

Katı Hal Fermantasyonu Kullanılarak *Streptomyces* sp. M127-1'den Elde Edilen Termotolerant Selülazın Yanıt Yüzeyi Metodolojisi ile Optimizasyonu

*Makale Bilgisi / Article Info

Alındı/Received: 01.08.2023

Kabul/Accepted: 12.01.2024

Yayımlandı/Published: 27.02.2024

Optimization of Thermotolerant Cellulase from *Streptomyces* sp. M127-1 with Response Surface Methodology using Solid-State Fermentation

Muzaffer BİNEK¹, Elif Esin HAMEŞ^{1,2,*}

¹ Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

² Biyomühendislik Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

Öz

Çalışma, kompostlamada kullanılabilecek selülazın aktinomiset izolatından katı hal fermantasyon yöntemiyle Yanıt Yüzeyi Metodolojisi (RSM) kullanılarak optimizasyonunu ve enzimin kısmi karakterizasyonunu amaçlamaktadır. Selülaz üreticisi olduğu belirlenmiş 5 izolat (M127-1, M127-2B, 1M1, M45-1 ve M6c-1) katı hal fermantasyonu ile selülaz üretimi açısından değerlendirilmiş ve izolat M127-1 ileri çalışmalar için seçilmiştir. Katı substrat seçimi için farklı substratların (talaş, malt çimi, soya unu ve buğday kepeği) kombinasyonları ile hazırlanan ortamlarda izolat M127-1 ile katı hal fermantasyonu gerçekleştirilmiş ve en iyi enzim aktivitesinin buğday kepeği-malt çimi (BM) (0,704 U/ml) ortamında olduğu belirlenmiştir. Ardından BM ortamı kullanılarak selülaz üretim optimizasyonu için nem, aşı miktarı ve inkübasyon süresi merkezi kompozit tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. Optimum selülaz üretim koşulları % 79,93 nem, 8,58 gün inkübasyon süresi ve 8,38 (v/w) aşı miktarı olarak belirlenmiş ve enzim aktivitesinin 1,8 kat arttığı görülmüştür. Enzimin optimum pH'sı 6 ve optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir. 16SrDNA dizi analizi ile izolat, *Streptomyces* sp. M127-1 olarak tanımlanmıştır. Sonuç olarak yüksek sıcaklıkta aktif selülazın uygun maliyetli substratlar kullanılarak katı hal fermantasyonu ile *Streptomyces* sp. M127-1'den istatistiksel üretim optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler

Selülaz; *Streptomyces*; Kompostlama; Katı hal fermantasyonu; Yanıt yüzey metodolojisi.

Abstract

The study aims to optimise cellulase that can be used in composting from actinomycete isolate using the solid-state fermentation method with Response Surface Methodology and its partial characterisation. Five isolates (M127-1, M127-2B, 1M1, M45-1 and M6c-1) were previously determined to be candidate cellulase producers, were investigated for cellulase production by solid-state fermentation, and isolate M127-1 was selected for further studies. For solid substrate selection, solid-state fermentation was performed by isolate M127-1 in media-prepared combinations of different solid substrates (sawdust, soy flour, malt grass and wheat bran), and the highest enzyme activity was found to be wheat bran-malt grass (BM) medium (0.704 U/ml). Then, moisture, inoculum size, and incubation time were optimised with the central composite design for cellulase optimisation using BM medium. Optimum cellulase production conditions were determined as 79.93% moisture, 8.58 days incubation time and 8.38 (v/w) inoculum size, and it was observed that the enzyme activity increased by 1.8 times. The optimum pH of the enzyme was 6, and its temperature was 60°C. The isolate was identified as *Streptomyces* sp. M127-1 by 16SrDNA sequence analysis. In conclusion, the thermotolerant cellulase production at high temperatures was optimised from *Streptomyces* sp. M127-1 through solid-state fermentation using cost-effective substrates.

Keywords

Cellulose; *Streptomyces*; Composting; Solid state fermentation; Response surface methodology.

1. Giriş

Selülaz, bitki hücre duvarında bulunan karmaşık bir karbohidrat olan selülozun parçalanmasında önemli rol oynayan bir enzimdir. Selülozik malzemelerin bozunması ile biyoyakıt üretimi, tekstil endüstrisi ve atık yönetiminde kullanım alanı bulan selülazlar, özellikle organik atıkların ayrışmasının doğal bir süreci olan

kompostlama ile sürdürülebilir atık yönetimi ve toprak zenginleştirme konusundaki muazzam potansiyeli nedeniyle artan bir ilgi görmektedir (Khan *et al.* 2016, Danso *et al.* 2022, Kumar *et al.* 2022, Korsa *et al.* 2023). Selülaz, bitkisel malzemelerin bozunmasında rol oynayarak organik atığın besin açısından zengin kompostta dönüştürülmesini kolaylaştırır. Çevre dostu bir atık yönetim tekniği olan kompostlama, toprak

iyileştirmesini sağlarken aynı zamanda organik atıkları düzenli depolama alanlarından uzaklaştırmak için sürdürülebilir bir çözüm sunmaktadır. Süreç, mikroorganizmaların etkisiyle organik maddenin ayrışmasını içerir (Ayılara *et al.* 2020). Selülozik biyokütlenin enzimatik hidrolizi, asit/alkali hidrolizinden farklı olarak bozunma ürünleri oluşturmadan yüksek özgülük ve yüksek verimde glikoz üretimi nedeniyle büyük umut vaat etmektedir (Khan *et al.* 2016). Çeşitli organik bileşikler arasında, bitki hücre duvarında bulunan selüloz, mikrobiyal bozunma için ana substratı oluşturur. Endoglukanazları, ekzoglukanazları ve β -glukosidazları içeren selüloz enzimleri, selülozun daha küçük glikoz birimlerine parçalanmasını başlatan katalizörlerdir. Endoglukanazlar, selüloz zinciri içindeki iç β -1,4-glikosidik bağları rastgele ayırarak daha kısa selüloz parçaları oluşturarak süreci başlatır. Ekzoglukanazlar bu parçalar üzerinde aktivite göstererek sellobiyozu serbest bırakır ve zincir uzunluğunu daha da kısaltır. Son olarak, β -glukosidazlar sellobiyozu mikroorganizmalar tarafından kolayca kullanılabilen glikoza hidrolize eder (Chen *et al.* 2021). Bu enzimlerin birlikte çalışması ile selülozun etkili hidrolizi sağlanarak kompostlama işlemi için atıklar mikrobiyal kullanıma hazır hale getirilir. Selüloz enzimlerinin varlığı ve aktivitesi, kompostlama işleminin verimini ve hızını önemli ölçüde etkiler. Yüksek selüloz aktivitesi, kompost olgunlaşmasının hızlandırılmasına yol açan selüloz bozunmasına neden olur. Selüloz enzimleri mikroorganizmaların selüloza ulaşmasını kolaylaştırarak mikrobiyal aktiviteyi ve biyokütle üretimini artırır (Sun *et al.* 2021, Kocak *et al.* 2023). Ayrıca, selülozun selüloz tarafından enzimatik olarak parçalanması, karbon, azot ve fosfor gibi besinlerin salınmasına katkıda bulunarak bu bileşiklerin bitki tarafından alınımını kolaylaştırır (Mazumder *et al.* 2021). Biyokütlenin enzimatik sürdürülebilir biyodönüşümü yoluyla selülozik atık miktarının azaltılmasında selülazın önemli rolü bulunmaktadır (Khan *et al.* 2016). Selülazlar, bitkiler, hayvanlar, funguslar ve bakteriler dâhil olmak üzere çok çeşitli organizmalar tarafından sentezlenir. Biyoaktif bileşik üretme yetenekleriyle bilinen Gram-pozitif filamentli bakteriler olan aktinomisetler, çok yönlü enzimatik yetenekleri ile de çeşitli biyoteknolojik süreçlerde araştırılmaktadır (Celaya-Herrera *et al.* 2021, Samuel *et al.* 2022, Topatan and Katı, 2022). Bu mikroorganizmalar dünya genelinde farklı iklim bölgelerinde yaygın olarak dağılır ve karasal ve sucul çevrelerde bulunur. Aktinomisetler, nötr ve alkali pH'ta mezofilik ve termofilik (50-60°C) şartlarda büyüyebilir ve ayrıca lignoselülozik materyaller gibi kompleks substratları parçalama yeteneğine sahiptir (Insam and de

