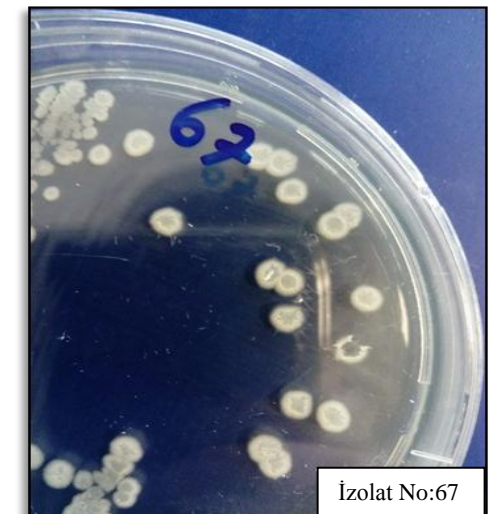
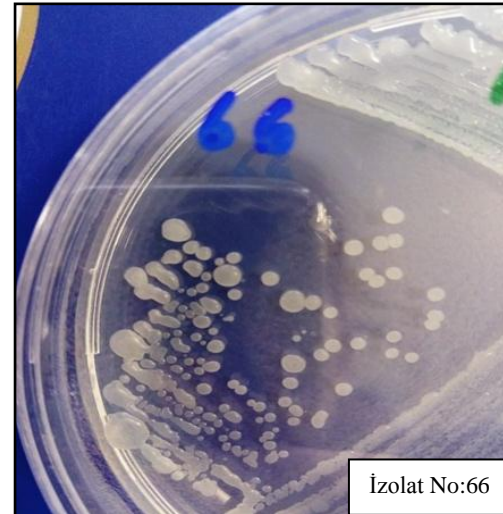
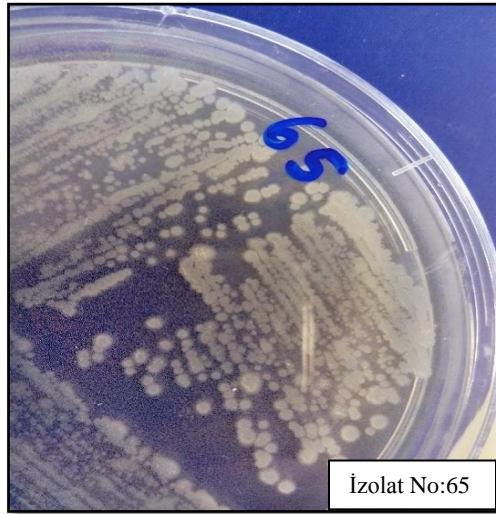
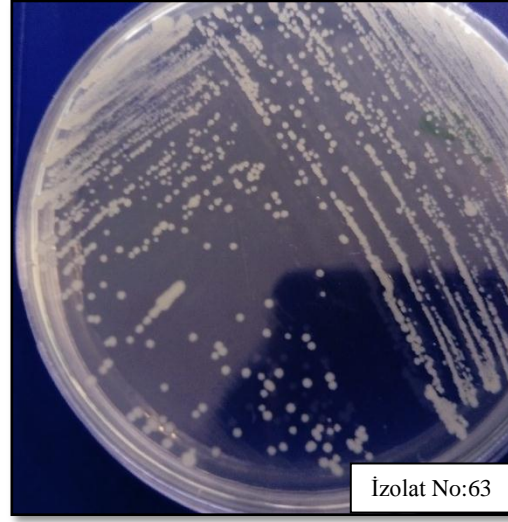
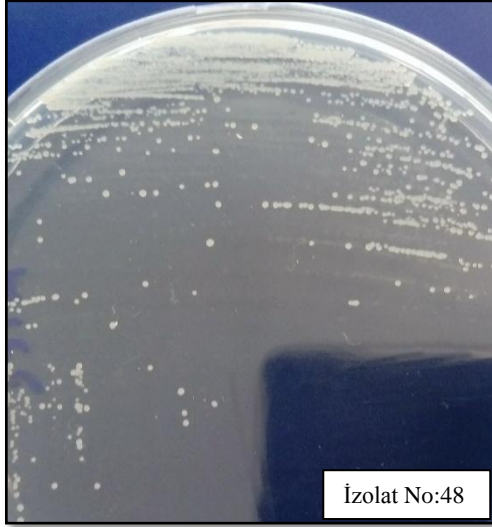
İzolat No.	Hücre Morfolojisi		Koloni Morfolojisi				
	Gram Boyama	Hücre Şekli	Koloni Şekli	Koloni Kenarı	Koloni Yükseltisi	Koloni Yüzeyi	Koloni Yapısı
3	Gram +	Basil	Dairesel	Düz	Konveks	Parlak	Kuru
39	Gram +	Basil	Dairesel	Dalgalı	Konveks	Pürüzlü	Kuru
43	Gram +	Kokobasil	Dairesel	Düz	Konveks	Parlak	Kuru
44	Gram var.	Basil	Dairesel	Dalgalı	Konveks	Pürüzlü	Kuru
45	Gram +	Basil	Dairesel	Düz	Düğmeli	Parlak	Mokoid
46	Gram +	Basil	Dairesel	Dalgalı	Konveks	Pürüzlü	Kuru
48	Gram +	Kok	Dairesel	Düz	Konveks	Parlak	Kuru
63	Gram +	Kokobasil	Dairesel	Düz	Konveks	Parlak	Kuru
64	Gram +	Basil	Dairesel	Düz	Konveks	Parlak	Kuru
65	Gram +	Basil	Dairesel	Dalgalı	Konveks	Pürüzlü	Kuru
66	Gram +	Basil	Dairesel	Düz	Düğmeli	Parlak	Mukoid
67	Gram +	Basil	Dairesel	Dalgalı	Konveks	Pürüzlü	Kuru

Gram pozitif ve basil hücre morfolojisine sahip 8 adet izolatın koloni görüntüsü incelendiğinde; 39, 46, 65 ve 67 numaralı izolatların geniş, krem renkli, dalgalı kenarlı, yüzeyi pürüzlü ve kuru koloni morfolojisine sahip oldukları gözlenmiştir. 3, 43 ve 64 numaralı izolatların küçük boyutta, yuvarlak, krem renkli, düz kenarlı, konveks ve yüzeyi parlak kolonilere sahip olduğu görülmüştür. 45 ve 66 numaralı izolatların ise, diğer 6 izolattan (izolat no: 3, 39, 46, 64, 65, 67) farklı olarak, mukoid yapıda ve düğme şeklinde koloniler oluşturduğu gözlenmiştir. 12 izolatın Nutrient Broth besiyerinde gelişmeleri incelendiğinde; 43, 44, 48 numaralı izolatların besiyerinde sadece bulanıklık oluşturduğu, 3, 39, 45, 46, 63, 64, 65, 66, 67 numaralı izolatların tümünün 43, 44, 48 numaralı izolatlara kıyasla sıvı besiyerinde daha düşük bulanıklık ve bu üç izolattan farklı olarak yüzeyde zar oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4.a ve 4.4.b).

Ghosh vd. (2002) izole ettikleri *Bacillus circulans* kolonilerini yuvarlak, konveks, yüzeyi pürüzlü; *Bacillus pumilus* kolonilerini yuvarlak, konveks, yüzeyi pürüzsüz; *Bacillus cereus* kolonilerini ise yuvarlak, konveks, mukoid özellikte olduğunu bildirmişlerdir. Rehman vd. (2015) çürük sebzelerden izole ettikleri *Bacillus licheniformis* kolonilerini Nutrient Agar besiyerinde kıvrımlı, opak, mukoid özellikte olduğunu belirtmişlerdir. Anbu vd. (2017) topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* kolonilerini Nutrient Agar besiyerinde geniş, yuvarlak, beyaz ve mukoid olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalar, *Bacillus* cinsine ait çeşitli türlerin birbirinden farklı koloni morfolojisine sahip olabileceğini göstermektedir. Bu çalışma kapsamında izole edilen Gram pozitif ve basil hücre morfolojisine sahip izolatlar, sırasıyla 3, 39, 45, 46, 64, 65, 66, 67 numaralı izolatların hücre ve koloni morfolojisi göz önüne alındığında, literatürdeki çalışma sonuçlarıyla benzer sonuçlar elde edilmiş olup, *Bacillus* cinsine ait olma ihtimallerinin yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (Anonim 2017).



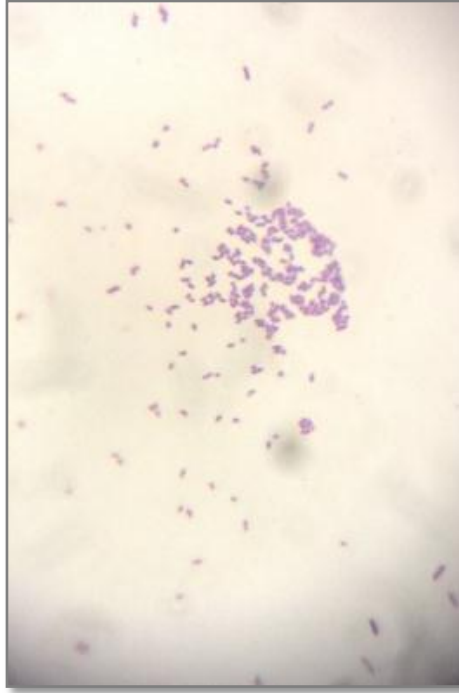
Şekil 4.1 3, 39, 43, 44, 45 ve 46 nolu izolatların Nutrient Agar besiyerinde 28°C'de 24 saat inkübasyon sonucu elde edilen tek koloni morfolojisi



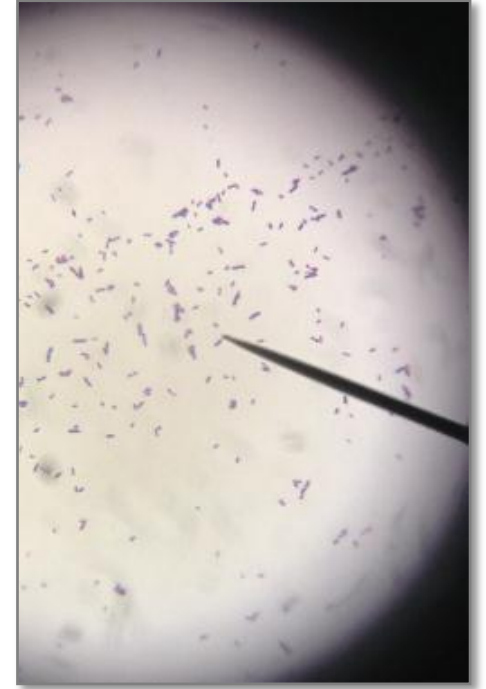
Şekil 4.2 48, 63, 64, 65, 66 ve 67 nolu izolatların Nutrient Agar besiyerinde 28°C'de 24 saat inkübasyon sonucu elde edilen tek koloni morfolojisi



a)

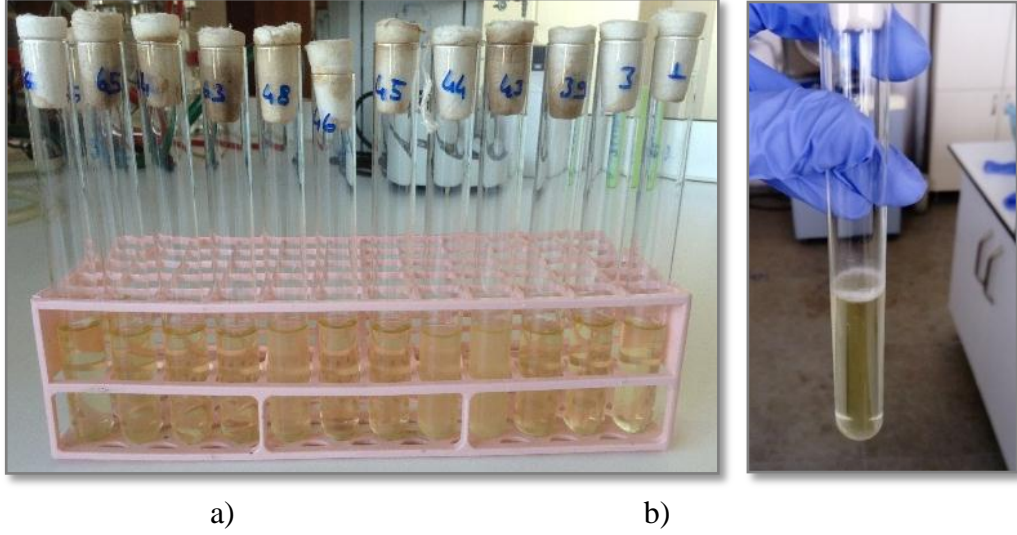


b)



c)

Şekil 4.3 İzolatların Gram boyama sonucu ışık mikroskobundaki hücre morfolojisi görüntüsü (a-39, b-48, c-63 numaralı izolatlar)



Şekil 4.4 a) İzolatların TSB besiyerinde 28°C’de 24 saat inkübasyon sonucu gelişme görünümü, b) 39 numaralı izolataın TSB Broth besiyerindeki gelişme görünümü ve besiyeri yüzeyinde zar görüntüsü

4.5 İzolatların Ksilanaz Aktivite Değerleri

Bu çalışmada, izolatların ksilanaz aktivitesi ilk aşamada 10 mL’lik Horikoshi besiyerinde çalkalamalı inkübasyon yapılmadan belirlenmiştir. Gelişme besiyeri hacminde ölçek büyütmenin ve çalkalamalı inkübasyonun enzim aktivitesine etkisi bulunduğu bildirilmiştir (Kapoor vd. 2008, Helianti vd. 2016, Yegin vd. 2016). Çalışmanın Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimizasyon basamağında, 250 mL’lik erlende 50 mL Horikoshi besiyeri olacak şekilde enzim üretimi planlandığı için ksilanaz aktivite değeri yüksek olan 2 adet yerli izolatu belirlemek amacıyla; 250 mL’lik erlenlerde 50 mL Horikoshi besiyeri olacak şekilde izolatların ksilanaz aktiviteleri belirlenmiştir. Nutrient Broth besiyerinde aktifleştirilmiş kültürden %1 inokülasyon oranında Horikoshi besiyerine ekim yapılmıştır. 12 adet yerli izolat, 28°C’de 150 rpm’de 24 saat çalkalamalı olarak inkübe edilmiş, sonuçlar çizelge 4.5’te verilmiştir.

İzolatlardan, en yüksek aktivite değeri 13,33 U/mL ile 39 numaralı izolatta saptanmıştır. 43 ve 44 numaralı izolatlar 2,00 U/mL’den düşük, 63 numaralı izolat ise 2,37 U/mL ile en düşük aktiviteye sahip izolatlar olarak belirlenmiştir. Gram boyama, koloni morfolojileri, gelişme hızları ve ksilanaz aktivite analiz sonuçları göz önüne alındığında; Gram pozitif ve basil hücre şekline sahip 3, 39, 45, 46, 64, 65, 66, 67

numaralı izolatlar potansiyel ksilanaz üreticisi *Bacillus* sp. olarak değerlendirilmiş, 16S rRNA dizi analizi için seçilmiştir. Gram pozitif, basil hücre morfolojisine sahip olmayan ve ksilanaz enzim aktivite değeri düşük olan 43, 44, 48 ve 63 numaralı izolatların Nutrient Broth besiyerindeki gelişmelerinin zayıf olduğu belirlenmiş olup, ilerleyen aşamaları için uygun izolatlar olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.5 İzolatların 50 mL Horikoshi besiyerindeki ksilanaz aktivite sonuçları

İzolat No.	Ksilanaz Aktivitesi (U/mL)
1*	0,49 ±0,02
3	3,58 ±0,58
39	13,33 ±1,08
43	<2,00
44	<2,00
45	5,23 ±0,67
46	5,55 ±0,52
48	4,93 ±2,55
63	2,37 ±0,37
64	4,30 ±0,48
65	6,20 ±0,70
66	3,72 ±0,48
67	5,57 ±0,09

**Bacillus subtilis* ATCC 6633

Çalışmanın sonraki basamağında ksilanaz üretim koşullarını Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimize etmek amacıyla, cins ve tür tanımlaması yapılan izolatlar arasından ksilanaz aktivite değerleri göz önüne alındığında 13,33 U/mL ve 6,20 U/mL aktiviteye sahip olan 39 ve 65 numaralı izolatların ileriki aşamalar için seçilebileceği belirlenmiştir. Ancak, diğer izolatlara kıyasla daha yüksek ksilanaz aktivitesine sahip 65 numaralı izolat ile yapılan ön denemelerde, ard arda yapılan deneylerde stabil enzim aktivitesine sahip olmamasından dolayı çalışmada kullanılacak ikinci yerli izolat olarak diğer yüksek ksilanaz aktivitesine sahip 67 numaralı izolat tercih edilmiştir.

Kapoor vd. (2008) *Bacillus pumilus* MK001 suşu ile çeşitli tarımsal atıklar ilave ettikleri besiyerini kullanarak yaptıkları ksilanaz üretim çalışmasında karıştırma devrinin besiyerinde çözünen oksijen miktarını, dolayısıyla da fermantasyon prosesini etkilediğini belirtmişlerdir. Sepahy vd. (2011) de *Bacillus mojavensis* AG137 ile yaptıkları çalışmada benzer sonucu elde etmişlerdir. Ayrıca besiyerini mekanik olarak karıştırmanın, topaklaşmayı da önlemesinden dolayı en iyi karıştırma yöntemi olduğu belirtilmektedir (Gusek vd. 1991).

4.6 İzolatların 16S rRNA Gen Dizi Analizi ile Cins ve Türlerinin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında izole edilen, hücre ve koloni morfolojik özellikleri yanı sıra ksilanaz aktivite değerleri dikkate alınarak seçilen 3, 39, 45, 46, 64, 65, 66, 67 numaralı izolatların 16S rRNA PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görünüşleri ve gen dizi analizi sonucu baz dizilimleri elde edilmiştir (EK 1, EK 2). Baz dizilimleri BLAST programıyla analiz edilmiş olup, sonuçlar tür bazında benzerlik oranı olarak çizelge 4.6'da verilmiştir. Analiz sonucunda izolatların tamamının *Bacillus* cinsine ait olduğu ve belirlenen türlerle benzerlik oranlarının %99 olduğu görülmüştür.

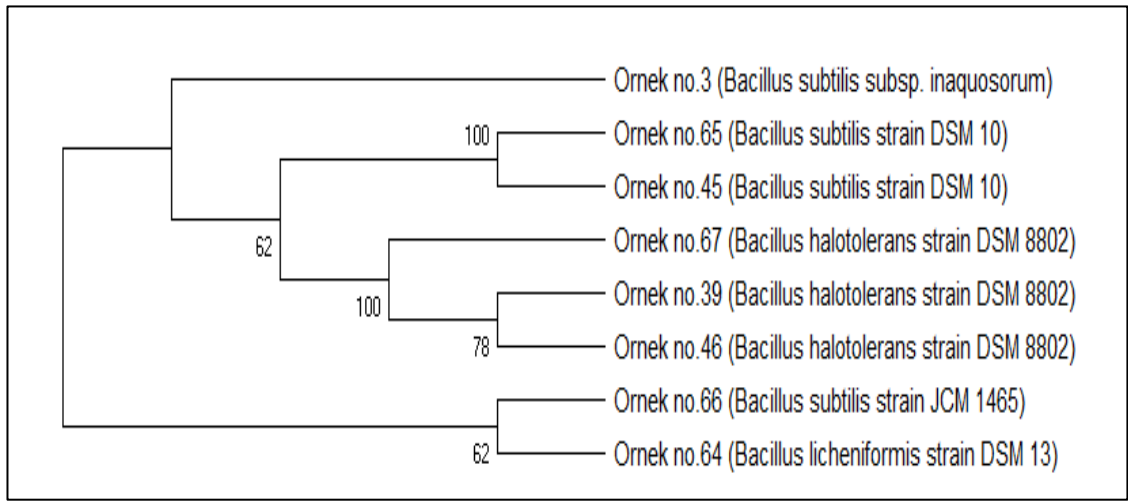
Çizelge 4.6 Çalışmada izole edilen bakteri örneklerinin 16S rRNA dizi analiz sonuçları

İzolat No.	Kaynağı	Tür Adı	Benzerlik Oranı, %
3	*	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> BGSC 3A28	99
39	Nohut Mayası	<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802	99
45	Buğday Sapı	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	99
46	Buğday Sapı	<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802	99
64	Fıstık Kabuğu	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	99
65	Fıstık Kabuğu	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	99
66	Fıstık Kabuğu	<i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465	99
67	Fıstık Kabuğu	<i>Bacillus halotolerans</i> DSM 8802	99

*3 nolu izolat yerli izolat olup, Prof. Dr. İsmail KARABOZ (Ege Üniv. Fen Fak. Biyoloji Bölümü)'dan temin edilmiştir.

4.7 Filogenetik Ağaç Çizimi

16S rRNA gen dizi analizi sonucu elde edilen baz dizilimleri EK 2’de verilmiştir. MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, USA) programında 16S rRNA dizi analizi sonucu belirlenen baz dizilimleri kullanılarak, 8 izolatın filogenetik ağaç çizimi yapılmış, izolatların birbirleriyle olan benzerliklerinin güvenilirlik oranı yüzde olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Yerli izolatların filogenetik ağaç üzerinde gösterimi

Çalışmanın sonraki basamağında, ksilanaz üretim koşullarını Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimize etmek amacıyla kullanılacak 39 ve 67 nolu izolatların her ikisinin de, 16S rRNA dizi analizi sonucunda, *Bacillus halotolerans* türüne ait olduğu belirlenmiştir.

