

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDÜSTRİYEL ATIKLARIN AZOT KAYNAĞI OLARAK MANNANAZ
ÜRETİMİNDE KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

Ercan KARAHALİL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2014

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDÜSTRİYEL ATIKLARIN AZOT KAYNAĞI OLARAK MANNANAZ
ÜRETİMİNDE KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

Ercan KARAHALİL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez 2014.02.0121.021 proje numarasıyla Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

2014

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENDÜSTRİYEL ATIKLARIN AZOT KAYNAĞI OLARAK MANNANAZ
ÜRETİMİNDE KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

Ercan KARAHALİL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 15 / 07 / 2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)
Prof. Dr. Mehmet İNAN
Yrd. Doç. Dr. Ersin AKINCI

ÖZET

ENDÜSTRİYEL ATIKLARIN AZOT KAYNAĞI OLARAK MANNANAZ ÜRETİMİNDE KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Ercan KARAHALİL

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. İrfan TURHAN
Temmuz, 74 sayfa

Mikrobiyal mannanazlar bitki dokularındaki karmaşık polisakkaritlerin mannooligosakkaritler ve mannozlar gibi basit moleküllere hidrolizini sağladığından dolayı biyoteknolojik olarak önem taşımaktadır. Gıda ve yem teknolojisinde meyve suyu berraklaştırması ve maserasyonu gibi pek çok uygulamaları vardır. Düşük maliyetli kaynakların kullanımıyla katma değeri yüksek olan ürünlerin üretimi giderek önem kazanmaktadır. Bir fermentasyon prosesi için karbon ve azot kaynaklarının en önemli besin maddeleri olduğu iyi bilinmektedir. Fermentasyon besiyerlerinde genellikle amonyum nitrat, amonyum nitrit, et ekstraktı, maya ekstraktı ve pepton gibi pahalı kaynaklar kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, karbon kaynağı olarak keçiyoynuzu ve glukoz kullanılarak rekombinant *Aspergillus sojae*'den mannanaz enzimi üretiminde ekonomik olarak uygun bazı azot kaynaklarının potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla üç tanesi hayvansal (et-kemik unu, balık unu ve tüy unu) dört tanesi bitkisel kökenli (kırmızı mercimek, pamuk tohumu, mısır zeini ve soya proteini) olmak üzere yedi farklı materyal denenmiştir. Fermentasyon ortamına bu materyaller üç farklı oranlarda (%0.5, %0.75, %1.0) ilave edilmiştir. Gerçekleştirilen fermentasyon çalışmaları neticesinde söz konusu materyaller ile ulaşılan maksimum enzim aktiviteleri; Kırmızı Mercimek(%0.5): 247,11 U/ml, Pamuk Tohumu(%1.0): 315.75 U/ml, Mısır Zeini(%1.0): 228.17 U/ml, Soya Proteini(%0.75): 525,93 U/ml, Et-Kemik Unu(%0.75): 597.31 U/ml, Tüy Unu(%1): 355.77 U/ml, Balık Unu(%1): 310.73 U/ml şeklinde olmuştur. Elde edilen veriler keçiyoynuzu ekstraktı kullanılarak yapılan denemelerden üretilen mannanaz enzim aktivite değerlerinin glukoz substratında yapılan denemelere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, bu tip azot ve karbon kaynaklarının birlikte kullanıldığında pahalı kaynaklara ekonomik bir alternatif olabileceğini göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: β -mannanaz, alternatif kaynaklar, azot, karbon, rekombinant *Aspergillus sojae*

JÜRİ: Doç. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)
Prof. Dr. Mehmet İNAN
Yrd. Doç. Dr. Ersin AKINCI

ABSTRACT

AN INVESTIGATION OF INDUSTRIAL WASTES UTILIZATION AS A NITROGEN SOURCE ON MANNANASE PRODUCTION

Ercan KARAHALİL

M.Sc. Thesis in Food Engineering
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İrfan TURHAN
July, 74 pages

Microbial mannanases have become biotechnologically important since they target the hydrolysis of complex polysaccharides of plant tissues into simple molecules like manno-oligosaccharides and mannoses. They have found many applications in the food and feed technology, such as fruit juice clarification, fruit maceration. Production of value-added products by using low-cost sources have increasingly come into prominence. It is well known that major nutrients are carbon and nitrogen for a fermentation process. Medium are generally supplied from expensive sources such as ammonium nitrate, ammonium nitrite, yeast extract, and peptone.

The aim of this study was to determine potential of some nitrogen sources which are economically appropriate on mannanase production by recombinant *Aspergillus sojae* using carob and glucose as carbon source. For this purpose, three of nitrogen sources of animal origin (meat-bone meal, fish meal and feather meal) and four vegetable sources (red lentil powder, cottonseed meal, maize zein, soybean protein), seven different materials were assayed. Various quantities of these materials (0.5%, 0.75%, 1.0%) were added to fermentation media. Enzyme activity results obtained from fermentations are given following: Red Lentil Powder_(1%): 247.11 U/ml, Cottonseed Meal_(1%): 315.75 U/ml, Maize Zein_(1%): 228.17 U/ml, Soyabean Protein_(0,75%): 525.93 U/ml, Meat-Bone Meal_(0,75%): 597.31 U/ml, Feather Meal_(1%): 355.77 U/ml, Fish Meal_(1%): 303.83 U/ml. Results showed that fermentations carried out with carob pod extract has higher mannanase enzyme activity values than glucose substrate. Also, obtained data indicated that this kind of nitrogen and carbon sources can be an economical alternative to expensive sources when they are used with together.