Bertoldi 2007, Tuomela *et al.* 2000, Bhatti *et al.* 2017). Bu çalışmada, daha önce izole edilen aktinomiset suşları içerisinde yüksek selüloz aktivitesi gösteren aktinomisetler kullanılarak selüloz üreticisinin seçiminin ardından kompostlama hedefine yönelik selülozik içerikli substratlar kullanılarak katı hal fermantasyon tekniği ile selüloz üretiminin istatistiksel optimizasyonu ve kısmi karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot / Materials and Methods

2.1 Mikroorganizmaların aktivasyonu ve kültürasyonu

Çalışmada Biyomühendislik Bölümü Medikal Biyoteknoloji laboratuvarında bulunan ve aynı zamanda World Federation of Culture Collections'a kayıtlı (WDCM 952) Aktinomiset Kültür Koleksiyonu (ACTINOCC) üyeleri içinden toprak kökenli mezofil alkalifilik aktinomiset suşları kullanılmıştır. Daha önce tarama çalışması yapılan ve iyi selüloz üreticisi olduğu belirlenen toprak, çamur ve termal sulardan izole edilmiş M127-1, M127-2B, 1M1, M45-1 ve M6c-1 kodlu izolatlar ile çalışma gerçekleştirilmiştir. İzolatların aktivasyonunda Mannitol Soya unu (MS) (mannitol 20 g, soya unu 20 g, agar 15 g, distile su 1L, pH 8) besiyeri kullanılmış, -20°C'de bulunan gliserol stoklarından petrilere inoküle edilen kültürler 30°C'de 5-7 gün inkübe edilmiştir (Hobbs *et al.* 1989).

2.2. Aşı kültürü hazırlanması

Katı hal fermantasyonunu başlatmak için her defasında yeni hazırlanan aşı kültürü kullanılmıştır. MS besiyerinde aktive edilmiş genç kültürden 6 mm çapında 3 agarlı parça, plug yardımıyla alınarak 50 mL Glikoz Yeast ekstrakt (GY) (glikoz 10 g, maya özütü 2 g, pepton 25 g, K₂HPO₄ 0,1 g, destile su 1 L, pH 8) içeren 250 mL'lik erlenlere aseptik koşullarda inoküle edilmiş ve 150 rpm ve 30°C'de 3-4 gün inkübe edilmiştir. Sporların çimlenmesi sonrası oluşan milimetrik boyuttaki pelletler aşı olarak kullanılmıştır (Demir *et al.* 2015). Aşılamanın homojenizasyonu ve pelletlerin verimli şekilde kullanılabilmesi için pellet içermeyen fazla besiyeri (toplam hacmin 4/5'i) aseptik koşullarda erlenlerden pipetlenerek çıkarılmış ve kalan yoğun pellet içeren kültürden 3 mL aşılama için kullanılmıştır.

2.3 Yüksek selüloz aktivitesine sahip suşun seçimi

Karboksimetil selüloz (CMC) içeren sentetik besiyerinde yüksek selüloz aktivitesi daha önce belirlenmiş olan 5 izolatın (M127-1, M127-2B, 1M1, M45-1 ve M6c-1) buğday kepeği-malt çimi (BM) besiyerinde katı hal

fermantasyonu (7 gün, 30°C) gerçekleştirilmiştir. Besiyerleri 10 g katı substrat, aşı kültürü hacmi dikkate alınarak % 75 nem (Sargın ve Göksungur 2007) içerecek şekilde 250 mL'lik erlenlerde hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrası selüloz aktivitesi ölçülmüş ve en yüksek aktivite elde edilen izolat ile optimizasyon çalışmasına devam edilmiştir.

2.4 Enzim Ekstraksiyonu

Katı hal fermantasyonunda selüloz aktivite ölçümü öncesinde enzim ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için her bir erlene 50 mL distile su eklenmiş, 30 dakika süresince aralıklarla karıştırılmış ve ardından bir huni üzerine yerleştirilen tülbent bezi üzerine erlen içeriği aktararak temiz bir kaba süzdürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen süzölmüş içerik 7000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek üst sıvı enzim aktivite tayininde kullanılmıştır (Sargın ve Göksungur 2007).

2.5 Selüloz aktivite tayini

CMC ve filter kâğıdı yöntemi olarak 2 ayrı yöntem selüloz aktivite tayininde kullanılmış, enzimin endo- β -1,4 glukanaaz aktivitesi belirlendiğinden ilerleyen çalışmalarda CMC yöntemi ile devam edilmiştir. CMC ile endo- β -1,4 glukanaaz aktivitesi ve hesaplamaları Ghose (1987)'a göre gerçekleştirilmiştir. Selüloz aktivitesi inkübasyon süresince enzimin CMC'yi parçalayarak ortaya çıkardığı glikoz miktarının hesaplanması esasına göre yapılmaktadır. Bu işlem için ilk olarak farklı glikoz konsantrasyonları ile hazırlanan örnekler kullanılarak DNS (Dinitrosalicylic acid) yöntemi ile glikoz absorbans grafiği elde edilmiştir. Enzimatik aktiviteyi hesaplamak için enzimin farklı seyreltmelerinden alınan 0,5 mL enzim çözeltisi 0,5 mL CMC çözeltisi (sitrataz tampon içinde %2 CMC) ile 50°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 3 mL DNS eklenerek 5 dakika kaynatılan tüplerin üzerine 20 mL distile su ilave edilmiş ve 549 nm'de UV-VIS Spektrofotometrede (Optizen POP, Korea) absorbans ölçülmüştür. Standart çözeltiler, kültür sıvıları ve kör örneklere de aynı işlem basamakları uygulanmıştır.

