

AUREOBASIDIUM PULLULANS İLE KSİLANAZ ÜRETİMİNE ETKİ EDEN BİYOPROSES PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ

Sırma Yeğın*

Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir, Türkiye

Geliş tarihi / Received: 05.05.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 19.06.2016

Kabul tarihi / Accepted: 22.06.2016

Özet

Ksilanazlar, gıda ve yem sektörlerinde çok yaygın olarak kullanılan enzimler arasındadır. Bu çalışmada, farklı *Aureobasidium pullulans* suşları ksilanaz üretimleri açısından taranmış ve ilgili suşlar arasında en yüksek enzim üretimi *A. pullulans* Y-2311-1 suşu ile elde edilmiştir. Söz konusu suş ile ksilanaz üretimi üzerine etkisi olan parametreler ve bu parametrelerin optimum değerleri belirlenmiştir. Maksimum enzim üretimi biyoprosesin dördüncü gününde elde edilmiştir. Enzim üretimi için optimum sıcaklık, başlangıç ortam pH'sı ve karıştırma hızı sırasıyla 28°C, pH 3.0 ve 200 rpm olarak belirlenmiştir. Enzim üretimi için en uygun azot kaynağı olarak maya ekstraktı tespit edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen enzim aktivitesi değeri 252.78 ± 23.08 U/ml'dir.

Anahtar kelimeler: Ksilanaz, *Aureobasidium pullulans*, biyoproses

DETERMINATION OF THE BIOPROCESS PARAMETERS EFFECTING XYLANASE PRODUCTION BY AUREOBASIDIUM PULLULANS

Abstract

Xylanases are one of the leading enzymes within the enzymes used in food and feed industries. In this work, different *Aureobasidium pullulans* strains have been screened for their ability to produce xylanase and *A. pullulans* Y-2311-1 was found to be the best strain for xylanase production within the strains tested. Effects of different cultivation parameters on xylanase production by this strain have further been evaluated. Maximum enzyme production was obtained at the fourth day of the bioprocess. The optimum levels of incubation temperature, initial medium pH and agitation speed were found as 28°C, pH 3.0 and 200 rpm, respectively. Yeast extract was determined as the most appropriate nitrogen source for xylanase production. Under optimized conditions the enzyme activity reached to 252.78 ± 23.08 U/ml.

Keywords: Xylanase, *Aureobasidium pullulans*, bioprocess

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ sirma.yegin@ege.edu.tr,

© (+90) 232 311 1921,

☎ (+90) 232 342 7592

GİRİŞ

Ksilan bitki hücre duvarının yapısında bulunan ve bir heteropolisakkarit olan hemselülozun temel bileşenidir. Ksilan temel zinciri birbirlerine β -1,4-glikosidik bağlarıyla bağlı beş karbonlu bir şeker olan D-ksiloz ünitelerinden oluşmaktadır. Söz konusu yapıda temel zincire bağlı çok sayıda yan zincir bulunmaktadır. Yan zincirde L-arabinofuranoz, D-glukuronik asit, 4-O-metil-D-glukuronik asit uniteleri ve asetil grupları yer alabilmektedir (1). Çok karmaşık bir yapıya sahip olması nedeniyle ksilanın tam olarak hidrolizi çok sayıda enzimin birlikte çalışmasını gerektirmektedir. Bu enzimlerden endo- β -1,4-ksilanaz (EC.3.2.1.8), ksilan temel zincirini rastgele olarak parçalayarak ksilooligosakkarit oluştururken β -ksilosidaz (EC.3.2.1.37) ise ksilooligosakkaritlerin ve ksilobiyozun indirgen olmayan uçlarına etki ederek ksiloz oluşturur. Bu temel iki enzim dışında, 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 esteraz (EC.3.1.1.-) ise temel zincire bağlı yan grupların hidrolizinde etkilidir (2). Bu enzimler içinde endo- β -1,4-ksilanazlar temel zincire etki eden en önemli enzimlerdir. Genel olarak ksilanaz enzimi ifadesi kullanıldığında endo- β -1,4-ksilanazlardan söz edilmektedir.

Ksilanaz enziminin üretimi, saflaştırılması ve uygulamaları konusunda çok fazla çalışma gerçekleştirilmiştir (3). Bunun temel nedeni ksilanazların çok yaygın kullanım alanlarına sahip olmasıdır. Başta kâğıt endüstrisi olmak üzere, gıda, yem, tekstil ve ilaç gibi pek çok sektörde kullanılmaktadırlar (4). Ksilanazlar, gıda endüstrisinde en yaygın olarak fırın ürünleri formülasyonunda kullanılmaktadırlar. Ksilanazların özellikle ekmek formülasyonunda kullanılmasıyla nişasta dışında kalan diğer polisakkaritlerin (arabinoksilan) hidrolizine bağlı olarak hamurun reolojik özelliklerinde ve ekmek içi yapısında iyileşme gözlenirken ekmeğin spesifik hacminde artış sağlanabilmektedir. Meyve suyu sektöründe de ksilanazlar pektinazlarla birlikte berraklaştırma amaçlı kullanılmaktadırlar. Meyve suyundaki çözünmeyen polisakkaritlerin hidrolizi ile indirgen şeker miktarında artış sağlamaktadırlar. Böylelikle meyve suyunun filtrasyonu işlemi kolaylaşmakta ve verimde artış elde edilmektedir (3). Ksilanazlar, bira üretiminde arpanın yapısında bulunan uzun

