

TERMOFİLİK *MYCELIOPHYTHORA*
HINNULEA'DAN SELÜLAZ ENZİMİ ÜRETİMİ
Yeşim YILMAZ
Yüksek Lisans Tezi
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Haziran 2015

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1309F317**

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Termofilik Myceliophthora hinnulea'dan Selülaaz Enzimi Üretimi

YEŞİM YILMAZ

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Berrin Bozan

2015, 63 sayfa

Lignoselülozik biyokütle, monomerik şekerlerin selülotik enzimlerle hidrolizi ile üretiminde, potansiyel yenilenebilir kaynaklardır. Endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glikozidaz enzim karışımlarından oluşan selülaaz enzimi, bu enzimlerin sinerjik etkileriyle selülozu glikoza parçalar. Bu enzimler başta mantarlar olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalar ile üretilebilmektedir.

Bu çalışmada, termofilik *Myceliophthora hinnulea* kullanılarak yanıt yüzey yöntemi ile selülaaz enziminin batık hal fermantasyon üretim parametreleri optimize edilmiştir. pH (4.0 - 5.25 - 6.5), sıcaklık (35°C - 45°C - 55°C), spor sayısı (1×10^6 - 5×10^9 - 1×10^{10}) ve kültür yaşının (24 h - 60 h - 96 h) filtre kağıdı birimi cinsinden selülaaz aktivitesi üzerine etkileri gözlenmiştir. Optimize edilmiş koşullarda önışlem görmüş üç ayrı lignoselülozik biyokütle (findık kabuğu, auççek sapı ve haşhaş sapı) kullanılarak *Myceliophthora hinnulea* kültüre alınmış ve bu biyokütlelerin selülaaz aktivitesi ve monomerik şeker verimine etkileri incelenmiştir.

Optimum enzim aktivitesine (0,216 FPU/ml), pH 6,1, 38°C, 1×10^{10} spor/ml ve 24 sa kültür yaşı şartlarında ulaşılmış, farklı karbon kaynaklarından da %2'lik önışlem görmüş findık kabuğu ile 7.gün sonunda en yüksek selülaaz aktivitesi (0,181 FPU/ml) elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Selülaaz, Yanıt Yüzey Yöntemi, *Myceliophthora hinnulea*.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

Cellulase Production from Thermophilic *Myceliophthora hinnulea*

Yesim YILMAZ

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Chemical Engineering Program

Supervisor: Prof. Dr. Berrin BOZAN

2015, 63 pages

Lignocellulosic biomass is potential renewable resource for monomeric sugars which can be produced by the enzymatic hydrolysis of cellulose with cellulolytic enzyme. Cellulase is a group of enzymes including endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase, which act synergistically to hydrolyze cellulose to glucose. These enzymes can be produced by a large diversity of microorganisms. mainly by funguses.

In this study, production of cellulase enzyme was optimized by response surface methodology under submerge conditions using thermophilic *Myceliophthora hinnulea*. The effect of pH (4.0 - 5.25 - 6.5), temperature (35°C - 45°C - 55°C), spore size (1×10^6 - 5×10^9 - 1×10^{10}) and culture age (24 h - 60 h - 96 h) on the cellulase production in terms of filter paper activity was investigated. At optimum conditions, three pretreated lignocellulosic feedstocks (hazelnut shells, sunflower stalks and poppy stalks) were used to culture *Myceliophthora hinnulea*.

The optimum levels of parameters for maximizing cellulase activity were found as 6.1 for pH, 38°C, 1×10^{10} inoculum size and of 24 h culture age. At these conditions, the cellulase activity was 0.216 FPU/ml. Maximum cellulase activity (0.181 FPU/ml) was reached using 1 % hazelnut shells after 7 days.

Key words: Cellulase, Responce Surface Optimization, *Myceliophthora hinnulea*.

TEŞEKKÜR

Danışmanlığımı üstlenen, gerek derslerimde ve gerekse tez çalışmalarında anlayış ve yardımlarını esirgemeyen, bilgisi, tecrübesi ve katkılarıyla bana yol gösteren, beni yönlendiren ve her türlü olanağı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Berrin BOZAN'a, tanıdığım andan itibaren her konuda bana destek olan, tez aşamamda, öncesinde ve sonrasında her zaman yanımda olan ve daima yanımda olacağını bildiğim Araş. Gör. Emir Zafer HOŞGÜN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim sırasında bilgisi ve tecrübesiyle yol gösteren, bölüm laboratuvarlarının imkanlarını kullanmama izin veren, deneylerim süresince her türlü yardımı gördüğüm Anadolu Üniversitesi fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Merih KIVANÇ, Dr. Derya Çelik BERİKTEN ve Gizem ARIK 'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bana karşı her zaman sabırlı ve anlayışlı olan, hiç bir konuda maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, deneylerimi tamamlamam da çok emeği olan değerli çalışma ve yol arkadaşlarım Onur YILDIZ, Ebru TUNÇ, Ceren PAÇAL, Yiğit UNAYAĞYOL ve Selin ÜREY 'e çok teşekkür ederim.

Lisans hayatım ve yüksek lisans hayatım boyunca yanımda olan, sevgi ve ilgilerini eksik etmeyen arkadaşlarım Arzu YENER, Arzu Sinem SATILMIŞ, Esin KALPAZAN ve Yasemin ERGÜL ' e teşekkürlerimi sunarım.

Yanımda olamasalar da, çalışmalarım sırasında bana büyük bir moral ve güç veren, her türlü fedakarlıktan kaçınmayan, anlayış ve destekleri için sevgili anneme, babama ve kardeşime çok teşekkür ederim.

YEŞİM YILMAZ

HAZİRAN 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x

1. GİRİŞİ

2.LİTERATÜR TARAMASI3

2.1. Selülaz Enzimi.....	3
2.1.1. Selülazların sınıflandırılması.....	4
2.1.2. Selülazlarınkarakterizasyonu ve özellikleri.....	5
2.1.3. Selülazların uygulama alanları.....	6
2.1.3.1.Gıda endüstrisi.....	6
2.1.3.2. Tekstil endüstrisi.....	6
2.1.3.3.Çamaşır ve deterjan endüstrisi.....	7
2.1.3.4.Hayvan yemi endüstrisi.....	8
2.1.3.5. Kağıt endüstrisi.....	8
2.1.3.6.Bira ve şarap endüstrisi.....	8
2.1.3.7.Biyoyakıt endüstrisi.....	8
2.1.4.Selülaz enzimi üretimini etkileyen faktörler.....	9
2.1.4.1. Karbon kaynağı.....	9
2.1.4.2. Azot kaynağı.....	10
2.1.4.3.Substratın nem içeriği.....	10
2.1.4.4. Substrat konsantrasyonu.....	11
2.1.4.5.İnokulum boyutu ve yaşı.....	11
2.1.4.6.İnkübasyon süresi.....	11
2.1.4.7.İnkübasyon sıcaklığı.....	12

2.1.4.8.Ortam pH' ının etkisi.....	12
2.1.5. Selülaz üretim yöntemleri.....	12
2.1.5.1.Katı hal fermantasyonu.....	13
2.1.5.2. Batık substratfermantasyonu.....	14
2.2. <i>Myceliophthorahinnulea</i>	16
2.3.LignoselülozikBiyokütle.....	17
2.3.1. Hemiselüloz.....	18
2.3.2. Lignin.....	19
2.3.3. Selüloz.....	20
2.4.Yanıt Yüzey Yöntemi.....	21
2.5.Önceden Yapılmış Çalışmalar.....	22

3.MATERYAL VE YÖNTEM25

3.1. Materyal.....	25
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1.Mikroorganizmaların tanımlanması.....	25
3.2.2. Mikroorganizmaların hazırlanması.....	26
3.2.3. İnokulantın hazırlanması.....	26
3.2.4. Selülaz üretimi.....	26
3.2.5.Selülaz üretim parametrelerinin yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu.....	28
3.2.6.Selülaz üretiminde farklı karbon kaynaklarının kullanımı.....	29
3.2.7. Lignoselülozikbiyokütlenin selülozca zenginleştirilmesi.....	30
3.2.7.1.Fındık kabuğuna uygulanan alkali ön işlem.....	31
3.2.7.2. Ayçiçeği sapına uygulanan alkali ön işlem.....	31
3.2.7.3.Haşhaş sapına uygulanan alkali ön işlem.....	31
3.2.7.4. Lignin tayini.....	31
3.2.8. Selülaz aktivitesinin belirlenmesi.....	31
3.2.9. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile monomerik şekerlerin analizleri.....	31
3.2.10.Nem, lignin, selüloz ve hemiselüloz miktarlarının belirlenmesi.....	37

4.DENEYSEL BULGULAR	39
4.1.Selülaz Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi.....	39
4.2.Selülaz Üretiminde İncelenen Parametrelerin Etkisi.....	39
4.2.1.Selülaz üretiminde sıcaklığın etkisi.....	39
4.2.2.Selülaz üretiminde pH etkisi.....	40
4.2.3.Selülaz üretiminde spor sayısının etkisi.....	41
4.2.4. Selülaz üretiminde kültür yaşının etkisi.....	42
4.3. Selülaz Üretim Parametrelerinin Yanıt Yüzey Yöntemi İle Optimizasyonu.....	43
4.4. Selülaz Aktivitesi Üzerine Etki Eden Parametrelerin Optimizasyonu.....	49
4.5. Farklı Karbon Kaynakları Kullanılarak Üretilen Selülaz Enzimi Verileri.....	49
5.SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Lignoselülozik biyokütle.....	17
Şekil 2.2. Hemiselüloz yapısı.....	18
Şekil2.3. Lignin yapısı.....	19
Şekil 2.4. Selülozun yapısı.....	20
Şekil 3.1. DNS kalibrasyon doğrusu.....	32
Şekil 3.2. Standart şeker bileşiklerine ait örnek bir kromotogram.....	34
Şekil 3.3. YBSK analizi sonucu glikoz bileşeninin kalibrasyon doğrusu.....	34
Şekil 3.4. YBSK analizi sonucu ksiloz bileşeninin kalibrasyon doğrusu.....	35
Şekil 3.5. YBSK analizi sonucu sellobiyoz bileşeninin kalibrasyon doğrusu.....	35
Şekil 3.6. YBSK analizi sonucu galaktoz bileşeninin kalibrasyon doğrusu.....	35
Şekil 3.7. YBSK analizi sonucu arabinoz bileşeninin kalibrasyon doğrusu.....	36
Şekil 3.8. YBSK analizi sonucu mannoz bileşeninin kalibrasyon doğrusu.....	36
Şekil 4.1. Selülaz aktivitesinin günlük deneysel verileri.....	39
Şekil 4.2. Selülaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi.....	40
Şekil 4.3. Selülaz aktivitesinin pH a bağlı olarak değişimi.....	41
Şekil 4.4. Selülaz aktivitesinin spor sayısına bağlı olarak değişimi.....	42
Şekil 4.5. Selülaz aktivitesinin kültür yaşına bağlı olarak değişimi.....	42
Şekil 4.6. Parametrelerin selülaz aktivitesi üzerine etkileri.....	47
Şekil 4.7. Karbon kaynaklarının alkali ön işlem sonrasında kimyasal bileşimi.....	49
Şekil 4.8. % 1' lik karbon kaynaklarının kullanımı ile ulaşılan selülaz aktivitesi..	50
Şekil 4.9. % 2 lik karbon kaynaklarının kullanımı ile ulaşılan selülaz aktivitesi..	50
Şekil 4.10. % 1 ve % 2'lik fındık kabuğunun karbon kaynağı olduğu durumlarda selülaz aktivitesi.....	51
Şekil 4.11. % 1 ve % 2'lik haşhaş .sapının karbon kaynağı olduğu durumlarda selülaz aktivitesi.....	51
Şekil 4.12. % 1 ve % 2'lik ayçiçeği sapının karbon kaynağı olduğu durumlarda selülaz aktivitesi.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Selülaz üretiminde kullanılan bakteri ve mantar türleri.....	2
Çizelge 2.1. Lignoselülozik biyokütle kaynakları bileşimleri.....	18
Çizelge 3.1. Selülaz inokulasyon besiyeri içeriği.....	27
Çizelge 3.2. Selülaz enzim besiyeri içeriği.....	27
Çizelge 3.3. Selülaz üretiminde incelenen parametreler ve seviyeler.....	28
Çizelge 3.4. Selülaz üretiminde bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonları	29
Çizelge 3.5. %1 lik farklı karbon kaynaklarının selülaz üretim besi yeri içeriği.....	30
Çizelge 3.6. %2 lik farklı karbon kaynaklarının selülaz üretim besi yeri içeriği.....	30
Çizelge 3.7. YBSK analizi sonucu standart şeker bileşiklerinin kalibrasyon doğrularının denklemleri.....	36
Çizelge 4.1. Üretilen selülazın aktivitesinin deneysel verileri.....	44
Çizelge 4.2. Selülaz aktivitesinin (FPU/ml) Box Behnken yanıt yüzey yöntemi	46
Çizelge 4.3. Deneysel ve modelden bulunan selülaz enzim aktivitesi.....	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CMC	: Karboksimetil selüloz
HEC	: Hidroksietil selüloz
KH_2PO_4	: Potasyum fosfat
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: Amonyum sülfat
MgSO_4	: Magnezyum sülfat
NH_4Cl	: Amonyum klorür
KNO_3	: Potasyum nitrat
NH_4NO_3	: Amonyum nitrat
SSF	: Katı-Hal Fermantasyonu
YYY	: Yanıt Yüzey Yöntemi
IU	: International Unit
CMCase	: Karboksimetil selülaz
FPase:	: Selülazlar için Filtre Kağıdı Aktivitesi
YBSK	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
FPU	: Filter Paper Unit
PDA)	: Potato Dextrose Agar
ANOVA	: Varyans Analizi

1. GİRİŞ

Enzimler biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Hücre içinde ve hücre dışında sentezlenen enzimler aktivasyon enerjisini düşürerek hücre içerisindeki reaksiyonların hızlanmasını sağlamaktadırlar. Hücre dışarısında da genellikle etkinliklerini korumaktadırlar (Zoppas ve ark., 2013).

Enzimler ilk çağlardan bu yana çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Teknolojinin gelişmesi ile birlikte daha saf enzimler elde edilmeye başlanarak, daha geniş ölçekli üretimler gerçekleştirilmektedir. Bu ilerlemelerle birlikte enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanımının önü açılmaktadır. Enzimler, tekstil, gıda, kağıt, bira, şarap ve deterjan gibi bir çok endüstriyel alanda kullanılmaktadır.

Otuz yıldan fazla süredir endüstriyel alanlarda kullanılmakta olan selülaz, selülozun hidrolizini katalizleyen mantar, bakteri ve protozoalardan üretilen enzimlerdir. Gıda, hayvan yemi, tarım, biyokütle değerlendirilmesi (arıtımı), kağıt hamuru, tekstil ve deterjan endüstrisi gibi bir çok alanda kullanılan selülaz, endüstriyel enzimlerin en yaygın olanıdır. Meyve sularının berraklaştırılması, kotların biyolojik olarak taşlanması, kumaşların ağartılması, atık kağıttan mürekkebin uzaklaştırılması gibi uygulamalarda selülaz kullanılmaktadır.

Fosil kaynakların azalması ile yenilenebilir enerji kaynaklarına duyulan ihtiyaç artmaktadır. Selülazların, biyoetanol ve biyolojik ürünlerin üretimi için ön işlem görmüş lignoselülozik maddelerin fermante şekerlere hidrolizinde kullanılması selülaz pazarını önemli ölçüde genişletmektedir. Endüstriyel alanda kullanılan selülazın en önemli dezavantajı üretimindeki yüksek maliyettir. Selülazların maliyetini düşürmek için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bunlardan biri de yüksek maliyetli olan selüloz, karboksimetil selüloz gibi ticari karbon kaynakları yerine daha az maliyetli lignoselülozik atıkların kullanımınıdır. Muz kabukları, buğday sapı, mısır koçanı, testere tozu, pamuk tozu gibi çeşitli lignoselülozik atıklar selülaz üretiminde substrat kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Bakteri veya mantarlardan çeşitli yollarla üretilen selülazın en sık kullanılan üretim şekli katı hal fermantasyonu (Solid state fermentation, SSF) ve

batık hal fermantasyonu (Submerged, SmF) dur. Katı hal fermantasyonu az atık su çıkması, düşük maliyeti dolayısıyla daha avantajlı gözükse de batık hal fermantasyonu sürecinin kontrol edilebilirliğinin kolay olmasından dolayı daha çok tercih edilmektedir (Pandit ve Maheshwari, 2012; Shobana ve Maheswari, 2013).

Selülaz üretiminde mantarlar, bakterilere göre daha çok tercih edilmektedirler. Selülaz üretiminde sıklıkla kullanılan bakteri ve mantarlar Çizelge 1.1 de verilmektedir.

Çizelge 1.1. Selülaz üretiminde kullanılan bakteri ve mantar türleri (Sharada ve ark., 2013)

Bakteri	Mantar
<i>Bacillus subtilis (CBTK 106)</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>Bacillus subtilis KO</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Alternaria alternate</i>
<i>Geobacillus pallidus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>

Bu çalışmanın amacını daha önce hiç bir çalışmada kullanılmayan termofilik bir mantar olan *Myceliophthora hinnulea*'dan selülaz enziminin üretiminin optimizasyonu oluşturmaktadır. *M. hinnulea*'nın gelişimi gerçekleştirildikten sonra ilk olarak karbon kaynağı olarak karboksimetil selüloz kullanılarak önceden belirlenen parametreler selülaz aktivitesi üzerinden optimize edilmiştir. Daha sonra optimize edilen koşullarda, karbon kaynağı olarak karboksimetil selüloz yerine, haşhaş sapı, ayçiçeği sapı ve fındık kabuğu gibi lignoselülozik atıklar kullanılarak farklı karbon kaynaklarının selülaz üretimi üzerine etkisi incelenmiştir.

2.LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Selülaz Enzimi

Selülazlar, selülozik materyallerin biyoyakıtlara dönüşümünde önemli bir rol oynayan glikozil hidrolazlardır (Goldbeck ve ark.,2013). Lignoselülozik biyokütlelerden alternatif yakıtların ve kimyasalların üretiminde kullanılan anahtar kaynaklardan olan selülazlar ve hemiselülazlar lignoselülozların glikoz, mannoz, arabinoz ve ksiloz gibi fermante şekerlere hidrolizi için gereklidirler (Hideno ve ark., 2011).

Dünya endüstriyel enzim talebinin %8'ini oluşturan selülazlar biyoetanol ve biyolojik ürünlerin üretimi için ön işlem görmüş lignoselülozik maddelerin fermante şekerlere hidrolizinde kullanıldıkları sürece, selülaz pazarı önemli ölçüde genişleyecektir. Genencor International ve Novozymes Biotech gibi biyoteknoloji firmaları selülozdan etanol üretim süreci için selülaz maliyetinin azaltılması için bir rapor sunmuşlardır. Bu raporda iki ana strateji bulunmaktadır. Bunların ilki, selülaz üretiminde işlem ve şekil arttırılmasıyla selülaz enzimin gramı başına fiyatının azaltılması için ekonomik iyileştirmelerin yapılması, bir diğeri ise karışımlar ve bileşen iyileştirilmesiyle eşdeğer hidrolizin gerçekleşmesi için enzimin gramının azaltılması amacıyla selülaz enzim performansında iyileştirme yapılmasıdır (Sadhu ve ark., 2013). Selülazların maliyeti toplam biyoetanol üretim maliyetiningeniş bir kısmını kapsamaktadır. Selülaz üretiminde; hammadde maliyetinin, taşıma ve saflaştırma maliyetlerinin azaltılması için bir yol bulunması gerekmektedir. Selülazın yüksek üretimde gerçekleşmesi için yüksek üretimli mantar ve pahalı olmayan karbon kaynağı gereklidir (Hideno ve ark., 2011).Selülaz üretim maliyeti için substratın maliyeti en önemli etkendir. Bu yüzden substrat olarak ucuz biyokütlelerin kullanımı selülaz maliyetinin azalmasına yardım etmektedir (Singh ve ark., 2009).