2.6 Katı hal fermantasyonu ile uygun besiyeri seçimi

Fermantasyon, içerdiği serbest su miktarına göre katı hal ve derin kültür fermantasyonu olabilmektedir. Katı hal fermantasyonu veya diğer ismiyle katı substrat fermantasyonu, serbest su içermeden mikroorganizmaların katı maddeler üzerinde gelişim gösterdiği bir fermantasyon işlemidir (Abdul Manan and Webb 2017). Doğada ölü bitki dokuları üzerinde büyüyen birçok mikroorganizma, katı hal fermantasyonu ile doğal

ortamlarına benzer koşullar sağlandığından başarılı olarak üretilebilmektedirler (Mendoza-Cal *et al.* 2010). Bu yöntem yenilenebilir ve ucuz substratların kullanımına uygun olması, az miktarda su kullanımı, toplam yatırım ve enerji harcamasının daha az olması gibi çeşitli avantajlara sahiptir (Raimbault 1998). Bu çalışmada da tarımsal katı substratların kullanıldığı katı hal fermantasyonunda karbon ve azot kaynağı dikkate alınarak beş farklı besiyeri oluşturulmuştur. Buğday kepeği-malt çimi besiyeri (BM) (buğday kepeği 9 g, malt çimi 1 g, distile su 27 mL), Buğday kepeği-soya unu besiyeri (BS) (buğday kepeği 9 g, soya unu 1 g, distile su 27 mL), Talaş-malt çimi besiyeri (TM) (talaş 9 g, malt çimi 1 g, distile su 27 mL), Talaş-soya unu besiyeri (TS) (talaş 9 g, soya unu 1 g, distile su 27 mL), Malt çimi besiyeri (M) (malt çimi 10 g, distile su 27 mL). Tüm besiyerleri 3 mL aşı kültürü hacmi de dikkate alınarak % 75 nem içeren (Sargın ve Göksungur 2007) substrat olacak şekilde 250 mL'lik erlenlerde hazırlanmış ve otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Ardından genç aşı kültürü (3 mL) ile laminar akışlı kabinde steril besiyerlerine aseptik koşullarda inoküle edilerek 30°C'de 5 gün inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası enzim ekstraksiyonu ve aktivite tayini gerçekleştirilmiştir.

2.7 Selüloz üretiminin istatistiksel optimizasyonu

Bu çalışmada her seferinde bir değişkenin değiştirilerek diğerlerinin sabit tutulduğu dolayısı ile değişkenlerin birbirleri ile etkileşiminin ihmal edildiği (one variable at a time-OVAT) geleneksel optimizasyon çalışması yerine değişkenler arası etkileşimin değerlendirilmesini sağlayan daha az sayıda deneme ile istatistiksel olarak deneme tasarımı yapılarak optimizasyon gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel deney tasarımı, faktöriyel tasarım veya deney tasarımı olarak isimlendirilen ve yakın geçmişte biyoteknolojik işlemlerin optimizasyonunda da yoğun şekilde kullanılmaya başlanan, parametre sayısına göre iki veya üç boyutlu analize imkân tanıyan bir yöntemdir (Mandenius and Brundin 2008, Antony 2023). Enzim aktivite tayin sonuçlarına göre seçilen besiyeri kullanılarak katı hal fermantasyonu ile istatistiksel deney tasarımında önemli değişkenler olan nem oranı (%60-85), inkübasyon süresi (3-10 gün) ve aşı miktarının (%2-10 v/w) optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Parametrelerin etkileri ve birbirleriyle etkileşimlerinin belirlenmesi için yanıt yüzeyi metodolojisi (Response Surface Methodology- RSM) yaklaşımı Design Expert Software 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için Merkezde 6 tekrarı içeren 2³-Tam Faktöriyel Merkezi

Kompozit Tasarımı (Central Composite Design-CCD) deneysel tasarım olarak seçilmiştir. Programın oluşturduğu deney tasarımı **Çizelge 2'**de sunulmuştur.

2.8 İstatistiksel analiz

Tasarlanan modellerin regresyon ve varyans analizleri 'Design Expert Software' ile gerçekleştirilmiş ve varyans analizini (One-way analysis of variance ANOVA) değerlendirilmede modelin istatistiksel analizi yapılmıştır.

2.9 Enzim karakterizasyonu

2.9.1 Optimum pH

Optimum pH'nın belirlenmesi için %2 CMC içeren ve pH değeri 4-11 arasında değişen tamponlar (0,5 M) kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. pH 4, 5 ve 6 için sitrat tamponu, pH 6, 7 ve 8 için fosfat tamponu, pH 8 ve

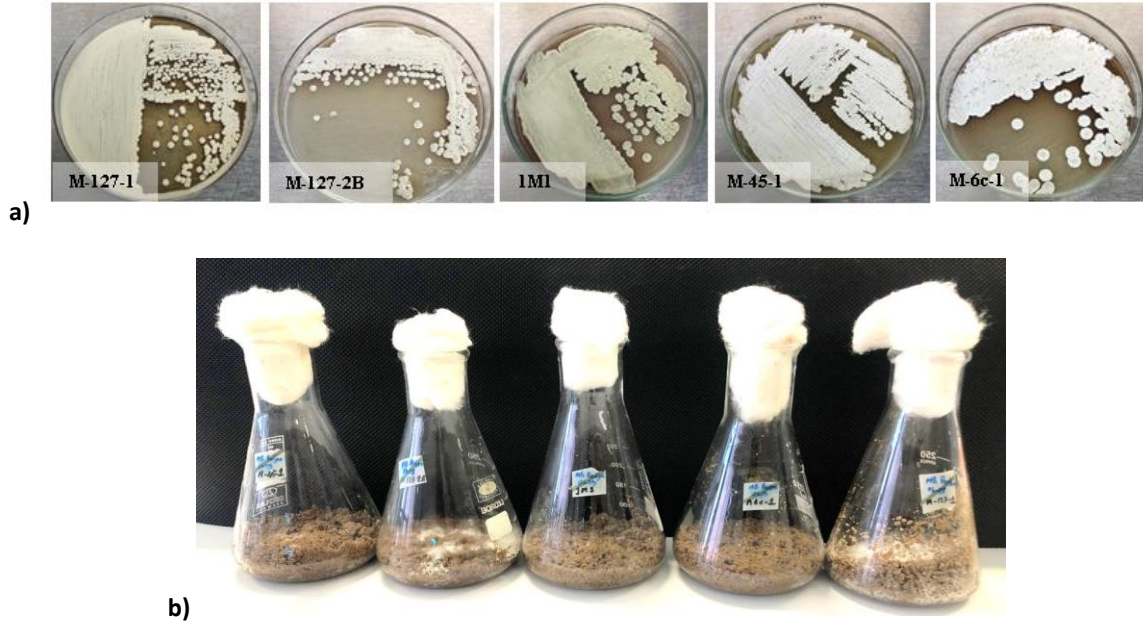
9 için Tris-HCl ve pH 9, 10 ve 11 için Glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır (Lee *et al.* 2008).

2.9.2 Optimum Sıcaklık

Optimum sıcaklığın belirlenmesinde enzimatik reaksiyon farklı sıcaklıklarda (30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C'de) gerçekleştirilerek enzim aktivitesi ölçülmüştür (Lee *et al.* 2008).

2.10 Genomik DNA izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Actinomycetes isolation agar besiyerinde 36 saat 30°C'de inkübe edilen izolataın DNA ekstraksiyonu Intron G-Spin DNA izolasyon kiti ile kullanıcı talimatlarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile izolataın 16S ribozomal DNA dizisini kodlayan gen bölgesi çoğaltılmıştır.



