

## Kanatlı Yemi Katkısı Olarak Kullanılan Ksilanaz Enziminin Katı Kültür Fermantasyon Yöntemi ile Üretiminde Ölçek Büyütme Çalışmaları \*

Sayit SARGIN<sup>1</sup>

Gaye ÖNGEN<sup>2</sup>

### Summary

#### Scale-Up Studies for the Production of Xylanase Used as an Additive in Poultry Feedstuffs by Solid State Fermentation

Xylanase production was performed in solid state fermentation in which low value agricultural by-products were used. Wheat bran-malt sprouts mixture was used as the substrate for the production of xylanase by the fungus *Trichoderma longibrachiatum*. The effects of inoculation, aeration and substrate depth were examined and the changes in temperature and moisture were recorded. The maximum xylanase activity obtained was 3467 IU/ g dry substrate at 0.5 substrate depth and 3.33 l/min/kg substrate aeration rate.

**Key words:** xylanase, solid state fermentation, wheat bran, malt sprouts.

### Giriş

Ksilan hemiselülozun başlıca bileşenidir ve hemiselülozlar doğada toplam biyokütlenin % 30-35'ini oluşturmaktadır (8). Yenilenebilen bu kaynaktan bugün gıda ve yem sanayi çeşitli şekillerde yararlanırken (3,2), kağıt sanayi (14,7) ve ayrıca atık arıtım ve değerlendirme proseslerinde de (3,4,6) ksilana yönelik uygulamalar bulunmaktadır. Ksilanın tüm bu sanayilerdeki işleme ve değerlendirme basamaklarında enzimatik hidrolizi ön plana çıkmaktadır. Ksilanın enzimatik hidrolizinde yer alan başlıca enzim ise  $\beta$ -1,4 bağları ile

---

\* Bu çalışma E.Ü. Araştırma Fonu'na desteklenen (2002/MÜH/012 nolu proje) doktora tezinden özetlenmiştir.

<sup>1</sup> Araş.Gör. Dr. E.Ü. Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü 35100 Bornova-İZMİR, e-posta: [ssargin@eng.ege.edu.tr](mailto:ssargin@eng.ege.edu.tr)

<sup>2</sup> Yrd. Doç. Dr. E.Ü. Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü 35100 Bornova-İZMİR

bağlanmış ksiloz birimlerinden oluşan iskeleti hidrolizleyen endo-1,4-β-ksilanazlar (1,4-β-D-ksilan ksilanohidrolaz) (EC 3.2.1.8) dir (12). Ksilanaz enzimi, ülkemizde yararlanılabileceği çeşitli alanlar içinde özellikle kanatlı yemi katkısı olarak kullanılmaktadır. Etlik piliç üretiminde kullanılan tahıl bazlı yemler, yapılarında nişasta tabiatında olmayan (NOP) ve antibesinsel faktör olarak kabul edilen çeşitli polisakkaritleri içermektedir. NOP'in su bağlama kapasitesi yüksek olduğundan bağırsak viskozitesini artırmaktadır. Viskozitedeki artış ince bağırsaktaki besin maddelerinin sindirimini düşürmektedir. Bunlara ek olarak yüksek viskozite, yapışkan dışkı miktarını artırmakta ve bunun sonucunda ıslak altlık sorununun yarattığı sağlık problemleri ortaya çıkmaktadır. Enzim ilavesi ile polisakkaritler su tutma kapasitelerini kaybetmekte ve viskozite düşmektedir. Kanatlı yemlerinde nişasta tabiatında olmayan polisakkaritlerden biri de arabinoksilandır. Ksilanaz enziminin yemlerde kullanımını ile olası sorunlar kaldırılmaktadır (5).

