

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**KAHVE ATIKLARI VE EKSTRAKTLARINDAN FERMENTASYONLA
OLİGOSAKKARİT ÜRETİMİ**

Selin BAŞMAK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2022

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**KAHVE ATIKLARI VE EKSTRAKTLARINDAN FERMENTASYONLA
OLİGOSAKKARİT ÜRETİMİ**

Selin BAŞMAK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAHVE ATIKLARI VE EKSTRAKTLARINDAN FERMENTASYONLA
OLİGOSAKKARİT ÜRETİMİ

Selin BAŞMAK

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 05/07/2022 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)

Dr. Öğr. Üyesi Mert KARAOĞLAN

Prof. Dr. Mustafa KARHAN

ÖZET

KAHVE ATIKLARI VE EKSTRAKTLARINDAN FERMENTASYONLA OLİGOSAKKARİT ÜRETİMİ

Selin BAŞMAK

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İrfan TURHAN

Temmuz 2022; 52 sayfa

Fermentasyon ile katma değeri yüksek birçok ürün, farklı mikroorganizmalar ve karbon kaynakları kullanılarak üretilmektedir. Bu çalışmada, katı kültür fermentasyonu (KKF) ile *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) ve rekombinant *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906) kullanılarak inülinaz ve β -mannanaz enzimlerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. KKF yöntemi, gıda ve tarım endüstrilerinin atıklarının kullanılması, mikroorganizmaların doğadaki nemli katılar üzerindeki gelişiminden sorumlu olmaları, daha az atık su çıkışı olması, daha ekonomik ve kolay bir yöntem olması vb. avantajları nedeniyle kullanılmaktadır. Dünya’da en çok tüketilen ürünlerden biri olan kahvenin içecek hazırlanması sonrasındaki atıkları yeterince değerlendirilememektedir. Bu sebeple kahve atıklarının öğütülmüş hali ve ekstraktı kullanılarak fermentasyon ile enzim ve oligosakkarit üretilmesi amaçlanmıştır.

Plackett-Burman Dizaynı (PBD) kullanılarak pH, katı:sıvı oranı, miks miktarı (kahve atığı ve öğütülmüş kahve) ve sıcaklık olmak üzere 4 farklı parametre ile deneme deseni oluşturulmuştur. Oluşturulan deneme deseni sonucunda elde edilen inülinaz ve β -mannanaz enzimleri kullanılarak enzimatik hidrolizasyon yoluyla oligosakkarit üretimi gerçekleştirilerek fruktooligosakkarit (FOS) ve mannoooligosakkarit (MOS) miktarları ve profilleri belirlenmiştir.

En yüksek inülinaz aktivitesi $564,065 \pm 2,636$ U/mg olarak pH 8, 1:4 katı:sıvı oranı, 1:1 miks oranı ve 30°C koşullarında elde edilmiştir. İstatistiksel analiz sonuçları incelendiğinde, inülinaz enzimi üretimi için sıcaklığın önemli olduğu ($P < 0,05$) görülmüştür. Gerçekleştirilen enzimasyon sonucunda FOS üretimi incelendiğinde, yalnızca 1, 5, 6 ve 10 numaralı denemelerde 1,1,1-kestopentoz rastlanmıştır. En yüksek 1,1,1-kestopentoz 38,341 ppm ile 5 numaralı denemeden elde edilmiştir. 1, 5, 6 ve 10 numaralı denemelerden elde edilen FOS miktarları, enzimasyon yapılmayan kontrol olarak kullanılan kahve örneği incelendiğinde arttığı görülmüştür.

En yüksek β -mannanaz aktivitesi ise $71,174 \pm 19,670$ U/mg olarak pH 4, 1:2 katı:sıvı oranı, 1:1 miks oranı ve 30°C koşullarında elde edilmiştir. İstatistiksel analiz sonuçları incelendiğinde, β -mannanaz üretimi için sıcaklığın istatistiksel olarak önemli olduğu ($P < 0,05$) görülmüştür. Enzimasyon sonucunda MOS üretiminde, en yüksek mannobiyoz 109,662 ppm ile 8 numaralı enzim örneğinde, en yüksek mannotriyoz 101,112 ppm ile 6 numaralı enzim örneğinde, en yüksek mannotetroz 391,016 ppm ile 8 numaralı enzim örneğinde belirlenmiştir. En yüksek toplam MOS miktarı ise 600,644 ppm ile 8 numaralı enzimasyon örneklerinden elde edilmiştir.

FOS ve MOS için enzimasyon yapılmayan kontrol kahve örnekleri incelendiğinde, üretilen enzimler kullanılarak FOS ve MOS miktarlarının artırılacağı, kahvenin prebiyotik aktivitesinin iyileştirilebileceği görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELEER: FOS, İnülinaz, KKF, MOS, β -mannanaz

JÜRİ: Prof. Dr. İrfan TURHAN

Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Dr. Öğr. Üyesi Mert KARAOĞLAN

ABSTRACT

OLIGOSACCHARIDE PRODUCTION FROM COFFEE WASTES AND EXTRACTS BY FERMENTATION

Selin BASMAK

MSc Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Irfan TURHAN

July 2022; 52 pages

With fermentation, many products with high added value can be produced using different microorganisms and carbon sources. In this study, inulinase and β -mannanase enzymes were produced by solid state fermentation (SSF) using *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) and recombinant *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906). SSF is being used for its advantages like utilizing wastes from food and agricultural industries, for being responsible for the growth of microorganisms on moist solids in nature, less wastewater, more economic and for being an easy method etc. Coffee is one of the most consumed drinks in the World and the waste of coffee cannot be evaluated sufficiently. Therefore, it is aimed to produce enzymes and oligosaccharides by using coffee waste, ground coffee and coffee extract.

Plackett-Burman Design (PBD) was used to create a design for enzyme production with 4 different parameters that were selected as pH, solid:liquid ratio, mix ratio (coffee waste and ground coffee) and temperature. Oligosaccharide production was carried out by enzymatic hydrolysis using inulinase and β -mannanase enzymes obtained as a result of PBD design, and the amount and profiles of fructooligosaccharide (FOS) and mannoooligosachharide (MOS) were determined.

The highest inulinase activity was found to be $564,065 \pm 2,636$ U/mg from the conditions of 8 pH, 1:4 solid:liquid ratio, 1:1 mix ratio and 30°C. When the statistical analysis results were examined, it was seen that the temperature was statistically significant ($P < 0.05$) for the production of inulinase enzyme. When the results of FOS production were examined, 1,1,1-kestopentaose was found in only 1st, 5th, 6th, and 10th runs. The highest 1,1,1-kestopentaose was found to be 38,341 ppm from the 5th run. It was observed that the amount of FOS obtained from runs 1, 5, 6 and 10 increased as to the control coffee sample.

The highest β -mannanase activity was found to be $71,174 \pm 19,670$ U/mg from the the conditions of 4 pH, 1:2 solid:liquid ratio, 1:1 mix ratio and 30°C. When the statistical analysis results were examined, it was seen that the temperature was statistically significant ($P < 0.05$) for the production of β -mannanase. As a result of MOS production, the highest mannobiose was found to be 109,662 ppm from run 8, the highest mannotriose was found to be 101,112 ppm from run 6, the highest mannotetrose was found to be 391,016 ppm from run 8 and the highest total MOS was found to be 600,644 ppm from run 8.

When the control coffee samples were examined for FOS and MOS production, it was seen that the amount of FOS and MOS could be increased and the prebiotic activity of the coffee could be improved.

KEYWORDS: FOS, Inulinase, SSF, MOS, β -mannanase

COMMITTEE: Prof. Dr. Irfan TURHAN

Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Asst. Prof. Dr. Mert KARAOGLAN

ÖNSÖZ

Fermentasyon ile katma değeri yüksek birçok ürün farklı mikroorganizmalar ve karbon kaynakları kullanılarak üretilmektedir. Katı kültür fermentasyon yöntemi gıda ve tarım endüstrilerinin atıklarının kullanılması yönüyle çevre dostu bir yöntemdir. İnülinaz ve β -mannanaz enzimleri endüstride oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptir. Bu alanlardan biri de oligosakkarit üretimidir. Oligosakkaritler, kolondaki yararlı mikroflorayı olumlu yönde etkilemeleri, enfeksiyon riskini azaltmaları ve bağışıklık sistemini güçlendirmede etkili olmaları vb. insan sağlığını olumlu yönde etkileyen birçok özelliğe sahip olmaları nedeniyle gıda endüstrisinde sıkça kullanılmaktadır. Fruktooligosakkarit ve mannooligosakkaritler inülinaz ve β -mannanaz enzimleri kullanılarak enzimatik hidrolizasyon yöntemiyle üretilmektedir. Dünya’da en çok tüketilen ürünlerden biri olan kahvenin içecek hazırlaması sonrasında ortaya çıkan atıkları yeterince değerlendirilememektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında, kahvenin ve/veya atıklarının uygun kimyasal pozisyonu nedeniyle inülinaz, β -mannanaz, fruktooligosakkarit ve mannooligosakkarit üretimlerinde potansiyel bir kaynak olarak kullanılması amaçlanmıştır.

Öncelikle bana bu çalışmayı araştırma fırsatı veren, kıymetli zamanını ve değerli bilgilerini benimle paylaşan ve her fırsatta yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam saygıdeğer Prof. Dr. İrfan TURHAN’a (Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi) teşekkürü bir borç bilirim.

Her koşulda yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım Hilal Nur GÜRLER TUFAN, Selime Benemir ERKAN ÜNSAL ve Müge CANATAR’a çok teşekkür ederim. Ayrıca aynı laboratuvarı paylaştığım Ali ÖZCAN’a, ekip arkadaşlarıma ve zorlandığımda yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Dr. Öğr. Üyesi Ercan YATMAZ’a (Akdeniz Üniversitesi, Göynük Meslek Yüksek Okulu) teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her anında arkamda duran, aldığım kararları her zaman destekleyen, sevgilerini hep hissettiğim en büyük motivasyon kaynağım aileme, annem Aysun BAŞMAK’a, babam Murat BAŞMAK’a ve ablam Ezgi KAZAN’a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

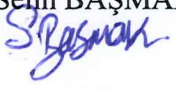
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. Katı Kültür Fermentasyon Yöntemi (KKF).....	3
2.2. KKF’de Kullanılan Substratlar	4
2.3. Kahve.....	5
2.4. Katı Kültür Fermentasyon Yöntemi ile Üretilen Endüstriyel Ürünler	6
2.4.1. Enzimler	6
2.5. İnülinaz Enzimi.....	7
2.5.1. KKF Yöntemi ile İnülinaz Enzimi Üreten Mikroorganizmalar.....	8
2.6. Mannanaz Enzimi	11
2.6.1. KKF ve SKF ile Mannanaz Enzimi Üreten Mikroorganizmalar	12
2.7. Prebiyotikler	14
2.7.1. Oligosakkaritler	14
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Materyal.....	19
3.2. Mikroorganizma ve İnokülasyon.....	19
3.3 Katı Kültür Fermentasyonu	21
3.4. Ekstraksiyon	23
3.5. Örneklerin Analiz Edilmesi.....	23
3.5.1. Enzim analizleri	23
3.5.2. Toplam şeker analizi.....	25
3.5.3. Protein analizi	25
3.6. Enzimatik Oligosakkarit Üretimi	25
3.6.1. Fruktooligosakkarit (FOS) ve Mannooligosakkarit (MOS) Örneklerinin Analiz Edilmesi	26

3.6.2. Viskozite analizi	27
3.7. İstatistiksel Analiz	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1. İnülinaz Enzimi Üretimi	28
4.1.1. Seçilen Parametrelerin İnülinaz ve İvertaz Enzimi Üretimine Etkileri	30
4.2. FOS Üretimi	33
4.3. β -Mannanaz Enzimi Üretimi	35
4.3.1. Seçilen Parametrelerin β -Mannanaz Enzimi Üretimine Etkileri	36
4.4. MOS Üretimi	38
4.4.1. Viskozite Analizi Sonuçları	41
5. SONUÇLAR	42
6. KAYNAKLAR	44
7. EKLER	49
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Kahve Atıkları ve Ekstraktlarından Fermentasyonla Oligosakkarit 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.

05/07/2022

Selin BAŞMAK


SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

cP	: Centi-Poise
dk	: Dakika
rpm	: Devir/Dakika
U/mg	: Enzim Birimi (Unit/miligram)
U/gds	: Enzim Birimi (Unit/gram kuru substrat)
U/g	: Enzim Birimi (Unit/gram)
g	: Gram
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
μ L	: Mikrolitre
M	: Molar
nm	: Nanometre
$^{\circ}$ C	: Santrigrad Derece
%	: Yüzde

Not: Bu tez kapsamında ondalık sayıların ayırımında ‘,’ kullanılmıştır.

Kısaltmalar

ANOVA	: Varyans Analizi
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
CCFD	: Merkezi Kompozit Yüzey Merkezli Dizayn
DNSA	: 3,5-dinitrosalisilik Asit
FOS	: Fruktooligosakkarit

GI	: Gastrointestinal
GOS	: Galaktooligosakkarit
HCl	: Hidroklorik Asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
I/S	: İnülinaz/İnvertaz(Sükraz)
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum Monohidrojen Fosfat
KKF	: Katı Kültür Fermentasyon
KOH	: Potasyum Hidroksit
LBG	: Locust Bean Gum
MEA	: Malt Ekstrakt Agar
MgSO ₄ .7H ₂ O	: Magnezyum Sülfat Heptahidrat
MOS	: Mannooligosakkarit
NaCl	: Sodyum Klorür
P	: Olasılık
PBD	: Plackett-Burman Dizayn
PDA	: Patato Dextrose Agar
PST	: Potasyum Sodyum Tartarat (KNaC ₄ H ₄ O ₆)
RSM	: Cevap Yüzey Metodu (Response surface methodology)
SKF	: Sıvı Kültür Fermentasyon
t	: Süre
XOS	: Ksilooligosakkarit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. KKF'de kullanılan bazı substratlar (Krishna 2005)	4
Şekil 2. 2. KKF ile üretilen endüstriyel bazı ürünler (Thomas vd. 2013).....	6
Şekil 2. 3. İnülin yapısı (Das vd. 2019)	7
Şekil 2. 4. Mannan ve heteromannanların yapıları. A) Mannan yapısı; B) Galaktomannan yapısı; C) Glukomannan yapısı; D) Galakto-glukomannan yapısı (Dhawan ve Kaur 2007)	11
Şekil 2. 5. Sindirilemeyen oligosakkaritleri oluşturan yapı taşları (Mussatto ve Mancilha 2007)	15
Şekil 2. 6. FOS'ların yapısı. Sırasıyla, 1-kestoz, nistoz ve fruktofuranozil nistoz (Bali vd. 2015)	16
Şekil 2. 7. MOS'ların yapısı. Sırasıyla mannobiyoz, mannotriyoz, mannotetroz, mannopentoz ve mannoheksoz (Megazyme)	18
Şekil 3. 1. <i>Aspergillus niger</i> A42 (ATCC 204447) ekimi yapılmış petriler. a) Petrinin üstten görünüşü; b) Petrinin alttan görünüşü	20
Şekil 3. 2. <i>Aspergillus sojae</i> AsT3 (ATCC 11906) ekimi yapılmış petriler, a) Petrinin üstten görünüşü; b) Petrinin alttan görünüşü	21
Şekil 3. 3. Fermentasyon sonrası etüvlerden alınan bazı erlenlerin görüntüleri.....	22
Şekil 3. 4. Ekstraksiyon aşamalarının görüntüleri. a) Çalkalamalı inkübatör; b) Kaba filtre kağıdı kullanılarak örneklerin süzülmesi; c) Santrifüj cihazı.....	23
Şekil 3. 5. İnkübasyon sonrası alınan bazı beherlerin görüntüsü.....	26
Şekil 4. 1. İnülinaz ve İnvvertaz Aktiviteleri (U/mg)	28
Şekil 4. 2. İnülinaz üretimi için seçilen parametrelerin Pareto grafiği	30
Şekil 4. 3. İnvvertaz üretimi için seçilen parametrelerin Pareto grafiği	30
Şekil 4. 4. HPLC analizi sonucunda hesaplanan FOS miktarları (ppm).....	34
Şekil 4. 5. Plackett-Burman Deneme Deseni kullanılarak yapılan fermentasyonlardan elde edilen β -mannanaz aktivitesi sonuçları (U/mg).....	36
Şekil 4. 6. β -Mannanaz üretimi için seçilen parametrelerin Pareto grafiği	36
Şekil 4. 7. HPLC analizi sonucunda hesaplanan MOS profili ve MOS miktarları (ppm)	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. KKF yöntemiyle inülinaz enzimi üretimi için kullanılan fungi ve maya mikroorganizmaları, substratlar ve maksimum enzim aktiviteleri (Das vd. 2019).....	9
Çizelge 2. 2. KKF yöntemiyle inülinaz enzimi üretimi için kullanılan bakteri ve aktinomisetler, substratlar ve maksimum enzim aktiviteleri (Das vd. 2019).....	10
Çizelge 2. 3. Mannanaz enzimi üreten bazı mikroorganizmalar, substratlar ve fermentasyon yöntemleri (Chauhan vd. 2012).....	13
Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan materyaller ve bu materyallerin temin edildikleri yerler	19
Çizelge 3. 2. İnülinaz ve β -mannanaz enzimleri üretimi için belirlenen parametreler ile oluşturulmuş Plackett-Burman deneme deseni	22
Çizelge 4. 1. İnülinaz üretimine ait bulgular.....	29
Çizelge 4. 2. İnülinaz üretimi için parametrelerin tahmini etkileri ve katsayıları	31
Çizelge 4. 3. Plackett- Burman deneme deseni ile gerçekleştirilen inülinaz üretiminin varyans analizi.....	31
Çizelge 4. 4. İnvertaz üretimi için parametrelerin tahmini etkileri ve katsayıları	32
Çizelge 4. 5. Plackett- Burman deneme deseni ile gerçekleştirilen invertaz üretiminin varyans analizi.....	32
Çizelge 4. 6. Enzimasyon sonrasında yapılan HPLC analizi sonucu FOS profili ve FOS miktarları (ppm)	33
Çizelge 4. 7. β -Mannanaz üretimine ait bulgular.....	35
Çizelge 4. 8. β -Mannanaz üretimi için parametrelerin tahmini etkileri ve katsayıları ...	37
Çizelge 4. 9. Plackett- Burman deneme deseni ile gerçekleştirilen β -mannanaz üretiminin varyans analizi	37
Çizelge 4. 10. Enzimasyon sonrasında yapılan HPLC analizi sonucu MOS profili ve MOS miktarları (ppm).....	39
Çizelge 4. 11. β -mannanaz ile enzimasyon yapılan kahve ekstraktlarının son durumdaki viskozite ölçümleri (cP)	41

1. GİRİŞ

Fermentasyon, sıvı kültür/derin kültür fermentasyonu (SKF) ve katı kültür fermentasyonu olarak 2 şekilde incelenmektedir. Sıvı kültür fermentasyon yöntemi, mikroorganizmanın gelişimi ve ürün üretimi için gerekli bütün bileşenleri sıvı koşullarda sağladığı fermentasyon tekniği olarak tanımlanabilmektedir (Singhania vd. 2010). Endüstride büyük ölçekli enzim üretiminde proses parametrelerinin daha iyi izlenebilirliği ve kullanım kolaylığı nedeniyle sıvı kültür fermentasyon yöntemi daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Singhania vd. 2010). Öte yandan katı kültür fermentasyonu sahip olduğu bazı dezavantajlar nedeniyle (yaşanılan ölçek büyütme sorunlarından dolayı KKF yöntemiyle çalışan reaktörler için daha az tasarım bulunmakta) daha az kullanım alanı bulmaktadır (Couto ve Sanromán 2006). KKF ve SKF prosesleri incelendiğinde, KKF'nin ekonomik ve pratik bazı avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Bu avantajlar arasında, ekonomik olması, az enerji gereksinimi, fermentasyon sonrası saflaştırma işlemlerinin görece kolaylığı, az su kullanımı, basit bir proses olması, bazı mikroorganizmaların doğal yaşam alanlarına yakın bir ortam oluşturması nedeniyle daha düşük enerji gereksinimine sahip olması, az atık su üretmesi ve katı atıkların kullanılması nedeniyle çevre dostu bir yöntem olması vb. gösterilmektedir (Pandey 2003; Krishna, 2005; Couto ve Sanromán 2006).

Katı kültür fermentasyon yöntemi (KKF), serbest su yokluğunda mikroorganizmaların katı substratlarda gelişim gösterdiği fermentasyon tekniğidir ve mikroorganizmaların doğadaki nemli katılar üzerindeki gelişiminden sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Pandey 2003; Krishna 2005). KKF yöntemiyle üretimi etkileyen substrat seçimi, mikroorganizma seçimi, pH, sıcaklık, inokülasyon tipi, besin vb. çeşitli faktörler bulunmaktadır ve bu faktörler kullanılan substrata, mikroorganizmaya ve prosese göre değişiklik gösterebilmektedir (Krishna 2005).

