



## Katı Kültür Fermantasyon Tekniği ile *Streptomyces* sp. TEM25'ten Ksilanaz Üretimi

Bilge Hilal ÇADIRCI<sup>1\*</sup> İhsan YAŞA<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup> Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, Tokat

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD İzmir

\* e-posta: bilgehilal.cadirci@gop.edu.tr

Alındığı tarih (Received): 20.06.2016

Kabul tarihi (Accepted): 19.01.2017

Online Baskı tarihi (Printed Online): 01.06.2017

Yazılı baskı tarihi (Printed): 08.09.2017

**Öz:** Bu çalışmada, endüstriyel ve biyoteknolojik alanda geniş yer tutan ksilanaz enzimi üretimi için yeni gen kaynakları araştırılmış ve üretim koşulları optimize edilerek enzim üretim verimi artırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle, katı kültür ve batık kültür fermantasyonu teknikleri karşılaştırılmış, fermantasyon için başlangıç inokülasyon şekli ve miktarı optimize edilmiş ve nemlendirme oranının enzim üretim verimine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Toprakтан izole edilen 49 Aktimoniset izolatu içinden, en iyi ksilanaz üretici olarak belirlenen *Streptomyces* TEM 25 straininden ksilanaz üretiminin en iyi buğday kepeği kullanılarak yapılan katı kültür fermantasyonunda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Katı kültür fermantasyon koşulları optimize edilerek ksilanaz enzim aktivitesi yaklaşık 1,5 kat artırılmış ve %66,6 nemlendirme koşullarında 45,85 ±1.22 U/g kepek enzim aktivitesine ulaşıldığı belirlenmiştir. Amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile kısmi saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi 5 kat artırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Batık kültür fermantasyon, Katı kültür fermantasyon, Ksilanaz, *Streptomyces*, Selülaz

## Xylanase Production from *Streptomyces* sp. TEM25 by Solid State Fermentation

**Abstract:** In this study, new gene sources for the production of xylanase enzyme, which occupies a large area in industrial and biotechnological field, were investigated and optimization of production conditions was aimed to increase enzyme production efficiency. For this reason, the techniques of solid state fermentation and submerged fermentation were compared, the initial inoculation type and amount were optimized and the effect of humidification rate on the efficiency of enzyme production was determined. From 49 Actinomycetes strains isolated from soil, it was determined that xylanase production from *Streptomyces* TEM 25, which was identified as the best xylanase producer, was best performed in solid culture fermentation using wheat bran. After the optimization of the solid state fermentation conditions, xylanase activity was increased 1.5 fold to 45.85 ±1.22 U/g wheat bran under 66.6% moistened conditions. The specific activity of the partially purified enzyme was increased 5-fold by the ammonium sulfate precipitation method.

**Keywords:** Cellulase, Solid state fermentation, *Streptomyces*, Submerged fermentation, Xylanase

### 1. Giriş

Batık kültür ve katı kültür fermantasyon teknikleri ile enzim ve çeşitli metabolit üretimleri gerçekleştirilebilmektedir. Katı kültür fermantasyonu, kullanılan substratların ucuz olması, üretim ekipmanlarının kompleks

olmaması, düşük nem içeriği nedeniyle bakteriyel kontaminasyon riskinin az olması ve üretim sonrası ayırma ve saflaştırma işlemlerinin maliyetinin düşük olmasına bağlı (Mitchel and Berovic, 1998) çeşitli ekonomik ve mühendislik üstünlükleri (Souza et al., 2001) nedeni ile enzim

üretim çalışmalarında önem kazanmıştır. Ekonomisi büyük ölçüde tarım ve hayvancılığa dayalı olan ülkemizde bazı enzim türleri için dünya şirketlerinin enzim pazarında tekelleşmeye doğru gittikleri göz önüne alınırsa, hayvan yemi sektörümüz için ksilanaz enzimi üretiminin, özellikle atık tarımsal yan ürünleri kullanarak çeşitli ekonomik ve mühendislik üstünlükleri olan katı kültür fermantasyonu ile gerçekleştirilmesinin sağlayacağı yarar yadsınmaz (Sargın ve Öngen, 2003). Katı kültür fermantasyonu susuz ya da çok az su içeren katı maddelerin kullanıldığı bir fermantasyon prosesidir. Bu proseste, zirai ve gıda endüstrisi atık ürünler mikroorganizmaların karbon ve enerji gereksinimlerini karşılamak için kullanılır ve enzim ve organik asit gibi metabolitler üretilir. Atık ürünlerin kullanımı maliyeti düşürürler. Bu nedenle katı kültür fermantasyonu son yıllarda büyük bir ilgi çekmektedir (Kalim et al., 2015).