4.8 İzolatlarla Ksilanaz Enzimi Üretiminde Yanıt Yüzey Yöntemi Analiz Sonuçları

Minitab programında Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım Modeli’yle Horikoshi besiyerinde ksilanaz enzim üretiminin, 39 ve 67 numaralı izolatlar ile *Bacillus subtilis* ATCC 6633 referans suşu için optimizasyonu yapılmıştır. Bu kapsamda, yanıt (enzim aktivitesi) üzerine etkisi olan her bir bağımsız değişken için 3 seviye olacak şekilde; inkübasyon sıcaklığı 30, 35 ve 40°C; karıştırma devri 100, 150,

200 rpm; besiyeri başlangıç pH değeri pH 6, 7 ve 8 kullanılarak yapılan deney tasarımı sonucunda 39 numaralı, 67 numaralı izolatlar ve *Bacillus subtilis* ATCC 6633 referans suşu için elde edilen ksilanaz enzim aktivitesi sonuçları sırasıyla, çizelge 4.7, 4.8 ve 4.9'da verilmiştir. Enzim aktivite sonuçları, elde edilen değerlerin ortalamasını ifade etmektedir. Enzim aktivite değerlerinin elde edilmesinin ardından, Minitab programında Yanıt Yüzey Yöntemi ile dizayn edilen tasarımın analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda regresyon katsayısının (R^2), tahminlenmiş regresyon katsayısının (R-Sq(pred)), standart sapmanın (S), model uygunsuzluğunun (lack of fit), inkübasyon sıcaklığı, karıştırma devri ve besiyeri başlangıç pH bağımsız değişkenlerinin ve bağımsız değişkenlerin ayrı ayrı birbiriyle interaksyonlarının ve sonuçların istatistiki açıdan önemli olup olmadığı incelenmiştir.

Çizelge 4.7 39 nolu izolata ait Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeli ile yapılan deney tasarımı sonuçları

Deney Numarası (Run)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Karıştırma Devri (rpm)	Besiyeri Başlangıç pH Değeri	Enzim Aktivitesi (U/mL)
1	35	150	7	12,83
2	35	150	8	10,12
3	40	100	8	7,47
4	35	150	7	12,80
5	35	150	7	13,33
6	40	200	6	9,04
7	35	150	7	12,68
8	30	100	8	23,01
9	30	200	6	13,90
10	35	150	7	13,15
11	35	200	7	12,72
12	30	100	6	19,22
13	40	200	8	7,03
14	30	200	8	16,15
15	40	150	7	10,43
16	40	100	6	7,27
17	30	150	7	20,30
18	35	150	6	12,98
19	35	100	7	9,88
20	35	150	7	13,30

Çizelge 4.8 67 nolu izolata ait Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeli ile yapılan deney tasarımı sonuçları

Deney Numarası (Run)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Karıştırma Devri (rpm)	Besiyeri Başlangıç pH Değeri	Enzim Aktivitesi (U/mL)
1	35	150	7	13,98
2	35	150	8	12,70
3	40	100	8	7,17
4	35	150	7	18,55
5	35	150	7	10,81
6	40	200	6	6,02
7	35	150	7	12,60
8	30	100	8	16,48
9	30	200	6	8,34
10	35	150	7	12,60
11	35	200	7	17,99
12	30	100	6	13,30
13	40	200	8	4,39
14	30	200	8	8,46
15	40	150	7	9,23
16	40	100	6	8,38
17	30	150	7	18,68
18	35	150	6	16,97
19	35	100	7	9,26
20	35	150	7	16,18

Çizelge 4.9 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 referans suşa ait Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeli ile yapılan deney tasarımı sonuçları

Deney Numarası (Run)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Karıştırma Devri (rpm)	Besiyeri Başlangıç pH Değeri	Enzim Aktivitesi (U/mL)
1	35	150	7	4,84
2	35	150	8	5,01
3	40	100	8	4,88
4	35	150	7	5,24
5	35	150	7	5,00
6	40	200	6	5,66
7	35	150	7	4,84
8	30	100	8	5,29
9	30	200	6	5,32
10	35	150	7	5,40
11	35	200	7	4,97
12	30	100	6	4,69
13	40	200	8	5,61
14	30	200	8	5,21
15	40	150	7	4,55
16	40	100	6	5,01
17	30	150	7	5,45
18	35	150	6	5,07
19	35	100	7	4,80
20	35	150	7	4,84

4.9 İzolatlarla Ksilanaz Enzimi Üretiminde Yanıt Yüzey Yöntemi Varyans Analizi Sonuçları

Yanıt Yüzey Yöntemi ile yapılan tasarım sonuçlarında her bir bağımsız değişken ve yanıt için temel göstergeler olan varyans analiz (ANOVA) tablolarının sonuçları, regresyon katsayısının (R^2 ya da R-Sq) ve tahminlenmiş regresyon katsayısının (R-Sq(pred)) 1,0'a ne kadar yakın olduğu, model uygunsuzluğunun (lack of fit) ideal olarak istatistiksel açıdan önemsiz yani P değerinin 0,05 değerinden büyük olma durumu incelenmiştir. Yanıt Yüzey Yöntemi, sadece prosesin optimizasyonu amaçlı değil, bağımsız değişkenlerin ayrı ayrı ve birbirleriyle etkileşimlerinin yanıt üzerine etkisini belirlemede de kullanılmaktadır. Böylece elde edilen analiz sonuçları bağımsız değişkenlerin yanıt üzerindeki etkisinin istatistiki açıdan önemli olup olmadığını

saptamak ve bağımsız değişkenlerin seviye aralıklarının seçiminin kontrolünü de mümkün kılmaktadır. Bu çalışmada, inkübasyon sıcaklığı (°C), karıştırma devri (rpm) ve besiyeri başlangıç pH değeri bağımsız değişkenlerinin ksilanaz aktivitesine ‘yanıt’ etkisi incelenmiştir. Çalışma kapsamında izole edilen, 39 numaralı yerli izolatların Horiskoshi besiyerinde ksilanaz üretiminin Yanıt Yüzey Yöntemi ile tasarımı sonucunda elde edilen verilerin analiz sonuçları, çizelge 4.10 ve çizelge 4.11’de verilmiştir. Çizelgelerde, sıcaklık (°C) terimi inkübasyon sıcaklığını, devir (rpm) terimi karıştırma devrini, pH terimi ise besiyeri başlangıç pH değerini ifade etmektedir.

39 numaralı izolata ait tasarım sonucunda regresyon katsayısı 0,824, model uygunsuzluğu sonucu (lack of fit) P değeri 0,735 olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.10 ve 4.11). R^2 değerinin 1,0’a yakın bir değer olduğu, ancak yeterince yüksek olmadığı görülmektedir. Model uygunsuzluğu istatistiksel açıdan önemsiz ($P>0,05$) bulunmuş olup, böylece tasarlanan modelin sonuçlarla uyumlu olduğu anlaşılmaktadır (Çizelge 4.11). Karıştırma devri ve inkübasyon sıcaklığı bağımsız değişkenlerinin ksilanaz aktivitesine etkisinin, istatistiki açıdan önemli ($P<0,05$) olduğu belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerin birbiriyle interaksiyonunun istatistiksel açıdan önemsiz olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.10 39 nolu izolata ait Yanıt Yüzey Yöntemi ile belirlenen tahminlenen regresyon katsayıları

Terim	Coef ^a	SE Coef ^b	T	P
Constant	13,8920	0,9062	15,330	0,000
Devir	-2,2057	0,8742	-2,523	0,033
Sıcaklık	-3,0070	0,7992	-3,762	0,004
pH	-0,3810	0,7992	-0,477	0,645
Devir *Devir	-6,3637	1,8955	-3,357	0,008
Sıcaklık*Sıcaklık	0,3000	1,6545	0,181	0,860
pH*pH	1,1800	1,6545	0,713	0,494
Devir*Sıcaklık	0,9800	0,8935	1,097	0,301
Devir*pH	-0,4350	0,8935	-0,487	0,638
Sıcaklık*pH	-0,7675	0,8935	-0,859	0,413
R-Sq(R^2) = %82,47 R-Sq(pred)=%31,92 S=2,52				

^a Coefficient (katsayı) , ^b Standard error coefficient (Standart hata katsayısı)

R-Sq (Regresyon katsayısı), R-Sq(pred) (Tahminlenmiş regresyon katsayısı), S (Standart sapma)

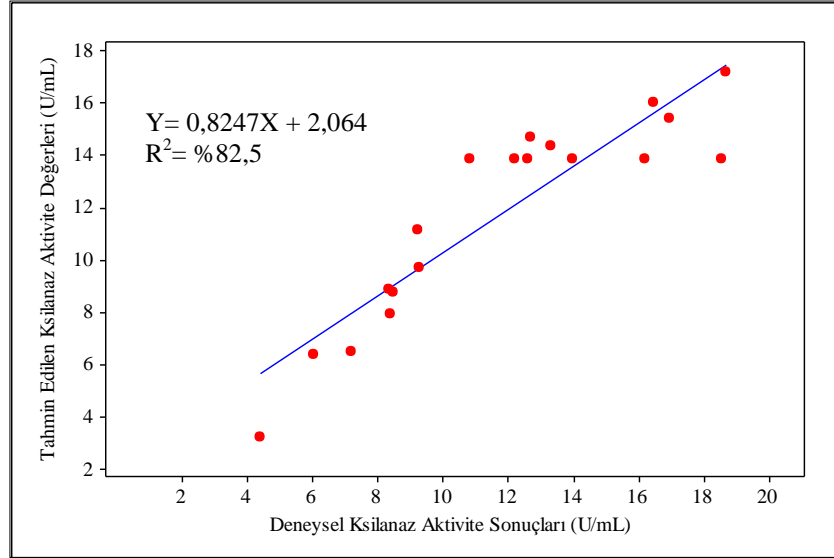
Çizelge 4.11 39 nolu izolata ait Yanıt Yüzey Yöntemi varyans analizi sonucu

Source	DF ^a	Seq SS ^b	Adj SS ^c	Adj MS ^d	F	P	
Model	9	270,423	270,423	30,0470	4,70	0,015	anlamlı
Linear	3	119,097	132,538	44,1792	6,92	0,010	
Devir	1	27,225	40,665	40,6655	6,37	0,033	
Sıcaklık	1	90,420	90,420	90,4205	14,16	0,004	
pH	1	1,452	1,452	1,4516	0,23	0,645	
Square	3	137,417	137,417	45,8057	7,17	0,009	
Devir*Devir	1	133,576	71,995	71,9952	11,27	0,008	
Sıcaklık*Sıcaklık	1	0,592	0,210	0,2100	0,03	0,860	
pH*pH	1	3,249	3,249	3,2489	0,51	0,494	
Interaction	3	13,909	13,909	4,6365	0,73	0,562	
Devir*Sıcaklık	1	7,683	7,683	7,6832	1,20	0,301	
Devir *pH	1	1,514	1,514	1,5138	0,24	0,638	
Sıcaklık*pH	1	4,712	4,712	4,7125	0,74	0,413	
Residual Error	9	57,485	57,485	6,3873			
Lack-of-Fit	4	16,597	16,597	4,1492	0,51	0,735	anlamsız
Pure Error	5	40,889	40,889	8,1778			
Total	18	327,909					

^a Degrees of freedom (Serbestlik derecesi), ^b Sequential sum of squares (Ardışık kareler toplamı), ^c Adjusted sum of squares (Düzeltilmiş kareler toplamı), ^d Adjusted mean square (Düzeltilmiş ortalama kareler)

Tahminlenmiş regresyon katsayısı değerinin (R-Sq(pred)) regresyon katsayısı (R-sq) değerine yakın olması arzu edilmek olup, modelin yeni gözlemleri ne derecede güçlü tahmin ettiğini gösteren bir değerdir. 39 numaralı izolat için yapılan tasarımda, tahminlenmiş regresyon katsayısı değeri (%31,92) regresyon katsayısından (%82,47) düşük çıkmıştır (Çizelge 4.11). 39 numaralı izolata ait tasarımda seçilen parametrelerden bazılarının aktiviteye etkisinin istatistiki açıdan önemsiz çıkması, tahminlenmiş regresyon katsayısı değerini düşürmektedir. Bu modelde besiyeri başlangıç pH parametresinin ve ikili interaksiyonların istatistiki açıdan yanıt etkisinin önemsiz çıkması, modelin yeni gözlemleri daha zayıf bir şekilde tahmin ettiğini göstermektedir. Standart sapma değeri modelin yanıtı ne kadar iyi tanımladığını gösteren bir diğer ölçüttür. Standart sapma değerinin düşük olması arzu edilmekte olup, 39 numaralı izolat için 2,52 değerinde bulunmuş olup, kabul edilebilir bir seviyede olduğu görülmektedir (Çizelge 4.11). Şekil 4.6'da görüldüğü gibi, model yardımıyla tahmin edilen ksilanaz enzimi aktivite değerleriyle deneysel olarak elde edilen sonuçlar büyük ölçüde uyum içerisindedir. Tasarlanan model istatistiki açıdan anlamlı (P<0,05) olarak çıkmış olup, böylece ksilanaz aktivitesini tahmin etmek için oluşturulan bu

model kullanıldığında %1,5 ihtimalle modelin dışında sonuç elde edileceğini göstermektedir (Çizelge 4.11).



Şekil 4.6 39 nolu izolata ait Horikoshi besiyerinde elde edilen ksilanaz aktivitesi deneysel sonuçlarıyla model sonuçlarının karşılaştırılması

Tasarımdan, enzim aktivitesini tahmin etmek için elde edilen denklem aşağıdaki şekildedir (Eşitlik 4.1). Burada; Y ksilanaz enzim aktivitesini, X_1 inkübasyon sıcaklığını, X_2 ise karıştırma devrini, X_3 ise besiyeri başlangıç pH değerini ifade etmekte olup; bu terimlerin denklemdaki birimleri, sırasıyla U/mL, °C ve rpm'dir.

$$Y = 33,3090 - 0,9549X_1 + 0,6432X_2 - 10,2235X_3 + 0,012(X_1)^2 - 0,0025(X_2)^2 + 1,18(X_3)^2 + 0,0039X_1X_2 - 0,1535X_1X_3 - 0,0087X_2X_3 \quad (4.1)$$

67 numaralı yerli izolatların Horiskoshi besiyerinde ksilanaz üretiminin Yanıt Yüzey Yöntemi ile tasarımı sonucunda elde edilen verilerin analiz sonuçları, çizelge 4.12 ve çizelge 4.13'te verilmiştir. Regresyon katsayısı (R^2) 0,996, model uygunsuzluğu sonucu (lack of fit) P değeri 0,109 olarak hesaplanmıştır. R^2 değeri 1,0'a oldukça yakın olarak elde edilmiştir. Model uygunsuzluğu istatistiksel açıdan önemsiz ($P > 0,05$) bulunmuş olup, böylece tasarlanan modelin sonuçlarla uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Karıştırma devri, inkübasyon sıcaklığı ve besiyeri başlangıç pH değeri bağımsız değişkenlerinin ayrı ayrı ve birbirleriyle interaksiyonlarının aktiviteye etkisinin, istatistiki açıdan önemli

(P<0,05) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12). Bu modelde tahminlenmiş regresyon katsayısı değeri (R-Sq(pred), %96,74) regresyon katsayısına (R²) oldukça yakın bir değer olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.12). Modelin yeni gözlemleri güçlü bir şekilde tahmin ettiğini göstermektedir. Düşük olması arzu edilen standart sapma değeri, 67 numaralı izolata için 0,38 değerinde hesaplanmış olup, kabul edilebilir bir seviyede olduğu görülmektedir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 67 nolu izolata ait Yanıt Yüzey Yöntemi ile belirlenen tahminlenen regresyon katsayıları

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	12,8721	0,1423	90,442	0,000
Sıcaklık	-5,1340	0,1224	-41,958	0,000
pH	0,5824	0,1344	4,334	0,002
Devir	-1,3026	0,1344	-9,695	0,000
Sıcaklık*Sıcaklık	2,7074	0,2654	10,200	0,000
pH*pH	1,1191	0,3217	3,479	0,008
Devir *Devir	-3,8659	0,3217	-12,018	0,000
Sıcaklık*pH	-0,9813	0,1368	-7,173	0,000
Sıcaklık*Devir	1,6887	0,1368	12,345	0,000
pH*Devir	-0,4687	0,1368	-3,426	0,009
R-Sq(R ²) = %99,64 R-Sq(pred)= %96,74 S=0,38				

^a Coefficient (katsayı) , ^b Standard error coefficient (Standart hata katsayısı)
R-Sq (Regresyon katsayısı), R-Sq(pred) (Tahminlenmiş regresyon katsayısı), S (Standart sapma)

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi, model yardımıyla tahmin edilen ksilanaz enzimi aktivite değerleriyle deneysel olarak elde edilen sonuçlar yüksek oranda uyum içerisindedir. Tasarlanan model istatistiki açıdan anlamlı (P<0,05) olarak çıkmış olup, böylece ksilanaz aktivitesini tahmin etmek için oluşturulan bu model kullanıldığında %1’den daha düşük ihtimalle modelin dışında sonuç elde edileceğini göstermektedir (Çizelge 4.13).

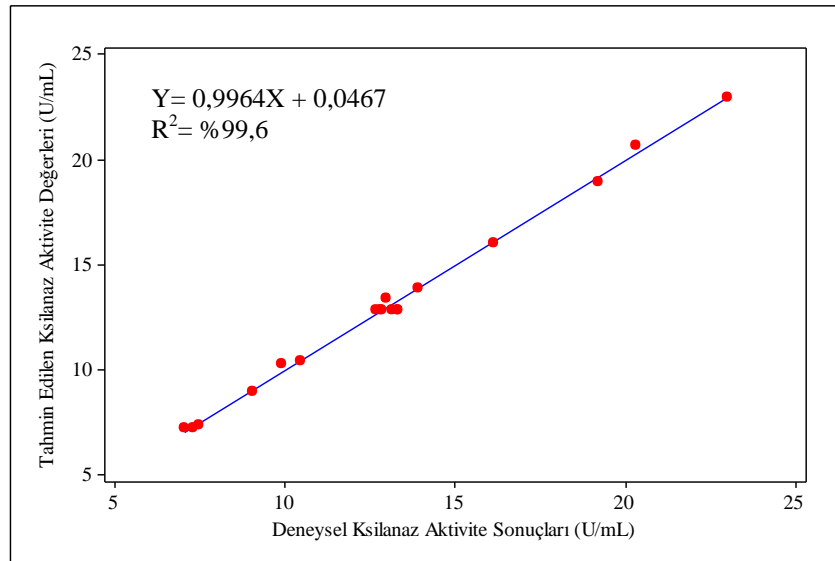
67 numaralı izolata ait tasarımdan, enzim aktivitesini tahmin etmek için elde edilen denklem eşitlik 4.2’de verilmiştir.

$$Y=178,884 - 8,2468X_1 + 0,2670X_2 - 6,8102X_3 + 0,1082(X_1)^2 - 0,0015(X_2)^2 + 1,1191(X_3)^2 + 0,0067X_1X_2 - 0,1962X_1X_3 - 0,0093X_2X_3 \quad (4.2)$$

Çizelge 4.13 67 nolu izolata ait Yanıt Yüzey Yöntemi varyans analizi sonucu

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P	
Model	9	333,149	333,149	37,017	247,24	0,000	anlamlı
Linear	3	272,201	280,025	93,342	623,45	0,000	
Sıcaklık	1	263,580	263,580	263,580	1760,51	0,000	
pH	1	2,060	2,812	2,812	18,78	0,002	
Devir	1	6,561	14,072	14,072	93,99	0,000	
Square	3	28,672	28,672	9,557	63,84	0,000	
Sıcaklık*Sıcaklık	1	2,969	15,576	15,576	104,03	0,000	
pH*pH	1	4,080	1,812	1,812	12,10	0,008	
Devir*Devir	1	21,623	21,623	21,623	144,42	0,000	
Interaction	3	32,276	32,276	10,759	71,86	0,000	
Sıcaklık*pH	1	7,703	7,703	7,703	51,45	0,000	
Sıcaklık*Devir	1	22,815	22,815	22,815	152,39	0,000	
pH*Devir	1	1,758	1,758	1,758	11,74	0,009	
Residual Error	8	1,198	1,198	0,150			
Lack-of-Fit	3	0,806	0,806	0,269	3,43	0,109	anlamsız
Pure Error	5	0,391	0,391	0,078			
Total	17	334,347					

^a Degrees of freedom (Serbestlik derecesi), ^b Sequential sum of squares (Ardışık kareler toplamı),
^c Adjusted sum of squares (Düzeltilmiş kareler toplamı), ^d Adjusted mean square (Düzeltilmiş ortalama kareler)



Şekil 4.7 67 nolu izolata ait Horikoshi besiyerinde elde edilen ksilanaz aktivitesi deneysel sonuçlarıyla model sonuçlarının karşılaştırılması

Eşitlik 4.2'de; Y ksilanaz enzim aktivitesini, X_1 inkübasyon sıcaklığını, X_2 ise karıştırma devrini, X_3 terimi ise pH değerini ifade etmekte olup; bu terimlerin denklemdaki birimleri, sırasıyla U/mL, °C ve rpm'dir. Elde edilen denklem, yanıtı

ikinci dereceden bir denklem olarak ifade etmekte olup; tasarım için belirlenen bağımsız değişken terimlerinin her birinin denklemde yer alması ve regresyon katsayısının yüksek olması ile oluşturulan tasarımın yanıtı güçlü bir şekilde açıklayacağı yorumu yapılabilmektedir.