İnülinaz enzimi (2,1- β -D-fruktan fruktanohidrolaz, EC 3.2.1.7) inülinin hidrolizini katalizleyen enzimlerdir ve inülinde bulunan β -2,1 glikozidik bağları hidrolize ederek fruktoz, inülo-oligosakkaritler ve glukoz açığa çıkartmaktadırlar (Housseiny 2014; Das vd. 2019). İnülin hindiba kökü, kuşkonmaz kökü, sarımsak, soğan, muz, pırasa vb. meyve ve sebzelerde bulunan depo karbonhidratıdır (Onilude vd. 2011; Das vd. 2019). İnülinaz enzimi, fruktooligosakkarit (FOS) üretiminde, düşük kalorili diyetlerde, gıdalarda diyet lifi olarak kullanılmaktadır (Mazutti vd. 2010).

Endo-1,4- β -mannanaz (β -mannanaz), mannan, ve heteromannanlarda (galaktomannan, glukomannan ve galaktoglukomannanlarda) bulunan β -1,4 mannozidik bağların rastgele parçalanmasını sağlayarak kısa β -1,4 manno-oligomerleri ve mannooligosakkaritleri oluştururlar (Singh vd 2018). Mannan ve heteromannanlar sert ve yumuşak ağaçlarda, baklagil bitkilerinin tohumlarında ve fasulyelerde doğada sık olarak bulunmaktadır (Dhawan ve Kaur 2007).

Günümüzde prebiyotikler oldukça önemli bir yere sahiptir. Bağırsaktaki mikroorganizmalar tarafından seçici olarak fermente edilirler ve böylece prebiyotikler, bağırsak mikrobiyotasını zenginleştirerek konağa anti obezite, anti neoplastik ve immünomodülatör etkiler kazandırarak konağa sayısız sağlık yararı sağlamaktadır (Jana vd. 2021). Gıdaların prebiyotik olarak sayılabilmeleri için gastrointestinal sistemin üst kısmında hidrolize edilmemeleri ya da absorbe olmamaları ve gelişimi uyarılan birçok bakteri için seçici bir substrat olmaları gerekmektedir (Dominguez vd. 2014). Oligosakkaritler sahip oldukları çeşitli prebiyotik özellikleri nedeniyle Dünya’da oldukça önemli bir yere sahiptir (Jana vd. 2021).

Oligosakkaritler, kolondaki yararlı mikroflorayı olumlu yönde etkilemeleri, enfeksiyon riskini azaltmaları ve bağışıklık sistemini güçlendirmede etkili olmaları vb. bazı özellikleri nedeniyle sağlığı olumlu yönde etkiledikleri için gıda endüstrisinde de sıkça kullanılmaktadır. Endüstriyel olarak doğal kaynaklardan ekstraksiyon ve kimyasal üretim ile üretilmelerine rağmen en çok enzimatik yöntemlerle üretim gerçekleştirilmektedir (Swennen vd. 2006; Mussatto ve Mancilha 2007).

FOS soğan, buğday, çavdar, arpacık soğanı, domates, muz, sarımsak, yer elması vb. bazı sebzelerde doğal olarak bulunmaktadır ya da sakkaroz veya inülin mikrobiyal enzimler ile üretilmektedir (Bali vd. 2015). Gıda endüstrisinde yağ ve şeker ikamesi olarak kullanılmaktadırlar (Morris ve Morris 2012).

MOS ticari substratlar ve tarımsal atıklar gibi zengin mannan içeriğine sahip olan materyallerden en yaygın olarak enzimatik hidroliz yöntemiyle üretilmektedir (Singh vd. 2018). Mannanların β -mannanaz tarafından hidrolize edilmesi ile üretilmektedirler (Singh vd. 2018). Gastrointestinal sistemde yararlı mikroorganizma gelişimini desteklemeleri nedeniyle prebiyotikler olarak fonksiyonel gıda uygulamalarında kullanılmaktadır (Singh vd. 2018).

Bu tez çalışması kapsamında KKF yöntemi kullanılarak enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Plackett-Burman Dizayn (PBD) kullanılarak, pH, sıcaklık, katı:sıvı oranı ve miks miktarı olarak belirlenen 4 farklı parametre ile elde edilen deneme deseniyle inülinaz ve β -mannanaz enzimlerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Belirlenen parametrelerin minimum ve maksimum noktalarında (pH 4 - 8, sıcaklık 30°C-50°C, katı:sıvı oranı 1:2-1:4 ve miks (kahve posası ve öğütülmüş kahve ile miks) 0 (yalnızca kahve posası)-1:1 (kahve posası:öğütülmüş kahve) miks üretimleri yapılmıştır. İnülinaz için *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) kullanılarak %7 inokülasyon oranında fermentasyon, β -mannanaz *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906) kullanılarak %5 inokülasyon oranında fermentasyon PBD’den elde edilen denemelere göre gerçekleştirilmiştir. Üretimi yapılan enzimler, demlenen kahve ekstraktlarına uygulanarak enzimatik hidrolizasyon gerçekleştirilmiştir. FOS ve MOS üretimi gerçekleştirilmiş olup miktar ve profil analizleri gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1.Katı Kültür Fermentasyon Yöntemi (KKF)

Katı kültür fermentasyon yöntemi serbest suyun yokluğunda mikroorganizmaların katı substratlarda gelişim gösterdiği fermentasyon yöntemi olarak adlandırılmaktadır (Krishna 2005). Substratın mikroorganizmanın gelişmesi ve metabolik faaliyetlerini desteklemesi için yeterli neme sahip olması gerekmektedir (Pandey 2003). Katı kültür fermentasyon yönteminin mikroorganizmaların doğada nemli katılar üzerindeki gelişiminden ve fermentasyon tekniğinin başlangıcından sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Pandey 2003).

KKF ve sıvı kültür fermentasyon (SKF) prosesleri incelendiğinde, KKF'nin ekonomik ve pratik bazı avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Bu avantajlar arasında, daha ekonomik olması, daha az enerji harcaması, fermentasyon sonrası işlemlerin daha kolay olması (ürünün ekstrakte edilmesi gereken durumlarda daha az solvent (çözücü) kullanılması ve daha az maliyet gerektirmesi), daha az su kullanımı ve daha basit bir proses olması ve bazı mikroorganizmaların doğal yaşam alanlarına yakın bir ortam oluşturması vb. bulunmaktadır (Krishna, 2005; Couto ve Sanromán 2006).

Bu fermentasyon yöntemi tarımsal ve endüstriyel atıkların kullanılmasında oldukça önemli bir yere sahiptir. Bunun nedeni de bu proseslerin daha düşük enerji gereksinimine sahip olması, daha az atık su üretmesi ve katı atıkların kullanılması nedeniyle çevre dostu bir yöntem olmasıdır (Pandey 2003).

Bütün bu avantajlarına rağmen sahip olduğu bazı dezavantajlar nedeniyle KKF yöntemiyle çalışan reaktörler için çok az tasarım bulunmaktadır (Couto ve Sanromán 2006).

KKF'nin sahip olduğu çeşitli dezavantajlar arasında pH, sıcaklık, nem vb. fermentasyon parametrelerinin kontrolündeki zorluklar, ölçek büyütme proseslerinde yaşanan zorluklar ve düşük nem seviyelerinde gelişebilen sınırlı mikroorganizmaların bulunması vb. örnek olarak verilebilmektedir (Krishna, 2005; Couto ve Sanromán 2006).

Katı kültür fermentasyonunu etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bu faktörler kullanılan substratlara, mikroorganizmalara ve proseslere göre değişiklik gösterebilmektedir (Krishna 2005). Bunlar arasında: inokülasyon tipi, nem ve su aktivitesi, substrat seçimi, seçilen substratın partikül büyüklüğü, pH, sıcaklık ve besin/beslenme faktörleri olarak sıralanabilmektedir (Krishna 2005).

Katı kültür fermentasyon yöntemi için mikroorganizma seçimi yapılırken elde edilmek istenen son ürünü üretme verimliliği ön plana çıkmaktadır. Bu fermentasyon yöntemi ile üretimde en yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalar funguslar ve bakterilerdir (Krishna 2005). Filamentli mantarlar (filamentous fungi) düşük su aktivitelere olan toleransları, enzim üretme verimliliklerinin iyi olmaları, aroma ve

sağlığı geliştirici ürünler üretebilmeleri vb. yönlerden katı kültür fermentasyon yöntemi için en uygun mikroorganizmalardır (Krishna 2005).

2.2.KKF'de Kullanılan Substratlar

Yapılan çalışmalar, ucuz atık materyallerin substrat olarak kullanımının KKF proseslerinin sağladığı büyük bir avantaj olduğunu göstermektedir (Couto ve Sanromán 2006). Bu nedenle, karbonhidrat ve diğer besinler açısından zengin olan gıda ve tarımsal atıkların substrat olarak kullanımı yönüyle KKF iyi bir yöntem olarak gözükmemektedir (Couto ve Sanromán 2006). KKF ile üretimde uygun substrat seçimi, maliyet ve kolay bulunabilirlik başta olmak üzere partikül büyüklüğü, nem içeriği, su aktivitesi vb. bazı faktörlere bağlıdır (Couto ve Sanromán 2006). KKF'de kullanılan bazı substratlar Şekil 2.1.'de verilmiştir.



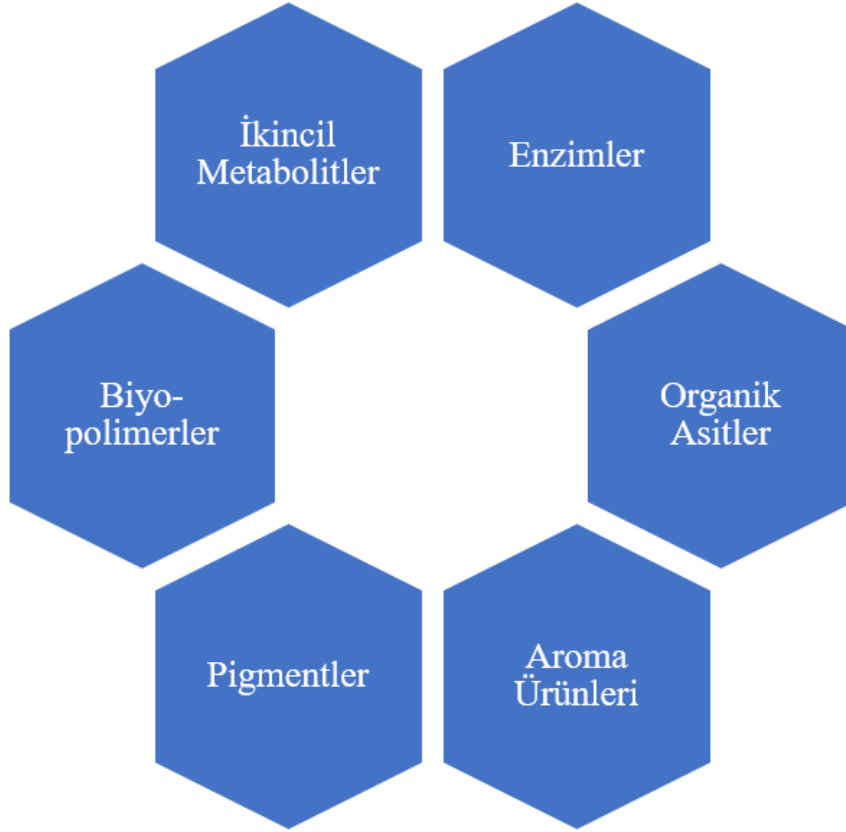
Şekil 2.1. KKF'de kullanılan bazı substratlar (Krishna 2005)

2.3.Kahve

Kahvenin Dünya’da en çok tüketilen içeceklerden biri olduğu bilinmektedir. Kafein varlığından dolayı fizyolojik olarak uyarıcı bir özelliğe sahiptir (Arya ve Rao 2007). Kahve çekirdeğinin en önemli bileşenlerinden olan karbonhidratlar, kahve çekirdeğinde aroma bağlayıcı olarak görev yapmaktadırlar (Arya ve Rao 2007). Yeşil kahve çekirdeklerinin polisakkarit fraksiyonunun büyük bir bölümünü oluşturan mannan, arabinogalaktan ve selüloz, çekirdeklerin kuru ağırlığının yaklaşık yarısını oluşturmaktadır (Sachtlehner vd. 2000). Bu fraksiyonunun ana polisakkariti mannan, çekirdeğin kuru ağırlığının yaklaşık %20-%30’unu oluşturan, suda çözünmeyen, kristalimsi bir bileşiktir (Sachtlehner vd. 2000). Yüksek moleküler ağırlıklı mannanların ve özellikle galaktomannaların çözeltileri, yüksek viskoziteye neden olmaları ile bilinmektedir (Sachtlehner vd. 2000). Bu polimerler, gıda ve gıda dışı uygulamalarda önemli koyulaştırıcı polisakkaritlerdir ve buna göre mevcut mannan, hazır kahve üretimlerinde sprey veya dondurarak kurutma işlemlerinden önce konsantre edildiğinde kahve ekstraktının yüksek viskoziteye sahip olmasına neden olmaktadır (Sachtlehner vd. 2000). Endüstriyel kahve ekstraksiyon teknikleri, %25’ten daha az çözünür konsantrasyonlar sağlamaktadır (Sachtlehner vd. 2000). Dondurarak kurutma bu konsantrasyonlarda gerçekleştirilebilir, ancak dondurarak kurutma ile suyun uzaklaştırılmasının maliyeti diğer yöntemlere göre daha yüksektir ve ek olarak bu konsantrasyonlarda kurutma, daha düşük konsantrasyonlarda daha belirgin olduğundan önemli aroma kayıplarına yol açabilmektedir (Sachtlehner vd. 2000). Bu nedenle mannanın mannanazlarla parçalanarak viskozitenin azaltılması, ekstraktların konsantre edilebilme etkinliğini iyileştirerek hazır kahve üretimini kolaylaştırmakta ve kurutucu için enerji maliyetini azaltmaktadır (Sachtlehner vd. 2000). Kahve ve/veya kahve atıkları uygun kimyasal kompozisyonu nedeniyle fermentasyonla katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde iyi bir besiyeri olabilme potansiyeline sahiptir. Ayrıca fermentasyon sırasında veya üretilen enzimin kullanılmasıyla prebiyotik özelliklerinin ortaya çıkması mümkün olabilecektir.

2.4. Katı Kültür Fermentasyon Yöntemi ile Üretilen Endüstriyel Ürünler

Bu yöntem ile üretilen birçok endüstriyel katma değeri yüksek ürün bulunmaktadır. Bunlardan bazıları Şekil 2.2.'de verilmiştir



Şekil 2. 2. KKF ile üretilen endüstriyel bazı ürünler (Thomas vd. 2013)

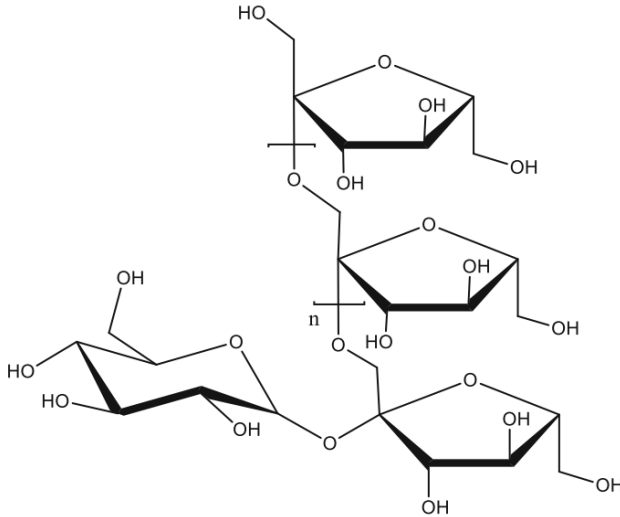
Bu tez kapsamında KKF yöntemi kullanılarak inülinaz ve β -mannanaz enzimlerinin üretimi gerçekleştirilecektir.

2.4.1. Enzimler

KKF yöntemiyle üretilen çeşitli ürünler arasında endüstriyel enzimler de yer almaktadır. Yeni mikrobiyal kaynaklardan daha düşük maliyetle yüksek enzim üretimi elde edebilmek için KKF'de farklı enzim üretim çalışmaları bulunmaktadır (Thomas vd. 2013). Endüstriyel enzim üretimi, gıda enzimleri, hayvan yemi enzimleri ve deterjan, kağıt vb. endüstrilerde kullanılan teknik enzimler olarak sıralanabilmektedir (Krishna 2005). İnülinaz, invertaz, β -mannanaz, ksilinaz, sellülaz, lipaz vb. çeşitli enzimler KKF yöntemi kullanılarak üretilmektedir.

2.5. İnülinaz Enzimi

İnülin terminal ucunda bir glikoz ünitesine bağlı doğrusal β -2,1-D-fruktofuranozdan oluşan bir fruktan polimeridir (şekil 2.3.) (Das vd. 2019). Liliaceae, Amaryllidaceae, Graminaeae ve Asteraceae'nin birçok üyesinde yer alan bir depo karbonhidratıdır (Onilude vd. 2011). Hindiba kökü, kuşkonmaz kökü, sarımsak, karahindiba kökü vb. bitkiler ve muz, soğan, pırasa vb. meyve ve sebzeler bol miktarda inülin içermektedir (Das vd. 2019).



Şekil 2. 3. İnülin yapısı (Das vd. 2019)

İnülinaz enzimi: (2,1- β -D-fruktan fruktanohidrolaz, EC 3.2.1.7) inülinin alt birimlerine ayrılmasını katalizleyen enzimlerdir (Housseiny 2014). İnülinde bulunan β -2,1 glikozidik bağlarını hidrolize ederek fruktoz, inülo-oligosakkaritler ve glukoz açığa çıkartmaktadırlar (Das vd. 2019).

İnülinaz enzimleri fruktooligosakkarit üretimi, düşük kalorili diyetlerde ürün formülasyonlarında, *Bifidus* uyarılmasında ve gıda preparatlarında diyet lifi kaynağı olarak kullanım için fonksiyonel ve besleyici görevlerde yer almaktadır (Mazutti vd. 2010).

İnülin, ekzo-inülinazlar (β -Dfruktan fruktohidrolaz, EC 3.2.1.80) ve endo-inülinazlar (2-1- β -D-fruktan fruktanohidrolaz, EC 3.2.1.7) olmak üzere 2 farklı tip inülinaz enzimiyle hidrolize edilebilmektedir (Housseiny 2014).

- Endo-inülinaz enzimleri fruktooligosakkarit üretiminde,
- Ekzo-inülinaz enzimleri ise fruktoz şurubu üretiminde kullanılmaktadır (Housseiny 2014).