Mikroorganizmaların bir çoğu selülozu parçalayabilmesine rağmen sadece bir kısmı kristal selülozu tamamen hidrolize edebilen biyoaktif bileşenleri önemli bir miktarda üretebilmektedir (Bail ve ark., 2011). Selülaz üretiminde genellikle bakteriler ve mantarlar kullanılmaktadır. Gelişim hızlarının yavaş olması nedeniyle mantarlardan üretilen selülazın maliyeti yüksektir. Bunun yanı sıra

mantarlar kolay saflaştırma ve ayırım için yetiştirme ortamına salınacak bol miktarda selüloz ve hemiselüloz üretme kapasitesine sahiptir. Mantarların uzamış lifleri selüloz yapısı üzerine mekanik baskı oluşturarak selülazın bol miktarlarda üretimini sağlamaktadır. Çoğu mantarlardan üretilmiş selülazlar hidrolitik ve oksidatif enzimleri salgılayarak, selüloz, hemiselüloz ve ligninin dağılmasını sağlayabilmektedir (Pandit ve Maheshwari, 2012). Mantarlardan üretilen enzimler bakteriyel enzimlere göre daha az komplekstirler (Otajevwo, 2011). Yüksek gelişim hızına sahip bakteriler ise mantarlar ile karşılaştırıldığında selülaz üretimi için daha iyi bir potansiyel olmalarına rağmen selülaz üretiminde bakteriler sıklıkla kullanılmamaktadırlar. Bakteriyel selülazlar genellikle üç selülaz aktivitesinin birinden yoksundurlar. Yoksun olunan bu aktivite FPase' dir. Bununla birlikte bakterilerden üretilen selülazlar daha verimli katalizörlerdir ve maddenin daha azinhibe olmasını sağlamaktadırlar (Ariffin ve ark., 2006). Bu enzimler daha hızlı gelişmekte ve daha kompleks yapıda oldukları için sinerjiyi ve işlevi artırmaktadırlar (Otajevwo, 2011).

Karbon kaynağı, selüloz kalitesi, pH değeri, sıcaklık, uyarıcıların varlığı, besi yerinin eklenmesi, havalandırma ve yetiştirilme süresi selülaz üretiminin optimize edilmesinde en önemli parametrelerdir. Bunların arasında pH en çok dikkat edilendir (Otajevwo, 2011).

2.1.1 Selülazların sınıflandırılması

Selülozik substrattaki hareket kısımlarına göre selülazlar üç gruba kategorize edilebilmektedirler. Bunlar, içteki selüloz ile lif bağlarını bölen endoglukanazlar, selülozun dış bölgesinde çalışan ekzoglukanazlar ve sellobiyohidrolazlar ile çözünebilir glikoz oligosakkaritlerini hidroliz eden beta-glikosidazlardır.

Endoglukanazlar: Bunlar, endo β -1-4 glukozidaz ve karboksi metil selülaz olarak bilinirler. Selülozun β -1-4 glukozidaz iç bağlarının hidrolizini katalizlerler. Selüloz onların doğal substratları olarak çalışır. Endoglukanazlar; sadece selülozun şekilsiz kısmında hareket edip ve aktivitesi selüloz zincirinin uzunluğu boyunca azalmaktadır.

Ekzoglukanazlar: Selüloz zincirinin indirgen ve indirgen olmayan kısımları içerisinde ilerleyen bir yolda hareket etmektedirler. Ana ürün olarak glikoz ve sellobiyohidrolazları serbest bırakırlar. Mikrokristal selüloz üzerinde hareket ederler ve dolayısıyla polisakkarit zinciri kısalmır. Bunlar karboksimetil selüloz (CMC) ve hidroksietil selüloz (HEC) gibi zincirler üzerinde sınırlı etkiye sahiptir.

β - glikosidazlar: Kısa oligosakkarit zinciri ve çözünebilir sellobiyozu glikoza hidroliz etmek için gereklidir. Ayrıca β - D- glikozid glukohidrolaz olarak da adlandırılabilirler. Selüloz zincirinin boyunun artması ile aktivitesini kaybeder ve ayrıca uçta β -D- glikoz oligosakkaritlerinin hidrolizini gerçekleştirir (Sharada ve ark., 2013).

2.1.2. Selülazların karakterizasyonu ve özellikleri

Selülazların endüstride en iyi performans koşulları altında kullanabilmek için özelliklerinin belirlenmesi çok önemlidir. Selülotik enzimlerin bir diğer özelliği metal gibi başka moleküllerden etkilenmesidir. Bu karakteristik inhibitör etkiye yol açmaktadır. Cıva, bakır, gümüş ve çinko selülazı inhibe edip toplam katalitik aktiviteyi düşüren iyonlardır. Aktiviteleri açısından ham selülazın karakterizasyonu için endoglukanazın farklı substratları kullanılmaktadır. Bununla birlikte, enzimin iki türü arasındaki sinerji, hassas bir ölçümü önlemektedir. Karboksimetil selüloz gibi çözünen bir selüloz türevidir endoglukanaz aktivitesi için substrat olarak kullanılabilir. Enzim rastgele şekilde polimere saldırır ve polimerizasyon derecesinde hızlı bir değişiklik yaratır. Enzimatik reaksiyondan sonra karboksimetil selülaz aktivitesi olarak bilinen indirgen şeker oluşumlarının miktarı belirlenir. Ekzoglukanazların aktivitesinin ölçümü için substratlardan biri olan mikrokristal selüloz kullanılır (Zoppas ve ark., 2013)

2.1.3. Selülağların uygulama alanları

Bu enzimler, gıda, bira ve şarap, tarım, kağıt, tekstil, deterjan, hayvan yemi gibi çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılırlar (Zoppas ve ark., 2013). Selülağ enzimi, bitki protoplastının izolasyonu için yardımcıdır.

2.1.3.1. Gıda endüstrisi

Selülağlar gıda endüstrisinde hemiselülağ ve pektinazlarla birlikte meyve sularının ve yağlı tohumların ekstraksiyonunda kullanılmaktadırlar. Ayrıca meyve sularının filtrasyonunda ve berraklaştırılmasında da önemli bir role sahip olan selülağlar, rengin ve nektarın ekstraksiyon etkinliğini artırıp, meyvelerden pigmentlerin daha iyi şekilde ekstre olmasına olanak sağlamaktadırlar (Zoppas ve ark., 2013).

Selülağın eklenmesiyle nektar verimi artırılabilir ve yüksek sıcaklarda gerçekleşen nektar hazırlanması sırasındaki kirlenme önlenebilmektedir (Saravanan ve ark., 2008).

Selülağlar, nişasta, sükröz gibi alternatif tatlandırıcılarla rekabet halinde olan selülozik materyallerden glikoz şuruplarının üretiminde de kullanılırken, hidroliz edilmiş selüloz fermantasyonla değişik kimyasalların üretimi için de besin kaynağı olarak da kullanılabilir. Ayrıca sitrik asit, asetik asit ve amino asit gibi gıda içeriklerini ve gıda süreçleri için kullanılan enzimleri içermektedirler (Zoppas ve ark., 2013).

2.1.3.2. Tekstil endüstrisi

Tekstil endüstrisinde selülağlar, Biyotaş Yıkama olarak adlandırılan bir uygulama olan kot kumaşlarında fazla boyaların çıkartılmasında kullanılırlar. Bu selülağların eklenmesiyle ilişkili diğer yararlar ise üretimi artırması, iş çevresinde güvenlik koşullarını geliştirmeleridir. Selülağlar ayrıca pilosite ile oluşan yüzey liflerinin uzaklaştırılmasında da kullanılmaktadırlar (Zoppas ve ark., 2013). Bunlara ek olarak tekstil endüstrisinde selülağlar, deterjanlar içerisinde kullanılıp,

kumaşın renginin, parlaklığının korunmasını ve kotların taşlaşmış görünmesini sağlar. Çok fazla yıkamadan sonra, giysiler soluk ve bulanık görünüme sahip olma eğilimi gösterebilirler. Deterjan fabrikaları ürünlerine selüloz ekleyerek renk kaybını azaltmayı amaçlamaktadır (Saravanan ve ark., 2008). Selüloz eklenmesiyle kumaşın yumuşaklığı daha da artmaktadır.

Pamuk kumaş süreçlerinde taşlama ve alkali yıkama gibi fiziksel ve kimyasal yöntemlerle yer değiştirilip selüloz enzimlerinin kullanılması daha etkilidir. Kumaş üzerinde daha az aşınma olmasını sağlamakta, daha ucuzdur ve çevresel etkiyi azaltmaktadırlar. Enzimatik temizlemede, pektinazlar, selülozlar ve proteazların kullanımı ölçülmüştür ve bunlar arasında sinerjik etki olduğu belirlenmiştir. Selülozlar ve pektinazların karışımı diğer birleşimlere göre daha etkilidir. Enzimatik temizlemeler genellikle nötral pH'da gerçekleştirilmektedirler ve pektinazlar bu pH'da optimum olarak çalışıyor olmalarına rağmen çoğu ticari selüloz, optimum aktivitesine asidik pH'da ulaşmaktadır. Bu nedenle her aşamada pH ayarlamasının yapılması gerekmektedir. Selülozlar optimum aktivitelere nötr ve alkali pH da ulaşmışlardır ve yavaş yavaş lif işlem prosesi içine dahil edilmişlerdir. Özellikle kotların boyama ve yıkama süreçlerinde alkali ve nötral pH lekelenmeleri azaltmaktadır (Vega ve ark., 2012).

2.1.3.3. Çamaşır ve deterjan endüstrisi

Selülozlar genellikle deterjanlarda tekstil ürünlerinin temizlenmesinde kullanılmaktadırlar. *Trichoderma reesei* 'den üretilen selülozlar deterjan içinde kullanıma daha uygundur. Ayrıca *Trichoderma viride* ve *Trichoderma harzianum* endüstride selülozların doğal kaynakları olarak kullanılmaktadırlar. Hafif alkali koşulları altında ve yüksek sıcaklıklarda aktif *Humicola* türlerinden üretilen selülozlar genellikle yıkama tozlarına ve deterjanlarına eklenmektedirler (Sukumaran ve ark., 2005).

2.1.3.4. Hayvan yemi endüstrisi

Hayvan yemi sektörü dünya çapında 50 milyar dolardan fazla bir pazar payına doğru hareket etmektedir. Geviş getiren hayvan yemlerinde, pektinazlar ve hemiselülozlar ile birlikte selülozların kullanımı, yem bitkilerinin sindirimini artırmakta, böylece yemin sindirilebilirliğini ve kalitesini de artırmaktadır (Zoppas ve ark., 2013).

2.1.3.5. Kağıt endüstrisi

Kağıt hamuru imalatında selüloz, hamurun kalitesine zarar veren odunsu maddelerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Bu süreçte, *Trichoderma* selülozlarının kullanımı % 20 den % 40 a ulaşabilen bir enerji korunumuna olanak sağlamaktadır. Bu olay zamana ve uygulanan enzimin türüne bağlıdır (Zoppas ve ark., 2013). Ayrıca mürekkebin kullanılmış kağıttan biyolojik olarak uzaklaştırılmasında da selülozlar kullanılmaktadır (Sukumaran ve ark., 2005).

2.1.3.6. Bira ve şarap endüstrisi

Enzim teknolojisi bira ve şarap üretiminde de önemli bir rol oynamaktadır. Bu enzimler biranın kalitesini ve filtrasyonunu artırmaktadırlar. Selülozlar şarap endüstrisinde ise şarabın berraklığını, filtrasyonunu, kalitesini ve aromasını artırmaktadırlar (Bhat ve 2000).

2.1.3.7. Biyoyakıt endüstrisi

Fosil yakıtların azalması ve yenilenebilir enerji kaynaklarına duyulan ihtiyacın artması ile selüloz biyoyakıt üretiminde de kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla selülozlar lignoselülozik biyokütlenin hidrolizini sağlamışlardır.

Lignoselülozik atıklar en yaygın yenilenebilir enerji kaynakları olmasına rağmen kullanımları maliyetli teknolojilerinden dolayı kısıtlanmaktadır. Selüloz, selülozik maddenin glikoza ve diğer basit şekerlere dönüşmesini sağlamak ve mikrobiyal substrat olarak tek hücreli proteinlerin ve etanol gibi değişik

fermantasyon ürünlerinin üretiminde kullanılabilirler. Biyokütleyi dönüştüren selüloz sistemlerinin hiçbiri ticari bir proses için yalnız başına etkili değildirler. Lignoselülozik atıklardan biyoetanol üretiminde biyokütle belli proseslerden geçmektedir ve hemiselüloz ile lignini uzaklaştırmak için ön işlem, selülozik atığı fermante şekerlere indirgemek için 50°C de enzimatik hidroliz ve son olarak hidroliz edilmiş maddeden alkol üretmek için fermantatif bir mikroorganizma kullanılmaktadır.

Biyokütlenin etanol üretimi için veya fermentasyon ürünleri için dönüşümünde saf enzimlerin kullanılması ticari enzimin yüksek maliyetinden dolayı ekonomik değildir. Ticari enzim yerine ürettiğimiz enzimi kullanmak daha uygun olacaktır.

Yaygın kullanımlarından ayrı olarak selülozlar endüstriyel çamurların gideriminde, protoplast neslinin araştırılmasında ve gıdaların korunmasında kullanılan antibakteriyel kitooligasakkaritlerin araştırılmasında da kullanılmaktadırlar (Sukumaran ve ark., 2005).

2.1.4. Selüloz enzimi üretimini etkileyen faktörler

Selüloz enzimi katı hal fermentasyonu ve batık hal fermentasyonu gibi çeşitli yöntemlerle üretilebilmektedir.

Selüloz enzimi üretimi; karbon kaynağı, azot kaynağı, selüloz kalitesi, substratın nem içeriği ve konsantrasyonu, karıştırma hızı, inokulum boyutu ve yaşı, inkübasyon süresi, sıcaklık, pH gibi çeşitli faktörlerden etkilenmekte ve bu faktörlerin üretilen selüloz aktivitesi üzerindeki etkileri kullanılan mikroorganizmalara göre değişmektedir (Otajevwo, 2011).

2.1.4.1. Karbon kaynağı

Karbon kaynağı mikrobiyal fermentasyon ortamının en önemli bileşenlerinden biridir ve bütün hücre içi gelişimi ve metabolizmayı etkilemektedir (Nagar ve ark., 2010). Selüloz üretiminde karboksimetil selüloz, nişasta, maltoz, sükröz, fruktoz, laktoz, galaktoz gibi farklı ticari karbon

kaynakları kullanılabilir. Karboksimetil selüloz ve laktoz enzim üretimi veriminde önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan birçok çalışmada ticari karbon kaynakları arasında karboksimetil selülazın en doğru karbon kaynağı olduğu belirlenmiştir (Muthuvelayudham ve Viruthagiri, 2010).

Karbon kaynağı enzim üretim maliyetini belirleyen en önemli faktördür. Selülaz enzim üretimi pepton, glikoz, maya özütü, potasyum fosfat (KH_2PO_4), amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), magnezyum sülfat (MgSO_4) gibi pahalı besi ortamı bileşenlerini gerektirmektedir. Bu yüzden karbon kaynağı olarak lignoselülozik atıkların kullanılması selülaz enzim maliyetinin düşürülmesi için önemli bir adımdır (Rashid ve ark., 2009). Bir çok çalışmada selülaz üretiminde karbon kaynağı olarak değişik lignoselülozik biyokütleler kullanılmıştır (Jadhav ve ark., 2013), (Purwadaria ve ark., 2004).

2.1.4.2. Azot kaynağı

Enzim üretimi farklı organik ve inorganik azot kaynaklarının derişiminden önemli ölçüde etkilenmektedir. Bacillus türleri için amonyum klorür (NH_4Cl) kullanımı optimum değerleri verirken bazı türlerde optimum değer potasyum nitrat (KNO_3) veya amonyum nitrat (NH_4NO_3) ile sağlanmaktadır (Muthuvelayudham ve Viruthagiri, 2010). Yapılan çoğu çalışmada amonyum sülfatın en uygun azot kaynağı olduğu gözlenmiştir (Padmavathi ve ark., 2012).

2.1.4.3. Substratın nem içeriği

Enzim üretimini etkileyen parametrelerden olan nem miktarının % 40 – 50 arasında olması selülaz üretimi için ideal bir değerdir. Selülaz üretiminde kullanılan substratların daha yüksek nem içeriğinde olması oksijenin içeriye girmesini önler ve bu da kontaminasyona sebep olabilmektedir. Düşük nem içerikli substratlar ise gelişim seviyesini, enzim aktivitesini düşürmekte ve besinlerin ulaşılabilirliğini azaltmaktadır (Maurya ve ark., 2012).

2.1.4.4. Substrat konsantrasyonu

Substrat konsantrasyonunun etkisi substrat çeşidine bağlı olarak değişmektedir. Genellikle % 1 lik konsantrasyona kadar artan aktivite değerleri bu konsantrasyondan sonra azalmaya geçmektedir (Muthuvelayudham ve Viruthagiri, 2010). Yüksek substrat konsantrasyonları enzimin inhibe olmasına neden olurken, düşük substrat konsantrasyonları ise verimi ve hidroliz sırasındaki reaksiyon hızını artırmaktadır (Iqbal ve ark., 2009).

2.1.4.5. İnokulum boyutu ve yaşı

İnokulum boyutunun yaklaşık %10 ve inokulum yaşının yaklaşık 20 saat olduğu durumlarda enzim aktivitesi optimum değerlerine ulaşmaktadır (Iqbal ve ark., 2009, Nagar ve ark., 2010). Bu boyutun artışı aktivitede azalmaya yol açabilmektedir. Fermantasyon süreçlerinde optimum spor yoğunluğu önemli bir faktördür. Daha yüksek miktarda aşılama boyutu nem içeriğini artırıp enzimin düşük aktiviteye sahip olmasına neden olabilmektedir.

2.1.4.6. İnkübasyon süresi

Hidrolitik enzimlerin üretimi genellikle mikroorganizmanın gelişim evresiyle paralel bir şekilde ilerlemektedir. Enzim aktivitesi optimum inkübasyon süresine kadar artmakta ve sonrasında sabitlenip azalmaya başlamaktadır. Bu azalma substrat içerisindeki besinin tükenmesinden kaynaklanabilmekte ve bu inkübasyon süresi substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilmektedir. Enzim üretiminde yüksek konsantrasyonlu substratlar kullanıldığında düşük oksijen transferinden dolayı inkübasyon süresi daha uzundur (Purwadaria ve ark., 2004).

İnkübasyon süresi enzimlerin optimum koşullarda üretiminde en önemli parametrelerden birisidir. Selülaz enzimi üretimi sırasında ortalama 5 günde maksimum aktiviteye ulaşılmaktadır (Muthuvelayudham ve Viruthagiri, 2010).

2.1.4.7. İnkübasyon sıcaklığı

Sıcaklık, mikroorganizmanın gelişim hızını ve miktarını etkileyen ana faktörlerden birisidir. Sıcaklığın artması ile enzim aktivitesinin artışında önemli bir değişim meydana gelmektedir fakat daha yüksek sıcaklıklarda enzim inaktive olmaya başlamaktadır (Thomas ve Ambikapathy, 2011).

Fungal selülozlar ile yapılan çalışmalarda en uygun sıcaklık koşullarının 28°C ile 37°C arasında değiştiği gözlenmiştir. Sıcaklık bu değerlerin üzerine çıktığında aktivitenin azaldığı görülmektedir (Padmavathi ve ark., 2012).

2.1.4.8. Ortam pH' ının etkisi

Fungal selülozlar için optimum pH aralığı türden türe değişmesine rağmen en uygun aralığın 3-6 olduğuna karar verilmiştir (Padmavathi ve ark., 2012). Bakteriyel izolatlardan üretilen selülozlar içinde en yüksek şeker verimi pH ın 6 olduğu ortamda elde edilmiştir. pH' ın azalmasıyla şeker verimi de azalmış ve pH ın 3 olduğu koşulda en düşük değeri elde edilmiştir (Otajevwo, 2014). Bacillus türlerinden üretilen selülozlarda ortam pH' ı 7 nin üzerine çıktıkça enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür (Muthuvelayudham ve Viruthagiri, 2010).

Ayrıca; pH ortamdaki metabolik iyonları ve hücre zarının geçirgenliğini etkilemektedir. (Thomas ve Ambikapathy, 2011).

2.1.5. Selüloz üretim yöntemleri

Herhangi bir süreçte, biyokütle, hücre gelişiminin karakterizasyonu için önemli bir parametredir. Biyosüreçler ikiye ayrılmaktadırlar ve bunların ilki, biyokütlenin üretimini gösterirken, ikincisi metabolitlerin üretimini sağlamaktadır. Birinci durumda, biyokütlenin ölçümü çok önemlidir. Çünkü, katı-hal veya batık fermantasyon süreçlerinin asıl amacı budur. Bu metabolitlerin üretimi biyokütlenin miktarı ile orantılı olabilmektedir. Böylece metabolitler, özellikle ikincil metabolitlerin üretiminin geliştirilmesi için hücre büyümesini geliştirmek amacıyla gereklidirler.