KEYWORDS: β -mannanase, alternative sources, carbon, nitrogen, recombinant *Aspergillus sojae*

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. İrfan TURHAN (Supervisor)
Prof. Dr. Mehmet İNAN
Asst. Prof. Dr. Ersin AKINCI

ÖNSÖZ

Günümüzde büyük bir ivme kazanan biyoteknolojik gelişmeler ile birlikte enzimler, organik asitler, etanol, antibiyotik gibi birçok katma değeri yüksek ürünün farklı teknikler ile üretimi hız kazanmıştır. Biyoteknolojik araştırmalarda her zaman laboratuvar ölçeğinde yapılan araştırma sonuçlarının endüstriye aktarımının hedeflendiği bilinmektedir. Ancak laboratuvar ölçekli yapılan araştırmalarda kullanılan saf materyallerin yüksek maliyetler oluşturması araştırmacıları alternatif kaynaklar araştırmaya yöneltmiştir. Özellikle de biyoteknolojik çalışmalar için uygun içeriğe sahip, başka bir değerlendirme alanı olmayan ya da dar bir değerlendirme alanına sahip olan materyaller üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda yoğunluk kazanmıştır. Bazı endüstrilerin yan ürünü ya da atığı olan materyaller bu şekilde hem çevresel problemlere yol açmadan doğadan uzaklaştırılmış hem de katma değeri yüksek bir ürünün üretiminde kullanılarak ülke ekonomisine büyük bir katkı sağlamış olmaktadır.

Enzimlerin bitkilerden ve hayvanlardan elde edilmesinin hem yüksek maliyetlerle hem de düşük bir verimle mümkün olabilmesi üretim maliyetleri nispeten az olan mikrobiyal enzim üretimini öne çıkarmıştır. Ayrıca mikrobiyal enzimlerin daha geniş bir pH ve sıcaklık aralığında çalışarak etkinlik göstermesi mikrobiyal üretim tercihinin bir başka sebebi olmaktadır.

Mannanazlar; son yıllarda ilaç, kâğıt, besleme (feed), pulp, gıda gibi geniş bir endüstriyel uygulama alanına yayılmıştır. Ayrıca bazı rekombinant mikroorganizmalardan üretilen mannanazların dünyaca ünlü birkaç firma tarafından başarılı bir şekilde üretilmesi değerini daha da artırmıştır.

Mezbaha atıklarının belirli işlemlerden geçirilmesiyle elde edilen rendering ürünleri besicilikte hayvan yemlerinin proteince zenginleştirilmesinde ve tarımsal üretimde yararlanılan gübrelerin formülasyonlarında uzun yıllar kullanılmıştır. Ancak 1989 yılında bazı hayvan hastalıklarına neden olduğu tespit edilen bu ürünlerin 1996 yılından itibaren FDA tarafından büyükbaş hayvanların yem rasyonlarında kullanımı yasaklanmıştır. Böylece yüksek azot içeriğine sahip bu ürünlerin gübre üretimi dışında herhangi bir kullanım alanı olmaması ve çevresel risk taşımalarından dolayı yeni değerlendirme alanlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bilindiği gibi azotun mikrobiyal gelişim için besiyerinde bulunması zorunlu içeriklerden biri olması bu materyallerin katma değeri yüksek ürünlerin üretimi için biyoteknolojik çalışmalarda kullanılabilirliğinin araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Akdeniz bölgesinde yaygın bir yetişme alanına sahip olan keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua L.*) meyvesinin biyoteknolojik çalışmalar açısından uygun bir içeriğe sahip olması ve saf karbon kaynaklarından çok daha ucuza temin edilebilmesi bu alanda değerlendirilebilecek bir potansiyeli olduğunu göstermektedir. Bu konuda son yıllarda yapılan araştırmalar da bu potansiyelin varlığını kanıtlar niteliktedir.

Bu çalışma ile giderek kullanım alanı daralan hayvansal atıkların ve düşük maliyetli bitkisel materyallerin mikrobiyal mannanaz üretiminde azot kaynağı olarak kullanım olanaklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmada glukoz dışında karbon kaynağı olarak keçiboynuzu ekstraktı da kullanılarak alternatif azot

kaynaklarının daha ucuz bir karbon kaynağı olan keçiboynuzu ekstraktı ile birlikte kullanım potansiyeli incelenmiştir. Bu tez çalışmasının endüstriye aktarılabilir sonuçların elde edilmesi ile daha sonraki yıllarda yapılacak mannanaz enziminin fermentasyon ortamından ayrılması ve saflaştırılması kapsamındaki araştırmalara da ışık tutacak nitelikte bir çalışma olduğu düşünülmektedir.

Bana bu konuyu araştırma fırsatı veren ve çalışmanın zor aşamalarında önümü açarak hiçbir zaman desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. İrfan TURHAN'a, çalışmanın bazı bölümlerindeki olumlu yönlendirmeleri nedeniyle Prof. Dr. Mehmet İNAN ve Yrd. Doç. Dr. Ersin AKINCI'ya, yine çalışma süresince ciddi yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Nedim TETİK ve Doç. Dr. Mustafa Kemal USLU'ya, tavsiyelerinden istifade ettiğim Arş. Gör. Hatice Reyhan ÖZİYİCİ ve Ercan YATMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Mustafa GERMEÇ, Ahmet Oktay KÜÇÜKÖZET, Arş. Gör. Atike Nur DURAK ve Aysen Güher Gündeş'e teşekkür ederim.

Araştırmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, 2210-C Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı ile destekleyen TÜBİTAK'a, materyallerin temininde yardımcı olan Keskinoglu Tavukçuluk İşl. San Tic. A.Ş., Antbirlik Pamuk ve Narenciye Tarım Satış Kooperatifleri Birliği'ne, Antalya Et Entegre Tesisleri A.Ş'ye ve her zaman bana güvenen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMALARI.....	3
1.1. Besiyeri Ortamının Bileşimi ve Mikrobiyal Gelişim İçin Önemi	3
2.1.2. Karbon kaynakları	3
2.1.3. Azot kaynakları	5
1.2. Sıvı Faz (Derin Kültür) Fermentasyon Yöntemi, Avantaj ve Dezavantajları.....	7
1.3. Mikrobiyal Gelişim Faktörleri	7
1.4. Enzimlerin Endüstriyel Önemi ve Mannanazlar	8
2.4.1. Mannanazın endüstriyel uygulamaları	9
2.4.2. Mannanazların üretimi ve daha önce yapılmış mannanaz çalışmaları	11
2. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Materyal	15
3.2. Fermentasyonlarda Kullanılan Çalkalamalı Inkübatör	15
3.3. Kullanılan Mikroorganizma	15
3.4. Fermentasyon	16
3.5. Deneme Deseni	16
3.6. Yöntem.....	18
3.6.1. Mannanaz aktivitesinin belirlenmesi.....	18
3.6.2. Kalıntı şeker analizi.....	19
3.6.3. Toplam hücre kütle (biyokütle) miktarı	19
3.6.4. Kinetik parametrelerin belirlenmesi	19
3.6.7. İstatistiksel değerlendirmeler	19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	20
4.1. Kırmızı Mercimek	20
4.1.1. Keçiboynuzu substratında farklı kırmızı mercimek miktarlarının kullanılması	20
4.1.2. Glukoz substratında farklı kırmızı mercimek miktarlarının kullanılması	22
4.1.3. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin kırmızı mercimek içeren denemelere ait kinetik parametreler	24
4.2. Pamuk Tohumu	26
4.2.1. Keçiboynuzu substratında farklı pamuk tohumu miktarlarının kullanılması	26
4.2.2. Glukoz substratında farklı pamuk tohumu miktarlarının kullanılması	28
4.2.3. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin pamuk tohumu içeren denemelerine ait kinetik parametreler	30
4.3. Mısır Zeini	31
4.3.1. Keçiboynuzu substratında farklı mısır zeini miktarlarının kullanılması	31
4.3.2. Glukoz substratında farklı mısır zeini miktarlarının kullanılması.....	33

4.3.3. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin mısır zeini içeren denemelerine ait kinetik parametreler.....	35
4.4.Soya Proteini	36
4.4.1. Keçiyoynuzu substratında farklı soya proteini miktarlarının kullanılması	36
4.4.2. Glukoz substratında farklı soya proteini miktarlarının kullanılması.....	39
4.4.3. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin soya proteini içeren denemelerine ait kinetik parametreler.....	41
4.5.Bitkisel Azot Kaynaklarının Genel Değerlendirilmesi	42
4.6. Et-Kemik Unu.....	43
4.6.1. Keçiyoynuzu substratında farklı et-kemik unu miktarlarının kullanılması	43
4.6.2. Glukoz substratında farklı et-kemik unu miktarlarının kullanılması	45
4.6.3. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin et-kemik unu içeren denemelerine ait kinetik parametreler.....	47
4.7. Tüy Unu.....	48
4.7.1. Keçiyoynuzu substratında farklı tüy unu miktarlarının kullanılması.....	48
4.7.2. Glukoz substratında farklı tüy unu miktarlarının kullanılması	50
4.7.3. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin tüy unu içeren denemelerine ait kinetik parametreler.....	52
4.8. Balık Unu	53
4.8.1. Keçiyoynuzu substratında farklı balık unu miktarlarının kullanılması	53
4.8.2. Glukoz substratında farklı balık unu miktarlarının kullanılması	55
4.8.3. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin balık unu içeren denemelerine ait kinetik parametreler.....	57
4.9. Hayvansal Azot Kaynaklarının Genel Değerlendirilmesi.....	58
4.10. Bitkisel ve Hayvansal Azot Kaynaklarının Karşılaştırılması.....	59
4.11. En İyi Olarak Belirlenen Karbon ve Azot Kaynaklarında Fermentör Çalışması.....	60
4.12. Azotça Zenginleştirilmemiş Fermentasyon Denemeleri.....	61
4.13. Alternatif Karbon ve Azot Kaynaklarının Ekonomik Analizi	61
5. SONUÇ	63
6. KAYNAKLAR	64
7. EKLER.....	72
Ek 1. Azot Kaynağı Olarak Değerlendirilen Bitkisel, Hayvansal Materyaller ve Azot Oranları.....	72
Ek 2. Zeinin Flask Çalışmalarındaki Görüntüsü.....	73
Ek 3. Kalıntı Şeker Miktarının Hesaplandığı Standart Mannoze Kurvesi	74

ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
ml	Mililitre
U	Ünite
kDa	Kilodalton
rpm	Dakikadaki devir sayısı
°Bx	Çözünür kuru madde miktarı
nm	Nanometre

