

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**REKOMBİNANT *Aspergillus sojae* AsT3 KULLANILARAK  
KATI FAZ FERMENTASYONU İLE MANNANAZ ÜRETİMİ**

**Cansu YILMAZER KOÇ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ**  
**ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ŞUBAT 2021**

**ANTALYA**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**REKOMBİNANT *Aspergillus sojae* AsT3 KULLANILARAK  
KATI FAZ FERMENTASYONU İLE MANNANAZ ÜRETİMİ**

**Cansu YILMAZER KOÇ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ**  
**ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ŞUBAT 2021**

**ANTALYA**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT *Aspergillus sojae* AsT3 KULLANILARAK  
KATI FAZ FERMENTASYONU İLE MANNANAZ ÜRETİMİ

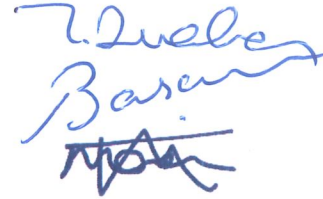
Cansu YILMAZER KOÇ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ  
ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 12/02/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / ~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İrfan TURHAN

Dr. Öğr. Üyesi Barçın KARAKAŞ BUDAK

Dr. Öğr. Üyesi Manolya Eser ÖNER



## ÖZET

### REKOMBİNANT *Aspergillus sojae* AsT3 KULLANILARAK KATI FAZ FERMENTASYONU İLE MANNANAZ ÜRETİMİ

Cansu YILMAZER KOÇ

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İrfan TURHAN

Şubat 2021; 46 sayfa

Katı faz fermentasyonu (KFF), enzimler, organik asitler ve biyoyakıtlar gibi katma değeri yüksek endüstriyel ürünlerin üretiminde sıvı kültür fermentasyon yöntemine göre daha ucuz ve çevre dostu olmasından dolayı alternatif olarak tercih edilmektedir. KFF, nemli katılar üzerinde mikroorganizma gelişimi için uygun bir ortam oluşturduğundan dolayı katı atıkların değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada ucuz ve bol bulunan farklı lignoselülozik biyokütlelerden (arpa kavuzu, buğday kepeği, çavdar kepeği, yulaf kavuzu) fermentasyonla *Aspergillus sojae* AsT3 kullanılarak mannanaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla beş farklı substrat (arpa kavuzu, buğday kepeği, çavdar kepeği, yulaf kavuzu ve karışım) üzerinde ve üç farklı inokülasyon oranında (%3, 5 ve 7) katı faz fermentasyonları yapılmıştır. Ayrıca katı faz fermentasyonu ile üretilen  $\beta$ -mannanaz enziminin kullanım alanlarından biri olan mannooligosakkaritlerin (MOS) üretimi de incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en iyi karbon kaynağı seçilmiş ve bağımsız değişkenlerin etkisini incelemek için Plackett-Burman Dizayn (PBD) ile belirlenen 10 farklı fermentasyon denemesi gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte MOS üretimini artırmak için PBD ile belirlenen fermentasyonlar gerçekleştirilirken en iyi karbon kaynağına mannan içerdiği bilinen kahve atıkları ilave edilmiştir. Fermentasyon denemeleri sonucunda her bir karbon kaynağı için farklı inokülasyon oranlarında en yüksek  $\beta$ -mannanaz aktivitesi sırasıyla; yulaf kavuzunda 413.50 U/mg (%5), arpa kavuzunda 582.59 U/mg (%7), çavdar kepeğinde 983.53 U/mg (%7), buğday kepeğinde 55.59 U/mg (%5) ve karışım fermentasyonlarında ise 262.75 U/mg (%7) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre en yüksek  $\beta$ -mannanaz aktivitesine (983.53 U/mg) %7 inokülasyon oranı kullanılan çavdar kepeğinde ulaşılmıştır.  $\beta$ -Mannanaz ve MOS üretiminde PBD ile belirlenen şartlarda bağımsız değişkenlerin etkisi incelenmiş ve sonuç olarak 30°C'de 7 gün boyunca %7 inokülasyon oranı ve başlangıç pH 7.0 olan fermentasyon şartlarının en iyi olduğu tespit edilmiştir. Fermentasyon ortamına eklenen kahve atığı enzim üretimini inhibe etmiş ancak MOS üretimini artırmıştır.

PBD ile belirlenen koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonlarında en yüksek değerlerdeki MOS bileşenleri ve toplam MOS değerleri, mannobioz için 80.59 ppm (6. deneme), mannotrioz için 69.94 ppm (1. deneme), mannotetroz için 210.37 ppm (3. deneme), mannopentoz için 391.87 ppm (1. deneme), mannoheksos için 533.40 ppm (9. deneme) ve toplam MOS değeri için 1086.45 ppm (9. deneme) olarak bulunmuştur. Ayrıca PBD ile gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda, inkübasyon sıcaklığının  $\beta$ -mannanaz üretiminde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, katı faz fermentasyon yöntemi ile rekombinant *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906) kullanılarak mannanaz üretimi ve aynı zamanda MOS retimi amaçlanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, atıkların değerlendirilmesi, düşük enerji gereksinimi ve mikroorganizma gelişimi için uygun bir ortam olması sebebiyle KFF'nin  $\beta$ -mannanaz ve MOS retimi için uygun olduğu belirlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** Katı faz fermentasyon, lignoselüloz, rekombinant *Aspergillus sojae*, mannooligosakkarit

**JÜRİ:** Doç. Dr. İrfan TURHAN

Dr. Öğr. Üyesi Barçın Karakaş BUDAK

Dr. Öğr. Üyesi Manolya Eser ÖNER

## ABSTRACT

### MANNANASE PRODUCTION BY SOLID STATE FERMENTATION USING RECOMBINANT *Aspergillus sojae* AsT3

Cansu YILMAZER KOC

MSc Thesis in Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Irfan TURHAN

February 2021; 46 pages

Solid state fermentation (SSF) has been well known as an alternative to the liquid culture fermentation method in the production of value-added industrial products such as enzymes and biofuels, as it is cheaper and environmentally friendly. SSF is used in the evaluation of solid wastes because it creates a suitable environment for microorganism growth on moist solids. In this study, mannanase production was carried out using *Aspergillus sojae* AsT3 by fermentation from different lignocellulosic biomass (barley husk, wheat bran, rye bran, oat husk) due to its cheap and abundant availability. For this purpose were carried out on five different substrates (barley husk, wheat bran, rye bran, oat husk and mixture) and at three different inoculation rates (3, 5 and 7%) solid state fermentations. In addition, the production of manno oligosaccharides (MOS) which is one of the uses of the  $\beta$ -mannanase enzyme produced by solid state fermentation, was also investigated. The best carbon source was selected and 10 different fermentation trials determined by Plackett-Burman Design (PBD) were conducted to examine the effect of independent variables. In order to increase MOS production, while fermentation determined by PBD was carried out, coffee wastes known to contain mannan were added to the best carbon source. It was according that these results, the highest  $\beta$ -mannanase activity (983.53 U/mg) was achieved in rye bran using a 7% inoculation rate. The effect of independent variables in non-mannanase and MOS production under conditions determined by PBD was examined and as a result it was determined that the fermentation conditions with 7% inoculation rate and initial pH 7.0 at 30°C for 7 days the best were found. Coffee waste added to the fermentation medium inhibited the enzyme production, but increased MOS production.

The highest values of MOS components and total MOS values in fermentations performed under conditions determined with PBD were 80.59 ppm for mannobiose (6<sup>th</sup> trial), 69.94 ppm for mannotriose (1<sup>st</sup> trial), 210.37 ppm for mannotetrose (3<sup>rd</sup> trial), 391.87 ppm for mannopentose (1<sup>st</sup> trial), 533.40 ppm for mannohexose (9<sup>th</sup> trial) and 1086.45 ppm for total MOS (9<sup>th</sup> trial). In addition, as a result of the fermentations performed with PBD, it was determined that the incubation temperature was effective in the production of  $\beta$ -mannanase.

In this study, the production of mannanase and MOS production by using recombinant *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906) by solid culture fermentation method was aimed. When the results are examined, it has been determined that SSF is suitable for  $\beta$ -mannanase and MOS production due to the evaluation of wastes, low energy requirement and because it is a suitable environment for microorganism development.

**KEYWORDS:** Solid-state fermentation, lignocellulose, mannanase, recombinant *Aspergillus sojae*, mannoooligosaccharide

**COMMITTEE:** Assoc. Prof. Dr. Irfan TURHAN

Asst. Prof. Dr. Barçın KARAKAS BUDAK

Asst. Prof. Dr. Manolya Eser ONER

## ÖNSÖZ

Dünya nüfusunun her geçen gün artmasıyla birlikte her türlü gıda maddesine olan ihtiyaç artmaktadır. Gıda endüstrisinin gelişmesiyle birlikte gıda atıklarında artış meydana gelmektedir. Biyoteknolojik uygulamalarda substrat olarak saf kimyasallar kullanılabildiği gibi tarımsal atıklar (yulaf kavuzu, arpa kavuzu, çavdar kepeği, buğday kepeği, keçiboynuzu atığı, melas, çay atığı) da kullanılmaktadır. Gelişen biyoteknolojik uygulamalar ile saf kimyasallarla üretimin pahalı olmasından dolayı katma değeri yüksek tarımsal-gıda atıkları değerlendirilerek atık sorunu ortadan kaldırılmakta, üretim maliyetleri düşürülmekte ve çevre kirliliğinin önüne geçilmektedir. Katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde kullanılan bu kaynaklara “yenilenebilir kaynaklar” denmektedir. Bu amaçla biyoteknolojik yollarla üretilen ürünlerden biri de  $\beta$ -mannanaz enzimidir.  $\beta$ -Mannanaz enzimi mannooligosakkarit (MOS) üretimi, hayvan yemlerinin iyileştirilmesi, kahve üretimi, kâğıt endüstrisi uygulamaları, temizlik ürünlerinin üretimi gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Böylesine fazla kullanım alanı olan bir enzimin biyoteknolojik yöntemlerle üretiliyor olması yılın her zamanında temin edilebilirliğini sağlamaktadır. Gıda ve diğer endüstrilerde kullanılan enzimlerin daha fazlasının ülkemizde üretilmeye başlanması ile hem yeni iş imkânları ortaya çıkacak hem de katma değeri yüksek ürünler sayesinde ülke ekonomisi güçlenecek ve dışa bağımlılığımız biraz daha azalacaktır.

Bu amaçla katma değeri yüksek ürünlerin biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesi alanındaki bir konuda bana çalışma fırsatı veren, her zaman arkamızda olan, tüm zorluklarda desteğini esirgemeyen, her şekilde fikirleri ile yol gösterici olan danışman hocam Doç. Dr. İrfan TURHAN’a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) teşekkürü bir borç bilirim.

Her zaman yanımda olan, sıkıldığımda, bunaldığımda desteklerini bir an olsun esirgemeyen, her koşulda varlıklarını hissettiren canım arkadaşlarım Hilal Nur GÜRLER, Selime Benemir ERKAN ve Duygu Gizem BİLGİN’e çok teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca laboratuvar ortamını paylaştığım Ali ÖZCAN’a, tüm ekip arkadaşlarıma ve zorlandığım her an birikimleri ile yardımlarını bir an olsun esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Ercan YATMAZ ve Dr. Mustafa GERMEÇ’e teşekkür ederim. Ayrıca mikroorganizma temininde katkılarından dolayı Prof. Dr. Zümrüt BEGÜM ÖGEL’e teşekkür ederim.

Bana karşı olan inancı ve güveni ile desteğini bir an olsun esirgemeyen, her anımda yanımda olan, fikirleriyle hayatıma yön veren canım eşim Arş. Gör. Andaç KOÇ’a sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak bana karşı sonsuz sevgi ve özveri gösteren, her zaman yanımda olan, inanan, güvenen, her türlü desteği esirgemeyen, bu günlere gelmemde yardımcı olan, hayatıma daima ışık tutan canım annem Nesrin YILMAZER, canım babam Cemal YILMAZER, canım ablam Ceren NAÇAR ve canım kardeşim Cem YILMAZER’e sonsuz teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| ÖZET.....  | i    |
| ABSTRACT.....  | iii  |
| ÖNSÖZ .....  | v    |
| AKADEMİK BEYAN .....   | viii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....   | ix   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....   | xii  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....  | xiii |
| 1. GİRİŞ.....  | 1    |
| 2. KAYNAK TARAMASI .....   | 3    |
| 2.1. $\beta$ -Mannanaz Enzimi ve Kullanım Alanları .....                                     | 3    |
| 2.1.1. Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi uygulamaları .....                                   | 6    |
| 2.1.2. Kahve endüstrisi uygulamaları.....  | 7    |
| 2.1.3. Deterjan endüstrisinde $\beta$ -mannanaz kullanımı.....                               | 7    |
| 2.1.4. İlaç endüstrisindeki uygulamalar .....  | 7    |
| 2.1.5. Hayvan yemlerinin iyileştirilmesinde $\beta$ -mannanaz kullanımı .....                | 8    |
| 2.1.6. Mannooligosakkarit (MOS) üretimi.....   | 8    |
| 2.1.7. Meyve-sebze maserasyonu ve meyve suyu endüstrisinde $\beta$ -mannanaz kullanımı ..... | 9    |
| 2.1.8. Mannanazların diğer uygulamaları .....  | 9    |
| 2.2. Lignoselülozik Materyaller ve Kahve Posasının Fermentasyonda Kullanımı .                | 10   |
| 2.2.1. Lignoselülozik materyaller .....  | 10   |
| 2.2.2. Kahve posası .....  | 13   |
| 2.3. Katı Faz Fermentasyonu.....   | 13   |
| 3. MATERYAL VE METOT .....   | 15   |
| 3.1. Materyal.....   | 15   |
| 3.2. Mikroorganizma ve İnokülasyon.....  | 15   |
| 3.3. Katı Faz Fermentasyonu.....   | 16   |
| 3.4. Enzim Ekstraksiyonu.....  | 17   |
| 3.5. Kahve Atığı İlaveli Şartlar İçin Plackett-Burman Dizayn.....                            | 18   |
| 3.6. Fermentasyon Sonunda Elde Edilen Örneklere Uygulanan Analizler .....                    | 18   |
| 3.6.1. $\beta$ -Mannanaz aktivite analizi .....  | 18   |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.6.2. | Toplam protein analizi .....   | 19 |
| 3.6.3. | Mannooligosakkarit (MOS) analizi .....                                       | 20 |
| 3.6.4. | İstatistiksel analiz .....   | 20 |
| 4.     | BULGULAR VE TARTIŞMA .....   | 21 |
| 4.1.   | $\beta$ -Mannanaz Üretimi İçin Karbon Kaynaklarının Belirlenmesi .....       | 21 |
| 4.2.   | $\beta$ -Mannanaz Üretimini PBD ile Optimizasyonu .....                      | 23 |
| 4.3.   | Bağımsız Değişkenlerin $\beta$ -mannanaz Üretimi Üzerine Etkisi .....        | 25 |
| 4.4.   | Bağımsız Değişkenlerin Mannooligosakkarit (MOS) Üretimi Üzerine Etkisi ..... | 26 |
| 5.     | SONUÇLAR .....   | 31 |
| 6.     | KAYNAKLAR .....  | 33 |
| 7.     | EKLER .....  | 44 |
|        | ÖZGEÇMİŞ   |    |

## AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Rekombinant *Aspergillus sojae* AsT3 Kullanılarak Katı Faz Fermentasyonu ile Mannanaz Üretimi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

12/02/2021

Cansu YILMAZER KOÇ



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

|                |   |
|----------------|---|
| Abs            | : absorbans                             |
| w/w            | : ağırlık/ağırlık oranı                 |
| w/v            | : ağırlık/hacim oranı                   |
| dk             | : dakika                                |
| rpm            | : devir/dakika                          |
| g              | : gram                                  |
| v/w            | : hacim/ağırlık oranı                   |
| v/v            | : hacim/hacim                           |
| pH             | : hidrojen iyonlarının eksi logaritması |
| L              | : litre                                 |
| $\mu$ L        | : mikrolitre                            |
| $\mu$ mol      | : mikromol                              |
| $\mu$ mol/dk   | : mikromol/dakika                       |
| mg             | : miligram                              |
| mL             | : mililitre                             |
| nm             | : nanometre                             |
| R <sup>2</sup> | : regresyon katsayısı                   |
| °C             | : santigrat derece                      |
| t              | : süre (dakika)                         |
| U/mg           | : unit/miligram                         |
| U/mL           | : unit/mililitre                        |
| %              | : yüzde                                 |

## **Kısaltmalar**

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| ABD                                  | : Amerika Birleşik Devletleri            |
| AK                                   | : Arpa Kavuzu                            |
| ANOVA                                | : Varyans Analizi                        |
| ATCC                                 | : American Type Culture Collection       |
| BK                                   | : Buğday Kepeği                          |
| CW                                   | : Kurutulmuş Hindistan Cevizi Atığı      |
| ÇK                                   | : Çavdar Kepeği                          |
| DNSA                                 | : 3,5-Dinitrosalisilik Asit              |
| Düz.KO                               | : Düzeltilmiş Kareler Ortalaması         |
| Düz. KT                              | : Düzeltilmiş Kareler Toplamı            |
| FAO                                  | : Food and Agriculture Organization      |
| FDA                                  | : Food and Drug Administration           |
| FOSHU                                | : Food for Specified Health Uses         |
| G                                    | : Santrifüj Kuvveti                      |
| GRAS                                 | : Generally Recognized as Safe           |
| GG                                   | : Guar Gam                               |
| HPLC                                 | : High Performance Liquid Chromatography |
| KBG                                  | : Keçiboynuzu gamı                       |
| KFF                                  | : Katı Faz Fermentasyonu                 |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | : Dipotasyum Monohidrojen Fosfat         |
| KG                                   | : Konjak Gam                             |
| KGM                                  | : Konjak Glukomannan                     |
| LCB                                  | : Lignoselülozik Biyokütle               |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | : Magnezyum Sülfat Heptahidrat           |

|      |                            |
|------|----------------------------|
| MOS  | : Mannooligosakkarit       |
| NaCl | : Sodyum Klorür            |
| NaOH | : Sodyum Hidroksit         |
| P    | : Olasılık                 |
| PBD  | : Plackett-Burman Dizayn   |
| PDA  | : Potato Dextrose Agar     |
| PKC  | : Hurma Çekirdeği Keki     |
| SSF  | : Solid State Fermentation |
| T:   | : Toplam                   |
| YK   | : Yulaf Kavuzu             |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| <b>Şekil 2.1.</b> Mannan ve heteromannanların genel yapısı; <b>A)</b> Mannan yapısı; <b>B)</b> Galaktomannan yapısı; <b>C)</b> Glukomannan yapısı; <b>D)</b> Galaktoglukomannan yapısı (Srivastava ve Kapoor 2017).....                                  | 3  |
| <b>Şekil 2.2.</b> Selüloz, hemiselüloz ve lignin fraksiyonlarını gösteren lignoselüloz yapısının temsili (Mussatto ve Teixeira 2010).....  | 10 |
| <b>Şekil 3.1.</b> Fermentasyonda kullanılan karbon kaynakları; <b>a)</b> Kahve atığı; <b>b)</b> Buğday kepeği; <b>c)</b> Çavdar kepeği; <b>d)</b> Arpa kavuzu; <b>e)</b> Yulaf kavuzu.....   | 15 |
| <b>Şekil 3.2.</b> Aspergillus sojae AsT3 (ATCC 11906) suşunun petride gelişmiş halinin görünümü ( <b>a)</b> Petrideki gelişmiş görünüm; <b>b)</b> Petrinin alttan görünümü) .....  | 16 |
| <b>Şekil 3.3.</b> Lignoselülozik maddeler ile gerçekleştirilen fermentasyon görüntüsü; <b>A)</b> Arpa ve yulaf kavuzu ile gerçekleştirilmiş fermentasyon görüntüsü; <b>B)</b> Buğday ve çavdar kepeği ile gerçekleştirilmiş fermentasyon görüntüsü ..... | 17 |
| <b>Şekil 3.4.</b> Enzim ekstraksiyonunda kullanılan çalkalamalı inkübatör .....  | 17 |
| <b>Şekil 4.1.</b> $\beta$ -mannanaz üretimi için karbon kaynaklarının değerlendirilmesi (K; Karışım).....  | 22 |
| <b>Şekil 4.2.</b> PBD ile belirlenen koşullar sonucunda elde edilen $\beta$ -mannanaz aktivite değerleri ( $P<0.05$ ) .....  | 23 |
| <b>Şekil 4.3.</b> PBD'den elde edilen $\beta$ -mannanaz aktivite değerleri ( $P<0.05$ ) .....  | 23 |
| <b>Şekil 4.4.</b> PBD'den elde edilen MOS değerleri (M.bio, mannobioz; M.tri, mannotrioz; M.tet, mannotetroz; M.pen, mannopentoz; M.hex, mannoheksoz) .....  | 27 |
| <b>Şekil 4.5.</b> PBD'de MOS üretimine uygulanan parametrelerin etkisini gösteren Pareto grafiği, $\alpha=0.05$ (İnküb.Sıc (İnkübasyon Sıcaklığı), İnokü.Or (İnokülasyon Oranı), İnküb.Sür (İnkübasyon Süresi)).....                                     | 28 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Çizelge 2.1.</b> $\beta$ -mannanaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar ve üretim koşulları (Dhawan ve Kaur 2007) .....                             | 4  |
| <b>Çizelge 2.2.</b> Lignoselülozik atıkların ana bileşenleri (Nigam vd. 2009) .....   | 11 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> Plackett-Burman Dizayn deneme deseni .....  | 18 |
| <b>Çizelge 4.1.</b> Spesifik $\beta$ -mannanaz aktivitelerine göre substrat kaynaklarının seçimi ve inokülasyon oranlarının aktivite üzerine etkisi ..... | 21 |
| <b>Çizelge 4.2.</b> Plackett-Burman Dizayn ve spesifik $\beta$ -mannanaz aktivitesi sonuçları.....  | 23 |
| <b>Çizelge 4.3.</b> $\beta$ -mannanaz için bağımsız değişkenlerin tahmini etkileri ve katsayıları....   | 24 |
| <b>Çizelge 4.4.</b> PBD ile belirlenen model denklemindeki $\beta$ -mannanaz üretim oranının varyans analizi.....   | 25 |
| <b>Çizelge 4.5.</b> Kahve ilavesiz fermentasyonda elde edilen MOS profili ve toplam MOS değerleri.....  | 26 |
| <b>Çizelge 4.6.</b> Fermentasyonda MOS profili ve toplam MOS değerleri .....  | 27 |
| <b>Çizelge 4.7.</b> MOS için bağımsız değişkenlerin tahmini etkileri ve katsayıları.....  | 28 |
| <b>Çizelge 4.8.</b> PBD ile belirlenen model denklemindeki MOS üretim oranının varyans analizi .....  | 29 |



## 1. GİRİŞ

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve kimyasal reaksiyonları spesifik olarak katalizleme yeteneğine sahip protein yapıdaki maddelerdir. Gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde, dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi, biyoteknoloji, tıp, tarım ve veterinerlik alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Damodaran 2017). Enzimler, bitki, hayvan ve mikroorganizmalar tarafından üretilir. Mikrobiyal enzimler ise hem hücre içinde sentezlenebilmekte hem de hücre dışına salgılanmaktadır (Brock 1984, Damodaran 2017). Tüm endüstriyel üretimlerde olduğu gibi enzim üretiminde de amaç üretim yöntemlerini standartlaştırarak yıl boyu uygulanabilirliği artırmaktır. Bu amaca ulaşmanın yolu ise hedeflenen enzim üretimi için uygun tekniğin kullanılarak standart üretim yapmaktan ve saflaştırma maliyetlerini düşürmekten geçmektedir.