Günümüzde endüstriyel kullanımı olan enzim preparatları için en önemli konu enzim üretim maliyetinin ve buna bağlı olarak da prosese girdi maliyetinin düşürülmesidir. Ksilanazın da aralarında bulunduğu alfa amilaz, selülaz, pektinaz, proteazlar, lipazlar gibi enzimlerin üretimi üzerine sürdürülen araştırmalar, uygun bir üretici mikroorganizmanın bulunması ve aynı zamanda ucuz ve bol bulunabilen kaynaklardan oluşan bir üretim ortamı kompozisyonunun oluşturulması yönünde devam etmektedir. Enzim üretim prosesine ilişkin diğer problemler önemli ölçüde aşılmıştır. Ksilanaz enzimi bakteri, maya ve fungus grubunda yer alan çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (13). Fermantasyon işlemleri de derin kültür ya da katı kültür yöntemleri ile gerçekleştirilebilmektedir. Katı kültür fermantasyonu, kullanılan substratların ucuz olması, üretim ekipmanlarının kompleks olmaması, düşük nem içeriği nedeniyle bakteriyel kontaminasyon riskinin az olması ve üretim sonrası ayırma ve saflaştırma işlemlerinin maliyetinin düşük olmasına bağlı (9) çeşitli ekonomik ve mühendislik üstünlükleri (13) nedeni ile enzim üretim çalışmalarında son yıllarda önem kazanmıştır.

Ekonomisi büyük ölçüde tarım ve hayvancılığa dayalı olan ülkemizde bazı enzim türleri için dünya şirketlerinin enzim pazarında tekelleşmeye doğru gittikleri göz önüne alınırsa, hayvan yemi sektörümüz için ksilanaz enzimi üretiminin, özellikle düşük değerli tarımsal yan ürünleri kullanarak çeşitli ekonomik ve mühendislik

üstünlükleri olan katı kültür fermantasyonu ile gerçekleştirilmesinin sağlayacağı yarar yadsınamaz.

Bu çalışmada, laboratuvar ölçeğinden başlayarak endüstriyel ölçeğe geçişe kadar ksilanaz enzimi üretiminde ortaya çıkabilecek sorunların belirlenmesi amacıyla laboratuvar çapında geliştirilen katı kültür biyoreaktörde, çeşitli üretim parametrelerinin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir.

## **Materyal ve Yöntem**

### **Materyal**

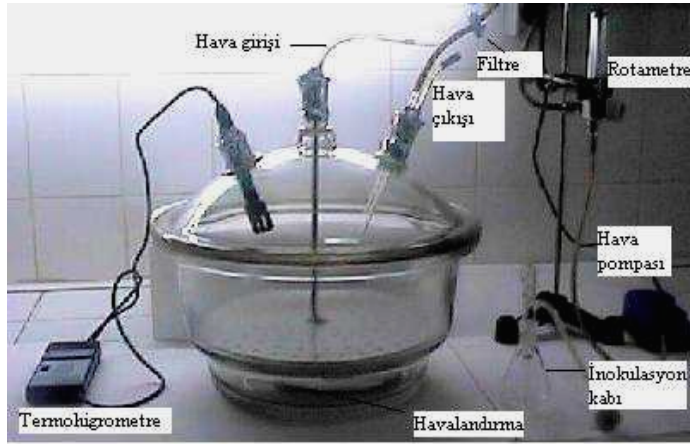
Enzim üretiminde kullanılan mikroorganizma *Trichoderma longibrachiatum*, Dr. J.P Nakas'tan (College of Environmental Science and Chemistry, State University of NewYork, Syracuse) temin edilmiştir. Fungus kültürü Patates Dekstroz Agar (PDA) (Oxoid Ltd., England) içeren eğik agarda +4 °C'de stok kültür olarak saklanmıştır. Substrat olarak kullanılan buğday kepeği Altınbaşak Un A.Ş, İzmir'den; Malt çimi İzmir Tuborg A.Ş' den temin edilmiştir. Kullanılan diğer kimyasal maddeler analitik saflıktadır.