Bacillus subtilis ATCC6633 suşunun Horiskoshi besiyerinde ksilanaz üretiminin Yanıt Yüzey Yöntemi ile tasarımı sonucunda elde edilen verilerin analiz sonuçları, çizelge 4.14 ve çizelge 4.15'te verilmiştir. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 referans suşa ait tasarım sonucunda regresyon katsayısı (R^2) 0,6978, model uygunsuzluğu sonucu (lack of fit) P değeri 0,677 olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.14 ve 4.15). Model uygunsuzluğu istatistiksel açıdan önemsiz çıkmış ($P>0,05$); fakat hem tasarlanan model hem de karıştırma devri, inkübasyon sıcaklığı ve besiyeri başlangıç pH değeri parametrelerinin ayrı ayrı ve bu parametrelerin interaksiyonlarının aktiviteye etkisinin, istatistiki açıdan önemsiz ($P>0,05$) olduğu belirlenmiştir. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 referans suşa ait tasarım sonucunda standart sapma (S) değeri düşük çıkmış, ancak tahminlenmiş regresyon katsayısı değeri (R-Sq(pred)) %0,00 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 referans suşa ait Yanıt Yüzey Yöntemi ile belirlenen tahminlenen regresyon katsayıları

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	5,04855	0,07956	63,453	0,000
Sıcaklık	0,07196	0,07675	0,938	0,373
Devir	0,21029	0,07017	2,997	0,015
pH	0,02569	0,07017	0,366	0,723
Sıcaklık*Sıcaklık	0,40441	0,16642	2,430	0,038
Devir*Devir	-0,19643	0,14526	-1,352	0,209
pH*pH	-0,03942	0,14526	-0,271	0,792
Sıcaklık*Devir	0,10388	0,07845	1,324	0,218
Sıcaklık*pH	-0,08366	0,07845	-1,066	0,314
Devir*pH	-0,07850	0,07845	-1,001	0,343
R-Sq(R^2) = %69,78 R-Sq(pred)=% 0,00 S = 0,22				

^a Coefficient (katsayı) , ^b Standard error coefficient (Standart hata katsayısı)

R-Sq (Regresyon katsayısı), R-Sq(pred)(Tahminlenmiş regresyon katsayısı), S (Standart sapma)

Çizelge 4.15 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 referans suşa ait Yanıt Yüzey Yöntemi varyans analizi sonucu

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P	
Model	9	1,02302	1,02302	0,113669	2,31	0,114	anlamsız
Linear	3	0,45936	0,49211	0,164037	3,33	0,070	
Sıcaklık	1	0,01052	0,04328	0,043276	0,88	0,373	
Devir	1	0,44224	0,44224	0,442235	8,98	0,015	
pH	1	0,00660	0,00660	0,006601	0,13	0,723	
Square	3	0,37204	0,37204	0,124014	2,52	0,124	
Sıcaklık*Sıcaklık	1	0,26952	0,29075	0,290753	5,91	0,038	
Devir*Devir	1	0,09890	0,09003	0,090030	1,83	0,209	
pH*pH	1	0,00363	0,00363	0,003626	0,07	0,792	
Interaction	3	0,19162	0,19162	0,063872	1,30	0,334	
Sıcaklık*Devir	1	0,08633	0,08633	0,086325	1,75	0,218	
Sıcaklık*pH	1	0,05599	0,05599	0,055989	1,14	0,314	
Devir*pH	1	0,04930	0,04930	0,049302	1,00	0,343	
Residual Error	9	0,44312	0,44312	0,049236			
Lack-of-Fit	4	0,14449	0,14449	0,036122		0,677	anlamsız
Pure Error	5	0,29864	0,29864	0,059727			
Total	18	1,46614					

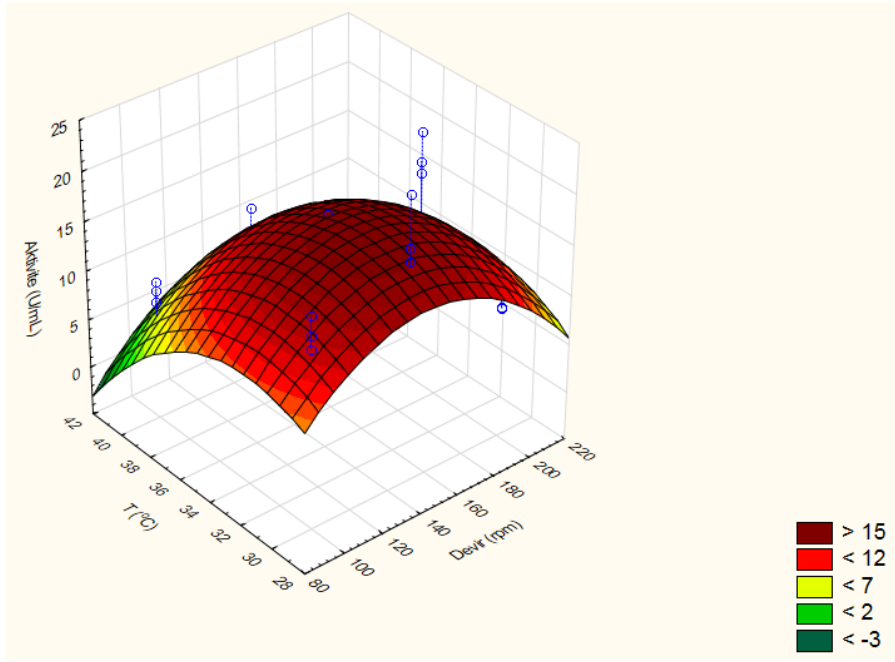
^a Degrees of freedom (Serbestlik derecesi), ^b Sequential sum of squares (Ardışık kareler toplamı), ^c Adjusted sum of squares (Düzeltilmiş kareler toplamı), ^d Adjusted mean square (Düzeltilmiş ortalama kareler)

Yanıta etki eden parametrelerin istatistiki açıdan önemsiz çıkmasından dolayı tahminlenmiş regresyon katsayı değeri (%0,00) düşük olarak elde edilmiştir. Bu yüzden yapılan tasarımın analizi sonucu elde edilen regresyon katsayısı, tahminlenmiş regresyon katsayısı, modelin ve parametrelerin istatistiki açıdan önem durumu incelendiğinde, tasarımın enzim aktivitesine etki eden parametlerin etkisini tahmin edemeyeceği sonucu elde edilmiştir. Dolayısıyla, referans suşun istatistiki açıdan dikkate değer enzim aktivite değeri göstermemesi nedeniyle elde edilen bu verilerin yanıt yüzey grafiklerinin çizimi, yanıtı ifade eden eşitliğin ve optimum ksilanaz üretim noktasının hesaplanması yapılamamıştır.

Ho ve Heng (2015) *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu ile yaptıkları çalışmada besiyerine karbon kaynağı olarak buğday kepeği ve soya fasulyesi kabuğu ilave ettikleri besiyerinde ksilanaz aktivitesini 11,96 U/mL olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada Ho ve Heng (2015) sonuçlarının aksine ksilan içeren besiyerinde maksimum ksilanaz aktivitesi düşük (5,66 U/mL) olarak elde edilmiştir.

4.10 İzolatların Ksilanaz Aktivitesine Ait Yanıt Yüzey Grafiklerinin Değerlendirilmesi

Tasarım sonucu elde edilen ksilanaz aktivitesi sonuçlarına ait yanıt yüzey grafiklerinin, Minitab 16 programında analiz edilebilmesine karşın, bu çalışmada 3 boyutlu yanıt yüzeyinin farklı açılardan incelenebilme olanağı sağlamasından dolayı Statistica programında incelenmesi tercih edilmiştir. 39 ve 67 numaralı izolatlara ait Yanıt Yüzey Yöntemi ile yapılan tasarım sonuçlarının yanıt yüzey grafikleri, sırasıyla şekil 4.8, 4.9 ve 4.10; şekil 4.11, 4.12 ve 4.13'te verilmiştir. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 referans suş için yapılan tasarımda, istatistiki açıdan dikkate değer enzim aktivite değeri göstermemesi nedeniyle, bu suş için elde edilen verilerin grafiksel çizimi yapılamamıştır.

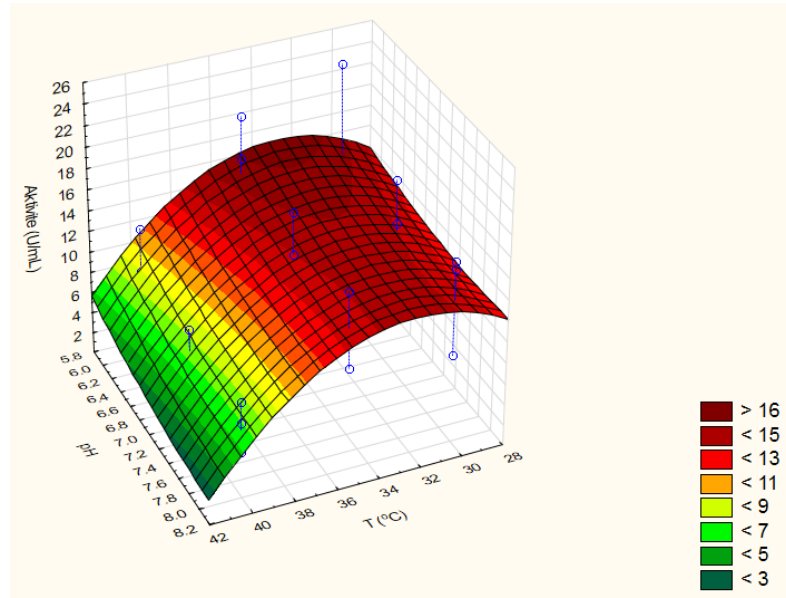


Şekil 4.8 39 nolu izolata ait, inkübasyon sıcaklığı (°C) ve karıştırma devrinin (rpm) ksilanaz enzim aktivitesine etkisi

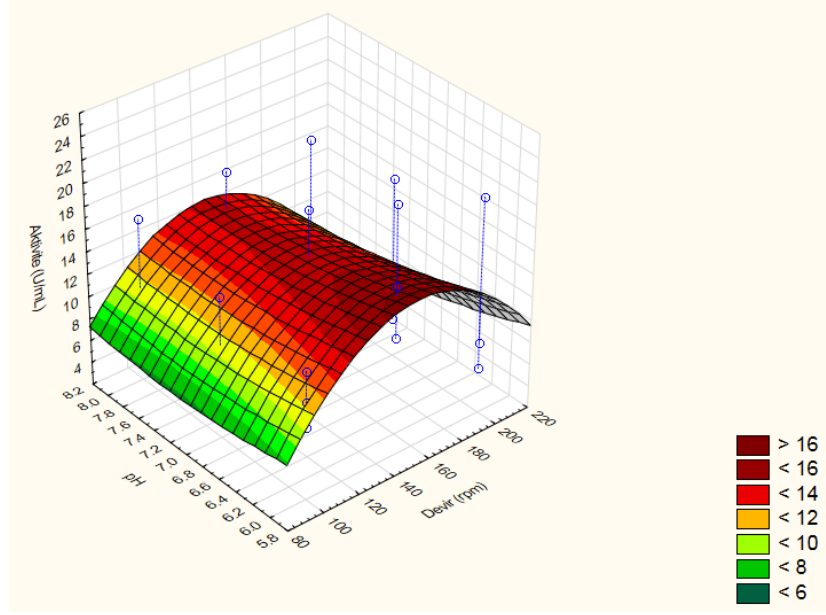
39 numaralı izolata ait yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, karıştırma devri ve inkübasyon sıcaklığının ksilanaz aktivitesine etkisini gösteren şekil 4.8'de verilen grafiğin kavisli bir görünüme sahip olduğu görülmektedir. Bu grafikten, karıştırma devri ve inkübasyon sıcaklığının enzim aktivitesinin artışına büyük ölçüde etkisinin

olduğu anlaşılmaktadır. Bu iki parametre için, inkübasyon sıcaklığının 30°C ve karıştırma devrinin 150 rpm olduğu seviyelere doğru aktivitenin belirgin bir artış gösterdiği gözlenmektedir. Fakat karıştırma devrinin artmasıyla ksilanaz aktivitesinde sürekli bir artış olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, Yanıt Yüzey Yöntemi sonucunda yapılan varyans analiziyle, karıştırma devri için P değeri 0,033 ve inkübasyon sıcaklığı için P değeri 0,004 olarak hesaplanmış, böylece bu iki parametrenin istatistiki açıdan ksilanaz aktivitesini etkileyen önemli parametreler olduğu görülmüştür (Çizelge 4.10).

39 numaralı izolata ait, inkübasyon sıcaklığı ve besiyeri başlangıç pH parametrelerinin enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren grafik şekil 4.9’da verilmiştir. Besiyeri başlangıç pH değerindeki değişikliğin ksilanaz aktivitesine etkisinin belirgin olmadığı, inkübasyon sıcaklığının 30°C olduğu seviyeye doğru ksilanaz aktivitesinde artış olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde besiyeri başlangıç pH ve karıştırma devri bağımsız değişkenleri beraber incelendiğinde, besiyeri başlangıç pH değerinin değişmesinin ksilanaz aktivitesinde belirgin farklılığa neden olmadığı, karıştırma devrinin 150 rpm olduğu seviyelerde aktivitenin maksimum olduğu görülmektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.9 39 nolu izolata ait, besiyeri başlangıç pH değeri ve inkübasyon sıcaklığının (°C) ksilanaz enzim aktivitesine etkisi



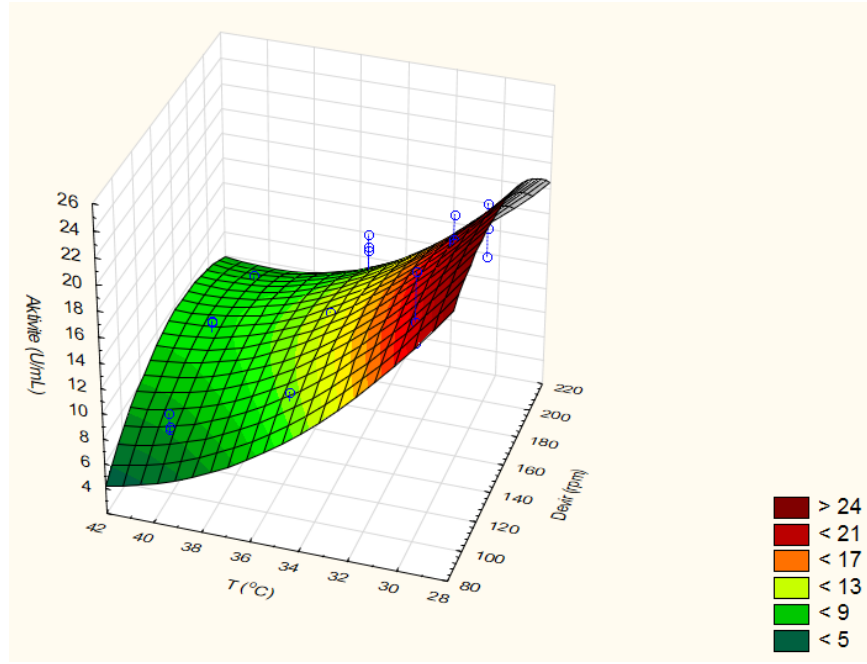
Şekil 4.10 39 nolu izolatta, besiyeri başlangıç pH değeri ve karıştırma devrinin (rpm) ksilanaz enzim aktivitesine etkisi

Yanıt Yüzey Yöntemi ile yapılan tasarımın varyans analiz sonuçları, farklı besiyeri başlangıç pH değerlerinde elde edilen ksilanaz aktivitelerinin arasındaki farkın istatistiki açıdan önemsiz olduğu ($P>0,05$) sonucunu göstermiştir (Çizelge 4.10). Dolayısıyla, 39 numaralı izolat için besiyeri başlangıç pH değerinin aktiviteyi etkileyen önemli bağımsız değişkenler arasında olmadığı sonucuna varılmıştır.

39 numaralı izolatin atık ilaveli besiyeri kullanılarak ksilanaz üretiminin optimizasyonu aşamasında, besiyeri başlangıç pH değeri için herhangi bir pH ayarlaması yapılmadan mevcut besiyeri formülasyonu sonucu elde edilen pH değeri ile (pH 6,1) devam edilmiştir. İnkübasyon sıcaklığının 30°C 'nin altındaki değerler için modelin vereceği yanıtı belirlemek amacıyla 39 numaralı izolatin gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde ksilanaz üretiminin optimizasyonu aşamasında inkübasyon sıcaklığının seviyeleri 25, 30 ve 35°C olarak tasarım yapılmıştır.

67 numaralı izolata ait yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde; karıştırma devri ve inkübasyon sıcaklığı değişkenlerinin enzim aktivitesi artışında etkili olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.11). Bu iki bağımsız değişken için, inkübasyon sıcaklığının

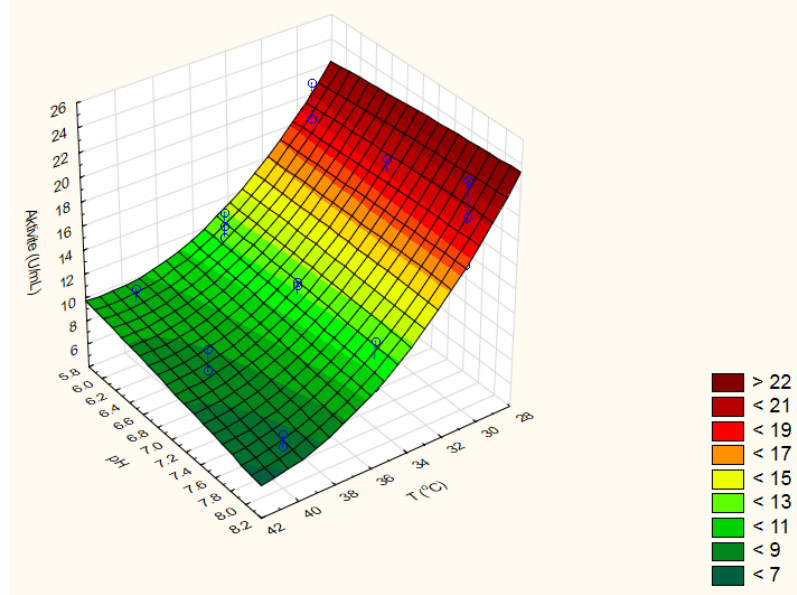
30°C olduğu ve karıştırma devrinin 150 rpm olduğu seviyelere doğru aktivitede belirgin bir artış gözlenmiştir. Ayrıca, Yanıt Yüzey Yöntemi ile yapılan varyans analizi, bu iki parametrenin hem ayrı ayrı hem de interaksiyonlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisinin istatistiki açıdan önemli ($P < 0,05$) olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.12). Ancak, inkübasyon sıcaklığının 30°C'nin altındaki değerler için modelin vereceği yanıtı belirlemek amacıyla 67 numaralı izolata gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde ksilanaz üretiminin optimizasyonu aşamasında inkübasyon sıcaklığının seviyeleri 25, 30 ve 35°C olarak tasarım yapılmıştır.



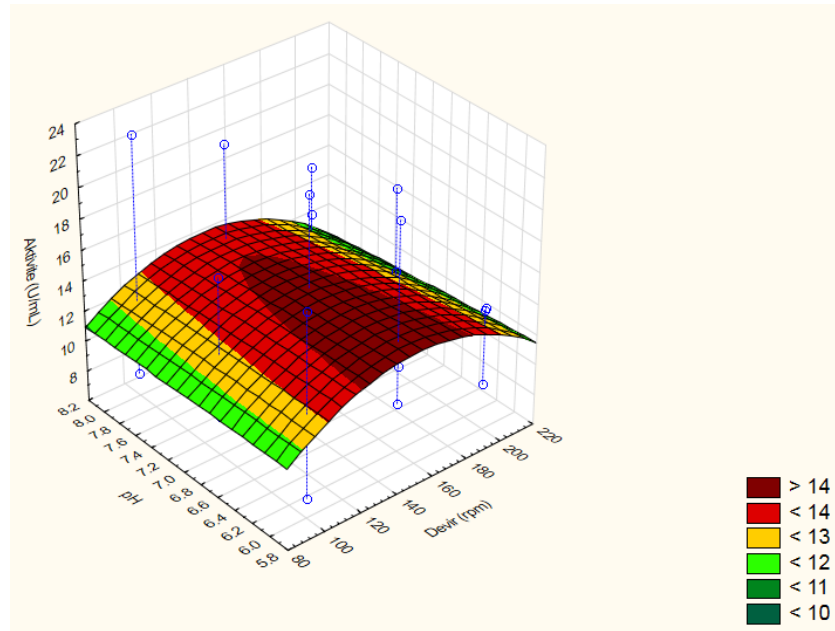
Şekil 4.11 67 nolu izolatta, inkübasyon sıcaklığı (°C) ve karıştırma devrinin (rpm) ksilanaz enzim aktivitesine etkisi

Şekil 4.12'de 67 numaralı izolata ait yanıt yüzey grafiği verilmiş olup, bu grafikte değişen besiyeri başlangıç pH değerleri için ksilanaz aktivite değerinin oldukça düşük oranda değiştiği görülmektedir. Ancak, inkübasyon sıcaklığının 30°C seviyelerine doğru enzim aktivitesinin büyük oranda arttığı görülmektedir. Yanıt Yüzey Yöntemi ile yapılan varyans analizi, besiyeri başlangıç pH değeri ve inkübasyon sıcaklığı bağımsız değişkenlerinin hem ayrı ayrı hem de interaksiyonlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisinin istatistiki açıdan önemli olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.12). Şekil 4.12'de elde edilen grafikten inkübasyon sıcaklığı için seçilen faktör seviyesinden daha düşük

sıcaklık değeri için de enzim aktivitesinin belirlenmesi gerektiği sonucu elde edilmiştir. Şekil 4.13'te karıştırma devri parametre seviyelerinde kavisli bir grafik elde edilmiş olup, 150 rpm seviyelerine doğru enzim aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir.