Sıcaklık, pH, su aktivitesi, oksijen seviyesi, besin ve ürünlerin derişimleri gibi çevresel faktörler mikrobiyal gelişimi ve ürün oluşumunu önemli bir şekilde etkilemektedirler (Zoppas ve ark., 2013).

Katı substrat fermantasyonu ile batık fermantasyon arasında doğrudan bir karşılaştırma yapmak hala zordur. Çünkü her iki sistem de birbirinden farklıdır. Örneğin, *Aspergillus* 'tan nötral proteaz üretiminde substrat konsantrasyonu ve fermantasyon hacmi her iki yöntemde de farklıdır. Aynı problem *Aspergillus* 'tan ekzopektinaz üretiminde de geçerlidir (Zhanga ve ark., 2013).

2.1.5.1. Katı hal fermantasyonu

Katı-Hal Fermantasyonu (SSF) terim olarak, serbest formda sıvı olmadan katı substrat varlığında mikroorganizmaların gelişimiyle meydana gelen fermantasyon olarak tanımlanmaktadır. İpliksi mantarlar, lifsel gelişimlerinden ötürü SSF konusunda en çok çalışılan mantarlardır. Mantarların yüzeyde ve substrat tanecikleri içerisinde gelişme özellikleri vardır. Mikroorganizmanın gelişmesi için serbest su esastır, bu su katı destek üzerinde adsorblanmakta ya da katı matris içinde kompleks hale getirilmektedir. Bu yöntem, gıda endüstrisi, yakıt endüstrisi, ilaç endüstrisi gibi mikrobiyal ürünlerin üretildiği sektörler için ne kadar potansiyelli olduğunu kanıtlamıştır (Toor ve İlyas, 2013).

SSF, diğer fermantasyon çeşitlerine göre daha doğal olarak kabul edilmektedir. Çünkü bu sürecin koşulları, doğadaki çoğu mikroorganizmanın yetiştirme koşullarına benzemektedir (Zoppas ve ark., 2013). Az miktarda atık suyun ortaya çıktığı, düşük miktarda enerji gerektiren çevre dostu bir yöntemdir. Düşük su miktarı gerektirdiğinden kontaminasyon riski daha azdır. Bu fermantasyon sırasında sıvı atık çıkmamaktadır (Manpreet ve ark., 2005). Bu fermantasyonun kültür ortamı daha kolaydır ve çoğu katı ortam uygun besinlerle birlikte direkt geliştirilme ortamı olarak kullanılabilir. Gelişim için sınırlayıcı faktör besinlerin difüzyonudur. Ayrıca saflaştırmayı daha kolay, maliyeti daha uygun hale getiren ürün daha yüksek konsantrasyonlarda elde edilebilmektedir. Bu yöntem düşük sermaye yatırımı, düşük işletim giderleri, kolay ekipman ve reaktör hacmi başına yüksek üretiminden dolayı da ekonomik

bir yöntemdir (Iqbal ve ark., 2011). Bu işlem sırasında küçük boyutlu reaktörler kullanılabilir.

Katı substratlar; bakteri, mantar ve maya içeren mikrobiyal ortama muhteşem bir destekleyici ve besleyici bir çevre sağlamaktadırlar (Toor ve İlyas, 2013). Katı hal fermantasyonunun en önemli avantajı ise lignoselülozik atığın substrat olarak kullanılmasıdır. Ek olarak, gelişim koşullarının iplikli mantarların doğal çevrelerine benzer olmasını sağlamaktadırlar. Katı hal fermantasyonunun kullanılmasıyla mikroorganizmayla substrat arasında daha iyi bir etkileşim gerçekleşmekte, böylece daha yüksek enzim konsantrasyonları elde edilebilmektedir (Cunha ve ark., 2011).

Substrat seçimi, esas olarak maliyet ve kullanılabilirlik gibi faktörlere bağlıdır. Diğer faktörler ise tanecik boyutu ve nem miktarıdır. Daha küçük substrat tanecikleri, mikroorganizmaların çoğalması için daha geniş yüzey alanı yaratmaktadırlar. Fakat substrat taneciklerinin çok küçük olması da, solunum verimini engelleyip gelişimin yavaş gerçekleşmesiyle az miktarda enzim üretilmesine neden olacaktır. Geniş partikül ile daha verimli bir havalandırma ve solunum gerçekleşebilmektedir. Bu da yüzey alanında düşüş meydana getirmektedir. Bu yöntemde substratın nem içeriği optimize edilerek, su miktarının daha yüksek veya daha düşük olmasının mikrobiyal aktiviteyi ters yönde etkileyebilmesi önlenmelidir (Sadhu ve Maiti, 2013).

Katı hal substrat fermantasyonunda daha iyi oksijen sirkülasyonu mevcuttur. Fakat batık fermantasyona göre süreç parametrelerinin kontrolü daha zordur. Daha yüksek kirlilikte ürün üretimi gerçekleştiği için daha yüksek maliyetli ürün geri dönüşümü gerçekleşmektedir (Demir ve ark., 2011).

2.1.5.2. Batık substrat fermantasyonu

Batık fermantasyon, batık yetiştirme olarak da bilinir ve esas özelliği çözünebilir besinlerle birlikte sıvı bir fermantasyon ortamı kullanılmasıdır. Bu fermantasyon süreci çalkalanabilir erlenlerde, fermantör üzerinde veya endüstriyel ölçekli bir fermantörde gerçekleştirilebilmektedir. Kuvvetli karıştırma, difüzyonu kolay hale getirmektedir. Bu tip fermantasyonda substrat, suyun limitleyici faktör

olmadığı bir su kaynağında çözülür veya asılır. Ayrıca bu fermentasyon türü farklı metabolitlerin oluşumunu da sağlayabilmektedir. Bunların arasında, enzimler, antibiyotikler, organik asitler, amino asitler ve yeniden birleştirilmiş proteinler bulunmaktadır.

Çoğu ticari enzim, fermentasyon kontrolünün daha kolay olması, verimin yüksekliği, maliyetin ve kontaminasyon riskinin daha düşük olması dolayısıyla batık fermentasyon ile üretilmektedir. Bu işlemde sıvı miktarı fazla olduğundan geniş ölçekli biyoreaktörler gerekmektedir. Dolayısıyla bol miktarda sıvı atık ortaya çıkmaktadır (Manpreet ve ark., 2005).

Su altında ipliksi mantarların başarılı bir şekilde yetiştirilmesi için çeşitli değişkenlerin çalışılması gereklidir. pH, sıcaklık, oksijen tüketimi ve karbondioksit oluşumu gibi parametreler ölçülüp, sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir.

Batık yetiştirme iki yolla gerçekleştirilebilmektedir. Bunlar, pH ve oksijen transferinin kontrolünün zor olduğu karıştırmalı inkübatör içerisinde veya sıcaklık, pH, karıştırma hızı ve basınç gibi değişken parametrelerin kontrolünü sağlayan biyoreaktörlerde gerçekleştirilmesidir. Batık prosesin en önemli avantajları, fizikokimyasal özelliklerin kolayca kontrol edilmesi, besin absorpsiyonunun yüksek verimi ve hücre boyunca metabolitlerin salgılanması ve verimlilik kazançlarıdır.

Fakat yüksek viskoziteli reaksiyon ortamı kullanıldığında havalandırma ve karıştırma maliyeti çok yüksektir. Bu durum batık prosesin dezavantajı olarak sayılabilmektedir (Zoppas ve ark., 2013).

Batık fermentasyonda kullanılan organizmanın genotipine ve kültür şartlarına bağlı olarak ipliksi mikroorganizmaların morfolojisi, pelletlenmiş ve dağınık biçimler arasında değişmektedir. Dağınık biçimler serbestçe dağılmış ve kümelenmiş organizmaları içerirken, pelletler iyice dolanmış, birkaç yüz mikrometre ve birkaç milimetre boyut aralıklarındaki hiflerin ölçülmüş kütlelerinden oluşmaktadır. Serbest ipliksi miselyum, yüksek viskoza ve gaz-sıvı kütle transferininin azaldığı fermentasyon ortamına yol açmakta ve fermentör içerisindeki besi ortamının homojenitesini sağlar. Pelletler iç kütle transferini kısıtlamaktadır (Dominguesa ve ark., 2000).

Besince zengin besin ortamlarında kapalı kaplar içerisinde gelişmekte ve yüksek oksijen derişimine ihtiyaç duyan mikroorganizmalar besinleri yıkararak, istenen enzimleri çözeltilinin içine salmaktadırlar. Geniş ölçekli fermantasyon teknolojilerinin gelişimiyle mikrobiyal enzimlerin üretimi biyoteknolojik endüstrilerin toplam giderlerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Fermantasyon geniş hacimli fermantörlerde gerçekleşmektedir. Fermantasyon ortamı; şeker, soya gibi yenilenebilir hammaddelere bağlı olarak besinleri sterilize ederken, çoğu endüstriyel enzim karbon ve azot kaynaklarını parçalamak üzere mikroorganizmalar tarafından fermantasyon ortamına salgılanmaktadır. Kesikli beslemeli ve sürekli fermantasyon süreci yaygın olarak kullanılmaktadır. Kesikli beslemeli süreçte, sterilize edilmiş besinler biyokütlenin gelişimi sırasında fermantöre eklenirken, sürekli süreçte, sterilize sıvı besinler, fermantasyon ortamı sistemi terk ederken aynı akış hızında fermantöre beslenmektedirler. Fermantör böylece yatışkın bir hale gelmektedirler. Sıcaklık, pH, oksijen tüketimi ve karbondioksit oluşumu fermantasyon sürecinin optimizasyonu için ölçülmekte ve kontrol edilmektedirler (Renge ve ark., 2012).

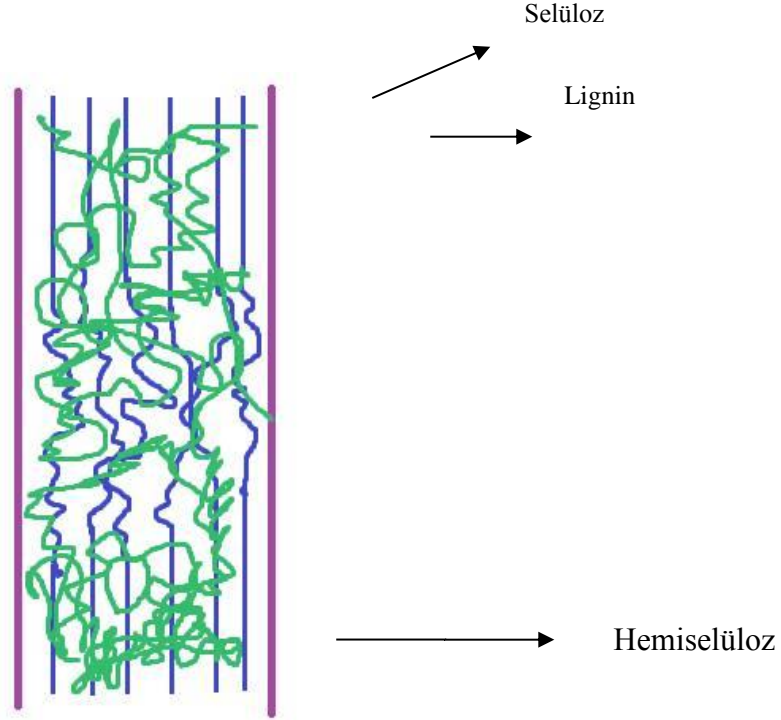
İlk olarak, fermantasyon ortamından enzimlerin alınma işlemi genellikle santrifüj ile gerçekleşmektedir. Biyokütle, gübre olarak geri kazanılabilir, fakat ilk olarak, içerisindeki mikroorganizmalar inaktive edilmelidirler. Geri kalan çözeltideki içindeki enzimler evaporasyon, membranfiltrasyon ve kristalizasyon ile geri kazanılabilmektedir.

2.2. *Myceliophthora hinnulea*

İlk olarak Awao ve Udagawa tarafından 1983 yılında belirlenen *Myceliophthora hinnulea* termofilik bir mantardır. Bu mantar PDA ortamında yetiştirilmektedir ve sporlanması 40°C ve 50°C sıcaklıkları arasında daha yaygındır. Bu türün minimum yetiştirilme sıcaklığı 22°C iken, optimum sıcaklığı 45°C, ve maksimum yetiştirilme sıcaklığı ise 55°C'dir. (http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802250027)

2.3. Lignoselülozik Biyokütle

Bu yapı esas olarak, selüloz ve hemiselüloz gibi yapısal karbonhidratlar ve heterojen fenolik polimer olan ligninden oluşmaktadır.



Şekil 2.1. Lignoselülozik biyokütle

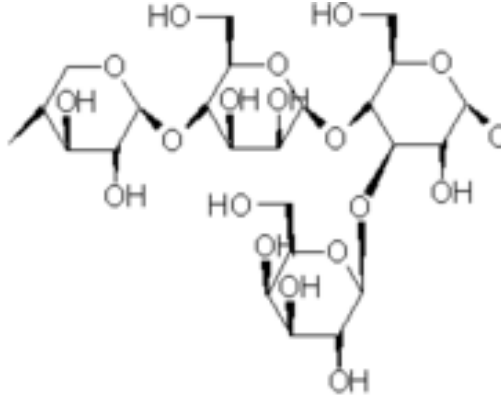
Bununla birlikte lignoselülozik biyokütlenin içeriği türlere, iklime, toprak verimliliğine ve gübrelemeye bağlı olarak değişmektedir. Mısır koçanı, buğday ve pirinç sapı gibi tarımsal atıklar yaklaşık olarak %40 selüloz, % 30 hemiselüloz ve %15 lignin içermektedirler. Birincil hücre duvarı hücre bölünmesiyle geliştirilmiştir. Kristal selüloz; mikrolifler ile hemiselüloz polisakkaritlerinin matrisi içerisine gömülmüştür. Komşu hücrelerin temel duvarları orta lamel olarak adlandırılan pektinlerden oluşan yapışkan bir tabaka ile tutturulmuş olup bunun amacı, iletken doku oluşturmak üzere çok sayıda vasküler demetler halinde düzenlenmesidir (Zhao ve ark., 2012).

Çizelge 2.1. Lignoselülozik biyokütle kaynakları ve bileşimleri

Ham Madde	Hemiselüloz (%)	Selüloz (%)	Lignin (%)	Diğer (kül, v.s.)
Tarımsal Atıklar	25-50	37-50	5-15	12-16
Sert odun	25-40	45-47	20-25	0,80
Yumuşak odun	25-29	40-45	30-60	0,50
Çimler	35-50	25-40	-	-
Atık Kağıtlar	12-20	50-70	6-10	-
Gazete	25-40	40-55	18-30	-

2.3.1. Hemiselüloz

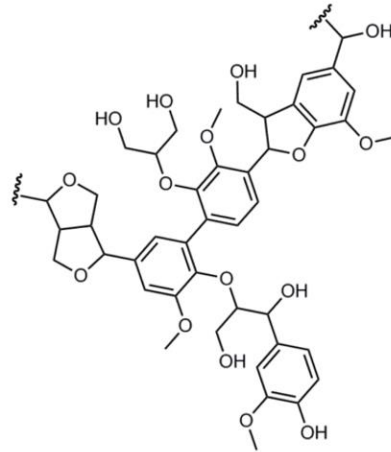
Hemiselüloz; glikoz, galaktoz, mannoz gibi heksozları, ksiloz, arabinoz gibi pentozları ve glukuronik, galakturonik ve metil galakturonik asit gibi şeker asitlerini içeren şekilsiz, değişken yapıda formları olan bir heteropolimerdir. Hemiselülozun ana zinciri, birincil olarak ksiloz (%90) ve arabinoz (%10) içeren β -1-4 bağlı ksilandan oluşmaktadır. Hemiselüloz içerisinde en çok bulunan bileşen ksilan olmasına rağmen ksilan derişimi her biyokütlede değişmektedir (Zhao ve ark., 2012). Selülozdan daha düşük molekül ağırlığına sahip olan hemiselüloz farklı şekerlerden oluşan kolay hidroliz edilebilir kısa zincirlerden oluşmaktadır. Selüloza göre daha şekilsizdirler, selüloz ve lignin lifleri arasında bağlantı görevi görmektedirler. Bütün selüloz, hemiselüloz lignin ağına sertlik vermektedirler (Limayem ve Ricke, 2012). Hemiselülozun en önemli bileşeni olan ksilan hemiselülozun kolay ekstre edilebilir kısmıdır ve asit veya alkali bir ortamda daha iyi şekilde ekstre edilebilmektedir.



Şekil 2.2. Hemiselüloz yapısı

2.3.2. Lignin

Lignin, kovalent bağlar aracılığı ile hemiselüloza bağlanmış 10000 Dalton molekül ağırlığına sahip aromatik, sert ve suda çözünmeyen inaktif bir biyopolimerdir. Esas olarak üç ana bileşenden meydana gelen ligninin ana bileşenleri, koniferil alkol, sinapil alkol ve p-kumaril alkoldür (Zhao ve ark., 2012). Selüloz ve hemiselülozdan sonra doğada en fazla bulunan polimer olan lignin hücresel duvar içerisinde yer almaktadır. Üç farklı fenilpropan birimlerinden oluşur ve şekilsizdir. Ligninin asıl amacı bitkiye destek sağlamak, mikrobiyal saldırı ve strese karşı direnç sağlamaktır. Orman ağaçları birincil olarak selüloz ve lignin polimerlerinden oluşmaktadır. En yüksek lignin seviyesine sahip olan bitkiler yumuşak ağaçlardır. Ligninin biyodönüşüm sürecinin ekonomik performansı üzerinde önemli bir etkisi vardır. Çünkü mikrobiyal gelişim ve fermantasyondaki çoğu inhibitörler ön işlem ve enzimatik hidroliz sırasında bu bileşenden gelmektedirler. Bu arada selülozdan sonra biyokütle içerisinde en çok bulunan bileşen olan lignin, yakıldığında bol miktarda enerji vermekte ve çevre dostu bir teknoloji olan kombine ısı ve güç üretimi için iyi bir seçimdir. Ayrıca taşıma yakıtları ve katma değer kimyasalları içeren değişik ürünler için lignin harika bir başlangıç materyalidir. Biyoetanol üretimini daha ekonomik hale getirebilmektedir (Hendriks ve Zeeman, 2009).



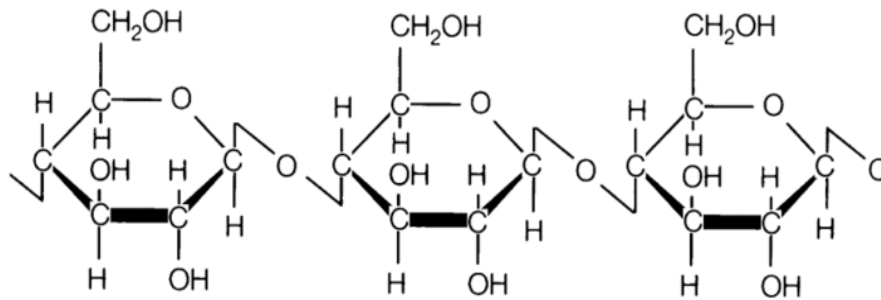
Şekil 2.3. Lignin yapısı

2.3.3. Selüloz

Selüloz β -1-4 glikosidik bağlarla bağlanmış β -1-4 glikoz birimlerinden oluşan dalsız bir glikoz polimeridir. Yılda 10^{10} ton sentezlenme hızıyla biyo dönüşümlerde en çok kullanılan moleküldür. Mantar ve bakteriler, hidrolitik ve oksidatif enzimleri kullanarak bu makro molekülleri parçalayabilmektedirler (Acharya ve ark., 2008).

Ayrıca, bu polimer yenilenebilir enerji üretiminde de çok önemli bir role sahiptir (Jeya ve ark., 2009). Selüloz molekülleri enzimatik hidroliz için dayanıklı, yüksek mukavemetli kristal bölge ve kristal olmayan (şekilsiz) bölgeden oluşmaktadırlar. Özellikle kristal bölgeler enzimatik hidroliz için daha dayanıklıdır (Howard ve ark.,2003). Bu bölgeler, çok serttir ve doğrusal zincirin paralel yapılanmasıyla oluşmaktadırlar. Onların bu paralel yapılanması selülozun çözünmezliğini sağlamaktadır. Şekilsiz bölgeler ise diğer kısımlara göre, daha zayıf bağlı selüloz zincirinden oluşmaktadır ve bu onları enzimatik hidroliz için daha elverişli hale getirmektedir (Kiramanyi ve ark., 2012).