Şekil 1. a) İzolatların MS agarda 5-7 günlük koloni görünüşleri, **b)** İzolatların katı substrat üzerinde gelişimleri (soldan sağa M45-1, M127-2B, 1M1, M6c-1, M127-1)

DNA'nın çoğaltılması için 16S ileri (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) ve geri (ACGGCTACCTGTACGACTT) primerleri kullanılmıştır. 5 µl Mg free Taq polimeraz tamponu, 3 µl MgCl₂ (25 mM), 5 µl deoksinükleotid trifosfat (10X), 10 pikomol/µl 16S rRNA primerleri ve 1.25 U of Taq DNA polimeraz kullanılmıştır. PZR programı ön denatürasyon için 94°C'de 1 dakika, ardından 40 döngü 94°C'de 1 dakika, 57°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika ve 72°C'de 10 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri EXO-SAP-IT™ (Thermo Fisher Applied Biosystems™, katalog no. A55242) kiti kullanılarak saflaştırılmıştır, BIG-DYE cycle sequencing kit (Thermo Fisher Applied Biosystems™, katalog no. 4404312) kullanılarak ABI 3500 cihazında

dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir. Çoklu dizi analizi BioEdit sequence alignment editor v7.2.5 (12/11/2013) programı aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Filogenetik analiz programı (MEGA-X version 10.2.2) kullanılarak filogenetik ağaç çiziminde Neighbour-joining yöntemi ve 3000 bootstrap değeri kullanılmıştır. Dizileme ve filogenetik ağaç çizimi için Aquatayf Biyoteknoloji (İstanbul) firmasından hizmet alımı yapılmıştır.

3. Bulgular

3.1. Selülaz üreticisi izolataın seçimi

Daha önceki çalışma ile yüksek selülaz üreticisi olarak 100 izolat içerisinde CMC içeren besiyeri kullanılarak

seçilen beş izolat (**Şekil 1a**) aktive edilmiş, aşı kültürü hazırlanmış ve BM besiyerinde katı hal fermantasyonu gerçekleştirilmiştir. Yedi günlük inkübasyon sonunda M127-1 ve M127-2B suşları katı substratın üzerini sararak iyi bir gelişim göstermiştir (**Şekil 1b**). Bu iki suşa ait enzim ekstraksiyonu yapılmış ve selülaz aktivitesi M127-1 için 1,07 U/mL ve M127-2B için 0.96 U/mL olarak belirlenmiştir. Çalışmaya M127-1 suşu ile devam edilmesine karar verilmiştir.

3.2 Katı substrat seçimi

Katı hal fermantasyonu optimizasyonu çalışmalarına geçilmeden önce M127-1 suşunun buğday kepeği, malt çimi ve talaşın farklı kombinasyonları ile elde edilen beş farklı besin ortamında (BM, BS, M, TM ve TS) fermantasyonları gerçekleştirilmiş ve enzim aktiviteleri ölçülmüştür (**Çizelge 1**). Besin ortamlarında kullanılan katı substratların seçiminde azot ve karbon içerikleri, kolay ve uygun maliyetli olması, katı hal fermantasyonu sonrası hücre ve enzim içeriği ile birlikte bir karışım olarak (biyoaktivatör) kompostlama sürecine dâhil edilebilirliği gözetilmiştir. En iyi selülaz aktivitesi buğday kepeği-malt çimi içeren BM besiyeri ile elde edilmiş bunu BS ve M besiyerleri takip etmiştir. Talaşın malt çimi ve soya unu ile oluşturulan TM ve TS besiyerlerinde ise enzim aktivitesi belirlenememiştir. Bununla uyumlu olarak mikrobiyal gelişimin de oldukça az gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 1. Farklı besiyerlerinde katı hal fermantasyonu sonrası selülaz aktiviteleri

Besiyeri	Selülaz aktivitesi (U/ml ekstrakt)
BM	0,704
BS	0,584
M	0,452
TM	-
TS	-

3.3 Selülaz üretiminin istatistiksel optimizasyonu

Response Surface Methodology (RSM) ile merkezi kompozit tasarım (Central Composite Design, CCD) deneyleri, her parametre için optimum seviyeyi ve bunların selülaz üretimi üzerindeki karşılıklı etkileşimini bulmak için literatürden önemli olduğu belirlenen nem, aşı miktarı ve inkübasyon süresi parametreleri ile gerçekleştirilmiştir (Pandey 2001). Üç önemli parametrenin bireysel ve sinerjik etkisini araştırmak için tam faktöriyel CCD kullanılmış ve diğer parametreler sabit tutulmuştur. Design Expert programının vermiş olduğu deneme deseni kullanılarak katı hal

fermantasyonları gerçekleştirilmiş ve yanıt olarak selülaz aktiviteleri ölçülmüştür. Optimizasyon, 6 eksen noktası, 8 faktöriyel nokta ve merkez noktasında 6 tekrardan oluşan toplam 20 deney yapılmasına dayalı olarak tasarlanmıştır. **Çizelge 2'**de kullanılan deneme deseni ve yanıt olarak ölçülen selülaz aktivite değerleri verilmiştir.

Çizelge 2. CCD deneme deseni ve deneysel yanıtlar

Run	Nem (%)	İnkübasyon (gün)	Aşı miktarı (v/w)	Yanıt Selülaz (U/ml)
1	72,5	6,5	6	0,6
2	72,5	6,5	6	0,8
3	79,93	8,58	3,62	0,79
4	65,07	8,58	3,62	1,23
5	85	6,5	6	0,72
6	72,5	6,5	6	0,88
7	60	6,5	6	0,92
8	72,5	6,5	6	1,12
9	65,07	4,42	8,38	0,78
10	72,5	6,5	10	0,95
11	72,5	6,5	2	0,43
12	72,5	10	6	1,36
13	72,5	6,5	6	0,64
14	79,93	4,42	8,38	0,49
15	65,07	8,58	8,38	0,77
16	79,93	4,42	3,62	0,59
17	72,5	6,5	6	0,69
18	72,5	3	6	0,68
19	65,07	4,42	3,62	0,51
20	79,93	8,58	8,38	0,56

Enzim aktivitesi değerleri programa girilerek, istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve optimum enzim üretiminde kullanılmak üzere aşağıda verilen ikinci dereceden denklem (1) elde edilmiştir. Denklemde aktivite, U/mL cinsinden enzim üretimini, A, B ve C sırasıyla, nem (%), inkübasyon süresi (gün) ve aşığı (v/w) ifade etmektedir.

$$Aktivite = 0.63 + 0.094 \times A + 0.19 \times B + 0.052 \times C + 0.035 \times A \times B - 0.035 \times A \times C - 0.022 \times B \times C + 0.12 \times A^2 + 0.13 \times B^2 - 0.065 \times C^2 \quad (1)$$

ANOVA sonuçları incelendiğinde modelin anlamlı olduğu belirlenmiştir (**Çizelge 3**). B (inkübasyon süresi), C (aşı miktarı), B² ve C² istatistiksel olarak anlamlı etkisi olduğu tespit edilen değişkenlerdir. p>F değerleri %95 güven aralığında 0,05'ten küçük olduğunda anlamlı etki yaptığı kabul edilmektedir. Nem miktarı (A) tek başına selülaz enzim üretiminde istatistiksel olarak anlamlı etki göstermemiştir. Modelin değerlendirilmesinde kullanılan

diğer yöntem ise lack of fit değeridir ve anlamsız çıkması beklenir. Deneysel veriler matematiksel model ile uyuyorsa bu test ile sadece modelin doğasında bulunan hatalar yansıtılır. Design Expert programı mümkün olan en uzak mesafeye her bir parametre için uç noktalar atamaktadır. Bu noktalar ile oluşturulan modelin tahmin ettiği değer, denemeden elde edilen değerlerin tekrar noktalarındaki hataya göre anlamlı

farklılık gösterip göstermediği değerlendirilir. Lack of fit değerinin anlamlı çıkması oluşturulan modelin değişkenler arasındaki ilişkiyi ifade edemediğini gösterir. İstatistiksel olarak anlamsız (non-significant) lack of fit değeri, sonuçların model ile yeterli miktarda uyduğunu göstermektedir. R^2 değerinin 1'e yaklaşması deneysel veriler ile tahmin edilen verilerin korelasyon gösterdiğini ifade etmektedir.