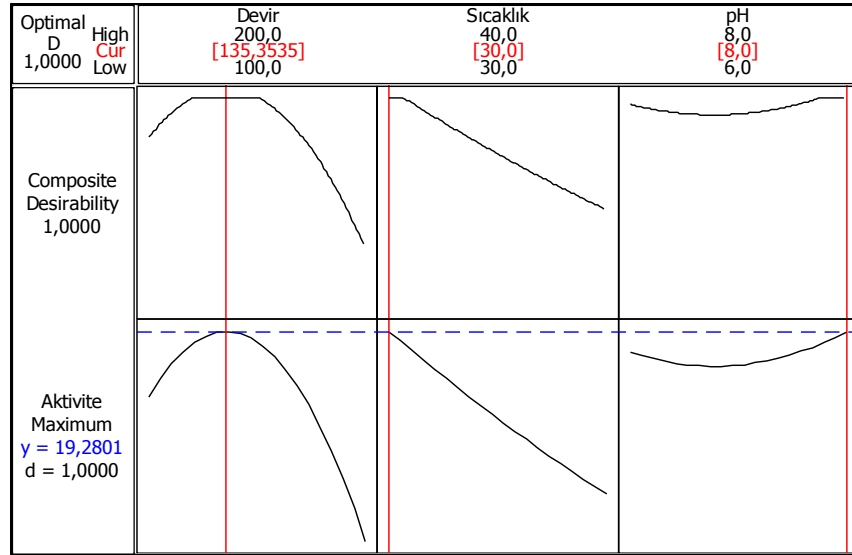
Şekil 4.12 67 nolu izolata ait, inkübasyon sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$) ve besiyeri başlangıç pH değerinin ksilanaz enzim aktivitesine etkisi



Şekil 4.13 67 nolu izolata ait, besiyeri başlangıç pH değeri ve karıştırma devrinin (rpm) ksilanaz enzim aktivitesine etkisi

4.11 Horikoshi Besiyerinde Ksilanaz Üretimi için Optimum Noktanın Belirlenmesi

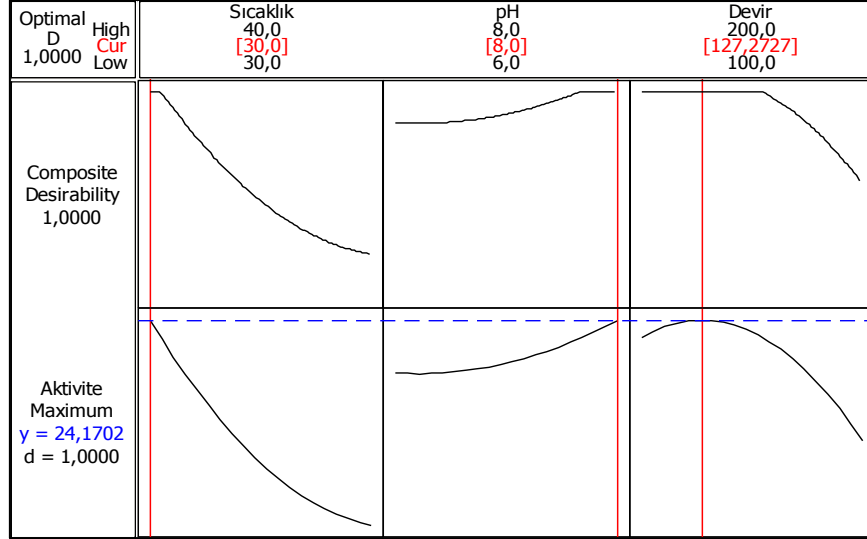
Minitab programında, 39 numaralı ve 67 numaralı izolatlar için tasarlanan modelin uyumlu çıkması sonucu, bu modelde Horikoshi besiyerinde ksilanaz enzimi üretimi için inkübasyon sıcaklığı, karıştırma devri ve besiyeri başlangıç pH değeri bağımsız değişkenlerinin optimum enzim aktivitesinin elde edildiği değerleri belirlenmiştir. Minitab programında 39 numaralı ve 67 numaralı izolatlar için tasarlanan modellerde, aynı programda modelin optimum noktasının hesaplanması sonucu elde edilen bağımsız değişkenlerin optimum değerleri, sırasıyla Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verilmiştir. Bu sonuca göre; 39 numaralı izolat için 135 rpm, 30°C ve pH 8, 67 numaralı izolat için 127 rpm, 30°C ve pH 8 olduğu koşullar optimum ksilanaz üretim koşullarıdır.



Şekil 4.14 39 nolu izolat ile ksilanaz üretimi için bağımsız değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile hesaplanan optimum değerleri

Yegin vd. (2016) *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 suşu ile buğday kepeği ilaveli besiyerinde yaptıkları ksilanaz üretiminin optimizasyonu çalışmasında karıştırma devri parametresinin önemli olduğunu savunmuşlardır. Yüksek karıştırma devrinde ksilanaz aktivitesinin düşük olmasını, yüksek devirde hücre kütlelerinin buğday kepeği yüzeyine bağlanmasının olumsuz etkilendiği şeklinde yorumlamışlardır. Düşük karıştırma

devrinde ise, buğday kepeğinin homojen olarak dağılmamasına neden olduğu için aktivitenin negatif etkilenmiş olduğunu savunmuşlardır.

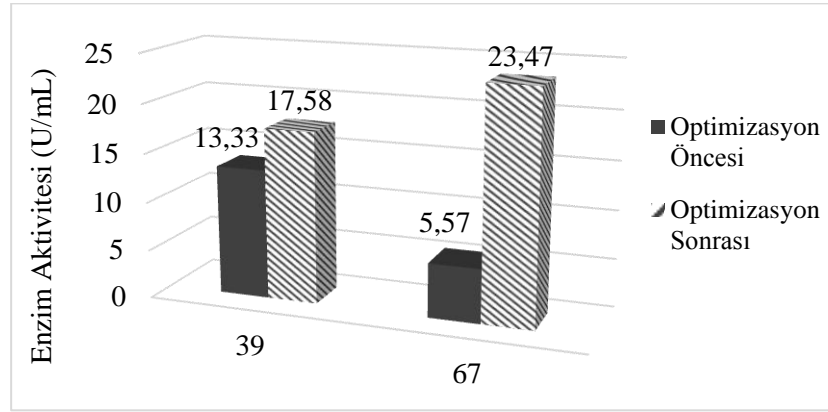


Şekil 4.15 67 nolu izolat ile ksilanaz üretimi için bağımsız değişkenlerin Yanıt Yüzey Yöntemi ile hesaplanan optimum değerleri

Bu çalışmada optimum karıştırma devrinin orta seviyelerde bir değer olarak elde edilmesinin sebebinin Yegin vd.'nin (2016) açıkladığı şekilde olabileceği düşünülmektedir. İzolatların izole edildikleri kaynaklar göz önünde bulundurulduğunda, optimum besiyeri başlangıç pH değerinin pH 8 seviyesinde elde edilmesinin makul olduğu anlaşılmaktadır.

Yerli izolatların Yanıt Yüzey Yöntemi ile tasarımı sonucu elde edilen optimum enzim üretim koşullarında ksilanaz aktivitesi ve spesifik aktivite değerleri hesaplanmıştır. Ksilanaz aktivitesi; 39 numaralı izolat için 17,58 U/mL, 67 numaralı izolat için 23,47 U/mL; toplam protein tayini ile belirlenen spesifik aktivite değerleri ise 39 numaralı izolat için 15,09 U/mg ve 67 numaralı izolat için 18,99 U/mg olarak belirlenmiştir. Modelde, enzimin optimum üretim şartlarında tahmin edilen ksilanaz aktivitesi değerine, deneysel olarak, 39 numaralı izolat için (teorik olarak tahmin edilen aktivite değeri 19,28 U/mL) %91 oranında, 67 numaralı izolat için (teorik olarak tahmin edilen aktivite değeri 24,17 U/mL) %97 oranında yakın değerler elde edilmiştir.

39 ve 67 numaralı izolatların Horikoshi besiyerinde ksilanaz üretiminin Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimizasyonu öncesi ve optimizasyonu ile elde edilen enzim aktivite sonuçları şekil 4.16’da verilmektedir. Optimizasyonun 39 numaralı izolatta 1,3 kat, 67 numaralı izolatta ise 4,2 kat enzim aktivitesini arttırdığı görülmektedir.



Şekil 4.16 39 ve 67 nolu izolatlara ait ksilanaz üretiminin Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimizasyonu öncesi ve sonrası elde edilen ksilanaz aktivite değerleri (U/mL)

Heck vd. (2005) Amazon bölgesinden izole ettikleri *B. circulans* suşunu kullanarak Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım (Central Composite Design) ile ksilanaz üretiminin optimizasyonunu çalışmış, bu tasarım yöntemiyle elde ettikleri model parametreleri kullanılarak, 3,7 kat daha fazla enzim aktivitesi (0,928 U/mg) elde etmişlerdir. Kallel vd. (2016) *B. mojavensis* ile Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeli ile besiyerindeki 5 parametrenin optimizasyonunu yapmışlardır. Enzim üretiminin optimize olduğu koşullarda 6 kat fazla enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar bu özellikteki ksilanazın meyve suyu ve yem proseslerine uygun olduğunu savunmuşlardır. Limkar vd. (2019) *Bacillus licheniformis* ile yaptıkları çalışmada buğday kepeği ile ksilanaz üretimini optimize etmişlerdir. Box-Behnken tasarım yöntemiyle yapılan optimizasyon ksilanaz üretimini 1,27 kat artırmışlardır.

Çalışmada, 67 numaralı izolat ile Horikoshi besiyerinde yapılan optimizasyon sonucu enzim aktivitesi 4,2 kat artırılmış, regresyon katsayısı %99,64 olarak elde edilmiş; ksilanaz aktivitesini açıklayan denklem göz önüne alındığında, denklemde hem birinci

derece terimlerin hem de ikinci derece terimlerin olması bu izolat ile yapılacak ileriki çalışmalarda denklemin ksilanaz aktivitesine ilişkin ‘yanıtı’ güçlü bir şekilde açıklayacağı görülmüştür.

4.12 Ksilanaz Üretim Besiyerine İlave Edilen Gıda ve Tarımsal Atıkların Bileşim Analizi Sonuçları

Temin edilen gıda ve tarım atıklarının kurutma ve öğütme işlemlerinden sonra bileşim analizleri yapılmıştır. Örneklerin etüvde kurutma, öğütme ve eleme işlemlerinin ardından görünüşleri şekil 4.17’de verilmiştir. Gıda ve tarımsal atık örneklerinin bileşimini belirlemek amacıyla, bileşimi hesaplamada kullanılan glikoz, ksiloz ve arabinoz şekerlerinin HPLC cihazında Transgenomic CarboSep COREGEL 87H3 kolonundaki alıkonma zamanları çizelge 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.17 Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen kurutulup öğütülmüş gıda ve tarımsal atıkların görüntüsü. Soldan sağa; elma posası, mısır koçanı, buğday kepeği.

Çizelge 4.16 Şeker standart çözeltilerinin HPLC cihazında 0,5 mL/dk akış hızındaki alıkonma zamanları

Şeker Standart Çözeltisi	Glikoz	Ksiloz	Arabinoz
Alıkonma Zamanı (dk)*	10,880	11,686	12,891

*Transgenomic CarboSep COREGEL 87H3 kolonundaki alıkonma zamanını ifade etmektedir.

Gıda ve tarım atıklarının bileşimlerindeki selüloz ve hemiselüloz miktarlarının hesaplanmasında; selülozun glikozdan hesaplanmasında çevirme faktörü 0,90, ksilanın

ksilozdan hesaplanmasında ise 0,88 olarak alınmıştır (Shen ve Wyman 2011). Hemiselülozun hesaplanmasında ise ksilan ve arabinoz değerlerinin toplamı alınmıştır. Gıda/tarımsal atıkların bileşim sonuçları çizelge 4.17’de verilmiş olup, bileşenlerin detaylı miktarları EK 3’te verilmiştir.

Çizelge 4.17 Ksilanaz üretiminin Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimizasyonu amacıyla ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda/tarımsal atıkların bileşimi

Bileşen	Elma Posası	Buğday Kepeği	Mısır Koçanı
	% Kuru Madde Cinsinden		
Selüloz	20,76 ±7,76	40,25 ±1,27	31,53 ±0,93
Hemiselüloz	20,29 ±7,77	21,10 ±0,31	33,62 ±0,44
Lignin	16,00 ±0,40	11,59 ±0,33	16,24 ±0,15
Kül	1,63 ±0,44	1,90 ±0,60	2,12 ±0,49
Nem	4,50 ±0,91	7,72 ±0,85	4,39 ±0,59
Toplam Kütle	63,18	82,56	87,90

*Sonuçlar, % kuru madde bazında aritmetik ortalama ±standart sapma şeklinde verilmiştir

**Nem, örneğin etüvde kurutulma ve ardından öğütülmesi işlemleri sonrasında ölçülmüştür

Guerrero vd. (2015) elma posasının bileşimini %47,5 selüloz, %27,8 hemiselüloz, %22,4 lignin, %5,10 kül olarak bildirmiştir. Macagnan vd. (2016) elma posasının bileşiminde selüloz ve hemiselüloz dışında %6,98 protein, %8,19 lipit, %17,31 oranında çözülebilir pektin olduğunu bildirmiştir. Bu tez çalışmasında, elma posası örneğinde analiz edilen bileşenlerin toplam miktarı %63,89 olarak elde edilmiştir. Literatürdeki çalışmalar göz önüne alındığında elma posasındaki selüloz miktarının %20,76 ile düşük olduğu görülmekte; bileşimin geri kalan yüzdesini çözülebilir pektin, yağ ve proteinin oluşturabileceği düşünülmektedir. Elma posasının ksilan içeriğinin ise %13,67 oranında olduğu belirlenmiştir (EK 3).

Lequart vd. (1999) buğday kepeği bileşimini %42,5 glikoz, %15,4 ksiloz, %3,1 arabinoz, %3,4 lignin olarak bildirmektedir. Maes ve Delcour (2002) ise %28,5 glikoz,

%17,0 protein, %10,1 arabinoz, %16,9 ksiloz, %0,6 mannoz, %1,9 galaktoz, %6,0 yağ ve %3-6 üronik asit olarak bildirmişlerdir. Hromádková vd. (2008) buğday kepeğinin bileşimdeki şekerler dışında, %7,4 lignin, %5,4 kül, %13,2 protein, %6,2 üronik asitten oluştuğunu belirtmektedir. Brijwani vd. (2010) ise selüloz oranını diğer çalışmalardan daha düşük oranda (%7,57) bulmuş olup; buğday kepeğinde %31,19 hemiselüloz, %4,06 lignin, %6,53 kül ve diğer çalışmalara paralel olarak protein oranını %16,29 olarak bildirmektedirler. Bu çalışmada, buğday kepeği örneğinde analiz edilen bileşenlerin toplam miktarı %82,56 olarak elde edilmiştir. Literatürdeki çalışmalar göz önüne alındığında, bileşimin geri kalan yüzdesini protein, üronik asit, galaktoz ve mannozun oluşturabileceği anlaşılmaktadır. Buğday kepeği örneğinde ksiloz miktarı, Lequart vd. (1999)'nin elde ettiği sonuca benzer şekilde, %13,53 olarak belirlenmiştir.

Mısır koçanının bileşiminin tayinine yönelik yapılan çalışmalarda; Lili vd. (2011) mısır koçanı bileşiminin %34,6 glikoz, %27,0 ksiloz, %3,6 arabinoz, %2,5 külden oluştuğunu bildirmişlerdir. Van Dongen vd. (2011) %34 glikoz, %28 ksiloz, %2,4 arabinoz, %0,8 galaktoz, %0,1 mannoz, %1,8 üronik asit ve %18,3 lignin olarak bildirmiştir. Pointner vd. (2014) mısır koçanının bileşimini %38,8 selüloz, %44,4 hemiselüloz ve %11,9 oranında lignin olarak bulmuşlardır. Silva vd. (2015) %47,1 glikoz, %28,0 ksiloz, %5,4 arabinoz, %2,2 galaktoz, %0,2 mannoz, %2,2 üronik asit, %17,8 lignin ve %1,2 kül; Irmak ve Meryemoglu (2017) %41,1 selüloz, %33,3 hemiselüloz, %18,1 lignin ve %1,7 kül; Perez-Rodríguez vd. (2017) %42,0 selüloz, %45,9 hemiselüloz, %2,8 lignin ve %9,3 nötral çözülebilir bileşikler; Ayesi ve Daramola (2017) %16,29 selüloz, %43,34 hemiselüloz ve %33,65 lignin olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada, mısır koçanı örneğinde analiz edilen bileşenlerin toplam miktarı %87,90 olarak elde edilmiştir. Literatürdeki çalışmalar göz önüne alındığında, bileşimin geri kalan yüzdesini üronik asit ve düşük orandaki galaktoz ve mannozun oluşturabileceği tahmin edilmektedir. Hemiselüloz miktarı %33,62 ile literatürdeki sonuçlara benzer şekilde yüksek olarak bulunmuş olup, diğer gıda/tarımsal atıklarla kıyaslandığında ksilanaz enzimi üretimi için iyi bir substrat olarak değerlendirileceği öngörülmektedir.

Çalışmada, ksilanaz üretiminde etkili olan inkübasyon sıcaklığı, karıştırma devri ve besiyeri başlangıç pH değerinin optimum noktaları Yanıt Yüzey Yöntemi ile Horikoshi

besiyeri kullanılarak belirlenmiştir. Ardından ksilanaz üretim besiyerine, karbon kaynağı olarak Horikoshi besiyeri kompozisyonundaki ksilan yerine, sırasıyla buğday kepeği, mısır koçanı ve elma posası ilave edilerek, Minitab programında Yanıt Yüzey Yöntemi ile ksilanaz üretiminin optimizasyonu yapılmıştır. Literatürdeki çeşitli çalışmalarda, buğday kepeği ve mısır koçanının ksilanaz üretiminde kullanıldığında, diğer çeşitli atıklara göre içerdiği yüksek ksilan miktarından dolayı enzimin sentezlenmesini tetiklediği, dolayısıyla bu tür lignoselülozik atıklarda daha yüksek enzim aktivitesi elde edildiği bildirilmiştir (Sa-Pereira vd. 2002, Battan vd. 2007, Kapoor vd. 2008, Yegin vd. 2016). Bileşim tayini sonucunda elma posası, buğday kepeği ve mısır koçanı örneklerinin bileşimindeki ksilan oranları, sırasıyla %13,67, %13,53 ve %30,06 olarak hesaplanmıştır (EK 3). Elma posasının da buğday kepeğine yakın değerlerde ksilan içerdiği saptanmış olup, ksilanaz üretimi için uygun bir atık olabileceği öngörülmektedir.

4.13 Gıda ve Tarımsal Atık İlaveli Besiyerinde Enzim Üretim Optimum Noktasının Belirlenmesi

Çalışma kapsamında Türkiye'deki çeşitli kaynaklardan izole edilen, 39 ve 67 numaralı *Bacillus* izolatlarının gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Birleşik Tasarım modeliyle ksilanaz üretiminin tasarımları yapılmıştır. Bu tasarımda kullanılan besiyeri bileşiminde karbon kaynağı olarak elma posası atığı %0,5 (w/v) oranında ilave edilmiştir.

Tasarım sonucunda 39 numaralı izolata ait belirlenen ksilanaz aktivitesi sonuçları çizelge 4.18'de; yapılan tasarımın Minitab programında değerlendirilmesiyle elde edilen analiz sonuçları çizelge 4.19'da ve varyans analizi sonuçları ise çizelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.18 39 nolu izolata ait elma posası ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımı sonuçları

Deney Numarası (Run)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Karıştırma Devri (rpm)	Ksilanaz Aktivitesi (U/mL)
1	30	150	9,26
2	35	100	9,82
3	25	150	9,46
4	30	150	7,74
5	35	200	8,28
6	30	200	6,33
7	30	150	10,74
8	25	100	7,02
9	30	100	7,17
10	25	200	8,62
11	35	150	9,23
12	30	150	8,25
13	30	150	7,73

Çizelge 4.19 39 nolu izolata ait elma posası ilaveli besiyerindeki Yanıt Yüzey Yöntemi analiz sonuçları

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	8,1475	0,3085	26,408	0,000
Sıcaklık	0,3717	0,2760	1,347	0,227
Devir	-0,1300	0,2760	-0,471	0,654
Sıcaklık* Sıcaklık	1,3925	0,4139	3,364	0,015
Devir*Devir	-1,2025	0,4139	-2,905	0,027
Sıcaklık* Devir	-0,7850	0,3380	-2,323	0,059
R-Sq(R ²)= %78,82 R-Sq(pred)=%0,00 S=0,67				

^a Coefficient (katsayı) , ^b Standard error coefficient (Standart hata katsayısı)
R-Sq (Regresyon katsayısı), R-Sq(pred) (Tahminlenmiş regresyon katsayısı), S (Standart sapma)

39 nolu izolata ait tasarım sonucunda R² değeri 0,788, model uygunsuzluğu (lack of fit) sonucu P değeri 0,583 olarak elde edilmiştir. Model uygunsuzluğu istatistiksel açıdan önemsiz çıkmış olup, böylece tasarlanan dizaynın sonuçlarla uyumlu olduğu sonucu elde edilmiştir. Tasarlanan model istatistiki açıdan anlamlı (P<0,05) olarak hesaplanmış, ancak karıştırma devri ve inkübasyon sıcaklığı bağımsız değişkenlerinin aktiviteye etkisinin, istatistiki açıdan önemsiz (P>0,05) olduğu belirlenmiştir. Bağımsız

değişkenlerin interaksyonu incelediğinde ise yalnızca (sıcaklık*sıcaklık) ve (rpm*rpm) interaksyonlarının istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.20 39 nolu izolata ait elma posası ilaveli besiyerindeki Yanıt Yüzey Yöntemi varyans analizi sonucu

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P	
Model	5	10,2013	10,2013	2,0403	4,47	0,048	anlamlı
Linear	2	0,9302	0,9302	0,4651	1,02	0,416	
Sıcaklık	1	0,8288	0,8288	0,8288	1,81	0,227	
Devir	1	0,1014	0,1014	0,1014	0,22	0,654	
Square	2	6,8062	6,8062	3,4031	7,45	0,024	
Sıcaklık* Sıcaklık	1	2,9502	5,1708	5,1708	11,32	0,015	
Devir* Devir	1	3,8560	3,8560	3,8560	8,44	0,027	
Interaction	1	2,4649	2,4649	2,4649	5,39	0,059	
Sıcaklık* Devir	1	2,4649	2,4649	2,4649	5,39	0,059	
Residual Error	6	2,7475	2,7415	0,4569			
Lack-of-Fit	3	1,1910	1,1910	0,3970	0,77	0,583	anlamsız
Pure Error	3	1,5550	1,5505	0,5168			
Total	11	12,9428					

^a Degrees of freedom (Serbestlik derecesi), ^b Sequential sum of squares (Ardışık kareler toplamı), ^c Adjusted sum of squares (Düzeltilmiş kareler toplamı), ^d Adjusted mean square (Düzeltilmiş ortalama kareler)

Tahminlenmiş regresyon katsayısı değeri (R-Sq(pred)) (%0,00) regresyon katsayısından (%78,82) düşük bulunmuştur (Çizelge 4.19). 39 numaralı izolata ait tasarımda seçilen parametrelerden bazılarının aktiviteye etkisinin istatistiki açıdan önemsiz çıkmasının, tahminlenmiş regresyon katsayısı değerinin düşük çıkmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Bu modelde yalnızca (sıcaklık*sıcaklık) ve (rpm*rpm) ikili interaksyonlarının istatistiki açıdan yanıt etkisinin önemli çıkması, modelin yeni gözlemleri zayıf bir şekilde tahmin edeceğini göstermektedir. Standart sapma değeri 0,67 değerinde bulunmuş olup, kabul edilebilir bir seviyede olduğu görülmektedir (Çizelge 4.19). Ancak tüm bu istatistiki sonuçlar beraber değerlendirildiğinde, tasarlanan modelin yanıtı doğru bir şekilde açıklayamayacağı görülmüş olup; elde edilen bu verilerle yanıt yüzey grafiklerinin çizimi, yanıt ifade eden eşitliğin ve optimum ksilanaz üretim noktasının hesaplanması yapılamamıştır. Gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde 39 numaralı izolata için ksilanaz üretiminin optimizasyonunu yapabilmek için karbon kaynağı olarak kullanılan elma posası dışında diğer besiyeri

bileşenlerinin etkisi de göz önüne alınarak bir tasarım yapılması gerektiği sonucu elde edilmiştir.