$\beta$ -Mannanazlara ait alt bilgiler incelendiğinde gen ekspresyonlarının genetik düzenlemesinin selülaz ve ksilanazlar kadar iyi bilinmediği ancak fungal yapılardaki oluşumlarının selülazlar ve ksilanazlara benzediği varsayılmaktadır (van Zyl vd. 2010).  $\beta$ -Mannanazlar, amino asit dizilimlerine göre glikoz hidrolaz GH5 ve GH26 familyalarında bulunmaktadır. Mannanların  $\beta$ -1,4 bağlarının rastgele hidrolizinden ve yeni uçların oluşmasından sorumlu endo-enzimlerdir. Mannanazlar genellikle doğal ortamlardan izole edilmiş olan mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (Dhawan ve Kaur 2007). Gelişim sürelerinin kısalığı, besiyeri ortamlarının küçük oluşu ve genetik müdahalelerin kolay yapılması nedeniyle mikroorganizmalar en yüksek potansiyele sahip enzim kaynağı olarak tercih edilmektedir. Toplu üretimi daha kolay olduğundan, ekstraselüler mannanaz önemli bir ticari değere sahiptir. Mannanaz üreten birçok bakteri türü olmasına rağmen, ticari olarak kullanılan birkaç doğal ya da rekombinant suş vardır. Bunların en önemlileri; *Bacillus* sp., *Streptomyces*, *Caldibacillus cellulovorans*, *Caldicellulosiruptor* sp. Rt8B, *Caldocellum saccharolyticum*'dur (Dawood ve Ma 2020).

Mannanazlar endüstriyel proseslerde; gıdaların vizkozitesinin azaltılması, meyve sularının berraklaştırılması, prebiyotik ürün üretimi, pulpların maserasyonu, enerji endüstrisinde lignoselülozik bileşiklerin hidrolizinde, yem sanayi, kâğıt ve pulp endüstrilerinde ağaç hamurunun enzimatik olarak ağartılmasında, çözünebilir kahve üretiminde, deterjan ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu enzim grubu en fazla yumuşak dokulu ağaçların pulpunun enzimatik ağartılmasında galaktomannanın parçalanması için kullanılır. Ağaç liflerinden elde edilen ligninin ekstraksiyonu ve çözünen pulpun ağartılması kâğıt endüstrisindeki en önemli basamaktır. Alkali koşullarda pulpa uygulanan ön işlemin lignine kovalent bağlı hemiselülozları hidrolize ettiği ve böylece ligninin sonradan giderilmesinin kolaylaştığı bilinmektedir (Dawood ve Ma 2020).

Bir tür prebiyotik olan mannooligosakkaritler (MOS), probiyotiklerin büyümesini destekleme ve yağ emilimini azaltma gibi fonksiyonel aktiviteleri nedeniyle hem endüstride hem de akademide büyük ilgi görmektedir (Li vd. 2020). Suda çözünen MOS'ları kaynak olarak içeren ürünlerin başında keçiyoynuzu gamı, guar gam, tara gam ve konjak gam gelmektedir. Bağırsak sağlığına faydalı olduğu bilinen MOS'ların düşük kalorili olması, kolondaki faydalı mikrofloraya yardımcı olması, enfeksiyon riskini azaltması gibi birçok faydalı özelliklerinin olduğu bilinmektedir.  $\beta$ -Mannanazlar, insan sağlığına faydalı olan ve bu nedenle gıda katkı maddesi olarak kullanılan MOS'ların üretiminde mannanları hidrolize etmek için kullanılmaktadır (Erkan vd. 2020).

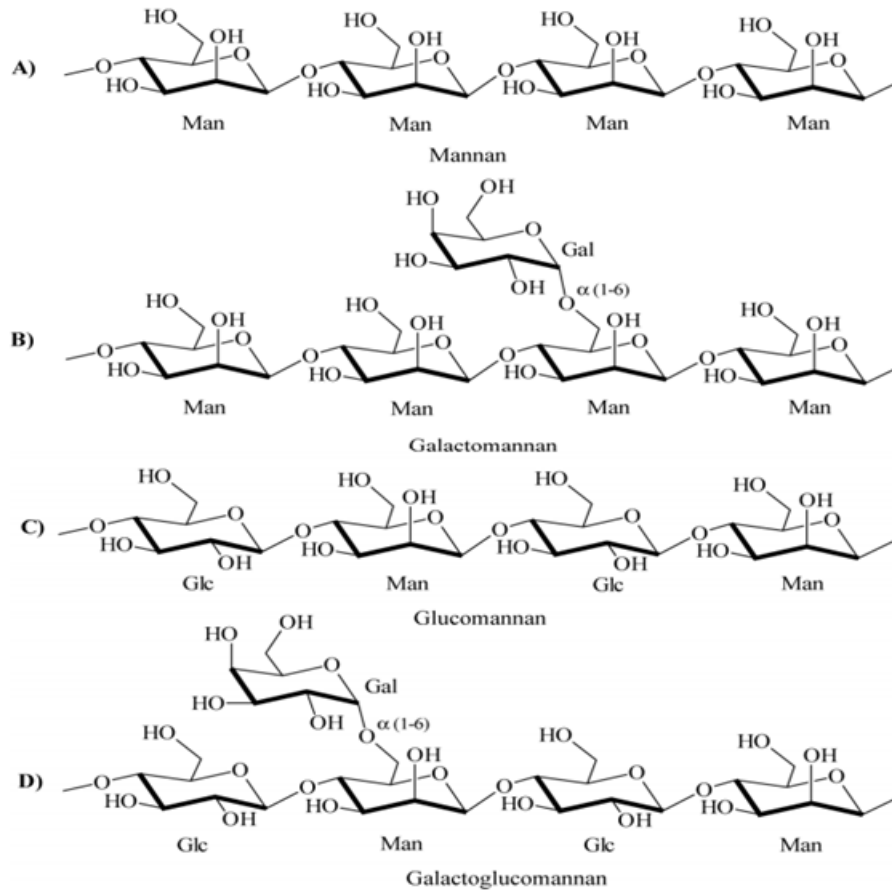
Fermentasyon, metabolizmada organik bileşenlerin elektron alıp verdiği, aerobik veya anaerobik koşullarda, biyoreaktör olarak adlandırılan kapalı kaplar içerisinde büyük miktarda hücrenin geliştiği ve metabolik ürünlerin oluşturulduğu enerji üreten bir süreçtir. Derin kültür ve katı faz olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Katı faz fermentasyonu, biyoteknolojik proseslerde katma değerli ürünler biyo-yakıtlar, enzimler, organik asitler, prebiyotik ürünler, polisakkaritler, ilaçlar vs. gibi mikrobiyal ürünlerin üretimi için potansiyel bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır. Katı faz fermentasyonu (KFF), tarımsal endüstri artıklarının işlenmesinde sayısız fırsat sunmaktadır. Bunun nedeni, katı faz fermentasyonu süreçlerinin daha düşük enerji gereksinimine sahip olması, daha az atık su üretmesi ve katı atık bertarafı sorununu çözmesiyle çevre dostu olmasının yanı sıra küflerin doğal gelişim ortamlarının toprak, ağaç dipleri, nemli ortamlar vb. olması katı faz fermentasyonu için avantaj sağlamaktadır. Katı faz fermentasyonunda mikroorganizmalar serbest su yokluğunda nemli bir materyal üzerinde gelişmektedir. Lignoselülozik biyokütle (LCB), bu gibi ürünlerin üretimi için dünyada en bol bulunan, ucuz ve çok kullanılan hammaddedir. Lignoselülozun yaklaşık %75'i, potansiyel olarak mayalanabilir şekere dönüştürülebilen polisakkaritlerden oluşur (Marriott vd. 2016).

Bu çalışmada, mannanaz enziminin rekombinant *Aspergillus sojae* suşu ile gerçekleştirilen katı faz fermentasyonu ile üretiminde farklı lignoselülozik maddelerin kullanılabilirliği araştırılmıştır.  $\beta$ -Mannanaz üretim maliyetlerini azaltmak için düşük maliyetli lignoselülozik malzemeler (arpa, yulaf kavuzu ve çavdar, buğday kepeği) ve kahve atığı karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Analizler sonucunda en iyi karbon kaynağı belirlendikten sonra Placket-Burman dizaynı ile önerilen KFF koşullarında  $\beta$ -mannanaz üretimi ve MOS üretimleri gerçekleştirilmiştir.

## 2. KAYNAK TARAMASI

### 2.1. $\beta$ -Mannanaz Enzimi ve Kullanım Alanları

$\beta$ -Mannanaz (EC 3.2.1.78), doğada yaygın olarak bulunan mannan ve heteromannanların (galaktomannan, glukomannan, galaktoglukomannan)  $\beta$ -1,4-D mannozidik bağlarını hidrolize eden hücre dışı enzimlerdir (Öztürk vd. 2010). Ayrıca mannan ve heteromannanlar da sert ve yumuşak dokulu ağaçların, keçiboynuzu tohumlarının ve fasulyenin hemiselüloz fraksiyonunun bir parçasıdır (Dawood ve Ma 2020). Lignoselülozik biyokütlenin %20-35'ini oluşturan hemiselülozlar, doğada en yaygın bulunan ikinci tür heteropolisakaritlerdir (Saha, 2003). Pentoz ve heksozların kopolimeri olarak bilinen hemiselülozların dallı yapıları, hidrolizi daha hassas hale getiren amorf bir yapının oluşumuna yol açmaktadır. Hemiselülozların önemli bir bileşeni olan mannan, doğrusal mannan, glukomannan, galaktomannan ve galaktoglukomannan olmak üzere dört alt sınıfa ayrılmaktadır (Petkowicz vd. 2001). Bu dört polisakaritin her biri  $\beta$ -1,4 bağlantılı omurganın sadece D-mannoz (mannanlar) veya mannoz ve D-glikoz (glukomannanlar) kalıntılarının bir kombinasyonunu içermektedir (Lipman vd., 2007; Moreira ve Filho, 2008).



**Şekil 2.1.** Mannan ve heteromannanların genel yapısı; **A)** Mannan yapısı; **B)** Galaktomannan yapısı; **C)** Glukomannan yapısı; **D)** Galaktoglukomannan yapısı (Srivastava ve Kapoor 2017)

Mannanazlar doğada her yerde bulunabilmekle beraber çoğunlukla doğal ortamlardan izole edilen mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (Yatmaz vd. 2016). Mikroorganizmalar, daha küçük ortamda çoğalma, daha kısa sürede büyüme ve genetik manipülasyonların kolay olması sebebiyle en güçlü enzim üretim kaynakları haline gelmektedir.  $\beta$ -Mannanaz üretimini etkileyen unsurlar besiyeri içeriği ve fermentasyon şartlarıdır. Mannanazlar pH, inkübasyon süresi, sıcaklık, azot ve karbon kaynakları, inorganik tuzlar, karıştırma hızı ve çözünmüş oksijen konsantrasyonu gibi fizikokimyasal ve beslenme faktörlerinden büyük ölçüde etkilenmektedir. 180 türü bulunan *Aspergillus* spp. endüstriyel ölçekte bu enzimin önemli üreticilerdir. Bunlardan *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus niger* türleri Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından “genellikle güvenli olarak bilinen” (GRAS) listesinde yer almaktadır (Ward vd. 2006). Öte yandan *A. fumigatus*, *A. sulphureus* ve *A. terreus* türleri  $\beta$ -mannanaz üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. *Aspergillus* spp. türleri arasında bulunan *A. fumigatus*'taki  $\beta$ -mannanaz geni patojenik doğası nedeniyle GRAS olarak kabul gören *Aspergillus sojae*'de klonlanarak eksprese edilmiştir (Puchart, Vranska ve Svoboda, 2004; Chen vd. 2007; Huang, Wang, Zhang ve Ma, 2007; Duruksu vd. 2009; Öztürk vd. 2010; Ecem Öner vd. 2018; Karahalil vd. 2019).

Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde farklı mikroorganizmlarla  $\beta$ -mannanaz üretiminde farklı fermentasyon koşullarının kullanıldığı dikkat çekmektedir (Chauhan vd. 2012). Bakterilerde inkübasyon süresi; *Acinetobacter* türlerinde 24 saat iken *Bacillus* türlerinde bu süre 96 saattir. Mantarlarda ise *Streptomyces* türlerinde 3 gün yeterli iken *Aspergillus* türlerinde bu süre 11 güne kadar ulaşmaktadır.  $\beta$ -Mannanaz üretiminde optimum sıcaklık genellikle ilgili mikroorganizmanın büyüme sıcaklığı olarak tercih edilmektedir. Genel olarak, en iyi üretimin gerçekleşmesi ve mikroorganizma gelişiminin olması için ortamın pH değeri bakterilerde bazik, mantarlarda ise asidik olarak ayarlanmaktadır (Aziz vd. 2008; Moriera ve Filho 2008; Chauhan vd. 2012).

**Çizelge 2.1.**  $\beta$ -Mannanaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar ve üretim koşulları (Dhawan ve Kaur 2007)

| Mikroorganizma                | Karbon kaynağı/ fermentasyon şartları (°C, pH) | Kaynaklar               |
|-------------------------------|--|-------------------------|
| <i>Aspergillus awamori</i>    | -/80°C, pH 3.0                                 | Setati vd. 2001         |
| <i>Aspergillus niger</i>      | -/50°C, pH 3.0                                 | Regaldo vd. 2000        |
| <i>Aspergillus oryzae</i>     | CW/40°C, pH 6.0                                | Regaldo vd. 2000        |
| <i>Agaricus bisporus</i>      | LBG/-, -                                       | Tang vd. 2001           |
| <i>Aspergillus tamaritii</i>  | LBG/-, pH 4.5                                  | Civas vd. 1984          |
| <i>Aspergillus aculeatus</i>  | -/60-70°C, pH 5.0                              | Christgau vd. 1994      |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>  | LBG/60°C, pH 4.5                               | Puchart vd. 2004        |
| <i>Aspergillus sulphureus</i> | LBG/50°C, pH 2.4                               | Chen vd. 2007           |
| <i>Aspergillus terreus</i>    | -/55°C, pH 7.5                                 | Huang vd. 2007          |
| <i>Bacillus agaradhaerens</i> | -/60°C, pH 8.0-10.0                            | Bettiol ve Showell 2002 |

Çizelge 2.1'in devamı

|   |                           |                                |
|---|---------------------------|--------------------------------|
| <i>Bacillus AM001</i>                     | -/60-65°C, pH 8.5-9.0     | Akino vd. 1989                 |
| <i>Bacillus circulans K-1</i>             | -/65°C, pH 6.9            | Yosida vd. 1998                |
| <i>Bacillus sp. JAMB-750</i>              | -/, pH 10.0               | Hatada vd.2005                 |
| <i>Bacillus sp. M50</i>                   | KGM/50°C, pH 6.0          | Chen vd. 2000                  |
| <i>Bacillus sp. N 16-5</i>                | -/70°C, pH 9.5            | Yanhe vd. 2004                 |
| <i>Bacillus sp.1633</i>                   | -/50°C, -                 | Kauppinen vd. 2003             |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i>        | LBG/70°C, pH 6.5          | Talbot ve Sygusch 1990         |
| <i>Bacillus subtilis</i>                  | -/55°C, pH 5.0            | Mendoza vd. 1994               |
| <i>Bacillus subtilis B36</i>              | LBG/50°C, pH 6.4          | Li vd. 2006                    |
| <i>Bacillus subtilis SA -22</i>           | LBG,KGM/70°C, pH 6.5      | Sun vd. 2003                   |
| <i>Bacillus subtilis 168</i>              | Galman/37°C, pH 7.0       | Helow ve Khattab 1996          |
| <i>Bacillus subtilis BM 9602</i>          | KGM,LBG/50°C, pH 6.0      | Cui vd.1999                    |
| <i>Bacteroides ovatus</i>                 | GG/-                      | Gherardini ve Salyers 1987     |
| <i>Caldibacillus cellulovorans</i>        | -/85°C, pH 6.0            | Sunna vd.2000                  |
| <i>Caldocellum saccharolyticum</i>        | -/80°C, pH 6.0            | Morris vd. 1995                |
| <i>Cellulomonas fimi</i>                  | LBG/42°C, pH 5.5          | Stoll vd. 1999                 |
| <i>Clostridium butyricum/beijerinckii</i> | KGM,CW/-, pH 7.0-8.0      | Nakajima ve Matsuura 1997      |
| <i>Clostridium cellulolyticum</i>         | -                         | Perret vd. 2004                |
| <i>Clostridium tertium</i>                | GG/30°C, pH 7.0           | Kataoka vd. 1998               |
| <i>Clostridium thermocellum</i>           | -/65°C, pH 6.5            | Halstead vd. 1999              |
| <i>Dictyoglomus thermophilum</i>          | LBG/80°C, pH 5.0          | Gibbs vd. 1999                 |
| <i>Flavobacterium sp</i>                  | KGM,LBG/35°C, pH 7.0      | Zakaria vd. 1998               |
| <i>Paenibacillus curdolanolyticus</i>     | GG/-, pH 4.0              | Pason ve Ratanakhanokchai 2006 |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i>             | -/50°C, pH 5.0            | Han vd. 2006                   |
| <i>Piromyces sp.</i>                      | -                         | Fanutti vd. 1995               |
| <i>Rhodothermus marinus</i>               | LBG,GG/85°C, pH 5.4       | Politz vd. 2000                |
| <i>Sclerotium rolfsii</i>                 | -/74-72°C, pH 2.9-3.3     | Gubitz vd. 1996                |
| <i>Streptomyces galbus</i>                | Galman of Ps/35°C, pH 7.0 | Kansoh ve Nagieb 2004          |
| <i>Streptomyces lividans</i>              | Galman/58°C, pH 6.8       | Arcand vd. 1993                |
| <i>Thermotoga maritima</i>                | -/90°C, pH 7.0            | Parker vd. 2001                |
| <i>Trichoderma harzianum T4</i>           | BK/65°C, pH 2.6           | Franco vd. 2004                |
| <i>Trichoderma reesei</i>                 | -/70°C, pH 3.5            | Stalbrand vd. 1993             |

CW: Kurutulmuş Hindistan cevizi atığı; LBG: Keçiyoynuzu gamı; KGM:Konjak glukomannan; Galman:Galaktomannan; GG:Guar gam; CM:Kahve mannanı; Galman of Palm seeds:Palmiye tohumlarındaki galaktomannan; BK:Buğday kepeği; -:Rapor edilmemiş.

Mantarlar arasında *Aspergillus*, *Agaricus*, *Trichoderma*, *Sclerotium* cinsleri en mannolitik gruplardır (Sachslehner vd. 2000; Tang vd. 2001; Franco vd. 2004; Huang vd. 2007; Chen vd. 2007). Mikrobiyal mannanazlar, hem indükleyici hem de yapısal enzimler olması, nedeniyle genellikle mikroorganizmanın yetiştirildiği ortama hücre dışında salgılanması ve yığın halinde üretimin daha kolay olması sebebiyle ticari öneme sahiptir (Dhawan ve Kaur 2007).

Literatürde  $\beta$ -mannanaz üretiminde genellikle derin kültür fermentasyon yönteminin kullanıldığı görülmektedir (Kote vd. 2009; Chauhan vd. 2012). Bu yönteme alternatif olarak da mannanaz üretiminde katı faz fermentasyon yöntemi kullanılmaktadır. Abdeshanian vd. (2009) ve Rashid vd. (2010) tarafından yapılan çalışmalara bakıldığında, KFF yöntemi mannanaz üretiminde kullanılmış ve üretim oranının cevap yüzey metodu kullanılarak parametrelerin optimizasyonu ile birkaç kat artırıldığı görülmüştür (Lin vd. 2007; Mohamad vd. 2011).