Selülozlar, selülaz enzimleriyle glikoza hidroliz edilen lignoselülozik biyokütlenin ana bileşenidirler. Selülozik biyokütle sık kullanılan yenilenebilir bir enerji kaynağıdır ve geniş malzeme çeşitliliği içermektedir. Dünya çapında kullanılabilirliği, şekerlere, alternatif yakıtlara ve kimyasal hammaddelere dönüşüm potansiyeli selülozik materyallerin bozunmasının araştırılmasını artırmaktadır (Jeya ve ark., 2009). Bu yöntem maliyeti de azaltmasından dolayı ekonomik olarak da çok elverişlidir. Selüloz bitki derişiminin yaklaşık olarak %30 unu kapsamaktadır (Limayem ve ark., 2009).



Şekil 2.4. Selülozun yapısı

2.4. Yanıt Yüzey Yöntemi

Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology, YYY) matematiksel ve istatistiksel yöntemlerin bir birleşimidir. Çeşitli değişkenlerden etkilenen ilgilenilen cevaptan oluşan problemin analizinde ve modellenmesinde kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemin amacı cevabın optimize edilmesidir. Örneğin bir kimya mühendisinin bir sürecin veriminin (y) maksimize edilmesi için sıcaklık (x_1) ve basıncın (x_2) seviyelerini bulmaya çalıştığını düşünelim:

$$y = f(x_1, x_2) + \varepsilon \quad (2.1)$$

ε ; y cevabında gözlenen gürültü veya hata olarak gösterilmektedir. Eğer beklenen cevap $E(y) = f(x_1, x_2) = \eta$ ile gösterilirse, yüzey $\eta = f(x_1, x_2)$ olarak ifade edilmekte ve yanıt yüzeyi olarak adlandırılmaktadır.

Çoğu Yanıt Yüzey Yöntemi probleminde cevap ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişki bilinmemektedir. Buna göre Yanıt Yüzey Yöntem'lerinde ilk adım y ve bağımsız değişkenler arasındaki doğru kullanışlı yaklaşımı bulmaktır. Genellikle bağımsız değişkenlerin bazı bölgelerinde düşük dereceli polinom çalışılmıştır. Eğer cevap bağımsız değişkenin lineer fonksiyonu ile iyi bir şekilde modelleniyorsa fonksiyon **birinci derece modeldir**.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (2.2)$$

Eğer sistemde bir eğrilik varsa **ikinci derece model** gibi daha yüksek dereceli polinomla çalışılmalıdır.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.3)$$

Neredeyse bütün Yanıt Yüzey Yöntemi problemleri bunların biri ya da ikisini kullanmaktadır. Tabiki de polinom model tüm bağımsız değişkenlerin doğru fonksiyonel ilişkisine uygun bir yaklaşım oluşturması imkansızdır fakat; küçük bir bölgede iyi çalışmaktadır. Yanıt yüzey analizleri döşenmiş yüzey kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Eğer uygun yüzey doğru cevap fonksiyonunun yeterli bir yaklaşımı ise uygun yüzeyin analizi yaklaşık olarak güncel sistemin

analizlerine uygun olacaktır. Verilen toplanmasında uygun deneysel tasarımları kullanılırsa model faktörleri en etkili biçimde tahmin edilebilmektedir. Uygun cevap yüzeyleri için tasarımlar cevap yüzey tasarımları olarak adlandırılmaktadırlar.

Yanıt Yüzey Yöntemi ardışık bir prosedürdür. Genellikle cevap yüzeyinde optimumdan uzak bir nokta ele alındığında sistemde küçük bir eğim oluşturmada ve birinci derece model bu durumda daha uygun hale gelmektedir. Burada amaç deneyin hızlı yapılmasına ve optimum nokta etrafında verimli bir şekilde gelişimine yol açmaktır.

Yanıt Yüzey Yönteminin asıl amacı; sistemin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi veya çalışma gerekliliklerini karşılayan faktör bölgesini belirlemektir (Montgomery, 2000).

2.5. Önceden Yapılmış Çalışmalar

Muthuvelayudham ve Viruthagiri (2010), *Trichoderma reesei*'den selüloz üretimini gerçekleştirirken karbon kaynağı olarak muz lifi ve pirinç samanını kullanmışlardır. Yanıt Yüzey Yöntemini kullanarak sıcaklık, substrat derişimi, indüleyici derişimi, pH, inokulum yaşı ve karıştırma hızı faktörlerinin optimizasyonunu sağlamışlardır. Substrat konsantrasyonu en etkili parametre olarak belirlenmiştir.

Murad ve Azzaz (2013), *Aspergillus flavus* NRRL 5521 selüloz üretiminde %10 pirinç samanı, %7 inokulum boyutu, 48 saatlik inkübasyon süresi pH 7 olan gelişim ortamı ve azot kaynağı olarak maya özütü kullanarak maksimum selüloz üretimine (0,11 IU/ml/dak) ulaşmışlardır.

Ramanathan ve ark. (2010), *Fusarium oxysporum*'dan selüloz üretiminde optimum koşulları 50°C sıcaklık, pH 6 olan ortam, 12 günlük inkübasyon süresi olarak belirlemişlerdir. Bu koşullar altında karbon kaynağı olarak da %1 karboksimetil selüloz kullanılmıştır.

Thomas ve Ambikapathy (2011), *Hormodendrum cladosporioides*'dan farklı üç yaprak sapı karbon kaynağı olarak kullanılarak selüloz enzimini üretmişlerdir. Selüloz aktivitesi 1,832 IU/ml bulunmuştur. Selüloz üretimi için optimum pH 5, sıcaklık 30°C, inkübasyon süresi ise 5 gün olarak gözlenmiştir.

120 rpm çalkalama hızında batık fermantasyon daha yüksek selüloz verimine olanak sağlamıştır.

Malik ve ark. (2010), maksimum selüloz üretimini (CMCase 1.57 U/ml/dak, FPase 0.921 U/ml/dak) 72 saatlik fermantasyon süresi sonunda 30°C sıcaklık ile elde etmişlerdir. Sonrasında besi ortamının pH ı optimize edilmiş ve en iyi gelişim ve enzim üretimi (CMCase 1.66 U/ml/dak ve FPase 0.932 U/ml/dak) pH 5,5 iken elde edilmiştir. Mikroorganizma olarak ise *Trichoderma viride* türünü kullanmışlardır.

Kiranmayi ve ark (2012), *Trichoderma reesei*’ den selüloz enzimi üretirken karbon kaynağı olarak muz kabuğu tozu ve hindistan cevizi tozu kullanmışlardır. En yüksek aktiviteye her iki karbon kaynağında da pH 6, sıcaklık 40°C iken 144 saatlik inkübasyon sonunda ulaşmışlardır.

Maurya ve ark. (2011), farklı karbon kaynakları kullanarak *Trichoderma reesei*’den selüloz üretmişlerdir. pH, sıcaklık, nem içeriği, substratın partikül boyutu gibi parametrelerin etkisini incelemişlerdir. Maksimum selüloz aktivitesini karbon kaynağı olarak buğday kepeği kullanıp 2,63 U/ml olarak elde etmişlerdir. Buğday kepeği için optimum koşulları başlangıç nem miktarı %70, ortam pH ı 5, sıcaklık 30°C ve substratın partikül boyutu 500 µm olarak belirlemişlerdir.

Devi ve Kumar (2012), *Aspergillus niger* ‘den selüloz enzimi üretmişlerdir. Maksimum selüloz aktivitesine (3,9 IU) 45°C sıcaklıkta, ortam pH ı 5 iken 7 günlük inkübasyon süresi sonunda ulaşmışlardır. Substrat olarak kağıt selülozu kullanmışlardır.

Singh ve ark (2009), *Aspergillus Heteromorphus*’dan substrat olarak buğday sapı kullanarak selüloz enzimi üretmişlerdir. En yüksek sonuca (3,2 IU/ml) 5 günlük inkübasyon sonunda pH 5 iken 30°C sıcaklıkta ulaşmışlardır.

Niranjane ve ark (2007), selüloz enzim üretimine farklı karbon kaynaklarının etkisini incelemişlerdir. Maksimum selüloz verimini karboksimetil selüloz kullanımı vermiştir.

Al-Ka’aby (2012), karbon kaynağı olarak testere talaşını kullanarak *Aspergillus niger* ‘den selüloz enzimi üretmişlerdir. Bu üretimde optimum pH değeri 4-5, sıcaklık 35°C, inkübasyon süresi ise 96 saat olarak belirlenmiştir.

Folakemi ve ark. (2008), *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus niger* ve *Saccharomyces cerevisiae* kullanarak selülozik ananas atığından selüloz üretmişlerdir. pH, substrat konsantrasyonu, inokulum boyutu ve sıcaklık parametrelerinin değişimiyle üretilen glikoz miktarını optimize etmişlerdir. *Trichoderma longibrachiatum*' la yapılan üretimde en yüksek miktarı pH 4,5, sıcaklık 45°C ve 7 günlük fermantasyon sonunda elde etmişlerdir. *Aspergillus niger*' le yapılan üretimde ise en yüksek miktarı pH 3,5, sıcaklık 40°C sıcaklık ve 5 günlük fermantasyon süresinde belirlemişlerdir. *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan üretimde pH 4,5, sıcaklık 45°C ve üretim süresi 5 gün iken en yüksek miktara ulaşmışlardır.

Ijaz ve ark. (2011), *Alternaria alternata* katı hal fermantasyonu ile kültür edilip, mısır koçanı gibi tarımsal atıkları kullanarak selüloz üretimini amaçlamışlardır. Optimum kültür şartlarını 35°C ve pH 6.0'da 96 saat inkübasyon olarak belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada selüloz üretiminde kullanılan *Myceliophthora hinnulea* Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarları'nda izole edilmiştir. Bu mikroorganizma Türkiye'de kaplıca sularından izole edilerek tanımlanmıştır.

Üretilen selülozün FPU aktivitesi belirlenirken Whatman 1 no 'lu filtre kağıdı kullanılmıştır. Aktivite tayini sırasında kullanılan kimyasallardan 3-5 dinitrosalisilik asit, potasyum sodyum tartarat tetrahidrat, sodyum metabisülfid ve fenol Merck Millipore'dan, sodyum hidroksit ise Sigma Aldrich'den satın alınmıştır.

Farklı karbon kaynakları olarak kullanılan fındık kabuğu Trabzon Beşikdüzü'nden, haşhaş sapı Afyon Alkaloid Fabrikasından ve ayçiçek sapı da Trakya Bölgesi'nden temin edilmiştir.

Fındık kabuğuna uygulanan ön işlemler yüksek basınç (3000 psi) ve sıcaklığa (350°C) dayanıklı paslanmaz çelik kesikli Parr (Illinois, USA) reaktörde gerçekleştirilmiştir. Diğer ön işlemler için GFL (Burgwedel, Almanya) marka su banyosu kullanılmıştır. İnkübasyon işlemleri Sartorius marka çalkalamalı inkübatörde (Goettingen, Almanya) gerçekleştirilmiş, selüloz aktivitesi Shimadzu UV-Vis 1800 spektrofotometresi (Kyoto, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Hidroliz ürünleri olan monomerik şekerlerin miktar tayinleri Agilent marka (Almanya) Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizmanın tanımlanması

İlk olarak mikroorganizmanın Cooney ve Emerson 'a göre mikroskopik ve makroskopik testler kullanılarak morfolojik tanımı gerçekleştirilmiştir (1964). Mantar genomik DNA, cam boncuk ezme yöntemi kullanılarak vortexleme yöntemi ile çıkartılmıştır (Van Burik et al, 1998). ITS (ITS I, ITS II, ve 5.8S rRNA geni) bölgesi için kodlanmış DNA genel öncüller kullanılarak güçlendirilmiştir. Geniş alt birim rDNA'nın aşırı değişken D1/D2 bölgesinin

güçlendirilmesi LR0R ve LR3 birincil çiflerinin kullanımı ile gerçekleştirilmiştir (Sharma et al, 2009). Seri analizler, Boya Terminatör Döngüsünü Sıralayan Hızlı Başlangıç Seti (Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit) (Beckman Coulter) ile gerçekleştirilmiş ve reaksiyonlar, Agencourt CleanSEQ Kit (Beckman Coulter) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış sıralı reaksiyonlar Beckman Coulter CEQ 8000 Genetik Analiz Sistemi'nde analiz edilmiştir. ITS ve D1/D2 bölgelerinin tanımlanması, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi veri tabanından alınan benzer dizilerin BLAST kullanılarak sıralanması ile gerçekleştirilmiştir. (Berikten ve Kıvanç, 2014).

3.2.2. Mikroorganizmaların hazırlaması

Selülaz üretimi için kullanılacak olan funguslar Potato Dextrose Agar (PDA) ortamına inokule edilip ve 45 °C' de 7 günde geliştirilmiştir. Bu fungus kolonilerinden alınan sporlar % 0,1'lik steril tween 80 süspansiyonu içerisine alınmış ve thoma lamı yardımı ile mikroskopta spor sayımları gerçekleştirilmiştir ve spor sayıları 10⁸ spor/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.3. İnokulantın hazırlanması

Belirli sayıdaki spor miktarına ayarlanmış olan fungus spor süspansiyonları takip edilecek olan deney sayısına bağlı olarak hacmi ayarlanan ve Çizelge 3.1'de bileşimi verilmiş olan inokulasyon besiyerine inokule edilmiştir ve 150 rpm'de ve 45°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda geliştirilmiş olan inokulantın her 25 ml selülaz üretim ortamı için 1 ml kullanılmıştır.

3.2.4. Selülaz üretimi

Myceliophthora hinnulea kullanılarak selülaz enzimi üretiminde karbon kaynağı olarak karboksimetil selüloz içeren besiyeri (Çizelge 3.2) kullanılmıştır. Besiyeri ortamı içerisinde belirli spor/ml miktarında spor olacak şekilde ayarlanmış inokulant aşılanmıştır. 45°C, 150 rpm, pH 4,5 ile sabit tutulan ortamda 7 gün süren inkübasyon süresi boyunca alınan numunelerde selülaz aktivitesi belirlenmiş ve maksimum aktivite miktarına 5.gün sonunda ulaşılmıştır.

Daha sonra 5 günlük inkübasyon süresi sabit tutularak üretim parametrelerinin Box Behnken Deneş Tasarımı ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Selülaş İnokulasyon Besiyeri İçeriğı

<i>Kimyasal Adı</i>	<i>Miktarı (g/1000 ml distile su)</i>
TrisodyumSitrata ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	5
Potasyum Fosfat (KH_2PO_4)	5
Amonyum Nitrat (NH_4NO_3)	2
Amonyum Sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	4
Magnezyum Sülfat (MgSO_4)	0,2
Pepton	1
Maya Özüü	2
Glikoz	10

Çizelge 3.2. Selülaş Üretim Besiyeri İçeriğı

<i>Kimyasal Adı</i>	<i>Miktarı (g/1000 ml distile su)</i>
TrisodyumSitrata ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	5
Potasyum Fosfat (KH_2PO_4)	5
Amonyum Nitrat (NH_4NO_3)	2
Amonyum Sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	4
Magnezyum Sülfat (MgSO_4)	0,2
Pepton	1
Maya Özüü	2
Karboksimetilselüloş	10

3.2.5. Selülaz üretim parametrelerinin yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu

Selülaz üretim parametrelerinin yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu deneylerinde 27 deneysel noktadan üç tekrarlı 4 değişkenden oluşan Box Behnken Deneysel Tasarımı Yöntemi kullanılmıştır. İncelenen pH (X_1), sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) (X_2), spor sayısı (X_3) ve kültür yaşı (saat) (X_4) parametrelerinin seviyeleri Çizelge 3.3. de, bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu ise Çizelge 3.4. de gösterilmiştir.

Cevap (Y) değerini belirlemek için önerilen ikinci derece polinom model eşitliği Eşitlik 3.1'de gösterilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 \quad (3.1)$$

Verilerin istatistiksel olarak modele uygunluk analizleri %95 güven aralığında ANOVA testi ile Minitab 16 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. Selülaz üretiminde incelenen parametreler ve seviyeler

Faktörler	Seviyeler		
	-1	0	1
X_1 : pH	4	5,25	6,5
X_2 : Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	35	45	55
X_3 : Spor sayısı(spor/ml)	1×10^6	5×10^9	1×10^{10}
X_4 :Kültür yaşı (saat)	24	60	96

Çizelge 3.4. Selülag üretiminde bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonları

Deney No	pH	T(°C)	Sporsayısı (spor/ml)	Kültür yaşı (saat)
1	5,25	35	1x10 ¹⁰	60
2	4,00	35	5x10 ⁹	60
3	5,25	45	1x10 ⁶	96
4	5,25	45	5x10 ⁹	60
5	5,25	35	5x10 ⁹	96
6	5,25	55	1x10 ⁶	60
7	5,25	45	5x10 ⁹	60
8	6,50	45	5x10 ⁹⁹	24
9	4,00	45	1x10 ¹⁰	60
10	5,25	55	1x10 ¹⁰	60
11	6,50	45	5x10 ⁹	96
12	5,25	55	5x10 ⁹	96
13	5,25	45	5x10 ⁹	60
14	5,25	35	5x10 ⁹	24
15	5,25	55	5x10 ⁹	24
16	5,25	45	1x10 ¹⁰	24
17	6,50	45	1x10 ¹⁰	60
18	6,50	45	1x10 ⁶	60
19	4,00	45	5x10 ⁹	96
20	5,25	35	1x10 ⁶	60
21	4,00	55	5x10 ⁹	60
22	4,00	45	1x10 ⁶	60
23	6,50	35	5x10 ⁹	60
24	5,25	45	1x10 ¹⁰	96
25	4,00	45	5x10 ⁹	24
26	6,50	55	5x10 ⁹	60
27	5,25	45	1x10 ⁶	24

3.2.6. Selülag üretiminde farklı karbon kaynaklarının kullanımı

Optimizasyon sonucunda belirlenen selülag üretimini maksimize edecek koşullar altında farklı lignoselülozik karbon kaynakları kullanılarak selülag üretimi gerçekleştirilmiştir (pH = 6,1, sıcaklık = 38°C, spor sayısı = 1x10¹⁰ spor/ml, kültür yaşı = 24 saat). Substrat olarak ticari karboksimetil selülag yerine %1 ve %2 oranlarında alkali ön işlem görmüş fındık kabuğu, ayçiçeği sapı ve

haşhaş sapı gibi lignoselülozik atıklar kullanılmış, yedi günlük inkübasyon süresi boyunca alınan numunelerde ve selüloz enzimi aktivitesi belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. %1 lik farklı karbon kaynaklarının selüloz üretim besi yeri içeriği

<i>Kimyasal Adı</i>	<i>Miktarı (g/100 ml distile su)</i>
TrisodyumSitrata (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	0,5
Potasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	0,5
Amonyum Nitrat (NH ₄ NO ₃)	0,2
Amonyum Sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0,4
Magnezyum Sülfat (MgSO ₄)	0,2
Pepton	0,1
Maya Özütü	0,2
Lignoselülozik biyokütle	1

Çizelge 3.6. %2 lik farklı karbon kaynaklarının selüloz üretim besi yeri içeriği

<i>Kimyasal Adı</i>	<i>Miktarı (g/100 ml distile su)</i>
TrisodyumSitrata (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	0,5
Potasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	0,5
Amonyum Nitrat (NH ₄ NO ₃)	0,2
Amonyum Sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0,4
Magnezyum Sülfat (MgSO ₄)	0,2
Pepton	0,1
Maya Özütü	0,2
Lignoselülozik biyokütle	2

3.2.7. Lignoselülozik biyokütlenin selülozca zenginleştirilmesi

Biyokütlenin selülozca zenginleştirilmesi için, lignoselülozik atıklara, deneysel koşulları daha önce yapılmış çalışmalarla belirlenmiş alkali ön işlem uygulanmıştır. Bütün ön işlemler sonrasında hammadde filtre kağıdıyla süzülüp saf su ile nötrleştirildikten sonra kurutulmuş ve Eşitlik 3.2.'deki gibi yüzde toplam

gravimetrik geri kazanım hesaplanmıştır. Ön işlem sonrası hammaddedeki selüloz, hemiselüloz ve lignin miktarları belirlenmiştir.

$$\% \text{ Toplam Grav. Kazanım} = \frac{\text{Ön işlem Sonrasında Kalan Katı (gr)}}{\text{Başlangıçtaki Kuru Madde Miktarı (gr)}} * 100 \quad (3.2)$$

3.2.7.1. Fındık kabuğuna uygulanan alkali ön işlem

Alkali ön işlem için % 5,25 (a/h) konsantrasyonundaki NaOH çözeltisi kullanılmıştır. Öğütülmüş (ortalama partikül boyutu 0,224 - 0,850 µm) fındık kabuğuna uygulanan ön işlem 180°C de, 1:5 katı sıvı oranında, 30 dak kesikli Parr reaktörde gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.2. Ayçiçeği sapına uygulanan alkali ön işlem

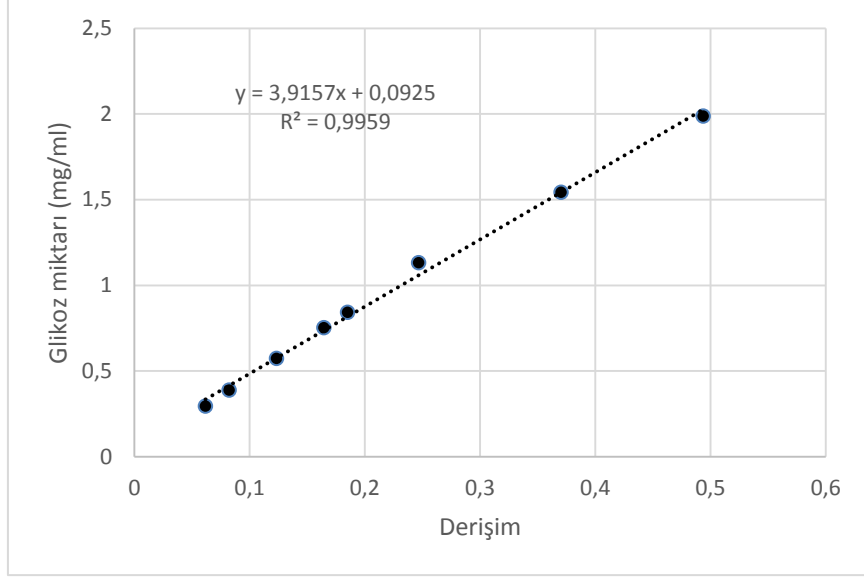
Alkali ön işlem için % 2 (a/h)'lik sodyum hidroksit çözeltisi kullanılmıştır. Öğütülmüş (ortalama partikül boyutu 0,224 - 0,850 µm) ayçiçeği sapına uygulanan ön işlem %2 lik NaOH ile 1:20 katı sıvı oranı kullanılarak, 90 °C de, 60 dak su banyosunda gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.3. Haşhaş sapına uygulanan alkali ön işlem

Öğütülmüş haşhaş sapsarı (ortalama partikül boyutu 0,224 - 0,850 µm) % 2,4 (a/h)' lük NaOH çözeltisi ile 80°C de, 1:20 katı sıvı oranında, 70 dak su banyosunda ön işleme tabi tutulmuştur.