2.5.1. KKF Yöntemi ile İnülinaz Enzimi Üreten Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar potansiyel karbon kaynaklarından enzimleri yüksek verimlerde üretebildiklerinden dolayı inülinaz üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Das vd. 2019). İnülinaz üretimi için KKF yönteminde kullanılan başlıca mikroorganizmalar fungi ve mantarlardır. Fungiler, hiflerini substrat partikülleri arasındaki boşluklara nüfuz ederek partikül yüzeylerinde gelişebilir ve böylelikle katı substratlarda gelişim gösterebilirler, bu nedenle de KKF için en uygun mikroorganizmalar olarak kabul edilirler (Das vd. 2019). En çok tercih edilen ve kullanılan mikroorganizmalar arasında *Kluyveromyces* ve *Aspergillus* suşları bulunmaktadır. Ayrıca KKF yöntemi kullanılarak bakteriyel inülinaz üretimi de gerçekleştirilmektedir (Das vd. 2019). Bunun ilk örneği ise Selvakumar ve Pandey (1999) tarafından *Staphylococcus* sp ile KKF yöntemi kullanılarak inülinaz enzimi üretimi örnek olarak verilebilmektedir. KKF yöntemi kullanılarak inülinaz enzimi üreten bazı mikroorganizmalar, substratlar ve maksimum inülinaz aktiviteleri Çizelge 2.1. ve Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. KKF yöntemiyle inülinaz enzimi üretimi için kullanılan fungi ve maya mikroorganizmaları, substratlar ve maksimum enzim aktiviteleri (Das vd. 2019)

Mikroorganizma	Substrat	Maksimum İnülinaz Aktivitesi	Kaynak
<i>Aspergillus niger</i>	Yer elması (Jerusalem artichoke) ve fasulye	11.13 U/gds	Al-Dabbagh ve Mahmood (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Muz kabuğu	200 U/gds	Narayanan vd. (2013)
	Pirinç kavuzu	137.2 U/gds	
<i>Aspergillus niger</i> AUMC 9375	Ayçiçeği yumruları ve marul kökü	0.232 U/gds	Housseiny (2014)
	Marul kökü	0.0879 U/gds	
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Şeker kamışı küspesi	1.773±0.0627 U/gds	Abd El Aty vd. (2014)
	Enginar yaprakları	0.177±0.016 U/gds	
<i>Aspergillus terreus</i>	Sarımsak atıkları	0.022±0.031 U/gds	Abd El Aty vd. (2014)
	Enginar yaprakları	4.433±0.121 U/gds	
<i>Aspergillus versicolor</i>	Hindiba kökleri	0.177±0.125 U/gds	Abd El Aty vd. (2014)
	Portakal kabukları	1.917±0.016 U/gds	
<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	Buğday kepeği ve pirinç kavuzu	420.9 U/gds	Sheng vd. (2009)
<i>Geotrichum candidum</i>	Pırasa tozu	412.1 U/gds	Canli ve Kurbanoglu (2012)
<i>Kluyveromyces</i> S120	Buğday kepeği	409.8 U/gds	Xiong vd. (2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC-52466	Buğday kepeği (iri taneli/kalın)	106.72 U/gds	Selvakumar ve Pandey (1999)
	Mısır unu	21.23 U/gds	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Şeker kamışı küspesi + şeker kamışı pekmezi + soya kepeği	463 U/gds	Mazutti vd. (2010a)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Şeker kamışı küspesi	390 U/gds	Mazutti vd. (2006)

Çizelge 2.1. devamı;

Mikroorganizma	Substrat	Maksimum İnülinaz Aktivitesi	Kaynak
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7572	Soya kepeği ve şeker kamışı	436.70 U/gds	Mazutti vd. (2010b)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7573	Soya kepeği ve şeker kamışı	250 U/gds	Mazutti vd. (2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7574	Soya kepeği ve şeker kamışı	586 U/gds	Astolfi vd. (2011)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Enginar yaprakları	1.241±0.877 U/gds	Abd El Aty vd. (2014)
	Sarımsak atıkları	0.665±0.156 U/gds	
<i>Penicillium rugulosum</i> (MTCC-3487)	Kopra atığı	239 U/gds	Dilipkumar vd. (2014)
<i>Pichia guilliermondii</i>	Buğday kepeği ve pirinç kavuzu	291 U/gds	Guo vd. (2009)
<i>Saccharomyces</i> sp.	Buğday kepeği	78.29±0.13 U/gds	Onilude vd. (2012)
	Portakal kabuğu	22.47±0.01 U/gds	

Çizelge 2. 2. KKF yöntemiyle inülinaz enzimi üretimi için kullanılan bakteri ve aktinomisetler, substratlar ve maksimum enzim aktiviteleri (Das vd. 2019)

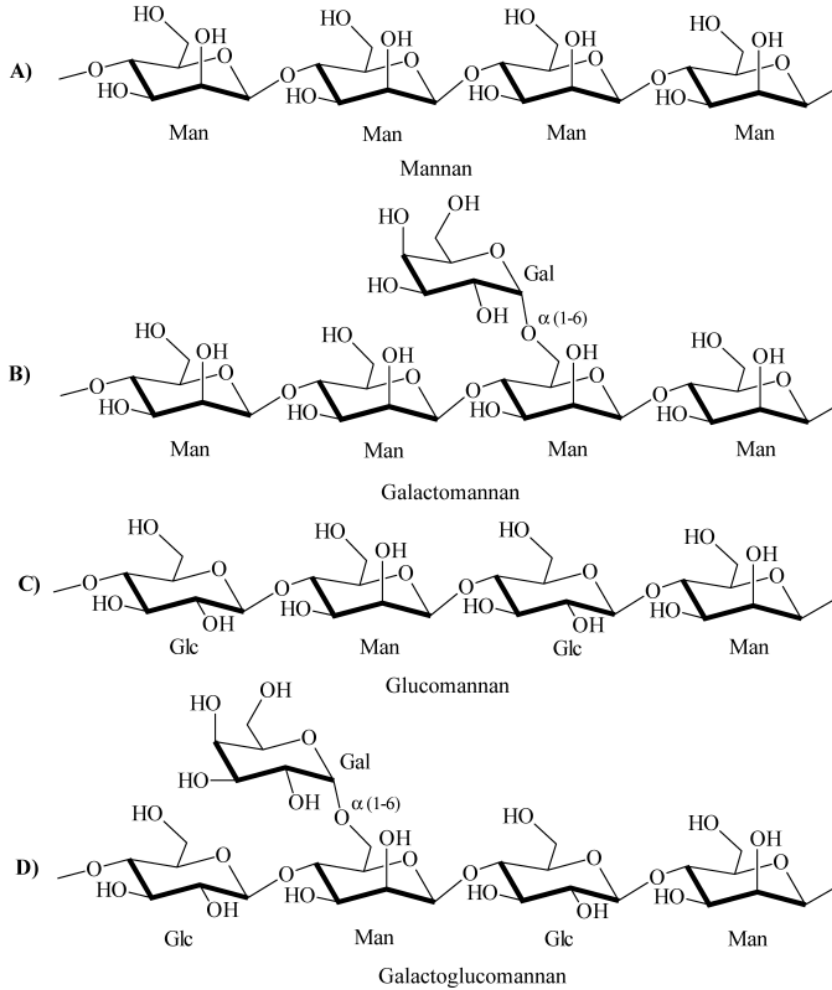
Mikroorganizma	Substrat	Maksimum İnülinaz Aktivitesi	Kaynak
<i>Staphylococcus</i> sp.	Buğday kepeği (ince)	96.77 U/gds	Selvakumar ve Pandey (1999)
	Mısır unu	16.11 U/gds	
<i>Streptomyces</i> sp.	Kopra atığı	131 U/gds	Dilipkumar vd. (2013)
<i>Streptomyces</i> sp. MTCC-3119	Sarımsak (bulb) tozu	76 U/gds	Dilipkumar vd. (2011b)
	Pressmud	89 U/gds	Dilipkumar vd. (2011a)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>phaseoli</i>	Sarımsak kabuğu	117 IU/gds	Ayyachamy vd. (2007)
	Soğan kabuğu	101 IU/gds	

2.6.Mannanaz Enzimi

Mannan ve **heteromannanlar** bitki hücre duvarlarının hemiselüloz fraksiyonunun bir parçasıdır. Bitki hücre duvarı polisakaritleri selüloz, hemiselüloz ve lignin olmak üzere 3 ana sınıfı içermektedir. Hemiselülozlar mannan, ksilan, galaktan ve arabinanı içermektedir (Dhawan ve Kaur 2007).

Mannan ve heteromannanlar sert ve yumuşak ağaçlarda (hardwoods and softwoods), baklagil bitkilerinin tohumlarında ve fasulyelerde hemiselüloz fraksiyonunun bir parçası olarak doğada sık olarak bulunmaktadır (Dhawan ve Kaur 2007).

Mannan, D-mannoz birimlerinden oluşmaktadır. Mannanlar yapılarındaki karbonhidratlara veya asit ikamelerine bağlı olarak ayrıca glukomannan, galaktomannan ve galakto-glukomannan (Şekil 2.4.) olarak karakterize edilen β -1,4-mannozidik bağlarla bağlanan lineer mannoz kalıntılarından oluşmaktadır (Singh vd. 2018).



Şekil 2. 4. Mannan ve heteromannanların yapıları. **A)**Mannan yapısı; **B)**Galaktomannan yapısı; **C)**Glukomannan yapısı; **D)**Galakto-glukomannan yapısı (Dhawan ve Kaur 2007)

Mannanın ana bileşeni, 6 karbonlu D-mannozdur ancak bitki mannanlarının heterojenliği ve karmaşık kimyasal doğası nedeniyle, belirli mikroorganizmalar tarafından kolayca enerji kaynağı olarak kullanılabilen basit şekerlere tamamen parçalanması için endo-1,4- β -mannanaz (EC 3.2.1.78, mannan endo-1,4- β -mannosidaz ve ekzo β -mannosidaz (EC 3.2.1.25) enzimleri kullanılmaktadır (Dhawan ve Kaur 2007). Asetil mannan estera ve α -galaktosidaz gibi ek enzimler, mannan yapısı üzerinde çeşitli noktalara bağlanabilen yan zincir dallanmalarını uzaklaştırabilmek için gerekli olabilmektedir (Moreira ve Filho 2008).

Endo-1,4- β -mannanaz: (aynı zamanda β -mannanaz olarak adlandırılır), mannan, galaktomannan, glukomannan ve galaktoglukomannanlarda bulunan β -1,4 mannozidik bağların rastgele parçalanmasını sağlayarak kısa β -1,4 manno-oligomerleri ve mannooligosakkaritleri oluştururlar (Singh vd 2018).

β -mannanaz enzimlerinin endüstride kullanım alanları incelendiğinde, gıda ve yem kalitesini iyileştirmek, kağıt ve kağıt hamuru endüstrilerinde yumuşak ağaç hamurlarının enzimatik ağartılmasına yardımcı olmak, hazır (instant) kahve endüstrisinde kahve mannanının yüksek viskozitesinin oluşturduğu sorunları ortadan kaldırmak için enzimle hidroliz edilmesi ve böylelikle viskozite düşürülmesi ve prebiyotik mannooligosakkarit üretimi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Dhawan ve Kaur 2007).

2.6.1. KKF ve SKF ile Mannanaz Enzimi Üreten Mikroorganizmalar

Mannanaz enzimlerinin üretimi, inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, karbon ve azot kaynakları, inorganik tuzlar, çözülmüş oksijen konsantrasyonu gibi beslenme ve fizikokimyasal faktörlerden etkilenmektedir (Chauhan vd. 2012). Çeşitli mikroorganizmalar maksimum β -mannanaz üretimi için farklı inkübasyon sürelerine sahiptir (Chauhan vd. 2012). Optimum sıcaklık değeri ise çoğu durumda mezofilik aralıkta olduğu rapor edilmiştir ve kullanılan mikroorganizmanın gelişme sıcaklığına denk gelmektedir (Chauhan vd. 2012). Genel olarak bakteriler nötr ile alkali pH tercih ederken fungi asidik pH aralıkları tercih etmektedir (Chauhan vd. 2012).

Mannanaz enzimleri çoğunlukla sıvı kültür fermentasyon yöntemi ile üretilmiştir ancak katı kültür fermentasyon yöntemi ile mannanaz enzimi üretimi ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır (Chauhan vd. 2012). Doğal suşlarla β -mannanaz üretimi için katı kültür fermentasyonunun kullanımı, hedef enzimi düşük saflıkta ve enzim kokteyli olarak üretmesine rağmen sıvı kültür fermentasyon yöntemine göre daha yüksek verimle sonuçlanabilmektedir (Zyl vd. 2010). Mannanaz enzimi üreten bazı mikroorganizmalar, substratlar ve fermentasyon yöntemleri Çizelge 2.3.'te verilmiştir.

Çizelge 2. 3. Mannanaz enzimi üreten bazı mikroorganizmalar, substratlar ve fermentasyon yöntemleri (Chauhan vd. 2012)

Mikroorganizma	Substrat / Fermentasyon	Kaynak
<i>Bacillus sp.</i> MG-33	Buğday kepeği / KKF	Meenakshi vd. (2010)
<i>Acinetobacter sp.</i> ST 1-1	Hindistan cevizi atığı (kopra meal), keçiyoynuzu gamı / SKF	Titapoka vd. (2008)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IOA 1	Galaktomannan / SKF	Mabrouk ve Ahwany (2008)
<i>Bacillus circulans</i> M-21	Guar gamı / SKF	Mou vd. (2011)
<i>Bacillus sp.</i> N16-5	Konjak mannan / SKF	Lin vd. (2007)
<i>Bacillus sp.</i> MSJ-5	Konjak tozu / SKF	Zhang vd. (2009)
<i>Cellulosimicrobium sp.</i> HY-13	Keçiyoynuzu gamı / SKF	Kim vd. (2011)
<i>Paenibacillus sp.</i> MSL – 9	Guar gamı / SKF	Manjula vd. (2010)
<i>Aspergillus niger</i> LW-1	Patates kabuğu / KKF	Shu-Fei vd. (2008)
<i>Aspergillus niger</i> FTCC 5003	Palm çekirdeği atığı (palm kernel cake) / KKF	Abdeshanian vd. (2009)
<i>Aspergillus niger gr</i>	Keçiyoynuzu gamı / SKF	Kote vd. (2009)
<i>Aspergillus flavus gr</i>	Keçiyoynuzu gamı / SKF	Kote vd. (2009)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 20114	Pepton / SKF	Mohamad vd. (2011)
<i>Aspergillus niger</i>	Guar gamı / SKF	Norita vd. (2010)
<i>Scopulariopsis candida</i> LMK 004	Keçiyoynuzu gamı / SKF	Mudau ve Setati (2008)
<i>Streptomyces sp.</i> PG-08-03	Guar gamı / SKF	Bhoria vd. (2009)
Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> AsT3 ATCC 11906	Glukoz / SKF	Yatmaz vd. (2020)

2.7.Prebiyotikler

Prebiyotik substratlar, bağırsaktaki mikroorganizmalar tarafından seçici olarak fermente edilerek konakçıya sayısız sağlık yararı sağlamaktadır (Jana vd. 2021). Böylece prebiyotikler, sağlığı teşvik eden bağırsak mikrobiyotasını zenginleştirerek konağa anti obezite, anti neoplastik ve immünomodülatör etkiler kazandırmaktadır (Jana vd. 2021). Prebiyotiklerin önemli özellikleri arasında mide suyunda asit stabilitesi, gastrointestinal (GI) enzimlere direnç, üst GI yolunda emilim olmaması ve prebiyotik bağırsak mikroflorasının seçici olarak zenginleştirilmesi yer almaktadır (Jana vd. 2021).

Gıdaların prebiyotik olarak ifade edilebilmeleri için birkaç önemli özelliğe sahip olmaları gerekmektedir (Dominguez vd. 2014).

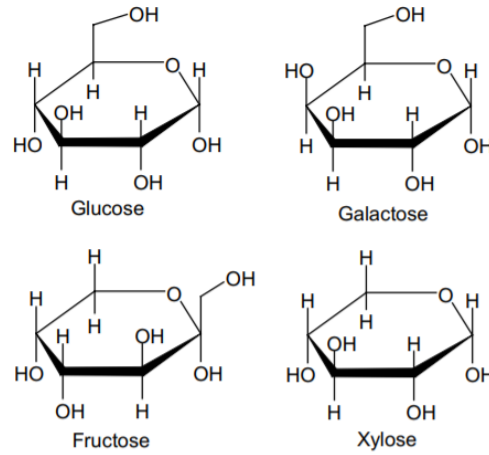
- Kolona önemli miktarlarda ulaşabilmesi için gastrointestinal sistemin üst kısmında hidrolize edilmemeli veya absorbe edilmemelidir.
- Gelişmesi uyarılan bir veya birden fazla bakteri için seçici bir substrat olmalıdır (Dominguez vd. 2014).

Fruktooligosakkaritler (FOS), manooligosakkaritler (MOS), ksilooligosakkaritler (XOS), galaktooligosakkaritler (GOS) gibi çeşitli fonksiyonel sindirilemeyen oligosakkaritler sahip oldukları prebiyotik özellikler nedeniyle Dünya çapında oldukça önemli bir yere sahiptir (Jana vd. 2021).

2.7.1.Oligosakkaritler

Günümüzde, sağlığı olumlu yönde etkileyen ve hastalık riskinin azaltılmasını teşvik eden gıdaların kullanımı oldukça popüler hale gelmektedir. Bu nedenle sindirilemeyen oligosakkaritler de oldukça önem kazanmaktadır.

Oligosakkaritler, 2 ile 10 arasında monosakkarit içeren bileşikler olarak adlandırılmaktadır (Mussatto ve Mancilha 2007). Bazı kaynaklara göre ise 3 ila 19 monosakkaritten oluşan bileşikler de oligosakkarit olarak kabul edilmektedir (Mussatto ve Mancilha 2007). Ek olarak oligosakkaritler fizyolojik özellikleri bakımından sindirilen ve sindirilemeyen oligosakkaritler olarak sınıflandırılmaktadır (Mussatto ve Mancilha 2007). Sindirilemeyen oligosakkarit kavramı, bazı oligosakkaritlerin monosakkarit birimlerinin anomerik karbon atomunun (C1 veya C2), glikozidik bağlarını insan sindirim enzimlerinin hidrolitik aktivitesine sindirilemez hale getiren bir konfigürasyona sahip olduğundan kaynaklandığı bilinmektedir (Mussatto ve Mancilha 2007). Sindirilemeyen oligosakkaritler ise genel olarak glikoz, fruktoz, ksiloz ve galaktoz birimlerini içermektedir (Şekil 2.5.) (Mussatto ve Mancilha 2007).



Şekil 2.5. Sindirilemeyen oligosakkaritleri oluşturan yapı taşları (Mussatto ve Mancilha 2007)

Oligosakkaritler, düşük kaloriye sahip olmaları, kolondaki yararlı mikrofloranın gelişimini olumlu yönde etkilemeleri, enfeksiyon riskini düşürmeleri ve bağışıklık sisteminde iyileşme göstermeye neden olmaları vb. tüketici sağlığını olumlu yönde etkileyen özelliklere sahip olmaları nedeniyle gıda katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır (Mussatto ve Mancilha 2007).

Gıda endüstrisinde oligosakkaritlerin gıda aromasında modifikasyonlar sağlayarak ve fizikokimyasal özelliklerini geliştirerek birçok gıdanın kalitesini iyileştirme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir (Mussatto ve Mancilha 2007). Oligosakkaritler, sükrozun 0,3 ila 0,6 katı daha tatlı olmaları nedeniyle gıda endüstrisinde sükroz ikamesi olarak, düşük kaloriye sahip olmaları nedeniyle gıda formülasyonlarında kabartıcı ajan olarak ve nem tutma kapasitelerinin yüksek olmaları nedeniyle su aktivitesini artırmadan nem tutucu olarak kullanılabilirler (Patel ve Goyal 2011).

Oligosakkaritlerin endüstriyel olarak üretimleri, doğal kaynaklardan ekstraksiyon, enzim ile üretim ve kimyasal üretim olmak üzere 3 grupta incelenebilmektedir (Swennen vd. 2006). Bazı oligosakkaritler (rafinoz, laktuloz vb.) hariç, endüstriyel olarak oligosakkarit üretimi enzimatik proseslerle gerçekleştirilmektedir (Mussatto ve Mancilha 2007). Ksilen ve nişasta gibi polisakkaritlerin enzimatik hidrolizasyonları sonucu veya sükroz ve laktoz gibi basit şekerlerin transglükosilasyon reaksiyonları sonucu üretilmektedirler (Mussatto ve Mancilha 2007). Bu prosesler sonucu polimerizasyon derecelerinde ya da glikozidik bağların pozisyonunda farklılık gösterebilen oligosakkaritler üretilmektedir (Mussatto ve Mancilha 2007). Oligosakkarit oluşumundan sonra reaksiyona girmemiş substratlar ya da monosakkaritler de mevcut olabileceği için daha saf ürün oluşturmak amacıyla çeşitli membran ve kromatografik prosesler kullanılarak uzaklaştırılmaktadır (Mussatto ve Mancilha 2007).

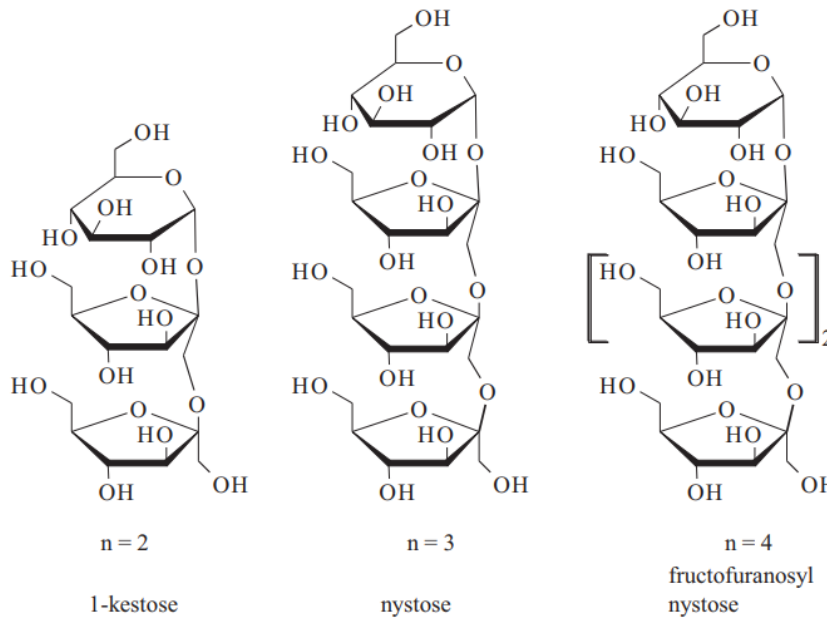
2.7.1.1. Fruktooligosakkaritler (FOS)

Fruktooligosakkaritler (FOS) (Şekil 2.6.), fruktoz oligomerlerinin ortak adıdır ve genel olarak inülin tip oligosakkaritler anlamına gelmektedir (Dominguez vd. 2014). Bunlar esas olarak 1-kestoz, nistoz ve 1- β -fruktofuranozil nistozdan oluşmaktadır (Dominguez vd. 2014). Soğan, buğday, çavdar, arpacık soğanı, domates, muz, sarımsak, yer elması vb. bazı sebzelerde doğal olarak bulunmaktadır veya sakkaroz veya inülininden mikrobiyal enzimler (β -D-fruktofuranozidaz veya fruktosiltransferaz) ile üretilebilirler (Bali vd. 2015). Gıda endüstrisinde FOS'ların kullanımlarındaki artış, FOS üretimi için yeni metotların keşfedilmesine neden olmuştur (Bali vd. 2015).