Tasarım sonucunda 67 numaralı izolata ait belirlenen ksilanaz aktivitesi sonuçları çizelge 4.21’de; yapılan tasarımın Minitab programında değerlendirilmesiyle elde edilen analiz sonuçları çizelge 4.22’te verilmiştir. 67 numaralı izolata ait tasarım sonucunda regresyon katsayısı (R^2) 0,6263, model uygunsuzluğu (lack of fit) sonucu P değeri 0,246 olarak elde edilmiştir. Model uygunsuzluğu istatistiksel açıdan önemsiz çıkmış ancak tasarlanan model anlamsız ($P>0,05$) olarak hesaplanmıştır. Ayrıca karıştırma devri, inkübasyon sıcaklığı ve besiyeri başlangıç pH parametrelerinin ksilanaz aktivitesine etkisinin, istatistiki açıdan önemsiz olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.21 67 nolu izolata ait elma posası ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi Merkezi Bileşik Tasarım modeliyle yapılan deney tasarımı sonuçları

Deney Numarası (Run)	İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Karıştırma Devri (rpm)	Besiyeri Başlangıç pH Değeri	Ksilanaz Aktivitesi (U/mL)
1	30	200	7	5,34
2	30	100	7	7,57
3	25	100	6	7,90
4	30	150	7	7,76
5	25	200	6	7,38
6	30	150	6	8,69
7	35	200	8	7,98
8	30	150	7	7,65
9	25	200	8	8,67
10	30	150	7	8,85
11	35	100	6	9,91
12	30	150	8	7,13
13	25	150	7	8,83
14	35	100	8	7,36
15	35	200	6	8,03
16	30	150	7	7,74
17	35	150	7	7,54
18	30	150	7	6,78
19	25	100	8	7,04
20	30	150	7	7,69

Çizelge 4.22 67 nolu izolata ait elma posası ilaveli besiyerindeki Yanıt Yüzey Yöntemi analiz sonuçları

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	7,6034	0,2733	27,825	0,000
Sıcaklık	0,1000	0,2514	0,398	0,699
Devir	-0,2380	0,2514	-0,947	0,366
pH	-0,3730	0,2514	-1,484	0,169
Sıcaklık*Sıcaklık	-0,7941	0,4793	1,657	0,129
Devir*Devir	-0,9359	0,4793	-1,953	0,079
pH*pH	0,5191	0,4793	1,083	0,304
Sıcaklık*Devir	-0,2963	0,2810	-1,054	0,317
Sıcaklık*pH	-0,3788	0,2810	-1,348	0,207
Devir*pH	0,5813	0,2810	2,068	0,065
R-Sq(R ²)=%62,63 R-Sq(pred)=%0,00 S=0,79				

^a Coefficient (katsayı) , ^b Standard error coefficient (Standart hata katsayısı)
R-Sq (Regresyon katsayısı), R-Sq(pred) (Tahminlenmiş regresyon katsayısı), S (Standart sapma)

Tasarım sonucunda 67 numaralı izolata ait varyans analizi sonuçları ise çizelge 4.23'te verilmiştir.

Çizelge 4.23 67 nolu izolata ait elma posası ilaveli besiyerindeki Yanıt Yüzey Yöntemi varyans analizi sonucu

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P	
Model	9	10,5892	10,5892	1,1766	1,86	0,173	anlamsız
Linear	3	2,0577	2,0577	0,6859	1,09	0,399	
Sıcaklık	1	0,1000	0,1000	0,1000	0,16	0,699	
Devir	1	0,5664	0,5664	0,5664	0,90	0,366	
pH	1	1,3913	1,3913	1,3913	2,20	0,169	
Square	3	3,9789	3,9789	1,3263	2,10	0,164	
Sıcaklık* Sıcaklık	1	1,4797	1,7341	1,7341	2,74	0,129	
Devir* Devir	1	1,7582	2,4088	2,4088	3,81	0,079	
pH*pH	1	0,7410	0,7410	0,7410	1,17	0,304	
Interaction	3	4,5525	4,5525	1,5175	2,40	0,129	
Sıcaklık*Devir	1	0,7021	0,7021	0,7021	1,11	0,317	
Sıcaklık*pH	1	1,1476	1,1476	1,1476	1,82	0,207	
Devir*pH	1	2,7028	2,7028	2,7028	4,28	0,065	
Residual Error	10	6,3181	6,3181	6,3181			
Lack-of-Fit	5	4,1536	4,1536	0,8307	1,92	0,246	anlamsız
Pure Error	5	2,1645	2,1645	0,4329			
Total	19	16,9073					

^a Degrees of freedom (Serbestlik derecesi), ^b Sequential sum of squares (Ardışık kareler toplamı),
^c Adjusted sum of squares (Düzeltilmiş kareler toplamı), ^d Adjusted mean square (Düzeltilmiş ortalama kareler)

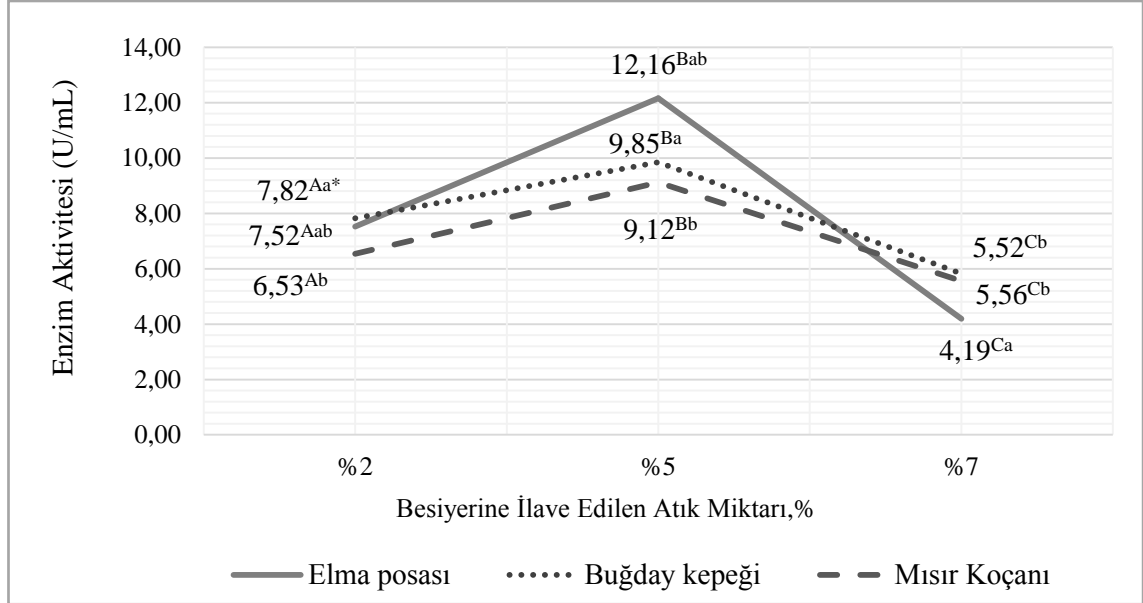
Tahminlenmiş regresyon katsayısı değeri düşük olarak hesaplanmış olup, bu modelin doğru bir tahmin yapmada yeterince güçlü olamayacağı sonucu elde edilmiştir. Tüm bu istatistiki sonuçlar beraber değerlendirildiğinde, tasarlanan modelin yanıtı doğru bir şekilde açıklayamayacağı görülmüş olup, elde edilen bu verilerle yanıt yüzey grafiklerinin çizimi, yanıtı ifade eden eşitliğin ve optimum ksilanaz üretim noktasının hesaplanması yapılamamıştır. Elma posası ilaveli besiyerinde 67 numaralı izolat için 39 numaralı izolat ile yapılan tasarımda olduğu gibi; ksilanaz üretiminin optimizasyonunu yapabilmek için karbon kaynağı olarak kullanılan elma posası dışında diğer besiyeri bileşenlerinin etkisi de göz önüne alınarak bir tasarım yapılmasının gerektiği sonucu elde edilmiştir.

4.14 Ksilanaz Üretim Besiyerine İlave Edilen Gıda ve Tarımsal Atık Konsantrasyonunun Etkisinin Belirlenmesi

Gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde Yanıt Yüzey Yöntemi ile yapılan deney tasarımı sonuçlarında regresyon katsayısı (R^2) değerlerinin düşük olması, parametrelerin ve interaksyonlarının etkisinin istatistiki açıdan önemsiz çıkması sonucunda Horikoshi besiyerinde optimizasyon sonucu elde edilen optimum parametre değerleri kullanılarak çalışmaya devam edilmiştir. Bu kapsamda besiyerine %2, %5 ve %7 oranlarında gıda/tarımsal atık ilave edilmiş olup; 39 numaralı izolat pH 6,1 135 rpm 30°C'de koşullarında, 67 numaralı izolat ise pH 8, 127 rpm, 30°C koşullarında geliştirilmiştir. 39 numaralı izolat için elde edilen ksilanaz aktivite değerleri şekil 4.18'de verilmiştir. 39 ve 67 numaralı izolatların %2, %5 ve %7 oranlarında gıda/tarımsal atık ilave edilmiş besiyerinde optimum parametrelerde elde edilen ksilanaz aktivitesi değerlerinin varyans analizi ve çoklu karşılaştırma testi sonuçları sırasıyla, EK 4 ve EK 5'te verilmiştir.

39 nolu izolata ait en yüksek ksilanaz aktivite değeri, %5 gıda/tarımsal atık ilaveli besiyeri ile yapılan çalışmalarda elde edilmiştir (Şekil 4.18). Bu değerler içinde de elma posası ilaveli besiyerinde 12,16 U/mL ile en yüksek aktivite elde edilmiş olup, bu değer %2 ve %7 konsantrasyonlarından istatistiki olarak farklı olduğu hesaplanmıştır (EK 4). Elma posası için elde edilen aktivite değerinin, buğday kepeği ve mısır

koçanının ilave edildiği besiyerinde elde edilen aktivite değerleri arasında, istatistiki olarak fark olmadığı belirlenmiştir. Buğday kepeği ve mısır koçanı ilaveli besiyerlerinde elde edilen enzim aktivite değerlerinin ise birbirinden istatistiki olarak farklı olduğu görülmüştür (EK 4).



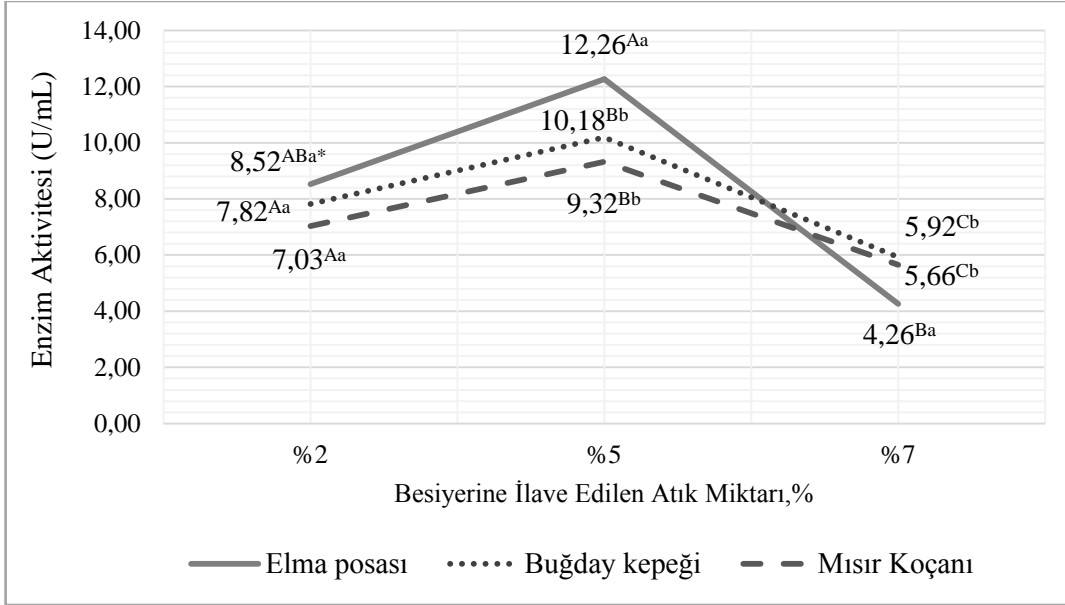
*A,B Farklı büyük harflerle gösterilen değerler besiyerine ilave edilen gıda/tarımsal atık konsantrasyonları arasındaki farkın enzim aktivitesine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05).

*a,b Farklı küçük harflerle gösterilen değerler besiyerine ilave edilen gıda/tarımsal atık türünün enzim aktivitesine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (p<0,05).

Şekil 4.18 39 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde pH 6,1, 135 rpm, 30°C’de gelişme koşullarındaki ksilanaz aktivitesi (U/mL)

67 numaralı izolat için elde edilen ksilanaz aktivite değerleri şekil 4.19’da verilmiştir. 67 nolu izolata ait en yüksek ksilanaz aktivite değeri, %5 gıda/tarımsal atık ilaveli besiyeri ile yapılan çalışmalarda elde edilmiş olup, bu değerler içinde de elma posası ilaveli besiyerinde 12,26 U/mL ile en yüksek aktivite elde edilmiştir. Bu değer %2 konsantrasyondaki aktivite değerinden istatistiki olarak farklı olmadığı, %7 konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerinden istatistiki olarak farklı olduğu hesaplanmıştır (EK 5). Elma posasının %5 konsantrasyonda besiyerine ilave edildiğinde elde edilen ksilanaz aktivite değerinin, diğer gıda/tarımsal atıkların %5 oranında besiyerine ilave edildiğinde elde edilen aktivite değerleri arasında istatistiki olarak fark

olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19). Gıda/tarımsal atık oranını %7 olduğu besiyerinde ise en düşük ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir.



*A,B Farklı büyük harflerle gösterilen değerler besiyerine ilave edilen gıda/tarımsal atık konsantrasyonları arasındaki farkın enzim aktivitesine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir ($p<0,05$).

*a,b Farklı küçük harflerle gösterilen değerler besiyerine ilave edilen gıda/tarımsal atık türünün enzim aktivitesine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir ($p<0,05$).

Şekil 4.19 67 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde pH 8, 127 rpm, 30°C gelişme koşullarındaki ksilanaz aktivitesi (U/mL)

Sharma vd. (2007), besiyerinin %0,15 (w/v) oranında buğday kepeği ile desteklenmesi sonucu ksilanaz sentezinde önemli artış gözlemlenmiştir. Battan vd. (2007) *Bacillus pumilus* ASH ile yaptıkları ksilanaz üretim çalışmasında, besiyerine ilave ettikleri buğday kepeği oranını %0,25 (w/v)'ten %2 (w/v)'ye artırdıklarında, bu çalışmaya benzer şekilde ksilanaz üretiminde dikkate değer artış gözlemlenmiştir. Haddar vd. (2012) *Bacillus mojavensis* ile ksilanaz üretimi için arpa kepeğinin iyi bir ksilanaz indükleyicisi olduğu sonucunu elde etmiş olup, Sepahy vd. (2011) de aynı bakteri ile yaptıkları çalışmalarında besiyerine %2 (w/v) oranında ilave ettikleri yulaf kepeğinin optimum karbon kaynağı olduğunu bildirmişlerdir.

Raj vd. (2018), kağıt atıklarıyla kontamine olmuş topraktan izole ettikleri *Bacillus licheniformis* Alk-1 suşunun buğday kepeği ilaveli besiyerinde ksilanaz üretimini

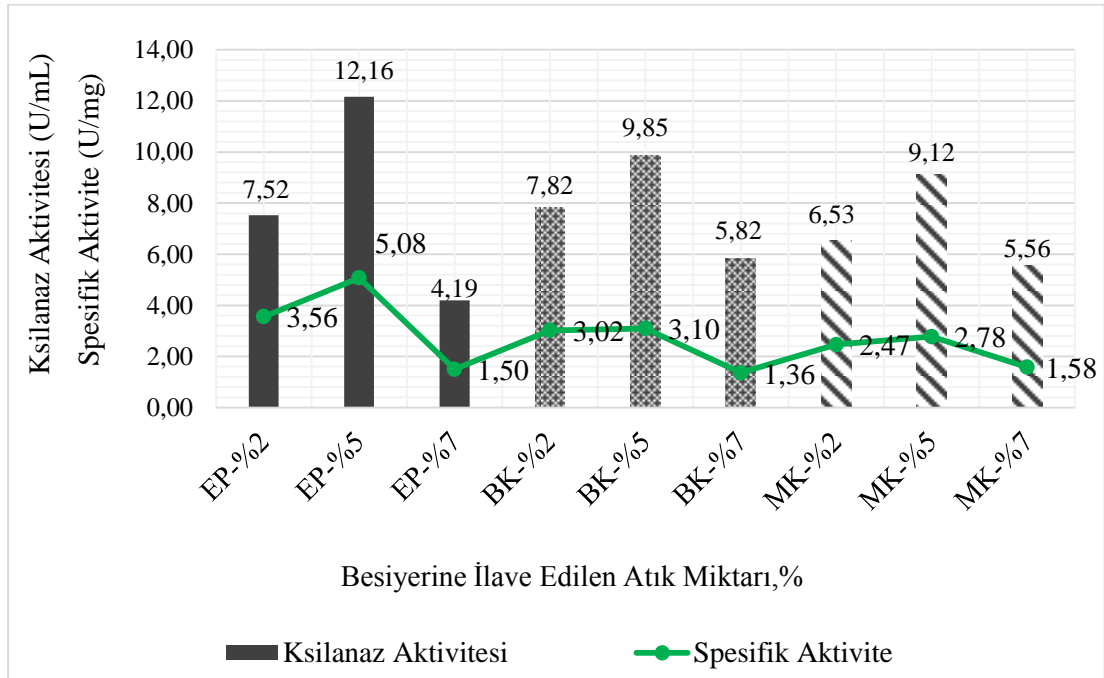
araştırdıkları çalışmalarında enzim aktivitesini 22,6 U/mL olarak belirlemişlerdir. Kaur vd. (2016), izole ettikleri *Bacillus pumilus* ile buğday kepeğinden ksilanaz üretiminde, Plackett-Burman deneysel tasarım yöntemiyle besiyeri bileşimi (buğday kepeği, pepton, ksiloz, potasyum nitrat, maya ekstraktı), inkübasyon koşulları (karıştırma, sıcaklık, süre), pH, inokülasyon miktarı ve inokülantın yaşı gibi 11 değişkenin etkisini araştırmışlar, optimum koşullarda maksimum aktivite 1430 U/mL olarak belirlemişlerdir. Tarafımızca yapılan bu çalışmada 3 değişkenin etkisi incelenmiş olup, Kaur vd. (2016)'ne benzer şekilde enzim aktivitesini etkileyen birçok faktörün optimize edilmeye çalışılmasının aktiviteyi önemli derecede attıracağı ileri sürülmüştür.

Bastawde (1992) tarafından ksilanazın düşük molekül ağırlıklı ksilan hidrolizatları tarafından indüklendiği bildirilmiştir. Kapoor vd. (2008) *Bacillus pumilus* MK001 suşu ile çeşitli monosakkarit, disakkarit, şeker alkoller, buğday kepeği, buğday samanı gibi çeşitli karbon kaynaklarının ksilanaz üretimine etkisini incelemişlerdir. Besiortamında ksilanın gerekli olduğunu, ancak ksilanın doğrudan hücre içine giremediği için, Bastawde'nin (1992) açıklamasına benzer şekilde ksilobiyoz, ksilotriyoz gibi ksilanın ilk hidroliz ürünlerinin direk indükleyici olabileceğini bildirmişlerdir. Besiortamına monosakkarit (ksiloz, arabinoz), disakkarit (sakkaroz) ve şeker alkoller (sorbitol) ilave ettiklerinde ksilanaz üretimini gözlemlemiş olup, enzimin yalnızca ksilanca zengin besiortamında üretilmediğini göstermişlerdir. Bu çalışmada besiortamına elma posası ilave edildiğinde buğday kepeği ve mısır koçanına göre daha yüksek ksilanaz aktivitesi gözlenmiştir. Kapoor vd. (2008)'in belirttikleri gibi, besiyerinde elma posası bileşiminde bulunan fruktoz ve sakkarozun bulunmasının bakteri gelişimini ve ksilanaz enzimini sentezlemeyi diğer atıklara kıyasla daha yüksek seviyede desteklemiş olabileceği düşünülmektedir.