3.2.8 Selüloz aktivitesinin belirlenmesi

Selüloz aktivitesi filtre kağıdı ünitesi (FPU) cinsinden belirlenmiştir. Selülozun hidroliz ürünü olan glikoz miktarı indirgen şeker olarak Dinitrosalisilik (DNS) reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. (Miller, 1959, Ghose, 1987). Glikoz miktarları saf glikoz çözeltileri kullanılarak hazırlanmış mg/ml glikoz-absorbans kalibrasyon doğrusu ($R^2 = 0,996$) (Şekil 3.1.) kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1. DNS kalibrasyon doğrusu

FPU aktivite ölçümünde, substrat olarak Whatman no:1 filtre kağıdıselüloz kaynağı kullanılmıştır. Şeritler halinde kesilen filtre kağıtlarından 50 mg tartılıp santrifüj tüplerine yerleştirilmiş ve üzerine 0,5 mL farklı konsantrasyonlarda hazırlanan mikrobiyal enzim örneği ve 1 mL (pH= 4,8'lik) asetik asit – sodyum asetat tampon çözeltisi eklenmiştir. Bu karışım 50°C'lik çalkalamalı inkübatörde 60 dak boyunca çalkalanmış vesonra her bir tüpe 3 ml DNS çözeltisi eklendikten sonra tüpler 5 dak sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra reaksiyonu durdurmak için tüpler akan su altında bir dak tutularak soğutulmuş ve 540 nm dalga boyunda absorbansları okunmuştur (Ghose, T.K., 1987).

Filter Paper Unit (FPU) birimi, Uluslararası Birime (IU) bağlı bir birimdir.

$$1 U = 1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{dk}} \text{ substrat dönüşümüdür.}$$

Eğer hidroliz sırasındaki ürün glikoz ise

$$1 IU = 0,18 \frac{\text{mg}}{\text{dk}} \text{dır.}$$

Kritik seyreltmede FPU belirlenirken serbest glikoz miktarı 2 mg dır.

$$2 \text{ mg glikoz} = \frac{2}{0,18} \mu\text{mol}$$

- Bu glikoz miktarı 60 dakikada 0,5 ml enzim ile üretilmiştir.

$$2 \text{ mg glikoz} = \frac{2}{0,18 \times 0,5 \text{ ml} \times 60 \text{ dk}} \mu\text{mol}$$

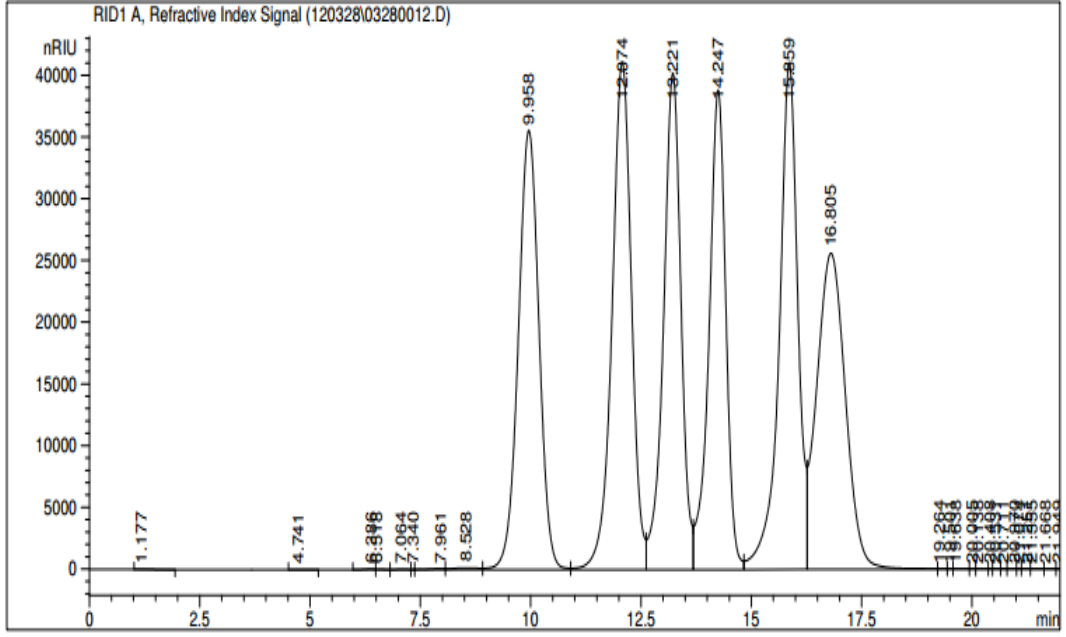
$$= 0,37 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml} \times \text{dk}} \left(\frac{\text{IU}}{\text{ml}} \right)$$

- Bir FPU reaksiyonunda 2 mg glikozu dönüştüren tahmini enzim miktarı;

$$FPU = \frac{0,37}{2 \text{ mg glikozu dönüştüren enzim konsantrasyonu}} U/ml \quad (3.3)$$

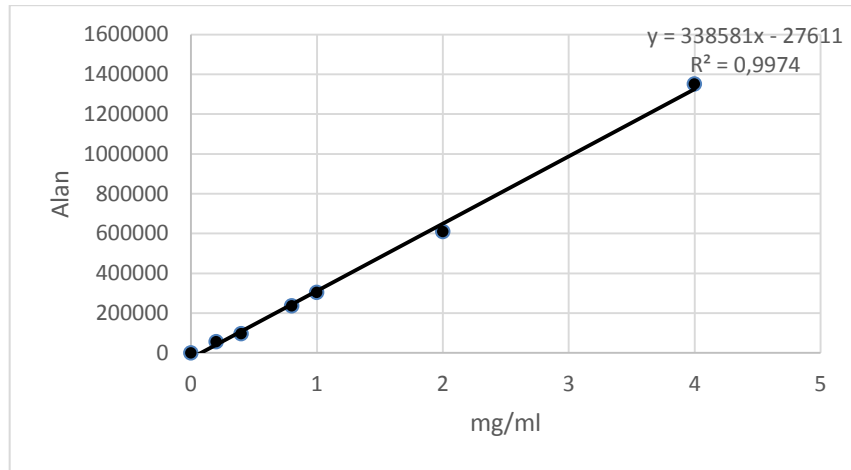
3.2.9. yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemi ile monomerik şekerlerin analizleri

Monomerik şeker bileşiklerinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi yöntemi ile miktarlarının belirlenmesi çalışmalarında dörtlü pompa, Refraktif indeks dedektör, otomatik enjeksiyon ünitesi ve kolon fırınından oluşan Agilent 1100 serisi YBSK sistemi kullanılmıştır. Ayırımlar 80°C de Aminex HPX 87P kolonda (Biorad, Hercules, USA) gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak 0,6 mL/dakakış hızında saf su kullanılmıştır. Miktar tayinleri ticari olarak sağlanan standart monomerik ve dimerik şeker (glikoz, sellobiyoz, ksiloz, mannoz, arabinoz, galaktoz) kalibrasyon doğruları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler kolona verilmeden önce Nylon membran (40µm) filtrelerden süzölmüş ve iki enjeksiyonun ortalama değerleri kullanılarak miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Örneklerin kromatogramından alınan piklere ait bileşikler standart bileşiklerin alıkonma zamanları (tR) ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Standart şeker bileşiklerine ait örnek bir kromatogram Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Monomerik şekerlere ait kalibrasyon doğruları Şekil 3.3’, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8 de ve kalibrasyon doğrularının denklemleri de Çizelge 3.7 de verilmiştir.

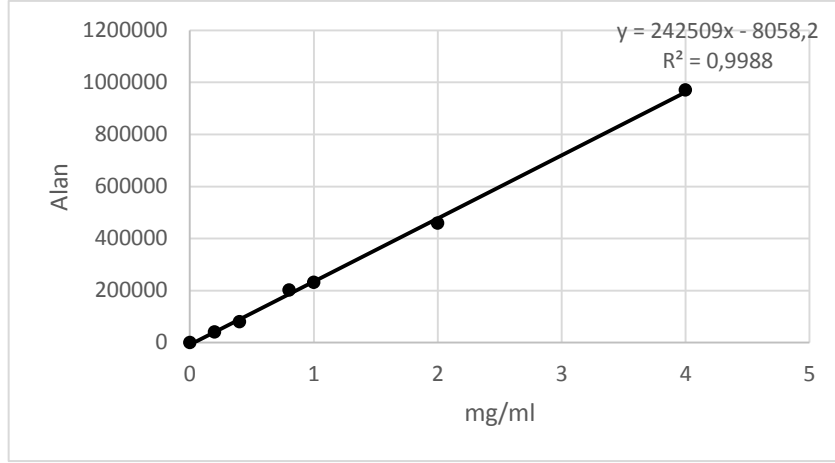


Şekil 3.2.Standart şeker bileşiklerine ait örnek bir kromatogram

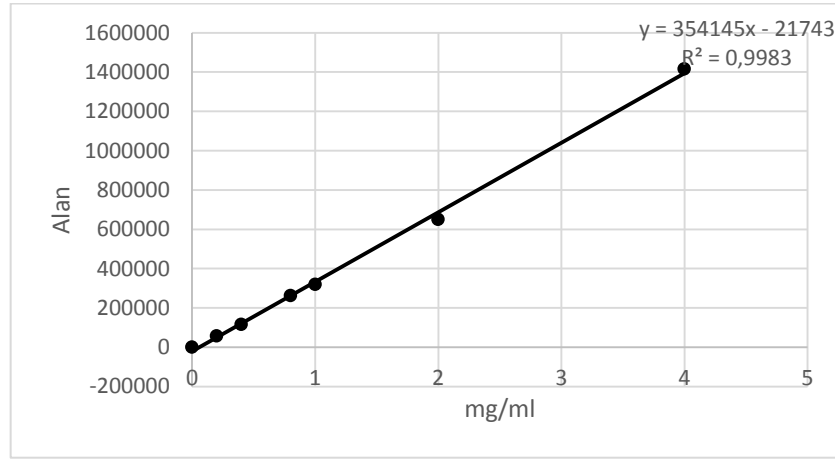
YBSK ile glikoz, ksiloz, sellobiyoz, galaktoz, arabinoz ve mannoz miktarları saf çözeltiler kullanılarak hazırlanmış ve mg/ml çözelti-alan kalibrasyon grafikleri kullanılarak sırasıyla aşağıdaki şekillerde verilmektedir.



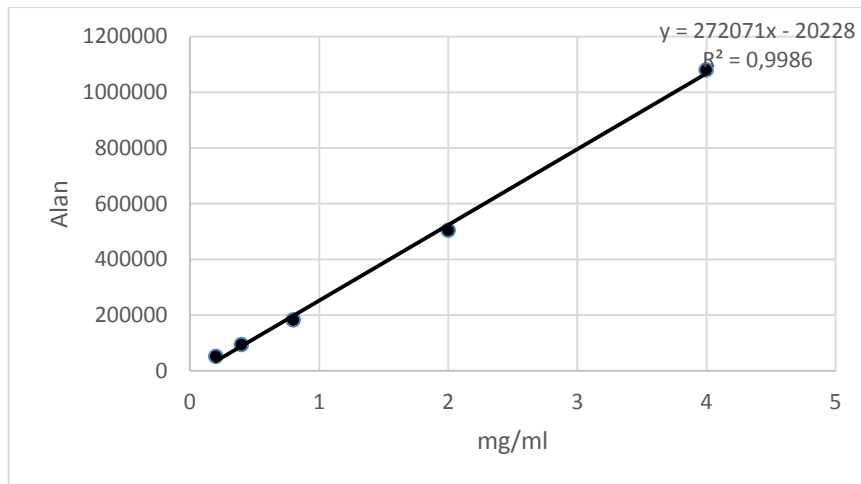
Şekil 3.3. YBSK analizi sonucu glikoz bileşeninin kalibrasyon doğrusu



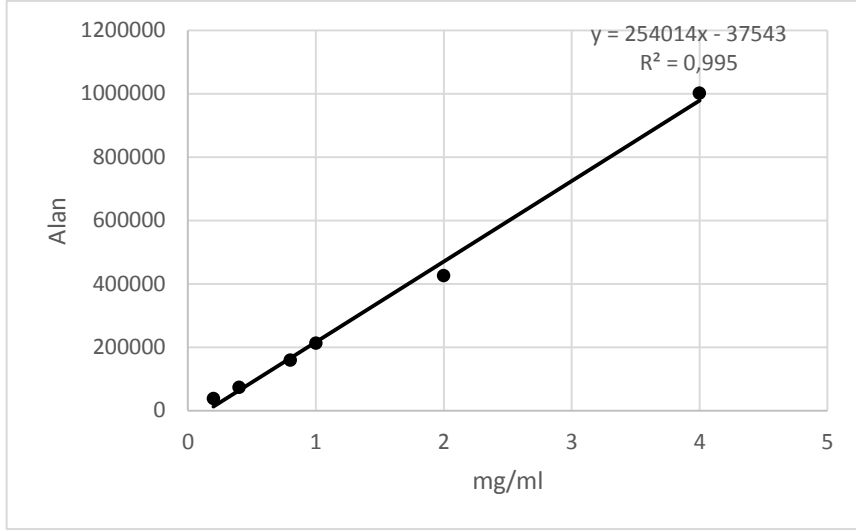
Şekil 3.4. YBSK analizi sonucu ksiloz bileşeninin kalibrasyon doğrusu



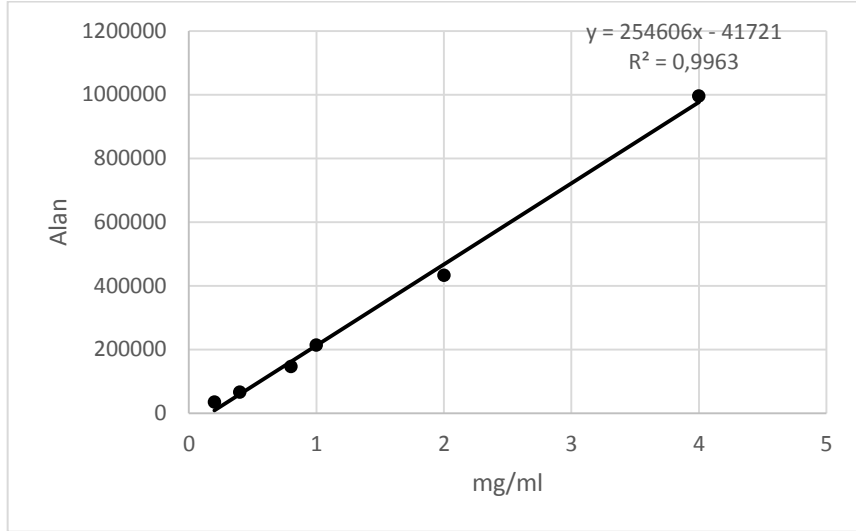
Şekil 3.5. YBSK analizi sonucu sellobiyoz bileşeninin kalibrasyon doğrusu



Şekil 3.6. YBSK analizi sonucu galaktoz bileşeninin kalibrasyon doğrusu



Şekil 3.7. YBSK analizi sonucu arabinoz bileşeninin kalibrasyon doğrusu



Şekil 3.8. YBSK analizi sonucu mannoz bileşeninin kalibrasyon doğrusu

Çizelge 3.7. YBSK analizi sonucu standart şeker bileşiklerinin kalibrasyon doğrularının denklemleri

Standart Şeker Bileşiği	Kalibrasyon Doğrusu Denklemi
Glikoz	$y = 338581x - 27611$
Ksiloz	$y = 242509x - 8058,2$
Sellobiyoz	$y = 354145x - 21743$
Galaktoz	$y = 272071x - 20228$
Mannoz	$y = 254014x - 37543$
Arabinoz	$y = 254606x - 41721$

3.2.10. Nem, lignin, selüloz ve hemiselüloz miktarlarının belirlenmesi

Nem tayini

Substrat olarak kullanılan fındık kabuğu, ayçiçeği sapı ve haşhaş sapı nemli numunelerinden 0,5-0,6 g arası örnek alınarak Mettler Toledo marka (Liebestrasse/İSVİÇRE)nem tayini cihazında kurutularak nem ölçümleri yapılmıştır.

Lignin tayini

Lignin tayini için, analizi yapılacak hammaddeden 300 mg tartılarak erlenlere konulmuş, üzerine 3 ml %72'lik sülfürik asit eklenmiş ve 1 dak karıştırılmıştır. 30°C'de, 60 dak çalkalamalı su banyosunda karıştırılan örneklerdeki H₂SO₄ konsantrasyonu daha sonra 84 ml saf su ile % 4 oluncaya kadar seyreltilmiştir ve 121°C'de otoklavda 60 dak hidroliz işlemine devam edilmiştir. Otoklav işleminden sonra, erlenlerin ağzı açılmadan önce oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiş ve daha sonrafiltrekağıdından geçirilerek süzölmüştür. Filtre kağıdında kalan katı su ile yıkandıktan sonra 4 sa 105°C'de etüvde kurutulup ardından tekrar tartılmıştır. Kurutulmuş örnek daha sonra 600 ° Ckül fırınında 24 saat yakılarak ve krozede kalan kül tartılıp kaydedilmiştir. Lignin miktarı kuru baz üzerinden aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Lignin miktarı (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100 \quad (3.3)$$

m_0 = başlangıçtaki hammadde

m_1 = 105°C' de kurutulduktan sonra kalan miktar

m_2 = 575°C' de yakıldıktan sonra kalan miktar

Lignin tayininde filtre kağıdından ayrılan süzöntü biyokütlede bulunan selüloz ve hemiselülozun konsantre asit ile hidroliz ürünleri olan monomerik şekerleri içermektedir. Bu sıvıda bulunan ve Bölüm 3.2.9'da verilen YBSK yöntemi ile belirlenen glikoz ve sellobiyoz miktarlarından biyokütlede bulunan selüloz (Eşitlik 3.4); ksiloz, arabinoz, mannoz ve galaktozun miktarlarının toplamı üzerinden ise katıda bulunan hemiselüloz miktarları (Eşitlik 3.5) hesaplanmıştır.