Fermantasyon endüstrisinde üzerinde durulan materyaller, selüloz ve benzeri heteropolimerlerdir. Odun her yerde bol miktarda bulunur ve daha ucuza elde edilir. Odun üç yapısal bileşene sahiptir; lignin, selüloz ve hemiselüloz. Ksilan odunun % 30'u kadar bir kısmını oluşturan bir hemiselülozdur. Ksilan çeşitli boyutlarda heteropolimerler olan (yumuşak odunlarda 70-130 birim, sert odunlarda 150-200 birim) bir komplekstir (Singh et al., 2007). Ksilanolitik enzimler  $\beta$ -1,4-endoksilanaz,  $\beta$ -ksilozidaz,  $\alpha$ -L-araninofuranozidaz,  $\alpha$ -glukuronidaz, asetil ksilan esteraz ve fenolik asit (ferulik ve p-kumarik asit) esteraz gibi enzimleri içeren gruba verilen isimdir (Aygan, 2008). Ksilanazlar (1,4, $\beta$ -D-ksilanhidrolaz EC 3.2.1.8) ksilanı ksilo-oligosakkarit ve ksillozlara hidrolizleyen enzimlerdir. Ksiloz bitki hücre duvarında bulunan heterojenik polisakkarittir. Araştırmacılar ksilanazları moleküler kütlesi 30kDa'dan büyük ve düşük izoelektrik nokta (pI) değerine sahip olanlar ile 30kDa'dan küçük moleküler kütleli ve yüksek pI değeri olanlar şeklinde iki gruba ayırmışlardır (Fedorova et al., 2012).

Ksilanolitik türlerden elde edilen enzimler daha çok kağıt hamuru ve kağıt sanayinde, gıda

sanayinde, yem sanayinde, tekstil endüstrisi uygulamalarında, çeşitli aromatik bileşiklerin elde edilmesinde ve diğer enzimlerin sinerjetik etkisi ile lignoselülozik biyokütleden etanol ve ksilitol gibi biyolojik yakıtların üretilmesinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca ksilanolitik enzimler hamurdaki polisakkaritleri parçalayarak unlu mamullerin pişirilmesini hızlandırır. Tarım, gıda ve tavukçuluk alanlarında oldukça sık kullanılan ksilanazların en ümit verici uygulamalarından birisi de, kağıt hamuru hazırlamada beyazlaştırma ajanı olarak klor kullanımının azaltılması ve kağıt hamurundan lignini uzaklaştırmasıdır. Enzim uygulaması kağıt hamurunun fibrilasyonunu ve su tutuşunu artırır, işlenmemiş kağıt hamurunda dövme sayısını düşürür, hurda kağıt hamurunda bağları onarır, çözünen hamurdan ksilanın selektif giderimini sağlar. Ksilanazlardan ayrıca odun hamurunda biobeyazlatma, sentetik ipek üretiminde ise hamurdan selüloz eldesinde faydalanılır (Kalim et al., 2015).

Lignoselülöz degradasyonunu içeren önemli endüstriyel enzimlerin üreticileri funguslar ve aktinomisetlerdir. Bu çalışmada toprak kökenli, filamentli, yüksek guanin-sitozin içeriğine sahip gram-pozitif filamentöz bakteriler olan aktinomisetlerden ksilanaz üreticisi *Streptomyces*'ler taranmıştır. En iyi ksilanaz üretim koşullarının belirlenmesi için fermantasyon tekniklerinde çeşitli modifikasyonlar yapılmış ve optimum şartlar belirlendikten sonra üretilen enzim kısmi olarak saflaştırılmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Kültürler

Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Kültür Koleksiyonundan alınan 49 izolat, ksilanaz üretimi için taranmış ve topraktan izole edilen *Streptomyces* sp. TEM25, izolatlar arasında en iyi ksilanaz üreticisi olarak belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. TEM25, glikoz-maya ekstraktı (GYA) besiyerinde saf kültür haline getirilmiştir. Bakteri kültürü +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