zincirli arabinoksilanların parçalanmasına olanak sağlayarak arpanın hidrolize olmasını kolaylaştırmaktadırlar. Böylelikle vizkoziteyi düşürerek bulanıklığın azaltılmasına da katkıda bulunmaktadırlar (4). Ksilanazların büyük ölçüde kullanıldığı diğer bir alan da yem sektörüdür. Ksilanaz preparatları kanatlı yem katkısı olarak kullanılmaktadır. Etlik piliç üretiminde kullanılan tahıl bazlı yemlerin yapısında bulunan arabinoksilan antibesinsel faktör olarak kabul edilmektedir. Çünkü arabinoksilanın su tutma kapasitesi yüksek olup bağırsak viskozitesini arttırabilmektedir. Bu durumda çeşitli besinsel maddelerin emilimi azalmakta ve verilen besine oranla gerçekleşen ağırlık artışı daha az olmaktadır. Ksilanazların yem formülasyonuna eklenmesiyle birlikte su tutma kapasitesi yüksek olan polisakkaritler hidrolize edilerek bu sorunların büyük ölçüde ortadan kaldırılması mümkün olabilmektedir (3, 4). Diğer taraftan ksilanazlar; ksiloz, ksilo-oligomerler ve yapay bir tatlandırıcı olan ksilitol üretiminde de kullanılmaktadır. Ksilooligosakkaritler prebiyotik özellik göstermekte olup gıda, yem ve ilaç gibi endüstrilerde kullanım alanı bulmaktadırlar (5).

Ticari olarak ksilanaz üretimi mikrobiyal biyoprosesler yoluyla gerçekleştirilmektedir. Endüstriyel ksilanaz üretimi çoğunlukla *Aspergillus* sp. ve *Trichoderma* sp. suşlarına ait küfler ile gerçekleştirilmiştir. Ticari bakteri kaynaklı ksilanazlar da mevcut olup çoğunlukla *Bacillus* sp. suşları tarafından üretilmişlerdir (6). Genellikle küf kaynaklı ksilanazlar asidik karakterde olup gıda endüstrisi için daha uygundur. Bakteri kaynaklı ksilanazlar ise alkali karakter sergilemektedirler (7). Küfler yüksek enzim sentezleme kapasitesine sahip olmalarına rağmen söz konusu mikroorganizma grubu ile çalışılması morfolojilerinin yarattığı problemler nedeniyle bakterilere kıyasla daha zordur. Bu çalışmada polimorfik bir küf olan *Aureobasidium pullulans* ile ksilanaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Söz konusu mikroorganizmanın maya benzeri morfoloji sergilemesi büyük bir avantajdır. Çalışma kapsamında farklı *A. pullulans* suşları ksilanaz üretimi açısından karşılaştırılmış, en yüksek düzeyde üretim sağlayan suş belirlenmiştir. Sonrasında bu suş ile ksilanaz üretimi üzerine etkili olan parametrelerin optimum düzeyleri tespit edilmiştir. Optimum koşullar belirlendikten sonra bu koşullarda gerçekleştirilen üretime ait biyoproses profili elde edilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Mikrobiyal besin ortamı bileşenlerinden maya-azot bazı (yeast-nitrogen base) Difco Firması'ndan (BD Detroit, Amerika Birleşik Devletleri), ksilan (kayın ağacı ksilanı) BOC Science Firması'ndan (Shirley, Amerika Birleşik Devletleri) temin edilmiştir. Diğer tüm kimyasal malzemeler analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) ve AppliChem (Darmstadt, Almanya) Firmaları'ndan temin edilmiştir.

Mikroorganizmalar ve kültür koşulları

A. pullulans DSM 2404 Alman Kültür Koleksiyonu'ndan (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 ve *A. pullulans* NRRL Y12,974 Amerikan Zirai Araştırma Servisi'nden (US Department of Agricultural Service) temin edilmiştir. *A. pullulans* P56 ise Prof. Dr. Triantafyllos Roukas (Aristotle Üniversitesi/Selanik-Yunanistan) tarafından sağlanmıştır.

A. pullulans DSM 2404 ve *A. pullulans* P56 PDA (Potato Dextrose Agar) ortamı üzerinde, *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 ve *A. pullulans* NRRL Y12,974 ise YM (Yeast Mold Media) ortamı üzerinde 4°C 'de saklanmıştır. Kültürler 3 haftada bir taze besi ortamına ekim yapılarak 25°C' de 3 gün geliştirilmiştir. YM ortamı bileşimi (g/L): maya ekstraktı 3, malt ekstraktı 3, pepton 5, glikoz 10 ve agar 20 şeklindedir.

Ksilanaz üretimi açısından farklı *A. pullulans* suşlarının değerlendirilmesi

Çalışmada 4 farklı *A. pullulans* suşu ksilanaz üretimleri açısından test edilmiştir. Söz konusu suşlar hem ksiloz hem de ksilan içeren sentetik üretim ortamlarında pH 5.0'da test edilmiştir. Çalışmada kullanılan besin ortamlarının bileşimi aşağıda verilmiştir (8).