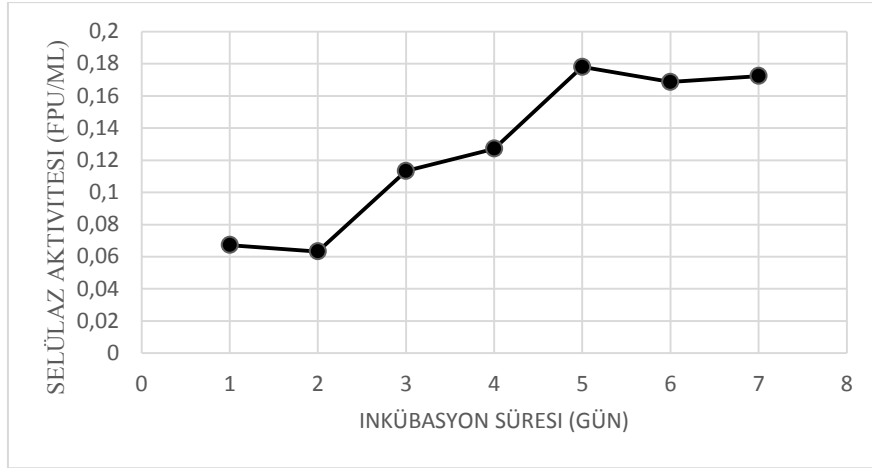
$$\% \text{Selüloz} = \frac{\text{glukoz} + \text{sellobiyoz}}{0,3} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\% \text{Hemiselüloz} = \frac{\text{Ksiloz} + \text{Arabinoz} + \text{Galaktoz} + \text{Mannoz}}{0,3} \times 100 \quad (3.5)$$

4.DENEYSEL BULGULAR

4.1. SelülaZ Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi

Termofilik Myceliophthora hinnulea'dan selülaZ enzimi üretiminde öncelikle inkübasyon süresi belirlenmiştir. Bu çalışmalar, 45°C, 150 rpm, pH 4,54 ve spor sayısının 10^8 olan ortamda gerçekleşmiş ve yedi gün boyunca selülaZ aktivitesi kontrol edilmiştir. Enzim aktivitesi 0,063 - 0,178 FPU/ml arasında değişmiş ve beklendiği üzere zamanla enzim aktivitesi artmıştır. En yüksek aktiviteye beşinci günde erişilmiş ve bu zamandan sonra aktivitenin değişmediği görülmüştür. Diğer parametrelerin incelenmesinde inkübasyon süresi beş gün olarak kullanılmıştır.



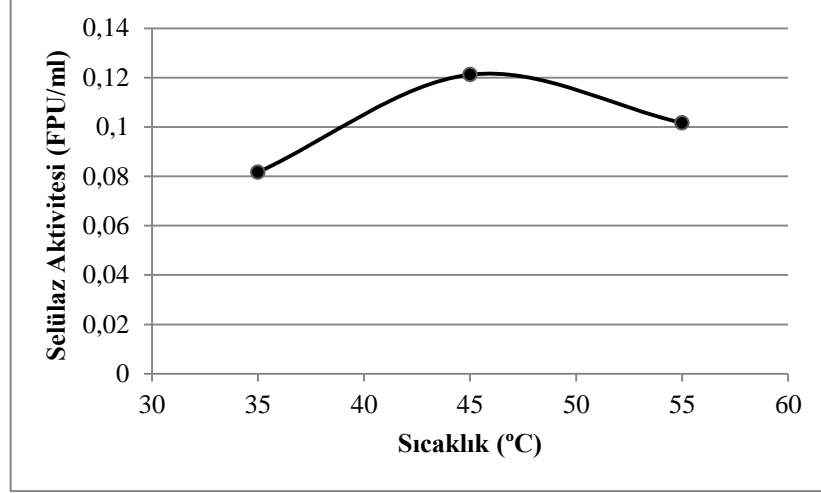
Şekil 4.1. SelülaZ aktivitesinin günlük deneysel verileri

4.2. SelülaZ Üretiminde İncelenen Parametrelerin Etkisi

pH, sıcaklık, spor sayısı ve kültür yaşı parametrelerinin selülaZ üretimi üzerinde tekli ve çoklu etkileri incelenmiştir.

4.2.1. SelülaZ üretiminde sıcaklığın etkisi

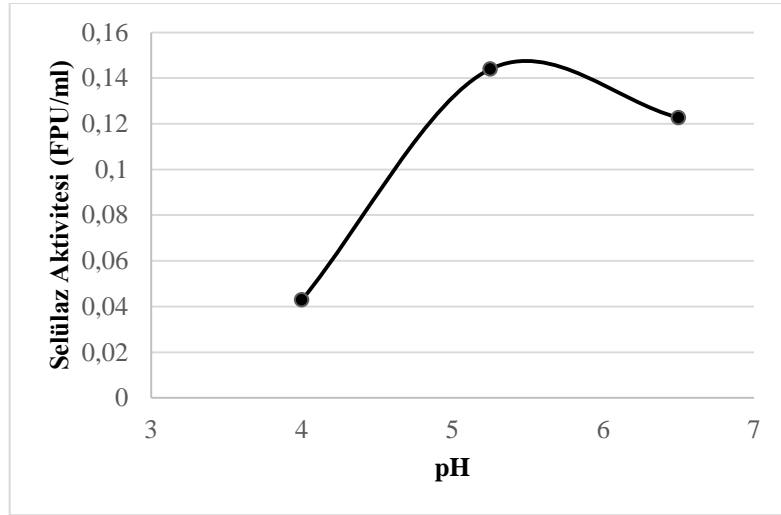
Diğer parametreler sabit tutulup enzim aktivitesinde sıcaklığın etkisi incelenildiğinde en yüksek değere (0,121 FPU/ml) 45°C de ulaşıldığı görülmektedir (Şekil 4.2). Sıcaklık arttıkça selülaZ enziminin aktivitesi azalmaktadır. Bunun nedeni belirli sıcaklıktan sonra enzimlerin inaktive olmasıdır.



Şekil 4.2. Selülaaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi

4.2.2. Selülaaz üretiminde pH etkisi

Diğer parametreler sabit tutulup enzim aktivitesinde pH etkisi incelendiğinde en yüksek değere (0,153 FPU/ml) 5,25 de ulaşıldığı görülmektedir (Şekil 4.3.). pH arttıkça selülaaz enziminin aktivitesi azalmaktadır.

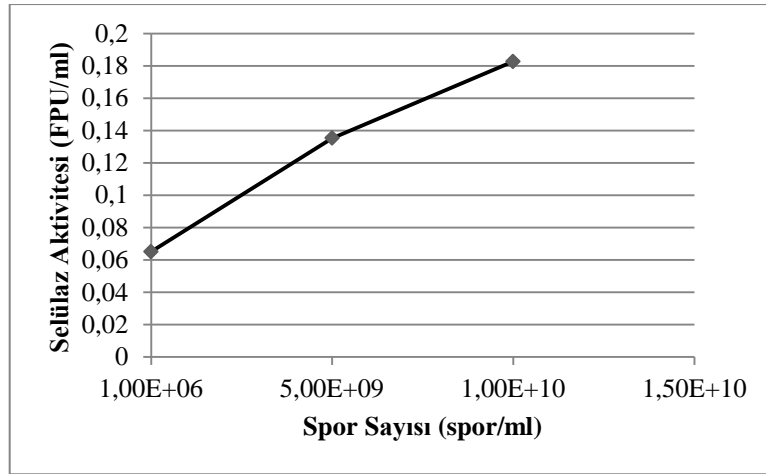


Şekil 4.3. Selülaaz aktivitesinin pH a bağlı olarak değişimi

4.2.3. Selülag üretiminde spor sayısının etkisi

Selülag aktivitesinin spor sayısına bağlı olarak değişimi Şekil 4.4. de verilmektedir. Diğer parametreler sabit tutulup enzim aktivitesinde spor sayısının etkisi incelenildiğinde en yüksek değere (0,183 FPU/ml) 1×10^{10} da ulaşıldığı görülmektedir. Spor sayısı arttıkça enzim aktivitesinin de arttığı gözlenmektedir.

Selülag aktivitesinin spor sayısına bağlı olarak değişimi Şekil 4.4. de verilmektedir. İnokulum boyutunun daha fazla artması selülag aktivitesinde kademeli olarak bir azalmaya neden olabilmektedir. Düşük boyutlu inokulum boyutlarında ise hücreler femantasyon ortamını yeterli miktarda iyi bir yolla kullanamadıklarından selülag biyosentezi daha düşük bir gelişim göstermektedir (Malik ve ark., 2010). Daha yüksek inokulum boyutlarında ise besi ortamı içerisindeki besinin yetersiz kalması ve oksijen geriliminin artması nedeniyle selülag üretimi yavaşlayabilmektedir (Bhattacharya ve ark., 2014).

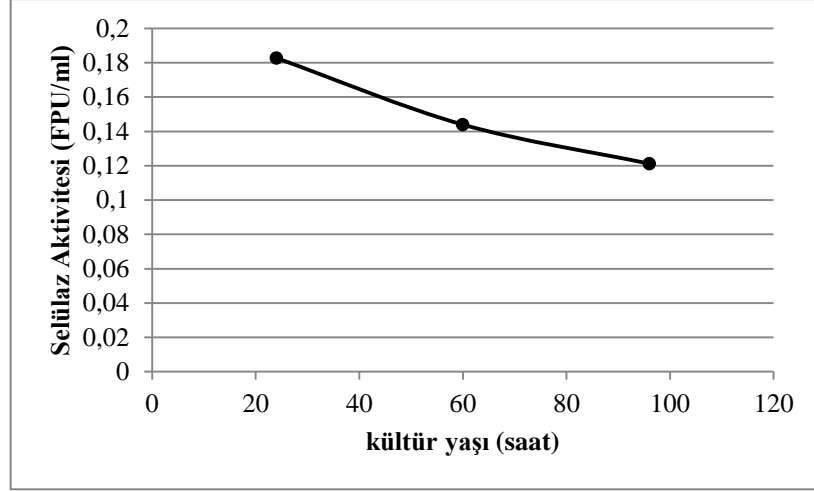


Şekil 4.4. Selülag aktivitesinin spor sayısına bağlı olarak değişimi

Trichoderma viride mikroorganizmasından selülag enzimi üretilirken maksimum selülag aktivitesi değerine (0,093 U/ml) içeriği $2,1 \times 10^7$ spor/ml olan %4 lük inokulum ile ulaşılmıştır.

4.2.4. Selülaz üretiminde kültür yaşının etkisi

Diğer parametreler sabit tutulup enzim aktivitesinde kültür yaşının etkisi incelenildiğinde en yüksek değere (0,183 FPU/ml) 24 saatte ulaşıldığı görülmektedir (Şekil 4.5.). Kültür yaşı arttıkça aktivite azalmaktadır.



Şekil 4.5. Selülaz aktivitesinin kültür yaşına bağlı olarak değişimi

4.3. Selülaz üretim parametrelerinin yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu

Selülaz üretim parametrelerinin yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu deneylerinde 27 deneysel noktadan üç tekrarlı 4 değişkenden oluşan Box Behnken Deneysel Tasarımı Yöntemi kullanılmış, Çizelge 3.3. de seviyeleri verilen pH (X_1), sıcaklık ($^{\circ}C$) (X_2), spor sayısı (X_3) ve kültür yaşı (saat) (X_4) parametrelerinin istatistiksel kombinasyonuna karşı elde edilen selülaz aktivitesi Çizelge 4.1. de gösterilmiştir.

Myceliophthora hinnulea'dan selülaz üretimi çalışmaları sonucunda, filtre kağıdı ünitesi üzerinden belirlenen selülaz aktivitesi (FPU/ml) 0,0367 ile 0,183 arasında değişmiştir. Yapılan deneylerle 5.gün sonunda en yüksek aktivite olan 0,183 FPU/ml'ye pH= 5,25, 45 $^{\circ}C$, 1×10^{10} spor sayısı ve 24 sa kültür yaşında ulaşılmıştır (Çizelge 4.1). Benzer çalışmalarda *Aspergillus niger* den elde edilen selülazlarda optimum aktiviteye 5 gün sonunda ve pH 5 de ulaşılmıştır. Selülaz aktivitesindeki azalma sellobiyozun birikmiş etkisinden kaynaklanabilmektedir.

Çünkü sellobiyoz endoglukanaz ve glukosidazın her ikisini de inhibe etmesiyle bilinen bir glikozdur (Singh ve ark., 2009).

Çizelge 4.1. Üretilen selülazın aktivitesinin deneysel verileri

Deney No	pH	T(°C)	Sporsayısı (spor/ml)	Kültür yasi (saat)	Selülaz aktivitesi (FPU/ml)
1	5,25	35	1×10^{10}	60	0,144
2	4,00	35	5×10^9	60	0,043
3	5,25	45	1×10^6	96	0,128
4	5,25	45	5×10^9	60	0,121
5	5,25	35	5×10^9	96	0,082
6	5,25	55	1×10^6	60	0,079
7	5,25	45	5×10^9	60	0,169
8	6,50	45	5×10^9	24	0,119
9	4,00	45	1×10^{10}	60	0,095
10	5,25	55	1×10^{10}	60	0,087
11	6,50	45	5×10^9	96	0,118
12	5,25	55	5×10^9	96	0,102
13	5,25	45	5×10^9	60	0,153
14	5,25	35	5×10^9	24	0,135
15	5,25	55	5×10^9	24	0,073
16	5,25	45	1×10^{10}	24	0,183
17	6,50	45	1×10^{10}	60	0,179
18	6,50	45	1×10^6	60	0,107
19	4,00	45	5×10^9	96	0,074
20	5,25	35	1×10^6	60	0,050
21	4,00	55	5×10^9	60	0,037
22	4,00	45	1×10^6	60	0,057
23	6,50	35	5×10^9	60	0,123
24	5,25	45	1×10^{10}	96	0,121
25	4,00	45	5×10^9	24	0,061
26	6,50	55	5×10^9	60	0,066
27	5,25	45	1×10^6	24	0,065

Box Behnken yanıt yüzey modelinin uygulandığı deneysel tasarımda, parametrelerin selüloz aktivitesi üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir (Çizelge 4.2). pH (X_1), sıcaklık (X_2) ve spor sayısının (X_3) değişimi ile selüloz aktivitesi doğrusal olarak değişmiştir ($p<0,05$). Kültür yaşının ise doğrusal etkisi görülmemiştir. pH ve sıcaklığın aynı zamanda kuadratik (2. derece polinom) etkisi de vardır. Kültür yaşının etkisi de sıcaklık ve spor sayısının değişimi ile birlikte (ikili etki) görülmüştür ($p<0,05$). Deneysel verilerin model uygulaması sonucunda elde edilen denklem Eşitlik 4.1. de verilmiştir.

$$Y_{\text{selüloz(FPU/ml)}} = 0,147514 + 0,028880X_1 - 0,011168X_2 + 0,26963X_3 - 0,000906X_4 - 0,035855X_1X_1 - 0,043372X_2X_2 - 0,008929X_3X_3 - 0,013116 X_4X_4 - 0,012671X_1X_2 + 0,008512 X_1X_3 - 0,003501 X_1X_4 - 0,021621 X_2X_3 + 0,020689 X_2X_4 - 0,0311035 X_3X_4$$

(4.1)

%95 güven aralığında ($p=0,05$) ön görülen modele ait olabilirlik değeri $p<0,001$ den küçük bulunmuştur ($p<0,0001$). Yani öngörülen model istatistiksel olarak anlamlıdır. Modelin bu hali ile uygunluğu regresyon katsayısı ile test edilebilir. Modelin regresyon katsayısı $R^2=0,9492$ (düzenlenmiş $R^2=0,8899$), uyum eksikliği (lack of fit) ise 0.973 ($p>0,05$) bulunmuştur. Modelden elde edilen selüloz aktivite verileri Çizelge 4.3 de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Selülaz Aktivitesinin (FPU/ml) Box Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA Testi

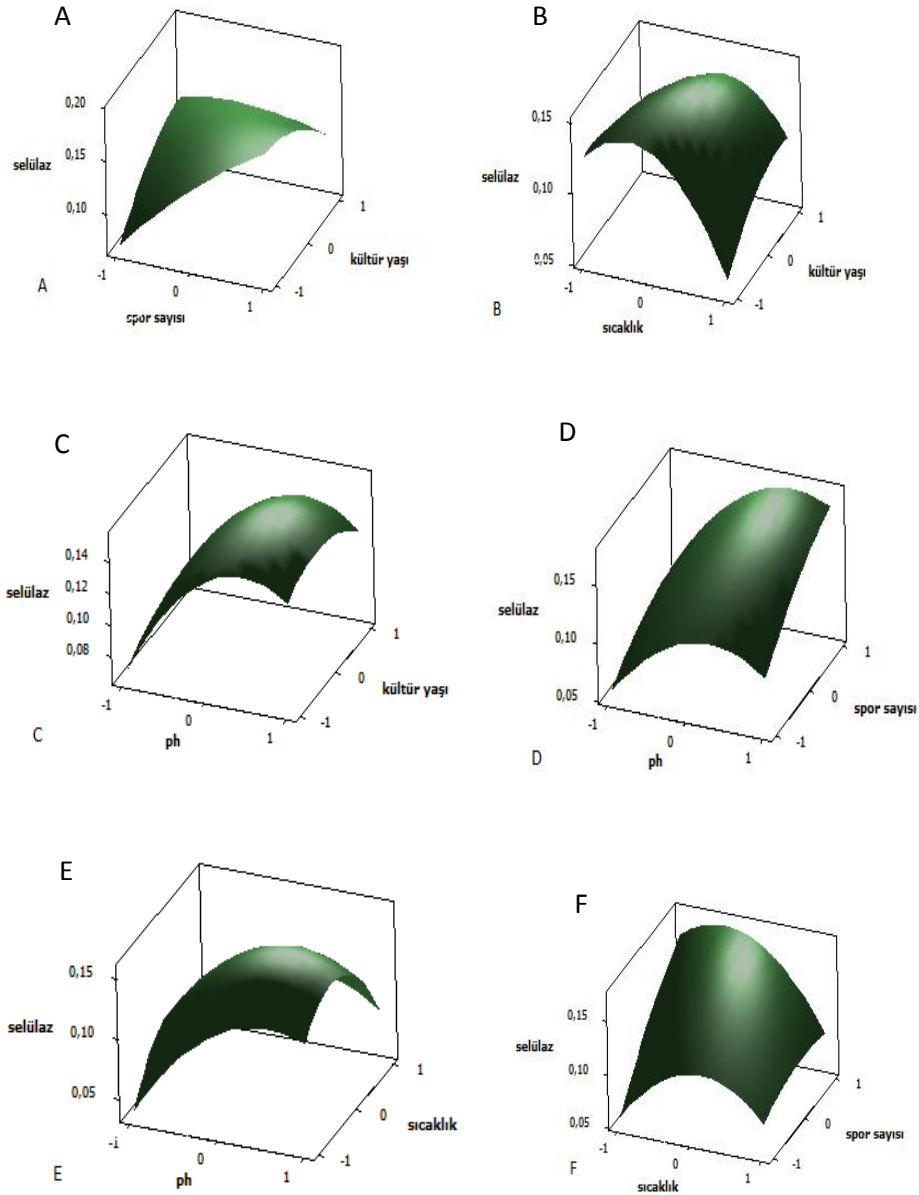
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	14	0,042328	0,042328	0,003023	16,02	0,000
Doğrusal	4	0,020239	0,020239	0,005060	26,80	0,000
X ₁ : pH	1	0,010009	0,010009	53,02	0,000	0,010009
X ₂ : T (°C)	1	0,001497	0,001497	0,001497	7,93	0,016
X ₃ : spor sayısı (spor/ml)	1	0,008724	0,008724	0,008724	46,21	0,000
X ₄ : kültür yaşı (saat)	1	0,000010	0,000010	0,000010	0,05	0,823
İkinci derece polinom	4	0,013673	0,003418	18,11	0,000	0,013673
X ₁ *X ₁	1	0,003457	0,006856	0,006856	36,32	0,000
X ₂ *X ₂	1	0,010033	0,010033	53,15	0,000	0,009174
X ₃ *X ₃	1	0,000125	0,000425	0,000425	2,25	0,159
X ₄ *X ₄	1	0,000917	0,000917	0,000917	4,86	0,048
İkili etkileşim	6	0,008416	0,008416	0,001403	7,43	0,002
X ₁ *X ₂	1	0,000642	0,000642	0,000642	3,40	0,090
X ₁ *X ₃	1	0,000290	0,000290	0,000290	1,54	0,239
X ₁ *X ₄	1	0,000049	0,000049	0,000049	0,26	0,620
X ₂ *X ₃	1	0,001870	0,001870	0,001870	9,91	0,008
X ₂ *X ₄	1	0,001712	0,001712	0,001712	907	0,011
X ₃ *X ₄	1	0,003853	0,003853	0,003853	20,41	0,001
Kalan Hata	12	0,002265	0,002265	0,000189		
Uyum Eksikliği	10	0,001101	0,001101	0,000110	0,19	0,973
Saf Hata	2	0,001165	0,001165	0,000582		
Toplam	26	0,044594				