## 2.2. Besiyerleri

Minimal Media (MM): Xylan: 2.5 g/l; NaCl: 2.5 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 7g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 3g/l; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0.1 g/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 1 g/l; Soil extract 2 ml/l pH 8.0. Toprak ekstraktı: 500 g yüksek verimli toprak 1500 ml çeşme suyu ile karıştırılır ve 121°C'de 30 dakika otoklavlanır. Daha sonra kağıt veya bezden bulanıklık gidinceye kadar filtre edilir. Toprak ekstraktı daha soğumadan içine 0.5 g CaSO<sub>4</sub> veya CaCO<sub>3</sub> katılır ve iyice karıştırılır 5 dakika bekledikten sonra tekrar filtre edilir. Üzerine her 1 litre için 0.2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> eklenir (Beg et al., 2000). Horikoshi medium (Hori): Xylan: 5g/l; Pepton: 5g/l; yeast extract: 5g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1 g/l; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0.1 g/l, pH 8.0 (Beg et al., 2000). Growth Medium (GM): NaNO<sub>3</sub>: 1.2 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 3 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g/l, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0.2 g/l, CaCl<sub>2</sub>: 0.05 g/l, MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.01 g/l, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0.001g/l pH 7.0. GYM *Streptomyces* medium: Glukoz; 4 g/l, Yeast astract: 4 g/l, Malt extract; 10 g/l (www.dsmz.de/no=65). Linden media: Yeast extract: 3g/l, malt extract: 3 g/l; pepton: 5 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 19 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 3 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 1.1 g/l, Xylan 30 g (Linden and Hahn-Hagerdal, 1989). Park Media: Yeast extract: 2.5 g/l, beef extract: 5 g/l; pepton: 1 g/l, NaCl; 5 g/l; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0.5 g/l Xylan 5g/l (Park and Toma, 1974).

## 2.3. Fermantasyon Koşullarının Belirlenmesi

Katı kültür fermantasyonu için havalandırma koşullarını sağlayabilmek amacı ile 250 ml'lik erlenlere 5'er gram kepek tartılmıştır (Çadirci ve ark., 2016). %3 oranında yeast ekstrakt içeren steril distile su ile uygun oranda nemlendirildikten sonra kepek ortamı, 121°C'de 40 dakika otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra en iyi ksilanaz verimi için ortam koşulları optimize edilmiştir.

**İnokulumun hazırlanması ve inokulum türünün belirlenmesi:** GYA besiyerinde üretilen *Streptomyces* sp. TEM25 straininden sporlar kazınarak alınmış, daha sonra uygun seyreltmeler yapılarak 600 nm dalga boyunda

spektrofotometrik olarak okunmuş, aynı anda seyreltmelerden petrilere yayma ekim yapılarak canlı koloni sayısı belirlenmiştir. Bol miktarda üretilen sporlar tüp dilüsyon tekniği ile sayılarak %20 gliserol içinde saklanmıştır. *Streptomyces* sp. TEM25'in kepek ortamına spor süspansiyonu veya hücre solüsyonu şeklinde ilavesinin aktiviteye olan etkisinin belirlenmesi için, 1x10<sup>7</sup>cfu/ml konsantrasyonundaki spordan 250 ml'lik erlenlerdeki 50 ml GYA ortamına ekim yapılmış ve 27°C'de 170 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Üreyen pelletlerden %10 olacak şekilde kepek ortamına ekimler yapılmıştır.

*Streptomyces* sp. TEM25 izolatının en yüksek ksilanaz aktivitesi gösterdiği günü tespit etmek için kültürler 7 gün boyunca inkübasyonda tutulmuştur. Bu süre boyunca her gün örnek alınarak aktivite ölçümleri yapılmıştır.

**Katı kültür ve çalkalamalı kültür fermantasyonlarının karşılaştırılması:** Bu amaçla, 6 farklı besiyeri hazırlanmıştır. Tüm besiyerleri ikili hazırlanmış ve ikincilerde ksilan yerine %1 oranında kepek konulmuştur. Tüm ortamlara %2 oranında 24 saatlik kültürden ilave edilmiş ve 7 gün 27°C'de inkübe edilmiştir. Katı kültür fermantasyonu için de nemlendirilmiş kepeğe %10 oranında inokulasyon yapılmış ve 7 gün 27°C'de inkübe edilmiştir.

**Nemlendirme koşullarının etkisi:** Katı kültür fermantasyonunda iyi bir enzim verimi için nemlendirme önemli bir adımdır. Bu nedenle farklı nemlendirme koşullarında (% 40 (1:1.5 w/v), %66,7 (1:2 w/v) ve %71,4 (1:2.5 w/v) hazırlanan ortamlar 121°C'de 40 dakika steril edildikten sonra %10 oranında 0.5 mL spor aş inokülasyonu yapılmıştır. 27°C'de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılan ortamlardan 5, 6 ve 7. günlerde örnekler alınarak aktivite tayini yapılmıştır.