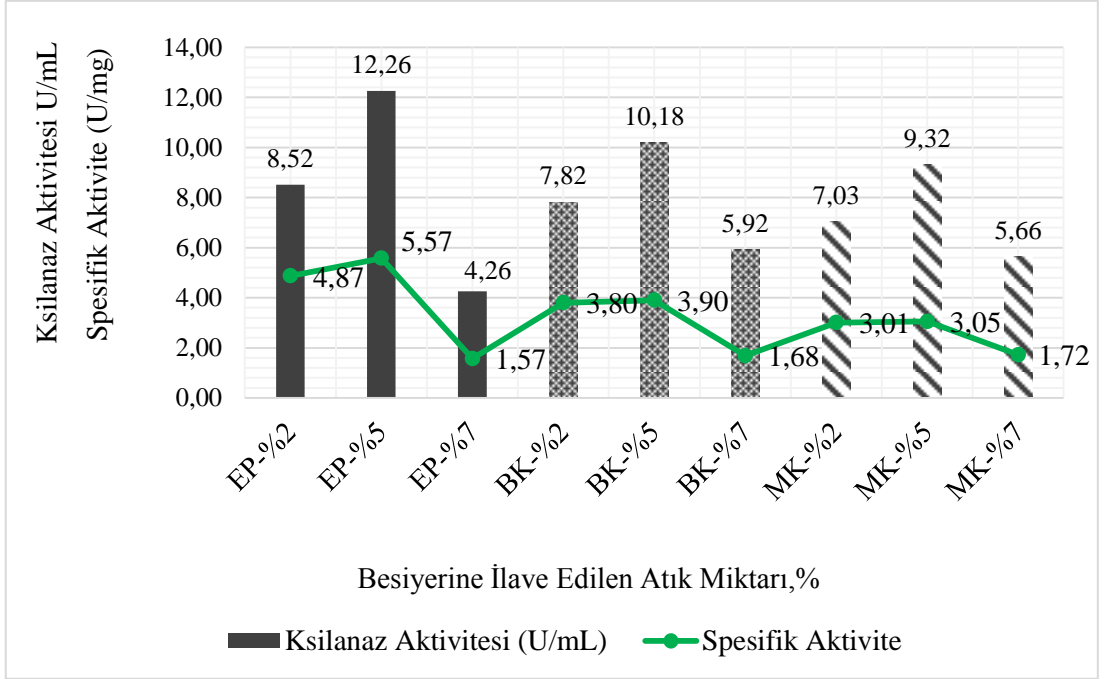
Sonia vd. (2005) değişik substratların kullanımı sonucu elde edilen ksilanaz aktivitelerinin farklı olmasının sebebini substratların hemiselüloz tipi, parçalanabilirliği ve besleyici bileşenlerin farklılığına dayandırmaktadırlar. Bu sebeple Kallel vd. (2016) ksilanaz indüklenmesinin karmaşık bir olay olduğunu ve değişik suşların bu indükleyicilere değişik cevaplar vereceğini belirtmişlerdir.

Bacillus cinsinin aerobik özellikte olmasından dolayı, besiyerinin viskozitesinin ve ilave edilen gıda/tarımsal atığın homojen dağılımının bakterinin gelişmesinde önemli olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada %7 gıda/tarımsal atık ilave edilmiş besiyerinin viskoz yapıda olduğu gözlenmiş olup, yapılan ksilanaz üretimi sonuçlarında aktivitenin düşük çıkmasının sebeplerinden birinin besiyerinin homojen olarak karışmamasından ve viskos yapıda oksijen transferinin yetersizliğinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

İzolatların spesifik aktivite değerleri şekil 4.20 ve şekil 4.21’de verilmiştir. Fang vd. (2007) ksilanın besiyerinde çözünmediğini, bu sebeple toplam protein değerinin hücre gelişmesinin göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde ölçülen enzim aktivitesi değeri toplam protein değerine oranlanarak spesifik aktivite değeri olarak hesaplanmış, böylece hücre gelişmesi ve enzim aktivitesinin arasındaki ilişki gözlenmiştir. Hem 39 hem de 67 numaralı izolata ait sonuçlar incelendiğinde, spesifik aktivite değerlerinin enzim aktivitesi değerlerine paralel olduğu, böylece izolatların gelişmesi ile enzim sentezlemesi arasında paralel bir ilişki olduğu sonucu elde edilmiştir.



Şekil 4.20 39 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde pH 6,1, 135 rpm, 30°C’de gelişme koşullarındaki ksilanaz aktivitesi ve spesifik aktivite sonuçları, (EP: Elma posası, BK: Buğday kepeği, MK: Mısır koçanı).



Şekil 4.21 67 nolu izolata ait gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerinde pH 8, 127 rpm, 30°C gelişme koşullarındaki ksilanaz aktivitesi ve spesifik aktivite sonuçları, (EP: Elma posası, BK: Buğday kepeği, MK: Mısır koçanı).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada elde edilen sonuçlar, aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

- ✓ Bu çalışmada toprak, buğday kepeği, çürümüş saman, fıstık kabuğu, buğday sapı, nohut mayası, bitki atıkları, meyve atıkları, elma posası, ekşi hamur mayası, fıstık kabuğu atıklarından 66 adet yerli izolat izole edilmiştir. Bakteri örneklerinden 39 adedinin Gram pozitif ve basil hücre şekline sahip olduğu, dolayısıyla *Bacillus* cinsine ait hücre morfolojisi gösterdiği, spor varlığının belirlenmesi analizi sonucu sporlu bakteri olduğu belirlenmiştir. İzolatlardan 12 adedi (izolat no; 3, 39, 43, 44, 45, 46, 48, 63, 64, 65, 66, 67) belirgin ksilanaz aktivitesi göstermiştir. 12 izolat arasından yüksek ksilanaz aktivitesi gösteren 8 izolatın (izolat no: 3, 39, 45, 46, 64, 65, 66, 67) koloni morfolojileri incelendiğinde *Bacillus* cinsiyle benzer özellikte olduğu görülmüştür. Bu izolatların tür bazında tanımlanması için 16S rRNA analizi yapılmış ve bu izolatların tamamının *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca belirgin ksilanaz aktivitesi gösteren 8 izolatın koloni morfolojileri incelendiğinde, literatürde bulunan *Bacillus* cinsine ait koloni morfolojisi özellikleriyle benzer sonuçlar elde edilmiştir.
- ✓ İzolatlardan 13,33 U/mL ksilanaz aktivitesi gösteren 39 numaralı izolat ve 5,57 U/mL ksilanaz aktivitesi gösteren 67 numaralı izolat, çalışmanın Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimizasyonu aşaması için seçilmiştir. Ayrıca, ksilanaz aktivitesine sahip *Bacillus subtilis* ATCC6633 suşu referans bakteri olarak kullanılmıştır. 39, 67 numaralı izolatlar ve referans bakteri ile ksilanaz enziminin üretimi amacıyla, besiyeri başlangıç pH değeri, karıştırma devri ve inkübasyon sıcaklığı parametreleri bağımsız değişken olarak seçilmiş ve bu parametreler Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimize edilmiştir. Bu deneyler Horikoshi besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir bağımsız değişken için 3 seviye belirlenmiş olup, bu seviyeler; inkübasyon sıcaklığı için 30, 35 ve 40°C, karıştırma devri için 100, 150, 200 rpm, besiyeri başlangıç pH değeri için 6, 7 ve 8 seviyeleridir. Tasarım, Minitab 16 programında yapılmıştır. Çalışmada, Yanıt Yüzey Yöntemi ile deney

tasarımında Merkezi Bileşik Tasarım (Central Composite Design full-unblocked), bu tasarımın da Yüzey Merkezli (Face Centered) tasarım modeli seçilmiştir. Oluşturulan deney tasarımında, 6 adet merkez noktanın tekrarı olmak üzere toplam 20 adet deney 3 tekerrürlü yürütülmüştür. Minitab programında Yanıt Yüzey Yöntemi ile dizayn edilen tasarımın analizi sonucunda regresyon katsayısının (R^2), model uygunsuzluğunun (lack of fit), inkübasyon sıcaklığı, karıştırma devri ve besiyeri başlangıç pH bağımsız değişkenlerinin ve bağımsız değişkenlerin ayrı ayrı birbiriyle interaksiyonlarının ve sonuçların %95 güvenle istatistiki açıdan önemli olup olmadığı incelenmiştir. 39 numaralı izolata ait Horiksohi besiyerinde Yanıt Yüzey Tasarımı sonucunda regresyon katsayısı (R^2) 0,824, model uygunsuzluğu sonucu (lack of fit) P değeri 0,735 olarak elde edilmiştir. Regresyon katsayısının 1,0'a yakın bir değer olduğu, ancak yeterince yüksek olmadığı görülmektedir. Model uygunsuzluğu istatistiksel açıdan önemsiz ($P>0,05$) bulunmuş olup böylece tasarlanan dizaynın sonuçlarla uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Yanıt Yüzey Yöntemi'ne ilişkin yapılan varyans analizi sonucunda, karıştırma devri için P değeri 0,033 ve inkübasyon sıcaklığı için P değeri 0,004 olarak hesaplanmış; bulgular bu iki parametrenin istatistiki açıdan ksilanaz aktivitesini etkileyen önemli parametreler olduğunu göstermiştir. Yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, bağımsız değişkenler arasında inkübasyon sıcaklığının ksilanaz aktivitesi için en önemli parametre olduğu anlaşılmaktadır. Horikoshi besiyerinde yapılan optimizasyon sonucunda 39 numaralı izolata optimum ksilanaz enzim üretim noktası 135 rpm, 30°C ve pH 8 olarak belirlenmiş olup bu parametrelerde yapılan ksilanaz üretiminde deneysel olarak elde edilen aktivite değeri teorik olarak Yanıt Yüzey Tasarımı ile hesaplanan ksilanaz aktivite değerine (19,28 U/mL) %91,2 oranında yakın bulunmuştur. Horikoshi besiyerinde yapılan optimizasyonun sonucunda 39 numaralı izolata enzim aktivitesini başlangıca göre 1,3 kat arttırdığı belirlenmiştir.

- ✓ 67 numaralı izolata ait Horiksohi besiyerinde Yanıt Yüzey Tasarımı sonucunda regresyon katsayısı (R^2) 0,996, model uygunsuzluğu sonucu (lack of fit) P değeri 0,109 olarak elde edilmiştir. Regresyon katsayısı değeri 1,0'a oldukça yakın olarak elde edilmiş olup; tasarlanan modelin %99,6 oranla yanıtı tahmin edebilir özellikte

olmasıyla güçlü bir model olduğu belirlenmiştir. Model uygunsuzluğu istatistiksel açıdan önemsiz ($P>0,05$) bulunmuş olup, böylece tasarlanan modelin sonuçlarla uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Karıştırma devri, inkübasyon sıcaklığı ve besiyeri başlangıç pH değeri bağımsız değişkenlerinin ayrı ayrı ve herbirinin birbirleriyle interaksiyonlarının aktiviteye etkisinin, istatistiki açıdan önemli ($P<0,05$) olduğu belirlenmiştir. Yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, bağımsız değişkenler arasında inkübasyon sıcaklığının ksilanaz aktivitesi için en önemli parametre olduğu belirlenmiştir. Horikoshi besiyerinde yapılan optimizasyon sonucunda 67 numaralı izolatin optimum ksilanaz üretim noktası 127 rpm, 30°C, pH 8 olarak belirlenmiş olup; bu parametrelerde yapılan ksilanaz üretiminde deneysel olarak elde edilen aktivite değeri teorik olarak Yanıt Yüzey Tasarımı ile hesaplanan ksilanaz aktivite değerine (24,17 U/mL) %97 oranında yakın bulunmuştur. Horikoshi besiyerinde yapılan optimizasyon sonucunda 67 numaralı izolatin enzim aktivitesini başlangıca göre 4,2 kat arttırdığı belirlenmiştir.

- ✓ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu ile Horikoshi besiyerinde Yanıt Yüzey Tasarımı sonucunda karıştırma devri, inkübasyon sıcaklığı ve besiyeri başlangıç pH değeri parametrelerinin ayrı ayrı ve bu parametrelerin interaksiyonlarının ksilanaz aktivitesine etkisinin, istatistiki açıdan önemsiz olduğu belirlenmiştir. Regresyon katsayısı (R^2) %67 olarak hesaplanmış olup, tasarımın yanıtı tahmin etmede yeterince güçlü olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla, referans suşun belirlenen parametre seviyelerinde istatistiki açıdan dikkate değer enzim aktivite değeri göstermediği belirlenmiştir.
- ✓ Enzim üretiminde kullanılan Horikoshi besiyerine karbon kaynağı olarak ksilan yerine ilave etmek üzere elma posası ve mısır koçanı atıkları 50°C'de kurutulmuş, çeşitli değirmenlerde öğütüldükten sonra 650 µm partikül boyutundaki elekten eilenmiş olup, bileşim tayini yapılmıştır. Buğday kepeği ilgili firmadan kuru ve öğütülmüş şekilde temin edildiği için yalnızca eleme yapılmıştır. Bileşim tayini sonucunda gıda/tarımsal atıkların bileşimindeki ksilan miktarı sırasıyla, elma posasında %13,67, buğday kepeğinde %13,53 ve mısır koçanında %30,06 olarak belirlenmiş olup bu atıkların ksilanaz üretiminde fermantasyon besiyerinde karbon

kaynağı olarak kullanılma potansiyelinin olduğu belirlenmiştir. Literatürdeki çeşitli çalışmalarda, buğday kepeği ve mısır koçanının içerdiği ksilan miktarından dolayı enzimin sentezlenmesini tetiklediği, dolayısıyla bu tür lignoselülozik atıklarda daha yüksek enzim aktivitesi elde edildiği bildirilmektedir. Bu çalışmada elma posasının ksilan içeriği buğday kepeğine yakın olarak belirlenmiş olup, benzer şekilde ksilanaz üretiminde kullanılabileceği düşünülmektedir. Böylece, besiyerine atık ilavesi hem proses ekonomisini ve hem de çevresel atık yönetimini geliştirecektir.

- ✓ Gıda/Tarımsal atık ilaveli ksilanaz üretim besiyerini hazırlamak amacıyla, Horikoshi besiyerine ksilan yerine karbon kaynağı olarak elma posası ilave edilmiştir. Minitab programında Yanıt Yüzey Yöntemi ile 39 ve 67 numaralı izolatların bu besiyerinde ksilanaz üretim optimizasyonu amacıyla yapılan tasarımda enzim aktivite değerleri düşük bulunmuş olup, parametrelerin etkisi istatistiki açıdan önemsiz olarak belirlenmiştir. Ardından Horikoshi besiyerinde yapılan optimizasyon ile elde edilen optimum enzim üretim parametrelerinde, gıda/tarımsal atık ilaveli besiyerindeki atık oranı artırılarak ksilanaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Atık ilaveli besiyerine ayrı ayrı elma posası, buğday kepeği ve mısır koçanı, %2, %5 ve %7 oranlarında ilave edilmiştir. En yüksek ksilanaz aktivitesi %5 oranında gıda/tarımsal atık ilave edilmiş besiyerinde elde edilmiş olup; 39 numaralı izolat için elma posası ilaveli besiyerinde 12,16 U/mL, 67 numaralı izolat için elma posası ilaveli besiyerinde 12,26 U/mL olarak bulunmuştur.
- ✓ Ülkemizde tarımsal üretimin ve gıda sanayisi faaliyetlerinin sonucunda her yıl yüksek miktarda çeşitli lignoselülozik atıklar ortaya çıkmaktadır. Bu atıkların değerlendirilmesinin öncelikle çevreye olan olumlu katkısından, yüksek katma değerli ürünlere dönüştürülmesiyle de ekonomiye olan katkısından dolayı önem taşıdığı düşünülmektedir. Çalışmada, ksilanaz üretiminde kullanılmak üzere izole edilen yerli *Bacillus* suşları ile elde edilen enzim aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, yerli suşların aktivite değerlerinin literatürle benzer seviyelerde olduğu görülmüştür. Optimizasyon çalışması ile bu aktivite değerleri artmıştır.

- ✓ Fermantasyon ortamına ilave edilen gıda/tarımsal atıkların karbon kaynağı olarak kullanımını kolaylaştırmak amacıyla, fermantasyon ortamına ilave edilmeden önce uygunlanacak ön işlemlerle lignoselülozik biyokütlenin mikroorganizmalar tarafından daha kolay kullanımı sağlanabilmektedir. Lignoselülozik atıklara yapılan bu gibi çeşitli ön işlemlerin enzim üretim verimine pozitif etki yapabileceği öngörülmektedir. Ancak enzimlerin ticari olarak üretiminde, gerek enzim üretim veriminin yüksek olması, gerekse mikroorganizma gelişme özelliklerinin stabil olması arzu edildiğinden üretim için çoğunlukla genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar tercih edilmektedir. Dolayısıyla, gelecekte yapılacak çalışmalar için bu çalışma kapsamında izole edilen *Basillus* suşlarının ksilanaz enzimi üretiminden sorumlu gen veya gen bölgelerinde yapılacak modifikasyon ile daha yüksek verimde enzim üretimini mümkün kılacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A.O. and Tunçer, M. 2016a. Production of endoxylanase from novel *Actinomadura geliboluensis* by using agricultural wastes. 4th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, Cyprus.
- Adıgüzel, A.O. and Tunçer, M. 2016b. Production, characterization and application of a xylanase from *Streptomyces* sp. AOA40 in fruit juice and bakery industries. *Food Biotechnology*, 30(3), 189-218.
- Adrio, J.L. and Demain, A.L. 2014. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4, 117-139.
- Aguilar, C. N., Gutiérrez-Sánchez, G., Rado-Barragán, P. A., Rodríguez-Herrera, R., Martínez-Hernandez, J. L. and Contreras-Esquivel, J.C. 2008. Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(4), 354-366.
- Akkara, M. ve Tosun, H. 2014. Funguslardan elde edilen endüstriyel ürünler. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9(2), 46-53.
- Akpınar, O., Erdogan, K., Bostancı, S. 2009. Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. *Food and Bioproducts Processing*, 87, 145-151.
- Anbu, S., Saranraj, P. and Padma, J. 2017. Synergetic effect of microbially fermented soybean and NPK fertilizer on plant growth of grand naine banana. *Journal of Academia and Industrial Research*, 6(2), 27-31.
- Annamalai, N., Thavasi, R., Jayalakshmi, S. and Balasubramanian, T. 2009. Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated from marine environment. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 291-297.
- Anonim. 2016. TÜİK Yıllık Sanayi Ürün İstatistikleri.
- Anonim. 2017. Web sitesi: www.mikrobiyoloji.org/. Erişim Tarihi: 31.05.2017.
- Anonymous. 2019a. Web sitesi: <https://www.enzyme-database.org/news.php>, Erişim Tarihi: 05.11.2019.
- Anonymous. 2019b. Web sitesi: <https://www.novozymes.com/en/biology/enzymes>, Erişim Tarihi: 07.05.2019.
- Anonymous. 2019c. Web sitesi: <http://biosciences.dupont.com/solutions/>, Erişim Tarihi: 07.05.2019.

- Anonymous. 2019d. Web sitesi: <https://www.abenzymes.com/en/>, Erişim Tarihi: 07.05.2019.
- Anonymous. 2019e. Web sitesi: <https://www.advancedenzymes.com/products-and-solutions/>, Erişim Tarihi: 07.05.2019.
- Anonymous. 2019f. Web sitesi: <https://turkish.alibaba.com/g/xylanase-food-grade.html>, Erişim Tarihi: 07.05.2019.
- Anonymous. 2019g. Web sitesi: <https://support.minitab.com/en-us/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/how-to/response-surface/analyze-response-surface-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/model-summary-table/> , Erişim Tarihi: 12.11.2019.
- Anonymous. 2019h. Web sitesi: <https://support.minitab.com/en-us/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/how-to/response-surface/analyze-response-surface-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/analysis-of-variance-table/>, Erişim Tarihi: 12.11.2019.
- Anthony, P., Harish, B.S., Jampala, P., Ramanujam, S. and Uppuluri, K.B. 2016. Statistical optimization, purification and applications of xylanase produced from mixed bacteria in a solid liquid fermentation using prosopis juliflora. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 213-220.
- Aronsson, A., Güler, F., Petoukhov, M.V., Crennellg, S.J., Svergun, D.I., Linares Pastén, J. and Nordberg Karlsson, E. 2017. Structural insights of RmXyn10A – A prebiotic-producing GH10 xylanase with a non-conserved aglycone binding region. *BBA - Proteins and Proteomics*, 1866, 292-306.
- Ayeni, A.O. and Daramola, M.O. 2017. Lignocellulosic biomass waste beneficiation: Evaluation of oxidative and non-oxidative pretreatment methodologies of South African corn cob. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 1771-1779.
- Aygan, A. and Arıkan, B. 2009. Production and characterization of multifunctional endoxylanase by *Bacillus* sp. X13. *Turkish Journal of Biology*, 33, 231-237.
- Ayishal, Begam, M., Annu, A., Shameera Banu, S. and Vishnu Priya, D. 2015. Comparison and optimization of thermostable xylanase production by *Bacillus pumilus* and *Bacillus cereus* using corn husk. *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology*, 2(9), 30-35.
- Azeri, C., Tamer, A.U. and Oskay, M. 2010. Thermoactive cellulase-free xylanase production from alkaliphilic *Bacillus* strains using various agroresidues and their potential in biobleaching of kraft pulp. *African Journal of Biotechnology*, 9(1), 63-72.