### **Yöntem**

#### **Ksilanaz Üretimi**

Üretim ortamının hazırlanışında daha önce küçük çapta optimize edilen buğday kepeği-malt çimi karışımı (1:3 ağırlık/ağırlık) ve Vogel tuzları kullanılmıştır (11). Substrat karışımının sterilizasyon sonrası pH değeri 6.50 ve nem değeri % 60 (ağırlık/ağırlık) olacak şekilde ayarlanmış ve 121 °C'de 30 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Üretimde toplam hacmi 15 l olan cam biyoreaktör kullanılmıştır (Şekil 1). Biyoreaktörün sterilizasyonu 180 °C'de 2 saat süre ile kuru sterilizasyon yöntemi ile (Memmert) gerçekleştirilmiştir. Aynı bir kap içerisinde sterilize edilen üretim ortamı, oda sıcaklığına soğutulan biyoreaktöre aseptik koşullar altında, steril kabin içinde transfer edilmiştir. İnokulasyonda, *Trichoderma longibrachiatum*, yüksek oranda sporlanmayı sağlayan Vogel tuzları ve %2 laktoz içeren eğik agarlara transfer edilmiş ve 28 °C 'de 7 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda % 0.2 (hacim/hacim) steril Tween 80 kullanılarak üretimde kullanılmak üzere 10<sup>7</sup> spor/ml içeren spor süspansiyonu hazırlanmıştır. Tüm spor sayımlarında Thoma lamı kullanılmıştır. İnokulasyonda üretim ortamına bu spor süspansiyonu %10 (hacim/ağırlık) oranında transfer edilmiştir. Biyoreaktör üretim için 28 °C'de sabit sıcaklıktaki inkübatörün (Memmert) içerisine alınmıştır. Üretim sırasında reaktörün içerisindeki sıcaklık ve nispi nem değerleri termohigrometre probu

(Lutron) ile izlenmiştir. Havalandırma işlemi, silikon hortumlar ile kompresörden taşınan havanın steril filtreden (GyroDisc CA 0.2 µm) geçirilmesinden sonra reaktörün içerisine beslenmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Hava akış hızı rotametre ile ayarlanmıştır. Örnek alma işlemi, her gün 3 g fermente olmuş ortamın aseptik koşullarda alınması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Örnekleme, biyoreaktörün merkezinden kenarlara doğru üç ayrı noktadan yapılmıştır. Elde edilen aktivite değerleri 3 ayrı noktadan alınan örneklerin ortalaması alınarak verilmiştir.



Şekil 1. Üretimlerde kullanılan biyoreaktör ve bağlantı elemanları.

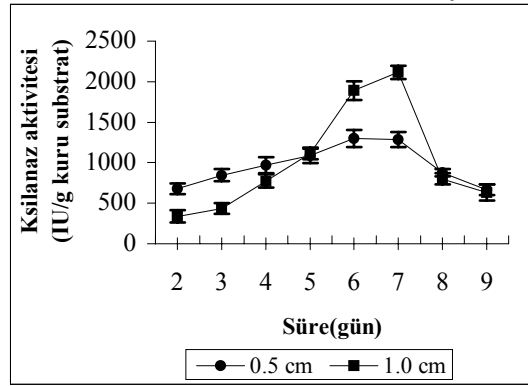
### Üretim sonrası işlemler

Üretilen ksilanaz enziminin ekstraksiyonu için üretim sırasında alınan her 1 kısım örneğe 5 kısım %0.2 (hacim/hacim) Tween 80 içeren çözelti eklenmiş ve 25°C'de 1 saat süre ile karıştırılarak bekletilmiştir. Daha sonra ortam, bir cendere bezinden filtre edilmiş ve sıvı kısım pH ölçümüne alınmıştır. Filtrasyon ve pH ölçüm işlemleri tamamlanan sıvı kısım Hettich marka soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 15 dakika süre ile (10000 devir/dakika) santrifüjlenmiştir. Supernatantlar (kaba enzim ekstraktları) tüplere alınmış ve -18 °C'de depolanmışlardır. Ksilanaz aktivitesi tayini Bailey, Biely and Poutanen (1992)'de belirtildiği şekilde yapılmıştır (1). Enzim aktivite birimi kuru bazda, kullanılan substratın gramı başına elde edilen enzim aktivitesi (IU/g kuru substrat) şeklinde ifade edilmiştir.