## 2.4. Ksilanaz Enziminin Üretimi ve Kısmi Saflaştırılması

Uygun üretim koşulları belirlendikten sonra inkübasyon sonucu üretilen ekstraselüler ksilanaz

enzimi içeren kepek ortamı üzerine 20 mL distile su ilave edilerek 30 dakika oda sıcaklığında 200 rpm'de karıştırılacak, enzimler suya alınmıştır. Kepekler, 0.5 mm<sup>2</sup> gözenek alanına sahip naylon tülbentten geçirilmiş ve daha sonra 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Süpernatant ksilanaz enzim karışımı olarak değerlendirilerek analitik ölçümler yapılmıştır (Çadırıcı ve ark., 2016). Daha sonra enzimin kısmi saflaştırılması %30, 60 ve 80 doyunlukta amonyum sülfat tuzu çöktürmesi ve aseton çöktürmeleri teknikleri ile yapılmıştır.

Kısmi saflaştırmada her basamakta protein içeriği Bradford yöntemi ile kontrol edilmiştir (Bradford, 1976).

### 2.5. Analitik Ölçümler

**Ksilanaz Enzim Aktivitesi:** Kültür süpernatantı ve ham enzim ekstraktlarında bulunan enzim karışımının ksilanaz aktivitesi, huş ağacı ksilanı (birchwood xylan, %1, w/v) substrat olarak kullanıldığında açığa çıkan indirgen şekerlerin dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi ile belirlenmesi temeline dayanmaktadır. 1 unite ksilanaz enzim aktivitesi, deney koşullarında (50°C; 50mM fosfat tamponu, pH 6.0) 1 mg ksilanı 1 dakikada ksiloza indirgeyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Miller, 1959).

**Filtre Kağıdı Selüloz Enzim Aktivitesi:** Ham enzim ekstraktlarında bulunan enzim karışımı ile bir saat boyunca 50°C'de muamele edilen 25 mg Whatman no:4 filtre kağıdından açığa çıkan indirgen şekerlerin DNS çözeltisi ile maltoz standartı kullanılarak Somogy-Nelson yöntemine göre belirlenmiştir (Nelson, 1944). 1 unite selüloz enzim aktivitesi, sabit koşullarda, dakikada 1 mg glikoz üretimini katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

### 3. Bulgular ve Tartışma

Endüstriyel uygulamalar için yeni gen kaynaklarının araştırılması ve enzim üretim koşullarının optimizasyonunun hedeflendiği çalışmamızda, *Streptomyces* sp. TEM25 izolatının iyi bir ksilanaz olduğu tespit edilmiş ve 6. gün

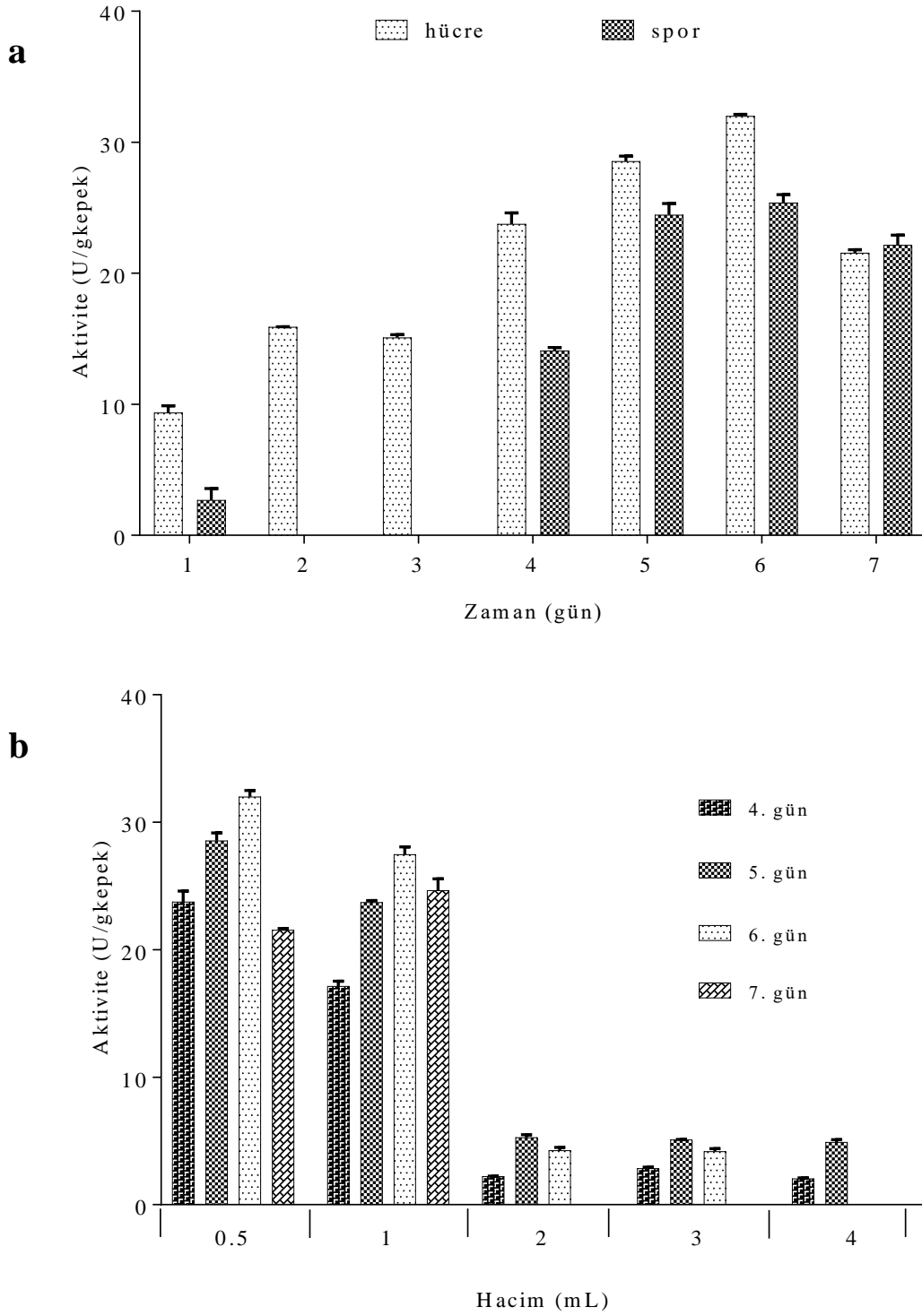
sonunda gram kepek başına 31,99±0,49 unit'lik aktivite ile %10'luk hacminde hücre solüsyonu inokulumu yapıldığında en yüksek değere ulaşılmıştır (Şekil 1).