FOS'un endüstriyel olarak üretimi, mantarlar, bakteriler, mayalar gibi mikrobiyal kaynaklardan izole edilen transfruktozilasyon aktivitesine sahip enzimlerin etkisini içermektedir (Bali vd. 2015). Ticari olarak gıda sınıfı FOS, hücre içi enzimler kullanılarak sakkaroz ve inülininden üretilmektedir (Bali vd. 2015).

Mikrobiyal enzimler kullanılarak enzim üreten tüm hücreler, izole enzimler veya immobilizasyon teknolojisi (tüm hücre veya enzim immobilizasyonu) gibi farklı yöntemlerle enzimlerin uygulanması ile üretilmektedir (Bali vd. 2015). İnülin hidrolizi veya sakkarozun transfruktozilasyonu ile üretilirler (Dominguez vd. 2014).

FOS'lar gıda endüstrisinde yağ ve şeker ikamesi olarak kullanılabilirler (Morris ve Morris 2012). Kabul edilebilirlik ve tokluk açısından umut verici sonuçlar veren mortadella ve sosis gibi düşük yağlı et ürünlerinde inülin ve FOS'un tanıtılması için çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Morris ve Morris 2012).



Şekil 2. 6. FOS'ların yapısı. Sırasıyla, 1-kestoz, nistoz ve fruktofuranozil nistoz (Bali vd. 2015)

2.7.1.2.Mannooligosakkaritler (MOS)

Mannooligosakkaritler (MOS) (Şekil 2.7.) temel olarak α -MOS ve β -MOS olmak üzere 2 tip oligosakkaritler olarak sınıflandırılmaktadır (Singh vd. 2018). Lineer mannoz şekeri zincirlerinden oluşmaktadır ve prebiyotik özelliklere sahiptirler (Singh vd. 2018). İnsan ve hayvanların sindirim sisteminde patojen kolonizasyonu önlemek için katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar (Singh vd. 2018). β -MOS, mannanların endo-1,4-mannanaz (EC 3.2.1.78) tarafından rastgele hidrolizi ile üretilmektedir ve polimerizasyon derecelerine ve ikame edicinin varlığına/konumuna göre değişkenlik göstermektedir (Singh vd. 2018).

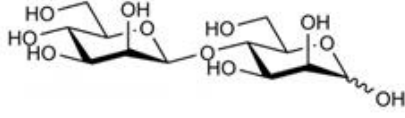
Mannooligosakkaritler, mannan içeriği zengin olan lignoselülozik materyallerden (ticari substratlar ve tarımsal atıklardan) üretilmektedir (Singh vd. 2018). Kopra küspesi, hurma çekirdeği küspesi, kullanılmış kahve tozu, patates kabuğu vb. farklı tarımsal atıklar farklı oligosakkaritlerin üretimi için kullanılmaktadır (Singh vd. 2018).

Mannooligosakkaritler kimyasal, enzimatik ve fiziksel olmak üzere 3 farklı metotla üretilmektedir (Singh vd. 2018). Farklı mannanlardan MOS üretimi için deterjanla muamele, hidrotermal muamele ve asit veya alkali hidroliz gibi farklı yöntemler ile fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmıştır (Jana vd. 2021).

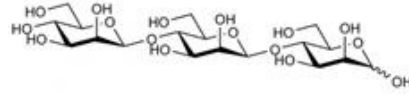
Enzimatik hidroliz, en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Mannanın depolimerizasyonu için endo- β -mannanaz enzimi kullanılmaktadır (Singh vd. 2018). Mannan, glukomannan, galaktomannan ve galaktoglukomannanda bulunan β -1,4 mannozidik bağların rastgele olarak kırılmasına neden olarak çeşitli manooligosakkaritleri üretmektedir (Singh vd. 2018).

Mannooligosakkaritler, gastrointestinal sistemde yararlı mikrofloranın gelişimini desteklemesi için prebiyotikler olarak kullanılmaktadır ve bu nedenle fonksiyonel gıda uygulamalarında kullanılabilir (Singh vd. 2018). Ayrıca konakçıya antitümör ve antialerjik özellikler kazandırdıkları bilinmektedir (Singh vd. 2018).

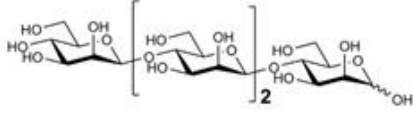
Mannobiiose



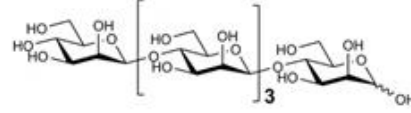
Mannotriose



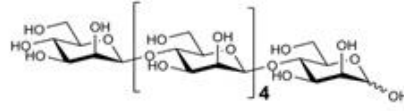
Mannotetraose



Mannopentaose



Mannohexaose



Şekil 2.7. MOS'ların yapısı. Sırasıyla mannobiyoz, mannotriyoz, mannotetroz, mannopentoz ve mannoheksoz (Megazyme)

Bu tez çalışmasında, kahvenin ve/veya atıklarının uygun kimyasal kompozisyonu nedeniyle FOS ve MOS üretimi için potansiyel bir kaynak olarak kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaçla; pH, katı:sıvı miktarı, miks miktarı ve sıcaklık olmak üzere 4 farklı parametre ile Plackett- Burman deneme deseni oluşturulmuştur. Bu deneme deseni kullanılarak inülinaz ve β -mannanaz enzimlerinin *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) ve rekombinant *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906) mikroorganizmaları kullanılarak mikrobiyal üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen enzimlerin demlenen filtre kahvelere enzimasyonu sonucunda kahvede prebiyotik oligosakkaritlerin (FOS ve MOS) oluşum miktarı ve oligosakkarit profilleri belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Yapılan çalışmada kullanılan materyaller ve bu materyallerin temin edildiği yerler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan materyaller ve bu materyallerin temin edildikleri yerler

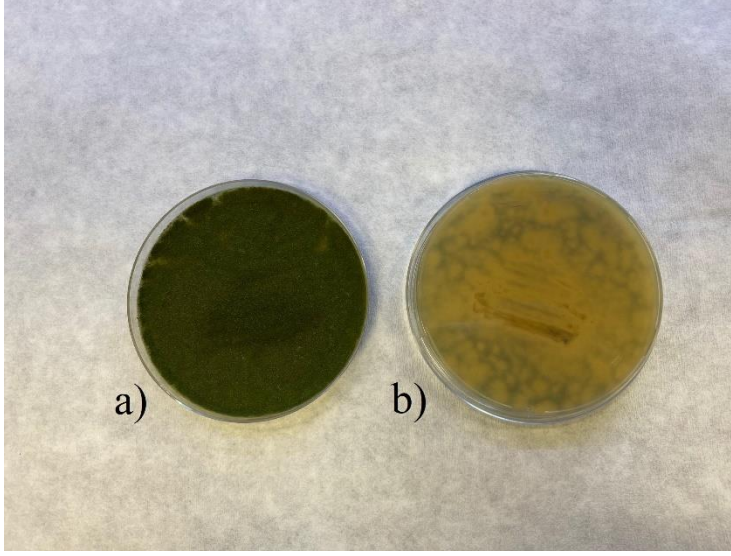
Substrat Materyalleri	Temin Edildiği Yer
Kahve Posası	Lokal kafeler
Filtre Kahve	Altıntelve Kahveleri (KÜBAŞ Kütahya Bak. Tüketim Maddeleri Ticaret ve San. A.Ş.)
Besiyeri Materyalleri	Temin Edildiği Yer
Maya Ekstraktı	Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot.1.03753.0500
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, Lot.BCBD6849V
K ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot.1.05101.1000
Mikroorganizma	Temin Edildiği Yer
İnokülasyon Materyalleri	Temin Edildiği Yer
Malt Ekstrakt Agar (MEA)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot.1.05398.0500
Patato Dextrose Agar (PDA)	Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot.1.10130.0500
Tween-80	Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot.8.22187.0500
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Germany, Lot.1.06404.1000

3.2. Mikroorganizma ve İnokülasyon

Bu çalışmada, inülinaz enzimi üretimi için Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan satın alınan *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) ve β -mannanaz enzimi üretimi için Prof. Dr. Zümrüt Begüm Ögel'in laboratuvarından temin edilen rekombinant *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906) (Duruksu vd. 2009) mikroorganizmaları kullanılmıştır.

Aspergillus niger A42 (ATCC 204447) (Şekil 3.1.) mikroorganizmasının gelişimi için Malt Ekstrakt Agar (MEA) (48 g/L) kullanılarak ekimi gerçekleştirilmiş ve 4 gün boyunca 30°C'lik etüvde (Memmert, UF 110 Plus, Schwabach, Germany) gelişime bırakılmıştır. İnkübasyonu sonlanan petriyer gerektiğinde kullanılmak üzere +4°C'de depolanmıştır. Verimliliğin ve canlılığın korunabilmesi için bu ekim işlemi on beş günde bir yenilenmiştir.

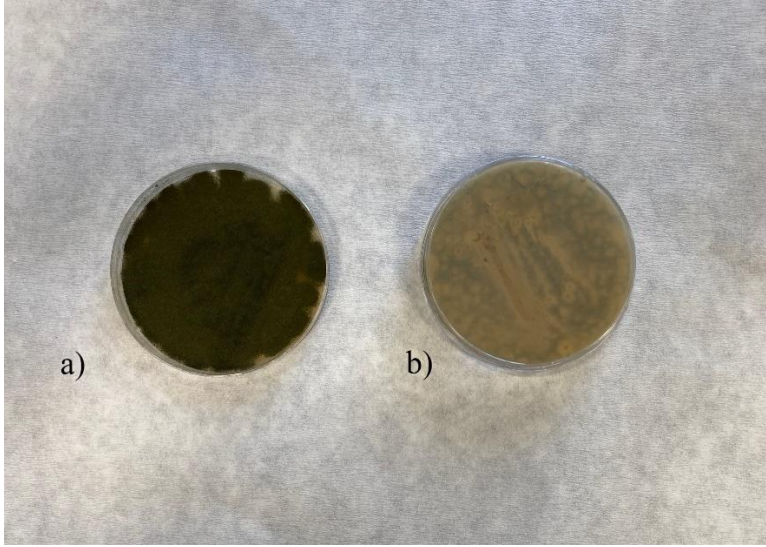
Yapılan fermentasyonlarda inokülasyon, hazırlanan %0.0001'lik Tween-80 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tween-80 çözeltisi hazırlanıp sterilize edildikten sonra geliştirilen petriyerden birinin içerisine pipetle 2 kere 10 mL olarak ilave edilmiştir ve elde edilen çözelti inokülasyonda kullanılmıştır.



Şekil 3.1. *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) ekimi yapılmış petriler. **a)** Petrinin üstten görünüşü; **b)** Petrinin alttan görünüşü

Rekombinant *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906) (Şekil 3.2.) mikroorganizmasının gelişimi için Patato Dextrose Agar (PDA) (39 g/L) kullanılarak ekim gerçekleştirilmiş ve 4 gün boyunca 30°C'lik etüvde (Memmert, UF 110 Plus, Schwabach, Germany) gelişime bırakılmıştır. İnkübasyonu sonlanan petriler gerektiğinde kullanılmak üzere +4°C'de depolanmıştır. Verimliliğin ve canlılığın korunabilmesi için bu ekim işlemi on beş günde bir yenilenmiştir.

Yapılan fermentasyonlarda inokülasyon, hazırlanan %0.05'lik Tween80 ve %0.8'lik NaCl çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tween-80 ve NaCl çözeltileri ayrı olarak hazırlanıp sterilize edildikten sonra steril kabin içerisinde birleştirilmiştir ve geliştirilen petrilerden birinin içerisine pipetle 2 kere 10 mL olarak ilave edilmiştir ve elde edilen çözelti inokülasyonda kullanılmıştır.



Şekil 3.2. *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906) ekimi yapılmış petriler, **a)** Petrinin üstten görünüşü; **b)** Petrinin alttan görünüşü

3.3 Katı Kültür Fermentasyonu

İnülinaz ve β -mannanaz enzimleri üretimi katı kültür fermentasyon yoluyla gerçekleştirilmiştir. Bu fermentasyonlar için 4 farklı parametre belirlenmiş olup bu parametreler kullanılarak Plackett-Burman deneme deseni oluşturulmuştur.

Belirlenen Parametreler:

1. pH

- Minimum=4
- Maksimum=8

2. Katı : Sıvı Oranı

- Minimum= 1:2
- Maksimum=1:4

3. Miks Miktarı

- Minimum=0 (miks yok yalnızca kahve posası)
- Maksimum=1:1 (kahve posası ve öğütülmüş kahve miks)

4. Sıcaklık

- Minimum=30°C
- Maksimum=50°C

Oluşturulan Deneme Deseni:

İnülinaz ve β -mannanaz enzimlerinin üretimi için belirlenen 4 parametre ile oluşturulan Plackett-Burman deneme deseni Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. İnülinaz ve β -mannanaz enzimleri üretimi için belirlenen parametreler ile oluşturulmuş Plackett-Burman deneme deseni

StdOrder	RunOrder	CenterPt	Blocks	pH	Katı-sıvı	Miks mikt.	Sıcaklık (°C)
6	1	1	1	4	4	0	50
4	2	1	1	4	4	1	50
5	3	1	1	8	2	1	50
1	4	1	1	8	2	0	50
8	5	1	1	4	2	0	30
7	6	1	1	4	2	1	30
3	7	1	1	8	4	1	30
2	8	1	1	8	4	0	30
10	9	0	1	6	3	0,5	40
9	10	0	1	6	3	0,5	40

Fermentasyonlarda kullanılan besiyeri içeriği inülinaz enzimi için maya ekstraktı (%1) ve β -mannanaz enzimi üretimi için ise maya ekstraktı (4 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g/L) ve K_2HPO_4 (1 g/L) olarak kullanılmıştır (Yılmaz vd. 2021).

Gerçekleştirilen her fermentasyon iki paralelli olarak gerçekleştirilmiştir ve bu fermentasyonlar için 5 g katı substrat ve hazırlanan sıvı besiyeri ilavesi oluşturulan deneme desenine göre katı:sıvı oranlarında yapılmıştır. Başlangıç pH değerleri ayarlanarak erlenler $121^\circ C$ 'de 15 dk sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası alınan erlenler, inülinaz enzimi üretimi için %7 ve mannanaz enzimi üretimi için %5 inokülasyon oranlarında inoküle edilmiştir. İnokülasyon işlemi sonrası erlenler, $30^\circ C$, $40^\circ C$ ve $50^\circ C$ olarak belirlenen sıcaklıklarda 7 gün fermentasyona bırakılmıştır (Yılmaz vd. 2021). Fermentasyon sonrası ekstraksiyon edilmek üzere alınan erlenler Şekil 3.3.'te gösterilmiştir.



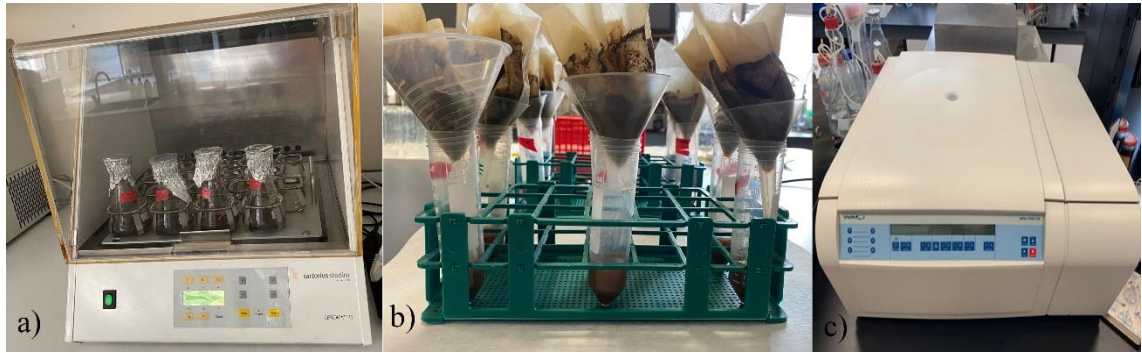
Şekil 3.3. Fermentasyon sonrası etüvlerden alınan bazı erlenlerin görüntüleri

3.4. Ekstraksiyon

Fermentasyonları sonlandırılan erlenlerin enzim ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. İnülinaz enzimi ekstraksiyonu için erlenlere hazırlanan Na-asetat tamponundan (0,1 M, pH=4,8) 20 mL ilave edilerek 250 rpm'de 30°C'de 1 saat çalkalamalı inkübatörde ekstraksiyona bırakılmıştır. 1 saat sonunda alınan erlenler kaba filtre kağıdı kullanılarak süzümüştür ve 1500 x g'de 4°C'de 20 dk santrifüj (VWR, Mega Star 3.0R) edilmiştir (Chen vd. 2011).

Mannanaz enzimi ekstraksiyonu için erlenlere 20 mL saf su ilave edilerek 250 rpm'de 30°C'de 1 saat çalkalamalı inkübatörde ekstraksiyona bırakılmıştır. 1 saat sonunda alınan erlenler kaba filtre kağıdı kullanılarak süzümüştür ve 1800 x g'de 4°C'de 20 dk santrifüj (VWR, Mega Star 3.0R) edilmiştir (Yılmaz vd. 2021).

Fermentasyondan sonra alınan erlenlerin ekstraksiyonuna ait görüntüler Şekil 3.4.'te verilmiştir.



Şekil 3.4. Ekstraksiyon aşamalarının görüntüleri. **a)** Çalkalamalı inkübatör; **b)** Kaba filtre kağıdı kullanılarak örneklerin süzülmesi; **c)** Santrifüj cihazı

3.5. Örneklerin Analiz Edilmesi

Ekstraksiyon işlemleri sonunda elde edilen örnekler daha sonra kullanılmak ve analiz edilmek üzere +4°C'de, uzun süreli muhafaza için de -20°C'de depolanmıştır. Bu örneklerin enzim analizleri, şeker analizi, protein analizi ve FOS, MOS analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Enzim analizleri

Elde edilen örneklerde inülinaz enzim aktivite analizi, invertaz enzim aktivite analizi ve β -mannanaz enzim aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.5.1.1. İnülinaz ve İvertaz enzim aktivite analizi

İnülinaz ve invertaz enzim aktivitesi analizleri DNSA metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Miller 1959). 0,1 M Na-asetat tampon çözeltisi (pH=4,8) ile %2'lik inülin ve %2'lik sükroz çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan Na-asetat çözeltisi kullanılarak seyreltilen örneklerden 0,1 mL ve hazırlanan inülin ve sükroz çözeltilerinden de 0,9 mL alınarak tüplere aktarılmış ve karıştırılmıştır. 60°C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Su banyosundan alınan tüplere 1,5 mL DNSA çözeltisi eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Örneklerden gelen indirgen şekerin absorbans değerlerinin ölçülebilmesi için 0,1 mL seyreltilmiş örnek, 0,9 mL inülin/sükroz çözeltisi ve 1,5 mL DNSA çözeltisi tüplere aktarılarak kontrol örnekleri hazırlanmıştır. Kör örnekleri 0,1 mL saf su, 0,9 mL inülin/sükroz çözeltisi ve 1,5 mL DNSA çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Birinci inkübasyondan alınan örnekler, kontrol örnekleri ve kör örnekleri enzim aktivitesini durdurmak amacıyla 100°C'de 10 dakika boyunca su banyosunda ikinci inkübasyona bırakılmıştır. 10 dakika sonunda alınan örnekler soğuduktan sonra spektrofotometrede (ThermoScientific, Evolution 201, UV Visible Spectrophotometer, Şangay, Çin) 540 nm dalga boyunda köre karşı okutularak elde edilen absorbans değerleri kaydedilmiştir. İnülinaz enzim aktivitesi ve invertaz enzim aktivitesi hesaplanması için Eşitlik 1 kullanılmıştır. Enzim analizinin hesaplamalarında kullanılan standart fruktoz kurvesi EK-1'de verilmiştir.

$$\text{İnülinaz Aktivitesi: } \frac{C_f * RV * SF}{t} \quad \text{Eşitlik (1)}$$

C_f : Fruktoz konsantrasyonu ($\mu\text{mol/mL}$)

RV : Test tüpünün toplam hacmi / enzim solüsyonunun hacmi

SF : Seyreltme faktörü

t : Reaksiyonda kalma süresi (dk)

3.5.1.2. β -Mannanaz enzim aktivite analizi

β -mannanaz enzim aktivite analizinin gerçekleştirilmesi için %0,05'lik keçiyoynuzu gamı (locust bean gum, LBG) çözeltisi hazırlanmıştır. 50 mM'lik sodyum nitrat çözeltisinde (pH=6) hazırlanan LBG çözeltisinden 1,8 mL alınarak test tüplerine ilave edilmiştir. Örnekler seyreltme yapılmıştır ve seyreltilen örneklerden 0,2 mL test tüplerine alınarak karıştırılmıştır. 50°C'de 5 dakika su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan alınan örnekler 3 mL DNSA çözeltisi ilave edilmiştir. Kontrol örnekleri hazırlanmıştır. 1,8 mL LBG çözeltisi, 0,2 mL saf su ve 3 mL DNSA kullanılarak kör hazırlanmıştır. Örnekler, kontrol örnekleri ve kör örnekleri 90°C'deki su banyosuna 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Soğutulan örnekler 540 nm'de spektrofotometrede (ThermoScientific, Evolution 201, UV Visible Spectrophotometer,

Şangay, Çin) ölçülerek değerleri kaydedilmiştir (Puchart vd. 2004). Hesaplamalarda kullanılan mannoz standart kurvesi EK-2’de verilmiştir.