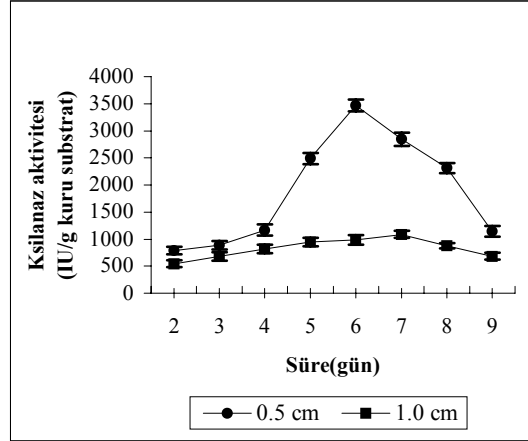
### Araştırma Bulguları ve Tartışma

Üretimin gerçekleştirildiği biyoreaktöre yüklenen üretim ortamı (substrat) miktarı ve buna bağlı olarak biyoreaktör içinde yaratılan substrat kalınlığı üretim parametrelerini ve seçilmesi gereken biyoreaktör tipini belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışma, kullanılan “tepsili biyoreaktör”e bir yaklaşım olarak geliştirilmiş bir biyoreaktördür. Ölçek büyütme çalışmaları küçük ölçekte kullanılan substrat miktarının (10 gram) 7.5 ve 15 kat artışı olarak planlanmıştır. Substrat miktarının artışı ile substrat kalınlığının ksilanaz enzimi üretimine etkisi araştırılmıştır (Şekil 2). Ölçek büyütmede homojen inokülasyonun gerçekleştirilebilmesi için ön denemeler yapılmıştır. Hava beslemesi olmadan yapılan denemede biyoreaktöre 75 gram üretim ortamı yüklendiğinde (0.5 cm substrat kalınlığı) üretim sırasında nispi nem oranı % 93±1 olarak korunmuştur. Üretim süresince biyoreaktör içinde sıcaklık değişimi 28.0-29.6°C aralığında gerçekleşmiştir. Maksimum ksilanaz aktivitesi 7. günde 2114.20±81.12 IU/g kuru substrat olarak elde edilmiştir. Biyoreaktöre 150 gram üretim ortamı yüklendiğinde (1.0 cm substrat kalınlığı) maksimum aktivite 1299.34±105.12 IU/g'dir. Havalandırmaz koşullarda substrat miktarı artırıldığı zaman (1.0 cm substrat kalınlığı) üretim sırasında sıcaklık değeri maksimum 32 °C'ye ulaşmıştır. Ksilanaz üretiminde *Trichoderma longibrachiatum* için optimum üreme aralığı 28-30°C olarak belirlenmiştir (11). Sıcaklık değerinin bu değer aralığını aşması mikrobiyal gelişmeyi ve dolayısı ile de ksilanaz üretimini olumsuz etkilemiştir(10,11). Nispi nem miktarında önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir. Substrat kalınlığının artmasına bağlı olarak ortaya çıkan sorunların biyoreaktöre oksijen transferi yapılarak aşılabileceği sonucuna varılmış ve bu amaçla her iki substrat kalınlığı için değişik hava hızlarının ksilanaz enzim üretimine etkisi incelenmiştir. Üretimin oksijen ihtiyacının karşılanmasında uygun havalandırıcı tipinin belirlenebilmesi amacıyla da ön denemeler yapılmıştır, havalandırma simidi kullanıldığında olumlu sonuç alınmıştır. İlk olarak, 3.33 l/dak/kg substrat hava besleme hızında üretim gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ksilanaz aktiviteleri Şekil 3.'te sunulmuştur. 0.5 cm substrat kalınlığı kullanılarak yapılan üretimde elde edilen maksimum ksilanaz aktivitesi 3467.56±121.28 IU/g dır. Bu aktivite değeri üretimin 6. gününde elde edilmiştir. Üretim sırasında nispi nem %92±2 değerini korumuştur. Sıcaklıktaki maksimum değerin ise 30.8°C ye ulaştığı belirlenmiştir. Ayrıca alınan örneklerde yapılan nem tayininde nem değerinin 8 gün boyunca ortalama %61.42±0.25