*Streptomyces* sp. TEM25 sporları aşılındığında: 25,4±0,61 U/g kepek aktivite elde edilirken, hücre pelletleri aşılındığında 31,99±0,14 U/g kepek aktiviteye sahip ksilanaz elde edilmiştir. Bunun nedeni olarak sporların vejetatif forma geçerken daha fazla enerji harcaması nedeniyle enzim gibi sekonder metabolitlerin üretiminin daha az olması olduğu öngörülmüştür.

Çizelge 1'de görüldüğü gibi batık kültür fermentasyonlarında kepeğin ksilanaz enzim ekspresyonunu MM, GM, Hori ve Park ortamlarında indüklediği gözlemlenirken, GYM ve Linden besiyerlerinde saf ksilan kadar etkisi olmamıştır. Batık kültürde en yüksek aktivite Linden ortamında elde edilirken (8,1 U/ml), katı kültür fermentasyonu sonucu elde edilen aktivite bu değeri geçmiştir (25,39 U/g kepek). Özellikle tamamen inorganik içeriğe sahip GM ortamında enzim aktivitesini gözlemlenmek, ham kepeğin de ksilan kadar veya daha fazla *Streptomyces* sp. TEM25 tarafından ksilanaz üretimini indüklediğini göstermektedir.

Bu sonuç ile, ksilanaz üretiminde atık ürün olan kepeğin besiyerinde kullanılmasının doğru bir seçim olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca batık kültür ile katı kültür fermentasyon teknikleri kıyaslandığında katı kültür fermentasyonunu ile yaklaşık üç kat daha yüksek oranda enzim üretilebileceği gösterilmiştir. Bu durum ksilanaz üretim çalışmalarını için katı kültür fermentasyon tekniğinin seçilmesi gerektiğini göstermektedir.

Katı kültür fermentasyonunda farklı nemlendirme koşullarında (% 40, 66.7 ve 71.4) yapılan çalışmada en uygun nemlendirmenin



**Şekil 1.** Farklı inokulum denemeleri a) *Streptomyces* sp. TEM25'in, vegetatif hücre veya spor inokulum şeklinde aşılmasının b) başlangıç hücre inokulum miktarlarının enzim üretimine etkisi.