3.5.2. Toplam şeker analizi

Elde edilen örneklerin toplam şeker analizi 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Miller 1959). 0,05 mL örnek, 1,95 mL saf su ve 0,04 mL HCl (12 M) tüplere eklenmiştir ve karıştırılmıştır. 90°C’lik su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası alınan tüplere 0,1 mL KOH (5N) eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Tüplerin her birinden 0,64 mL alınmış ve atılmıştır. Kalan karışımlara 1,5 mL DNSA çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. 1,5 mL saf su ve 1,5 mL DNSA çözeltisi eklenerek kör hazırlanmıştır. 90°C’lik su banyosunda 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası alınan tüplere 0,5 mL PST (KNaC₄H₄O₆) çözeltisi eklenmiştir ve oda sıcaklığına soğutulmuştur. Spektrofotometrede (ThermoScientific, Evolution 201, UV Visible Spectrophotometer, Şangay, Çin) 575 nm’de okutulan absorbans değerleri kaydedilmiştir. Örneklerin şeker miktarları EK-3’te verilen standart sakaroz çözeltisi ile hazırlanan curve kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5.3. Protein analizi

Örneklerin protein analizi için ThermoScientific Coomassie (Bradford) Protein Analiz Kiti kullanılmıştır. Test tüplerine 30 µL örnek ve 1,5 mL Coomassie (Bradford) Protein Assay Reagent konularak karıştırılmıştır. 10 dakika oda sıcaklığında ışık almayan bir yerde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda spektrofotometrede 595 nm’de ölçümleri yapılarak değerleri kaydedilmiştir (Bradford 1976).

Protein standart kurvesinin oluşturulması için albümin ampulleri (2 mg/mL) kullanılarak hazırlanan standartların spektrofotometrede 595 nm’de ölçülen değerler kullanılarak hem inülinaz üretimi için hem de β-mannanaz üretimi için standart curve oluşturulmuştur. Oluşturulan standart curve grafikleri EK-4 ve EK-5’te verilmiştir. Curve grafiğinden elde edilen denklem kullanılarak toplam protein değerleri (mg/mL) olarak hesaplanmıştır.

3.6. Enzimatik Oligosakkarit Üretimi

Üretilen enzimler kullanılarak gerçekleştirilen oligosakkarit üretimi için, french press kullanılarak demlenen kahve ekstraktlarına (%20) üretilen enzimler uygulanmıştır. Demlenen kahve ekstraktlarına 7,5 mL enzim ilavesi yapılmış ve 40°C’lik etüvde 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır (Erkan vd 2021). İnkübasyon sonrası (Şekil 3.5.) FOS, MOS ve viskozite analizleri için örnekler hazırlanmıştır.



Şekil 3.5. İnkübasyon sonrası alınan bazı beherlerin görüntüsü

3.6.1. Fruktooligosakkarit (FOS) ve Mannooligosakkarit (MOS) Örneklerinin Analiz Edilmesi

Üretilen enzimler kahve ekstraktlarına uygulanmıştır ve oluşan FOS, MOS miktarları ve profilleri HPLC cihazı ile analiz edilmiştir.

3.6.1.1. Fruktooligosakkarit (FOS) analizi

Örnekler UF saf su kullanılarak 20 kat seyreltilmiştir. Seyreltilen örnekler filtreden (Chromafil PET-45/25) geçirilerek viyalere alınmıştır. Hazırlanan örnekler RefractoMax 520 kırılma indisi dedektörü, kolon fırını ve bilgisayar ile donatılmış bir HPLC (ThermoScientific UltiMate 3000, Dreieich, Almanya) cihazı kullanılarak FOS profili ve miktarı analizi yapılmıştır. Analiz koşulları olarak 1 mL/dk akış hızında 10 µL enjeksiyon hacmi, Shodex KS-801 kolonu ile 50°C kolon sıcaklığı ve ultra saf su mobil faz kullanılmıştır. 1,1,1-kestopentoz standardı Megazyme (Bray, İrlanda) tarafından temin edilmiştir. Analiz sonunda hesaplanan değerler ppm cinsinden ifade edilmiştir. FOS hesaplamalarında kullanılan 1,1,1-kestopentoz standardı EK-6'da verilmiştir.

3.6.1.2. Mannooligosakkarit (MOS) analizi

Örnekler, UF saf su kullanılarak 20 kat seyreltilmiştir. Seyreltilen örnekler filtreden (Chromafil PET-45/25) geçirilerek viyalere alınmıştır. Hazırlanan örnekler, RefractoMax 520 kırılma indisi dedektörü, kolon fırını ve bilgisayar ile donatılmış bir HPLC (ThermoScientific UltiMate 3000, Dreieich, Almanya) cihazı kullanılarak MOS

profili ve miktarı analizi yapılmıştır. Analiz koşulları olarak 1 mL/dk akış hızında 20 µL enjeksiyon hacmi, CarboPac PA100 kolonu ile 25°C kolon sıcaklığı ve 100mM NaOH mobil faz kullanılmıştır (Erkan vd. 2021). Mannobiyoz, mannotriyoz, mannotetroz, mannopentoz ve mannoheksoz standartları Megazyme (Bray, İrlanda) tarafından temin edilmiştir. Analiz sonunda hesaplanan değerler ppm cinsinden ifade edilmiştir. MOS hesaplamalarında kullanılan standart kurveler EK-7’de verilmiştir.

3.6.2. Viskozite analizi

Örneklerin viskozite analizleri Brookfield DV-II+Pro Viskozimetresi (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz koşulları, oda sıcaklığında, SC4-21 Spindle kullanılarak 200 rpm olarak belirlenmiştir (Erkan vd. 2021). Sonuçlar centi-Poise olarak ifade edilmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

İnülinaz ve β-mannanaz enzim analizleri için oluşturulan deneme deseni Minitab İstatistiksel Yazılımı (Version 13.3; Minitab Inc., State College, PA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon denemelerinin analiz sonuçlarını değerlendirmek amacıyla SAS istatistiksel programı (Versiyon 9; SAS Institute Inc., Cary, ABD) kullanılmıştır. %95 önem seviyesinde Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi gerçekleştirilmiştir. Tüm değerler en az 2 ayrı tekrarın ortalaması şeklinde verilmiş olup tablolarda ortalama ± standart hata şeklinde belirtilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

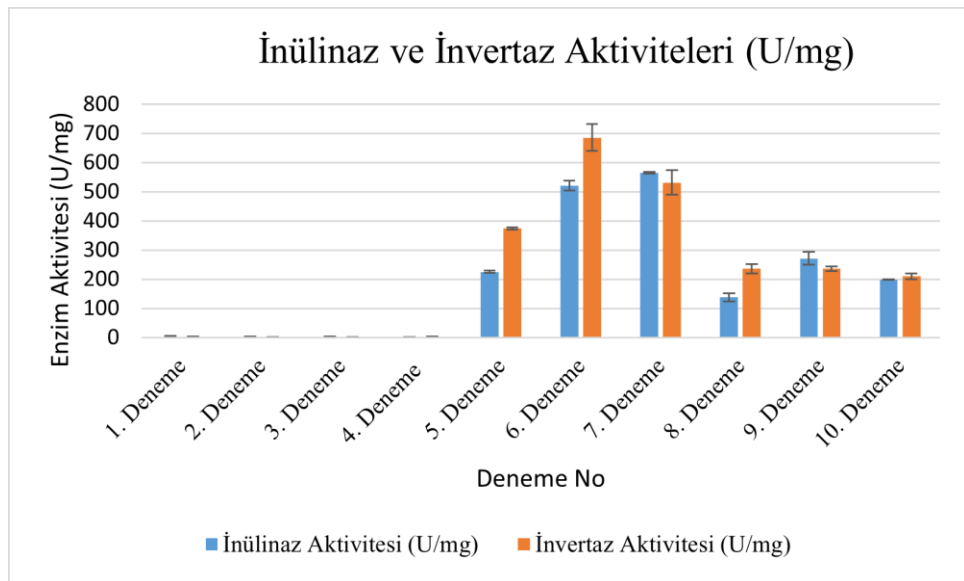
4.1. İnülinaz Enzimi Üretimi

Plackett-Burman deneme deseni ile oluşturulmuş 10 farklı fermentasyon denemesi inülinaz üretimi için gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1.'de verilmiştir. 4 farklı parametre belirlenmiş olup, bu parametrelerin enzim üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Kinetik parametre olarak enzim aktivite değerleri (U/mg) cinsinden hesaplanarak verilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde en yüksek inülinaz enzim aktivitesi $564,0655 \pm 2,636$ U/mg ile 7 numaralı denemeden, en düşük inülinaz enzim aktivitesi ise $0,394 \pm 0,098$ U/mg ile 4 numaralı denemeden elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Şekil 4.1. 'de 1, 2, 3 ve 4 numaralı besiyerlerinde inülinaz enzim üretiminin oldukça düşük olduğu/olmadığı görülmektedir.

Bunlara ilaveten en yüksek invertaz aktivitesi $685,450 \pm 45,882$ U/mg ile 6 numaralı denemeden, en düşük invertaz aktivitesi ise $0,984 \pm 1,712$ U/mg ile 4 numaralı denemeden elde edilmiştir. Yalnızca 2 numaralı denemede invertaz aktivitesine rastlanmamıştır (Çizelge 4.1.). Benzer şekilde 1, 2, 3 ve 4 numaralı besiyerlerinde invertaz aktivitesinin düşük olduğu görülmektedir (Şekil 4.1.).

Ekzo-inülinazlar inülin hidrolitik aktivite ile birlikte invertaz aktivitesi de göstermektedir bunun yanında endo-inülinazlar ise invertaz aktivitesi göstermemektedir (Das vd. 2019). Genel olarak bu ayrımın yapılabilmesi için, I/S (İnülinaz/İnvertaz(Sükraz)) oranı kullanılmaktadır (Das vd. 2019). I/S oranı 10^{-2} 'den büyük ise üretilen enzimin inülinaz aktivitesinde olduğu, 10^{-4} 'ten küçük ise invertaz aktivitesinde olduğu şeklinde yorumlanmaktadır (Das vd. 2019). Deneme deseni kullanılarak üretilen inülinaz enziminin bütün denemeler için I/S oranları Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Bütün örneklerin inülinaz aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 1. İnülinaz ve İnvertaz Aktiviteleri (U/mg)

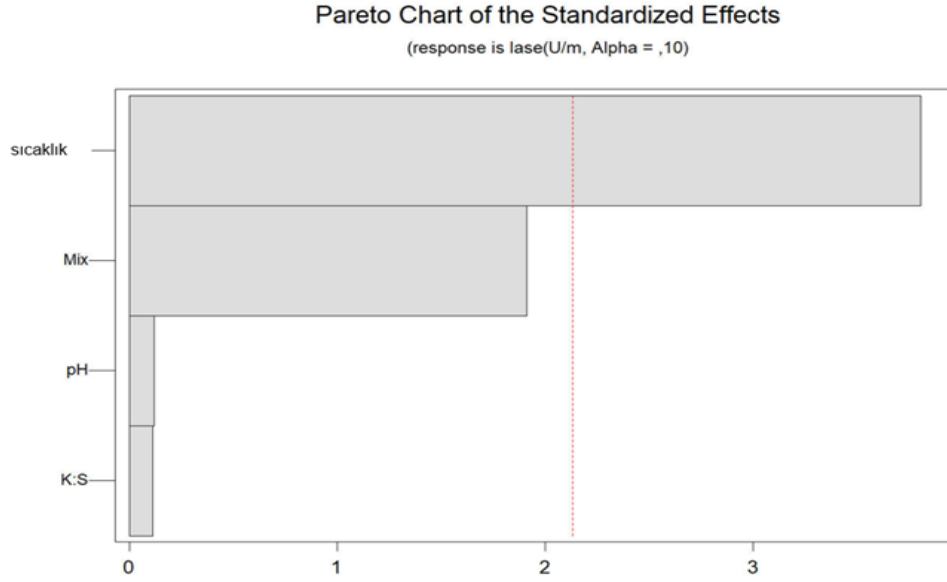
Çizelge 4.1. İnülinaz üretimine ait bulgular

Deneme	pH	Katı:Sıvı	Miks	Sıcaklık(°C)	İnülinaz Aktivitesi (U/mg)	İnvertaz Aktivitesi (U/mg)	Protein Miktarı (mg/mL)	I/S
1	4	4	0	50	1,755 ^e ±2,433	2,175 ^e ±1,096	0,638	0,807
2	4	4	1	50	2,054 ^e ±0,353	0 ^e	0,759	-
3	8	2	1	50	1,860 ^e ±0,534	1,268 ^e ±0,855	1,153	1,467
4	8	2	0	50	0,394 ^e ±0,098	0,984 ^e ±1,712	1,238	0,400
5	4	2	0	30	224,679 ^c ±4,142	374,249 ^c ±3,902	0,112	0,600
6	4	2	1	30	520,986 ^a ±16,906	685,450^a±45,882	0,153	0,760
7	8	4	1	30	564,065^a±2,636	531,048 ^b ±41,805	0,299	1,062
8	8	4	0	30	137,832 ^d ±13,837	235,568 ^d ±16,438	0,535	0,585
9	6	3	0,5	40	271,190 ^b ±22,755	235,646 ^d ±8,179	0,745	1,151
10	6	3	0,5	40	199,224 ^c ±0,570	209,499 ^d ±10,325	0,838	0,951

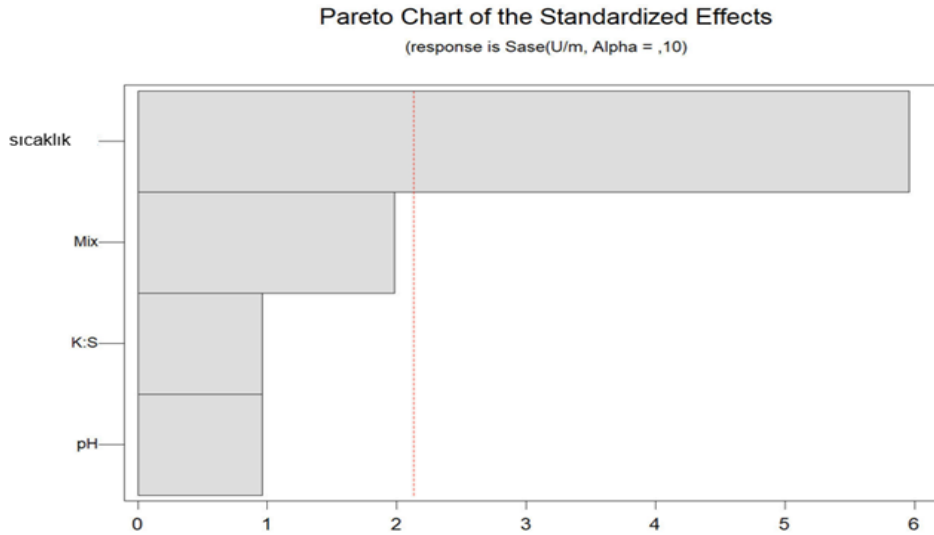
Aynı sütünda yer alan farklı harfler değerler arasındaki istatistiksel önemi göstermektedir (P<0,05).

4.1.1. Seçilen Parametrelerin İnülinaz ve İvertaz Enzimi Üretimine Etkileri

Seçilen 4 farklı parametrenin (sıcaklık, pH, katı:sıvı oranı ve miks miktarı) inülinaz ve invertaz üretimi üzerine olan etkilerinin incelenmesi ve yorumlanması için Şekil 4.2.'de inülinaz üretimi için ve Şekil 4.3.'te invertaz üretimi için Pareto grafikleri verilmiştir.



Şekil 4. 2. İnülinaz üretimi için seçilen parametrelerin Pareto grafiği



Şekil 4. 3. İvertaz üretimi için seçilen parametrelerin Pareto grafiği

Pareto grafiği, parametrelerin önemini belirtmektedir. Bir referans çizgisine sahiptir (kırmızı çizgi) ve bu referans çizgisini aşan değerlerin istatistiksel olarak anlamlı/önemli olduğu şeklinde yorumlanmaktadır. Şekil 4.2. ve Şekil 4.3'te görüldüğü gibi referans çizgisini aşan tek parametre sıcaklıktır ve bu nedenle, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Ayrıca, Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.4. incelendiğinde, pH, katı:sıvı oranı ve miks miktarının enzim üretimi üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığı görülmektedir. P değeri 0,05'ten küçük olan tek parametre değerinin inülinaz için P=0,019 ve invertaz için P=0,004 ile sıcaklık değeri olduğu görülmektedir. Çizelge 4.3.'te inülinaz ve Çizelge 4.5.'te invertaz üretimi için gerçekleştirilen varyans analizlerinin sonuçları verilmiştir. Bu analiz sonucuna göre modelin uyum eksikliği değeri sırasıyla P=0,240 ve P=0,109 olduğu için (P>0,05) model uyumludur şeklinde yorumlanmıştır.

Çizelge 4.2. İnülinaz üretimi için parametrelerin tahmini etkileri ve katsayıları

Terim	Etki	Katsayı (Coefficient)	SE Katsayı (SE Coefficient)	T	P
Sabit		181,7	47,35	3,84	0,019
pH	-11,3	-5,7	47,35	-0,12	0,911
Katı:Sıvı	-10,6	-5,3	47,35	-0,11	0,917
Miks	181,1	90,5	47,35	1,91	0,128
Sıcaklık	-360,4	-180,2	47,35	-3,81	0,019

Çizelge 4.3. Plackett- Burman deneme deseni ile gerçekleştirilen inülinaz üretiminin varyans analizi

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Ana Etki	4	325797	325797	81449	4,54	0,086
Artık Hata	4	71750	71750	17937		
Uyum Eksikliği	3	69160	69160	23053	8,90	0,24
Saf Hata	1	2590	2590	2590		
Toplam	9					

Çizelge 4.4. İnvertaz üretimi için parametrelerin tahmini etkileri ve katsayıları

Terim	Etki	Katsayı (Coefficient)	SE Katsayı (SE Coefficient)	T	P
Sabit		228,9	38,21	5,99	0,004
pH	-73,3	-36,6	38,21	-0,96	0,392
Katı:Sıvı	-73,3	-36,7	38,21	-0,96	0,392
Miks	151,2	75,6	38,21	1,98	0,119
Sıcaklık	-455,5	-227,7	38,21	-5,96	0,004

Çizelge 4.5. Plackett- Burman deneme deseni ile gerçekleştirilen invertaz üretiminin varyans analizi

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Ana Etki	4	482173	482173	120543	10,32	0,022
Artık Hata	4	46715	46715	11679		
Uyum Eksikliği	1	46373	46373	15458	4,52	0,109
Saf Hata	3	342	342	352		
Toplam	9	528951				

Böylelikle katı kültür fermentasyonu ile inülinaz ve invertaz üretimi üzerine sıcaklığın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir.