Aşı kültürü bileşimi (g/L): Ksiloz 10, maya-azot bazı (yeast nitrogen base) 6.7, asparajin 2.0, KH₂PO₄ 5.0 (pH 5.0)

Üretim ortamı bileşimi (g/L): Ksiloz veya ksilan (kayın ağacı ksilanı) 10, maya ekstraktı 1.0, (NH₄)₂SO₄ 2.5, KH₂PO₄ 5.0 (pH 5.0)

Ortamlarının pH'sı HCl ve NaOH kullanılarak ayarlanmıştır.

Söz konusu mikroorganizmalar her üretim öncesinde uygun besin ortamında (PDA veya

YM) 25°C' de 3 gün süreyle geliştirildikten sonra, kültürlerden yukarıda bileşimi belirtilen 50 ml'lik aşı ortamına (250 ml'lik erlenlerde) 2 öze dolusu ekim yapılmıştır. Aşı kültürü 28°C' de, 150 rpm çalkalama hızında 24 h süreyle inkübe edilmiştir. 24 h sonrasında aşı kültürü'nden üretim ortamına % 2 oranında ekim yapılmıştır. Üretim ortamları da 250 ml'lik erlenler içinde 50 ml ortam olacak şekilde hazırlanmıştır. Enzim üretimi 28°C'de, 150 rpm çalkalama hızında 7 gün süreyle gerçekleştirilmiş ve üretim ortamlarından her gün örnek (600 µl) alınmıştır. Fermantasyon ortamından alınan örnekler, 21500g değerinde 4°C' de ve 15 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutulmuş, üst faz alınarak enzim aktivitesi tayini yapılmıştır.

Ksilanaz üretimine etki eden biyoproses parametrelerinin belirlenmesi

Biyoproses parametrelerinden; başlangıç ortam pH'sı, ortam sıcaklığı, karıştırma hızı ve farklı azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Üretim ortamı olarak ksilan içeren besin ortamı kullanılmıştır.

Farklı azot kaynaklarının ksilanaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda maya ekstraktı, mısır ıslatma suyu, pepton, tripton ve üre kullanılmıştır. Gerçekleştirilen denemelerde maya ekstraktının yerine alternatif olarak denenen azot kaynakları temel formülasyonda bulunan 1 g/L maya ekstraktı ile eşit azot temelinde kullanılmıştır. Bu amaçla azot oranları bilinen söz konusu maddelerin 1 g/L maya ekstraktının içeriğindeki azot miktarına denk oranda azot içeren miktarları ortam formülasyonunda kullanılmıştır (Çizelge 1).

Ksilanaz aktivitesi tayini

Ksilanaz aktivitesi dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile belirlenmiştir (9). Substrat olarak kayın ağacından (beechwood) elde edilen ksilan kullanılarak sitrat tamponu (50 mM, pH 5.2) içerisinde % 0.5' lik (w/v) çözeltisi hazırlanmıştır. 900 µl substrat ve 100 µl enzim örneği bir test tüpü içerisinde karıştırılmış ve su banyosunda 50°C' de, 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında karışım üzerine 1.5 ml DNS çözeltisi ilave edilerek karıştırılıp kaynamakta olan su banyosunda 5 dakika bekletildikten sonra 1 dakika soğuk suda bekletilerek hızla soğutulmuştur. Sonrasında örneklerin 540 nm'deki absorpsiyon değerleri spektrofotometre kullanılarak

Çizelge 1. Enzim üretiminde kullanılan azot kaynakları
Table 1. The nitrogen source utilized in enzyme production

Azot kaynağı Nitrogen source	Azot Nitrogen (%)	Ortama ilave edilen miktar The amount added into the medium formulation (g/L)
Maya ekstraktı Yeast extract	11.0	1.0
Mısır ıslatma suyu Corn steep liquor	6.44	1.71
Pepton Peptone	9.0	1.22
Tripton Tryptone	13.0	0.85
Üre Urea	46.67	0.24

kaydedilmiştir. Söz konusu her bir örneğe spesifik bir de kör deneme yapılmıştır. Kör deneme için enzim örneği, DNS çözeltisinin ilavesinden sonra eklenmiş olup bunun dışında örnek için uygulanan prosedür aynı şekilde izlenmiştir. Söz konusu enzim örnekleri 540 nm'de yaklaşık 0.6-0.7 arasında bir absorbans verecek şekilde sitrat tamponu (50 mM, pH 5.2) kullanılarak seyreltilmişlerdir.