Genellikle, optimum pH değerleri bakteriyel mannanazların üretiminde nötr pH'da, fungal mannanazların üretiminde ise asidik pH aralığındadır (Mabrouk ve Ahwan 2008; Kote vd. 2009; Blibech vd. 2010). Bununla birlikte alkalofilik bir bakteri olan *Bacillus* sp. N16-5'in mannanaz üretimi için optimum pH değeri 9.5 olarak belirlenmiştir. Alkali mannanazların kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde kullanımı avantaj sağlamaktadır. Mikrobiyal mannanazların 37-70°C aralığında değişen sıcaklıklarda çalışabildiği belirlenmiştir. Genellikle, bakteriyel mannanazlar fungal mannanazlara göre daha termostabil olduğundan hamur ağartma endüstrisindeki uygulamalar için önem arz etmektedir (Ma vd. 2004; He vd. 2008; Eneyskaya vd. 2009).

Filamentli mantar fermentasyonu, ticari olarak biyoteknolojik proseslerde katma değerli ürünler, biyo-yakıtlar, enzimler, organik asitler, polisakkaritler, ilaçlar vs. gibi yararlı ürünlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların genetik manipülasyonlarındaki gelişmeler, arzu edilen özelliklerdeki mannanazların üretilmesiyle sonuçlanmaktadır. Geliştirilen rekombinant mannanazların P&G, ChemGen ve Genencor firmaları tarafından ticareştirilmesi ve modern mikrobiyoloji ve biyoteknolojiye başarılı bir şekilde uyarlanması buna iyi bir örnektir (Öztürk 2008). Üretilen rekombinant mannanaz birçok endüstri dalında yaygın bir şekilde tek veya diğer enzimlerle karışım halinde kullanılmaktadır.

### 2.1.1. Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi uygulamaları

Yumuşak dokulu ağaçların galaktomannan yapıları %15-20 arasında hemiselüloz içermektedir ve mannanazların en yaygın kullanımlarından biri olan yumuşak dokulu ağaç hamurlarının enzimatik olarak ağartılması işlemidir (Suurnakki vd. 1996). Ligninin ağaç liflerinden ekstrakte edilmesi ağaç hamurlarının enzimatik olarak ağartılmasında önemli bir adımdır. Alkali şartlarda hamura ön işlem uygulanması, lignine kovalent bağlı hemiselülozları hidrolize eder ve böylece ligninin uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Ancak bu işlem çevre kirliliğine sebebiyet verdiği için dezavantajlıdır (Hongpattarakere 2002). Ancak hamur ağartma aşamasında yüksek sıcaklıkta alkali ekstraksiyonu için enzimatik ön işlem uygulamak (Clarke vd. 2000) çevre kirliliğini önemli ölçüde azaltmakta ve bu sebeple kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde büyük öneme sahip olmaktadır. Bunun uygulanabilir olması enzimatik

ağartma işlemleri sırasında hamur kalitesinin bozulmamasını gerektirmektedir. Yumuşak dokulu ağaçları hamur haline getirmek için yüksek sıcaklık uygulamasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple termofilik mannanazların yüksek sıcaklıklarda daha yüksek yapısal stabiliteye sahip olması ve katalitik verimliliklerinin daha fazla olması mezofilik mannanazlara göre önemli avantajlar sunmaktadır (Yanhe vd. 2004). Mannanaz, kağıt hamurunun parlaklığını artırmak ve klorsuz ağartma ile hidrojen peroksit ihtiyacını azaltmak veya ortadan kaldırmak için yararlıdır (Tenkanen vd. 1997).

### 2.1.2. Kahve endüstrisi uygulamaları

Kahve ekstraktının ana bileşeni olan mannan viskozitenin yüksek olmasından sorumludur ve bu da hazır kahvenin işlenmesinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Kahve mannanlarının hidrolizi için farklı mannanaz preparatları kullanılarak bu olumsuz etki önemli derecede azaltılmaktadır (Erkan vd. 2020). Ayrıca mannanaz, hazır kahvenin dondurularak kurutulması sırasında jel oluşumunu önlemek amacıyla kahve ekstraktında bulunan galaktomannanların hidrolizinde de kullanılmaktadır. Kahve, içeriğindeki mannandan dolayı manno oligosakkarit (MOS) üretimi için bir potansiyel oluşturmaktadır. Aynı zamanda azalan şeker içeriği, çeşitli MOS açığa çıkması ile sürekli olarak artmaya başlamıştır. Kalori değeri düşük olan oligosakkaritler, kolondaki bakterilere faydalı olmakta ve ishal riskini azaltmaktadır (Erkan vd. 2020). Kısmen saflaştırılmış, immobilize edilmiş veya çözünür ham mannanaz preparatları, kahve mannanının degradasyonunda başarılı şekilde kullanılmaktadır (Nicolas vd. 1998; Nunes vd. 1998; Sachslehner vd. 2000; Nunes vd. 2006).

### 2.1.3. Deterjan endüstrisinde $\beta$ -mannanaz kullanımı

Son yıllarda, deterjan endüstrisinde kararlı alkali mannanazlar, çamaşırlar üzerinde leke çıkartıcı olarak kullanılmaktadır. Mannanlar genel olarak dondurmalara, soslara, saç kremlerine, şampuanlara ve diş macunlarına kıvam artırıcı ajanlar olarak eklenmektedir (Wong ve Saddler 1993). Mannanlar selüloz liflerine tutunduğundan dolayı mannan içeren lekelerin çıkarılması da bir hayli zor olmaktadır. Mannanlar yıkama sırasında temiz kumaşlara da aktarılmakta ve bu da kumaşların grileşmesine sebep olmaktadır. Mannanazlar, mannoz birimleri arasındaki  $\beta$ -1,4-bağlantılarını hidroliz ederek gam polimerini daha küçük karbonhidrat parçalarına bölmektedir. Bu küçük karbonhidrat parçaları suda daha çok çözünerek kumaşlardan uzaklaştırılmakta ve yıkama ile atılmaktadır. Böylelikle mannanazlar, yıkama sırasında açığa çıkan kirlerin yeniden birikmesini de önlemektedir. Bu bileşimler aynı zamanda sağlık ve güzellik bakım ürünleri, sanitasyon ürünleri, kontakt lens temizleyicileri, bulaşık deterjanı ve sert yüzey temizleyicileri olarak da formüle edilebilmektedir (Bettioli vd. 2002).

### 2.1.4. İlaç endüstrisindeki uygulamalar

Hastalıkların iyileştirilmesinde kullanılan ilaçların hızlı çözünmesi ve yapısal özelliklerinin oluşturulmasında mannozların kullanımı her geçen gün artmaktadır (Fu vd. 2006). Hurma çekirdeği keki ve mısır unu gibi mannan bakımından zengin düşük maliyetli substratların  $\beta$ -mannanaz vasıtasıyla parçalanması sonucu mannoz açığa çıkmaktadır. Her geçen gün kullanımı artmakta olan mannoz, mannan içeren substratların  $\beta$ -mannanaz ile parçalanmasıyla elde edilmektedir. Bu amaçla sadece  $\beta$ -

mannanaz enzimi hidroliz için yeterli olurken selülaz ve  $\alpha$ -galaktozidaz ile kombine edilmesinin mannoz verimini artırmak için olumlu bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (van Zyl vd. 2010; Chauhan vd. 2012). Guar gamın, protein alımını azaltmadan plazma kolesterolünü ve vücut yağını azaltmak ve dışkı atılım hacmini artırmak gibi bazı fizyolojik fonksiyonlar üzerinde olumlu etkilerinin olduğu da tespit edilmiştir (Takeno vd. 1990).

### 2.1.5. Hayvan yemlerinin iyileştirilmesinde $\beta$ -mannanaz kullanımı

$\beta$ -mannan, mısır unu, guar unu, soya fasulyesi unu, hurma çekirdeği unu ve susam unu gibi yem bileşenlerinde yaygın olarak bulunan bir polisakkarittir. Bütün bu bileşenler, mannan, galaktomannan, ksilan ve arabinoksilan gibi çeşitli anti-beslenme faktörleri ile birlikte lezzet eksikliği, yüksek lif içeriği, esansiyel aminoasit eksikliği ve yüksek viskozite gibi bazı ortak özelliklere sahiptir; bu yüzden, bağırsakta kullanımları sınırlı olmaktadır. Hayvan yemlerinde kullanılmak üzere, geniş pH aralığına sahip olan, pepsin ve tripsin gibi protezlara dirençli mannanazlar tercih edilmektedir (Mussini vd. 2011). Piyasadaki çoğu mannanaz endo- $\beta$ -mannanaz formundadır ve bu tür bir enzim yemlere dahil edilerek manno oligosakkaritler, mannotrioz, mannobiyoz ve az miktarda mannoz üretilmektedir. Sadece mannozlar bağırsakta emilebildiği için mannobiyoz ve manno oligosakkaritlerin üretimi bir noktaya kadar işe yaramamaktadır. Bundan dolayı, karbonhidratlarda bulunan bu bileşenler emilemediğinden konakçıya enerji sağlanamamaktadır. Kümes hayvanları yemlerinde yapılan araştırmalar sonucunda mannanaz enziminin kullanımının oldukça yaygın olduğu ve başarı sağladığı bildirilmiştir (Kusakabe ve Takashi 1988; Sundu vd. 2006; Chauhan vd. 2012).

### 2.1.6. Mannooligosakkarit (MOS) üretimi

Mannooligosakkaritler (MOS) suda çözünen diyet lifleridir ve insanlar tarafından sindirilemezler. Bu grubun üyeleri bağırsak mikroflorası tarafından besin olarak kullanılır ve böylelikle insan sağlığı için yararlı maddeler oluştururlar. Keçiboynuzu gamı, guar gam, tara gam ve konjak unu suda çözünür MOS'lar içermektedir. Mannanlar  $\beta$ -mannanaz enzimi tarafından kısmen parçalandığında mikroorganizmalar tarafından substrat olarak kullanılabilen MOS'lar üretilmektedir (Erkan vd. 2020).

MOS'ların üretimi  $\beta$ -mannanaz enziminin kullanım alanlarından biridir. Klinik çalışmalar sonucunda, farklı bitki kaynaklarından elde edilen MOS'ların insan sağlığı için yararlı etkileri olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle MOS üretiminde kompleks enzim çözeltileri yerine  $\beta$ -mannanaz kullanımının yeterli olduğu belirlenmiştir (van Zyl vd. 2010).



### **2.1.7. Meyve-sebze maserasyonu ve meyve suyu endüstrisinde $\beta$ -mannanaz kullanımı**

Sebze ve meyve suları, düşük enerji içeriği ile önemli bir vitamin kaynağıdır. Sebze ve meyvelerin en önemli bileşenlerinin başında karotenoidler gelmektedir. Biyoaktif karotenoidler provitamin A kaynağıdır ve antioksidatif, antikanser, cilt koruma gibi birçok fonksiyon göstermektedir (Gurler vd. 2020). Meyve suyu üretiminde temel işlem, verimi, biyoaktif bileşikleri ve meyve suyu stabilitesini artırmak için enzimlerin sıvılaştırılmasıdır. Gıda endüstrisinde, meyve-sebze maserasyonu ve meyve sularının durultulması için glikozil hidrolazlarla birlikte mannan bozucu enzimler de kullanılmaktadır (Moreira ve Filho 2008). Mannan bozucu bir enzim olan  $\beta$ -mannanaz enzimi, meyve-sebze maserasyonu ve meyve suyu durultulması gibi işlemler sırasında hem kaliteyi (verimi) ve  $\beta$ -karoten değerini artırmak hem de bulanıklığı azaltmak amacıyla kullanılmaktadır.

### **2.1.8. Mannanazların diğer uygulamaları**

$\beta$ -Mannanazlar yukarıda belirtilen uygulamaların yanı sıra birçok farklı alanda da kullanılmaktadır:

Petrol ve gaz endüstrilerinde sondaj işlemleri sırasında petrol ve gaz akışını artırmak amacı ile galaktomannanın enzimatik hidrolizinden yararlanılmaktadır. Petrol kuyularındaki yüksek sıcaklık ( $>80^{\circ}\text{C}$ ) termostabil mannanazların bu amaç için kullanımını artırmıştır (Comfort vd. 2004).

Hindistancevizi etinin hücre duvarının ana bileşenini mannan ve galaktomannan oluşturduğundan, hindistancevizi etinin enzimatik yağ ekstraksiyonunda mannanazlar kullanılmaktadır. Aflatoksin bulaşması ve ürünlerin oksidatif acılaşıma sorunlarını ortadan kaldırmak için enzimatik işlemlere gereksinim duyulmaktadır (Chen ve Diosady 2003).

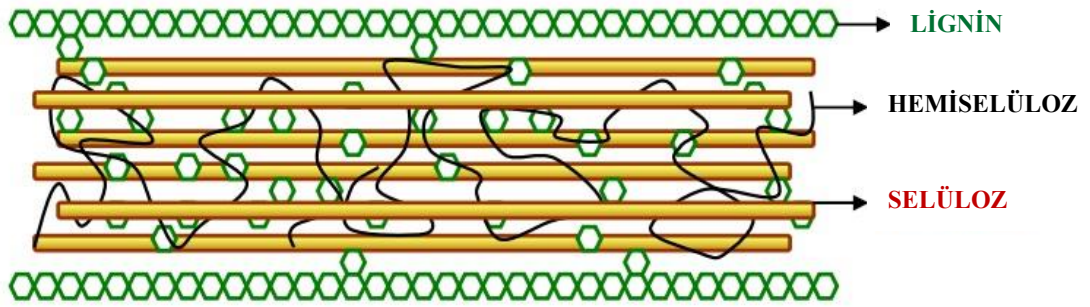
Biyoetanol üretimi için lignoselülozik biyokütlenin öncelikli olarak selüloz, ksilanaz ve mannanaz gibi diğer enzimleri de içeren bir enzim karışımı ile fermente edilebilir şekerlere hidrolize edilmesi gerekmektedir (Varnai vd. 2011; Chauhan vd. 2012).

Guar gam ve keçiboynuzu gamı gibi galaktomannanlar tekstil baskısında baskı boyasını kalınlaştırıcı ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Baskı boyasının viskozitesini azaltmak ve tekstil baskısından sonra fazla baskı boyasının yıkanmasını kolaylaştırmak için mannanazlardan yararlanılmaktadır (Adenmark vd. 1998).

## 2.2. Lignoselülozik Materyaller ve Kahve Posasının Fermentasyonda Kullanımı

### 2.2.1. Lignoselülozik materyaller

Dünya çapında, tarım ve tarımsal endüstriyel atıkları, gıda işleme atıkları, ormancılık atıkları, odun atıkları vb. gibi bol bulunan yenilenebilir ve ucuz enerji kaynaklarına lignoselülozik biyokütle (LCB) denmektedir (Germeç vd. 2017). Başlıcaları; talaş, kavak ağacı, şeker kamışı, kağıt atığı, bira üretiminde kullanılan atıklar, pirinç, arpa, buğday, mısır, çavdar, yulaf, sorgum vb. tahıllardan elde edilen kabuklar, kavuzlar, yapraklar, kepekler ve saplardır. Bu tür atıklar her yıl fazla miktarda birikerek çevre kirliliğine yol açmaktadır. Bu sebeple, şeker içermeleri ve diğer kimyasal bileşimlerine bağlı olarak etanol, gıda katkı maddeleri, organik asitler, enzimler ve bir dizi katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde kullanılabilirler. Kullanım alanlarının artmasıyla birlikte lignoselülozik maddelerden kaynaklanan çevresel sorunlar ve potansiyel olarak kullanılan değerli kaynakların kaybı azalmaktadır. Lignoselülozun ana bileşenleri, bitkisel biyokütlenin hücre kompleksini oluşturan polimerler olan selüloz, hemiselüloz ve lignindir. Temel olarak bu üç ana bileşen ile çevrili bir iskelet oluşturmaktadır (Şekil 2.2) (Mussatto ve Teixeira 2011).



**Şekil 2.2.** Selüloz, hemiselüloz ve lignin fraksiyonlarını gösteren lignoselüloz yapısının temsili (Mussatto ve Teixeira 2010)

Karbonhidrat polimerleri ve lignin miktarları bitki türlerine göre farklılık göstermektedir. Bir bitkide bulunan bileşenler arasındaki oranlar bitkinin yaşına, büyüme aşamasına ve diğer koşullara bağlı olarak değişebilir. Yapısal bileşenler arasında en fazla bulunan homopolisakkarit selülozdur. Organik bileşik olan selüloz bitki hücre duvarında genellikle %35-50 oranında bulunur. Bunu heteropolisakkarit olan hemiselüloz %20-35 ve lignin %10-25 oranlarında izlemektedir. Lignin aynı zamanda lignoselülozik biyokütlerdeki hücre duvarlarının direncini ve bütünlüğünü artırmaktadır (Pienkos ve Zhang 2009; Singh vd. 2014; Ravindran ve Jaiswal 2016; Loow vd. 2016a; Germeç vd. 2017). Çeşitli lignoselülozik atıkların ana bileşenlerinin ortalama değerleri Çizelge 2.2'de verilmiştir (Saha 2003; Mussatto ve Teixeira 2010;).

**Çizelge 2.2.** Lignoselülozik atıkların ana bileşenleri (Nigam vd. 2009)

| Lignoselüloz atığı   | Selüloz (%w/w) | Hemiselüloz (%w/w) | Lignin (%w/w) |
|----------------------|----------------|--------------------|---------------|
| Arpa samanı          | 33.8           | 21.9               | 13.8          |
| Mısır koçanı         | 33.7           | 31.9               | 6.1           |
| Mısır sapı           | 35.0           | 16.8               | 7.0           |
| Pamuk sapları        | 58.5           | 14.4               | 21.5          |
| Yulaf samanı         | 39.4           | 27.1               | 17.5          |
| Pirinç samanı        | 36.2           | 19.0               | 9.9           |
| Çavdar samanı        | 37.6           | 30.5               | 19.0          |
| Soya sapı            | 34.5           | 24.8               | 19.8          |
| Şeker kamışı küspesi | 40.0           | 27.0               | 10.0          |
| Ayçiçeği sapları     | 42.1           | 29.7               | 13.4          |
| Buğday samanı        | 32.9           | 24.0               | 8.9           |

Bu tez çalışmasında; lignoselülozik materyal olarak arpa kavuzu (AK), buğday kepeği (BK), çavdar kepeği (ÇK) ve yulaf kavuzu (YK) tercih edilmiştir. En çok üretilen tarım ürünlerinin başında arpa (*Hordeum vulgare*), yulaf (*Avena sativa*), buğday (*Triticum sp.*) ve çavdar (*Secale cereale*) gelmektedir (Serna-Saldivar 2016). 2018 yılındaki FAO (Food and Agriculture Organization) verilerine göre dünya çapında arpa, buğday, çavdar ve yulaf üretim miktarları sırasıyla 141.4, 734.0, 11.3 ve 23.1 milyon tondur. Aynı yıl Türkiye’de gerçekleşen üretim miktarları sırasıyla 7.0, 20.0, 0.32 ve 0.26 milyon tondur (FAOSTAT 2020)

Arpa (*Hordeum vulgare*), taneleri malt ve yem olarak kullanılan önemli bir tahıldır. Dünya çapında, üretimde mısır, buğday ve pirinçten sonra 4. Sırada yer almakta olan arpa, Türkiye’de buğdaydan sonra en çok üretilen ikinci tahıldır. Arpa üretiminin en yaygın olduğu başlıca ülkeler Rusya, Ukrayna, Fransa, Almanya, Kanada ve İspanya’dır. Arpa eski dönemlerde milyonlarca insan tarafından önemli bir besin kaynağı olarak tüketilmiştir (Anonim 2020a).

2018 yılı FAO verilerine göre arpa dünyada yaklaşık 48 milyon, ülkemizde ise 2.6 milyon hektarlık ekim alanına sahiptir (FAOSTAT, 2020). Bugün dünyada ekimi yapılan arpa daha çok hayvan yemi (%65), bira (%33) üretimi ve insan beslenmesinde (%2) kullanılmaktadır. Ülkemizde ise tüketimin %90’ı hayvan yemi olarak, kalan kısmı ise maltlık olarak bira üretiminde kullanılmakta ve bu oran gün geçtikçe artmaktadır (Köten vd. 2013).

Arpa taneleri kavuzlu ve kavuzsuz olarak çeşitlilik göstermektedir. Ham protein miktarı %9-14 ve karbonhidrat miktarı %60-70 aralığında değişmektedir. Tanede ortalama %10-13 oranında kavuz bulunmaktadır. Arpa tanesini buğday tanesinden ayıran en önemli etmen iç kavuz olarak bilinen tabakaya tutulu olmasıdır. Bu sebeple arpa tanesi kavuzlu tane olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda ise Kanada’da kavuzsuz arpa yeniden keşfedilmiş ve günümüzde kavuzsuz arpanın gıda ve endüstride kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır (Karaduman 1999).

Buğday (*Triticum* sp.), ılıman ülkelerde yetiştirilen insan beslenmesi ve hayvan yemi olarak kullanılan bütün dünyada ıslahı yapılmış tek yıllık otsu bir bitkidir. Çeşitli araştırmalar sonucunda buğdayın gen merkezi olarak Anadolu, Batı İran ve Kafkasya kabul edilmektedir. Bununla birlikte İskandinavya, Rusya, Arjantin, tropik ve alt-tropik bölgelerdeki yüksek kesimler de dahil olmak üzere rakipsiz yetiştirme aralığına sahiptir (Shewry 2009; Anonim 2020b).

2018 yılı FAO verilerine göre buğday dünyada 214.3 milyon, ülkemizde ise 7.3 milyon hektarlık ekim alanına sahiptir (FAOSTAT 2020). Dünya çapında ekim alanı ve üretimi bakımından ilk sırada yer alan buğday; temel besin olarak un ve yem üretiminde kullanılmaktadır (Demirel 2017). Ayrıca buğdayın kepekli yapısı içerdiği esansiyel aminoasitler, mineraller ve vitaminler ile insan beslenmesinde fayda sağlamaktadır.