Housseiny (2014) tarafından yapılan bir çalışmada ayçiçeği yumruları ve marul kökleri olmak üzere iki farklı substrat kullanılarak inülinaz üretimi KKF yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Her iki atığın karışım olarak kullanılmasının daha yüksek endo-inülinaz üretimi ile sonuçlandığı belirtilmiştir. Ek olarak bu karbon kaynakları olarak kullanılan substratlar üzerinde 10 farklı fungal tür endo-inülinaz aktivitelerinin en iyi üretimi için taranmıştır. Bunlardan *Aspergillus niger* AUMC 9375'in 6:1 (w/w) oranında ayçiçeği yumruları:marul kökü karışımı kullanılarak geliştirildiğinde en verimli olan olduğu görülmüştür ve %50 nem, 30°C, 5 pH ve 7 günlük inkübasyonda en yüksek spesifik inülinaz aktivitesi 232.5 U/g protein olarak bulunmuştur. İnülinaz iyon-değişim kromatografisi ve jel-filtrasyon metotları kullanılarak 51,11 kat saflaştırılmıştır. Ayçiçeği yumrusu ve marul kökü karışımının inülinaz üretiminde ekonomik ve etkili bir potansiyel substrat olduğu belirtilmiştir. İnülinaz, %71,28 verimle başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir. 60°C'de 2 saat inkübasyon sonrasında serbest enzim aktivitesi belirgin şekilde %10'a düşerken, immobilize enzim formunun sadece %87'ye düşmüştür. Yeniden kullanılabilirlik testi sonucunda immobilize inülinazın 10 döngü dayanıklılığını ve 4°C'de 32 gün saklanabileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar, immobilize formdaki inülinazın yüksek saflıkta fruktoz şuruplarının büyük ölçekli üretimi için potansiyel bir aday olduğunu göstermektedir.

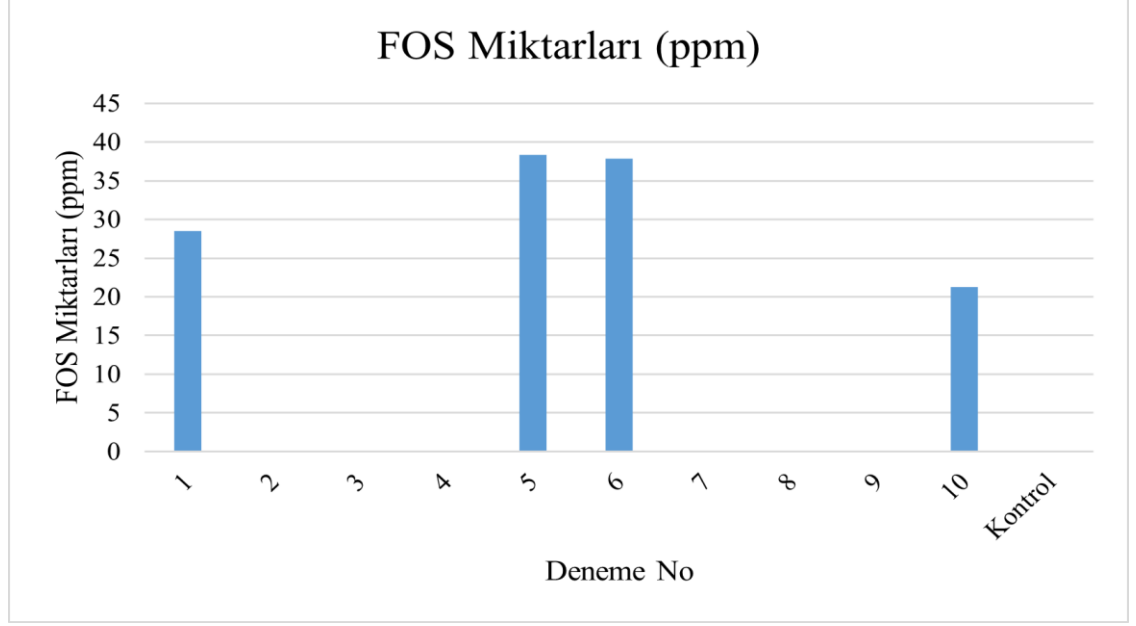
Trivedi vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, KKF yöntemi, buğday kepeği ve mısır demleme sıvısı (corn steep liquor, CSL) substratları ve yeni izole edilmiş *Aspergillus tubingensis* CR16 kullanılarak ekstraselüler, termostabil inülinaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon süresi, % nem içeriği, besiyeri pH'sı gibi proses parametrelerinin optimizasyonu için Box-Behnken Dizaynı (BBD) içeren Cevap Yüzey Metodu (Response Surface Methodology, RSM) kullanılmıştır. Maksimum inülinaz aktivitesi $257 \pm 11,4$ (U/g) olarak 5 g buğday kepeği, 10^9 spor/mL, %71,2 başlangıç nemi, 6,1 pH ve 103 saat fermentasyon süresinde elde edilmiştir. Bu fermentasyonun invertaz aktivitesi $1358,6 \pm 0,8$ U/g olarak hesaplanmıştır. Ham (crude) inülinaz maksimum aktiviteyi 60°C 'de ve 5 pH'da gösterdiği bildirilmiştir. Enzim 60°C 'de 4,5 saat boyunca aktivitesinin yaklaşık %90'ını koruduğu için termostabil bir enzim olduğu belirtilmiştir. İnülin hidrolizi sonucu son ürün olarak fruktoz elde edilmiştir ve bu nedenle üretilen enzimin ekzo-inülinaz olduğu kanıtlanmıştır.

4.2.FOS Üretimi

Plackett-Burman deneme deseni kullanılarak üretilen inülinaz enzimleri, FOS üretimi amacıyla filtre kahve örneklerine uygulanmıştır. İnkübasyon sonrası alınan örneklerde FOS profili ve FOS miktarları hesaplanmıştır. Çizelge 4.6. ve Şekil 4.4.'te belirlenen FOS ve miktarları gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Enzimasyon sonrasında yapılan HPLC analizi sonucu FOS profili ve FOS miktarları (ppm)

Deneme	1,1,1-kestopentoz (ppm)
1	28,494
2	-
3	-
4	-
5	38,341
6	37,879
7	-
8	-
9	-
10	21,262
Kontrol	-



Şekil 4. 4. HPLC analizi sonucunda hesaplanan FOS miktarları (ppm)

Yapılan enzimasyon sonucunda ortamda 1,1,1-kestopentoz FOS olarak bulunmuştur. 2, 3, 4, 7, 8 ve 9 numaralı enzim örneklerinde 1,1,1-kestopentoz rastlanmamıştır. 1, 5, 6 ve 10 numaralı örneklerde FOS miktarının enzim ilavesi yapılmayan kontrol kahve örneğine göre artış gösterdiği görülmüştür. Kontrol kahve örneğinde 1,1,1-kestopentoz rastlanmamıştır.

En yüksek 1,1,1-kestopentoz 38,341 ppm ile 5 numaralı denemeden elde edilmiştir. En düşük 1,1,1-kestopentoz ise 21,262 ppm ile 10 numaralı denemeden elde edilmiştir.

4.3. β -Mannanaz Enzimi Üretimi

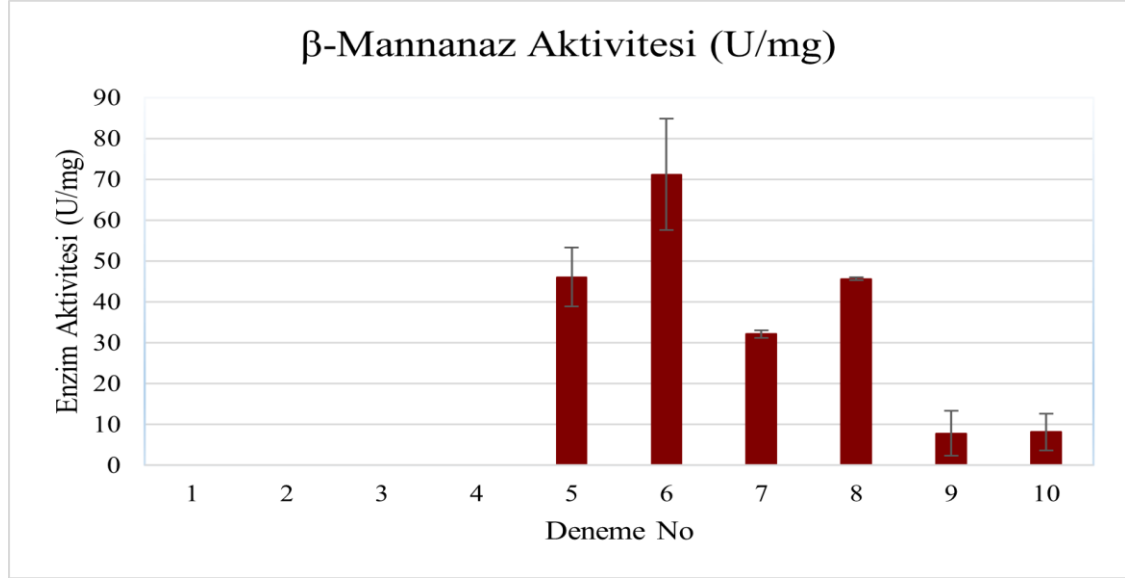
Plackett-Burman deneme deseni ile oluşturulmuş 4 farklı parametrede 10 farklı fermentasyon denemesi mannanaz üretimi için gerçekleştirilmiş olup, sonuçlar Çizelge 4.7. ve Şekil 4.5.'te verilmiştir. Kinetik parametre olarak enzim aktivite değerleri (U/mg) cinsinden hesaplanarak verilmiştir.

Çizelge 4.7. β -Mannanaz üretimine ait bulgular

Deneme	pH	Katı:Sıvı	Miks	Sıcaklık (°C)	Mannanaz Aktivitesi (U/mg)	Protein Miktarı (mg/mL)	Şeker Miktarı (g/L)
1	4	4	0	50	0,000 ^e	0,933	13,304
2	4	4	1	50	0,000 ^e	1,134	13,161
3	8	2	1	50	0,000 ^e	1,284	16,355
4	8	2	0	50	0,000 ^e	1,297	18,547
5	4	2	0	30	46,031 ^b ±7,183	1,257	11,829
6	4	2	1	30	71,174^a±13,670	1,454	14,407
7	8	4	1	30	32,084 ^b ±0,984	1,164	13,390
8	8	4	0	30	45,610 ^b ±0,330	1,678	12,516
9	6	3	0,5	40	7,797 ^c ±5,514	0,697	9,093
10	6	3	0,5	40	8,163 ^c ±4,493	0,831	12,373

Aynı sütünda yer alan farklı harfler değerler arasındaki istatistiksel önemi göstermektedir (P<0,05).

Sonuçlar incelendiğinde en yüksek β -mannanaz enzim aktivitesi 71.174±13,670 U/mg ile 6 numaralı denemeden, en düşük β -mannanaz enzim aktivitesi ise 7,797±5,514 U/mg ile 9 numaralı denemeden elde edilmiştir. 1, 2, 3 ve 4 numaralı denemelerde ise enzim aktivitesine rastlanmadığı görülmüştür. Şekil 4.5.'te sonuçlar grafik olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4. 5. Plackett-Burman Deneme Deseni kullanılarak yapılan fermentasyonlardan elde edilen β -mannanaz aktivitesi sonuçları (U/mg)

4.3.1. Seçilen Parametrelerin β -Mannanaz Enzimi Üretimine Etkileri

Sıcaklık, pH, katı:sıvı oranı ve miks miktarı olarak seçilen 4 parametrenin β -mannanaz üretimi üzerine olan etkilerinin incelenebilmesi için Pareto grafiği Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4. 6. β -Mannanaz üretimi için seçilen parametrelerin Pareto grafiği

Şekil 4.6.'da verilen Pareto grafiği incelendiğinde referans çizgisini geçen tek parametrenin sıcaklık olduğu görülmektedir. Bu nedenle, istatistiksel olarak anlamlı olan

tek parametredir. Ek olarak, Çizelge 4.8. incelendiğinde, pH, katı:sıvı oranı ve miks miktarının enzim üretimi üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığı görülmektedir. P değeri 0,05'ten küçük olan tek değer sıcaklık (P=0,002) olduğu görülmektedir. Çizelge 4.9.'da β -mannanaz üretimi için gerçekleştirilen varyans analizinin sonuçları verilmiştir. Bu analiz sonucuna göre modelin uyum eksikliği P=0,017 (P<0,05) olduğu için model uyumsuzdur şeklinde yorumlanmıştır.

Çizelge 4.8. β -Mannanaz üretimi için parametrelerin tahmini etkileri ve katsayıları

Terim	Etki	Katsayı (Coefficient)	SE Katsayı (SE Coefficient)	T	P
Sabit	-	24,36	3,494	6,97	0,002
pH	-9,88	-4,94	3,494	-1,41	0,23
Katı:Sıvı	-9,88	-4,94	3,494	-1,41	0,23
Miks	2,9	1,45	3,494	0,42	0,699
Sıcaklık	-48,72	-24,36	3,494	-6,97	0,002

Çizelge 4.9. Plackett- Burman deneme deseni ile gerçekleştirilen β -mannanaz üretiminin varyans analizi

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Ana Etki	4	5155,35	5155,35	1288,84	13,19	0,014
Artık Hata	4	390,76	390,76	97,69		
Uyum Eksikliği	3	390,69	390,69	130,23	2E+03	0,017
Saf Hata	1	0,07	0,07	0,07		
Toplam	9	2975,52				

Böylelikle katı kültür fermentasyonu ile β -mannanaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir.

Bangoria vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, yağ ekstraksiyon endüstrisi atıkları olan palm çekirdeği atığı (palm kernel cake) ve soya fasülyesi küspesi (soyabean meal) katı substrat olarak kullanılarak yeni izole edilen *Penicillium aculeatum* APS1'den ekstraselüler β -mannanaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Palm çekirdeği atığı %20 soya fasülyesi küspesi ilave edildiğinde β -mannanaz üretiminin veriminin 2807 U/g olduğu belirtilmiştir. β -mannanaz optimizasyonu için cevap yüzey metodu (Response surface methodology, RSM) kullanılmıştır. Nem seviyesi ve inkübasyon süresi olmak üzere 2 bağımsız değişkenin üretim üzerine önemli ölçüde etkisi olduğu bulunmuştur. Optimum koşullar olan %52.25 nem seviyesi ve 130 saat inkübasyon süresi sonucunda β -mannanaz üretimi 1,6 kat arttığı ve maksimum β -mannanaz aktivitesinin 4696 U/g olduğu bildirilmiştir. Ham (crude) β -mannanaz üretimi için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 6,0

ve 65°C olarak belirtilmiştir. Ham ve kısmen saflaştırılmış β -mannanazın, keçiyoynuzu gamı, guam gam ve konjak glukomannan (konjac glukomannan) gibi mannan içeriği zengin olan substratların hidrolizi yoluyla MOS salınmasında etkili olduğu bulunmuştur. Kalitatif ve kantitatif MOS analizi TLC ve iyon kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. *Penicillium aculeatum* APS1'den üretilen β -mannanazın yem ve gıda endüstrilerinde uygulamaları için uygun özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir.

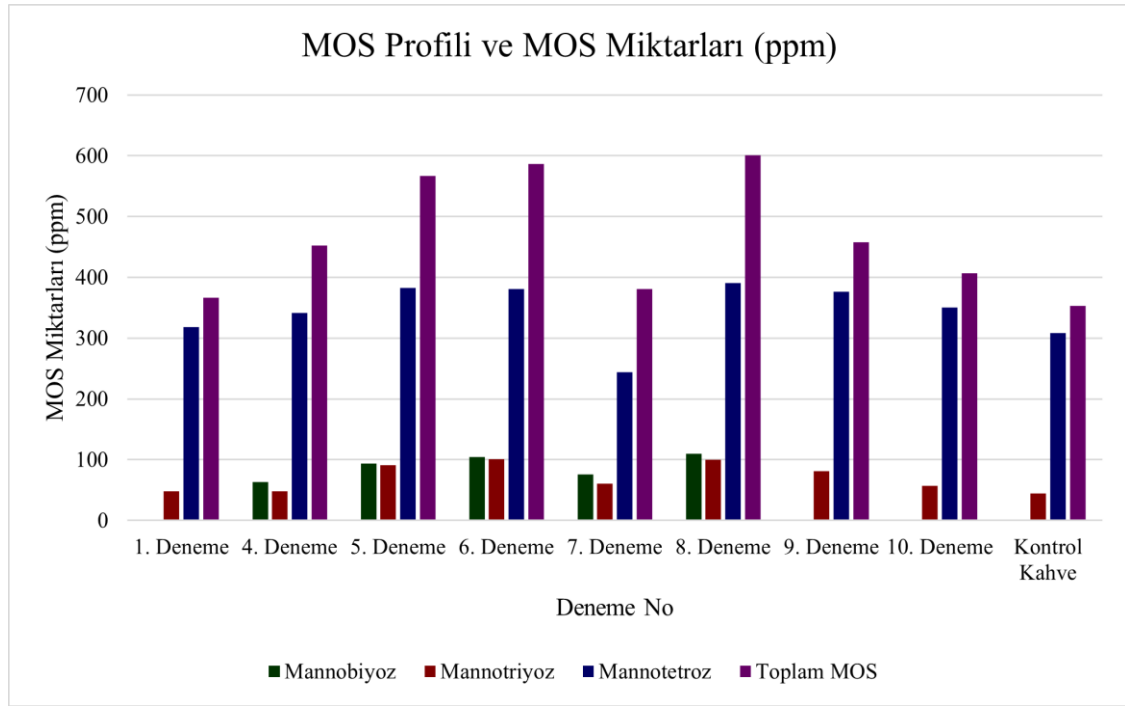
Abdeshahian vd. (2009), KKF yönteminde, substrat olarak palm çekirdeği atığından (palm kernel cake) β -mannanaz üretimi, laboratuvar kolon biyoreaktörü kullanılarak gerçekleştirmiştir. İnkübasyon sıcaklığı, substratın başlangıç nem içeriği ve hava akış hızı olmak üzere üç bağımsız değişkenin β -mannanaz üretimi üzerindeki etkileri Merkezi Kompozit Yüzey Merkezli (Central Composite Facecentered Design, CCF design) Dizayn temelinde Cevap Yüzey Metodu (Response Surface Methodology, RSM) ile değerlendirilmiştir. *Aspergillus niger* FTCC 5003'ün KKF yöntemi kullanılarak 7 gün boyunca havalandırmalı bir kolon biyoreaktöründe palm çekirdeği atığı üzerinde geliştirildiği on sekiz deneme gerçekleştirilmiştir. En yüksek β -mannanaz üretimi 2117,89 U/g olarak elde edilmiş olup, 32,5°C'de, %60 başlangıç nem miktarında ve 0,5 l/dk akış hızında elde edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda, inkübasyon sıcaklığı ve başlangıç nem içeriği gibi parametrelerin β -mannanaz üretimi üzerinde önemli etkileri olduğu görülmüştür ($P<0,01$). Benzer bir analiz sonucunda başlangıç nem içeriğinin doğrusal etkisinin ve başlangıç nem seviyesi ile havalandırma hızı arasındaki etkileşim etkisinin β -mannanaz üretimini önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir ($P<0,01$). İstatistiksel model, en yüksek β -mannanaz aktivitesine ulaşmak için optimum koşulların 32°C inkübasyon sıcaklığı, %59 başlangıç nem içeriği ve 0,5 l/dk havalandırma hızı olduğu belirtilmiştir. Bu optimum koşullar altında gerçekleştirilen fermentasyonda 2231,26 U/g'lık bir β -mannanaz aktivitesi elde edildiği belirtilmiştir.

4.4.MOS Üretimi

Plackett-Burman deneme deseni kullanılarak üretilen β -mannanaz enzimleri, french press kullanılarak demlenen filtre kahve örneklerine uygulanmıştır. İnkübasyon sonrası alınan örnekler MOS profili ve MOS miktarları belirlenmiş ve Çizelge 4.10. ve Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. Enzimasyon sonrasında yapılan HPLC analizi sonucu MOS profili ve MOS miktarları (ppm)

Örnekler	Mannobiyoz	Mannotriyoz	Mannotetroz	Toplam MOS
1. Deneme	-	48,034	318,108	366,142
2. Deneme	-	-	-	-
3. Deneme	-	-	-	-
4. Deneme	63,574	47,878	341,198	452,650
5. Deneme	93,985	91,101	382,200	567,286
6. Deneme	104,594	101,112	380,731	586,437
7. Deneme	75,944	61,017	244,149	381,111
8. Deneme	109,662	99,965	391,016	600,644
9. Deneme	-	81,560	376,253	457,812
10. Deneme	-	56,585	350,504	407,089
Kontrol Kahve	-	44,593	308,592	353,185



Şekil 4. 7. HPLC analizi sonucunda hesaplanan MOS profili ve MOS miktarları (ppm)

Yapılan enzimasyon sonucunda mannobiyoz, mannotriyoz, mannotetroz, mannopentoz, mannohekoz ve toplam MOS değerlerine bakılmıştır. Örneklerde mannopentoz ve mannohekoza rastlanmamıştır. 2 ve 3 numaralı enzim örnekleri hariç bütün örneklerdeki MOS miktarının enzim ilavesi yapılmayan kontrol kahve örneklerine göre artış gösterdiği görülmüştür. Kontrol kahve örneğinden elde edilen değerler incelendiğinde, 44,593 ppm mannotriyoz, 308,592 ppm mannotetroz ve 353,185 ppm toplam MOS hesaplanmıştır.