Standart grafiğin hazırlanması için 2 mg/mL konsantrasyonunda stok ksiloz çözeltisi sitrat tamponu içerisinde (50 mM, pH 5.2) hazırlanmıştır. Söz konusu stok çözeltiden 0-75 µg ksiloz içeren çözeltiler seyreltme yoluyla elde edilerek örnek için yukarıda ifade edilen prosedür izlenmiş ve elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik oluşturulmuştur. Standart grafik kullanılarak enzim etkisi sonucu ortaya çıkan indirgen şeker miktarı serbest ksiloz cinsinden bulunmuştur. Enzim aktivite birimi (U/ml); belirtilen koşullarda (50°C ve pH 5.2) bir dakikada 1 µmol ksiloza eşdeğer gelen indirgen şekerleri serbest hale geçiren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Örneklere ait enzim aktivitesi aşağıda belirtilen denklem ile hesaplanmıştır.

$$\text{Aktivite (U/ml)} = (X/150.13) * (1/5) * (1/0.1) * \text{SF} \quad (\text{Denklem 1})$$

X: µg ksiloz (Standartlar ile hazırlanan grafikten elde edilmiştir)

SF: Seyreltme faktörü

Protein tayini

Protein tayini Bradford metodu ile "Coomassie Plus™ Protein Assay Kit" (Pierce, Fischer Scientific, Schwerte, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Standart olarak BSA (Bovine serum albumin) kullanılmıştır.

Biyokütle tayini

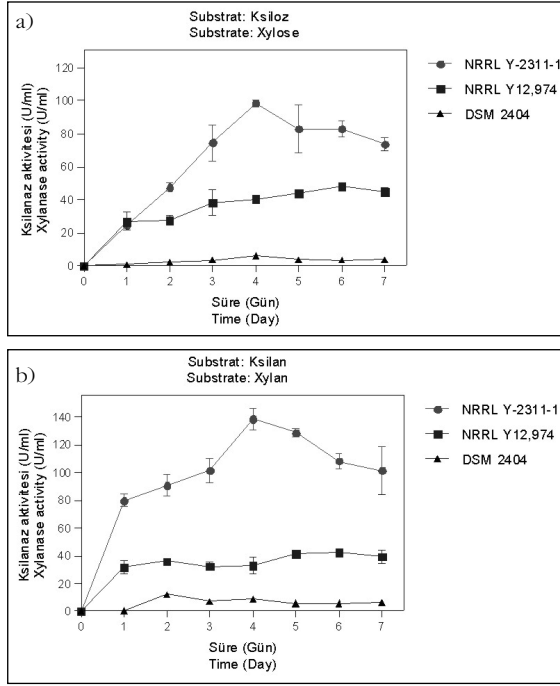
Fermantasyon ortamından alınan örnekler, 21500g değerinde 4°C' de ve 15 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve biyokütle fermantasyon sıvısından ayrılarak 80°C'de sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Farklı *A. pullulans* suşlarının ksilanaz üretimi açısından taranması

Çalışmada 4 farklı *A. pullulans* suşu ksilanaz üretimleri açısından test edilmiştir. Söz konusu suşlardan, *A. pullulans* DSM 2404 siyah pigment üreten, *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 ve *A. pullulans* NRRL Y12,974 ise renkli pigment üreten suşlardır. *A. pullulans* P56 ise ultraviyole (UV) mutasyon ile elde edilmiş pigment üretimi zayıflatılmış bir suştur. Şekil 1a ve Şekil 1b 'de görüldüğü gibi, tüm suşlar için en yüksek enzim aktivitesi ksilan içeren üretim ortamlarında elde edilmiştir. İncelenen suşlar içerisinde en yüksek aktiviteyi *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 sağlamıştır. *A. pullulans* P56 ile gerçekleştirilen üretimlerde ise ksilanaz aktivitesi tespit edilmemiştir. Bu nedenle çalışmanın bundan sonraki kısmında *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 suşunun kullanılmasına karar verilmiştir.

A. pullulans NRRL Y-2311-1 için en yüksek aktivite her iki substrat için de biyoprosesin dördüncü gününde gözlenirken, *A. pullulans* NRRL Y12,974 için ise biyoprosesin üçüncü gününden itibaren enzim aktivite değerlerinde çok fazla bir değişikliğin olmadığı görülmektedir. *A. pullulans* DSM 2404 ksiloz kullanıldığında en yüksek enzim aktivitesi değerine biyoprosesin dördüncü gününde ulaşılırken ksilan kullanıldığında ise biyoprosesin ikinci gününde ulaşmıştır. Biyoproses



Şekil 1. Farklı *A. pullulans* suşları ile gerçekleştirilen ksilanaz üretimlerinin kinetiği: a) Substrat: ksiloz, 28 °C, 150 rpm ve pH 5.0; b) Substrat: ksilan, 28 °C, 150 rpm ve pH 5.0
Figure 1. Kinetics of xylanase production with different *A. pullulans* strains a) Substrate: xylose, 28 °C, 150 rpm and pH 5.0; b) Substrate: xylan, 28 °C, 150 rpm and pH 5.0

süresi arttıkça enzim sentezinde gözlenen düşüşün, ortamda bulunan ve mikrobiyel fizyoloji üzerinde etkisi bulunan makro ve mikro besin elementlerinin azalmasına bağlı olabileceği belirtilmiştir. Söz konusu besin elementlerinin miktarlarındaki azalmanın, enzimin sentezlenme metabolizmasında inaktivasyona sebep olması mümkündür (10).