Çavdar (*Secale cereale*), buğdaygiller familyasında bulunan, tahıl ve yem mahsülü olarak yetiştirilen, soğuğa en dayanıklı tahıl bitkisidir. Un, çavdar ekmeği, çavdar birası, viski, votka ve hayvan yemi üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda olarak tüketilemeyen %15-20'lik kısmı tarımsal atık olarak oluşmaktadır. Rusya ve İskandinavya ülkeleri gibi kışları çok sert geçen iklimlerde dahi yetiştirilebilmektedir. En verimsiz topraklarda bile diğer tahıllardan daha çok ürün vermektedir. Çavdarın kimyasal yapısını karbonhidrat, protein, potasyum ve B vitamini oluşturmaktadır (Bledzki vd. 2010; Anonim 2020c).

2018 yılı FAO verilerine bakıldığında çavdar dünyada 4.1 milyon, ülkemizde ise 0.1 milyon hektar ekim alanına sahiptir (FAOSTAT 2020). Ülkemizde en çok çavdar yetiştirilen illerin başında Kayseri gelmektedir. Bunu Niğde, Sivas, Yozgat, Nevşehir ve Konya takip etmektedir.

Yulaf (*Avena sativa*), içeriğinde bol nişasta bulunduran, serin iklim koşullarına elverişli tek yıllık otsu bir tahıl bitkisidir. En yaygın kullanım alanı hayvan yemi olsa da insan beslenmesi, ilaç ve kozmetik endüstrisinde de kullanılmaktadır. Yulaf, yüksek yağ içeriğine sahiptir. Buğday, arpa ve çavdarda %1.5-2 oranında yağ içeriği bulunurken bu oran yulafta %4.5-8 arasında değişmektedir. Bunun yanı sıra bol miktarda nişasta, protein, vitamin ve mineral içermektedir. Yulaf tanesinin %20-30 kadarını kavuz oluşturmaktadır (Sarı 2012; Anonim 2020d).

2018 yılı FAO verilerine göre yulaf dünyada yaklaşık 9.9 milyon, ülkemizde ise 0.1 milyon hektar ekim alanına sahiptir. Yulaf, dünyada ABD ve Rusya gibi ülkelerde daha çok üretilmektedir. Ülkemizde ise en çok Marmara, Ege ve İç Anadolu bölgelerinde yetiştirilmektedir (FAOSTAT 2020; Anonim 2020d).

Katma değeri yüksek ürünlerin üretilmesinde saf kimyasallar kullanıldığı gibi içeriği uygun tarımsal ürünler veya atıklarda kullanılmaktadır. Ancak saf kimyasallarla üretimin pahalı olması ve ayrıca tarımsal ürünlerin ve atıkların değerlendirilmesi gibi çevreci ve ekonomik yaklaşımlar, alternatif olarak doğal yetişen ürünlerin hammadde olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bu kaynaklardan katma değeri yüksek bir ürün olan mannanaz enziminin üretilmesi, günümüzde bu enzimin saf karbon kaynaklarından (glukoz, fruktoz, mannoz, laktoz, sukroz vb.) üretilmesine alternatif olarak görülmekte ve ekonomik açıdan büyük ölçüde kazanç sağlamaktadır.

### 2.2.2. Kahve posası

Dünyanın en popüler içeceklerinden biri olan kahve 80'e yakın ülke tarafından yetiştirilmekte ve petrolden sonra en çok ticaret ağına sahip bir özelliği taşımaktadır. İşleme sırasında çeşitli kahve kalıntıları oluşmakta ve kahve meyvesinin yaklaşık %50'sine yakını kalıntı olarak açığa çıkmaktadır (Tsai Liu ve Hsieh 2012; Campos-Vega vd. 2015). Demleme işleminden sonra kalan posa kahve atığı olarak adlandırılmaktadır. Tüm yıl üretim sırasında fazla miktarda kalıntı oluşması atık yönetimi planlamasını gerektirmiştir. Dünyanın en büyük şirketlerinden olan Nestle'nin bünyesinde 20'den fazla Nescafe fabrikası bulunmaktadır. Tüm bu atıkların değerlendirilebilmesi için yıl boyunca oluşan kahve taveleri günümüze kadar yenilenebilir enerji kaynağı olarak kullanılması amaçlanmaktadır. Bu nedenle, tüm çözümler kahve endüstrisinde oluşan kalıntılar değişik amaçlarda (biyoenerji üretimi, mantar yetiştirme, bahçecilik vb.) kullanılmak için uzman kuruluşlar tarafından toplatılmaktadır.

Kahve atıkları katma değerli ürün üretimine yardımcı organik bileşikler olan yağ asitleri, lignin, selüloz, hemiselüloz ve diğer polisakkaritleri içermektedir. Bu amaçla kahve atıkları biyodizel üretimi için şeker kaynağı, aktif karbon üretimi için sorbent olarak kullanılmaktadır (Preethu vd. 2007; Fiol vd. 2008; Mussatto vd. 2011; Caetano vd. 2012; Kante vd. 2012; Campos-Vega vd. 2015; Erkan vd. 2020).

Genel olarak mannozdan oluşan manooligosakkaritler (MOS), yüksek basınç ve sıcaklıkta kahve atığından mannanın hidrolizi sonucunda da elde edilmektedir (Asano vd. 2001). Manooligosakkaritlerin ana bileşenleri mannobioz, mannotrioz ve mannotetrozdur. Japonya'da yapılan bir çalışmada, MOS'un bağırsaklarda bifidobakterilerin oluşumunu artırıcı etkisinin olduğu ve insan denemelerinde dışkı yapısını iyileştirdiği saptanmıştır. Kahve mannanından elde edilen MOS, Japonya'da (Aginomoto Co. Inc.) aktif probiyotik bileşen olarak geliştirilmiş ve FOSHU (Food for Specified Health Uses) tarafından fonksiyonel gıda maddesi olarak onaylanmıştır (Fukami 2010; Campos-Vega vd. 2015; Erkan vd. 2020).

### 2.3. Katı Faz Fermentasyonu

Katı faz fermentasyonu (KFF), serbest su yokluğunda mikroorganizmaların gelişimi için gerekli neme sahip olan fermentasyon ortamıdır (Pandey 2003). KFF ile üretilen fermente ürünlerin başında Uzak Doğu'da üretilen tempeh ve tofu gibi ürünler, peynir, mantar, organik gübre ve silaj gelmektedir. Bunlara ek olarak, biyoteknolojik proseslerde katma değerli ürünlerden biyo-yakıtlar, enzimler, organik asitler, polisakkaritler, ilaçlar gibi mikrobiyal ürünlerin üretimi için sıvı kültür fermentasyonuna alternatif olarak kullanılmaktadır (Turhan 2015). Katı faz fermentasyonu, tarımsal endüstri artıklarının işlenmesinde sayısız fırsat sunmaktadır. Bunun nedeni, katı faz fermentasyonu süreçlerinin daha düşük enerji gereksinimine sahip olması, daha az atık su üretmesi, katı atık sorununu ortadan kaldırmasıyla çevre dostu olması ve mikroorganizmanın doğasına uygun gelişim ortamını en iyi şekilde temsil etmesidir. Bu yüzden küflerin doğal gelişim ortamları toprak, ağaç dipleri, nemli ortamlar vb. gibi yerler olduğu için katı faz fermentasyonunda avantaj sağlamaktadırlar. Mikroorganizmaların doğal yaşam ortamlarına uyumlu olduğu için KFF'de ürün verimliliğinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir (Pandey vd. 2003).

KFF’de uygun substrat seçimi önemli unsurlardan biridir. Substrat, hem fiziksel olarak fermentasyona destek sağlamakta hem de besin kaynağı olarak işlev görmektedir. Substratlar genel olarak, tarımsal ürünlerden, tarımsal endüstriyel atıklardan ve gıda atıklarından oluşmaktadır. Bu sebeple, KFF’de substrat seçerken öncelikle düşük maliyetli, tarımsal ürünlerin ve atıkların değerlendirilmesine önem verilmektedir. Üretimi amaçlanan ürün için en uygun substrat seçimi gerçekleştirilmektedir. Substrat seçiminin yanı sıra uygun mikroorganizma seçimi de ürün üretiminde önemli bir unsurdur. KFF’de modelleme ve diğer temel unsurları incelemek için genellikle inert malzemeler kullanılmaktadır. Parametrelerin belirlenmesi ve optimizasyonunun yapılması da önemli unsurlardan arasındadır. Bunlar substrat seçimi, pH, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi, inokülasyon oranı, ilave karbon kaynağı vb. gibi etmenlerden oluşmaktadır (Pandey vd. 2001; Hoogschagen vd. 2001).

KFF, daha yüksek verimlilik sağlama, düşük maliyetli fermentasyon ortamı, basit teknoloji, düşük enerji ihtiyacı, az miktarda atık su çıkışı ve köpük sorunu olmaması gibi avantajların yanı sıra, yavaş mikrobiyal üreme, ısı açığa çıkmasıyla oluşan problemler, bakteriyel kontaminasyon riski, ölçek büyütme sorunları ve substratın nem düzeyini kontrol etmekteki zorluklar sebebiyle çeşitli dezavantajlara da sahiptir (Turhan 2015).

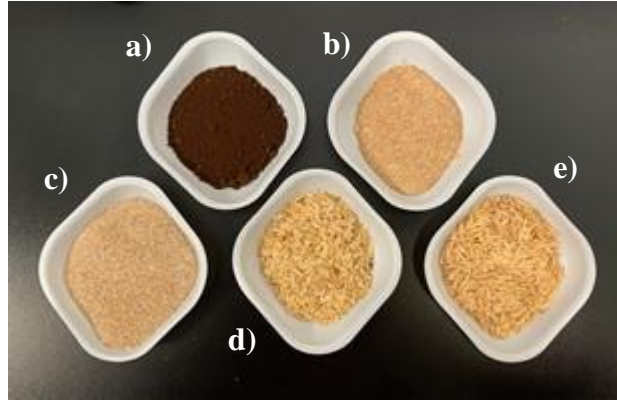
Katı faz fermentasyonu genellikle kesikli sistemde gerçekleştirilmektedir. Bazı proseslerde biyoreaktör gereksinimi olmazken, silaj üretimi gibi proseslerde karıştırma ve havalandırma düzeneğine ihtiyaç duyulduğundan reaktörlere gereksinim duyulmaktadır. Yaygın olarak kullanılan biyoreaktörler; döner tamburlu fermentörler, tepsili fermentörler, yatak sistemleri, kolon biyoreaktörler ve akışkan yataklı reaktörlerdir (Turhan 2015).

Bu tez çalışması kapsamında, küflerin doğal yaşam alanlarına uygun bir ortam oluşturan fermentasyon yöntemlerinden biri olan katı faz fermentasyon yöntemi ile düşük maliyetli atıklar ve tarımsal ürünler kullanılarak rekombinant *Aspergillus sojae* AsT3 ile  $\beta$ -mannanaz üretimi amaçlanmıştır. Öncelikle erlenmayerlerde farklı konsantrasyonlarda fermentasyonlar gerçekleştirilerek  $\beta$ -mannanaz üretimi için en uygun substrat belirlenmesi hedeflenmiştir. Ardından üretilen  $\beta$ -mannanaz enziminin kullanım alanlarından biri olan manooligosakkaritlerin (MOS) varlığını araştırmak için ortama mannan kaynağı olan kahve atığı ilave edilerek Plackett-Burman dizayn (PBD) ile fermentasyonların gerçekleştirilmesi ve optimum çalışma parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

Proje kapsamında farklı karbon kaynakları (arpa kavuzu, buğday kepeği, çavdar kepeği, yulaf kavuzu ve kahve atığı) ile mannanaz enziminin üretimi gerçekleştirilmiş ve en iyi karbon kaynağı bir sonraki fermentasyon aşamalarında kullanılmak amacı ile belirlenmiştir. Bu amaçla çalışma kapsamında kullanılan karbon kaynaklarından arpa kavuzu, çavdar kepeği ve yulaf kavuzu Konya’da yer alan Sağlık Tarım Ürünleri ve Gıda San. Ltd. Şti tarafından, buğday kepeği Çorum’un Osmancık ilçesindeki yerel bir üreticiden, kahve posası ise Antalya’da bulunan bir kahve işletmecisi olan Starbucks tarafından temin edilmiştir. Ayrıca alınan kahve posaları 65°C’de 1 gün boyunca etüvde (Memmert, UF 110 Plus, Schwabach, Germany) kurumaya bırakılmıştır.



**Şekil 3.1.** Fermentasyonda kullanılan karbon kaynakları; **a)** Kahve atığı; **b)** Buğday kepeği; **c)** Çavdar kepeği; **d)** Arpa kavuzu; **e)** Yulaf kavuzu

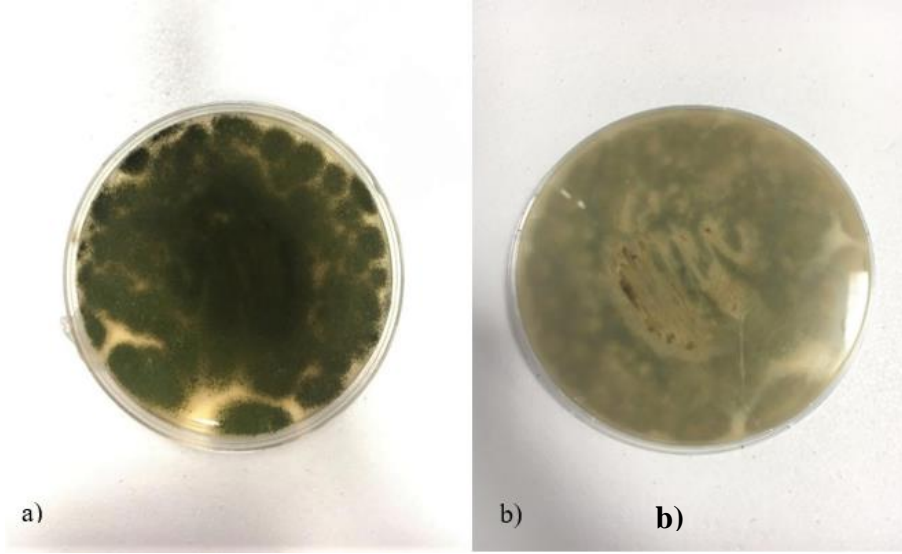
Bunların yanı sıra besiyeri içeriğinde azot kaynağı olarak maya ekstraktı (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot.1.03753.0500), inorganik tuzlar olarak  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Lot.BCBD6849V) ve  $K_2HPO_4$  (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot.1.05101.1000) kullanılmıştır. Mikroorganizmanın inokülasyonu için farklı oranlarda hazırlanan Tween-80 (Merck, Schuchardt, Germany, Lot.8.22187.0500) ve NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot.1.06404.1000) çözeltileri inokülasyon solüsyonunu olarak kullanılmıştır.

#### 3.2. Mikroorganizma ve İnokülasyon

Bu çalışmada  $\beta$ -mannanaz üretiminde Prof. Dr. Zümrüt Begüm ÖGEL’in laboratuvarından temin edilen rekombinant *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906) kullanılmıştır. Stok kültür hazırlamak için rekombinant *Aspergillus sojae* AsT3’ün Potato Dextrose Agar (PDA) içeren petrilere ekimi yapılmış ve petrilere 30°C’de 4-5 gün gelişime bırakıldıktan sonra +4°C’de maksimum 1 ay olacak şekilde depolanmıştır. Mikroorganizmanın canlılığının devamı için stok kültür her ay düzenli olarak yenilenmiştir.

Tüm fermentasyon denemelerinde karbon kaynaklarına ek olarak besiyeri içeriğinde maya ekstraktı (4 g/L),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.5 g/L) ve  $K_2HPO_4$  (1 g/L) kullanılmıştır (Öztürk vd. 2010).

Mikroorganizmanın fermentasyon ortamına inokülasyonu için %0.05'lik Tween-80 ve %0.8'lik NaCl çözeltileri hazırlanmış ve ayrı ayrı steril edildikten sonra oda sıcaklığına getirilerek karıştırılmıştır. Gelişmiş petrilerden biri alınıp, Tween-80 ve NaCl karışımından 8-10 mL pipet ile çekilerek petrinin üzerinde gezdirildikten sonra karışımın içerisine aktararak inokülasyon sıvısı hazırlanmıştır.

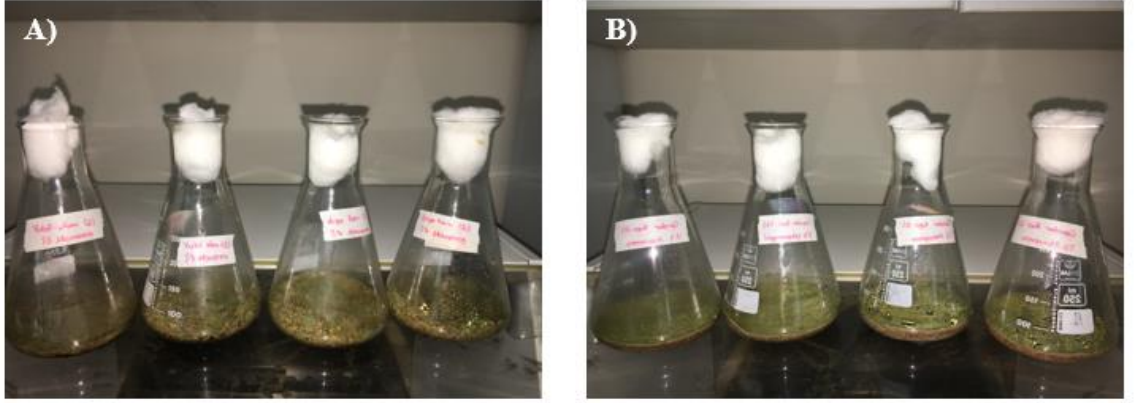


**Şekil 3.2.** *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906) suşunun petride gelişmiş halinin görünümü (a) Petrideki gelişmiş görünüm; b) Petrinin alttan görünümü)

### 3.3. Katı Faz Fermentasyonu

Fermentasyonda karbon kaynağı olarak arpa kavuzu, buğday kepeği, çavdar kepeği, yulaf kavuzu ve kahve posası kullanılmıştır. Her bir karbon kaynağından erlenlere 5'er g tartılmış ve 1:3 (w/v) katı:sıvı oranında olacak şekilde sıvı besiyeri eklenmiş ve başlangıç pH değeri 5.0 olarak ayarlanmıştır. Bu çalışmada üç farklı inokülasyon oranı kullanılmış ve tüm fermentasyon denemeleri iki paralelli olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Erlenler otoklavda  $121^{\circ}C$ 'de 15 dk boyunca steril edilmiş ve sterilizasyondan sonra belirlenen oranlarda (%3, %5, %7 v/w) inokülasyon gerçekleştirilmiştir. İnokülasyonu tamamlanan erlenmayerler  $30^{\circ}C$ 'de 7 gün boyunca fermentasyona bırakılmıştır (Şekil 3.3) (Ustok vd. 2007). Ayrıca çalışma kapsamında kullanılan substratlardan (arpa kavuzu, buğday kepeği, çavdar kepeği ve yulaf kavuzu) karışımlar hazırlanmış ve üç farklı inokülasyon oranlarında karışım fermentasyonları gerçekleştirilmiştir.





**Şekil 3.3.** Lignoselülozik maddeler ile gerçekleştirilen fermentasyon görüntüsü; **A)** Arpa ve yulaf kavuzu ile gerçekleştirilmiş fermentasyon görüntüsü; **B)** Buğday ve çavdar kepeği ile gerçekleştirilmiş fermentasyon görüntüsü

#### 3.4. Enzim Ekstraksiyonu

Fermentasyon aşaması tamamlandıktan sonra her bir erlenin içerisine 1:1 (v/v) oranında olacak şekilde 20 mL saf su ilave edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific Edison, Excella E24R, New Jersey, USA) 30°C’de 250 dev/dk çalkalama hızında 1 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edildikten sonra süzülen örnekler 4°C ve 1800 x G santrifüj kuvvetinde 20 dakika boyunca santrifüjlenmiştir (VWR, Mega Star 3.0R).