- Bailey, M.J., Biely, P. and Poutanen, K. 1992. Interlaboratory testing for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23, 257-270.
- Bajpai, P. 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology Progress*, 15(2), 147-157.
- Bajpai, P. 2014. *Xylanolytic Enzymes*. Elsevier, 120, London.
- Bastawde, K.B. 1992. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 353-368.
- Baş, C. 2010. Cevap yüzeyi tasarımları ve sinir ağları yaklaşımı. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstatistik Anabilim Dalı, 140, Ankara.
- Baş, D. and Boyacı, İ.H. 2007. Modeling and optimization I: Usability of Response Surface Methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 836-845.
- Battan, B., Sharma, J., Dhimana, S.S. and Kuhad, R.C. 2007. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 733-739.
- Bayındırlı, A. 2010. *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing Chemistry and Engineering Applications*. CRC Press Taylor & Francis Group, 358, Boca Raton.
- Beg, Q.K., M., Mahajan, L. and Hoondal, G.S. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 326-338.
- Bennett, J.W. 1998, *Mycotechnology: The role of fungi in biotechnology*. *Journal of Biotechnology*, 66, 101-107.
- Bezerra, M.A, Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S. and Escaleira, L.A. 2008. Response Surface Methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965-977.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*, 3, 286-290.
- Birijlall, N., Manimaran, A., Kumar, K.S., Permaul, K. and Singh, S. 2011. High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia pastoris* NC38 in a 5 L fermenter and its efficiency in biobleaching of bagasse pulp. *Bioresource Technology*, 102, 9723-9729.
- Boonchuay, P., Takenaka, S., Kuntiya, A. and Techapun, C. 2016. Purification, characterization, and molecular cloning of the xylanase from *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 and its application to xylooligosaccharide production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 129, 61-68.

- Box, G.E.P. and Draper, N.R. 2007. Empirical Model Building and Response Surfaces. John Wiley and Sons, 688, New York.
- Boyacı-Gündüz, C.P. 2018. Molecular characterization of the predominant Lactic Acid Bacteria and yeasts in the sourdough and chickpea fermentations and investigation of some Lactic Acid Bacteria for potential starter culture usage. PhD Thesis, Çukurova University, Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Food Engineering, 317, Adana.
- Bradley, N. 2007. The Response Surface Methodology. Masters Thesis, Indiana University of South Band, 84, India.
- Brijwani, K., Oberoi, H.S. and Vadlani, P.V. 2010. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, 45, 120-128.
- Buzrul, S., Çevik, M. and Alpas, H. 2008. Comparison of Response Surface Methodology and the proposed Weibull model for inactivation of *Listeria innocua* by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Safety*, 28, 142-156.
- Büyüktopçu, A.E.Ü. 2012. Farklı stres koşullarında *Rhodotorula glutinis*'ten antoksidan üretim için biyoproses koşullarının geliştirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 158, Ankara.
- Castillo, E.D. 2007. Process Optimization, A Statistical Approach. Springer US, 462, New York.
- Chen, X., Whitmire, D. and Bowem, J.P. 1996. Xylanase homology modeling using the inverse protein folding approach. *Protein Science*, 5, 705-708.
- Christov, L.P., Szakacs, G. and Balakrishnan, H. 1999. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. *Process Biochemistry*, 34, 511-517.
- Claassen, P.A.M., van Lier, J.B., Lopez-Contreras, A.M., van Niel, E.W.J., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., de Vries, S.S. and Weusthuis, R.A. 1999. Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 741-755.
- Collins, T., Gerday, C. and Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3-23.
- Coman, G. and Bahrim, G. 2011. Optimization of xylanase production by *Streptomyces* sp. P12-137 using Response Surface Methodology and central composite design. *Annals of Microbiology*, 61, 773-779.

- Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P. 1993. β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems, biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 17, 259-289.
- Çerçi, B., Koçyiğit, A. ve Karaboz, İ. 2011. Gıdaların işlenmesinde kullanılan enzimlerin rekombinant DNA teknolojisi ile üretimi. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 9(3), 1-7.
- Damiano, V.B., Ward, R., Gomes, E., Alves-Prado, H.F. and Da Silva, R. 2006. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic and thermophilic *Bacillus licheniformis* 77-2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129(132), 289-302.
- Demirekler, P., Şumnu, G. and Sahin, S. 2004. Optimization of bread baking in a halogen lamp–microwave combination oven by Response Surface Methodology. *European Food Research and Technology*, 219, 341-347.
- Desai, D.I and Iyer, B.D. 2017. Utilization of corn cob waste for cellulase-free xylanase production by *Aspergillus niger* DX-23: Medium optimization and strain improvement. *Waste and Biomass Valorization*, 8(1), 103-113.
- Dhillon, A., Gupta, J.K., Jaurhari, B.M. and Khanna, S. 2000. A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. *Bioresource Technology*, 73, 273-277.
- Ebringerova, A. and Heinze, T. 2000. Xylan and xylan derivatives: Biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9), 542-556.
- Elgharbi, F., Hmida-Sayari, A., Zaafouri, Y. and Bejar, S. 2015. Expression of an *Aspergillus niger* xylanase in yeast: Application in bread making and in vitro digestion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 103-109.
- Fang, H.Y., Changa, S.M., Hsieh, M.C. and Fang, T.J. 2007. Production, optimization growth conditions and properties of the xylanase from *Aspergillus carneus* M34. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic*, 49, 36-42.
- Fengxia, L., Mei, L., Zhaoxin, L., Xiaomei, B., Haizhen, Z. and Yi, W., 2008. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology*, 99, 5938-5941.
- Fischer, E. 1894. Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 27, 2985-2993.

- Fujita, J., Shigeta, S., Yamane, Y.I., Fukuda, H., Kizaki, Y., Wakabayashi, S. and Ono, K. 2003. Production of two types of phytase from *Aspergillus oryzae* during industrial koji making. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 95, 460-465.
- Gandarillas, C., Soto, R. and Vargas, V.A. 2012. Xylanase production using barley straw by *Bacillus* sp. LB-4 isolated from Laguna Blanca Potosi-Bolivia. *Revista Boliviana De Química*, 29(1), 63-70.
- Garai, D. and Kumar, V. 2013. Response Surface optimization for xylanase with high volumetric productivity by indigenous alkali tolerant *Aspergillus candidus* under submerged cultivation. *3 Biotech*, 3, 127-136.
- Ghosh, K., Sen, S.K. and Ray, A.K. 2002. Characterization of *Bacilli* isolated from the gut of rohu, labeo rohita, fingerlings and its significance in digestion. *Journal of Applied Aquaculture*, 12(3), 33-42.
- Goksungur, Y., Mantzouridou, T., Roukas, F. and Kotzekidou, P. 2004. Production of β -Carotene from beet molasses by *Blakeslea trispora* in stirred-tank and bubble column reactors. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 112(1), 37-54.
- Goldschmid, O. 1971. Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions. John Wiley & Sons, 916, New York.
- Guerrero, M.R.B., Gutierrez, J.M.S., Zaragoza, M.J.M., Ortiz, A.L. and Collins-Martinez, V. 2016. Optimal slow pyrolysis of apple pomace reaction conditions for the generation of a feedstock gas for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 23232-23237.
- Gupta, U. and Kar, R. 2009. Xylanase production by a thermo-tolerant *Bacillus* species under solid-state and submerged fermentation. *Brazilian Archives of Biology Technology*, 52(6), 1363-1371.
- Gusek, T.W., Johnson, R.D., Tyn, M.T. and Kinsella, J.E. 1991. Effect of agitational shear on growth and protease production by *Thermomonospora fusca*. *Biotechnology and Bioengineering*, 37, 371-374.
- Haddar, A., Driss, D., Frikha, F., Ellouz-Chaabouni, S. and Nasri, M. 2012. Alkaline xylanases from *Bacillus mojavensis* A21: Production and generation of xylooligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 647-656.
- Hea, J., Chena, D., Yua, B. and Zhanga, K. 2010. Optimization of the *Trichoderma reesei* endo-1,4-beta-xylanase production by recombinant *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal*, 52, 1-6.
- Heck, J.X., Soares, J.H.B. and Ayu, M.A.Z. 2005. Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 417-423.

- Helianti, I., Ulfah, M., Nurhayati, N., Suhendar, D., Finalissari, A.K. and Wardani, A.K. 2016. Production of xylanase by recombinant *Bacillus subtilis* DB104 cultivated in agroindustrial waste medium. HAYATI Journal of Biosciences, <http://dx.doi.org/10.1016/j.hjb.2016.07.002>.
- Hjort, C. 2007. Industrial enzyme production for food applications, In: Novel enzyme technology for food applications. Robert Rastall (eds), Woodhead Publishing Limited, 55-56, Cambridge.
- Ho, H.L. and Heng, K.L. 2015. Xylanase production by *Bacillus subtilis* in cost-effective medium using soybean hull as part of medium composition under submerged fermentation (smf) and solid state fermentation (ssf). Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development, DOI: 10.4172/2376-0214.1000143.
- Hornstra, L.M., de Leeuw, P.L.A, Moezelaar, R., Wolbert, E.J., de Vries, Y.P., Vos W.M. and Abee, T. 2007. Germination of *Bacillus cereus* spores adhered to stainless steel. International Journal of Food Microbiology, 116, 367-371.
- Hölker, O., Höfer, M., Lenz, J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory scale solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 175-186.
- Hromádková, Z., Košťálová, Z. and Ebringerová, A. 2008. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of phenolics-rich heteroxylans from wheat bran. Ultrasonics Sonochemistry, 15, 1062-1068.
- Hua, X. and Yang, R. 2016. Enzymes in Starch Processing, In: Applications of Enzymes in Food and Beverage Industries. Chandrasekaran M. (eds), CRC Press, 556, Florida.
- Ikura, Y. and Horikoshi, K. 1987. Stimulatory effect of certain amino acids on xylanase production by alkalophilic *Bacillus* sp.. Agricultural and Biological Chemistry, 51, 3143-3145.
- Irfan, M., Asghar, U., Nadeem, M., Nelofer, R. and Syed, Q. 2016. Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp. in submerged fermentation. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 9, 139-147.
- Irfan, M., Nadeem, M., Syed, Q. and Baig, S. 2012. Effect of medium composition on xylanase production by *Bacillus subtilis* using various agricultural wastes. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 12(5), 561-565.
- Irmak, S. and Meryemoglu, B. 2017. Comparison of perennial grasses and corn-based biomass materials for high-yielding hydrogen gas production. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 60, 601-606.

- İkiz, F., Püskülcü, H. ve Eren, Ş. 2000. İstatistiğe Giriş. Barış Yayınları, 459, İzmir.
- İyidoğan, N.F. and Bayındırlı, A. 2004. Effect of L-cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice. *Journal of Food Engineering*, 62, 299-304.
- Juturu, V. and Wu J.C. 2012. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*, 30, 1219-1277.
- Kahyaoglu, T. and Kaya, S. 2006. Determination of optimum processing conditions for hot air roasting of hulled sesame seeds using Response Surface Methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1452-1459.
- Kallel, F., Driss, D., Chaari, F., Zouari-Ellouzi, S., Chaabouni, M., Ghorbel, R. and Chaabouni, S.E. 2016. Statistical optimization of low-cost production of an acidic xylanase by *Bacillus mojavensis* UEB-FK: Its potential applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, 1-10.
- Kapoor, M., Nair, L.M. and Kuhad, R.C. 2008. Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. *Biochemical Engineering Journal* 38, 88-97.
- Karaoglan, M., Yildiz, H. and Inan M. 2014. Screening of signal sequences for extracellular production of *Aspergillus niger* xylanase in *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal*, 92, 16-21.
- Karasu, S., Durak, M.Z. ve Toker, Ö.S. 2015. Gıda biyoteknolojisi ve biyoproseslerinde yeni gelişmeler. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2(5), 161-164.
- Kaur, P., Bhardwaj, N.K. and Sharma, J. 2016. Process optimization for hyper production of xylanase via statistical methodology from isolated *Bacillus pumilus* 3GAH using lignocellulosic waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6, 59-167.
- Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N. 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1), 12-19.
- Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 345-351.
- Kitamoto, K. 2002. Molecular biology of the koji molds. *Advances in Applied Microbiology*, 51, 129-153.
- Kocabaş, D.S., Güder, S. and Özben, N. 2015. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 115, 66-75.

- Koç, B. 2008. Püskürtmeli kurutma yöntemi ile yoğurt tozu üretim koşullarının optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 237, İzmir.
- Koç, B. ve Kaymak-Ertekin, F. 2010. Yanıt Yüzey Yöntemi ve gıda işleme uygulamaları. *Gıda*, 35(1), 63-70.
- Koshland, D.E. 1958. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(2), 98-104.
- Kuhad, R.C. and Singh, A. 1993. Lignocellulosic biotechnology: Current and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, 13, 151-172.
- Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 441-456.
- Kumar, A., Gupta, R., Shrivastava, B., Khasa, Y.P. and Kuhad, R.C. 2012. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74, 170-177.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lai, T.T., Pham, T.T.H., Adjalle, K., Brouillette, F. and Barnabe, S. 2015. Strategies for using pulp and paper sludges as culture media for xylanase production with *Bacillus pumilus*. *Waste Biomass Valor*, 6, 1103-1113.
- Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O., Turunen, O. and Schoemaker, H. 2002. Industrial use of enzymes, In: *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, EOLSS Publishers Co., 424, Oxford.
- Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, Jr. W. J. and Shadomy, H. J. 1985. *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, 1044, Washington, D.C.
- Lequart, C., Nuzillard, J-M., Kurek, B. and Debeire, P. 1999. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: Production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 319, 102-111.
- Li, K., Azadi, P., Collins, R., Tolan, J., Kim, J.S. and Eriksson Karl-Erik, L.I. 2000. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 89-94.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M. and Wang, X. 2012. Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3), 1-11.

- Lili, W., Yijun, J., Chunhu, L., Xiutao, L., Lingqian, M., Wei, W. and Xindong, M. 2011. Microwave-assisted hydrolysis of corn cob for xylose production in formic acid. International Conference on Materials for Renewable Energy and Environment (ICMREE), 20-22 May, Book of Abstracts, (1), 332-335, Shanghai, China.
- Limkar, M.B., Pawar, S.V., Rathod, V.K. 2019. Statistical optimization of xylanase and alkaline protease co-production by *Bacillus* spp using Box-Behnken Design under submerged fermentation using wheat bran as a substrate. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 17, 455-464.
- Lin, J., Ndlovu, L.M., Singh, S. and Pillay, B. 1999. Purification and biochemical characteristics of β -D-xylanase from a thermophilic fungus. *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. Biotechnology and Applied Biochemistry, 30,73-79.
- Linares-Pasten, J.A., Aronsson, A. and Nordberg-Karlsson, E. 2018. Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass. Current Protein and Peptide Science, 19, 48-67.
- Linder, M.B., Qiao, M., Laumen, F., Selber, K., Hyytia, T., Nakari-Setälä, T. and Penttilä, M.E. 2004. Efficient purification of recombinant proteins using hydrophobins as tags in surfactant-based two-phase systems. Biochemistry, 43, 11873-11882.
- Liu, M.Q. and Liu G.F 2008. Protein expression and purification. Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. Protein Expression and Purification, 57(2), 101-107.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry, 193, 267-75.
- Macagnan, F.T., Santos, L.R., Roberto, B.S., Moura, F.A., Bizzani, M. and Silva, L.P. 2015. Biological properties of apple pomace, orange bagasse and passion fruit peel as alternative sources of dietary fibre. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 6,1-6.
- Maes, C. and Delcour, J.A. 2002. Structural characterisation of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. Journal of Cereal Science, 35, 315-326.
- Moteshafi, H., Hashemi, H., Mousavi, S.H. and Mousivand, M. 2016. Characterization of produced xylanase by *Bacillus subtilis* D3d newly isolated from apricot phyllosphere and its potential in pre-digestion of BSG. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 37, 251-260.

- Muluk, F.Z., Toktamış, Ö., Kurt, S. ve Karağaoğlu, E. 2009. Çeviri: Hicks, C.R., Deneysel Düzenlemede İstatistiksel Yöntemler. Ege Üniversitesi Basımevi, 267, İzmir.
- Murugan, P., Jampala, P., Ramanujam S. and Uppuluri, B. 2015. Production of xylanase from a mixed culture system of *Acetobacter xylinum* and *Cellulomonas uda* in submerged fermentation. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12(2), 1615-1622.
- Myers, R. H. and Montgomery, D.C. 1995. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, John Wiley & Sons, 856, New York.
- Myers, R.H. and Montgomery, D.C. 2002. *Response Surface Methodology Process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons, Inc. United States of America.
- Nagar, S., Mittal, A., Kumar, D., Kumar, L., Kuhad, R.C. and Gupta, V.K. 2012. Hyper production of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV-85S using wheat bran under solid state fermentation. *New Biotechnology*, 28(6), 581-587.
- Pastor, F.I.J., Gallardo, O., Sanz-Aparicio, J. and Diaz, P. 2007. Xylanases: Molecular Properties and Applications, In: *Industrial Enzymes*, Polaina, J. and MacCabe, A.P. (eds.), 65-82, Dordrecht.
- Peng, J. S., Tsai, W.C. and Chou, C.C., 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 105-111.
- Perez-Rodríguez, N., García-Bernet, D. and Domínguez, J.M. 2017. Extrusion and enzymatic hydrolysis as pretreatments on corn cob for biogas production. *Renewable Energy*, 107, 597-603.
- Pointner, M. Kuttner, P., Obrlik, T., Jäger, A. and Kahr, H. 2014. Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. *Agronomy Research* 12(2), 391-396.
- Poorna, C.A. and Prema, P. 2006. Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. *Biochemical Engineering Journal*, 32, 106-112.
- Puls, J. and Poutanen, K. 1989. Mechanisms of enzymatic hydrolysis of hemicelluloses xylans and procedures for determination of the enzyme activities involved. In: Ericksson KEE, Ander P (eds) *Proceedings of the 3rd International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. STFI, 93-95, Stockholm.

- Puri, M., Sharma, D. and Barrow, C.J. 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 37-44.
- Raj, A., Kumar, S., Singh, S.K., Prakash, J. 2018. Production and purification of xylanase from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* and its pretreatment of eucalyptus kraft pulp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15,199-209.
- Ramsden, D.K., Hughes, J. and Weir, S. 1998. Flocculation of cellular material in complex fermentation medium with the flocculant poly (diallyldimethylammonium chloride). *Biotechnology Techniques*, 12, 599-603.
- Rana, N. K. and Bhat, T. K. 2005. Effect of fermentation system on the production and properties of tannase of *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. *Journal of General and Applied Microbiology*, 51, 203-212.
- Rastall, R. 2007. *Novel Enzyme Technology for Food Applications*. Woodhead Publishing Limited, 320, Cambridge.
- Ravindran, R. and Jaiswal, A.K. 2016. Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 58-69.
- Rehman, H.I., Siddique, N.N., Aman, A., Nawaz, M.A., Baloch, A.H. and Qader, S.A.U 2015. Morphological and molecular based identification of pectinase producing *Bacillus licheniformis* from rotten vegetable. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13, 139-144.
- Reilly, P.J. 1981. Xylanases, structure and function, In: *Trends in the biology of fermentation for fuels and chemicals*. Hollaender, A. (eds), Springer US, 591, New York.
- Röhr, M., Kubicek, C. P. and Kominek, J. 1983. Citric acid, in G. Reed and H. J. Rehm (eds). *Biotechnology*, Verlag Chemie, Weinheim, 3, 420-454.
- Ruanglek, V., Sriprang, R., Ratanaphan, N., Tirawongsaroj, P., Chantasigh, D., Tanapongpipat, S., Pootanakit, K. and Eurwilaichitr, L. 2007. Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinant endo-1, 4- β -xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 19-25.
- Rubin, E.M. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454, 841-845.
- Sa'-Pereira, P., Mesquita, A., Duarte, J.C., Barros, M.R.A. and Costa-Ferreira, M. 2002. Rapid production of thermostable cellulase-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 924-933.

- Saklar, S., Katnas, S. and Urgan, S. 2001. Determination of optimum hazelnut roasting conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 271-281.
- Salles, B.C., Cunha, R.B., Fontes, W., Sousa, M.V. and Filho, E.X.F. 2000. Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *Journal of Biotechnology*, 81,199-204.
- Saraçoğlu, Z.N. 2010. Cellulase-Free alkaline xylanase enzim üreticisi *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu, enzim üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik kullanım olanaklarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 89, Adana.
- Sarrouh, B., Santos, T.M., Miyoshi, A., Dias R. and Azevedo, V. 2012. Up-To-Date insight on industrial enzymes applications and global market. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, S4:002. doi:10.4172/2155-9821.S4-002.
- Schafer, T., Borchert, T.W., Nielsen, S.S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzak, F., Nilsson, D.L., Salmon, S., Pedersen, S., Heldt-Hansen, H.P., Poulsen, B.P., Lund, H., Oxenboll, K.M., Wu, G.F., Pedersen, H.H. and Xu, H. 2007. Industrial enzymes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 105, 59-131.
- Seo, J., Park, T.S., Kim, J.N., Ha, J.K. and Seo, S. 2014. Production of endoglucanase, beta-glucosidase and xylanase by *Bacillus licheniformis* grown on minimal nutrient medium containing agriculture residues. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(7), 946-950.
- Sepahy, A.A., Ghazi, S. and Sepahy, M.A. 2011. Cost-effective production and optimization of alkaline xylanase by indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 fermented on agricultural waste. *SAGE-Hindawi Enzyme Research*. doi:10.4061/2011/593624.
- Sevimli, K.M., Şumnu, G. and Şahin, S. 2005. Optimization of halogen lamp–microwave combination baking of cakes: A Response Surface Methodology study. *European Food Research and Technology*, 221, 61-68.
- Shan, J.G., Xia, J., Guo, Y.X. and Zhang, X.Q. 1996. Flocculation of cell, cell debris and soluble protein with methacryloyloxyethyl trimethylammonium chloride–acrylonitrile copolymer. *Journal of Biotechnology*, 49, 173-178.
- Sharma, A., Adhikari, S. and Satyanarayana, T. 2007. Alkali-thermostable and cellulase-free xylanase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 483-490.