Leathers (11) tarafından yapılan bir suş tarama çalışmasında da taranan suşlar içerisinde en yüksek ksilanaz aktivitesini *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 suşunun gösterdiği belirtilmiştir. Mevcut çalışmada bu çalışmadan farklı olan *A. pullulans* suşları da incelenmiştir ancak taranan suşlar içinde en yüksek aktiviteyi yine *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 sağlamıştır. Başka bir çalışmada farklı karbon kaynaklarının siyah pigment üreten *A. pullulans* ATCC 20524 ile ksilanaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Söz konusu çalışmada karbon kaynağı olarak ksiloz kullanıldığında ksilanaz üretimi gerçekleşmezken ksilan kullanıldığında biyoprosesin beşinci gününde maksimum ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir (12).

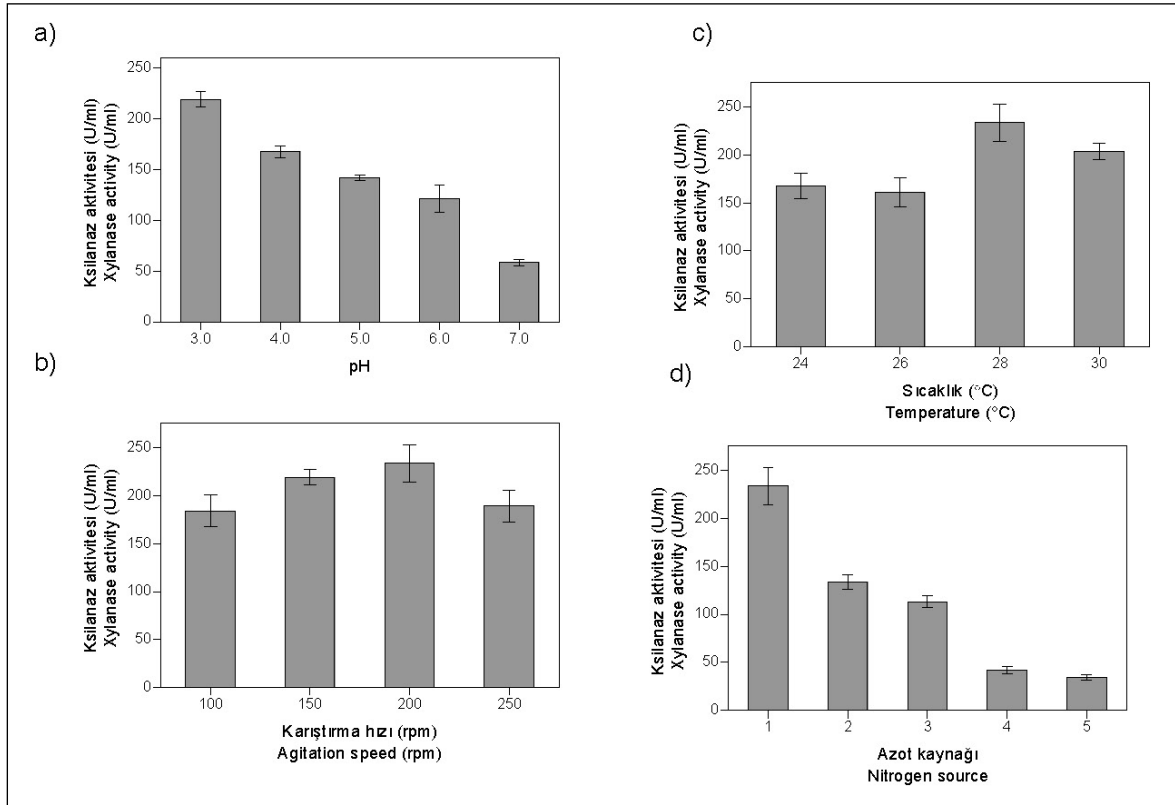
Başlangıç ortam pH'sının ksilanaz üretimi üzerine etkisi

Ksilanaz üretimini önemli ölçüde etkileyen biyoproses parametrelerinden biri ortam pH'sıdır. Başlangıç ortam pH'sının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda en yüksek enzim aktivitesi ortam pH'sı 3.0 (219.01 ± 7.91 U/ml) olduğunda gözlenmiştir (Şekil 2a). pH değeri arttıkça enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir.

Pek çok küf ve bakteri ile ksilanaz üretiminin gerçekleştirildiği önceki çalışmalar incelendiğinde ksilanaz üretiminin ortam pH'sına bağlı olarak önemli değişiklikler gösterdiği görülebilmektedir (13). *Penicillium sclerotiorum* ile saf yulaf ksilanı kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada en yüksek ksilanaz aktivitesi başlangıç ortam pH'sı 6.5 olduğunda elde edilmiştir (14). *Aspergillus foetidus* ile saf huş ağacı ksilanı kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada ise pH 5.0 ile biyoprosese başlandığında ksilanaz üretiminde önemli ölçüde artış olduğu ifade edilmiştir (15). *Bacillus altitudinis* DHN8 ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada başlangıç ortam pH'sı 7.0 olduğunda en yüksek ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir (16). Sonuç olarak; ksilanaz üretimi için optimum pH değeri kullanılan mikroorganizmaya ve kullanılan üretim ortamı kompozisyonuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Üzerinde önemle durulması gereken bir diğer konu da ortam pH'sının çalışılan mikroorganizmanın lignoselülozik yapıda bulunan ksilanın erişebilirliğini ve kullanılabilirliğini önemli ölçüde etkilediğidir. Bu durum özellikle üretim ortamı formülasyonlarında kompleks lignoselülozik substratlar kullanıldığında geçerlidir.