Enzimasyon sonucunda en yüksek mannobiyoz 109,662 ppm ile 8 numaralı enzim örneğinden, en yüksek mannotriyoz 101,112 ppm ile 6 numaralı enzim örneğinden, en yüksek mannotetroz 391,016 ppm ile 8 numaralı enzim örneğinden ve en yüksek toplam MOS miktarı ise 600,644 ppm ile 8 numaralı enzim örneğinden elde edilmiştir.

Deneme desenindeki 2 ve 3 numaralı örneklerden elde edilen β -mannanaz enzimi ilavesi ile yapılan MOS analizinde, mannobiyoz, mannotriyoz, mannotetroz, mannopentoz ve mannoheksoza rastlanmamıştır. Enzim aktivitesi olmadığı için kahve mannanının parçalanmadığı ve MOS üretimi gerçekleşmediği şeklinde yorumlanmıştır.

Deneme desenindeki 1 ve 4 numaralı örneklerden elde edilen β -mannanaz enzimi ilavesi ile yapılan MOS analizinde sırasıyla 48,034 ppm mannotriyoz, 318,108 ppm mannotetroz ile toplam 366,142 ppm ve 63,574 ppm mannobiyoz. 47,878 ppm mannotriyoz, 341,198 ppm mannotetroz ile toplam 452,650 ppm MOS hesaplanmıştır. 1 ve 4 numaralı denemelerin enzim aktivitelerinin olmamasından dolayı hesaplanan MOS miktarının enzimasyon sonucu olan bir üretim olmadığı, sıcaklık kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Erkan vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, Box-Behnken Yanıt Yüzey Metodu (Box-Behnken Response Surface Methodology (RSM)) kullanılarak enzim miktarı (5-10 mL), enzimasyon sıcaklığı (40°C-60°C) ve enzimasyon süresi (30-90 dk) parametreleri kullanılarak optimizasyon çalışması yapılmıştır. Biyoreaktörde keçiyoynuzu özü kullanılarak β -mannanaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen enzim %20 (v/v) kahve ekstraktlarına uygulanarak optimizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda ise en yüksek toplam MOS miktarı 7,5 mL enzim ilavesi, 40°C'de 90 dk olarak belirlenmiş olup 3970,97 ppm olarak hesaplandığı görülmektedir. Mannotriyoz ve mannoheksoz sırasıyla 1081,68 ppm ve 1475,03 ppm olarak hesaplanmış olup hakim MOS profili olarak belirtilmiştir.

Rungruangsaphakun ve Keawsompong (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus circulans* ile β -mannanaz enzimi üretilerek kopra küspesinden (copra meal) MOS üretimi için hidroliz koşulları optimize edilmiştir. Maksimum MOS üretiminin, 16,52 U/mL enzim konsantrasyonunda, %15 substrat yüklemesinde, 12 saat uygulama süresinde gerçekleştiği ve 14,41 mg/mL (20 mL) olarak hesaplandığı bildirilmiştir. Büyük ölçekli çalışıldığında (200 mL ve 2 L), maksimum MOS miktarlarının sırasıyla 15,76 mg/mL ve 16,89 mg/mL olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yağı alınmış kopra unu (copra meal) hidrolizatından elde edilen MOS'lar bazı yararlı mikroorganizmaların (laktobasil ve bifidobakteri) gelişimini desteklediği, bazı patojen mikroorganizmaların (*Salmonella serovar*, *Esherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Shigella dysenteriae*) gelişimini de elimine ettiği bildirilmiştir. Sonuç olarak, kopra unu (copra meal) hidrolizatının endüstriyel ölçekte MOS üretimi için potansiyel bir kaynak olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

4.4.1. Viskozite Analizi Sonuçları

Yapılan viskozite analizi sonucunda, kontrol olarak kullanılan enzimasyon yapılmayan kahve örneğinin viskozitesinin 1,25 cP olduğu ve Çizelge 4.11.'de gösterildiği üzere β -mannanaz ilavesi yapılan örneklerin viskozitelerinde düşüşe neden olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.11. β -mannanaz ile enzimasyon yapılan kahve ekstraktlarının son durumdaki viskozite ölçümleri (cP)

Örnek	Viskozite (cP)	Hız	% Tork	Shear Stres	Shear Rate
1. Deneme	1,22	200	0,5	2,33	186
2. Deneme	1,25	200	0,5	2,33	186
3. Deneme	1,2	200	0,5	2,33	186
4. Deneme	1,06	200	0,5	2,33	186
5. Deneme	1,12	200	0,5	2,33	186
6. Deneme	1,18	200	0,5	2,33	186
7. Deneme	1,06	200	0,5	2,33	186
8. Deneme	1,18	200	0,5	2,33	186
9. Deneme	1,25	200	0,5	2,33	186
10. Deneme	1,25	200	0,5	2,33	186
Kontrol	1,25	200	0,5	2,33	186

Chauhan vd. (2014) kahve ekstraktının ana polisakkarit bileşeni olan mannanın sebep olduğu yüksek viskoziteyi ve bu yüksek viskozite nedeniyle hazır kahve yapımında yer alan teknolojik işleme sürecindeki olumsuz etkileri giderebilmek amacıyla kahve çekirdeği ve ticari kahve ekstraktlarından izole edilen mannanı, *Bacillus nealsonii* PN-11'den üretilen alkali termostabil mannanaz enzimi kullanılarak hidroliz edilmiştir. Mannanın alkali koşullarda daha çözünür olmasından dolayı alkali termostabil bir mannanazın hidroliz için uygun olduğu belirtilmiştir. Enzimatik hidroliz optimizasyonu için Cevap Yüzey Metodu (Response Surface Methodology, RSM) kullanılmıştır. Optimum koşullar olan 11,50 Umannanaz/g kahve ekstraktı enzim dozu, 44,50°C sıcaklık ve 35,80 dk sürede viskozitenin 2 kat (50 mPas'dan 26,00±1,56 mPas'a) düştüğü gözlemlenmiştir. Hidrolizin ilk başlarında ağırlıklı olarak mannotetroz ve mannopentoz oluştuğu, hidrolizin sonraki aşamalarında ise oluşan ana reaksiyon ürünlerinin mannobiyoz ve mannotriyoz olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre, üretilen enzim kahve çekirdeklerinden elde edilen mannanı parçalayabilmiştir ve dolayısıyla viskozitenin azalmasına neden olmuştur. Bu nedenle büyük ölçekli endüstriyel üretimde uygulanması, dondurarak kurutma sırasında kullanılan enerji tüketiminin azaltılmasına yardımcı olacağı ve kahve üretiminde yer alan teknolojik prosesleri de daha ekonomik hale getirilebileceği belirtilmiştir.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, kahve içerdiği yüksek mannan nedeniyle inülinaz ve β -mannanaz enzimlerini üretmek ve aynı zamanda bu enzimleri kahve ekstraktlarına uygulayarak FOS ve MOS üretmek için potansiyel bir kaynak olarak kullanılması amaçlanmıştır. Enzimlerin üretimi için 4 farklı parametre (pH, sıcaklık, katı:sıvı oranı ve miks miktarı) belirlenmiş olup Plackett-Burman Dizaynı (PBD) kullanılarak deneme deseni oluşturulmuştur. Bu deneme deseni kullanılarak inülinaz ve β -mannanaz enzimlerinin *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) ve rekombinant *Aspergillus sojae* AsT3 (ATCC 11906) mikroorganizmaları kullanılarak mikrobiyal üretimi KKF yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Inülinaz üretimi sonucunda en yüksek inülinaz aktivitesi $564,0655 \pm 2,636$ U/mg ile 7 numaralı denemeden, en düşük inülinaz enzim aktivitesinin ise $0,394 \pm 0,098$ U/mg ile 4 numaralı denemeden elde edilmiştir. Denemelerin tümünün I/S oranları incelendiğinde inülinaz aktivitesi gösterdiği görülmüştür. İstatistiksel analiz sonucunda elde edilen Pareto grafiğinde ve ANOVA analizinde, fermentasyon ile inülinaz ve invertaz üretimi üzerine sıcaklığın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir.

β -mannanaz üretimi sonucunda en yüksek β -mannanaz enzim aktivitesi $71.174 \pm 13,670$ U/mg ile 6 numaralı denemeden, en düşük β -mannanaz enzim aktivitesi ise $7,797 \pm 5,514$ U/mg ile 9 numaralı denemeden elde edilmiştir. 1, 2, 3 ve 4 numaralı denemelerde ise enzim aktivitesine rastlanmadığı görülmüştür. İstatistiksel analiz sonucunda elde edilen Pareto grafiği ve ANOVA analizinde, fermentasyon ile β -mannanaz üretimi üzerine sıcaklığın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada ayrıca inülinaz ve β -mannanaz enzimleri kullanılarak oligosakkarit üretimi gerçekleştirilmiştir. French press kullanılarak demlenen kahve ekstraktlarına (%20) üretilen enzimler uygulanarak enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Örneklerde FOS, MOS miktar ve profil analizleri ve viskozite analizi gerçekleştirilmiştir.

Yapılan enzimasyon sonrasında yapılan FOS analizi sonucunda yalnızca 1, 5, 6 ve 10 numaralı örneklerde 1,1,1-kestopentoz rastlanmıştır. En yüksek 1,1,1-kestopentoz $38,341$ ppm ile 5 numaralı denemeden elde edilmiştir. 1, 5, 6 ve 10 numaralı örneklerde FOS miktarının enzim ilavesi yapılmayan kontrol kahve örneğine göre artış gösterdiği görülmüştür.

Enzimasyon sonrasında yapılan MOS analizi sonucunda, enzim ilavesi yapılmayan kontrol kahve örneğinden elde edilen değerler incelendiğinde, $44,593$ ppm mannotriyoz, $308,592$ ppm mannotetroz ve $353,185$ ppm toplam MOS hesaplanmıştır. Enzimasyon sonucunda en yüksek mannobiyoz $109,662$ ppm ile 8 numaralı enzim örneğinden, en yüksek mannotriyoz $101,112$ ppm ile 6 numaralı enzim örneğinden, en yüksek mannotetroz $391,016$ ppm ile 8 numaralı enzim örneğinden ve en yüksek toplam MOS miktarı ise $600,644$ ppm ile 8 numaralı enzim örneğinden elde edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 2 ve 3 numaralı enzim örnekleri hariç bütün örneklerdeki MOS miktarının enzim ilavesi yapılmayan kontrol kahve örneklerine göre artış gösterdiği görülmüştür. Üretilen enzimler kahve ekstraktlarındaki MOS miktarını artırmıştır. Örneklerde yapılan viskozite analizinde, enzim ilavesi yapılmayan kahve örneğinin viskozitesinin enzim ilavesi gerçekleştirildikten sonra düştüğü görülmüştür.

Sonuç olarak, kahve ve/veya atıklarının katı kültür fermentasyonunda katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde potansiyel bir substrat özelliği taşıdığı belirlenmiştir. Ayrıca üretilen inülinaz ve β -mannanaz enzimlerinin kahve ekstraktlarındaki oligosakkarit miktarını artırdığı görülmüştür. Bu nedenle kahvenin ve/veya ürünlerinin prebiyotik aktivitesinin artırılacağı ve oligosakkarit profilinin enzimatik hidroliz yoluyla zenginleştirilebileceği belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Abd El Aty, A. A., Wehaidy, H. R., and Mostafa, F. A. 2014. *Optimization of inulinase production from low cost substrates using Plackett–Burman and Taguchi methods. Carbohydrate polymers*, 102: 261-268.
- Abdeshahian, P., Samat, N., Hamid, A. A., and Yusoff, W. M. W. 2010. *Utilization of palm kernel cake for production of β -mannanase by Aspergillus niger FTCC 5003 in solid substrate fermentation using an aerated column bioreactor. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37 (1): 103.
- Al-Dabbagh, Y. N., and Mahmood, W. A. 2015. *Effect of carbon, nitrogen and pH on inulinase production from local isolate of Aspergillus niger. ZANCO Journal of Pure and Applied Sciences*, 27 (3): 1-8.
- Anonymous 1: Megazyme. <https://www.megazyme.com> [Son erişim tarihi: 20.05.2022].
- Arya, M., ve Rao, L. J. M. 2007. *An impression of coffee carbohydrates. Critical reviews in food science and nutrition*, 47 (1): 51-67.
- Ayyachamy, M., Khelawan, K., Pillay, D., Permaul, K., and Singh, S. 2007. *Production of inulinase by Xanthomonas campestris pv phaseoli using onion (Allium cepa) and garlic (Allium sativum) peels in solid state cultivation. Letters in applied microbiology*, 45 (4): 439-444.
- Bali, V., Panesar, P. S., Bera, M. B., and Panesar, R. 2015. *Fructo-oligosaccharides: production, purification and potential applications. Critical reviews in food science and nutrition*, 55 (11): 1475-1490.
- Bangoria, P., Divecha, J., and Shah, A. R. 2021. *Production of mannoooligosaccharides producing β -Mannanase by newly isolated Penicillium aculeatum APS1 using oil seed residues under solid state fermentation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 34: 102023.
- Bhoria, P., Singh, G., and Hoondal, G. S. 2009. *Optimization of mannanase production from Streptomyces sp. PG-08-03 in submerged fermentation. BioResources*, 4 (3): 1130-1138.
- 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 (1-2): 248-254.
- Canli, O., and Kurbanoglu, E. B. 2012. *Application of low magnetic field on inulinase production by Geotrichum candidum under solid state fermentation using leek as substrate. Toxicology and industrial health*, 28 (10): 894-900.
- 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 (5): 1817-1830.
- Chauhan, P. S., Sharma, P., Puri, N., and Gupta, N. 2014. *A process for reduction in viscosity of coffee extract by enzymatic hydrolysis of mannan. Bioprocess and biosystems engineering*, 37 (7): 1459-1467.
- Chen, H. Q., Chen, X. M., Chen, T. X., Xu, X. M., and Jin, Z. Y. 2011. *Extraction*

- optimization of inulinase obtained by solid state fermentation of Aspergillus ficuum JNSP5-06. Carbohydrate polymers*, 85 (2): 446-451.
- Couto, S. R., ve Sanromán, M. A. 2006. *Application of solid-state fermentation to food industry—a review. Journal of Food Engineering*, 76 (3): 291-302.
- Das, D., Bhat M, R., and Selvaraj, R. 2019. *Review of inulinase production using solid-state fermentation. Annals of Microbiology*, 69 (3): 201-209.
- Dhawan, S., and Kaur, J. 2007. *Microbial mannanases: an overview of production and applications. Critical reviews in biotechnology*, 27 (4): 197-216.
- Dilipkumar, M., Rajasimman, M., and Rajamohan, N. 2011a. *Application of statistical design for the production of inulinase by Streptomyces sp. using pressmud. Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 5 (4): 463-470.
- Dilipkumar, M., Rajasimman, M., and Rajamohan, N. 2011b. *Optimization of inulinase production from garlic by Streptomyces sp. in solid state fermentation using statistical designs. Biotechnology Research International*, 2011.
- Dilipkumar, M., Rajasimman, M., and Rajamohan, N. 2013. *Enhanced inulinase production by Streptomyces sp. in solid state fermentation through statistical designs. 3 Biotech*, 3 (6): 509-515.
- Dominguez, A. L., Rodrigues, L. R., Lima, N. M., and Teixeira, J. A. 2014. *An overview of the recent developments on fructooligosaccharide production and applications. Food and Bioprocess Technology*, 7 (2): 324-337.
- Duruksu, G., Ozturk, B., Biely, P., Bakır, U., and Ogel, Z.B. 2009. *Cloning, expression and characterization of Endo- β -1,4-mannanase from Aspergillus fumigatus in Aspergillus sojae and Pichia pastoris. Biotechnology progress*, 25: 271-276.
- Erkan, S. B., Basmak, S., Ozcan, A., Yilmazer, C., Gürler, H. N., Yavuz, G., Germec, M., Yatmaz, E. and Turhan, I. 2021. *Mannooligosaccharide production by β -mannanase enzyme application from coffee extract. Journal of Food Processing and Preservation*, 45 (8), e14668.
- Erkan, S. B., Ozcan, A., Yilmazer, C., Gurler, H. N., Karahalil, E., Germec, M., Yatmaz, E., Kucukcetin A. and Turhan, I. 2021. *The effects of mannanase activity on viscosity in different gums. Journal of Food Processing and Preservation*, 45 (8): e14820.
- Housseiny, M. M. (2014). *Production of an endoinulinase from Aspergillus niger AUMC 9375, by solid state fermentation of agricultural wastes, with purification and characterization of the free and immobilized enzyme. Journal of Microbiology*, 52 (5): 389-398.
- Jana, U. K., Suryawanshi, R. K., Prajapati, B. P., and Kango, N. 2021. *Prebiotic mannoooligosaccharides: synthesis, characterization and bioactive properties. Food Chemistry*, 342: 128328.
- Kim, D. Y., Ham, S. J., Lee, H. J., Kim, Y. J., Shin, D. H., Rhee, Y. H., Son, K. H., and Park, H. Y. 2011. *A highly active endo- β -1, 4-mannanase produced by Cellulosimicrobium sp. strain HY-13, a hemicellulolytic bacterium in the gut of Eisenia fetida. Enzyme and microbial technology*, 48 (4-5): 365-370.

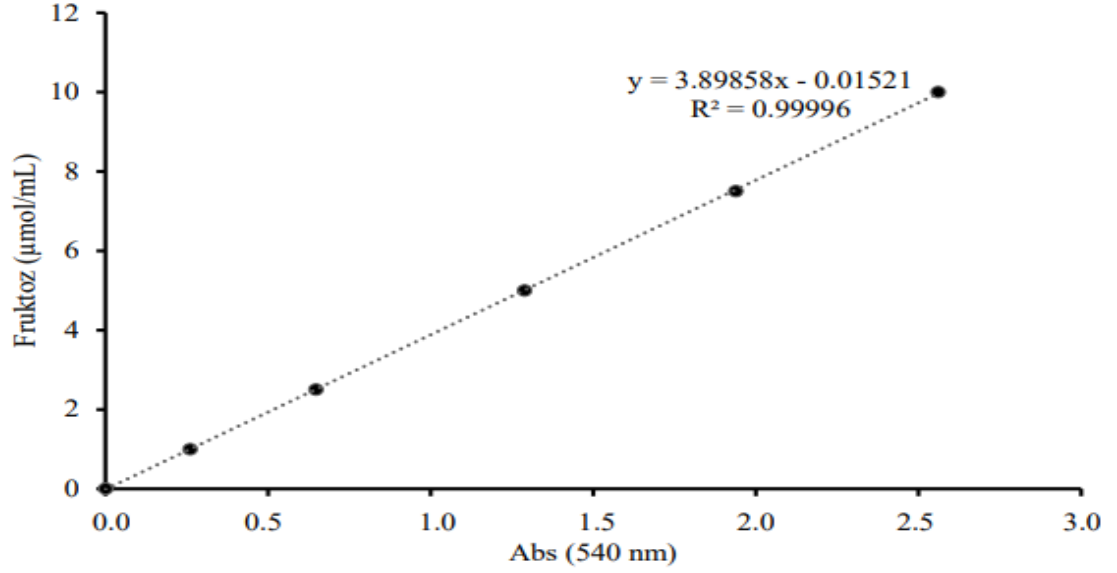
- Kote, N. V., Patil, A. G. G., and Mulimani, V. H. 2009. *Optimization of the production of thermostable endo- β -1, 4 mannanases from a newly isolated Aspergillus niger gr and Aspergillus flavus gr. Applied biochemistry and biotechnology*, 152 (2): 213-223.
- Krishna, C. 2005. *Solid-state fermentation systems—an overview. Critical reviews in biotechnology*, 25 (1-2): 1-30.
- Lin, S. S., Dou, W. F., Xu, H. Y., Li, H. Z., Xu, Z. H., and Ma, Y. H. 2007. *Optimization of medium composition for the production of alkaline β -mannanase by alkaliphilic Bacillus sp. N16-5 using response surface methodology. Applied Microbiology and Biotechnology*, 75 (5): 1015-1022.
- Mabrouk, M. E., and El Ahwany, A. M. 2008. *Production of β -mannanase by Bacillus amylolequifaciens 10A1 cultured on potato peels. African journal of Biotechnology*, 7(8).
- Manjula, S., Shinde, M., and Lalitha, J. 2010. *Optimization of Culture Conditons For The Production of Beta-Mannanase From An Agar Utilizing Paenibacillus Sp. Msl-9. Bioscan*, 5 (1): 75-79.
- Mazutti, M. A., Zabot, G., Boni, G., Skovronski, A., de Oliveira, D., Di Luccio, M., Rodrigues M.I., Treichel H. and Maugeri, F. 2010. *Kinetics of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. Food Chemistry*, 120 (1): 163-173.
- 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 biotechnology*, 28 (2), 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 (2): 165-178.
- Morris, C., and Morris, G. A. 2012. *The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. Food chemistry*, 133 (2): 237-248.
- Mou, H., Zhou, F., Jiang, X., and Liu, Z. 2011. *Production, purification and properties of β -mannanase from soil bacterium Bacillus circulans M-21. Journal of Food Biochemistry*, 35 (5): 1451-1460.
- Mudau, M. M., & Setati, M. E. 2008. *Partial purification and characterization of endo- β -1, 4-mannanases from Scopulariopsis candida strains isolated from solar salterns. African Journal of Biotechnology*, 7 (13).
- Mussatto, S. I., and Mancilha, I. M. 2007. *Non-digestible oligosaccharides: A review. Carbohydrate polymers*, 68 (3): 587-597.
- Narayanan, M., Srinivasan, B., Gayathiri, A., Ayyadurai, A., and Mani, A. 2013. *Studies on the optimization and characterization for the biosynthesis of inulinase under solid state fermentation. International Journal of ChemTech Research*, 5 (1): 376-384.