Kısaltmalar

μ	Mikroorganizma için spesifik gelişme hızı
A.B.D	Amerika Birleşik Devletleri
A.Ş	Anonim Şirketi
ATCC	Amerikan tip kültür koleksiyonu
BSE	Deli dana hastalığı
ÇKM	Çözünür kuru madde
DNSA	Dinitro salisilik asit
dx/dt	Birim zamandaki biyokütle oluşumu
ds/dt	Birim zamanda harcanan substrat miktarı
dp/dt	Birim zamanda oluşan ürün miktarı
FDA	Amerika Gıda ve İlaç Kurumu
Gal	Galaktoz
Glc	Glukoz
GRAS	Genel olarak güvenilir kabul edilen
Man	Mannoz
OD	Optik Yoğunluk
pH	Hidrojen iyonlarının (-) logaritması
t	Zaman
x	Biyokütle miktarı
x ₀	Fermentasyon başlangıcındaki biyokütle miktarı
S	Substrat
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PDA	Patetes nişastası bazlı agar
P	Ürün
P ₁	Fermentasyon sonundaki ürün miktarı
P ₀	Fermentasyon başlangıcındaki ürün miktarı
S ₀	Fermentasyon başlangıcındaki substrat miktarı
S ₁	Fermentasyon sonundaki substrat miktarı
t _d	Canlı hücrelerin iki katına çıkma süresi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Galaktomannanın kimyasal yapısı	12
Şekil 2.2. Mannanın kimyasal yapısı	12
Şekil 2.3. Glukomannanın kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.4. Galaktoglukomannanın kimyasal yapısı	12
Şekil 3.1. Sartorius çalkalamalı inkübatör	15
Şekil 4.1. Farklı miktarlarda kırmızı mercimek içeren keçiboynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki maksimum aktivite değerleri	25
Şekil 4.2. Farklı miktarlarda pamuk tohumu içeren keçiboynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki maksimum aktivite değerleri	31
Şekil 4.3. Farklı miktarlarda mısır zeini içeren keçiboynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki denemelere ait maksimum aktivite değerleri	36
Şekil 4.4. Farklı miktarlarda soya proteini içeren keçiboynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki maksimum aktivite değerleri	42
Şekil 4.5. Farklı miktarlarda bitkisel kaynakların bulunduğu keçiboynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki maksimum aktivite değerleri.....	42
Şekil 4.6. Farklı miktarlarda et-kemik unu içeren keçiboynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki maksimum aktivite değerleri	48
Şekil 4.7. Farklı miktarlarda tüy unu içeren keçiboynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki maksimum aktivite değerleri	53
Şekil 4.8. Farklı miktarlarda balık unu içeren keçiboynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki maksimum aktivite değerleri	58
Şekil 4.9. Farklı miktarlarda hayvansal kaynakların bulunduğu keçiboynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki maksimum aktivite değerleri.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Fermentasyon çalışmalarında besiyerine ilave edilen gelişim faktörleri ve kaynakları.....	8
Çizelge 3.1. Fermentasyon için kullanılan besiyeri içeriği	16
Çizelge 3.2. Farklı azot ve karbon kaynakları ile mannanaz üretimi için deneme deseni.....	17
Çizelge 4.1. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin kırmızı mercimek içeren keçiyoynuzu substratında gelişimi.....	21
Çizelge 4.2. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin kırmızı mercimek içeren glukoz substratında gelişimi.....	23
Çizelge 4.3. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin kırmızı mercimek içeren denemelerine ait kinetik parametreler.....	24
Çizelge 4.4. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin pamuk tohumu içeren keçiyoynuzu substratında gelişimi.....	27
Çizelge 4.5. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin pamuk tohumu içeren glukoz substratında gelişimi.....	29
Çizelge 4.6. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin pamuk tohumu içeren denemelerine ait kinetik parametreler.....	30
Çizelge 4.7. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin mısır zeini içeren keçiyoynuzu substratında gelişimi.....	32
Çizelge 4.8. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin mısır zeini içeren glukoz substratında gelişimi	34
Çizelge 4.9. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin mısır zeini içeren denemelerine ait kinetik parametreler.....	35
Çizelge 4.10. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin soya proteini içeren keçiyoynuzu substratında gelişimi.....	38
Çizelge 4.11. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin soya proteini içeren glukoz substratında gelişimi.....	40
Çizelge 4.12. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin soya proteini içeren denemelerine ait kinetik parametreler.....	41
Çizelge 4.13. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin et-kemik unu içeren keçiyoynuzu substratında gelişimi.....	44

Çizelge 4.14. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin et-kemik unu içeren glukoz substratında gelişimi.....	46
Çizelge 4.15. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin et-kemik unu içeren denemelerine ait kinetik parametreler.....	47
Çizelge 4.16. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin tüy unu içeren keçiyoynuzu substratında gelişimi.....	49
Çizelge 4.17. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin tüy unu içeren glukoz substratında gelişimi	51
Çizelge 4.18. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin tüy unu içeren denemelerine ait kinetik parametreler.....	52
Çizelge 4.19. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin balık unu içeren keçiyoynuzu substratında gelişimi.....	54
Çizelge 4.20. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin balık unu içeren glukoz substratında gelişimi	56
Çizelge 4.21. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> 'nin balık unu içeren denemelerine ait kinetik parametreler.....	57
Çizelge 4.22. Kullanılan azot kaynaklarına ait maksimum maksimum enzim aktivite değerleri.....	59
Çizelge 4.23. Kullanılan farklı azot kaynaklarına ait maksimum üretim oranları	60
Çizelge 4.24. Mannanaz üretiminde yüksek maliyetli kaynaklar ile alternatif kaynakların ekonomik analizi	62

1. GİRİŞ

Dünya’da değerlendirilme olanakları kısıtlı olan veya tamamı değerlendirilemeyen birçok tarımsal ürün, gıda fabrikası atıkları, basit şekerleri ve polisakkaritleri içeren diğer atıklar fermentasyon proseslerinde kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Saf kimyasalların yanı sıra bu ürün ve atıkların kullanılmasıyla birçok enzim, organik asit, vitamin, amino asit, alkol, antibiyotik ve antikör gibi ekonomik değeri yüksek ürünler fermentasyon yoluyla üretilmektedir. Fermentasyon çalışmalarında saf kimyasalların kullanımının maliyetli oluşu ve ayrıca tarımsal ürünlerin organik atıklarının değerlendirilmesi gibi ekonomik ve çevreci yaklaşımlar, alternatif olarak doğal ürünleri hammadde olarak kullanmaya olan ilgiyi artırmıştır. Bu alanda pamuk tohumu, şeker pancarı, melas, şeker kamışı, keçiboynuzu ekstraktı ve mısır gibi birçok bitkisel materyal yaygın olarak kullanılmaktadır.

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Endüstrinin pek çok alanında kullanılan enzimler genellikle fermentasyon tekniği kullanılarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikrobiyal kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere nispeten katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri, daha stabil ve ucuz olmalarıdır.

Son yıllarda enzim gibi ekonomik değeri yüksek ürünlerin üretimi için gerçekleştirilen fermentasyon çalışmalarında temel hedef, üretim şartlarının en düşük maliyetle yüksek saflıkta enzim üretimini sağlayacak şekilde optimize etmektir. Bu nedenle saf kimyasalların maliyeti artırdığı fermentasyon çalışmalarında yenilenebilir doğal kaynakların kullanım potansiyelinin belirlenmesi de günümüzde önem kazanmıştır.