Karıştırma hızının ksilanaz üretimi üzerine etkisi

Karıştırma hızının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi için farklı karıştırma hızları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, en yüksek enzim aktivitesi değeri çalkalama hızı 200 rpm olduğunda gözlenmiştir (233.40 ± 19.22 U/ml). 200 rpm' in üzerindeki çalkalama hızı değerlerinde enzim aktivitesi değerinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 2b). Farklı mikroorganizmalarla gerçekleştirilen pek çok çalışmada maksimum ksilanaz aktivitesi karıştırma hızının 200 ila 250 rpm arasında olduğu değerlerde elde edilmiştir (13, 16,17).



Şekil 2. a) Başlangıç ortam pH'sının enzim üretimi üzerine etkisi (28°C, 150 rpm, 96 h); b) Karıştırma hızının enzim üretimi üzerine etkisi (28°C, pH 3.0, 96 h); c) Sıcaklığın enzim üretimi üzerine etkisi (200 rpm, pH 3.0, 96 h); d) Farklı azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi (pH 3.0, 28°C, 200 rpm, 96 h, 1: Maya ekstraktı, 2: Mısır ıslatma suyu, 3: Pepton, 4: Tripton, 5: Üre)

Figure 2. a) Effect of initial medium pH on enzyme production (28°C, 150 rpm, 96 h); b) Effect of agitation speed on enzyme production (28°C, pH 3.0, 96 h); c) Effect of temperature on enzyme production (200 rpm, pH 3.0, 96 h); d) Effect of different nitrogen source on enzyme production (pH 3.0, 28°C, 200 rpm, 96 h, 1: Yeast extract, 2: Corn steep liquor, 3: Peptone, 4: Tryptone, 5: Urea)

Ortam sıcaklığının ksilanaz üretimi üzerine etkisi

Ortam sıcaklığı çalışılan mikroorganizmanın büyüme ve gelişimi için önemli olduğu kadar metabolit üretimi için de kritik bir parametredir. Bu doğrultuda, maksimum düzeyde enzim üretiminin gerçekleştiği ortam sıcaklığının belirlenmesi için 24°C, 26°C, 28°C ve 30°C olmak üzere dört farklı sıcaklık değerinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Şekil 2c'de görüldüğü gibi 24°C ve 26°C' de benzer aktivite değerleri elde edilirken, maksimum aktivite 28°C' de (233.40 ± 19.22 U/ml) elde edilmiştir. 30°C'de ise enzim aktivitesinde (203.42 ± 8.48 U/ml) kısmi bir düşüş söz konusu olmuştur. Enzim üretimi sırasında yüksek biyoproses sıcaklıklarıyla indüklenen fizyolojik değişiklikler tam olarak anlaşılmasına rağmen yüksek sıcaklık değerlerinde mikroorganizmaların daha az sayıda, büyüme-gelişme ve diğer fizyolojik

prosesler için gerekli olan proteinleri öncelikli olarak sentezledikleri belirtilmiştir (18). Yüksek sıcaklıklarda, mikroorganizmaların fizyolojik prosesler için ihtiyaç duydukları proteinlerin sentezlenmesine öncelik vermeleri nedeniyle sıcaklık arttıkça ksilanaz üretiminde düşüş meydana gelmesi mümkündür.

Farklı azot kaynaklarının ksilanaz üretimi üzerine etkisi

Genel olarak hızlı metabolize edilebilir azot kaynakları enzim üretimini baskılamaktadır. Diğer taraftan çok kompleks azot kaynaklarının ortam formülasyonunda kullanımı da yapılarında bulunan safsızlıklar nedeniyle enzim üretiminde azalmaya ve/veya enzim inhibisyonuna sebep olabilmektedir (19). Çalışmada farklı azot kaynaklarının ksilanaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla maya ekstraktı, mısır ıslatma suyu, pepton, tripton ve üre kullanılmıştır. Şekil 2d'de görüldüğü gibi

en yüksek düzeyde enzim aktivitesi (233.40 ± 19.22 U/ml) azot kaynağı olarak maya ekstraktı kullanıldığında elde edilmiştir. Pepton, tripton ve üre gibi kısmen daha kolay hidrolize olabilen azot kaynakları kullanıldığında enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Çalışma sonuçlarına paralel olarak ksilanaz üretimi üzerine etkisi incelenen azot kaynakları arasında en yüksek ksilanaz aktivitesinin maya ekstraktı kullanıldığında elde edildiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. *Thermomyces lanuginosus* SDYKY-1 (20), mutant *Thermomyces lanuginosus* MC 134 (21) ve *Schizopyllum commune* (22) suşlarının kullanıldığı çalışmalar bu duruma örnek olarak verilebilir.