Çizelge 3. CCD denemesinin ANOVA sonuçları

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri	Prob > F
Model	1,2	9	0,13	5,36	0,0075	Anlamlı
A-Nem	0,12	1	0,12	4,85	0,0523	
B-İnkübasyon	0,50	1	0,50	20,19	0,0012	
C-Aşı miktarı	0,037	1	0,037	1,47	0,0434	
AB	0,097	1	0,097	0,39	0,5451	
AC	0,097	1	0,097	0,39	0,5451	
BC	0,042	1	0,042	0,16	0,6959	
A²	0,20	1	0,20	8,20	0,0669	
B²	0,24	1	0,24	9,72	0,0109	
C²	0,06	1	0,060	2,41	0,0151	
Artık (sapma)	0,25	10	0,025	2,41		
Uyum eksikliği	0,20	5	0,041	1,27	0,0658	Anlamlı değil
Saf hata	0,047	5	0,090			
Toplam	1,45	19				
R^2				0,8282		
Hassasiyet derecesi				8,594		

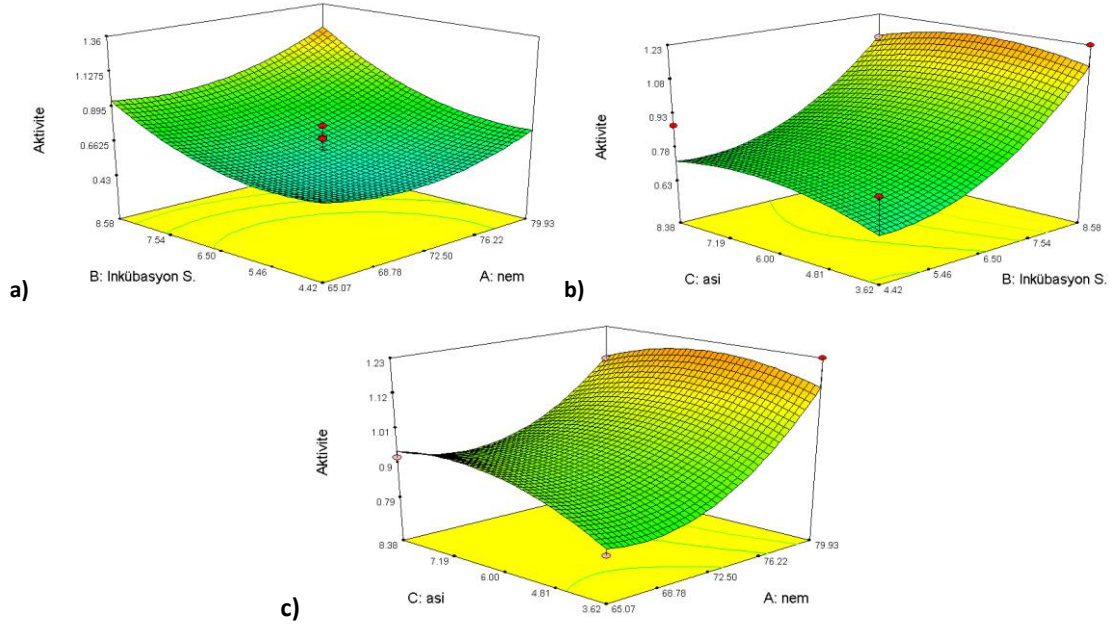
Adeq. precision değeri tasarım noktalarında tahminlenen değerlerin mesafelerini, ortalama tahmin hatasına göre karşılaştırır ve 4'ten büyük değer elde edilmesi istenir (Box *et al.* 1978, Bezerra *et al.* 2008, Antony 2023).

Şekil 2'de denemelerin sonucunda elde edilen model ile program tarafından çizilen 3B grafikler sunulmuştur. Renklendirme, üretilen selülazın Unit miktarlarına göre yapılmaktadır. Kırmızı renge yaklaşan bölgeler üretimin en yüksek olduğu noktaları göstermektedir. Üç boyutlu grafikler incelendiğinde inkübasyon süresinin üretim üzerindeki etkisinin yüksek olduğu ve inkübasyon süresi arttıkça enzim aktivitesinin de arttığı görülmektedir. Programın verdiği doğrulama deneyi ile nem %80, inkübasyon süresi 9 gün ve aşı miktarı 8.4 (v/w) olarak gerçekleştirilmiş ve enzimatik aktivite %95 güven aralığı

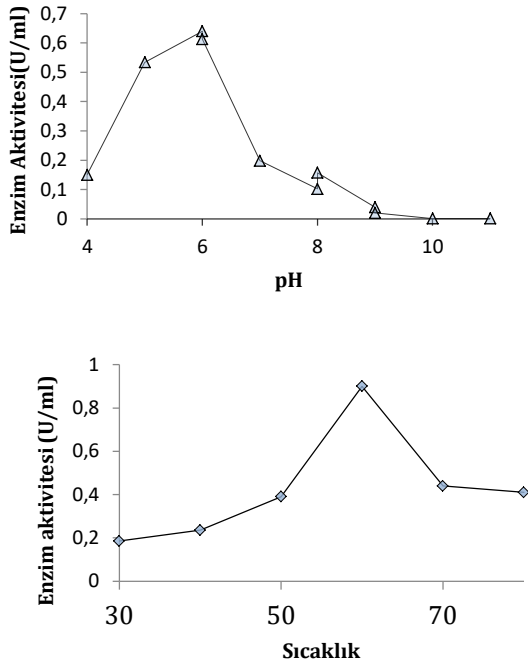
(0,79-1,61 U/mL) içerisinde 1,28 U/mL olarak ölçülmüştür. Optimizasyon sonrası enzim aktivitesinde yaklaşık 1,8 kat artış elde edilmiştir.

3.4 Optimum pH ve sıcaklık

pH'nın enzimin katalitik aktivitesine etkisini belirlemek için pH 4.00-11.00 aralığında farklı substrat çözeltileri kullanılarak DNS yöntemi ile aktivite tayini yapılmıştır. Selülazın optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 6 olduğu belirlenmiştir (**Şekil 3a**). Sıcaklığın enzimin katalitik aktivitesine etkisini belirlemek için enzim aktivitesi 30-80°C aralığında ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 60°C'de enzimin maksimum aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (**Şekil 3b**).