değerinde olduğu görülmüştür. Substrat kalınlığı 1.0 cm olan üretimde ise en yüksek ksilanaz aktivitesi  $1086.13 \pm 65.45$  IU/g kuru substrat ve biyoreaktörde nispi nem oranı  $\% 90 \pm 2$  ve maksimum sıcaklık  $32^\circ\text{C}$  olmuştur. Hava hızı 6.66 l/dak/kg substrat olarak ayarlandığında Şekil 4'de görüldüğü gibi ise ksilanaz aktivitesini olumsuz etkilenmiştir. Ayrıca bu üretimde, nispi nem oranı  $\%90 \pm 2$  değerine düşmüş, substratın nem miktarındaki düşüş 9. günde  $\%3.2$  olarak saptanmıştır. Sıcaklığın üretim boyunca biyoreaktörde ulaştığı maksimum değer ise  $31^\circ\text{C}$  olmuştur. Substrat kalınlığının 1.0 cm olduğu üretimde ise nispi nem  $\% 88 \pm 2$  ve maksimum sıcaklık  $32^\circ\text{C}$  olarak ölçülmüştür.



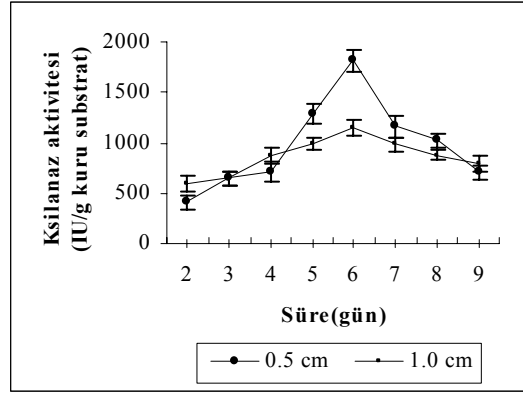
Şekil 2. Hava beslemesi yapılmayan üretimde değişik substrat kalınlıklarında ksilanaz aktivitesi değişimi.



Şekil 3. Havalandırılmalı üretimde 3.33 l/dak/kg substrat hava hızında ksilanaz aktivitesi değişimi.

*T. longibrachiatum* fungusunun buğday kepeği ortamında değişik substrat kalınlıklarında (0.5-2.5 cm) ksilanaz aktivite üretiminin incelendiği bir çalışmada, maksimum aktivitenin 948 IU/g ile 1.5 cm

substrat kalınlığında, 2.9 l/dak/kg substrat hava akış hızı ve % 55 nem oranında elde edildiği belirtilmektedir (10). Bu değerlerle karşılaştırıldığında bu çalışma ile 3.6 kat daha yüksek aktivitede ksilanaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiştir.



şekil 4. Havalandırmalı retimde 6.66 l/dak/kg substrat hava hızında ksilanaz aktivitesi değişimi.