Optimum koşullarda gerçekleştirilen biyoprosesin profili

Ksilanaz üretimine etki eden biyoproses parametrelerinin belirlenmesinin sonrasında optimum koşullarda (başlangıç ortam pH'sı: 3.0; karıştırma hızı: 200 rpm; sıcaklık: 28°C; azot kaynağı: maya ekstraktı) gerçekleştirilen enzim üretiminin kinetiği belirlenmiştir. 24 saat aralıklarla alınan örneklerde ksilanaz aktivitesi ve toplam protein analizleri yapılmış ve biyokütle miktarı belirlenmiştir. Çizelge 2'de görüldüğü üzere, maksimum ksilanaz aktivitesi (252.78 ± 23.08 U/ml) ve spesifik aktivite (7122.57 U/mg) biyoprosesin dördüncü gününde elde edilmiştir. Toplam protein miktarı 25.03 ± 1.31 µg/ml ila 36.95 ± 0.84 µg/ml arasında değişmiştir. Biyoproses süresi boyunca spesifik aktivite değerlerinin izlediği eğilim, ksilanaz aktivitesi değerinin izlediği eğilim ile yaklaşık olarak paralellik göstermektedir. Diğer taraftan biyokütle miktarının ilk günden sonra enzim üretiminin maksimum olduğu dördüncü güne kadar azalma gösterdiği sonrasında da sabit kaldığı görülmektedir. Fungal ksilanaz üretiminin logaritmik büyüme evresinin sonunda başladığı ve durağan faz evresi ve sonrasında maksimuma ulaştığı belirtilmiştir

(23). Benzer durumun bazı bakteriyel ksilanazlar için de geçerli olduğu çalışmalar mevcuttur. Ho (24) tarafından *Bacillus subtilis* ile farklı üretim ortamı formülasyonlarında ksilanaz üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada enzim üretiminin durağan fazın sonunda başladığı gösterilmiştir. Leathers (11) tarafından *A. pullulans* Y-2311-1 ile ksilanaz üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada da üretimin ilk 30 saati sonrasında biyokütle düzeyinin azaldığı sonrasında sabit kaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada maksimum ksilanaz üretimi biyoprosesin 70. saatinde elde edilmiştir. *A. pullulans* suşları ile pullulan üretimi ile ilgili olarak mikroorganizmanın azot limitasyonuna maruz kalması durumunda karbon kaynağının biyokütle üretimi yerine metabolit üretiminde kullandığı belirtilmiştir (25). Benzer şekilde *A. pullulans* suşları ile ksilanaz üretimi sırasında biyoprosesin başlangıcında (ilk 24 saat) azot kaynağının hızlı bir şekilde biyokütle oluşumunda kullanılması ve azot kaynağının azalmasının ardından karbon kaynağının ksilanaz üretiminde kullanılması olasıdır. *Bacillus circulans* (26) ve *Rhizopus oryzae* (27) ile ksilanaz üretiminin gerçekleştirildiği çalışmalarda da biyoprosesin ilerleyen sürelerinde ksilanaz üretiminde artış gözlenirken biyokütle miktarında azalma tespit edilmiştir. Diğer taraftan ortam pH'sı da enzim ve biyokütle üretimi açısından kritik bir faktördür. Mikrobiyal büyümenin limitasyona uğradığı pH değerlerinde ksilanaz üretiminin artış gösterdiği belirtilmiştir (23). Biyoproses profili incelendiğinde pH değerinin ilk 24 h sonunda başlangıç pH'sının (pH 3.0) altına düştüğü ve sonrasında çok az artışlarla pH 2.60 değerinde biyoprosesin tamamlandığı görülmektedir. *Aspergillus fumigatus* ile ksilanaz üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada pH değerinin biyoprosesin ilerleyen aşamalarında 3.0'ın altına düşmesi ile ksilanaz üretiminde artış gözlemlendiği ifade edilmiştir (28).

Çizelge 2. Optimum koşullarda elde edilen biyoproses profili
Table 2. Bioprocess profile at optimum conditions

Süre (gün) Time (day)	Ksilanaz aktivitesi Xylanase activity (U/mL)	Protein (µg/mL)	Spesifik aktivite Specific activity (U/mg)	Biyokütle Biomass (g/L)	Ortam pH'sı Medium pH
1	123.22 ± 11.77	25.03 ± 1.31	4922.89	5.46 ± 0.06	2.42 ± 0.01
2	198.08 ± 12.36	32.02 ± 0.98	6186.13	4.65 ± 0.30	2.46 ± 0.01
3	233.29 ± 14.84	33.21 ± 2.95	7024.69	3.95 ± 0.07	2.46 ± 0.01
4	252.78 ± 23.08	35.50 ± 3.09	7122.57	3.55 ± 0.13	2.53 ± 0.01
5	243.79 ± 7.54	35.46 ± 2.01	6875.07	3.53 ± 0.21	2.56 ± 0.03
6	178.35 ± 14.13	33.01 ± 1.92	5402.91	3.50 ± 0.25	2.60 ± 0.01
7	163.86 ± 10.59	36.95 ± 0.84	4434.64	3.48 ± 0.17	2.60 ± 0.01