**Figure 1.** Various inoculum trials. Effects of a) inoculum style as vegetative cells or spor forms of *Streptomyces* sp. TEM25 b) inoculum amount of starter cells on enzyme production

**Çizelge 1.** Batık kültür ve Katı kültürde ksilanaz üretiminin karşılaştırılması

**Table 1.** Comparison of xylanase production in submerged fermentation and solid state fermentation

	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün
GYM	2,9*	2,3	3,3	2,7	2,9	-
GYM+ kepek	4,3	2,2	2,4	2,1	-	-
MM	0,7	1,7	3,1	2,8	-	-
MM+ kepek	2,8	3,5	4,3	3,5	-	-
GM	1,5	1,6	3,4	2,7	3,5	3,5
GM+kepek	3,2	3,7	4,5	3,6	4,3	4,0
Hori	1,1	0,9	1,7	1,4	-	-
Hori kepek	2,7	3,5	3,8	3,3	-	-
Linden	1,9	6,2	6,5	8,1	7,8	-
Linden+ kepek	1,1	4,0	3,7	4,6	4,1	-
Park	0,0	0,8	0,6	0,7	1,1	-
Park+ kepek	0,3	1,8	1,4	1,6	1,7	-
Kepek*	2,7	-	-	14,1	24,5	25,4

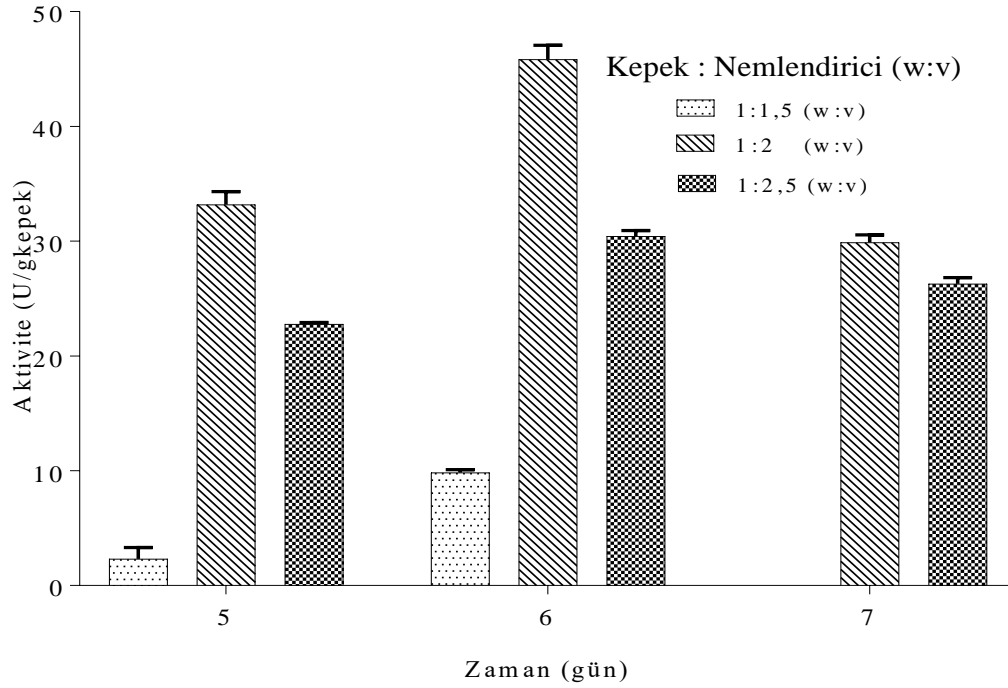
\* Aktivite (U/mL), \*\* Aktivite (U/gkepek), - aktivite görülmemiştir

% 66,6 olduğu ve bu nemlendirme koşullarında 45.85 ±1,22 U/g kepek enzim aktivitesine ulaşıldığı belirlenmiştir (Şekil 2).

Selülozlar, selülozu glikoza parçalayabilme kapasitesindeki hidrolitik enzim grubudurlar. Bitki hücre duvarlarında ksilanın yanında selülozun da bulunması nedeni ile *Streptomyces* sp. TEM25 strainin ürettiği selülaz aktivitesi ksilanaz aktivitesi ile karşılaştırmalı olarak ham ekstraktta araştırılmıştır. Şekil 3'te görüldüğü gibi en yüksek selülaz aktivitesi 5.günde 0,31 U/g kepek olarak bulunurken, ksilanaz aktivitesi 6.günde 31,99 U/gkepek olarak bulunmuştur. Böylece hücrede selülaz ve ksilanaz sekresyonunun birlikte gerçekleştiği ancak selülaz aktivitesinin 6. günde azaldığı görülmüştür.