**Şekil 3.4.** Enzim ekstraksiyonunda kullanılan çalkalamalı inkübatör

### 3.5. Kahve Atığı İlaveli Şartlar İçin Plackett-Burman Dizayn

Çalışmanın ilk aşamasında  $\beta$ -mannanaz enzim üretimi için en uygun substrat belirlendikten sonra optimum koşulları belirlemek amacı ile Plackett-Burman Dizayn (PBD) kullanılmıştır. Bu amaçla enzim ve manooligosakkarit (MOS) üretimlerinin her ikisi için inokülasyon oranı (%3-7, v/w), inkübasyon sıcaklığı (30-50°C), inkübasyon süresi (5-7 gün) ve başlangıç pH'ı (3-7 pH) gibi 4 farklı parametre kullanılmıştır. Tespit edilen en uygun substrata ilave olarak fermentasyon sırasında MOS üretimini desteklemek veya artırmak için 1:1 (w/w) oranında kahve posası eklenmiştir. Fermentasyon ortamına bölüm 3.2'de belirtildiği gibi besiyeri bileşenleri ilave edilmiş ve 121.1°C'de 15 dk steril edildikten sonra PBD tarafından belirlenen koşullarda fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Tüm bu fermentasyonlar iki paralelli olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PBD ile belirlenen koşullarda gerçekleştirilen tüm bu fermentasyonlar sonunda  $\beta$ -mannanaz ve MOS üretimi için en uygun şartlar belirlenmiştir. Fermentasyon sonunda gerçekleştirilen enzim ekstraksiyonundan sonra elde edilen örnekler analiz edilene kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Plackett-Burman Dizayn deneme deseni

| Deneme | İnokülasyon oranı (%) | İnkübasyon süresi (gün) | İnkübasyon sıcaklığı (°C) | pH |
|--------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|----|
| 1      | 5                     | 6                       | 40                        | 5  |
| 2      | 7                     | 7                       | 50                        | 3  |
| 3      | 3                     | 5                       | 50                        | 7  |
| 4      | 3                     | 7                       | 50                        | 3  |
| 5      | 7                     | 5                       | 50                        | 7  |
| 6      | 3                     | 5                       | 30                        | 3  |
| 7      | 3                     | 7                       | 30                        | 7  |
| 8      | 5                     | 6                       | 40                        | 5  |
| 9      | 7                     | 7                       | 30                        | 7  |
| 10     | 7                     | 5                       | 30                        | 3  |

### 3.6. Fermentasyon Sonunda Elde Edilen Örneklerle Uygulanan Analizler

#### 3.6.1. $\beta$ -Mannanaz aktivite analizi

Fermentasyon bitiminde ekstrakte edilen ve ardından santrifüjlenen örneklerden alınan sıvılar analiz edilerek  $\beta$ -mannanaz aktivite değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla DNSA (3,5-dinitrosalisilik asit) metodu kullanılmıştır (Miller 1959). Öncelikle %0.05'lik keçiyoynuzu gamı solüsyonu Na-sitrat tamponunda (pH 6.0) hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyonun 1.8 mL'si bir test tüpüne alınmış ve üzerine 20 kat seyreltilmiş enzim solüsyonundan 0.2 mL ilave edilerek karıştırılmıştır. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra su banyosunda 50°C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Su banyosundan çıkarılan tüplerin üzerine 3 mL DNSA çözeltisi eklenmiş ve daha sonra 90°C'deki su banyosunda 15 dk boyunca tekrardan inkübasyona bırakılmıştır. Su banyosundan çıkarılıp soğutulmaya bırakılan örneklerin 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede (ThermoScientific Evolution, Şangay, Çin) absorbans değerleri ölçülmüştür. Bir birim enzim aktivitesi (1 U = 1  $\mu$ mol/dk), 1 dakikada 1  $\mu$ mol D-mannoza eşdeğer indirgeyici

şekerleri serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Öztürk vd. 2010). Hesaplanan değerler mannoz standart kurvesinde yerine konularak  $\beta$ -mannanaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Puchart vd. 2004). Enzim analizinde kullanılan mannoz standart kurvesi EK-1’de verilmiştir.

Mannoz standart kurvesinden faydalanılarak oluşturulan denklem aşağıda verilmiştir.

$$C_{\text{mannoz}} = a \times \text{Abs}_{540} - b \quad \text{Denklem (1)}$$

$$C_{\text{mannoz}} = \text{Mannoz konsantrasyonu } (\mu\text{mol/mL})$$

$$\text{Abs}_{540} = 540 \text{ nm'de okunan absorbands değeri}$$

$$a = \text{standart kurvenin eğimi}$$

$$b = \text{sabit sayı}$$

Örnekler analiz edilirken beraberinde kontrol örneği ve kör hazırlanmıştır. Burada; kontrol örnekleri için tüplere 1.8 mL keçiyoynuzu gamı (LBG) ile 20 kat seyreltilmiş enzim solüsyonundan 0.2 mL eklenerek karıştırılmış ve üzerlerine 3 mL DNSA çözeltisi direkt ilave edilerek renk değişimi sağlanmıştır. Kontrol örneklerinin hazırlanmasının amacı ortamda bulunan indirgen şekerlerin absorbands değerlerinin ölçülmesini sağlamaktır. Kör ise test tüplerine 1.8 mL keçiyoynuzu gamı, 0.2 mL saf su ve 3 mL DNSA çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan kör ve kontrol örnekleri 50°C’deki inkübasyona dahil edilmemiş ancak örnek tüpleri ile birlikte 90°C’deki su banyosuna konularak 15 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Örnek tüplerinden elde edilen absorbands değerlerinden ( $\text{Abs}_{\text{enzim}}$ ) kontrol örneklerinden elde edilen absorbands değerlerinin ( $\text{Abs}_{\text{kontrol}}$ ) çıkarılması ile enzim tarafından açığa çıkarılan indirgen şekerlerin absorbands değerleri ( $\text{Abs}_{540}$ ) hesaplanmıştır.

$$\beta\text{-mannanaz aktivitesi (U/mL)} = (C_{\text{mannoz}} \times R_v \times DF) / t \quad \text{Denklem (2)}$$

$$R_v = \text{Test tüpündeki toplam solüsyon hacmi} / \text{enzim solüsyonunun hacmi}$$

$$DF = \text{Dilüsyon faktörü}$$

$$t = \text{Reaksiyon süresi (dk)}$$

### 3.6.2. Toplam protein analizi

Spesifik  $\beta$ -mannanaz aktivitesini belirlemek için örneklere toplam protein analizi uygulanmıştır. Toplam protein analizini gerçekleştirmek için ThermoScientific Coomassie (Bradford) Protein Assay kit kullanılmıştır. Analiz kiti, Coomassie (Bradford) Protein Assay Reagent (950 mL) ve albumin standart ampullerinden (2 mg/mL, 10 ampül) oluşmaktadır

Fermentasyon sonunda elde edilen örnekler analiz edilmek üzere +4°C’de muhafaza edilmiştir. Toplam protein analizinde, tüplere 1.5 mL Coomassie (Bradford) Protein Assay Reagent ile 30  $\mu$ L albümin standardı veya örnek eklenerek karıştırılmış ve daha stabil ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için oda sıcaklığında 10 dk

boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından standart ve örnekler 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı okutulmuştur. Kör ile düzeltilmiş standart absorbanslar kullanılarak standart kurve oluşturulmuş ve örneklerin absorbans değeri kurvede yerine konularak toplam protein miktarları hesaplanmıştır (Bradford 1976). Hesaplanan toplam protein miktarları mg/mL cinsinden ifade edilmiştir.

Spesifik mannanaz aktivitesi aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$\text{Spesifik Mannanaz Aktivitesi (U/mg)} = \frac{\beta\text{-Mannanaz aktivitesi (U/mL)}}{\text{Protein miktarı (mg/mL)}} \quad \text{Denklem (3)}$$

### 3.6.3. Mannooligosakkarit (MOS) analizi

Fermentasyon sonunda örneklerdeki MOS miktarlarını belirlemek amacı ile RefractoMax 520 kırılma indisi dedektörü, otomatik örnekleyici, kolon fırını ve bilgisayar kontrolü ile donatılmış bir HPLC (Thermo Scientific UltiMate 3000, Dreieich, Almanya) kullanılmıştır. Analiz, 1 mL/dk akış hızında 20 µL enjeksiyon hacmi ve 25°C’de bir CarboPac PA100 kolonu ile 10mM NaOH mobil faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler, mobil faz ile 20 kat seyreltilmiştir ve filtrelenerek (Chromafil PET-45/25) viyalere aktarılmıştır. Analiz sonunda elde edilen değerler ppm cinsinden ifade edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan standart kimyasallar olan mannobioz, mannotrioz, mannotetroz, mannopentoz ve mannoheksoz, Megazyme International (Bray, İrlanda) tarafından temin edilmiştir. MOS analiz koşulları, ThermoFisher Scientific tarafından temin edilen CarboPac PA100 kolonunda belirtilen şartlarda gerçekleştirilmiştir (Erkan 2020; Yılmaz 2020).

### 3.6.4. İstatistiksel analiz

Enzim ve MOS üretiminde optimum koşulların belirlenmesinde kullanılan fermentasyonlara ait deneme deseni Minitab İstatistiksel Yazılımı (Version 13.3; Minitab Inc., State College, PA) kullanılarak oluşturulmuştur. Program tarafından elde edilen modelin deneysel verileri ne ölçüde karşıladığı ANOVA ile belirlenmiştir. Bu yöntemle her faktörün cevap üzerindeki istatistiksel önemi %95 güven seviyesinde tespit edilmiştir. Ayrıca fermentasyon denemelerinin analiz sonuçlarını değerlendirmek için SAS istatistiksel programı (Version 9; SAS Institute, Cary, NC, ABD) kullanılmıştır. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi %95 önem seviyesinde gerçekleştirilmiştir ( $P=0.05$ ). Tüm parametrelerdeki değerler, en az iki tekerrürün ortalaması alınarak verilmiş olup tablolarda ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde ifade edilmiştir.

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

##### 4.1. $\beta$ -Mannanaz Üretimi İçin Karbon Kaynaklarının Belirlenmesi

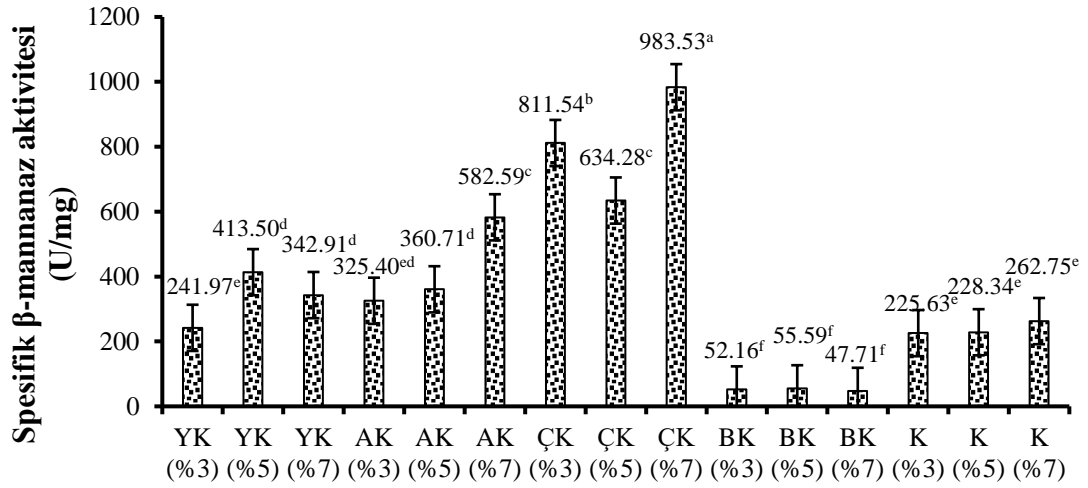
Yenilenebilir kaynaklar ve bunların karışımları kullanılarak KFF prosesi ile  $\beta$ -mannanaz üretimi gerçekleştirilmiş, ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Elde edilen ekstraktların enzim aktivite değerleri analiz edilmiş ve protein içeriği belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Spesifik  $\beta$ -mannanaz aktivitelerine göre substrat kaynaklarının seçimi ve inokülasyon oranlarının aktivite üzerine etkisi

| Substrat      | İnokülasyon oranı (%) | Spesifik $\beta$ -mannanaz aktivitesi (U/mg) | Ekstraktaki protein miktarı (mg/mL) |
|---------------|-----------------------|--|-------------------------------------|
| Yulaf kavuzu  | 3                     | 241.97 <sup>e</sup> ±55.97                   | 1.107                               |
|               | 5                     | <b>413.50<sup>d</sup>±44.32</b>              | 1.115                               |
|               | 7                     | 342.91 <sup>d</sup> ±27.43                   | 1.083                               |
| Arpa kavuzu   | 3                     | 325.40 <sup>ed</sup> ±31.92                  | 1.048                               |
|               | 5                     | 360.71 <sup>d</sup> ±31.04                   | 1.000                               |
|               | 7                     | <b>582.59<sup>c</sup>±32.60</b>              | 1.016                               |
| Çavdar kepeği | 3                     | 811.54 <sup>b</sup> ±47.21                   | 0.963                               |
|               | 5                     | 634.28 <sup>c</sup> ±12.25                   | 1.065                               |
|               | 7                     | <b>983.53<sup>a</sup>±33.52</b>              | 0.970                               |
| Buğday kepeği | 3                     | 52.16 <sup>f</sup> ±17.73                    | 0.876                               |
|               | 5                     | <b>55.59<sup>f</sup>±14.05</b>               | 0.897                               |
|               | 7                     | 47.71 <sup>f</sup> ±10.04                    | 0.893                               |
| Karışım       | 3                     | 225.63 <sup>e</sup> ±2.97                    | 0.969                               |
|               | 5                     | 228.34 <sup>e</sup> ±12.49                   | 1.001                               |
|               | 7                     | <b>262.75<sup>e</sup>±60.78</b>              | 0.956                               |

\*Aynı sütundaki farklı harfler ortalama değerler arasında istatistiksel önemi gösterir ( $P<0.05$ ). Koyu renk ile gösterilmiş değerler en yüksek aktivite değerlerini göstermektedir.

Sonuçlar incelendiğinde en yüksek enzim aktivitesi değerleri yulaf kavuzunda %5 inokülasyon oranında 413.50 U/mg, arpa kavuzunda %7 inokülasyon oranında 582.59 U/mg, çavdar kepeğinde %7 inokülasyon oranında 983.53 U/mg, buğday kepeğinde %5 inokülasyon oranında 55.59 U/mg ve substrat karışımları ile gerçekleştirilen fermentasyonda %7 inokülasyon oranında 262.75 U/mg olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda en iyi üretimi gösteren karbon kaynağının çavdar kepeği olduğu belirlenmiştir. Ayrıca karışımlarla (arpa kavuzu, buğday kepeği, çavdar kepeği, yulaf kavuzu ve kahve posası) gerçekleştirilen fermentasyonların KFF sürecinde yulaf kavuzu, arpa kavuzu ve çavdar kepeğine göre daha az  $\beta$ -mannanaz enzim aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.1) (Şekil 4.1). Ancak karışım fermentasyonları KFF sürecinde buğday kepeği ile gerçekleştirilen fermentasyonlara göre daha başarılı olmuştur.



**Şekil 4.1.**  $\beta$ -mannanaz üretimi için karbon kaynaklarının değerlendirilmesi (K; Karışım)

Diğer taraftan inokülasyon oranlarının enzim fermentasyonları üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Hazırlanan fungal spor çözeltilisinin sırasıyla %3, %5 ve %7 oranlarında yulaf kavuzu, arpa kavuzu ve çavdar kepeği içeren besiyerlerine inoküle edilmesiyle enzim üretiminin önemli ölçüde arttığı saptanmıştır ( $P < 0.05$ ). Fakat, buğday kepeği ve karışım fermentasyonlarında inokülasyon oranlarının enzim fermentasyonu üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir ( $P > 0.05$ ) (Çizelge 4.1). Sonuç olarak, maksimum spesifik  $\beta$ -mannanaz aktivitesi (983.53 U/mg) çavdar kepeğinde %7 inokülasyon sonucunda elde edildiğinden KFF prosesi altında MOS üretimi ve  $\beta$ -mannanaz üretimi bu şartlar kullanılmıştır.

#### 4.2. $\beta$ -Mannanaz Üretiminin PBD ile Optimizasyonu

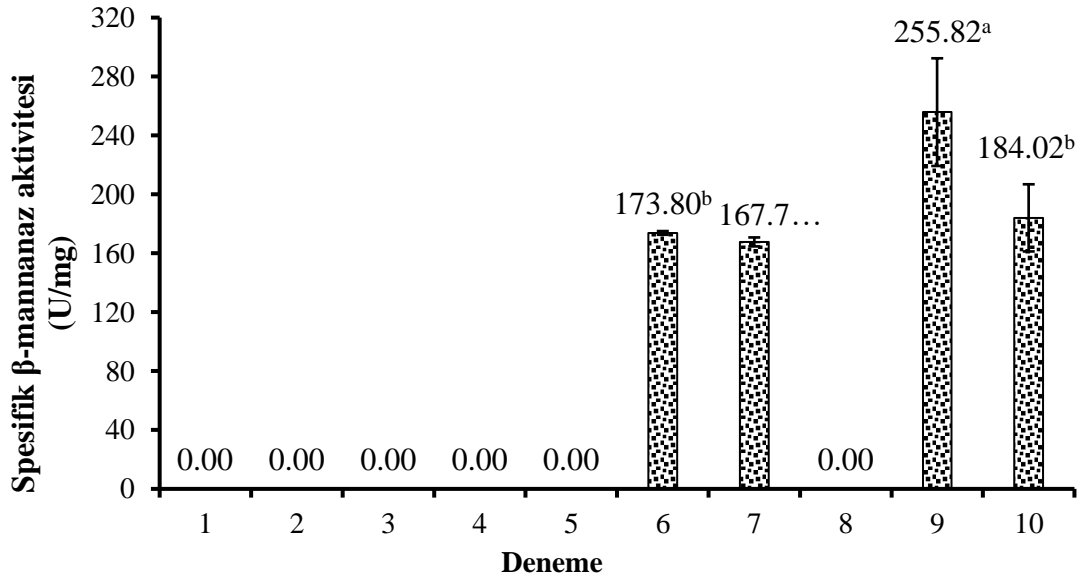
Bağımsız değişkenlerin çavdar kepeğinde  $\beta$ -mannanaz ve MOS üretimi üzerindeki etkisi PBD ile incelenmiştir (Çizelge 4.2). Ayrıca KFF sırasında MOS üretimini artırmak için çavdar kepeğine kahve atığı ilave edilmiştir.

Çizelge 4.2. Plackett-Burman Dizayn ve spesifik  $\beta$ -mannanaz aktivitesi sonuçları

| Deneme | İnokülasyon oranı (%) | İnkübasyon süresi (gün) | İnkübasyon sıcaklığı (°C) | pH | Spesifik $\beta$ -mannanaz aktivitesi (U/mg) | Protein miktarı (mg/mL) |
|--------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|----|--|-------------------------|
| 1      | 5                     | 6                       | 40                        | 5  | -  | 1.028                   |
| 2      | 7                     | 7                       | 50                        | 3  | -  | 1.097                   |
| 3      | 3                     | 5                       | 50                        | 7  | -  | 1.016                   |
| 4      | 3                     | 7                       | 50                        | 3  | -  | 0.941                   |
| 5      | 7                     | 5                       | 50                        | 7  | -  | 0.788                   |
| 6      | 3                     | 5                       | 30                        | 3  | 173.80 <sup>b</sup> ±1.25                    | 0.773                   |
| 7      | 3                     | 7                       | 30                        | 7  | 167.70 <sup>b</sup> ±3.05                    | 1.219                   |
| 8      | 5                     | 6                       | 40                        | 5  | -  | 0.805                   |
| 9      | 7                     | 7                       | 30                        | 7  | 255.82 <sup>a</sup> ±36.55                   | 1.227                   |
| 10     | 7                     | 5                       | 30                        | 3  | 184.02 <sup>b</sup> ±22.80                   | 0.912                   |

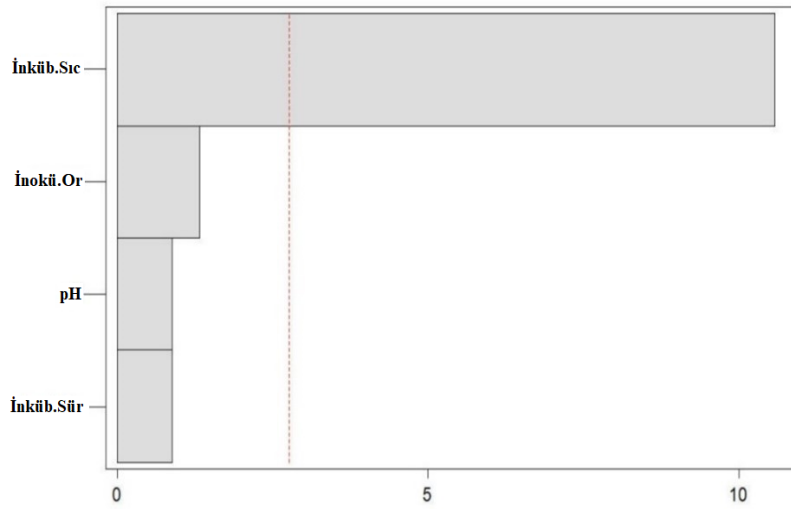
\*Aynı sütundaki farklı harfler ortalama değerler arasındaki istatistiksel önemi gösterir ( $P<0.05$ ).

Sonuçlar incelendiğinde, en yüksek (255.82 U/mg) ve en düşük (167.70 U/mg)  $\beta$ -mannanaz aktivitelerinin (Şekil 4.2) sırasıyla 9 ve 7 numaralı deneme desenlerinden elde edildiği gösterilmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.2. PBD ile belirlenen koşullar sonucunda elde edilen  $\beta$ -mannanaz aktivite değerleri ( $P<0.05$ )

Pareto grafiği parametrelerin ortam üzerindeki etkilerinin önemini göstermek için kullanılmaktadır. Grafik üzerindeki referans çizgisini geçen çubukların istatistiksel olarak önem taşıdığı nitelendirilmektedir. Bununla birlikte, kahve atıklarının fermentasyon ortamına eklenmesinin  $\beta$ -mannanaz üretimini baskıladığı Pareto grafiğinde gösterilmektedir (Şekil 4.3). Ayrıca Şekil 4.3’de inkübasyon sıcaklığının referans çizgisini geçtiği görülmektedir. Bu durumda inkübasyon sıcaklığı mevcut olan model koşullarında 0.05 önem seviyesinde istatistiksel olarak anlamlıdır. Sonuç olarak, inkübasyon sıcaklığının fermentasyon ortamını etkilediği ancak diğer parametrelerin etkisiz kaldığı değerlendirilmiştir.



**Şekil 4.3.** PBD'de  $\beta$ -mannanaz üretimi üzerine uygulanan parametrelerin etkisini gösteren Pareto grafiği,  $\alpha=0.05$

Çizelge 4.3'te  $\beta$ -mannanaz için bağımsız değişkenlerin tahmini etkileri ve katsayıları verilmiş olup incelendiğinde P (Olasılık) değerlerinin sadece inkübasyon sıcaklığı için 0.05'ten küçük olduğu yani istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görülmektedir.