Çizelge 4.3. Deneysel ¹ ve modelden ² bulunan selülaaz enzim aktivitesi

Deney No	pH	T(°C)	Sporsayısı (spor/ml)	Kültür yasi (saat)	Selülaaz aktivitesi ¹ (FPU/ml)	Selülaaz aktivitesi ² (FPU/ml)
1	5,25	35	1x10 ¹⁰	60	0,144	0,155
2	4,00	35	5x10 ⁹	60	0,043	0,038
3	5,25	45	1x10 ⁶	96	0,128	0,129
4	5,25	45	5x10 ⁹	60	0,121	0,147
5	5,25	35	5x10 ⁹	96	0,082	0,081
6	5,25	55	1x10 ⁶	60	0,079	0,079
7	5,25	45	5x10 ⁹	60	0,169	0,148
8	6,50	45	5x10 ⁹	24	0,119	0,132
9	4,00	45	1x10 ¹⁰	60	0,095	0,092
10	5,25	55	1x10 ¹⁰	60	0,087	0,089
11	6,50	45	5x10 ⁹	96	0,118	0,123
12	5,25	55	5x10 ⁹	96	0,102	0,099
13	5,25	45	5x10 ⁹	60	0,153	0,148
14	5,25	35	5x10 ⁹	24	0,135	0,124
15	5,25	55	5x10 ⁹	24	0,073	0,060
16	5,25	45	1x10 ¹⁰	24	0,183	0,184
17	6,50	45	1x10 ¹⁰	60	0,179	0,167
18	6,50	45	1x10 ⁶	60	0,107	0,096
19	4,00	45	5x10 ⁹	96	0,074	0,072
20	5,25	35	1x10 ⁶	60	0,050	0,058
21	4,00	55	5x10 ⁹	60	0,037	0,041
22	4,00	45	1x10 ⁶	60	0,057	0,055
23	6,50	35	5x10 ⁹	60	0,123	0,121
24	5,25	45	1x10 ¹⁰	96	0,121	0,120
25	4,00	45	5x10 ⁹	24	0,061	0,067
26	6,50	55	5x10 ⁹	60	0,066	0,073
27	5,25	45	1x10 ⁶	24	0,065	0,068

İncelenen parametrelerin selülaaz aktivitesi üzerine etkisinin yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.6 da verilmiştir. Parametrelerin orta noktaları sabit alınarak çizilen grafiklerde düşük kültür yaşında spor sayısı arttıkça selülaaz aktivitesinin arttığı görülmektedir. Ancak bu etki kültür yaşı büyüdüğünde görülmemektedir

(A). Sıcaklıkla kültür yaşının değişimi grafiğinde sıcaklıkla belli bir değere kadar selüloz aktivitesi artarken, artan sıcaklıklarla aktivite düşmektedir (B). Aynı durum pH etkisi için de geçerlidir (C). Spor sayısı tüm pH ve sıcaklık değerlerinde aktiviteyi pozitif yönde etkilemektedir (D). Sıcaklık ve pH grafiğinde ise yine her iki parametre arttıkça selüloz aktivitesi artmakta ancak belli bir değerden sonra azalmaktadır (E). Yüksek sıcaklıklarda spor sayısının selüloz aktivitesi üzerine etkisinin düşük sıcaklığa göre çok az olduğu gözlenmiştir.



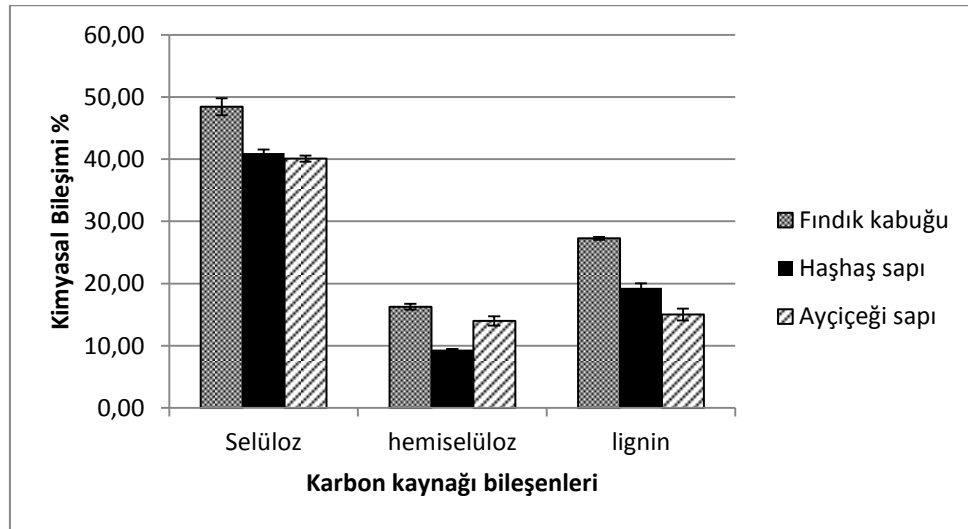
Şekil 4.6. Parametrelerin selüloz aktivitesi üzerine etkileri

4.4. Selülag Aktivitesi Üzerine Etki Eden Parametrelerin Optimizasyonu

Ön görülen üretim parametreleriyle selülag aktivitesinde maksimum verimi elde etmek için MINITAB 16 programının yüzey optimizeri kullanılmıştır. Optimum üretim koşulları, pH 6,1, sıcaklık 38°C, spor sayısı 1×10^{10} spor/ml ve kültür yaşı 24 saat olarak belirlenmiştir. Optimum koşulda beklenen selülag aktivitesi 0,218 FPU/ml dir. Beklenen bu değeri doğrulamak amacıyla yapılan deneyler sonucunda ise selülag aktivitesi 0,216 FPU/ml olarak bulunmuştur.

4.5. Farklı Karbon Kaynakları Kullanılarak Üretilen Selülag Enzimi Verileri

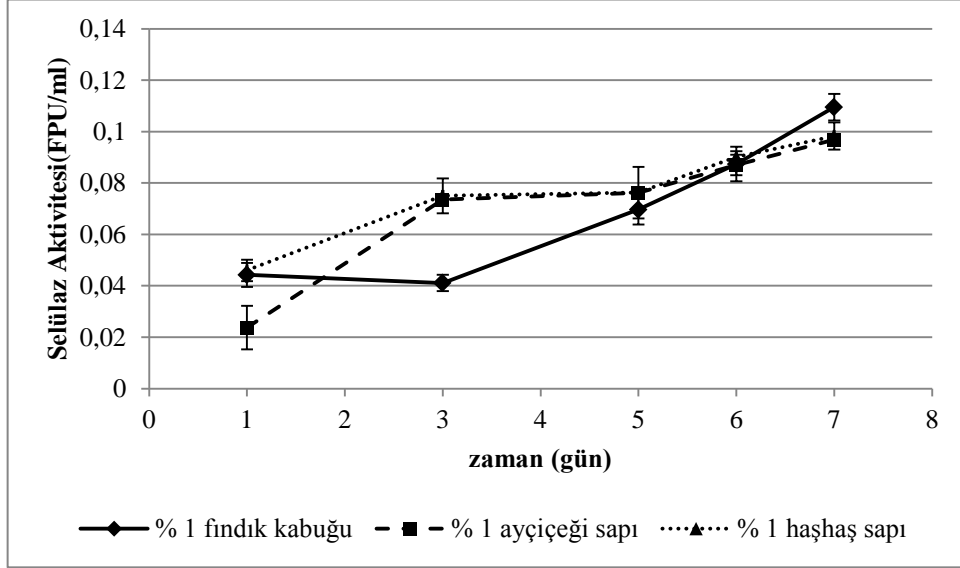
Karbon kaynağı olarak kullanılan liginoselülag yapıdaki fındık kabuğu, ayçiçeği sapı ve haşhaş sapının alkali ön işlem sonucu elde edilen kimyasal kompozisyonları Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. Ön işlemler sonrasında belirlenen hammadde içeriklerine bakıldığında en fazla selülagun fındık kabuğundabulunduğu görülmektedir. Üretilen selülag aktivitesinin en yüksek değerine fındık kabuğu varlığında ulaşması beklenen bir sonuçtur.



Şekil 4.7. Karbon kaynaklarının alkali ön işlem sonrasında kimyasal bileşimi

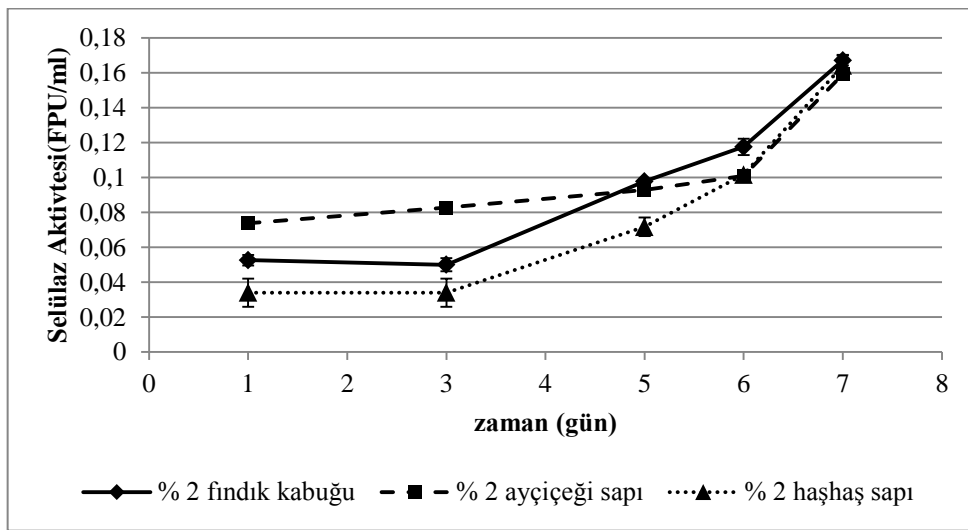
Ağırlıkça % 1 ve % 2 oranında karbon kaynağı olarak kullanılan hammaddeler ile yapılan selülag üretimi, optimize edilmiş koşullarda (pH 6,1,

sıcaklık 38°C, spor sayısı 1×10^{10} spor/ml ve kültür yaşı 24 saat) gerçekleştirilmiştir.



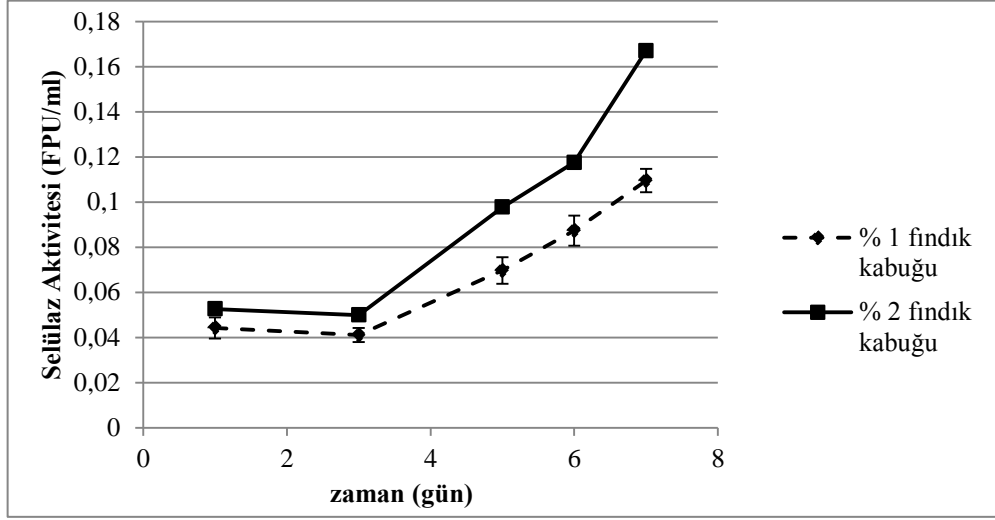
Şekil 4.8. % 1' lik karbon kaynaklarının kullanımı ile ulaşılan selülag aktivitesi

%1 lik karbon kaynakları birbirleri ile kıyaslandığı zaman en yüksek aktiviteye fındık kabuğu ile 7. gün sonunda ulaşılmıştır (0,11 FPU/ml). Fındık kabuğu bu sırasıyla ayçiçeği sapı ve haşhaş sapı takip etmektedir (0,097 FPU /ml, 0,098 FPU/ml).

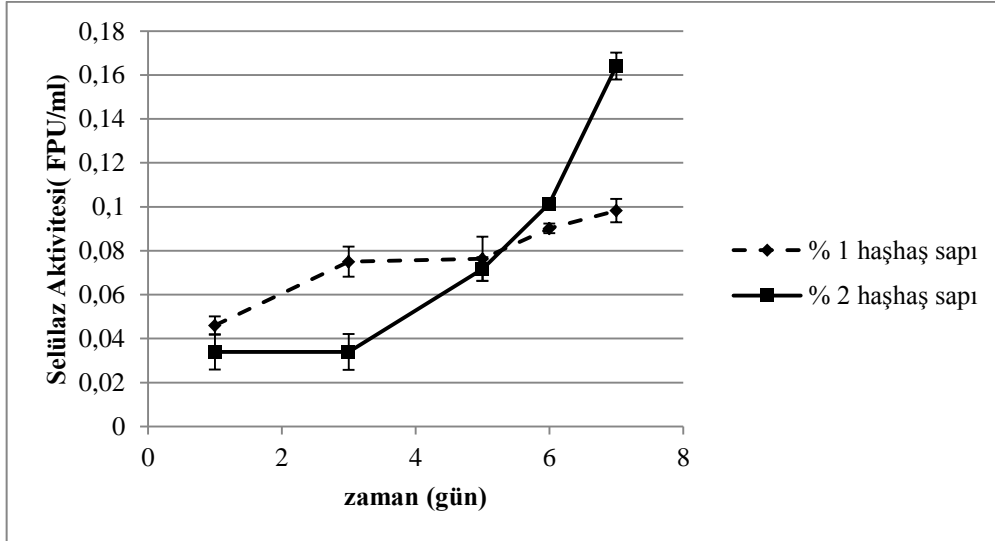


Şekil 4.9. % 2 lik karbon kaynaklarının kullanımı ile ulaşılan selülag aktivitesi

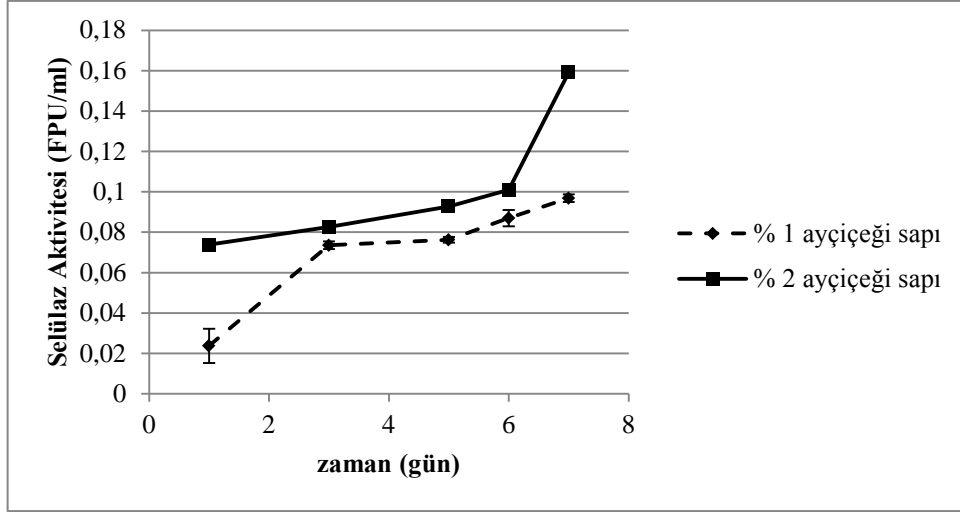
Maksimum selülaaz aktivitesine karbon kaynağı olarak %2 fındık kabuğu kullanımı ile 7. gün sonunda ulaşılmıştır (0,181 FPU/ml). Diğer karbon kaynakları haşhaş sapı ve ayçiçeği sapı kullanımında da en yüksek değerlere % 2 lik substrat ile 7. gün sonunda ulaşılmıştır. Haşhaş sapı ve ayçiçeği sapı kullanılarak üretilen selülaazın aktiviteleri sırasıyla 0,167 FPU/ml ve 0,181 FPU/ml'dir (Şekil 4.9).



Şekil 4.10. % 1 ve % 2'lik fındık kabuğunun karbon kaynağı olduğu durumlarda selülaaz aktivitesi



Şekil 4.11. % 1 ve % 2'lik haşhaş sapının karbon kaynağı olduğu durumlarda selülaaz aktivitesi



Şekil 4.12. % 1 ve % 2'lik ayçiçeği sapının karbon kaynağı olduğu durumlarda selüloz aktivitesi

Yapılan tüm deneyler sonucunda % 2 lik karbon kaynakları kullanılarak elde edilen ürünlerin aktivitesinin % 1 'lik kullanıma göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Substrat miktarı arttıkça enzim aktivitesi de artmıştır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki substrat miktarının sürekli artması ile enzim aktivitesi azalmaya başlamaktadır. Ortamda substrat miktarının fazla olmasıyla enzim inhibe olabilmektedir. Substratın fazla olması enzim moleküllerine bağlanmayı azaltır ve üretim düşer (Jadhav ve ark., 2013). Değişik substrat konsantrasyonlarında selüloz üretiminin gerçekleştirildiği bir başka çalışmada ise maksimum selüloz aktivitesine (0,085 FPU/ml). % 2,5 'luk konsantrasyonda ulaşılmıştır (Thekra, 2012).

5. SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Bu çalışmada *Myceliophythora hinnulea* mantarı ile karbon kaynağı olarak karboksimetil selüloz kullanılarak selülaz üretiminin yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda karbon kaynağı olarak lignoselülozik atıkların kullanımı ile de üretim gerçekleştirilmiş ve üretilen selülazın aktiviteleri belirlenmiştir.

45°C, 150 rpm, pH 4,5 de gerçekleştirilen üretimde 5. gün sonunda 0,178 FPU/ml aktiviteye ulaşılmıştır. Şekil 4.1.'de de görüldüğü gibi 5. günden sonra aktivitenin azaldığı gözlenmektedir.

Farklı karbon kaynakları kullanılarak yapılan benzer çalışmalarda da en yüksek aktiviteye 5.gün sonunda ulaşılmıştır. Pirinç kabuğu, muz kabuğu ve buğday kepeği gibi lignoselülozik kaynaklar kullanılarak *Aspergillus niger*' den elde edilen selülazlarda aktivite sırasıyla 12,2 U/ml, 12,4 U/ml ve 9,2 U/ml' dir (Jadhav ve ark., 2013). Batık hal fermantasyonu ile *Fusarium oxysporum*' dan üretilen selülaz maksimum seviyeye 8.gün sonunda ulaşmış ve aktivitesi 1,34 U/ml olarak hesaplanmıştır (Ramanathan ve ark., 2010).

Muz kabuğu (0,57 ± 0,03 U/ml) ve Hindistan cevizi kabuğu (0,42 ± 0,02 U/ml) tozlarının karbon kaynağı olarak kullanıldığı ve *Trichoderma reesei* mantarından elde edilen selülazda maksimum aktiviteye pH' 6 da 144 saatlik inkübasyon sonunda ulaşılmıştır. İki karbon kaynağı birbiri ile kıyaslandığında maksimum aktiviteye (0,69 ± 0,02 U/ml) % 1,5 oranında muz kabuğu tozu kullanılarak ulaşılmıştır (Kiranmayi, ve ark.,2012).

Yapılan başka bir çalışmada alkali ön işlem görmüş üç farklı çeşit yaprak kullanılarak yapılan deneylerde en yüksek selülaz aktivitesi değerine 6 günlük inkübasyon süresi sonunda ulaşılmıştır. Bu sürenin artması ile aktivite düşüşe geçmiştir. Süre uzadıkça üretimin azalması substratın bitmesi, zamanla oluşan inhibe ürünler gibi nedenlerden kaynaklanabilmektedir (Thomas ve Ambikapathy, 2011).