- Norita, S., Rosfarizan, M., and Ariff, A. B. 2010. *Evaluation of the activities of concentrated crude mannan-degrading enzymes produced by Aspergillus niger*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 171-180.
- Onilude, A. A., Fadaunsi, I. F., and Garuba, E. O. 2012. *Inulinase production by Saccharomyces sp. in solid state fermentation using wheat bran as substrate*. *Annals of microbiology*, 62 (2): 843-848.
- Pandey, A. 2003. *Solid-state fermentation*. *Biochemical engineering journal*, 13 (2-3): 81-84.
- Patel, S. and Goyal, A. 2011. *Functional oligosaccharides: production, properties and applications*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (5): 1119-1128.
- Puchart, V., Vršanská, M., Svoboda, P., Pohl, J., Ögel, Z. B., & Biely, P. (2004). *Purification and characterization of two forms of endo- β -1, 4-mannanase from a thermotolerant fungus, Aspergillus fumigatus IMI 385708 (formerly Thermomyces lanuginosus IMI 158749)*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1674 (3): 239-250.
- Rungruangsaphakun, J., & Keawsompong, S. 2018. *Optimization of hydrolysis conditions for the manno oligosaccharides copra meal hydrolysate production*. *3 Biotech*, 8 (3): 1-9.
- Sachtlehner, A., Foidl, G., Foidl, N., Gübitz, G., ve Haltrich, D. 2000. *Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of Sclerotium rolfsii*. *Journal of biotechnology*, 80 (2): 127-134.
- Selvakumar, P., and Pandey, A. 1999. *Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from Staphylococcus sp. and Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, 34 (8): 851-855.
- Sheng, J., Chi, Z., Yan, K., Wang, X., Gong, F., and Li, J. 2009. *Use of response surface methodology for optimizing process parameters for high inulinase production by the marine yeast Cryptococcus aureus G7a in solid-state fermentation and hydrolysis of inulin*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32(3): 333-339.
- Shu-Fei, Z., Jia-Huan, S., Min-Chen, W., Jin-Ping, S., and Jian-Fang, L. 2008. *Mutation breeding of Aspergillus niger strain LW-1 for high-yield β -mannanase production*. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 5 (2): 153-158.
- Singh, G., Bhalla, A., and Hoondal, G. S. 2010. *Solid state fermentation and characterization of partially purified thermostable mannanase from Bacillus sp. MG-33*. *BioResources*, 5 (3): 1689-1701.
- Singh, S., Ghosh, A., and Goyal, A. 2018. *Manno-oligosaccharides as prebiotic-valued products from agro-waste*. In *Biosynthetic Technology and Environmental Challenges* (pp. 205-221). Springer, Singapore.
- Singh, S., Singh, G., and Arya, S. K. 2018. *Mannans: An overview of properties and application in food products*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119: 79-95.
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C., and Pandey, A. 2010. *Advancement and comparative profiles in the production technologies using*

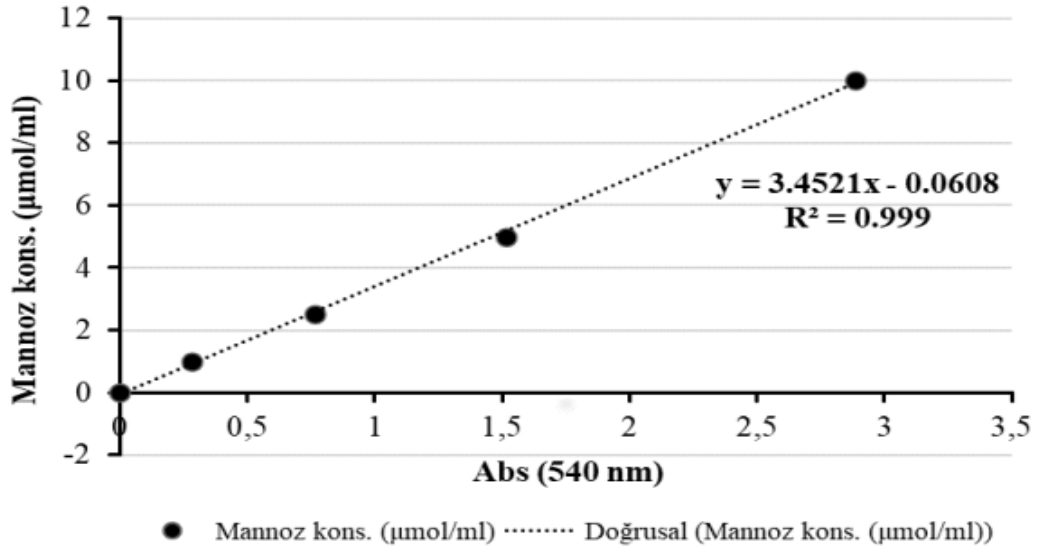
- solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. Enzyme and Microbial Technology*, 46 (7): 541-549.
- Swennen, K., Courtin, C. M. and Delcour, J. A. 2006. *Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. Critical reviews in food science and nutrition*, 46 (6): 459-471.
- Thomas, L., Larroche, C., ve Pandey, A. 2013. *Current developments in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal*, 81: 146-161.
- Titapoka, S., Keawsompong, S., Haltrich, D., and Nitisinprasert, S. 2008. *Selection and characterization of mannanase-producing bacteria useful for the formation of prebiotic manno-oligosaccharides from copra meal. World journal of microbiology and biotechnology*, 24 (8): 1425-1433.
- Trivedi, S., Divecha, J., and Shah, A. 2012. *Optimization of inulinase production by a newly isolated Aspergillus tubingensis CR16 using low cost substrates. Carbohydrate polymers*, 90 (1): 483-490.
- Van Zyl, W. H., Rose, S. H., Trollope, K., and Görgens, J. F. 2010. *Fungal β -mannanases: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. Process Biochemistry*, 45 (8): 1203-1213.
- Xiong, C., Jinhua, W., and Dongsheng, L. 2007. *Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by Kluyveromyces S120 using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal*, 34 (2): 179-184.
- Yatmaz, E., Germec, M., Karahalil, E., and Turhan, I. 2020. *Enhancing β -mannanase production by controlling fungal morphology in the bioreactor with microparticle addition. Food and Bioproducts Processing*, 121: 123-130.
- Yilmazer, C., Germec, M., & Turhan, I. 2021. *Solid-state fermentation for the production of a recombinant β -mannanase from Aspergillus fumigatus expressed in Aspergillus sojae grown on renewable resources. Journal of Food Processing and Preservation*, 45 (8): e14584.
- Zhang, M., Chen, X. L., Zhang, Z. H., Sun, C. Y., Chen, L. L., He, H. L., Zhou, B. C. and Zhang, Y. Z. 2009. *Purification and functional characterization of endo- β -mannanase MAN5 and its application in oligosaccharide production from konjac flour. Applied microbiology and biotechnology*, 83 (5): 865-873.

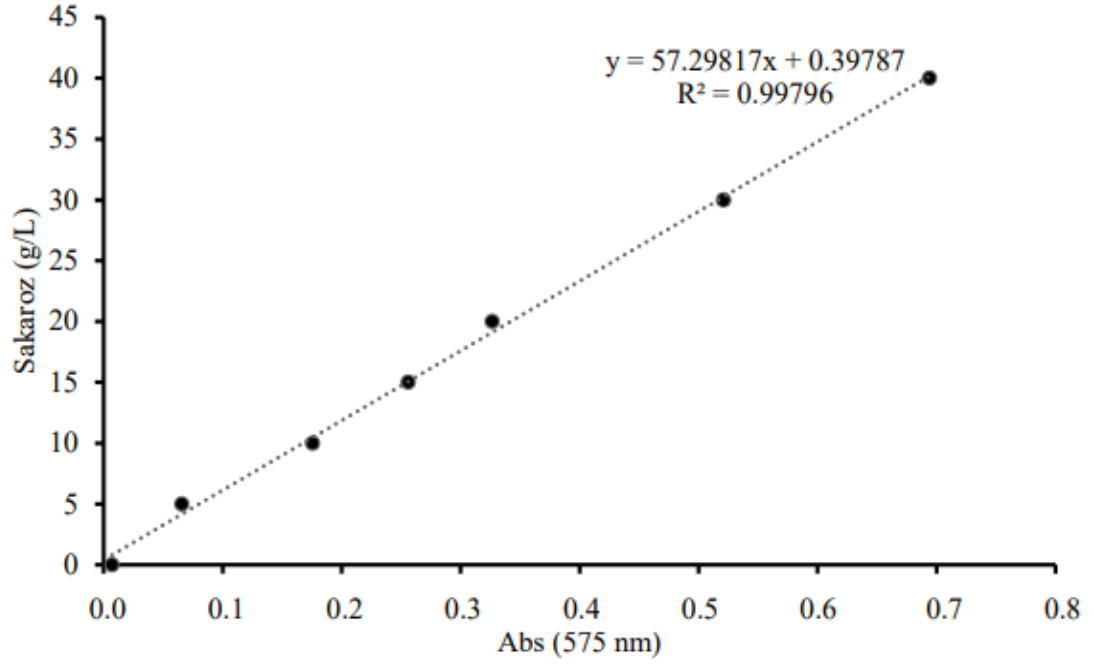
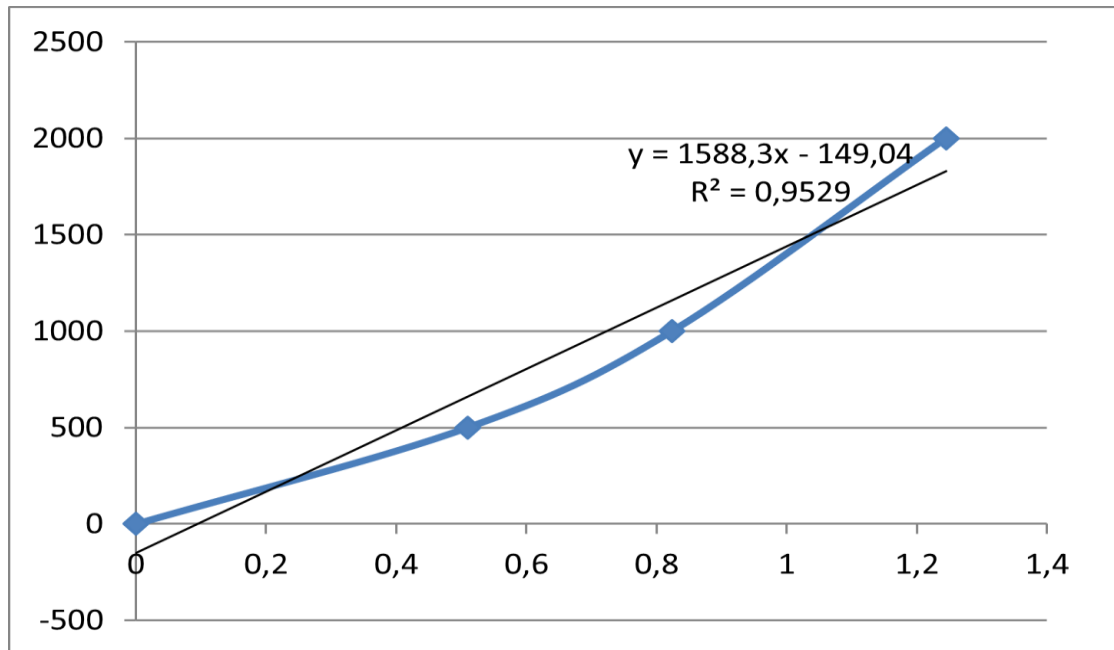
7. EKLER

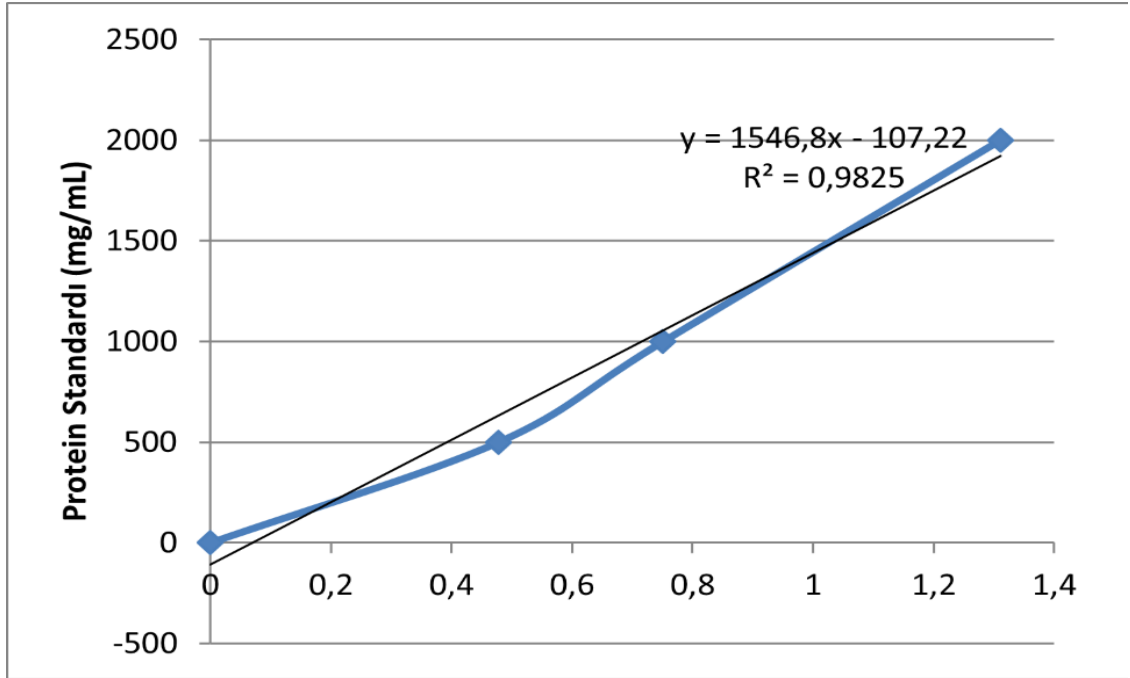
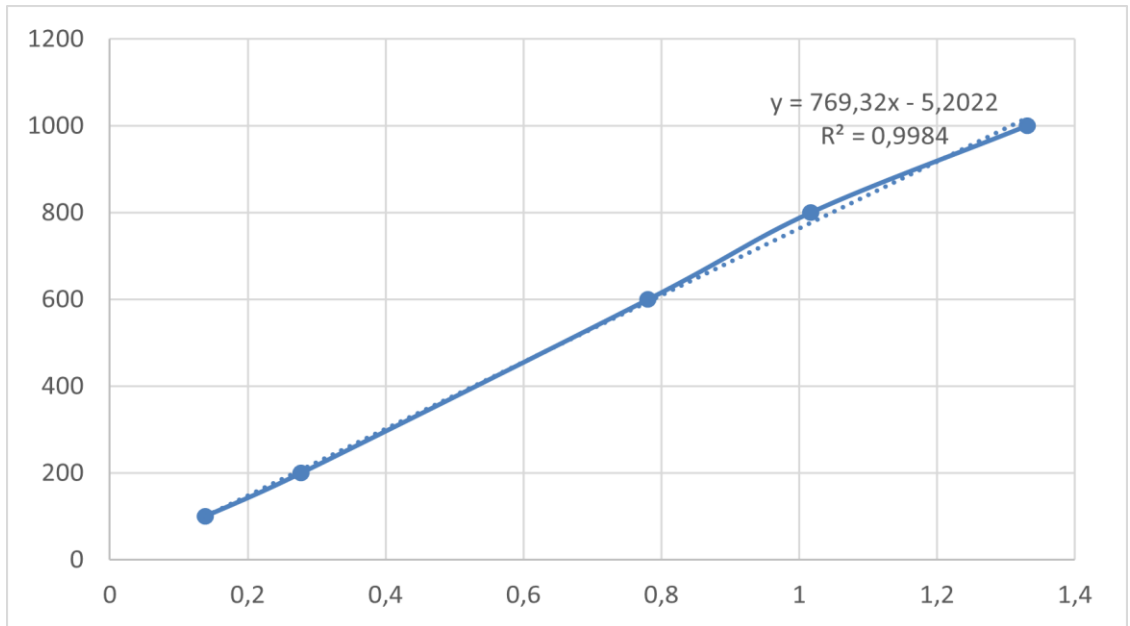
EK-1 . İnülinaz/İnvertaz enzim analizinde kullanılan standart fruktoz kurvesi.



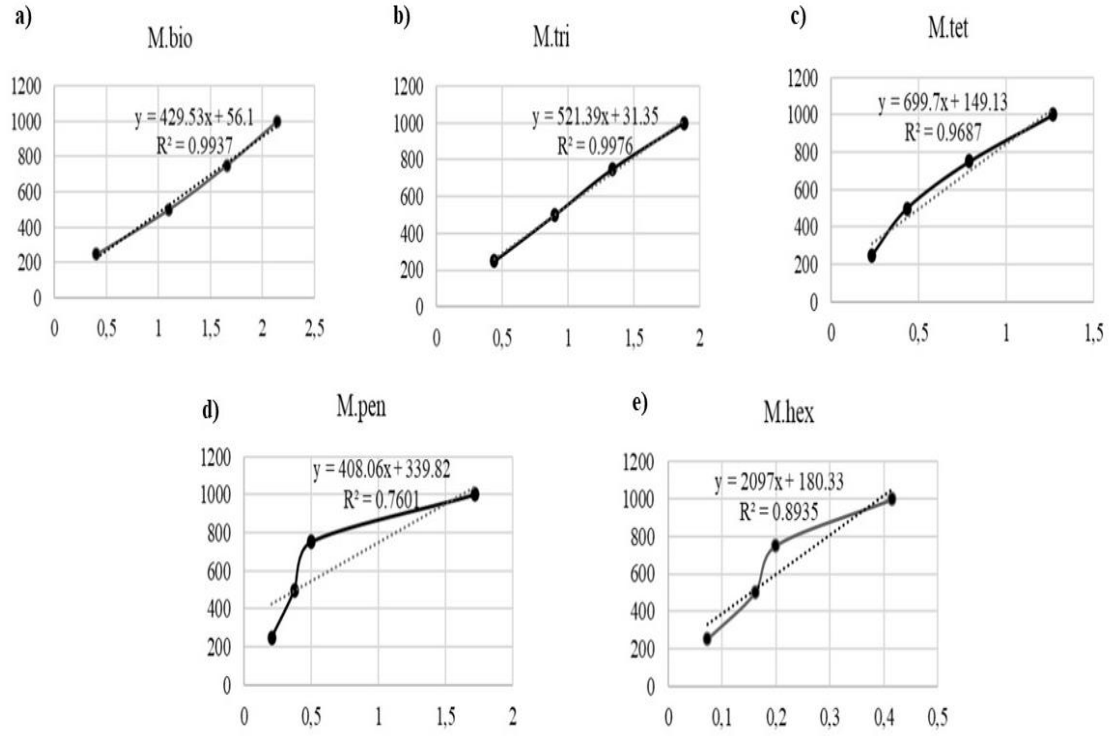
EK-2. β-mannanaz enzim analizinde kullanılan standart mannoz kurvesi.



EK-3. Şeker analizinde kullanılan standart sakaroz çözeltisi.**EK-4.** İnülinaz enzimi için standart protein kurvesi.

EK-5. β -mannanaz için kullanılan standart protein kurvesi.**EK-6.** 1,1,1-kestopentoz standart kurvesi.

EK-7. MOS standart kurveleri; **a)**mannobiyoz standart kurvesi; **b)**mannotriyoz standart kurvesi; **c)**mannotetroz standart kurvesi; **d)**mannopentoz standart kurvesi; **e)**mannohexoz standart kurvesi.



ÖZGEÇMİŞ

Selin BAŞMAK

selinbasmak@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2019-2022	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015-2019	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Erkan, S. B., **Basmak, S.**, Ozcan, A., Yilmazer, C., Gürler, H. N., Yavuz, G., Germec, M., Yatmaz, E. and Turhan, I. 2021. Mannooligosaccharide production by β -mannanase enzyme application from coffee extract. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45 (8): e14668.