**Çizelge 4.3.**  $\beta$ -Mannanaz için bağımsız değişkenlerin tahmini etkileri ve katsayıları

| Terim                | Etki    | Katsayı | SH katsayı | T      | P    |
|----------------------|---------|---------|------------|--------|------|
| Sabit                |         | 97.67   | 9.23       | 10.58  | 0.00 |
| İnokülasyon oranı    | 24.58   | 12.29   | 9.23       | 1.33   | 0.25 |
| İnkübasyon süresi    | 16.43   | 8.21    | 9.23       | 0.89   | 0.42 |
| İnkübasyon sıcaklığı | -195.34 | -97.67  | 9.23       | -10.58 | 0.00 |
| pH                   | 16.43   | 8.21    | 9.23       | 0.89   | 0.42 |



Çizelge 4.4'te  $\beta$ -mannanaz enzimi üretim sonuçlarının regresyon katsayıları ve varyans analizi verilmiştir. Varyans analizi sonuçları incelendiğinde model istatistiksel olarak önemlidir ( $P < 0.05$ ).

**Çizelge 4.4.** PBD ile belirlenen model denklemindeki  $\beta$ -mannanaz üretim oranının varyans analizi

| Terim          | SD | Düz. KT | Düz. KO | F     | P     |
|----------------|----|---------|---------|-------|-------|
| Ana etki       | 4  | 78600   | 19649.9 | 28.84 | 0.003 |
| Artık hata     | 4  | 2726    | 681.4   |       |       |
| Uyum eksikliği | 3  | 2726    | 908.5   |       |       |
| Saf hata       | 1  | 0       | 0       |       |       |
| Toplam hata    | 9  |         |         |       |       |

Plackett-Burman Dizayn ile bağımsız değişkenlerin fermentasyon ortamına etkisinin incelenmesi için 10 farklı fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Bu fermentasyonlarda 1 ve 8 numaralı denemeler Plackett-Burman tarafından verilen orta noktalardır. 110 fermentasyon sonunda 6, 7, 9 ve 10 numaralı denemelere ait olan fermentasyonlardan enzim aktivitesi alınmıştır. Diğer fermentasyon denemelerinde enzim aktivitesi elde edilememiştir. En yüksek aktivite değeri ise 9 numaralı fermentasyon denemesinde 255.82 U/mg olarak bulunmuştur.

### 4.3. Bağımsız Değişkenlerin $\beta$ -mannanaz Üretimi Üzerine Etkisi

Farklı sıcaklık değerlerinin (30, 40 ve 50°C)  $\beta$ -mannanaz üretimi üzerine etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlara göre sıcaklık değişiminin  $\beta$ -mannanaz üretimi üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2) (Şekil 4.2). Şöyle ki, 40 ve 50°C sıcaklıklarında gerçekleştirilen fermentasyonlarda enzim üretimi tespit edilememiştir. Bu nedenle Çizelge 4.2'deki PBD sonuçları incelendiğinde fermentasyonlar üzerinde sadece sıcaklığın etkili olduğu diğer bağımsız değişkenlerin etki etmediği görülmüştür.

Regalado vd. (2000), KFF'de *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus niger* kullanarak hindistan cevizi ezmesinden ve kahve atıklarından  $\beta$ -mannanaz üretimini incelemiştir. Çalışmalarında iki mikroorganizma, iki substrat ve iki fermentasyon süresi arasındaki etkileşimi belirlemek için 23 faktörlü bir dizayn kullanılmıştır. 764 U/mg'lık en yüksek enzim aktivitesinin *A. niger* tarafından 2.5 gün boyunca hindistan cevizi ezmesinden elde edildiği bildirilmiştir.

Yin vd. (2013), elma küspesinden en iyi şekilde yararlanmak için pamuk tohumu tozu ile birlikte *Aspergillus niger* SN-09 kullanılarak KFF'de  $\beta$ -mannanaz üretmiştir.  $\beta$ -Mannanaz üretimini en üst düzeye çıkarmak için PBD ve CCD (Central Composite Design) kullanılmıştır. %45.7'lik bir artış ile 561.3 U/mg'lık en yüksek enzim aktivitesi, başlangıç nem içeriği %59.2 (w/w) olan, bazı iyonik bileşikler ve mineral tuzları içeren, elma küspesi ve pamuk tohumu tozu (3:2, w/w) karışımı ile 30°C'de 48 saat boyunca KFF'de gerçekleştirildiği zaman elde edilmiştir.

Heck ve arkadaşları (2005), en iyi büyüme süresini, sıcaklığını ve havalandırma koşullarını belirlemek için 23 faktörlü CCD kullanmıştır. Amazon ortamından izole edilen *Bacillus circulans* B153 suşu, ksilanaz ve  $\beta$ -mannanaz üretiminde kullanılmıştır.  $\beta$ -Mannanaz sonuçları incelendiğinde, üretimin yüksek havalandırma hızı ve düşük sıcaklıkta arttığı görülmüştür. CCD'ye göre deneysel olarak elde edilen enzim aktivite sonuçlarının kullanılan önceki koşullara göre 3.7 kat arttığı belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre en yüksek  $\beta$ -mannanaz aktivitesi 0.540 U/mg olarak bulunmuştur. Enzim üretiminin optimize edilmesinin, endüstriyel olarak önemli mikroorganizmaların katı faz yetiştiriciliğinde konsantre enzim özütleri elde etmek için faydalı olduğunu göstermektedir.

Abdeshahian vd. (2009), katı faz fermentasyon yöntemi ile  $\beta$ -mannanaz üretiminde havalandırılmalı kolon biyoreaktörü kullanmıştır. Fermentasyonda substrat olarak hurma çekirdeği keki kullanılmıştır. İnkübasyon sıcaklığının, başlangıç nem içeriğinin ve hava akış hızının  $\beta$ -mannanaz üretimi üzerindeki etkisi yanıt yüzey yöntemi ile değerlendirilmiştir. *Aspergillus niger* FTCC 5003 suşu kullanılarak havalandırılmalı kolon reaktöründe 18 çalışma gerçekleştirilmiştir. En yüksek  $\beta$ -mannanaz aktivitesi (2117.89 U/mg), 32.5°C inkübasyon sıcaklığı, %60 başlangıç nem içeriği ve 0.5 L/dak havalandırma oranı koşullarında elde edilmiştir. İstatistiksel analiz inkübasyon sıcaklığının ve başlangıç nem içeriğinin  $\beta$ -mannanaz üretiminde etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kısacası, fermentasyon parametreleri istatistiksel bir tasarım ile optimize edildiğinde üretim verimliliği önemli ölçüde artmıştır.

#### 4.4. Bağımsız Değişkenlerin Mannooligosakkarit (MOS) Üretimi Üzerine Etkisi

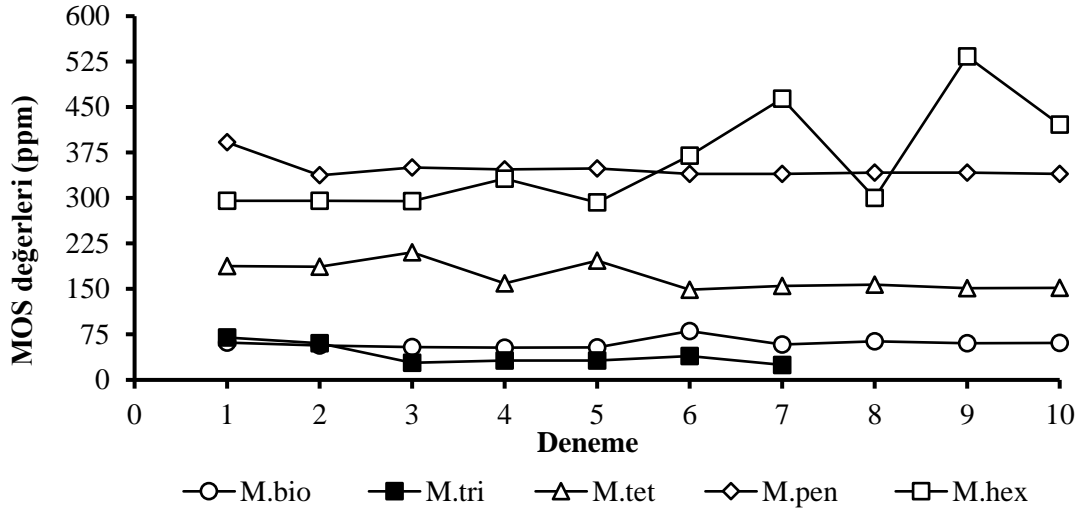
Çalışma kapsamında kahve ilaveli ve kahve ilavesiz fermentasyonlar gerçekleştirilmiş ve sonuçlar incelendiğinde fermentasyon ortamına eklenen kahve atığının, enzim üretimini inhibe ettiği fakat MOS üretimini artırdığı belirlenmiştir. Kahve ilavesiz enzim fermentasyonlarından elde edilen MOS profili ve toplam MOS değerlerine Çizelge 4.5'de yer verilmiştir. PBD tarafından önerilen koşullarda gerçekleştirilen enzim fermentasyonlarından elde edilen MOS profili Şekil 4.4'te verilmiştir. Ayrıca MOS profili ve toplam MOS değerleri ile ilgili sonuçlara ise Çizelge 4.6'te yer verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Kahve ilavesiz fermentasyonda elde edilen MOS profili ve toplam MOS değerleri

| Deneme | Toplam MOS (ppm)             | M.bio (ppm)                | M.tri (ppm)               | M.tet (ppm)                 | M.pen (ppm) | M.hex (ppm) |
|--------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|
| 1      | 510.72 <sup>a</sup> ±150.70  | 40.55 <sup>ab</sup> ±28.67 | 57.19 <sup>a</sup> ±1.57  | 412.99 <sup>a</sup> ±123.59 | -           | -           |
| 2      | 324.76 <sup>cb</sup> ±16.55  | 38.51 <sup>ab</sup> ±27.23 | 55.78 <sup>a</sup> ±4.22  | 230.47 <sup>b</sup> ±6.46   | -           | -           |
| 3      | 282.15 <sup>cb</sup> ±50.18  | 39.71 <sup>ab</sup> ±28.08 | 24.57 <sup>b</sup> ±17.37 | 217.88 <sup>b</sup> ±4.72   | -           | -           |
| 4      | 232.40 <sup>cab</sup> ±57.62 | 76.42 <sup>a</sup> ±2.67   | 58.54 <sup>a</sup> ±8.61  | 97.45 <sup>dc</sup> ±68.90  | -           | -           |
| 5      | 338.21 <sup>ab</sup> ±4.75   | 71.48 <sup>a</sup> ±0.49   | 52.81 <sup>a</sup> ±1.49  | 213.92 <sup>b</sup> ±2.77   | -           | -           |
| 6      | -                            | -                          | -                         | -                           | -           | -           |
| 7      | -                            | -                          | -                         | -                           | -           | -           |
| 8      | 301.29 <sup>ab</sup> ±3.67   | 69.91 <sup>a</sup> ±0.56   | 42.51 <sup>ab</sup> ±0.07 | 188.87 <sup>bc</sup> ±4.30  | -           | -           |
| 9      | -                            | -                          | -                         | -                           | -           | -           |
| 10     | -                            | -                          | -                         | -                           | -           | -           |

\*MOS Mannooligosakkarit; M.bio Mannobioz; M.tri Mannotrioz; M.tet Mannotetroz; M.pen Mannopentoz; M.hex Mannoheksöz. Aynı sütundaki farklı harfler ortalama değerler arasındaki istatistiksel önemi gösterir ( $P<0.05$ ).

Çizelge 4.5’deki MOS profilleri ve toplam MOS değerleri incelendiğinde hiçbir denemede mannopentoz, mannoheksoz ve toplam MOS verilerine ulaşamamıştır. Diğer MOS profilleri ve toplam MOS değerleri incelendiğinde ise en yüksek verilerin; mannobioz için 76.42 ppm (4. deneme), mannotrioz için 58.54 ppm (4. deneme), mannotetroz için 412.99 ppm (1. deneme) ve toplam MOS için 510.72 ppm (1. deneme) olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. PBD'den elde edilen MOS değerleri (M.bio, mannobioz; M.tri, mannotrioz; M.tet, mannotetroz; M.pen, mannopentoz; M.hex, mannoheksoz)

Çizelge 4.6. Fermentasyonda MOS profili ve toplam MOS değerleri

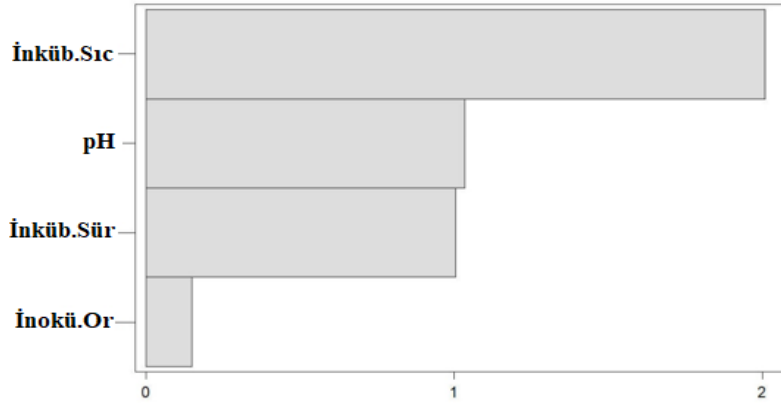
| Deneme | Toplam MOS (ppm)             | M.bio (ppm)              | M.tri (ppm)                | M.tet (ppm)                  | M.pen (ppm)                 | M.hex (ppm)                 |
|--------|------------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1      | 1006.27 <sup>ba</sup> ±42.80 | 61.48 <sup>b</sup> ±1.11 | 69.94 <sup>a</sup> ±3.87   | 187.49 <sup>bac</sup> ±3.98  | 391.87 <sup>a</sup> ±4.10   | 295.50 <sup>d</sup> ±21.20  |
| 2      | 936.78 <sup>bc</sup> ±21.63  | 56.54 <sup>b</sup> ±1.20 | 60.53 <sup>ba</sup> ±17.16 | 186.68 <sup>bac</sup> ±23.45 | 337.43 <sup>c</sup> ±3.28   | 295.60 <sup>d</sup> ±10.16  |
| 3      | 938.29 <sup>bc</sup> ±1.24   | 54.22 <sup>b</sup> ±0.41 | 28.41 <sup>c</sup> ±2.20   | 210.37 <sup>a</sup> ±9.13    | 350.23 <sup>b</sup> ±2.50   | 295.08 <sup>d</sup> ±6.08   |
| 4      | 923.45 <sup>bc</sup> ±6.46   | 53.27 <sup>b</sup> ±0.56 | 31.95 <sup>c</sup> ±0.39   | 159.08 <sup>bc</sup> ±10.27  | 347.27 <sup>cbd</sup> ±1.62 | 331.88 <sup>d</sup> ±2.74   |
| 5      | 923.65 <sup>bc</sup> ±8.66   | 53.47 <sup>b</sup> ±0.21 | 32.14 <sup>c</sup> ±0.92   | 196.79 <sup>ba</sup> ±3.88   | 348.60 <sup>cb</sup> ±0.97  | 292.66 <sup>d</sup> ±4.23   |
| 6      | 978.49 <sup>bac</sup> ±0.31  | 80.59 <sup>a</sup> ±7.61 | 39.23 <sup>bc</sup> ±0.59  | 148.83 <sup>c</sup> ±0.45    | 339.80 <sup>cd</sup> ±1.04  | 370.04 <sup>dc</sup> ±3.93  |
| 7      | 1041.59 <sup>ba</sup> ±41.51 | 58.26 <sup>b</sup> ±1.08 | 24.81 <sup>c</sup> ±0.02   | 154.77 <sup>bc</sup> ±0.20   | 339.66 <sup>ed</sup> ±0.65  | 464.09 <sup>ba</sup> ±22.09 |
| 8      | 862.83 <sup>c</sup> ±46.65   | 63.48 <sup>b</sup> ±4.50 | -                          | 157.33 <sup>bc</sup> ±0.32   | 342.03 <sup>ced</sup> ±1.04 | 300.00 <sup>d</sup> ±24.69  |
| 9      | 1086.45 <sup>a</sup> ±5.92   | 60.25 <sup>b</sup> ±2.58 | -                          | 151.10 <sup>c</sup> ±0.32    | 341.70 <sup>ced</sup> ±0.33 | 533.40 <sup>a</sup> ±42.33  |
| 10     | 973.75 <sup>bac</sup> ±8.91  | 61.05 <sup>b</sup> ±1.35 | -                          | 151.84 <sup>c</sup> ±1.39    | 339.76 <sup>ed</sup> ±1.10  | 421.11 <sup>bc</sup> ±4.30  |

\*MOS Mannooligosakkarit; M.bio Mannobioz; M.tri Mannotrioz; M.tet Mannotetroz; M.pen Mannopentoz; M.hex Mannoheksoz. Aynı sütundaki farklı harfler ortalama değerler arasındaki istatistiksel önemi gösterir ( $P < 0.05$ ).

Şekil 4.4 ve Çizelge 4.6’teki MOS profilleri ve toplam MOS verileri değerlendirildiğinde, en yüksek mannobioz değeri 6. denemede 80.59 ppm, mannotrioz değeri 1. denemede 69.94 ppm, mannotetroz değeri 3. denemede 210.37 ppm, mannopentoz değeri 1. denemede 391.87 ppm, mannoheksoz değeri 9. denemede 533.40 ppm ve en yüksek toplam MOS değeri ise 9. denemede 1086.45 ppm olarak bulunmuştur.

Aynı şekilde MOS profilleri ve toplam MOS değerleri en düşük verilere göre değerlendirildiğinde, mannobioz değeri 4. denemede 53.27 ppm, mannotrioz değeri 8., 9. ve 10. denemelerde ölçülemedi, mannotetroz değeri 6. denemede 148.83 ppm, mannopentoz değeri 2. denemede 337.43 ppm, mannoheksoz değeri 5. Denemede 292.66 ppm ve en düşük toplam MOS değeri ise 8. denemede 862.83 ppm olarak hesaplanmıştır. Ayrıca sonuçlar MOS üretimlerinin tüm denemelerde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan bağımsız değişkenlerin KFF işleminde kahve atığı ile takviye edilmiş çavdar kepeği bazlı ortamdan MOS üretimini artırdığı bulunmuştur. Bu nedenle, fermentasyon sırasında üretilen enzimin MOS üretimi için kullanıldığı da ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.6).

Parametrelerin fermentasyon ortamı üzerindeki etkilerinin önemini göstermek için pareto grafiği kullanılır. PBD’de toplam MOS üretiminde uygulanan parametrelerin etkisini gösteren pareto grafiği Şekil 4.5’de gösterilmektedir. Bu durumda uygulanan parametrelerin mevcut olan model koşullarında 0.05 önem seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir. Sonuç olarak, tüm parametrelerin fermentasyon ortamında etkisiz kaldığı söylenebilmektedir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** PBD'de MOS üretimine uygulanan parametrelerin etkisini gösteren Pareto grafiği,  $\alpha=0.05$  (İnküb.Sıc (İnkübasyon Sıcaklığı), İnokü.Or (İnokülasyon Oranı), İnküb.Sür (İnkübasyon Süresi))

Çizelge 4.7’de MOS için bağımsız değişkenlerin tahmini etkileri ve katsayıları verilmiş olup incelendiğinde P değerlerinin tüm parametrelerde 0.05’ten büyük olduğu yani istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

**Çizelge 4.7.** MOS için bağımsız değişkenlerin tahmini etkileri ve katsayıları

| Terim                | Etki   | Katsayı | SH katsayı | T     | P    |
|----------------------|--------|---------|------------|-------|------|
| Sabit                |        | 961.78  | 22.42      | 42.90 | 0.00 |
| İnokülasyon oranı    | 6.37   | 3.18    | 21.46      | 0.15  | 0.89 |
| İnkübasyon süresi    | 51.97  | 25.99   | 25.88      | 1.00  | 0.37 |
| İnkübasyon sıcaklığı | -86.19 | -43.10  | 21.46      | -2.01 | 0.12 |
| pH                   | 44.38  | 22.19   | 21.46      | 1.03  | 0.36 |

Çizelge 4.8’de MOS üretim sonuçlarının regresyon katsayıları ve varyans analizi verilmiştir. Uyum eksikliği değeri  $P>0.05$  bulunmuş olup, modellerin deneysel verilerle oldukça uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.8.** PBD ile belirlenen model denklemindeki MOS üretim oranının varyans analizi

| Terim          | SD | Düz. KT | Düz. KO | F    | P     |
|----------------|----|---------|---------|------|-------|
| Ana etki       | 4  | 22592.4 | 5648.1  | 1.53 | 0.345 |
| Artık hata     | 4  | 14740.6 | 3685.2  |      |       |
| Uyum eksikliği | 3  | 3475.3  | 1158.4  | 0.10 | 0.947 |
| Saf hata       | 1  | 11265.3 | 11265.3 |      |       |
| Toplam hata    | 9  |         |         |      |       |

Erkan vd. (2020), biyoreaktörde keçiyoynuzu ekstraktı ile gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda üretilen rekombinant  $\beta$ -mannanaz enziminin, kahve ekstraktından (%20 v/v) MOS üretimini incelemiştir. MOS üretim koşulları enzim miktarı (5-10 mL), uygulama sıcaklığı (40-60°C) ve uygulama süresi (30-90 dakika) gibi bağımsız değişkenler kullanılarak Box-Behnken Yanıt Yüzey Metodu (RSM) ile optimize edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, optimum koşullar 7.5 mL enzim miktarı, 40°C uygulama sıcaklığı, 90 dakika uygulama süresi olarak belirlenmiştir. En yüksek toplam MOS konsantrasyonu 3970.97 ppm olarak bulunmuştur. Ayrıca, tüm koşullarda mannotrioz (M3) ve mannoheksoz (M6) profillerinin baskın MOS’lar olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde kahve ekstraktının MOS üretimi için potansiyel bir kaynak olduğu belirlenmiştir.