Maksimum inkübasyon süresi belirlendikten sonra pH, sıcaklık, spor sayısı ve kültür yaşı parametreleriyle optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu parametrelerin etkisi incelendiğinde sıcaklık arttıkça aktivitenin arttığı fakat

sıcaklığın daha da artmasıyla aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. Bu da sıcaklık arttıkça enzimlerin protein yapısının bozulması ve inaktive olması ile açıklanabilmektedir (Thomas ve Ambikapathy, 2011).

Yapılan bazı çalışmalarda karbon kaynağının pirinç kabuğu olduğu üretimler için en uygun sıcaklık 30°C, talaş ve hindistan cevizi atıkları için 40°C olarak belirlenmiştir (Jadhav ve ark., 2013). Yaprak atığı kullanılarak üretilen selüzlarda en yüksek aktivite değerine 30°C de ulaşılmıştır. Sıcaklık arttıkça enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür (Thomas ve Ambikapathy, 2011). *Aspergillus niger* mikroorganizmasıyla selülaaz üretiminde maksimum aktiviteye (0,081 IU/ml) 35°C de ulaşılmıştır (Al-Ka'aby, 2012). *Fusarium oxysporum* üretilen selülaazda maksimum gelişim ve enzim üretimi 50°C de görülmüştür (Ramanathan ve ark., 2010).

Fusarium oxysporum ile karbon kaynağı olarak karboksimetil selüloz kullanımı ile elde edilen selülaazda maksimum gelişim ve enzim üretimi 50°C de görülmüştür. Sıcaklık arttıkça enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir (Ramanathan ve ark., 2010). 8 gün inkübasyon süresi, 37°C sıcaklık ve 150 rpm de *Penicillium echinulatum* ile substratın karboksimetil selüloz olduğu selülaaz enzimi üretiminde enzim aktivitesi 1,53 U/ml olarak belirlenmiştir (Martins ve ark., 2007).

pH ın artması ile de selülaaz aktivitesi artarken maksimumu bulduğu noktadan sonra aktivitenin azalmaya başladığı görülmüştür. pH ın çok yüksek veya çok düşük olması aktiviteyi olumsuz etkilemektedir. Kültür ortamının pH ı metabolik iyonların varlığını ve mantar hücre zarlarının geçirgenliğini etkilemektedir (Thomas ve Ambikapathy, 2011).

Aspergillus niger kullanılarak yapılan bir başka üretimde ise selülaaz üretimi için optimum pH 4 ve 4,5 aralığı olarak belirlenmiştir. Maksimum selülaaz aktivitesi pH 4 te ulaşılan 0,093 IU/ml dir. pH ın 3 ve 9 aralıklarında olduğu ortamlarda selülaazın etkin olduğu gözlenmiştir (Acharya ve ark., 2008). *Fusarium oxysporum*' un seçilmiş küf hücreleri pH 6 ve 7 'de ağır bir gelişim ve daha yüksek miktarda enzim aktivitesi göstermişlerdir (Ramanathan ve ark., 2010).

3 farklı yaprak atığının karbon kaynağı olarak, *Hormodendrum cladosporioides*'in mikroorganizma olarak kullanıldığı bir çalışmada en yüksek

selülaaz aktivitesi için en uygun pH'ın 6 olduğu belirlenmiştir (Thomas ve Ambikapathy, 2011). *Aspergillus niger* mikroorganizmasıyla karbon kaynağı olarak talaş tozu kullanımı ile elde edilen selülaazlarda maksimum değer olan 0,083 IU/ml' ye pH 4 te ulaşılmıştır (Al-Ka'aby, 2012). Yine *Aspergillus niger* kullanılarak yapılan bir başka üretimde ise selülaaz üretimi için optimum pH 4 ve 4,5 aralığı olarak belirlenmiştir. Maksimum selülaaz aktivitesi pH 4 te ulaşılan 0,093 IU/ml dir. pH ın 3 ve 9 aralıklarında olduğu ortamlarda selülaazın etkin olduğu gözlenmiştir (Acharya ve ark., 2008). Benzer çalışmalarda farklı karbon kaynaklarının kullanımı ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Karbon kaynağının buğday samanı olduğu selülaaz üretiminde en yüksek değere 30 °C de 5.gün sonunda ulaşılmıştır. Hesaplanan aktivite 3,2 U/ml dir (Singh ve ark., 2009).

Spor sayısının artması ile enzim aktivitesinin de arttığı gözlenmektedir (Şekil 4.4). Spor sayısı daha fazla arttırılsa mantarların aşırı büyümesi dolayısıyla fermantasyon ortamının da viskozitesi artabilir bu da ortam içerisinde besinsel dengesizlik yaratabilmektedir (Dinarvand ve ark., 2012). Kültür yaşının artması ise enzim aktivitesini azaltmıştır. Bu da zamanın artması ile mikroorganizmanın gelişiminin yavaşlaması ile açıklanabilmektedir. İnokulum boyutunun daha fazla artması selülaaz aktivitesinde kademeli olarak bir azalmaya neden olabilmektedir. Düşük boyutlu inokulum boyutlarında ise hücreler fermantasyon ortamını yeterli miktarda iyi bir yolla kullanamadıklarından selülaaz biyosentezi daha düşük bir gelişim göstermektedir (Malik ve ark., 2010). Daha yüksek inokulum boyutlarında ise besi ortamı içerisindeki besinin yetersiz kalması ve oksijen geriliminin artması nedeniyle selülaaz üretimi yavaşlayabilmektedir (Bhattacharya ve ark., 2014).

Çizelge 4.1. de MINITAB 16 programı kullanılarak elde edilen deney tablosu ve deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen veriler gösterilmektedir. Analiz edilen optimizasyon değerleri sonucunda Çizelge 4.2. ye bakacak olursak selülaaz aktivitesinin (FPU/ml) Box- Behnken yanıt yüzey yöntemi ANOVA tablosundan parametrelerin etki düzeyleri görülmektedir. Ayrıca pH, sıcaklık ve kültür yaşının karelerinin etkileri ($p < 0,05$), sıcaklık-spor sayısı, sıcaklık- kültür yaşı ve spor sayısı-kültür yaşının ikili etkilerinin de selülaaz üretimini etkileyen faktörlerden olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3' e bakıldığında selülaaz aktivitesinin deneysel olarak bulunan sonuçları ve istatistiksel olarak beklenen sonuçlar görülmektedir. Bu değerler birbirine oldukça yakındırlar. Deneysel tasarımın analiziyle elde edilen R^2 değeri %94,92 iken uyum eksikliği ise 0,001'dir.

En yüksek selülaaz aktivitesi 0,181 FPU/ml olarak pH 5,25, sıcaklık 45°C olan ortamda spor sayısı 1.10^{10} spor/ml ve kültür yaşı 24 saat iken elde edilmiştir. Sıcaklık, spor sayısı ve pH ın artması belirli seviyeye kadar aktiviteyi olumlu etkilerken kültür yaşının artışının üretimi olumsuz etkilediği gözlenmiştir. Aktivite düşük kültür yaşı, yüksek spor sayısında maksimumdur. Benzer çalışmalarda *Aspergillus niger* den elde edilen selülaazlarda optimum aktiviteye 5 gün sonunda ve pH 5 de ulaşılmıştır. Selülaaz aktivitesindeki azalma sellobiyozun birikmiş etkisinden kaynaklanabilmektedir. Çünkü sellobiyoz endoglukanaz ve glukosidazın her ikisini de inhibe etmesiyle bilinen bir glikozdur (Singh ve ark., 2009).

Yüzey optimizasyonu ile optimum koşullar pH 6,1, sıcaklık 38°C, spor sayısı 1.10^{10} spor/ml ve kültür yaşı 24 saat olarak belirlenmiştir. Optimizasyon sonucu beklenen selülaaz aktivitesi değeri 0,218 FPU/ml dir. Doğrulama deneyleri kapsamında bu optimum koşullarda üretilen selülaazın aktivitesi de 0,216 FPU/ml olarak bulunmuştur. Bu da sonuçların tutarlı olduğunu göstermektedir.

Uygulanan alkali ön işleme sonucunda hammaddelerin içerikleri Şekil 4.7. de görülmektedir. En yüksek selüloz fıncık kabuğuna uygulanan ön işleme elde edilmiştir. Karbon kaynağı olarak ön işleme görmüş haşhaş sapı, fıncık kabuğu ve ayçiçeği sapının kullanımı ile optimum koşullarda gerçekleştirilen üretimde en yüksek aktiviteye %2 fıncık kabuğu kullanımı ile 7. gün sonunda ulaşılmıştır. Elde edilen en yüksek selülaaz aktivitesi 0,181 FPU/ml dir.

Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12 incelenildiğinde her bir karbon kaynağı için substrat miktarı arttıkça selülaaz aktivitesinin de arttığı görülmüştür. Ortamda substratın daha fazla olmasıyla besin ortamının substrata yetersiz gelmesi dolayısıyla üretim düşebilmekte ve mantar gelişimi inhibe olabilmektedir (Romero ve ark., 1999).

Üretilen selülazın aktivitesinin artırılması için enzimin saflaştırılarak yabancı maddelerden arındırılması çok önemli bir aşamadır. Kromotografik yöntemlerle bu saflaştırma gerçekleştirilerek enzim daha aktif hale getirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Acharya, P. B., Acharya, D. K. ve Modi, H. A. (2008), "Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate", *African Journal of Biotechnology*, **7** (22), 4147-4152.
- Al- Ka'aby, T. (2012), "Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate", *Pure and Applied Sciences*, **20**, 1457-1465.
- Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M.S., Shirai, Y. ve Hassan, M.A. (2006) , "Production And Characterisation Of Cellulase By *Bacillus Pumilus* EB3", *International Journal of Engineering and Technology*, **3**(1), 47-53.
- Bail, S., Ravikumar, M., Mukeshkumar, D.J., Balashanmugam, P., Bala kumaran, M.D. ve Kalaichelvan, P.T. (2012), "Cellulase Production by *Bacillus subtilis* isolated from Cow Dung", *Scholars Research Library*, **4** (1), 269-279.
- Bhat, M.K., "Cellulases and related enzymes in biotechnology" (2000), *Biotechnology Advances* **18**, 355–383.
- Bhattacharya, S., Das, A., Patnaik, A., Bokade, P. ve Rajan, S. (2014), " Submerged fermentation and characterization of carboxymethyl cellulase from a rhizospheric isolate of *Trichoderma viride* associated with *Azadirachata indica*". *Journal of Scientific & Industrial Research*", **73**, 225-230.
- Cunha, F.M. , Esperança , M.N. ,. Zangirolami , T.C., Badino A.C. ve Farinas C.S. (2012)," Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase", *Bioresource Technology*, **112**, 270–274.
- Demir, A., Aytar, P., Gedikli, S., Çabuk, A. ve Arısoy , M. (2011), "Laccase Production with Submerged and Solid State Fermentation: Benefit and Cost Analysis", *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, **39** (3), 305–313.
- Devi, M.C. ve Kumar, M.S. (2012), "Production, Optimization and Partial purification of Cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper

- and timber sawmill industrial wastes”, *J. Microbiol. Biotech. Res.*,**2(1)** 120-128.
- Dinarvand, M., Ariff, A.B., Moeini, H., Masomian, M., Mousavi, S.S., Nahavandi, R. ve Mustafa, S. (2012), “Effect of extrinsic and intrinsic parameters on inulinase production by *Aspergillus niger* ATCC 20611”, *Electronic Journal of Biotechnology*, **15(4)**.
- Dominguesa, F.C., Queiroza, J.A., Cabralb, J.M.S. ve Fonseca, L.P. (2000), “The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30” , *Enzyme and Microbial Technology* ,**26** , 394–401.
- Dos Santos, T.C., Gomes, D.P.P., Bonomo, R.C.F. ve Franco, M., “Optimization of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes”, *Food Chemistry*, **133**,1299–1304, 2012.
- Ghose, T.K. (1987), “ Measurement of cellulase activities”, *Pure & Apl. Chem.*, **59 (2)**, 257-268.
- Goldbeck, R., Ramos, M.M., Pereira, G.A.G. ve Maugeri-Filho, F.(2013), “Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates”, *Bioresource Technology*, **128** ,797–803.
- Hendriks, A.T.W.M. ve Zeeman, G. (2009), “Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass,” *Bioresource Technology* **100**, 10–18.
- Hideno, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Yano, S., Fang, X., Endo, T. ve Sawayama, S. (2011), “Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source)”, *Enzyme and Microbial Technology* **48** , 162–168.
- Howard R.L., Abotsi E., Van Rensburg J.E.L. ve Howard S. (2003), “Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production”, *African Journal of Biotechnology*, **2(12)**, 602-619.
- Ijaz, A., Anwar, Z., Zafar, Y., Hussain, I., Muhammad, A., Irshad, M. Ve Mehmood, S. (2011), “ Optimization of cellulase enzyme production

- from corn cobs using *Alternaria alternata* by solid state fermentation”, *Journal of Cell and Molecular Biology*, **9(2)**, 51-56.
- Iqbal, H.M.N., Ahmed, I., Zia, M.A. ve Irfan, M. (2011), “Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility”, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **2**, 149-156
- Iqbal, H.M.N., Asgher, M., Ahmed, I. ve Hussain, S. (2010), “Media Optimization for Hyper-production of Carboxymethyl Cellulase using proximally analyzed agro-industrial residue with *Trichoderma harzianum* under SSF”, *IJAVMS*, **4(2)**, 47-55.
- Jadhav A.R., Girde A.V., More S.M., More S.B. ve Khan, S. (2013), " Cellulase Production by Utilizing Agricultural Wastes", *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*, **1(7)**, 6-9.
- Jeya, M., Zhang, Y., Kim, I., ve Lee, J. (2009), “Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM”, *Bioresource Technology*, **100**, 5155-5161.
- Kiranmayi, M.U., Poda, S. ve Vijayalakshmi, M. (2012), “Optimization Of Process Parameters For The Production Of Cellulases By *Trichoderma Reesei* Using Agrowates As A Carbon Source”, *International Journal of Current Research*, **4**, **169**-173.
- Limayem, A. ve Ricke, S.C.(2012), “ Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects”, *Progress in Energy and Combustion Science*, **38**, 449-467.
- Malik, S.K., Mukhtar, H., Farooqi, A.A. ve Ul-Haq, I.(2010), “Optimization Of Process Parameters For The Biosynthesis Of Cellulases By *Trichoderma Viride*”, *Pak. J. Bot.*, **42(6)**, 4243-4251.
- Manpreet, S., Sawraj, S., Pankaj, S. ve Banarjee, U.C.(2005), “Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid State Fermentation”, *Mal. J.Microbiol.*, **1(2)**, 1-9.

- Maurya, D., Singh, D., Pratap, D. ve Maurya, J.(2012), “Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*”, *J. Environ. Biol.*, **33**, 5-8.
- Miller, G.L., 1959, “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”, *Anal. Chem.*,**31**, 426–428.
- Montgomery D.C.,*Design and Analysis of Experiments*, Wiley Publisher, A.B.D. 2000.
- Mrudula, S. ve Murugammal, R.(2011), “ Production Of Cellulase By *Aspergillus niger* Under Submerged And Solid State Fermentation Using Coir Waste As A Substrate” *Brazilian Journal of Microbiology*, **42**, 1119-1127.
- Murad, H.A. ve Azzaz, H.H.(2013), Cellulase Production from Rice Straw by *Aspergillus flavus* NRRL 5521, *Science International*, **1(4)**, 103-107.
- Muthuvelayudham, R. and Viruthagiri, T.(2010), “Application of Central Composite Design Based Response Surface Methodology in Parameter Optimization and on Cellulase Production Using Agricultural Waste”, *International Journal of Chemical and Biological Engineering* ,**3(2)** , 97-104.
- Nagar, S., Gupta, V.K., Kumar, D., Kumar, L. ve Kuhad, R.C.(2010), “Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 71–83.
- Niranjane, A.P., Madhou, P. Ve Stevenson, T.W.(2007), “The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*”,*Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1464–1468.
- Omojasola, P.F., Jilani, O.P. ve Ibiyemi, S.A.(2008), “Cellulase Production by some Fungi Cultured on Pineapple Waste”, *Nature and Science*, **6(2)**, 64-79.
- Otajevwo, F.D.(2011), “Cultural Conditions Necessary for Optimal Cellulase Yield by Cellulolytic Bacterial Organisms as They Relate to Residual Sugars Released in Broth Medium”, *Modern Applied Science*, **5(3)**, 141-151.

- Padmavathi. T, Nandy, V. ve Agarwal, P. (2012), "Optimization of the medium for the production of cellulases by *Aspergillus terreus* and *Mucor plumbeus*", *Euro. J. Exp. Bio.*, **2(4)**, 1161-1170.
- Pandit, N.P. ve Maheshwari, S.M. (2012), "Optimization of Cellulase Enzyme Production from Sugarcane Pressmud Using Oyster Mushroom - *Pleurotus Sajor-Caju* by Solid State Fermentation", *J. Bioremed. Biodegrad*, 3(3), **1-5**.
- Purwadaria, T., Kumalasarı, A.T., Tutiharyati, Ketaren, P. P. Ve Sinurat, A. P. (2004), Optimization Of Cellulase Production With *Penicillium Nalgiovense* Sll Grown On Pretreated Wheat Pollard, *BIOTROPIA*, **23**, 1 – 12.
- Renge, V.C., Khedakar, S.V. ve Nandurkar, N.R. (2012), "Enzyme Synthesis By Fermentation Method : A Review", *Sci. Revs. Chem. Commun.*, **2(4)**, 585-590.
- Ramanathan, G., Banupriya, S. ve Abirami, D. (2010), "Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporu* by submerged fermentation" *Journal of Scientific & Industirial Research*, **69**, 454-459.
- Rashid, S.S, Alam, M.Z., Karim M. I. A ve Salleh, M.H. (2009), Optimization of the Nutrient Supplients for Cellulase Production with the Basal Medium Palm Oil Mill Effluent, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **60** , 809-815.
- Romero, M.D., Aguado, J., Gonzalez, L. ve Ladero, M. (1999), "Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw", *Enzyme and Microbial Technology*, **25**, 244–250.
- Sadhu, S. ve Maiti, T.K. (2013), "Cellulase Production by Bacteria: A Review", *British Microbiology Research Journal*, **3(3)**, 235-258.
- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateshwar, S. ve Rao, M.A. (2013), "Production Of Cellulase – A Review", *International Journal Of Pharmaceutical, Chemical And Biological Sciences*, **3(4)**, 1070-1090.
- Saravanan, K., Sivashankar, M. Ve Sivacharan S.R.C. (2008), Production And Optimization Of Cellulase From *Aspergillus Niger*, *Srm University*,

Department of Biotechnology School of Bioengineering Faculty Of Engineering And Technology, Kattankulathur.

- Singh, A., Singh, N. ve Bishnoi, N.R. (2009), "Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from Wheat Straw under Submerged Fermentation", *International Journal of Civil and Environmental Engineering*, **1(1)**, 23-26.
- Shobana, P. and Maheswari, N.U. (2013), "Production of Cellulase from *Aspergillus fumigatus* Under Submerged and Solid State Fermentation Using Agricultural Waste", *International Journal Of Advances In Pharmacy, Biology And Chemistry*, **2(4)**, 595-599.
- Thomas D.P. ve Ambikapathy. V. (2011), "Optimization of Cellulase produced by *Hormodendrum cladosporioides* using three leaf litters", *J. Microbiol. Biotech. Res.*, **1(3)**, 135-146.
- Toor, Y. ve Ilyas U. (2013), "Optimization of Cellulase Production by *Aspergillus ornatus* by the Solid State Fermentation of *Cicer arietinum*", *American Journal of Research Communication*.
- Vega, K., Villena, G.K., Sarmiento, V.H., Ludeña, Y., Vera, n. ve Gutiérrez-Correa M. (2012), "Production of Alkaline Cellulase by Fungi Isolated from an Undisturbed Rain Forest of Peru", *Biotechnology Research International*, 2012, **1-7**.
- Zhanga, B., Lua, L., Xiaa, Y. (2013), Wang Y. ve Xua, G., "Use of agar as carrier in solid-state fermentation for Monacolin K production by *Monascus*: A novel method for direct determination of biomass and accurate comparison with submerged fermentation", *Biochemical Engineering Journal*, 80, **10-13**.
- Zhao, X., Zi, L., Bai, F., Lin, H., Hao, X., Yue, G. Ve Ho N.W.Y. (2012), Bioethanol from Lignocellulosic Biomass, *Biochem Engin/Biotechnol.*, 128, **25-51**.
- Zoppas, F.M., Meneguzzi, A., ve Tramontina, F. (2013), "Alternatives for Cellulase Production in Submerged Fermentation with Agroindustrial Wastes", *International Journal of Modern Engineering Research*, **3(4)**, 2374-2381.