Mannanazlar hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda oluşan doğal bir bileşiktir. Bununla birlikte mikroorganizmalar hızlı gelişimleri, besiyeri ortamının çok büyük olmaması ve genetik müdahalelerin kolay yapılabilmesi açısından en yüksek potansiyele sahip enzim kaynağı olarak tercih edilmektedir. Biyoteknolojik olarak üretilen mannanaz enzimi ilaç, kimya, tekstil ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmış olup, enzimin saf kimyasallar veya doğal kaynaklarla üretimi üzerine yabancı kaynaklı araştırmacı ve firmalar çeşitli çalışmalar gerçekleştirmekte ve geliştirdikleri yeni teknolojileri de patent altına almaktadırlar. Benzer şekilde ülkemizde de enzim üreten birçok mikroorganizmanın farklı ortamlardan izolasyonu, karakterizasyonu ve üretimi ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca doğal olarak bu enzimleri üreten mikroorganizmaların ilgili genleri tespit edilerek daha yüksek miktarda enzim üretme kapasitesine sahip rekombinant mikroorganizmaların üretimine yönelik çalışmalara da hız verildiği bilinmektedir.

Bu çalışmada tamamına yakını gübre ve kısmen yemlerin zenginleştirilmesinde kullanılan rendering ürünleri (işlenmiş mezbaha atıkları) ile yüksek azot içeriğine sahip bazı bitkisel materyallerin mannanaz üretiminde azot kaynağı olarak kullanım olanakları araştırılmıştır. Ayrıca değerlendirilme olanakları son 20 yılda biraz daha

azalan mezbaha atıklarının herhangi bir çevresel soruna yol açmadan doğadan uzaklaştırılması ve ekonomik döngüye yeniden katılımı sağlamak çalışmanın temel hedeflerinden birini oluşturmaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalar ile biyoteknolojik açıdan uygun içeriğe sahip olduğu belirlenmiş olan Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua L.*) ülkemizde Akdeniz ikliminin hâkim olduğu bölgelerde yetişen, düşük maliyetli bir meyvedir.

Bu projede karbon kaynağı olarak keçiboynuzu ekstraktı ve glukozun farklı alternatif azot kaynakları ile rekombinant *Aspergillus sojae* (ATCC 11906) kullanılarak derin kültür fermentasyonunda mannanaz üretimleri gerçekleştirilmiştir. Bu enzim birçok bakteri ve küf tarafından üretilmektedir. *Aspergillus fumigatus* (IMI 385708) endo- β -1,4-mannanaz üreten doğal bir patojen fungal mikroorganizmadır. Ancak bu mikroorganizmanın patojen olması nedeniyle, ürettiği mannanaz enzimi gıda endüstrisinde kullanılamamaktadır. Üretilen enzimin gıda endüstrisinde kullanılabilmesi için kullanılan mikroorganizmanın GRAS (Generally Recognized As Safe) listesinde yer alması gerekmektedir. Bu nedenle *Aspergillus fumigatus* (IMI 385708) mikroorganizmasının endo- β -1,4-mannanaz geninin proteini kodlayan bölgesi izole edilerek toksin üretmediği için GRAS listesinde yer alan *Aspergillus sojae* 'ye transfer edilmiş ve yüksek seviyede endo- β -1,4-mannanaz üreten rekombinant *Aspergillus sojae* (ATCC 11906) geliştirilmiştir. Ayrıca bu yeni suş endo- β -1,4-mannanaz üreten doğal ve rekombinant mikroorganizmalar arasında en yüksek endo- β -1,4-mannanaz aktivitesine sahip fungal kaynaklı bir suştur.

Alternatif azot ve karbon kaynakları ile biyoteknolojik ürünlerin üretiminde maliyetlerin düşürülmesine yönelik çalışmaların yapıldığı bilinmektedir. Ancak yapılan literatür taramaları neticesinde işlenmiş hayvansal katı atıklar (et-kemik unu, tüy unu, tırnak tozu, tavuk unu, et unu v.b) ve ucuz bitkisel materyaller ile mannanaz üretimine yönelik daha önce herhangi bir çalışmanın yapılmamış olduğu görülmüştür. Yapılan bu çalışma ile söz konusu ürünlerin daha yüksek bir ekonomik değer kazanacağı ve bu konuda daha sonraki yıllarda yapılacak kapsamlı çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMALARI

Üretim şartlarını en düşük maliyetle en yüksek saflıkta enzim üretimini sağlayacak şekilde optimize etmek son yıllarda yapılan fermentasyon çalışmalarının temel amacını oluşturmaktadır. Fermentasyon yoluyla üretilen enzimlerin endüstrideki kullanım alanları giderek genişlerken üretimin daha düşük maliyetlerle yapılabilirliği de araştırılmaya devam etmektedir. Laboratuvar ortamındaki çalışmalarda kullanılan kimyasalların maliyet açısından endüstriyel üretim için uygun olmaması alternatif kaynakların araştırılmasını gündeme getirmiş ve yenilenebilir doğal kaynakların kullanım potansiyelinin belirlenmesi de son yıllarda buna paralel olarak önem kazanmıştır.

2.1. Besiyeri Ortamının Bileşimi ve Mikrobiyal Gelişim İçin Önemi

Besiyeri tasarımı endüstriyel üretimlerde ve laboratuvar çalışmalarında mikrobiyal gelişim için en kritik işlemlerden birisidir (Stanbury 2003). Kullanılan mikroorganizmanın en kısa sürede gelişimini sağlayarak hedef ürünü en kısa sürede elde etmek için besiyeri ortamında bulunması gereken bileşenler için optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır.