En yüksek ksilanaz aktivitesinin görüldüğü 6. günde ham ekstraktlar toplanarak kısmi

saflaştırma basamaklarına geçilmiştir. Ham ekstrakt kademeli olarak %30, 60 ve 80 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesine maruz bırakılmış, %60 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi ile en yüksek ksilanaz aktivitesi ve protein miktarı elde edilmiştir. Bu nedenle saflaştırmanın devamına bu çöktürme basamağından elde edilen enzim ekstraktı ile devam edilmesi kararlaştırılmıştır. Enzim yoğunlaştırma yaparken buğday kepeğinden kaynaklanan bazı boyar maddelerin ekstraktan uzaklaştırılması düşüncesi ile aseton ile çöktürme yöntemiyle de enzimin konsantre edilmesi planlanmıştır. Ancak Çizelge 2'de görüldüğü gibi çok büyük aktivite ve protein kaybı görülmüştür. Bu nedenle amonyum sülfat çöktürme tercih edilmiştir.



**Şekil 2.** Nemlendirme miktarının enzim üretimi üzerine etkisi. 5 gr kepek, nemlendirici olarak %3 oranında yeast ekstrakt içeren steril distile su ile farklı oranlarda nemlendirilmiştir. 0.5 mL *Streptomyces sp. TEM25* sporları başlangıç inokulumu olarak kullanılmıştır.

**Figure 2.** Effects of moisture amount on enzyme production. 5 g of wheat bran was moistened by various ratios of sterile distilled water including 3% of yeast extract. 0.5 mL of *Streptomyces sp. TEM25* spores were used as starter inoculum.

Sonuçta endüstriyel olarak kullanılan lipaz, ksilanaz, amilaz, proteaz vb. enzimlerin analitik düzeyde saflaştırılması maliyeti artırdığı için tercih edilmemektedir. Bu çalışmada ksilanaz

üretimi için kepeğin kullanıldığı katı kültür fermantasyonunun, batık kültür fermantasyon tekniğine göre uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

**Çizelge 2.** *Streptomyces sp. TEM25*'ten elde edilen ksilanaz enziminin saflaştırılması

**Table 2.** Purification of xylanase from *Streptomyces sp. TEM25*

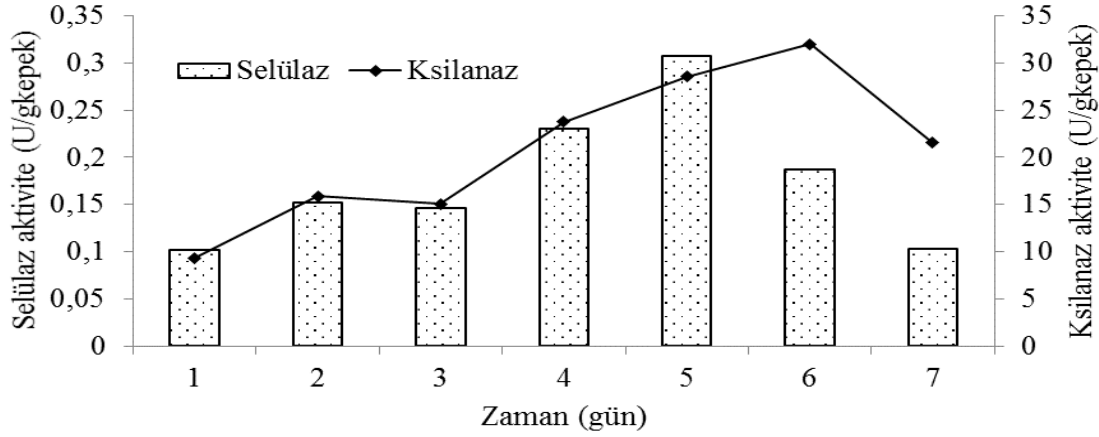
	Total aktivite (U)	Total protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma	Rölatif aktivite (%)
Ham ekstrakt	7811,5±207,8	1531,5±158,3	5,10±1,3	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1555,1±117,3	65,5±1,1	23,74±2,4	4,66	19,91
Aseton	14,7±2,9	114,8±4,4	0,13±0,1	0,03	0,19

Katı kültür fermantasyonunun, ekstraselüler enzim üretiminde avantajlı olduğu ile ilgili benzer bir sonuç, lipaz üretimi için de gösterilmiştir (Çadırıcı ve ark., 2016). Ayrıca fermantasyon

koşullarının optimizasyonu ile enzim üretim verimi yaklaşık %43 oranında artırılmıştır. Bu sonuç fermantasyon koşulları optimizasyonlarının ürün verimi artırımı üzerindeki önemini bir kez daha göstermektedir.