Şekil 2. Optimizasyon parametrelerinin birbirleri ile etkileşiminin 3B görünümü a) inkübasyon süresi-nem, b) aşı miktarı-inkübasyon süresi, c) aşı miktarı-nem

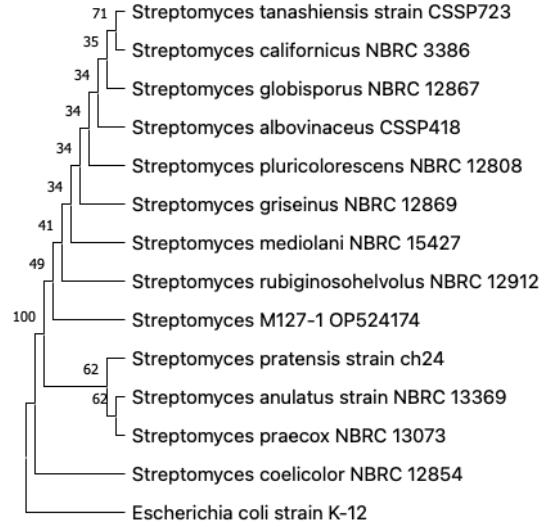


Şekil 3. pH (a) ve sıcaklığın (b) selüloz aktivitesine etkisi

3.5 Tanımlama

Tanımlama çalışması sonucunda, izolat M127-1 için elde edilen konsensus diziler NCBI (National Center for Biotechnology Information) web sayfasında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) nükleotid dizi veri bankası kullanılarak BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizi yapılmış ve izolatın *Streptomyces* cinsi üyesi olduğu belirlenmiştir (Tamura *et al.* 2021). Ayrıca elde edilen 16S rDNA dizisinin NCBI nükleotid veri

bankasına girişi yapılmış ve erişim (OP524174) numarası alınmıştır. M127-1'in 16S rDNA dizi analiz sonucuna dayanılarak çizilen filogenetik ağaç modeli **Şekil 4**'te sunulmuştur.



Şekil 4 İzolat M127-1'in 16S rDNA dizi analiz sonucuna dayanılarak çizilen filogenetik ağaç (3000 bootstrap)

4. Tartışma ve Sonuç

Her gün dünyada lignoselülozik kökenli çok miktarda biyokütle atığı üretilmektedir. Selüloz biyosferin en bol bulunan, bitki hücre duvarı bileşeni ve karasal dünyada en fazla bulunan biyolojik bileşiktir. Tarımsal artıklar, kâğıt ve gıda atıkları gibi selüloz açısından zengin malzemeler, işlenmesi zor olan organik atıkların oluşumuna katkıda bulunur. Selüloz kullanılarak, bu atık

malzemeler verimli bir şekilde katma değerli ürünlere dönüştürülebilir (Khan *et al.* 2016). Selüloz üreten mikroorganizmaların veya selüloz enzimlerini aşırı ifade eden genetiği değiştirilmiş organizmaların kullanılması, kompostlama verimliliğini daha da artırma potansiyeline sahiptir (Chen *et al.* 2021). Mikrobiyal selülozlar, endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukosidaz aktiviteleri dâhil olmak üzere çeşitli hidrolitik aktiviteler sergileyerek selülozun verimli bir şekilde parçalanmasını sağlar (Celaya-Herrera *et al.* 2021).

Lignoselülozik malzemelerin parçalanması doğal ortamlarda çoğunlukla beyaz çürükçül funguslar tarafından gerçekleştirilir, ancak kompostlama işleminde lignoselülozik biyokütlenin bozunmasındaki merkezi rol aktinobakteriler tarafından gerçekleştirilir (Crawford 1978, Ramachandra *et al.* 1988, Sanchez *et al.* 2017). Bu bozunma kabiliyetinden dolayı, bu bakteri grubunun izolasyon ve karakterizasyonuna sadece kompostlama uygulamaları için değil aynı zamanda kağıt endüstrisi için de özel bir ilgi vardır (Crawford *et al.* 1993, Cuesta *et al.* 2012, Kausar *et al.* 2011). Kompostta bulunan aktinobakterilerin temsilcilerinin bazıları *Streptomyces thermovulgaris*, *Actinobifida chromogena*, *Thermoactinomyces vulgaris* (Insam and de Bertoldi 2007), *Micromonospora carbonacea* (Kausar *et al.* 2011), *Streptomyces lincolnensis*, *Streptomyces varieustantanus* (Cuesta *et al.* 2012) ve *Streptomyces sennicomposti* (Duangupama *et al.* 2022) örnek verilebilir. Bu çalışmada tanımlama için benzerlik analizi, M127-1 izolatının *Streptomyces* cinsinin bir üyesi olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle ürettikleri sekonder metabolitleri ile iyi bilinen gram pozitif bir bakteri olan *Streptomyces* üyeleri antibiyotik endüstrisinin dayanak noktasını oluşturmaktadırlar. Ancak çeşitli biyopolimerleri parçalama yetenekleriyle de birçok hücre dışı hidrolazları ürettikleri bilinmektedir (Korn-Wendisch and Kutzner 1992, Samuel *et al.* 2022).

Kompostlama süreçlerinde önemli bir hidrolitik enzim olan selüloz konusunda birçok çalışma yapılmış olmakla birlikte bu çalışmada, yerli bir *Actinobacteria* izolatı enzim aktivite taraması ile seçilerek *Streptomyces* sp. M127-1 (OP524174) olarak tanımlanmış ve selüloz üretim optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Katı hal fermantasyon tekniği ise kompostlama sürecinin bir katı hal fermantasyonu olması sebebiyle bu çalışmada tercih edilmiş ve ayrıca kompostlama süreçlerindeki benzer şekilde selülozik içerikli substratlar kullanılarak selüloz üretimi gerçekleştirilmiştir.

Substratların kombinasyonunda buğday kepeği ve talaş, karbon kaynağı (lignoselülozik yapı) olarak kullanılmıştır

(Manan and Webb 2017). Mikroorganizma selüloz sentezleyerek selülozik yapıyı parçalamış ve karbon ihtiyacını karşılamıştır. Malt çimi ve soya unu ise azot kaynağı olarak kullanılmıştır (Sargın ve Öngen 2003). En iyi sonuç BM kombinasyonu ile elde edilirken malt çimi yerine soya unu eklenmesi (BS) aktiviteyi %17 azaltmıştır. Bu etki malt çimine atfedilebilir görülmektedir. BM besiyerinde malt çimi azot kaynağı olarak katı substratın onda biri olarak kullanılmıştır. Tek başına malt çimi kullanımı ile aktivitenin %36 azaldığı belirlenmiştir (**Çizelge 1**).

Yakın zamanda gerçekleştirilen kapsamlı bir çalışmada *Streptomyces*'in organik madde bozulması üzerindeki etkisini aydınlatmak için kompostlama deneyleri gerçekleştirilmiş ve kompost sistemlerine eklenen suşların tüm kompost mikrobiyotasına hâkim olduğu ve bu aşamadaki en önemli faktörün enzim aktivitesi olduğu rapor edilmiştir (Kocak *et al.* 2023). Bostubayeva ve arkadaşları (2023) yaptıkları çalışmada iki *Streptomyces* türünün kompostlama süreçlerinde iyi bir biyoaktivatör olacağını rapor etmişlerdir. Birçok etkili mikrobiyal türün kompostlama süreçlerine inokülasyonun yapılmasının değerlendirildiği derlemede *Streptomyces* üyelerinin organik materyali parçalamada elde edilen olumlu sonuçlarına da değinilmiştir (Zainudin *et al.* 2022).