Mikrobiyal gelişim için en fazla ihtiyaç duyulan iki bileşenin karbon ve azot olduğu bilinmektedir. Bunun yanında vitaminlerin ve bazı elementlerin (K, P, Ca v.b) de fermentasyon ortamında bulunması gelişim için zorunlu olmamakla birlikte genellikle olumlu etkilemektedir. Dolayısıyla mikrobiyal gelişim için ortama ilave edilen unsurları iki grupta kategorize edebilmek mümkündür:

- a) Majör Besinler (çok miktarda gereksinim duyulan bileşenler): Karbon, Azot
- b) Minör Besinler (az miktarda gereksinim duyulan bileşenler): Vitaminler, K, P, Ca, Mg, Fe vb.

2.1.2. Karbon kaynakları

Karbon, bakterilerde bulunan mikro ve makro-moleküllerin yapısına girdiğinden ihtiyaç duyulan önemli bir elementtir. Ototrof mikroorganizmalar karbon kaynağı için, inorganik bileşiklerden ve heterotroflar ise organik bileşiklerden yararlanırlar. İnorganik ve organik karbonlu bileşiklerin ayrışmasından kendileri için gerekli olan enerjiyi sağlarlar. Bazı mikroorganizmalar (paratroflar) enzim yetersizliği veya kendilerindeki mutasyonların bir sonucu olarak ortamdaki karbonlu bileşiklerden yararlanamadıkları için bunu ancak özel kaynaklardan sağlamaktadırlar (Arda 2000).

2.1.2.1 Saf karbon kaynakları

Saf karbon kaynakları laboratuvar ölçeğinde yapılan çalışmalar için uygun olmalarına rağmen endüstriyel çaptaki üretimler için yüksek maliyetleri nedeniyle sorun oluşturmaktadırlar. Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda kullanılan saf karbon kaynaklarına hidrolize nişasta, laktoz (Erkmen vd 2010), D-glukoz, galaktoz (Mabrouk ve Ahwany 2008), fruktoz (Aqeel 2010), guar gam (Manjula vd 2010, Mou vd 2011),

keçiboynuzu gamı (Kote vd 2009), konjak mannan (Lin vd 2007), pepton (Mohamad vd 2011) ve tripton (Yang vd 2009a) örnek verilebilmektedir.

2.1.2.2. Alternatif karbon kaynakları

Saf karbon kaynaklarının büyük ölçekli çalışmalarda üretim maliyetlerini artırması çeşitli endüstri kollarının atıkları ya da yan ürünleri başta olmak üzere birçok düşük maliyetli materyalin biyoteknolojik çalışmalar için uygunluğunun araştırılmasını gündeme getirmiştir. Bu amaçla günümüzde melas, kahve atığı, şeker pancarı, şeker kamışı, buğday kepeği, yenedünya çekirdeği, keçiboynuzu posası gibi pek çok ucuz materyalden yararlanılmaktadır.

a) Keçiboynuzu meyvesinin üretimi, bileşimi ve biyoteknolojik elverişliliği

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua L.*) *Fabaceae* familyasının *Cesalpinoideae* alt familyasına dahil çok yıllık bir bitkidir ve Akdeniz ikliminin hakim olduğu bölgelerde yetişmektedir (Seçmen 1974; Seçmen 1975). Ülkemiz keçiboynuzunun anavatan bölgesi içerisinde yer alması nedeniyle gen kaynakları açısından büyük bir avantaja sahiptir. Bu durum, ülkemiz koşullarında yapılan seleksiyon çalışmaları ile de ortaya konmuş ve ülkemizin özellikle yabani tipler açısından çok zengin olduğu bildirilmiştir (Battle ve Tous 1997). Dünyada keçiboynuzu yetiştiriciliği yapılan toplam üretim alanı 103,147 ha civarında olmakla beraber, Avrupa'daki Akdeniz kıyı şeridinde bulunan ülkelerin toplam üretim alanı 100,000 ha dolayındadır. Türkiye'de ise 2,800 ha üretim alanı bulunmaktadır (Anonim 2009). Dünya'da toplam keçiboynuzu üretiminin 186,466 ton/yıl olduğu tahmin edilmektedir. Bu üretimin %42'si İspanya, %16'sı İtalya, %8'i Fas, %6'sı Portekiz, %6.5'i Yunanistan, %5.5 Kıbrıs (özellikle de Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti) ve %4.8'i Türkiye'de gerçekleşmektedir. Türkiye, Kıbrıs ile birlikte yaklaşık 20,000 ton keçiboynuzu üretmektedir (Anonim 2009).

Keçiboynuzu meyvesi tüketim olgunluğuna ulaştığında %91–92 toplam kuru madde ve %62–67 çözünür kuru madde (ÇKM) içermekte olup, ÇKM'nin önemli bir bölümünü sakkaroz (%34–42), fruktoz (%10–12) ve glukoz (%7–10) oluşturmaktadır (Karkacier ve Artık 1995). Bu özelliğinden dolayı doğal haliyle preslenmesi mümkün olmayan keçiboynuzu meyvesi sıcak su ile ekstrakte edilerek ülkemizde uzun yıllardan beri pekmez üretimine işlenmektedir. Ancak zengin karbonhidrat, protein, pektin ve mineral madde kaynağı olan keçiboynuzu meyvesinin posası hayvan yemi rasyonlarına katılması dışında değerlendirilmemekte; ürünün yoğun bir aromaya sahip olması nedeniyle de yem rasyonlarına sınırlı miktarlarda katılmakta ve önemli bir kısım atılmaktadır. Bu nedenle uygun içeriğe sahip bu meyvenin ekstraktının biyoteknolojik yöntemlerle özellikle de fermentasyonla değerlendirilebilecek niteliklere sahip olduğu bilinmektedir.