Liu vd. (2020), *Aspergillus kawachii*  $\beta$ -mannanazın MOS üretim potansiyelini değerlendirmek için %10 substrat konsantrasyonunda keçiyoynuzu gamı (LBG), guar gam (GG) ve konjak gamdan (KG) MOS üretmiştir. LBG, GG ve KG’nin yüksek substrat seviyelerinde (%10) düşük molekül ağırlıklı MOS’lara (<2000 Da) hidrolize edilebileceği belirtilmiştir. Öte yandan, sinameki gamından MOS üretmek için bir *Rhizopus microsporus*  $\beta$ -mannanaz kullanılmıştır. Sinameki gamı MOS veriminin %70.6’sı ile hidrolize edilmiştir. Sonuçlara göre, MOS içeren hidrolizat sırasıyla mannoz, mannobioz, galaktoz, mannotrioz, mannotetroz, 61- $\alpha$ -D-galaktozil- $\beta$ -D-mannobioz ve mannopentoz olarak tanımlanan yedi bileşeni içermektedir. Fermentasyon incelendiğinde, üretilen MOS’ların *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* suşlarının büyümesini 3 kat artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, suşların polimerizasyon derecesi (DP) 4-5 olan MOS’lardan ziyade DP 2-3 olan MOS’ları tercih ettiği belirlenmiştir. Sinameki gamından üretilen MOS’ların umut verici bir prebiyotik aktivite gösterdiği ortaya çıkmıştır (Li vd. 2020).

Bununla birlikte Jana ve Kango (2020), LBG, GG, KG, hurma çekirdeği keki (PKC) ve mısır unu (CM) dahil olmak üzere tarımsal atık mannanlardan MOS üretmiştir. Sonuçlara göre toplam MOS, mannoz, mannobioz ve mannotrioz seviyeleri sırasıyla LBG'den 1.90, 0.35, 0.67 ve 0.88 mg/mL; GG'den 11.24, 0.97, 6.54 ve 3.73 mg/mL; KG'den 4.63, 1.18, 1.70 ve 1.75 mg/mL; PKC'den 2.05, 0.24, 1.14 ve 0.67 mg/mL; CM'den 7.14, 0.69, 4.77 ve 1.68 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, 4.82 mg/mL mannotetrozun da KG'den elde edildiği ve GG'den daha yüksek miktarda MOS elde edildiği bildirilmiştir. Çalışmalar, mannan bakımından zengin tarımsal atıklardan üretilen MOS'ların prebiyotik potansiyelini ortaya koymuştur (Jana ve Kango 2020). Yapılan literatür taraması sonucunda, bu tez çalışmasındaki MOS sonuçları literatürdeki mevcut MOS sonuçları ile desteklenmektedir.

## 5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, uygun maliyetli üretim için KFF prosesinde *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906) tarafından  $\beta$ -mannanaz üretmek için substrat olarak arpa kavuzu, buğday kepeği, çavdar kepeği, yulaf kavuzu ve kahve atığı gibi yenilenebilir kaynaklar kullanılmıştır. Enzim üretimi açısından en iyi karbon kaynağını belirlemek için erlenmayerlerde fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. KFF fermentasyonları 30°C sıcaklıkta 7 gün boyunca %3, 5 ve 7 inokülasyon oranlarında başlangıç pH değeri 5.0 olarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlanan fermentasyonlar çalkalamalı inkübatörde 1 saat boyunca ekstrakte edilmiş ardından süzülerek 20 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Elde edilen fermentasyon sıvısından  $\beta$ -mannanaz aktivitesi, protein miktarı ve MOS analizleri yapılmıştır.

Sonuçlar incelendiğinde, farklı karbon kaynakları kullanılarak gerçekleştirilen erlenmayer denemelerinde karbon kaynaklarının  $\beta$ -mannanaz enzim aktivite değerleri üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). *A. sojae*'nin spor çözültisinin %7'lik inokülasyon oranı ile birlikte karbon kaynağı olarak kullanılan çavdar kepeğinin 983.53 U/mg'lık en yüksek enzim aktivitesini verdiği belirlenmiştir. Daha sonraki tüm fermentasyonlar en iyi aktiviteyi veren çavdar kepeği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında bağımsız değişkenlerin etkisini görmek için PBD yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, 4 farklı parametre (inkübasyon süresi, inokülasyon oranı, inkübasyon sıcaklığı ve pH) değerlendirilmiş ve 10 farklı fermentasyon denemesi gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen denemeler sonucunda en iyi fermentasyon koşulları inokülasyon oranı %7, inkübasyon süresi 7 gün, inkübasyon sıcaklığı 30°C ve başlangıç pH 7.0 olarak belirlenmiştir. PBD sonuçlarına göre KFF süresince inkübasyon sıcaklığının  $\beta$ -mannanaz üretimini etkilediği gözlenmiştir.

Kahve atığının enzim ve MOS üretimi üzerindeki etkisini görmek için kahve ilavesiz ve kahve ilaveli PBD tarafından önerilen fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Yapılan fermentasyonlar sonucunda, kahve ilavesi olmadan gerçekleştirilen fermentasyonlarda MOS analizleri yapılmış ve en yüksek toplam MOS konsantrasyonunun 1 numaralı deneme deseninden (510.72 ppm) elde edildiği tespit edilmiştir. Kahve ilavesi ile PBD tarafından önerilen fermentasyonlarda ise en yüksek enzim aktivitesinin (255.82 U/mg) ve toplam MOS konsantrasyonunun (1086.45 ppm) %7 inokülasyon oranı, 30°C sıcaklık, 7 günlük inkübasyon süresi ve başlangıç pH'sının 7 olduğu 9 numaralı deneme deseninden elde edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca MOS profilleri incelendiğinde en yüksek üretimin kahve ilavesiz fermentasyonlarda mannbioz için 76.42 ppm (4. deneme), mannotrioz için 58.54 ppm (4. deneme), mannotetroz için 412.99 ppm, mannopentoz ve mannoheksoz için üretimin olmadığı; kahve ilaveli PBD tarafından önerilen fermentasyonlarda ise mannbioz için 80.59 ppm (6. deneme), mannotrioz için 69.94 ppm (1. deneme), mannotetroz için 210.37 ppm (3. deneme), mannopentoz için 391.87 ppm (1. deneme) ve mannoheksoz için 533.40 ppm (9. deneme) olduğu belirlenmiştir.

Kahve ilaveli ve kahve ilavesiz KFF prosesleri incelendiğinde, kahve ilavesiz fermentasyonlarda enzim üretiminin olduğu fakat MOS üretiminin gözlenmediği, kahve ilaveli fermentasyonlarda ise enzim üretiminin olmadığı ancak MOS üretiminin arttığı belirlenmiştir. Bu sebeple ortama eklenen kahve atıklarının enzim üretimini inhibe ettiği fakat aynı zamanda yüksek sıcaklıklarda üretilen enzimin MOS üretimini teşvik ettiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak çavdar kepeğinin, KFF sürecinde *Aspergillus sojae* AsT3 tarafından  $\beta$ -mannanaz üretimi için düşük maliyetli yenilenebilir bir kaynak olarak kullanılabilmesi ve çavdar kepeğine ilave olarak mannan bakımından zengin kahve posasının da MOS üretimi için potansiyel bir kaynak olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir.



## 6. KAYNAKLAR

- Abdeshanian, P., Samat, N., Hamid, A.A. and Yusoff, W.M.W. (2009). Utilization of palm kernel cake for production of  $\beta$ -mannanase by *Aspergillus niger* FTCC 5003 in solid state fermentation using an aerated column bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37:103–109.
- Adenmark, P., Varga, A., Medve, J., Harjunpaa, V., Drakenberg, T., Terneld, F. and Stalbrand, H. (1998). Softwood hemicelluloses-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a  $\beta$ -mannanase. *Journal of Biotechnology*, 63:199–210.
- Akino, T., Kato, C. and Horikoshi, K. (1989). The cloned  $\beta$ -mannanase gene from alkalophilic *Bacillus* sp. AM-001 produces two  $\beta$  mannanases in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*. 152: 10–15.
- Anonim, 2020a. <https://en.wikipedia.org/wiki/Bran>. (Erişim tarihi 10.12.2020)
- Anonim, 2020b. <https://en.wikipedia.org/wiki/Barley>. (Erişim tarihi 11.12.2020)
- Anonim, 2020c. <https://en.wikipedia.org/wiki/Rye>. (Erişim tarihi 12.12.2020)
- Anonim, 2020d. <https://en.wikipedia.org/wiki/Oat>. (Erişim tarihi 12.12.2020)
- Arcand, N., Kluepfel, D., Paradis, F.W., Morosoli, R. and Sharek, F. (1993).  $\beta$ -Mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequencing of the manA gene and characterization of the enzyme. *Journal of Biochemistry*. 290: 857–863.
- Asano, I., Nakamura, Y., Hoshino, H., Aoki, K., Fujii, S. and Imura, N., (2001). Use of manooligosaccharides from coffee mannan by intestinal bacteria. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 75(10): 1077-1083.
- Aziz, S.A., Ong, L.G.A., Hassan, M.A. and Karim, M.I.A. (2008). Production parameters optimization of mannanase production from *Aspergillus niger* FTCC 5003 using palm kernel cake as carbon source. *Asian Journal of Biochemistry*, 3(5):297–307.
- Bettiol, J.P. and Showell, M.S. (2002). Detergent compositions comprising a mannanase and a protease. US Patent 6376445.
- Bledzki, A.K., Mamun, A.A. and Volk, J. (2010). Physical, chemical and surface properties of wheat husk, rye husk and soft wood and their polypropylene composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 41(4): 480-488.
- Blibech, M., Ghorbel, R.E., Fakhfakh, I., Ntarima, P., Piens, K., Bacha, A.B. and Chaabouni, S.E. (2010). Purification and characterization of a low molecular weight of  $\beta$ -mannanases from *Penicillium occitanis* Pol6. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160: 1227–1240.

- Bradford, M. 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brock, T.D. 1984. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*. Sinauer Associates, 308 pp.
- Caetano, N.S., Silva, V.F. and Mata, T.M. (2012). Valorization of coffee grounds for biodiesel production. *Italian Association of Chemical Engineering*, 26.
- Campos-Vega, R., Loarca-Pina, G., Vergara-Castaneda, H. A. and Oomah, B. D. (2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1): 24-36.
- Chauhan, P.S., Puri, N., Sharma, P. and Gupta, N. (2012). Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93: 1817-1830.
- Chen, Y., Long, J., Liao, L., Zhang, Y. and Yang, J. (2000). Study on the production of beta-mannanase by *Bacillus* M50. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 40(1), 62-68.
- Chen B.K. and Diosady L.L. (2003). Enzymatic aqueous processing of coconuts. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 1: 55–61.
- Chen, X., Cao, Y., Ding, Y., Lu, W. and Li, D. (2007). Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* beta-mannanase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 128(3): 452–461.
- Christgau, S., Kauppinen, S., Vind, J., Kofod, L. V. and Dalboge, H. (1994). Expression, cloning, purification and characterization of a beta-1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus*. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 33: 917–925
- Civas, A., Eberhard, R., le Dizet, P., and Petek, F. (1984). Glycosidases induced in *Aspergillus tamaris* secreted  $\alpha$ -D-galactosidase and  $\beta$ -D-mannanase. *Biochemical Journal*. 219: 857–863.
- Clarke, J.H., Davidson, K., Rixon, J.E., Halstead, J.R., Fransen, M.P. and Gilbert, H.J. (2000). A comparison of enzyme aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and alpha-galactosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 661–667.
- Comfort, D.A., Swapnil, R., Chhabra, S.R., Connors, S.B., Chou, C.J. and Epting, K.L. (2004). Strategic biocatalysis with hyperthermophilic enzymes. *Green Chemistry*, 6: 459–465.
- Damodaran, S., Parkin, K.L. and Fennema, O.R. (Eds.) (2007). *Fennema's Food Chemistry*. CRC press.

- Dawood, A. and Ma, K. (2020). Applications of Microbial  $\beta$ -Mannanases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8: 598-630.
- Demirel, F. (2017). Lignoselülozik içeriğe sahip farklı tarımsal kaynaklardan etanol üretimi. Yüksek Lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- Dhawan, S. and Kaur, J. (2007). Microbial mannanases: An overview of production and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27:197-216.
- Duruksu, G., Öztürk, B., Biely, P., Bakir, U. and Ogel, Z. B. (2009). Cloning, expression and characterization of endo- $\beta$ -1,4-mannanase from *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus sojae* and *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, 25(1): 271–276.
- Eneyskaya, E.V., Sundqvist, G., Golubev, A.M., Ibatullin, F.M., Ivanen, D.R., Shabalin, K.A., Brumer, H. and Kulminskaya, A.A. (2009). Transglycosylating and hydrolytic activities of the  $\beta$ -mannosidase from *Trichoderma reesei*. *Biochimie*, 91: 632–638.
- Erkan, S.B., Basmak, S., Ozcan, A., Yilmazer, C., Gürler, H.N., Yavuz, G., Germec, M., Yatmaz, E. and Turhan, I. (2020). Mannooligosaccharide production by  $\beta$ -mannanase enzyme application from coffee extract. *Journal of Food Processing and Preservation*, e14668.
- Fanutti, C., Ponyi, T., Black, G.W., Hazlewood, G.P. and Gilbert, H.J. (1995). The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *Journal of Biological Chemistry*. 270(49): 29314–29322.
- FAOSTAT, (2020) <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. (Erişim tarihi 10.12.2020)
- Fiol, N., Escudero, C. and Villaescusa, I. (2008). Reuse of exhausted ground coffee waste for Cr (VI) sorption. *Separation Science and Technology*, 43(3): 582-596.
- Franco, P.F., Ferreira, H.M. and Filho, E.X. (2004). Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* strain T4. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40: 255–259.
- Fu, Y., Jeong, S.H., Kim, J., Callihan, J.A., Park, K. and Pai, C.M. (2006). Mannosebased fast dissolving tablets. Patent US20060134195A1.
- Fukami, H. (2010). Functional foods and biotechnology in Japan. *Biotechnology in Functional Foods and Nutraceuticals*, 29-50.
- Germec, M., Demirel, F., Tas, N., Ozcan, A., Yilmazer, C., Onuk, Z. and Turhan, I. (2017). Microwave-assisted dilute acid pretreatment of different agricultural bioresources for fermentable sugar production. *Cellulose*, 24(10): 4337-4353.

- Gibbs, M.D., Reeves, R.A., Sunna, A. and Bergquist, P.L. (1999). Sequencing and expression of a  $\beta$ -mannanase gene from the extreme thermophile *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, and characteristics of the recombinant enzyme. *Current Microbiology*, 39(6): 351–357.
- Gubitz, G.M., Lischig, T., Stebbing, D. and Saddler, J.N. (1997). Enzymatic removal of hemicellulose from dissolving pulps. *Biotechnology Letters*. 19: 491–495.
- Gurler, H.N., Yilmazer, C., Erkan, S.B., Ozcan, A., Yatmaz, E., Öziyici, H.R., Karhan, M. and Turhan, I. (2020). Applicability of recombinant *Aspergillus sojae* crude mannanase enzyme in carrot juice production. *Journal of Food Processing and Preservation*, e14603.
- Han, Y., Kye, C., Hong, S., Sun, L., Yong, K., Goon, K. and Hoon, K. (2006). A cel44C-man26A gene of endophytic *Paenibacillus polymyxa* GS01 has multi-glycosyl hydrolases in two catalytic domains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3): 618–630.
- Halstead, J.R., Vercoe, P.E., Gilbert, H.J., Davidson, K. and Hazlewood, G.P. (1999). A family 26 mannanase produced by *Clostridium thermocellum* as a component of the cellulosome contains a domain which is conserved in mannanases from anaerobic fungi. *Microbiology*. 145: 3101–3108.
- Hatada, Y., Takeda, N., Hirasawa, K., Ohta, Y., Usami, R., Yoshida, Y., Ito, S. and Horikoshi, K. (2005). Sequence of the gene for a high-alkaline mannanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750, its expression in *B. subtilis* and characterization of the recombinant enzyme. *Extremophiles*. 9: 497–500
- He, X., Liu, N., Zhang, Z., Zhang, B. and Ma, Y. (2008). Inducible and constitutive expression of a novel thermostable alkaline  $\beta$ -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 43: 13–18.
- Heck, J.X., de Barros Soares, L.H. and Ayub, M.A.Z. (2005). Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(4): 417-423.
- Hongpattarakere, T. (2002). Hyperthermostable cellulolytic and hemicellulolytic enzymes and their biotechnological applications. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 24: 481–491.
- Hoogschagen, M., Zhu, Y., van As, H., Tramper, J. and Rinzema, A. (2001). Influence of wheat type and pretreatment on fungal growth in solid-state fermentation, *Biotechnol Letters*, 23(14): 1183–1187.
- Huang, S.P., Wang, C.L., Zhang, G.M. and Ma, L.X. (2007). Construction of a double functional recombinant strain of *Pichia pastoris* co-expressing phytase and mannanase and the enzymatic analyses. *Acta Microbiologica Sinica*, 47(2): 280–284.

- Jana, U.K. and Kango, N. (2020). Characteristics and bioactive properties of mannoooligosaccharides derived from agro-waste mannans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149: 931-940.
- Kansoh, A.L. and Nagieb, Z.A. (2004). Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Antonie van Leeuwenhoek*. 85: 103–114.
- Kante, K., Nieto-Delgado, C., Rangel-Mendez, J. R. and Bandosz, T. J. (2012). Spent coffee-based activated carbon: specific surface features and their importance for H<sub>2</sub>S separation process. *Journal of Hazardous Materials*, 201: 141-147.
- Karaduman, Y. (1999). Kavuzsuz Arpa Potansiyeli. *Unlu Mamuller Teknolojisi*, 74: 21-26.
- Karahalil, E., Germec, M., Karaoglan, M., Yatmaz, E., Coban, H. B., Inan, M. and Turhan, I. (2019). Partial purification and characterization of a recombinant  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on carob extract. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1–17.
- Kauppinen, M.S., Schulein, M., Schnorr, K., Andersen, L. N. and Bjornvad, M.E. (2003). *Mannanases*. US Patent 6.566.114.
- Kataoka, N. and Tokiwa, Y. (1998). Isolation and characterization of an active mannanase-producing anaerobic bacterium, *C. tertium* KT5A from lotus soil. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 357–367.
- Kote, N.V., Patil, A.G.G. and Mulimani, V.H. (2009). Optimization of the production of thermostable endo- $\beta$ -1,4 mannanase from a newly isolated *Aspergillus niger* gr. and *Aspergillus flavus* gr. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152: 213–223.
- Köten, M., Ünsal, S. and Atlı, A. (2013). Evaluation of Barley as Human Food. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 1: (2).
- Kusakabe, I. and Takahashi, R. (1988). Enzymatic preparation of  $\beta$ -1,4-mannooligosaccharides and  $\beta$ -1,4-glucomannooligosaccharides. *Methods in Enzymology* 160: 518-523.
- Li, Y. N., Meng, K., Wangm Y. R. and Yao, B. (2006). A  $\beta$ -mannanase from *B. subtilis* B36: purification, properties sequencing, gene cloning and expression in *E. coli*. *Zeitschrift für Naturforschung (C)*. 61: 840–846.
- Li, Y.X., Liu, H J., Shi, Y.Q., Yan, Q.J., You, X. and Jiang, Z.Q. (2020). Preparation, characterization, and prebiotic activity of manno-oligosaccharides produced from cassia gum by a glycoside hydrolase family 134  $\beta$ -mannanase. *Food Chemistry*, 309: 125709.

- Liepman, A.H., Nairn, C.J., Willats, W.G.T., Sørensen, I., Roberts, A.W. and Keegstra, K. (2007). Functional genomic analysis supports conservation of function among cellulose synthase-like a gene family members and suggest diverse roles of mannans in plants. *Plant Physiology*, 143: 1881–1893.
- Lin, S.S., Dou, W.F., Xu, H., Li, H.Z., Xu, Z.H. and Ma, Y. (2007). Optimization of medium composition for the production of alkaline  $\beta$ -mannanase by alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 using response surface methodology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75(5): 1015–1022.
- Loow, Y.L., Wu, T.Y., Jahim, J.M., Mohammad, A.W. and Teoh, W.H. (2016a). Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. *Cellulose*, 23: 1491–1520.
- Liu, Z., Ning, C., Yuan, M., Yang, S., Wei, X., Xiao, M. and Mou, H. (2020). High-level expression of a thermophilic and acidophilic  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus kawachii* IFO 4308 with significant potential in mannooligosaccharide preparation. *Bioresource Technology*, 295: 122257.
- Ma, Y., Xue, Y., Dou, Y., Xu, Z., Tao, W. and Zhou, P. (2004). Characterization and gene cloning of a novel beta-mannanase from alkalophilic *Bacillus* sp. N16-5. *Extremophiles*, 8: 447–454.
- Mabrouk, M.E.M. and Ahwany, A.M.D.E.I. (2008). Production of  $\beta$ -mannanase by *Bacillus amyloliquefaciens* 10A1 cultured on potato peels. *African Journal of Biotechnology*, 7: 1123–1128.
- Marriott, P.E., Gomez, L.D. and McQueen-Mason, S.J. (2016). Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. *New Phytologist*, 209:1366–1381.
- Mendoza, N.S., Arai, M., Kawaguchi, T., Yoshida, T. and Joson, L.M. (1994). Isolation of mannan utilizing bacteria and culture conditions for mannanase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10: 51–54.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428.
- Mohamad, S.N., Ramanan, R.N., Mohamad, R. and Ariff A.B. (2011). Improved mannan degrading enzymes production by *Aspergillus niger* through medium optimization. *New Biotechnol*, 28: 146–152.
- Moreira, L.R.S. and Filho, E.X.F. (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79: 165-178.
- Mussatto, S. I. and Teixeira, J. A. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes.

- Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J., Roberto, I. C. and Teixeira, J. A. (2011). A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 83(2): 368-374.
- Mussini, F.J., Coto, C.A., Goodgame, S.D., Lu, C., Karimi, A.J., Lee, J.H. and Waldroup, P.W. (2011). Effect of  $\beta$ -mannanase on broiler performance and dry matter output using corn-soybean meal based diets. *International journal of Poultry science*, 10(10): 778-781.
- Nakajima, N. and Matsuura, Y. (1997). Purification and characterization of konjac glucomannan degrading enzyme from anaerobic human intestinal bacterium, *Clostridium butyricum-Clostridium beijerinckii* group. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 61: 1739–1742.
- Nicolas, P., Raetz, E., Reymond, S. and Sauvegeat, J.L. (1998). Hydrolysis of the galactomannans of coffee extract with immobilized  $\beta$ -mannanase. Patent US 5714183.
- nee’Nigam, P.S., Gupta, N. and Anthwal, A. (2009). Pre-treatment of agro-industrial residues. In *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation* (pp. 13-33). Springer, Dordrecht.
- Nunes, F.M. and Coimbra, M.A. (1998). Influence of polysaccharide composition in foam stability of espresso coffee. *Carbohydr. Polym*, 37: 283–285.
- Nunes, F.M., Reis, A., Domingues, M.R. and Coimbra M.A. (2006). Characterization of galactomannan derivatives in roasted coffee beverages. *J Agric Food Chem*, 54(9): 3428–3439.
- Öner, B.E., Akyol, Ç., Bozan, M., Ince, O., Aydin, S. and Ince, B. (2018). Bioaugmentation with *Clostridium thermocellum* to enhance the anaerobic biodegradation of lignocellulosic agricultural residues. *Bioresource technology*, 249: 620-625.
- Öztürk, B. (2008). Optimization of mannanase production from Recombinant *Aspergillus sojae* and analysis of galactomannan hydrolysis. Yüksek Lisans Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
- Öztürk, B., Cekmecelioglu, D. and Ogel, Z.B. (2010). Optimal conditions for enhanced  $\beta$ -mannanase production by recombinant *Aspergillus sojae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64: 135-139.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A. and Nigam, P.S.N. (2001). Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications Reference Book. *Asiatech Publishers, Inc.*
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3): 81-84.

- Parker, K.N., Chhabra, S.R., Lam, D., Callen, W., Duffaud, G.D., Snead, M.A., Short, J. M., Mathur, E.J. and Kelly, R. M. (2001). Galactomannanases Man2 and Man5 from *Thermotoga* species: growth physiology on galactomannans, gene sequence analysis, and biochemical properties of recombinant enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(3): 322–333
- Pason, P., Kyu, K.L. and Ratanakhanokchai, K. (2006). *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 2483–2490.
- Perret, S., Belaich, A., Fierobe, H.P., Belaich, J.P. and Tardif, C. (2004). Towards designer cellulosomes in *Clostridia*: mannanase enrichment of the cellulosomes produced by *Clostridium cellulolyticum*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 40: 255–259.
- Petkowicz, C.L.O., Reicher, F., Chanzy, H., Taravel, F.R. and Vuong, R. (2001). Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. *Carbohydrate Polymers*, 44: 107–112.
- Pienkos, P.T. and Zhang, M. (2009). Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose*, 16: 743–762.
- Preethu, D.C., Bhanu Prakash, B.N.U.H., Srinivasamurthy, C.A. and Vasanthi, B.G. (2007, September). Maturity indices as an index to evaluate the quality of compost of coffee waste blended with other organic wastes. In *Proceeding of international conference on sustainable solid waste management, Chennai, India, Citeseer* (pp. 270-275).
- Puchart, V., Vranska, M. and Svoboda, P. (2004). Purification and characterization of two forms of endobeta-1,4-mannanase from a thermotolerant fungus *Aspergillus fumigatus* IMI 385718 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochimica Et Biophysica Acta*, 167: 239–250.
- Rashid, S.A., Darah, I. and Omar, I.C. (2010). Utilization of palm kernel cake for the production of mannanase by an indigenous filamentous fungus, *Aspergillus niger* USM F4 under solid state fermentation. *International Microbiology*, 9: 1.
- Regalado, C., García-Almendárez, B.E., Venegas-Barrera, L.M., Téllez-Jurado, A., Rodríguez-Serrano, G., Huerta-Ochoa, S. and Whitaker, J.R. (2000). Production, partial purification and properties of  $\beta$ -mannanases obtained by solid substrate fermentation of spent soluble coffee wastes and copra paste using *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9): 1343-1350.
- Ravindran, R. and Jaiswal A.K. (2016). A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 199: 92–102.



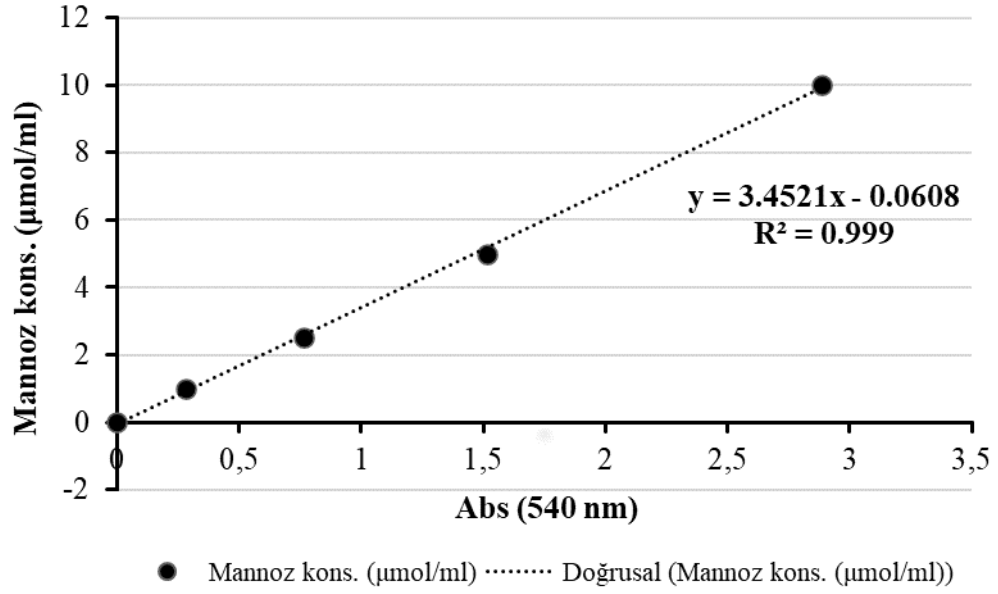
- Sachslehner, A., Foidl, G., Foidl, N., Gubitz, G. and Haltrich, D. (2000). Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*. *J. Biotechnol.* 80: 127–134.
- Saha, B. (2003). Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30: 279-91.
- Sarı, N. (2012). Yulafta (*Avena sativa L.*) verim ve verim komponentleri arasındaki ilişkiler. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 22 s.
- Serna-Saldivar, S.O. (2016). Cereal grains: properties, processing, and nutritional attributes, *CRC press*, pp 4–7.
- Setati, M.E., Ademark, P., Vanzyl, W.H., Hahn-Hagerdal, B. and Stalbrand H. (2001). Expression of the *Aspergillus aculeatus* endo- $\beta$ -1,4-mannanase encoding gene (*man1*) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expression and Purification.* 21: 105–114
- Shewry, P.R. (2009). Wheat. *Journal of experimental botany*, 60(6): 1537-1553.
- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S. and Srivastava, M. (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32: 713–728.
- Srivastava, P.K. and Kapoor, M. (2017). Production, properties, and applications of endo- $\beta$ -mannanases. *Biotechnology advances*, 35(1), 1-19.
- Sun, Y. and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic material from ethanol production: A review. *Bioresource Technology.* 83: 1–11.
- Sundu, B., Kumar, A. and Dingle, J., (2006). Response of broiler chicks fed increasing levels of copra meal and enzymes. *International Journal of Poultry Science*, 5: 13-18.
- Suurnäkki, A., Clark, T., Allison, R., Buchert, J. and Viikari, L. (1996). Mannanase aided bleaching of soft-wood kraft pulp. *Biotechnology in pulp and paper industry—advances in applied and fundamental research*, 69-74.
- Stalbrand, H., Siika-Aho, M., Tenkanen, M. and Viikari, L. (1993). Purification and characterisation of two  $\beta$ -mannanases from *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology.* 29: 229–242.
- Talbot, G. and Sygusch, J. (1990). Purification and characterization of thermostable  $\beta$ -mannanase and  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology.* 56: 3505–3510.
- Takeno, F., Yamada, H., Sekiya, K., Fujitani, B. and Ohtsu, K. (1990). Effect of partially decomposed guar gum on high-cholesterol-fed rats and non-dietary fiber-fed rats. *Journal of Japan Society of Nutrition and Food Sciences*, 43: 421–425

- Tang, C.M., Waterman, L.D., Smith, M.H. and Thurston, C.F. (2001). The cel4 gene of *Agaricus bisporus* encodes a  $\beta$ -mannanase. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5): 2298-2303.
- Tenkanen, M., Makkonen, M., Perttula, M., Viikari, L. and Teleman, A. (1997). Action of *Trichoderma reesei* on galactoglucomannan in pine kraft pulp. *Journal of Biotechnology*, 57: 191–204
- Tsai, W.T., Liu, S.C. and Hsieh, C.H. (2012). Preparation and fuel properties of biochars from the pyrolysis of exhausted coffee residue. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 93: 63-67.
- Turhan İ., Ed., (2015). "Endüstriyel Mikrobiyolojiye Giriş", *Palme Yayıncılık A.Ş.*, ANKARA. 105-107 s.
- Ustok, F.I., Tari, C. and Gogus, N. (2007). Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *Journal of Biotechnology*, 127(2): 322-334.
- van Zyl, W.H., Rose, S.H., Trollope, K. and Gorgens, J.F. (2010). Fungal  $\beta$ -mannanases: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochemistry*, 45: 203–1213.
- Varnai, A., Huikko, L., Pere, J., Siika-aho, M. and Viikari, L. (2011). Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. *Bioresource Technology*, 102: 9096–9104.
- Ward, O.P., Qin, W.M., Dhanjoon, J., Ye, J. and Singh, A. (2006). Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*, 58: 1–55.
- Wong, K.K. (1993). Application of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. *Hemicelluloses and hemicellulases*, 127-143.
- Yanhe, Ma., Xue, Y., Dou, Y., Xu, Z., Tao, W. and Zhou, P. (2004). Characterization and gene cloning of a novel beta-mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *Extremophiles*, 8: 447–454.
- Yatmaz, E., Karahalil, E., Germec, M., Oziyci, H.R., Karhan, M., Duruksu, G., Ogel, Z.B. and Turhan, I. (2016). Enhanced  $\beta$ -mannanase production from alternative sources by recombinant *Aspergillus sojae*. *Acta Alimentaria*, 45(3), 371-379.
- Yin, L.J., Tai, H.M. and Jiang, S.T. (2012). Characterization of mannanase from a novel mannanase-producing bacterium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:6425-6431.
- Yoshida, S., Sako, Y. and Uchida A. (1998). Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for an enzyme from *Bacillus circulans* K-1 that degrades guar gum. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 62(3): 514–520.

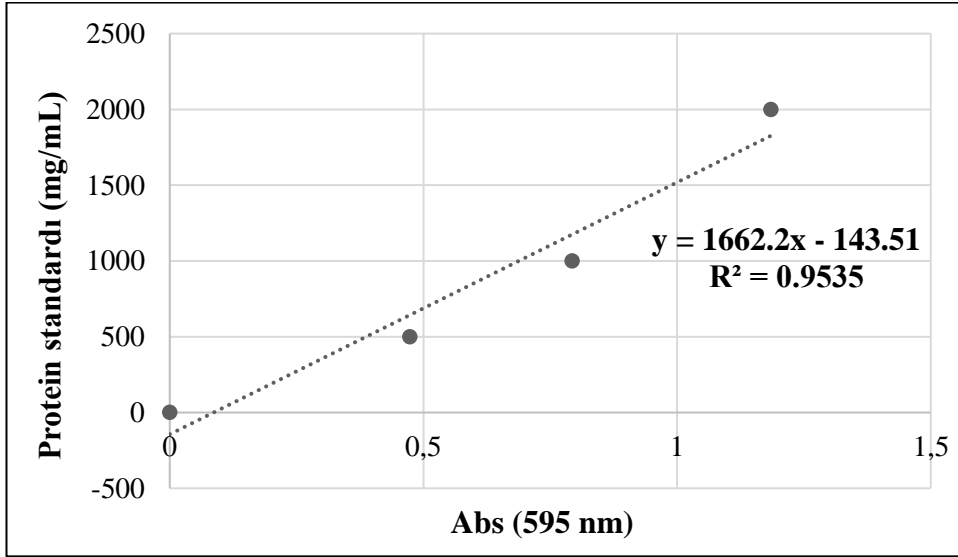
Zakaria, M.M., Ashiuchi, M., Yamamoto, S. and Yagi, T. (1998). Optimization for beta-mannanase production of a psychrophilic bacterium, *Flavobacterium* sp. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62: 655–660.

## 7. EKLER

EK-1. Enzim analizinde kullanılan standart mannoz kurvesi

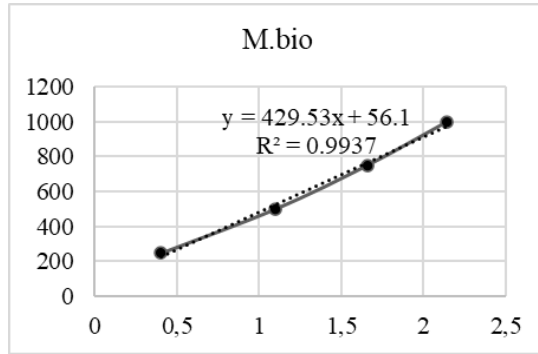


## EK-2. Protein standart kurvesi

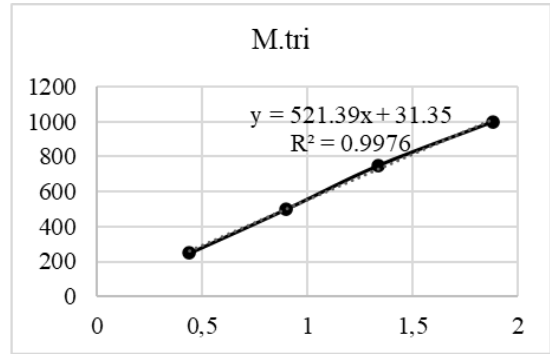


EK-3. a: Standart mannobioz kurvesi, b: Standart mannotrioz kurvesi, c: Standart mannotetroz kurvesi, d: Standart mannopentoz kurvesi, e: Standart mannoheksoz kurvesi

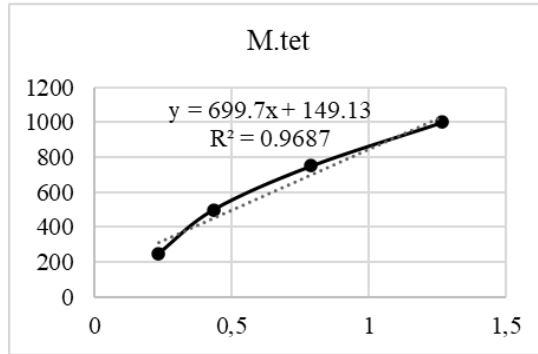
a)



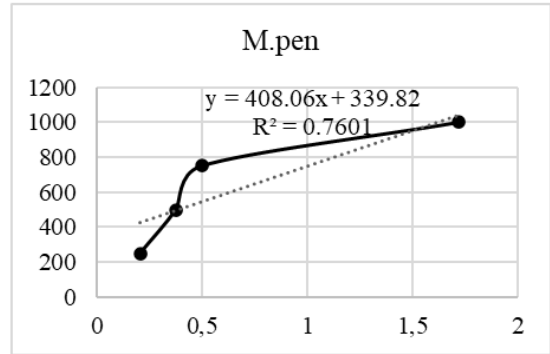
b)



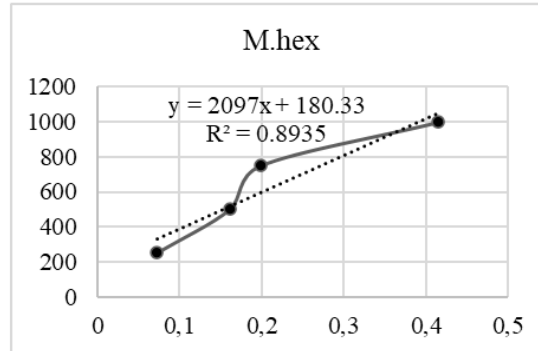
c)



d)



e)



## ÖZGEÇMİŞ

CANSU YILMAZER KOÇ

[cansuyilmazerr@gmail.com](mailto:cansuyilmazerr@gmail.com)



### ÖĞRENİM BİLGİLERİ

|                            |  |
|----------------------------|--|
| Yüksek Lisans<br>2018-2021 | Akdeniz Üniversitesi<br>Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim<br>Dalı, Antalya |
| Lisans<br>2012-2016        | Akdeniz Üniversitesi<br>Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü,<br>Antalya          |

### ESERLER

#### Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Yilmazer C.**, Germeç M., Turhan I. Solid-state fermentation for the production of a recombinant  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on the renewable resources. *Journal of Food Processing and Preservation*, pp.1-10, 2020.
- 2- Yilmazer, C.**, Gürler, H.N., Erkan, S.B., Ozcan, A., Hosta Yavuz, G., Germec, M., Yatmaz, E. and Turhan, I. Optimization of mannoooligosaccharides production from different hydrocolloids via response surface methodology using a recombinant *Aspergillus sojae*  $\beta$ -mannanase produced in the microparticle-enhanced large-scale stirred tank bioreactor. *Journal of Food Processing and Preservation*, pp.1-10, 2020.
- 3- Gürler H.N.**, Erkan S.B., Ozcan A., **Yilmazer C.**, Karahalil E., Germeç M., Yatmaz, E., Ogel, Z.B. and Turhan, I. Scale-up processing with different microparticle agent for  $\beta$ -mannanase production in a large-scale stirred tank bioreactor. *Journal of Food Processing And Preservation*, pp.1-10, 2020.
- 4- Erkan S.B.**, Başmak S., Ozcan A., **Yilmazer C.**, Gürler H.N., Hosta Yavuz G., Germec, M., Yatmaz, E. And Turhan I. Mannooligosaccharide production by  $\beta$ -mannanase enzyme application from coffee extract. *Journal of Food Processing And Preservation*, pp.1-10, 2020.
- 5- Erkan S.B.**, Ozcan A., **Yilmazer C.**, Gürler H.N., Karahalil E., Germeç M., Yatmaz, E., Kucukcetin, A. and Turhan I. The effects of mannanase activity on viscosity in different gums. *Journal of Food Processing And Preservation*, pp.1-10, 2020.

6- Gürler H.N., **Yilmazer C.**, Erkan S.B., Ozcan A., Yatmaz E., Oziyci H.R., Karhan, M. and Turhan I. Applicability of recombinant *Aspergillus sojae* crude mannanase enzyme in carrot juice production. *Journal of Food Processing And Preservation*, pp.1-10, 2020.

7- Germeç M., Demirel F., Tas N., Ozcan A., **Yilmazer C.**, Onuk Z. and Turhan I. Microwave-assisted dilute acid pretreatment of different agricultural bioresources for fermentable sugar production. *Cellulose*, pp.4337-4353, 2017.

### **Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler**

Germeç M., Ozcan A., Yilmazer C., Tas N., Onuk Z., Demirel F. and Turhan I. Ethanol fermentation from microwave-assisted acid pretreated raw materials by *Scheffersomyces stipitis*. *Agrolife Scientific Journal*, pp.112-118, 2017.

### **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler**

**1-Yilmazer C.** and Turhan I. Mannanase production by solid state fermentation (SSF) using recombinant *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906). *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20- 21, 2019.

**2- Yilmazer C.**, Erkan SB., Ozcan A., Gürler HN., Yavuz G., Yatmaz E. and Turhan I. Mannooligosaccharides production from different gums using mannanase, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

**3- Gürler HN.**, **Yilmazer C.**, Erkan SB., Ozcan A., Yatmaz E. and Turhan I. Effect of mannanase enzyme treatment on yield, beta carotene content and turbidity in the carrot juice production, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

**4- Erkan SB.**, Ozcan A., **Yilmazer C.**, Gürler HN., Karahalil E., Germec M., Yatmaz E. and Turhan I. The effects of mannanase activity on viscosity in different gums, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

**5- Erkan SB.**, Ozcan A., **Yilmazer C.**, Gürler HN., Yavuz G., Yatmaz E. and Turhan I. Mannooligosaccharide production by mannanase enzyme application from coffee extract, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology*, Istanbul, Turkey, June 20-21, 2019.

### **PROJELER**

**1- Mikrobiyal mannanaz üretimi için biyoreaktörde ölçek büyütme işlemleri, Üretilen enzimin saflaştırılması, gıda endüstrisinde uygulanabilirliği ve ekonomik analizi, TÜBİTAK, 115O051, Araştırmacı, Tamamlandı.**

**2- Katı kültür fermentasyonunda *Aspergillus niger* ile inülinaz ve fruktooligosakkarit üretimi, BAP K. Araştırma, FKA- 2019-4686, Araştırmacı, Devam ediyor.**