Nem, aşı miktarı ve inkübasyon süresi değişkenlerinin BM besiyerinde istatistiksel optimizasyonu sonucu anlamlı bir model elde edilmiş (**Çizelge 3**) ve aktivite yaklaşık 1,8 kat arttırılmıştır. İstatistiksel optimizasyon tasarımının geleneksel optimizasyon çalışmalarına göre en büyük avantajlarından birisi değişkenlerin ikili etkileşimlerini gösterebilmesidir. Üç boyutlu grafiklerde bir değişken sabit iken diğer iki değişkenin selüloz üretimine etkileri incelenebilmektedir (**Şekil 2**).

Bu çalışma özellikle kompostlama süreçlerinde *Streptomyces* üyelerinin gerek hücre olarak komposta karıştırılması gerekse de selüloz ve hücre içeren ham fermantasyon kütesinin doğrudan kompostlanacak selülozik içerikli atıklara karıştırılmasının etkin kompostlamada önemli olabileceği varsayımından hareketle selülozik içerikli katı substratlar kullanılarak üretim planlanmıştır. Enzimin 60°C'de en iyi aktiviteyi göstermesi kompostlama sürecinde yer alan ısınma periyodunda aktivitesini sürdüreceğini göstermektedir. Termostabilite, yüksek sıcaklıkta hızlı reaksiyona olanak tanıyan ve böylece enzim kullanımını azaltan herhangi bir endüstriyel enzimin en çok arzu edilen özelliğidir (Patel *et al.* 2019). Kompostlama süreçlerinde termofilik faz olarak ta isimlendirilen ısınma periyodu, organik maddenin parçalandığı ve ayrışmanın çoğunun

gerçekleştiği önemli bir süreçtir. Aktinobakteri üyeleri kompostta bulunan en baskın türlerdir ve ısınma periyodunda önemli rol oynarlar. Doğada da bu organizmalar toprakta bol bulunur ve ölü bitki ve hayvanların karmaşık polimerlerini parçalayabilen yüksek guanin ve sitozin içeriğine sahip bakterilerdir. Büyüme hızları bakterilere göre daha yavaştır ancak biyolojik olarak daha az parçalanabilen, karmaşık organik bileşikler diğer bakterilerle karşılaştırıldığında daha büyük parçalama kapasitesine sahiptirler. Bu bakteriler, selülaz, hemiselülaz ve lignolitik enzimler gibi lignoselülazların salgılanması yoluyla bitki biyokütlesindeki sert lignoselülozu parçaladıkları için lignoselüolitik mikroorganizmalar olarak bilinir (Palaniveloo *et al.* 2020). Bu çalışmada da kompostlama sürecinde özellikle termofil fazda katalizör etki gösterecek termostabil selülaz üretimi yapan suşun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Selülaz üretimi açısından değerlendirildiğinde buğday kepeği, malt çimi ve talaş gibi lignoselüolitik substratların kullanım öncesi ön hidroliz işlemlerinin enzim aktivitesini artırıcı etkisi olabilir (Celaya-Herrera *et al.* 2021). Ancak yüksek tonlarda gerçekleştirilen kompostlama süreçlerinde uygulanacak işlemlerin enerji maliyetlerinin iyi hesaplanması gerekmektedir. Substrat seçenekleri saman ve küspe gibi ülkemize özgü diğer agroendüstriyel atıklar ile genişletilebilir. Diğer yonden ise *Streptomyces* sp. M127-1'in bir gen kaynağı olarak değerlendirilmesi de bir başka seçenektir. Selüloz atıklarının ekonomik olarak uygulanabilir işlemlerle değerli yan ürünlere dönüştürülmesi, uzun zamandır üzerinde çalışılan bir konudur. Bu çalışma ile daha önce izole edilen yüz adet aktinomiset içerisinden *Streptomyces* sp. M127-1'in buğday kepeği ve malt çimi kullanılarak termotolerant selülaz üretiminde verimli şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir. Katı hal fermantasyonu sonrası tüm substrat ve hücrelerin bir karışım halinde biyoaktivatör olarak kompostlama sistemine aktarılabilir olması da süreçlerin basitleştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Etik Standartlar Bildirgesi

Yazarlar tüm etik standartlara uyduklarını beyan ederler.

Yazarlık Katkı Beyanı

Yazar 1: Araştırma, Deneysel tasarım, Doğrulama, Görselleştirme, Yazma –orijinal taslak

Yazar 2: Fikir Sahibi, Analiz ve yorumlama, Yazma, inceleme ve düzenleme, Proje Yönetimi, Danışmanlık

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarların bu makalenin içeriğiyle ilgili olarak beyan edecekleri hiçbir çıkar çatışması yoktur.

Verilerin Kullanılabilirliği

Bu çalışma sırasında oluşturulan veya analiz edilen tüm veriler, yayınlanan bu makaleye dâhil edilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü FYL-2020-22356 nolu proje ile desteklenmiştir. Yazarlar Prof. Dr. Sait SARGIN'a destekleri için teşekkür eder.

5. Kaynaklar

- Abdul Manan, M., Webb, C., 2017. Modern microbial solid state fermentation technology for future biorefineries for the production of added-value products. *Biofuel Research Journal*, **16**, 730-740. <https://doi.org/10.18331/BRJ2017.4.4.5>
- Antony, J., 2023. Design of experiment for engineers and scientist. Elsevier.
- Ayılara, M.S., Olanrewaju, O.S., Babalola, O.O., Odeyemi, O., 2020. Waste management through composting: *Challenges and potentials. Sustainability*, **12**(11), 4456. <https://doi.org/10.3390/su12114456>
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, **76**(5), 965-977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bhatti, A.A., Haq, S., Bhat, R.A., 2017. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial pathogenesis*, **111**, 458-467. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.036>
- Bostubayeva, M., Baimbetova, E., Makenova, M., Shumenova, N., Sarmanova, R., Nauanova, A., 2023. Screening and evaluation of potential microbial bio-activators used in sewage sludge composting. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 1-9. <https://doi.org/10.22124/CJES.2023.6936>
- Box, G.E., Hunter, W.H., Hunter, S. 1978. Statistics for experimenters (Vol. **664**). New York: John Wiley and Sons.
- Celaya-Herrera, S., Casados-Vázquez, L.E., Valdez-Vázquez, I., Barona-Gómez, F., Bideshi, D.K., Barboza-Corona, J.E., 2021. A cellulolytic *Streptomyces* sp. isolated from a highly oligotrophic niche shows potential for hydrolyzing agricultural wastes. *BioEnergy Research*, **14**, 333-343. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10174-z>
- Chen, X., Cheng, W., Li, S., Tang, X., Wei, Z., 2021. The "quality" and "quantity" of microbial species drive the degradation of cellulose during composting. *Bioresource Technology*, **320**, 124425.