Fermentasyon ortamında substrat olarak kullanılan keçiboynuzu ekstraktı ile etanol, laktik asit ve enzim üretimleri üzerine çalışmalar yapılarak meyvenin bu konudaki potansiyeli de ortaya konulmuştur (Turhan vd 2010). Ayrıca keçiboynuzu meyvesinden içki ispiertosu üretimi üzerine yürütülmüş ancak çalışmalar ileriye götürülemedi; endüstriye adapte edilebilecek nitelikte sonuçlara ulaşılamamıştır (Yazıcıoğlu vd 1983).

b) Diğer alternatif karbon kaynakları

Biyoteknolojik çalışmalarda keçiyoynuzu ekstraktı dışında pek çok alternatif karbon kaynağı kullanılmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda melas (Ozturk 2008), arpa (Erkmen 2010), mısır (Erkmen 2010), buğday kepeği, şeker kamışı küspesi, hurma şurubu, pirinç kabuğu (Yasina 2010), palm çekirdek içi kalıbı (Aziz vd 2008; Abdeshanian vd 2009; Rashid vd. 2010) ve mısır likörünün (Zheng vd 2012) kullanıldığı bildirilmiştir.

2.1.3. Azot kaynakları

Azot, mikroorganizmalardaki çeşitli moleküllerin yapısına girmesinin yanı sıra enzimler, gelişim faktörleri, nükleik asitlerdeki pürin ve pirimidin bazlarında da bulunmaktadır. Bu nedenle mikrobiyal gelişim açısından önemi büyük olan bu elementi bakteriler çeşitli kaynaklardan (amonyum tuzları, organik asitler, amino asitler, vb.) temin ederler. Mikroorganizmaların azota olan gereksinimleri genellikle değişiklik göstermektedir. Bazı mikroorganizmalar (Azotobakterler, Rhizobium türleri, vb.), havadaki gaz halinde bulunan azotu fikse ederek bundan organik moleküller yapabilmektedirler. Nitrat ve nitritler de azot kaynağı olarak kullanılan maddeler arasındadır. Besiyerlerinde inorganik azotun kullanılması pH üzerine etkili olabilir. Ortamdaki nitratlar ayrışınca genellikle asitlik düşer ve pH yükselir (Arda 2011).

2.1.3.1. Saf azot kaynakları

Saf karbon kaynakları gibi saf azot kaynakları da araştırma amacı taşıyan küçük ölçekli üretimler için uygun olmakla birlikte endüstriyel üretim için maliyet yükünü artırmaktadır. Bu yüksek saflıktaki materyallere pepton, maya ekstraktı, et ekstraktı, amonyum nitrat, amonyum nitrit, amonyum sülfat, sodyum nitrat, potasyum nitrat, üre, kazein hirolizati örnek olarak verilebilir (Öztürk 2008; Aqeel 2010).

2.1.3.2. Alternatif azot kaynakları

Fermentasyon çalışmalarında kullanılan doğal azot kaynaklarının kilogram fiyatı 4 - 5 TL olurken bunlardan üretilen mannanaz enziminin gram fiyatı yaklaşık 1000 dolar olarak karşımıza çıkması alternatif kaynak araştırmalarının ne kadar büyük bir öneme sahip olduğunu net bir şekilde göstermektedir. Mikrobiyal enzim üretiminde alternatif azot kaynakları kullanılabilir.

a) Hayvansal alternatif azot kaynakları

Mezbaha, et kombinasyonu gibi et üretim tesislerinde kesim sonrası insan tüketimine uygun ürünün dışında önemli bir miktarda katı atık kalmaktadır. Yapılan araştırmalar, ortalama randımanda bir büyükbaş hayvandan tüm hijyenik ve biyolojik kurallar uygulandığında canlı ağırlığının % 55'i oranında insan tüketimine uygun materyal elde edilebileceğini, bunun yanında net ağırlığının % 34'ü kırmızı et, % 16'sı kemik, % 16'sı deri ve deri yağları, % 16'sı sakatat, % 4'ü yağlı dokular, % 3'ü kan ve geri kalan kısım ise boynuz, tırnak, kafatası, ayak ve sindirimdeki maddelerden oluştuğunu ortaya koymaktadır (Ertuğrul 2000). Ayrıca çeşitli incelemelerde 100 büyük baş hayvandan

ortalama 3 ton atık çıktığı bildirilmiştir (Aslantaş 2004). Bundan dolayı kırmızı et sektöründeki girişimciler de yatırımlarının verimliliği açısından bu atıkları değerlendirecek ek tesisler açmak zorunda kalmıştır (Ertuğrul 2000). İşlenmedikleri takdirde çevre kirliliği sebebi olan bu hayvansal atıklar (deri, kıl, boynuz, tırnak, kan, kıkırdak, kemik vb.) belirli işlemlerden geçirilerek kozmetik ürünleri, sabun, mum, endüstriyel yağ asitleri ve gliserin üretiminde kullanılan forma dönüştürülebilmektedir. Ancak bu değerli ürünlerin üretiminin katı hayvansal atıkların çevreden tamamen uzaklaştırılmasında yetersiz kalması uzmanları farklı alanlarda nasıl değerlendirilebileceğine yönelik araştırmalara sevk etmiştir.

Başta A.B.D olmak üzere birçok ileri sanayi ülkesi hayvansal katı atıkların tamamının işlenmesiyle çevresel ve ekonomik fayda sağlayan rendering (parçalama, eritme) tesisleri kurmuştur. Bu atıklar sterilizasyon, yağ ayırma, kurutma, öğütme gibi işlemlere tabi tutup toz haline getirilmektedir (NRA 2000). Toz formuna getirilen bu ürünler, gübrelerin katkılanması ve besicilikte faydalanılan bazı yemlerin proteince zenginleştirilmesinde kullanılmaktadır. Yüksek oranda azot içeriğine sahip ve oldukça düşük maliyetli olan rendering ürünleri (kemik unu, kabuk-tırnak unu, kan unu, et-kemik unu, tüy unu vb.) ülkemizde de yoğun olarak bu iki alanda kullanılmaktadır.