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ksilanaz üretimleri açısından taranan farklı *A. pullulans* suşları arasında en yüksek enzim üretimi *A. pullulans* Y-2311-1 suşu ile elde edilmiştir. Söz konusu suş ile ksilanaz üretimini etkileyen parametrelerin optimum düzeyleri tespit edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen enzim aktivitesi değeri 252.78 ± 23.08 U/ml olarak belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen enzim üretimi değeri genel olarak yüksektir. Ancak üretim ortamı formülasyonunda saf ksilan kullanılması üretim maliyetlerini önemli ölçüde arttırmaktadır. Bu çalışma, söz konusu mikroorganizma ile ksilanaz üretimi için belirlenen optimum koşullarda ucuz ve bol bulunan lignoselülozik atıkların taranması ve düşük maliyetli farklı ortam formülasyonlarının oluşturulması için bir temel oluşturmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma "Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu" tarafından TÜBİTAK-TOVAG 112O521 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Elgharbi F, Hmida-Sayari A, Zaafouri Y, Bejar S. 2015. Expression of an *Aspergillus niger* xylanase in yeast: Application in breadmaking and in vitro digestion. *Int J Biol Macromol*, 79, 103-109.
2. Collins T, Gerday C, Feller G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanase. *FEMS Microbiol Rev*, 29, 3-23.
3. Paes G, Berrin JG, Beaugrand J. 2012. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnol Adv*, 30, 564-592.
4. Bajpai P. 2014. Xylanolytic enzymes, New York, Academic Press.
5. Juturu V, Wu JC. 2012. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnol Adv*, 30, 1219-1277.
6. Dobrev GT, Pishtiyski IG, Stanchev VS, Mircheva R. 2007. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. *Bioresour Technol*, 98, 2671-2678.
7. Kulkarni N, Shendye A, Rao M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol Rev*, 23, 411-456.
8. Christov LP, Myburgh J, Van Tonder A, Prior BA. 1997. Hydrolysis of extracted and fiber bound xylan with *Aureobasidium pullulans* enzymes. *J Biotechnol*, 55, 21-29.
9. Bailey MJ, Bieleley P, Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol*, 23, 257-270.
10. Irfan M, Nadeem M, Syed Q. 2014. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride* IR05 in solid-state fermentation. *J Radiat Res Appl Sci*, 7, 317-326.
11. Leathers TD. 1986. Colour variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity. *Appl Environ Microbiol*, 52, 1026-1030.
12. Ohta K, Moriyama S, Tanaka H, Shige T, Akimoto H. 2001. Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. melanigenum and sequence analysis of the encoding gene. *J Biosci Bioeng*, 92, 262-270.
13. Kumar A, Gupta R, Shrivastava B, Khasa YP, Kuhad RC. 2012. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. *J Mol Catal B: Enzym*, 74, 170-177.
14. Knob A, Carmona EC. 2008. Xylanase production by *Penicillium sclerotiorum* and its characterization. *World Appl Sci J*, 4, 277-283.
15. Shah AR, Madamwar D. 2005. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochem*, 40, 1763-1771.
16. Adhyaru DN, Bhatt NS, Modi HA. 2014. Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification. *Biocatal Agric Biotechnol*, 3, 182-190.
17. Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 326-338.

18. Gawande PV, Kamat MY. 1999. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *J Appl Microbiol*, 87, 511-519.
19. Bajaj BK, Khajuria Y P, Singh VP. 2012. Agricultural residues as potential substrates for production of xylanase from alkali-thermotolerant bacterial isolate. *Biocatal Agric Biotechnol*, 1, 314-320.
20. Su Y, Zhang X, Hou Z, Zhu X, Guo X, Ling P. 2011. Improvement of xylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* SDYKY-1 using response surface methodology. *New Biotechnol*, 28, 40-46.
21. Kumar KS, Manimaran A, Permaul K, Singh S. 2009. Production of β -xylanase by a *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. *J Biosci Bioeng*, 107, 494-498.
22. Haltrich D, Steiner W. 1994. Formation of xylanase by *Schizophyllum commune*. Effect of medium components. *Enzyme Microb Technol*, 16, 229-235.
23. Haltrich D, Nidetzky B, Kulbe KD, Steiner W, Silvia Zupancic S. 1996. Production of fungal xylanase. *Bioresour Technol*, 58, 137-161.
24. Ho HL. 2015. Xylanase production by *Bacillus subtilis* using carbon source of inexpensive agricultural wastes in two different approaches of submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SsF). *J Food Process Technol*, 6: 437, doi:10.4172/2157-7110.1000437
25. Sheng L, Zhu G, Tong Q. 2014. Comparative proteomic analysis of *Aureobasidium pullulans* in the presence of high and low levels of nitrogen source. *J Agric Food Chem*, 62, 10529-10534.
26. Bocchini DA, Oliveira OMMF, Gomes E, Da Silva R. 2005. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. *Proces Biochem*, 40, 3653-3659.
27. Bakir U, Yavascaoglu S, Guvenc F, Ersayin A. 2001. An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enzyme Microb Technol*, 29, 328-334.
28. Bailey MJ, Viikari L. 1993. Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan based media. *World J Microbiol Biotechnol*, 9, 80-84.