- <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124425>
- Crawford, D. L., 1978. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **35**(6), 1041-1045.
<https://doi.org/10.1128/aem.35.6.1041-1045.1978>
- Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M., Ousley, M. A., 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**(11), 3899-3905.
<https://doi.org/10.1128/aem.59.11.3899-3905.1993>
- Cuesta, G., García-de-la-Fuente, R., Abad, M., Fornes, F., 2012. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *Journal of Environmental Management*, **95**, S280-S284.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.023>
- Danso, B., Ali, S.S., Xie, R., Sun, J., 2022. Valorisation of wheat straw and bioethanol production by a novel xylanase-and cellulase-producing *Streptomyces* strain isolated from the wood-feeding termite, *Microcerotermes* species. *Fuel*, **310**, 122333.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122333>
- Demir, T., Hameş, E.E., Öncel, S.S., Vardar-Sukan, F., 2015. An optimization approach to scale up keratinase production by *Streptomyces* sp. 2M21 by utilizing chicken feather. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **103**, 134-140.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.025>
- Duangupama, T., Pittayakhajonwut, P., Intaraudom, C., Suriyachadkun, C., Sirirote, P., He, Y.W., Thawai, C., 2022. *Streptomyces sennicomposti* sp. nov., an actinomycete isolated from compost of Senna siamea (Lam.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **72**(4), 005320.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005320>
- Ghose, T. K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, **59**(2), 257-268.
<https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, D.C., Cullum, J.A., Oliver, S.G., 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **31**, 272-277.
<https://doi.org/10.1007/BF00258408>
- Insam, H., and De Bertoldi, M., 2007. Microbiology of the composting process. In *Waste Management Series Vol. 8*, Elsevier, pp. 25-48.
[https://doi.org/10.1016/S1478-7482\(07\)80006-6](https://doi.org/10.1016/S1478-7482(07)80006-6)
- Kausar, H., Sariah, M., Mohd Saud, H., Zahangir Alam, M., Razi Ismail, M., 2011. Isolation and screening of potential actinobacteria for rapid composting of rice straw. *Biodegradation*, **22**, 367-375.
<https://doi.org/10.1007/s10532-010-9407-3>
- Khan, M.N., Luna, I.Z., Islam, M.M., Sharmeen, S., Salem, K.S., Rashid, T.U., Zaman, A., Haque, P., Rahman, M.M., 2016. Cellulase in waste management applications. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, pp. 237-256.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00021-6>
- Kocak, F.O., Tanir, S.G.E., Cetin, A.K., Degirmenci, L., 2023. Simultaneous evaluation of composting experiments and metagenome analyses to illuminate the effect of *Streptomyces* spp. on organic matter degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **39**(3), 70.
<https://doi.org/10.1007/s11274-023-03516-4>
- Korsa, G., Konwarh, R., Masi, C., Ayele, A., Haile, S., 2023. Microbial cellulase production and its potential application for textile industries. *Annals of Microbiology*, **73**(1), 13.
<https://doi.org/10.1186/s13213-023-01715-w>
- Kumar, M., Kumar, P., Das, P., Solanki, R., Kapur, M.K., 2022. Proactive role of *Streptomyces* spp. in plant growth stimulation and management of chemical pesticides and fertilizers. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **19**(10), 10457-10476.
<https://doi.org/10.1007/s13762-021-03473-1>
- Korn-Wendisch F, Kutzner HJ (1992) The family Streptomycetaceae. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds) *The prokaryotes*. Springer, New York, pp 921–995.
- Lee, Y.J., Kim, B.K., Lee, B.H., Jo, K.I., Lee, N.K., Chung, C.H., Lee, Y-C., Lee, J.W., 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*, **99**(2), 378-386.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.013>
- Manan, M.A., and Webb, C., 2017. Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering* **4**(1), 91.
<https://doi.org/10.15406/jabb.2017.04.00094>
- Mandenius, C.F., and Brundin, A., 2008. Bioprocess optimization using design-of-experiments

- methodology. *Biotechnology Progress*, **24**(6), 1191-1203.
<https://doi.org/10.1002/btpr.67>
- Mazumder, P., Akhil, P.M., Khwairakpam, M., Mishra, U., Kalamdhad, A.S., 2021. Enhancement of soil physico-chemical properties post compost application: Optimization using Response Surface Methodology comprehending Central Composite Design. *Journal of Environmental Management*, **289**, 112461.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112461>
- Mendoza-Cal, A., Cuevas-Glory, L., Lizama-Uc, G., & Ortiz-Vázquez, E., 2010. Naringinase production from filamentous fungi using grapefruit rind in solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, **4**(19), 1964-1969.
- Palaniveloo, K., Amran, M.A., Norhashim, N.A., Mohamad-Fauzi, N., Peng-Hui, F., Hui-Wen, L., Kai-Lin, Y., Jiale, L., Chian-Yee, M. G., Jing-Yi, L., Gunasekaran, B., Razak, S.A., 2020. Food waste composting and microbial community structure profiling. *Processes*, **8**(6), 723.
<https://doi.org/10.3390/pr8060723>
- Patel, A.K., Singhania, R.R., Sim, S.J., & Pandey, A., 2019. Thermostable cellulases: current status and perspectives. *Bioresource Technology*, **279**, 385-392.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.049>
- Raimbault, M. 1998. General and Microbiological Aspects of Solid Substrate Fermentation *Electronic Journal of Biotechnology*, **1**(3), 26-27.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34581998000300007>
- Ramachandra, M., Crawford, D.L., Hertel, G., 1988. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**(12), 3057-3063.
<https://doi.org/10.1128/aem.54.12.3057-3063.1988>
- Sánchez, Ó. J., Ospina, D. A., & Montoya, S. (2017). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste management*, **69**, 136-153.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.08.012>
- Samuel, M.S., Govarthan, M., Selvarajan, E., 2022. A comprehensive review on strategic study of cellulase producing marine actinobacteria for biofuel applications. *Environmental Research*, **214**, 114018.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114018>
- Sargın, S, ve Göksungur, Y., 2007. Çeşitli tarımsal atık ve yan ürünlerin katı kültür fermantasyonu ile laktik asit üretiminde kullanılabilirliklerinin incelenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **44**(3), 89-99.
- 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).
- Sun, C., Wei, Y., Kou, J., Han, Z., Shi, Q., Liu, L., Sun, Z., 2021. Improve spent mushroom substrate decomposition, bacterial community and mature compost quality by adding cellulase during composting. *Journal of Cleaner Production*, **299**, 126928.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126928>
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, **38**(7), 3022-3027.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Topatan, Z.Ş., and Katı H., 2022. Screening of actinomycetes from *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh compost for their enzyme and antibacterial activities. *Trakya University Journal of Natural Sciences*. **23**(2): 113-124.
<https://doi.org/10.23902/trkjnat.1059974>
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M., 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, **72**(2), 169-183.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00104-2)
- Zainudin, M.H.M., Zulkarnain, A., Azmi, A.S., Muniandy, S., Sakai, K., Shirai, Y., Hassan, M.A., 2022. Enhancement of agro-industrial waste composting process via the microbial inoculation: a brief review. *Agronomy*, **12**(1), 198.
<https://doi.org/10.3390/agronomy12010198>