Ayrıca %60'lık amonyum sülfat çöktürmesi ile yaklaşık 5 katlık bir saflaştırma yapılabilmektedir. Bu sonuç, Kang ve ark. (1996) tarafından *Cephalosporium* sp.'den yapılan ksilanazın kısmi saflaştırmada elde edilen sonuçlarla uyumludur.

göstermektedir. Çalışmada elde edilen ksilanaz enzim aktivitesi, Kavya ve Padmavathi (2009)'nın optimize katı kültür fermentasyon tekniği kullanarak *Aspergillus niger*'den elde ettikleri 12,65 U/mL enzim aktivitesinden yaklaşık 4,5 kat daha fazladır.



**Şekil 3.** *Streptomyces* sp. TEM25 izolatının ksilanaz ve selülaz üretim profilleri  
**Figure 3.** Xylanase and cellulase production profiles of *Streptomyces* sp. TEM25

#### 4. Sonuç

Topraktan izole edilen 49 Aktimoniset izolatı içinden, en iyi ksilanaz üretici olarak belirlenen *Streptomyces* TEM 25 straininin, hem selülaz hem ksilanaz aktivitesi gösterdiği, ksilanaz üretiminin batık kültür fermentasyonu ile kıyaslandığında en iyi buğday kepeği kullanılarak yapılan katı kültür fermentasyonunda olduğu ve fermentasyon ortamı optimizasyonları yapıldığında ise enzim üretim veriminin  $45.85 \pm 1,22$  U/g kepek enzim aktivitesi ile yaklaşık %43 oranında artırıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca farklı deriştirilme yöntemi kıyaslanarak, katı kültür fermentasyonu ile üretilen ksilanaz, %60'lık amonyum sülfat çöktürmesi ile yaklaşık 5 kat saflaştırılmıştır.

Sonuç olarak en *Streptomyces* sp. TEM25 ham ekstraktı, ruminant ve monogastrik hayvanların yemlerinde sindirilebilirliği artırmak amacı ile kullanılmaya uygundur.

#### Kaynaklar

Aygan A (2008). Haloalkofil *Bacillus* sp. izolasyonu, amilaz, selülaz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda

- kullanılabilirliği. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yayınlanmış, Doktora Tezi, Adana.
- Beg QK, Bhushan B, Kapoor M, Hoondal GS (2000). Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24(6): 396-402.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cadirci BH, Yasa I and Kocyigit A (2016) *Streptomyces* sp. TEM 33 possess high lipolytic activity in solid state fermentation in comparison with submerged fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 46(1):23-29.
- Fedorova TV, Chulkin AM., Vavilova EA, Maisuradze IG, Trofimov AA, Zorov IN, Khotchenkov VP, Polyakov KM, Benevolensky SV, Koroleva OV and Lamzin VS (2012). Purification, biochemical characterization, and structure of recombinant endo-1,4-b-xylanase XylE. *Biochemistry (Moscow)* 77 (10): 1433-1442.
- Kalim B, Böhringer N, Ali N and Schäberle TF (2015). Xylanases—from microbial origin to industrial application. *British Biotechnology Journal* 7(1): 1-20.
- Kang MK, Maeng PJ, Rhee YH (1996). Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic *Cephalosporium* sp. strain RYM-202. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3480-3482.
- Kavya V, Padmavathi T (2009). Optimization of growth conditions for xylanase production by *Aspergillus*



- niger* in solid state fermentation. Polish Journal of Microbiology 58(2):125-30.
- Linden T and Hahn-Hagerdal B (1989). Fermentation of lignocellulose hydrolysates with yeasts and xylose isomerase. Enzyme and Microbial Technology 11: 583–589.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31: 426-428.
- Mitchell D and Berovic M (1998). Solid state fermentations. in: Bioprocess Engineering Course, Ed. M. Berovic, National Institute of Chemistry, Slovenia, 128- 167.
- Nelson N (1944). Nelson’s method for quantitative determination of reducing power of carbohydrates. Journal of Biological Chemistry, 153: 375–380.
- Park YK and Toma M (1974) Inter relation between microbial xylanase and glucose isomerase production. Journal of General and Applied Microbiology 20: 67-69.
- Sargın S ve Öngen G (2003). Kanatlı yemi katkısı olarak kullanılan ksilanaz enziminin katı kültür fermantasyon yöntemi ile üretiminde ölçek büyütme çalışmaları. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 40(3): 145-152.
- Singh RP, Dwivedi P, Vivekanand and Kapur N (2007). Xylanases: Structure, Molecular Cloning and Regulation of Expression. in: *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*. Ed. R.C. Kuhad and Singh A., I.K. International Publishing House, New Delhi, India, 149–161.
- Souza DF, Souza CGM and Peralta RM (2001). Effect easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid state fermentation. Process Biochemistry, 36: 835-838.