### Sonuç

Biyoreaktörde yapılan üretimlerde 0.5 cm substrat kalınlığı ve 3.33 kg/l/dak havalandırma hızında 3467.56±121.28 IU/g kuru substrat aktiviteye sahip ksilanaz enzim preparatı üretilmiştir. Bununla beraber ölçek büyümesine bağlı olarak biyoreaktör içinde meydana gelen oksijen transferi kısıtlamaları, sıcaklığın remeye bağlı olarak yükselmesi, nem oranının üretim süresince değişmesi gibi faktörler daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır. Bu sorunların beslenen havanın şartlandırılması yanı sıra biyoreaktör tipinin uygunluğu ile aşılabileceği düşünülmektedir.

### zet

Ksilanaz enzimi üretiminde ekonomik değerini düşük olan tarımsal yan ürünlerin kullanıldığı katı kültür fermentasyon yöntemi uygulanmıştır. Biyoreaktörde yapılan üretimlerde buğday kepeği ve malt imi karşımı (1:3) substrat olarak kullanılmış ve *Trichoderma longibrachiatum* fungusu ile ksilanaz enzimi üretimi yapılmıştır. Üretimde, inokulasyon şeklinin, havalandırmanın, substrat kalınlığının ksilanaz enzim verimine etkisi incelenmiş ve üretim sırasında sıcaklık ve nem değişimleri izlenmiştir. 0.5 cm substrat kalınlığı ve 3.33 l/dak/kg substrat havalandırma hızında en yüksek ksilanaz aktivitesi 3467 IU/g kuru substrat olarak elde edilmiştir.

**Anahtar szckler:** ksilanaz, katı kültür fermentasyonu, buğday kepeği, malt imi.

### Kaynaklar

1. Bailey, M.J., Biely, P. and Poutanen, K., 1992, Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, *Journal of Biotechnology*, 23: 257-270.
2. Berovic, M. and Ostroversnik, H., 1997, Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. *Journal of Biotechnology*, 53:47-53.
3. Biely, P., 1985, Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*, 3: 286-290.
4. Carmona, E.C., Pizzironi, A.A., Monterio, R.T.R. and Jorge, J.A., 1997, Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. *Journal of Basic Microbiology*, 38 (6): 387-394.
5. Çiftçi, İ., *Yem Katkı maddesi olarak enzimler Çiftlik Hayvanlarının Beslenmesinde Temel Prensipler ve Karma Yem Üretiminde Bilimsel yaklaşımlar* Editör: Melih Yavuz, İstanbul 2001, 896 sayfa.
6. Duarte, J.C and Ferreira, M. C., 1994, *Aspergilli* and lignocellulosics: Enzymology and biotechnological applications, *FEMS Microbiology Reviews*, 13: 377-386.
7. Haarhoff, J., Moes, C.J., Cerff, C., Wyk, W.J., Gerischer, G. and Janse, B.J.H., 1999, Characterization and biobleaching effect of hemicellulases produced by thermophilic fungi, *Biotechnology Letters*, 21: 415-420.
8. Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M., 1999, Molecular and biotechnological aspects of xylanases, *FEMS Microbiology Reviews*, 23: 411-456.
9. Mitchell, D. and Berovic, M., 1998, Solid state fermentations. *Bioprocess Engineering Course*, Edt M Berovic, National Institute of Chemistry, Slovenia, 128-167.
10. Ridder, E.R., Nokes, S.E. and Knutson, B.L., 1999, Optimization of solid state fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system, *American Society of Agricultural Engineers*, 42(6): 1785-1790.
11. Sargın, S., 2003, Katı Kültür Fermantasyonu ile Ksilanaz Enzim Üretiminin Optimum Koşullarının Belirlenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Bornova-İzmir.
12. Singh, S., Madlala, A.M. and Prior, B.A., 2003, *Thermomyces lanuginosus* : Properties of strains and their hemicellulases, *FEMS Microbiology Reviews*, 27:3-16.
13. Souza, D.F., Souza, C. G. M. and Peralta, R. M., 2001, Effect easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid state fermentation, *Process Biochemistry*, 36: 835-838.
14. Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M. and Sasaki, K., 2003, Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review, *Process Biochemistry*, 38 :1327-1340.