- Shen, J. and Wyman, C.E. 2011. A novel mechanism and kinetic model to explain enhanced xylose yields from dilute sulfuric acid compared to hydrothermal pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, 102, 9111-9120.
- Silva, J.C., Oliveira, R.C., Neto, A.S., Pimentel, V.C. and Santos, A.A. 2015. Extraction, addition and characterization of hemicelluloses from corn cobs to development of paper properties. *Procedia Materials Science*, 8, 793-801.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. and Templeton, D. 2005. Determination of ash in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, Issue Date: 7/17/2005.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. and Crocker, D. 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, Issue Date: 4/25/2008.
- Sonia, K.G., Chadha, B.S. and Saini, H.S. 2005. Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid state fermentation. *Bioresource Technology*, 96,1561-1569.
- Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, 291, Ankara.
- Teo, C.C., Tan, S.N., Hong Yong, J.W., Hew, C.S. and Ong, E.S. 2010. Pressurized hot water extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2484-2494.
- Teo'filo, R.F. and Ferreira, M.M.C. 2006. Chemometrics II: spreadsheets for experimental design calculations, a tutorial. *Quimica Nova*, 29, 338-350.
- Törrönen, A. and Rouvinen, J. 1997. Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4- β -xylanases. *Journal of Biotechnology*, 57, 137-149.
- Tunail, N. 2009. Mikrobiyoloji, Palme Yayıncılık, 438, Ankara.
- Ürküt, Z., Dağbağlı, S. and Göksungur, Y. 2007. Optimization of pullulan production using ca-alginate- immobilized *Aureobasidium pullulans* by Response Surface Methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, 837-846.
- Van Dongen, F.E.M., Van Eylen, D. and Kabel, M.A. 2011. Characterization of substituents in xylans from corn cobs and stover. *Carbohydrate Polymers*, 86, 722-731.
- Whistler, R.L. and Masak, E. 1955. Enzymatic hydrolysis of xylan. *Journal of the American Chemical Society*, 77, 1241-1243.

- Whitehurst, R.J. and Oort, M. 2010. Enzymes in Food Technology. Blackwell Publishing Ltd, 368, Iowa.
- Wiseman, A. 1987. The Application of Enzymes in Industry, In: Handbook of Enzymes Biotechnology. Horwood, E. (eds), 274-373, Chichester.
- Wong, K.K., Tan, L.U. and Saddler, J.N. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 52, 305-17.
- Wong, K.K.Y., Richardson, J.D. and Mansfield, S.D. 2000. Enzymatic treatment of mechanical pulp fibers for improving papermaking properties. Biotechnology Progress, 16, 1025-1029.
- Yegin, S., Buyukkileci, A.O., Sargin, S. and Goksungur, Y. 2017. Exploitation of agricultural wastes and by-products for production of *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1 xylanase: Screening, bioprocess optimization and scale up. Waste Biomass Valorization, 8, 999-1010.
- Yegin, S., Fernandez-Lahore, M., Gama-Salgado, A. J., Guvenc, U., Goksungur, Y. and Tari, C. 2011. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. Applied Microbiology Biotechnology, 89, 949-960.
- Yegin, S., Sargin, S. and Goksungur, Y. 2014. Bioprocess strategies for production of xylanase on agro-residual products with *Aureobasidium pullulans*. New Biotechnology, 32, S62.
- Yeğın, S. ve Büyükkilleci, A.O. 2015. Mikrobiyal ksilanazlar ve gıda endüstrisinde kullanım alanları. Akademik Gıda, 13(4), 317-326.

EKLER

EK 1 16S rRNA PCR Ürünlerinin Agoroz Jeldeki Görünümleri

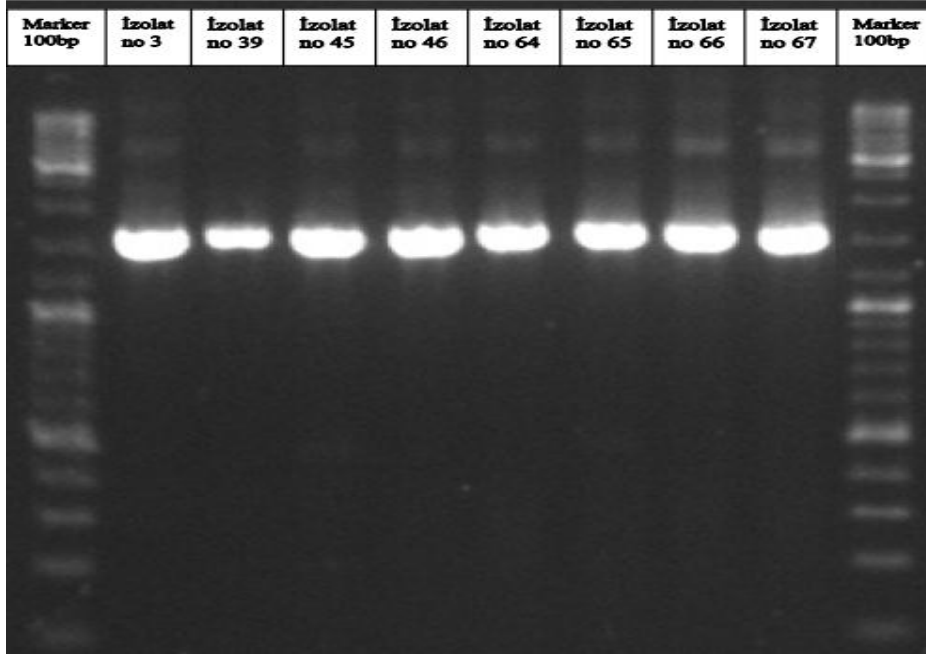
EK 2 Çalışmada İzole Edilen Bakteri Örneklerinin Baz Dizilimleri

EK 3 Çalışmada Kullanılan Gıda ve Tarımsal Atıkların Bileşimi

EK 4 39 Numaralı İzolata ait Farklı Oranlarda Gıda/Tarımsal Atık İlave Edilen Besiyerindeki Ksilanaz Aktivitesi Varyans Analizi ve Çoklu Karşılaştırma Sonuçlarının Çizelgeleri

EK 5 67 Numaralı İzolata ait Farklı Oranlarda Gıda/Tarımsal Atık İlave Edilen Besiyerindeki Ksilanaz Aktivitesi Varyans Analizi ve Çoklu Karşılaştırma Sonuçlarının Çizelgeleri

EK 1 16S rRNA PCR Ürünlerinin Agoroz Jeldeki Görünümleri



3, 39, 45, 46, 64, 65, 66 ve 67 nolu izolatlara ait 16S rRNA PCR Ürünlerinin Agoroz Jeldeki Görünümleri

EK 2 Çalışmada İzole Edilen Bakteri Örneklerinin Baz Dizilimleri

İzolat No:3

ATGGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGG
GAAACCGGGGCTAAAACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATA
AAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG
GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
GTACCGTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAAGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC
GGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTAAGTCTGATGTGA
AAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTG
CAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG
GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGC
TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAG
ATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTC
AGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTG
ATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG
GCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGG
TTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCG
ACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA
ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTA
CACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGA
CAGATGAATTGGGGGGAAGTCGTCC

İzolat No: 39

GGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGT
TAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGA
TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGGT
TCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGA
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG

GAAGAACAAGTACCGTTCTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAG
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAA
CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTG
ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAG
TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGAC
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA
ATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATG
GTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCC
GGTGACAAACCGAAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAA
CCGCGAGGTAAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCT
GCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC
CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAG
AGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCG
AAGGTGGGACAGATGATTGGGGGGAAGTCGTAACA

Ízolat No: 45

GGGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATG
TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGG
ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGG
TTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCG
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCG
ACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
GCAACGCCGCCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
GGAAGAACAAGTACCGTTCTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGT
CTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGGA
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCT
GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTA
GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAC
AATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCAT
GGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG

CAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGGCACTCTAAGGTGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT
ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAA
ACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTC
TGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGA
GAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCC
GAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTAAAGTCGTT

İzolat No: 46

ATGTCCGAAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCCCATGGTTCAAACATAAAA
GGGGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAATGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAAGGTG
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTA
CCGTTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAG
AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGA
GCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA
ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTGGAAG
CAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGAT
AGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG
CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATC
TTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTA
AGCCAATCCCACAAATCTGTTCCAGTTCGGATCGAAGTCTGCAACTCGAAT
GCGGGAAGCTGGAATCCCTAGTAACCGCGGAAAAGCATGCCCCGGGGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACA
CCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACA
GATGATTGGGGGGAAGTCGTAACAG

İzolat No: 64

ATACATGCAAGTCGAGCGGACCGACGGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGCGG
CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTC

CGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATC
ATAAAAGGTGGCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAG
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGA
ACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTG
AGTGCAGAAAAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACG
CTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCT
GCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCT
AGAGATAGGGCTTCCCTTCCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTGATCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC
CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCAGAACAAAGGGCAGCGAACCCGC
GAGGCTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTTTGCAA
CTCCACGGCTGGAAACTGAAACCCTAATTCCGGAAAAAAGGCCGCCGGGA
AAAATTTCCCGGC

İzolat No: 65

AATTGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACAT
AAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC
CTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
AGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGT
GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTG
AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGC
AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAAC

TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTA
AAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC
GTCACCTCCTGTCTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTT
TGATCTTAGTTGCCACCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC
AAACCGAAGAAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGA
GGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACT
CGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGT
AACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGG
GACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG

Ízolat No: 66

AAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT
AACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG
CTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTT
CGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA
ACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
AGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCG
AATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGG
CTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGG
AGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATGTGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAG
CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT
AAGCACTCCGCCTGCGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGT
CCCCTTCGGGGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTCATCTTAGTTGC
CAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACG
TGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAAT
CCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAA
GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAG
TCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGGATGAT
TGGGGTA

İzolat No: 67

AAAATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGC
GGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTGAACCGCATGGTTCAAACA
TAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCT
AGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
CCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAC
AAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCGAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT
CCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAGTTGAG
TGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTG
AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTG
CAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCT
AGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCACCTCGTGTCTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCG
AGGTAAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAAC
TCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGG
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTG
TAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTG
GGACAGATGATTGGGGTGAAGT

EK 3 Çalışmada Kullanılan Gıda ve Tarımsal Atıkların Bileşimi

Ksilanaz üretim besiyerine ilave edilen gıda ve tarımsal atıklarının bileşimi

Örnek Adı	Glikoz, %	Ksiloz, %	Ksilan, %	Arabinoz, %	ASL, %	AinSL, %	Kül, %	Nem, %
Elma Posası	23,07 ±8,63	15,53 ±5,78	13,67 ±5,09	6,62 ±2,69	1,72 ±0,02	14,29 ±0,39	1,63 ±0,44	4,50 ±0,91
Buğday Kepeği	44,72 ±1,41	15,38 ±0,12	13,53 ±0,11	7,57 ±0,20	4,85 ±0,02	6,74 ±0,30	1,90 ±0,60	7,72 ±0,85
Mısır Koçanı	35,03 ±1,04	34,16 ±0,10	30,06 ±0,09	3,56 ±0,35	3,65 ±0,19	12,60 ±0,35	2,12 ±0,49	4,39 ±0,59

¹Sonuçlar % kuru madde bazında Ort ± Standart sapma şeklinde verilmiştir.

²ASL: Asitte çözünen lignin, AinSL: Asitte çözünmeyen lignini ifade etmektedir.

³Ksilanın, ksilozdan hesaplanmasında çevirme faktörü 0,88 alınmıştır (Shen ve Wyman 2011).

⁴Nem, örneğin etüvde kurutulma ve ardından öğütmesi işlemleri sonrasında ölçülmüştür.

EK 4 39 Numaralı İzolata ait Farklı Oranlarda Gıda/Tarımsal Atık İlave Edilen Besiyerindeki Ksilanaz Aktivitesi Varyans Analizi ve Çoklu Karşılaştırma Sonuçlarının Çizelgeleri

Farklı oranlarda elma posası ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	DF	SS	MS	F	P
Besiyerindeki elma posası oranı	2	64,0089	32,0045	738,28	0,000
Hata	3	0,1301	0,0434		
Toplam	5	64,1390			

Farklı oranlarda elma posası ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının Tukey Testi sonucu

Besiyerindeki elma posası oranı	N	Mean	Grouping		
%2	2	7,5200	A		
%5	2	12,1550		B	
%7	2	4,1900			C

Farklı oranlarda buğday kepeği ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	DF	SS	MS	F	P
Besiyerindeki buğday kepeği oranı	2	16,2412	8,1206	121,81	0,001
Hata	3	0,2000	0,0667		
Toplam	5	16,4412			

Farklı oranlarda buğday kepeği ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının Tukey Testi sonucu

Besiyerindeki buğday kepeği oranı	N	Mean	Grouping		
%2	2	7,8200	A		
%5	2	9,8500		B	
%7	2	5,8200			C

Farklı oranlarda mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	DF	SS	MS	F	P
Besiyerindeki mısır koçanı oranı	2	13,5074	6,7537	561,25	0,000
Hata	3	0,0361	0,0120		
Toplam	5	13,5435			

Farklı oranlarda mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının Tukey Testi sonucu

Besiyerindeki mısır koçanı oranı	N	Mean	Grouping		
%2	2	6,5350	A		
%5	2	9,1200		B	
%7	2	5,5650			C

%2 oranında elma posası, buğday kepeği, mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	DF	SS	MS	F	P
Gıda/tarımsal atık türü	2	1,8076	0,9038	11,95	0,037
Hata	3	0,2268	0,0756		
Toplam	5	2,0345			

%2 oranında elma posası, buğday kepeği, mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının Tukey Testi sonucu

Gıda/tarımsal atık türü	N	Mean	Grouping		
Elma posası	2	7,5200	a	b	
Buğday kepeği	2	7,8200	a		
Mısır koçanı	2	6,5350		b	

%5 oranında elma posası, buğday kepeği, mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	DF	SS	MS	F	P
Gıda/tarımsal atık türü	2	10,0381	5,0191	148,71	0,001
Hata	3	0,1013	0,0338		
Toplam	5	10,1394			

%5 oranında elma posası, buğday kepeği, mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının Tukey Testi sonucu

Gıda/tarımsal atık türü	N	Mean	Grouping		
Elma posası	2	12,1550	a	b	
Buğday kepeği	2	9,8500	a		
Mısır koçanı	2	9,1200		b	

%7 oranında elma posası, buğday kepeği, mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	DF	SS	MS	F	P
Gıda/tarımsal atık türü	2	3,0750	1,5375	121,22	0,001
Hata	3	0,0381	0,0127		
Toplam	5	3,1131			

%7 oranında elma posası, buğday kepeği, mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının Tukey Testi sonucu

Gıda/tarımsal atık türü	N	Mean	Grouping		
Elma posası	2	4,1900	a		
Buğday kepeği	2	5,8200		b	
Mısır koçanı	2	5,5650		b	

EK 5 67 Numaralı İzolata ait Farklı Oranlarda Gıda/Tarımsal Atık İlave Edilen Besiyerindeki Ksilanaz Aktivitesi Varyans Analizi ve Çoklu Karşılaştırma Sonuçlarının Çizelgeleri

Farklı oranlarda elma posası ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	DF	SS	MS	F	P
Besiyerindeki elma posası oranı	2	64,09	32,05	14,84	0,028
Hata	3	6,48	2,16		
Toplam	5	70,57			

Farklı oranlarda elma posası ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının Tukey Testi sonucu

Besiyerindeki elma posası oranı	N	Mean	Grouping		
%2	2	8,520	A	B	
%5	2	12,260	A		
%7	2	4,260		B	

Farklı oranlarda buğday kepeği ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	DF	SS	MS	F	P
Besiyerindeki buğday kepeği oranı	2	19,098	9,549	67,49	0,003
Hata	3	0,424	0,141		
Toplam	5	19,522			

Farklı oranlarda buğday kepeği ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının Tukey Testi sonucu

Besiyerindeki buğday kepeği oranı	N	Mean	Grouping		
%2	2	7,8200	A		
%5	2	10,1850		B	
%7	2	5,8200			C

Farklı oranlarda mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	DF	SS	MS	F	P
Besiyerindeki mısır koçanı oranı	2	13,7230	6,8615	230,64	0,001
Hata	3	0,0893	0,0298		
Toplam	5	13,8123			

Farklı oranlarda mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının Tukey Testi sonucu

Besiyerindeki mısır koçanı oranı	N	Mean	Grouping		
%2	2	6,8700	A		
%5	2	9,2200		B	
%7	2	5,5650			C

%2 oranında elma posası, buğday kepeği, mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	DF	SS	MS	F	P
Gıda/tarımsal atık türü	2	2,74	1,37	0,61	0,598
Hata	3	6,71	2,24		
Toplam	5	9,45			

%2 oranında elma posası, buğday kepeği, mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının Tukey Testi sonucu

Gıda/tarımsal atık türü	N	Mean	Grouping		
Elma posası	2	8,520	a		
Buğday kepeği	2	7,820	a		
Mısır koçanı	2	6,870	a		

%5 oranında elma posası, buğday kepeği, mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	DF	SS	MS	F	P
Gıda/tarımsal atık türü	2	9,6523	4,8262	59,23	0,004
Hata	3	0,2444	0,0815		
Toplam	5	9,8968			

%5 oranında elma posası, buğday kepeği, mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının Tukey Testi sonucu

Gıda/tarımsal atık türü	N	Mean	Grouping		
Elma posası	2	12,2600	a		
Buğday kepeği	2	10,1850		b	
Mısır koçanı	2	9,2200		b	

%7 oranında elma posası, buğday kepeği, mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının varyans analizi

Varyasyon Kaynağı	DF	SS	MS	F	P
Gıda/tarımsal atık türü	2	2,8011	1,4006	110,42	0,002
Hata	3	0,0381	0,0127		
Toplam	5	2,8392			

%7 oranında elma posası, buğday kepeği, mısır koçanı ilave edilen besiyerindeki ksilanaz aktivitesi sonuçlarının Tukey Testi sonucu

Gıda/tarımsal atık türü	N	Mean	Grouping		
Elma posası	2	4,2600	a		
Buğday kepeği	2	5,8200		b	
Mısır koçanı	2	5,5650		b	

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatma GÜLER
Doğum Yeri : Meriç/Edirne
Doğum Tarihi : 1989
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :Edirne Lisesi (2003-2007)
Lisans :Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2007-2012)
Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2012-2014)
Doktora :Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2015-2020)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Araştırma Görevlisi :Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2014-2016)
Araştırma Görevlisi :Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2016-2020)

Yayınlar (SCI)

Semerci, N.I. and **Güler, F.** 2018. Protic ionic liquid as effective agents for pretreatment of cotton stalks at high biomass loading. *Industrial Crops and Products*, 125, 588-595.

Aronsson, A., **Güler, F.**, Petoukhov, M.V., Crennell, S.J., Svergun, D.I., Linares-Pastén, J.A. and Nordberg Karlsson, E. 2018. Structural insights of Rmxyn10A – A prebiotic-producing GH10 xylanase with a non-conserved aglycone binding region. *BBA- Proteins and Proteomics*, 1866(2018), 292-306.

Uluslararası Hakemli Dergiler

Semerci, N.I. and **Güler, F.** 2019. Pretreatment of crop wastes from edible biomass with a protic ionic liquid. *International Journal of Renewable Energy Research*, 9(1), 17-23.

Semerci, I., **Guler, F.**, Ersan, G., Soysal, K., Ozturk, O., Altinisik, H., Tirpan, S., Ozcelik, F. 2019. Assessment of a protic ionic liquid with respect to fractionation and changes in the structural features of hardwood and softwood. *Bioresource Technology Reports*, 100334.

Ulusal Hakemli Dergiler

Güler, F. and Özçelik, F. 2017. An adaptation strategy to improve the proteolytic activities of Lactic Acid Bacteria isolated from pickles. *Gıda*, 42(5), 561-567.

Uluslararası Kongre Sunum

Güler, F. and Özçelik, F. 2014. Production of lyophilized starter culture in industry: Factors affecting cell viability. 2nd International Congress on Food Technology, 05-07 November, 165, Kuşadası, Turkey (Özet metin bildiri, poster).

Güler, F., Bağder Elmacı S. and Özçelik, F. 2014. Proteolytic system of Lactic Acid Bacteria. 2nd International Congress on Food Technology, 05-07 Kasım, 166, Kuşadası, Türkiye (Özet metin bildiri, poster).

Sağlamtaş, M., Elmacı-Bagder, S., **Güler, F.** and Özçelik, F. 2018. Determination of antimicrobial activity of Lactic Acid Bacteria isolated from a traditional cheese 'Surk'. 3rd International Congress on Food Technology, 10-12 October, Nevşehir, Türkiye (Özet metin bildiri, poster).

Öztürk, S., **Güler, F.**, Bağder Elmacı S. and Özçelik, F. 2018. A research on the production of vinegar from black carrot. 3rd International Congress on Food Technology, 10-12 October, Nevşehir, Türkiye (Özet metin bildiri, poster).

Semerci, I. and **Güler F.** 2018. Utilisation of protic ionic liquids for levulinic acid production from biomass. 7th International Symposium on Energy from Biomass and Waste, 15-18 October, Venice, Italy (Tam metin bildiri, poster).

Güler, F. and Özçelik, F. 2018. Determination of xylanase activity of indigenous *Bacillus* species isolated from food and agricultural wastes. 7th International Symposium on Energy from Biomass and Waste, 15-18 October, Venice, Italy (Tam metin bildiri, poster).

Semerci, I. and **Güler, F.** 2018. Utilization of ionic liquids as effective pretreatment reagents to produce fuels and chemicals from biomass. International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology, 22-23 November, 146, Ankara, Turkey (Özet metin bildiri, sözlü).

Ulusal Kongre Sunum

Güler, F., Bağder-Elmacı, S. and Özçelik, F. 2016. Mikrobiyal enzim üretiminde derin kültür tekniği smf ile katı faz tekniğinin ssf karşılaştırılması. Türkiye 12. Gıda Kongresi, 05-07 Ekim, 513, Edirne, Türkiye (Özet metin bildiri, poster).

Güler, F. and Özçelik, F. 2016. Mikrobiyal pigment üretimi fikosiyanın. Türkiye 12. Gıda Kongresi, 05-07 Ekim, 514, Edirne, Türkiye (Özet metin bildiri, poster).