Halk arasında deli dana hastalığı olarak da bilinen Bovine spongiform encephalopathy (BSE)'nin 1980'li yılların sonlarına doğru ortaya çıkması ve 1996 yılında büyük kayıplara yol açması nedeniyle rendering ürünlerinin ruminant beslenmesinde kullanımı FDA tarafından yasaklanmıştır (Hamilton 2000). Ayrıca hayvansal atıklarda hem doğal olarak bulunan hem de rendering işlemleri sırasında yüksek miktarlarda oluşabilen dioksinin tespit edilmesi bu ürünlerin kullanım alanlarının daha da daralmasına neden olmuştur (Aydın 2000). Çevresel ve ekonomik kaygılar araştırmacıları bu ürünlerin değerlendirilebileceği alternatif alanların araştırılmasına sevk etmiştir.

Son yıllarda biyoteknolojik çalışmalarda alternatif azot kaynağı olarak kullanılan rendering ürünleriyle gerçekleştirilen çalışmalardan verimli sonuçlar elde edilmiştir. Katma değeri yüksek ürünler olan etanol ve laktik asit üretiminde kullanılarak endüstriyel üretim için maliyetlerin düşmesine katkı sağlamıştır (Turhan 2009). Önümüzdeki yıllarda düşük maliyetli birer azot kaynağı olarak daha farklı çalışmalarda da kullanılabileceği düşünülmektedir.

b) Bitkisel alternatif azot kaynakları

Biyoteknolojik proseslerde alternatif azot kaynağı olarak hayvansal atıkların yanı sıra farklı ucuz bitkisel kökenli materyallerden de yararlanılmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanların soya fasülyesi, mısır, maserasyon sıvısı, gluten, pamuk tohumu, kırmızı mercimek, buğday kepeği olduğu bildirilmiştir (Erkmen 2010; Reddy 2005; Reddy vd 2006; Reddy vd 2007a; Reddy vd 2007b).

2.2. Sıvı Faz (Derin Kültür) Fermentasyon Yöntemi, Avantaj ve Dezavantajları

Fermentasyon yoluyla metabolit üretiminde birçok yöntem vardır. Fermentasyon işlemleri genel olarak derin kültür ve katı kültür olmak üzere ikiye ayrılabilir. Bu iki işlem arasındaki temel farklılık substrattaki serbest su miktarıdır. Katı kültür fermentasyonu serbest su bulunmayan nemlendirilmiş katı substratlar üzerinde mikroorganizma gelişimini ve metabolik faaliyeti ifade eder. Bu fermentasyonda mikroorganizma, gelişimi için gerekli suyu substratın içindeki nemden karşılar (Mitchell vd 2000). Derin kültürde ise gerçekleştirilen fermentasyon işlemlerinde substrat miktarı 50 g/l'nin üzerine çıkmamaktadır ve aynı zamanda substrattaki nem oranı %12'nin altına düşmemektedir (Robinson vd 2001).

Sıvı kültür fermentasyonları mikroorganizmanın steril sıvı besiyerine inoküle edildiği bir tekniktir. Endüstriyel enzimlerin üretilebildiği bu fermentasyon yöntemi, içinde yüksek konsantrasyonda oksijen ve zengin bir sıvı besiyeri bulunan kapalı tanklarda daha önceden seçilmiş organizmanın (bakteri, küf veya maya) dikkatlice gelişiminin sağlanmasını kapsamaktadır (Nundurkar vd 2012). Genellikle paslanmaz çelikten yapılmış silindirik tankların kullanıldığı derin kültür tekniğinde yeterli düzeyde karıştırma ve havalandırmanın yapılması büyük öneme sahiptir. İnokülasyon ile ortama verilen milyonlarca hücre ve sporun her biri fermentördeki besiyerinde üreme odakları oluşturarak hızla üreyip besin elementlerini biyokütleyle dönüştürürler (Scragg 1988). Fermentasyon süresince besinleri parçalayan organizma, ortama arzu edilen hedef ürünü (enzim, etanol, organik asit vb.) salgılamaktadır. Salgılanan bu ürün fermentasyon sonrasında çeşitli işlemler ile ortamdaki safsızlıklardan arındırılarak elde edilmektedir.

Derin kültür yönteminde tüm hücreler ortamın fiziksel ve kimyasal koşullarından aynı oranda etkilenir ve substrat ile doğrudan temas halindedir. Fermentasyon süresi bakımından yüzey kültür yönteminden daha kısa süreli olan derin kültür yönteminin kullanıldığı düzenek kompleks ve pahalıdır (Muhtar 2000). Sıvı faz fermentasyonlarının bir diğer dezavantajı da maliyet açısından katı faz fermentasyonlarına oranla daha yüksek maliyet gerektirmesidir (Özşölen 2010).

2.3. Mikrobiyal Gelişim Faktörleri

Fermentasyon çalışmalarının başarıya ulaşması için mikroorganizmanın metabolit üretme ve hücre gelişimi için ihtiyaç duyduğu tüm bileşikler fermentasyon ortamında uygun formda ve miktarda bulunmalıdır (Brock 1984). Ancak organizma için gerekli olan bu içerikler inhibe edici etki gösteren herhangi bir unsur içermemelidir.

Gelişim faktörleri mikroorganizma tarafından sentezlenmeyen ve bundan dolayı dışarıdan ilave edilmesi gereken materyallerdir. Enzimlerde kofaktör olarak yer alan bu materyaller vitaminler ve nükleik asitlerin yapısında bulunabilmektedirler. Endüstriyel besiyeri tasarımında saf formlarının kullanılması oldukça pahalı olduğundan majör bileşikler doğal olarak yapısında bulunduran materyaller kullanıldığından gelişim faktörleri fermentasyon öncesinde besiyerleri ortamına düşük miktarlarda ilave edilmektedir (Okaför 2007) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Fermentasyon çalışmalarında besiyerine ilave edilen gelişim faktörleri ve kaynakları

Gelişim Faktörü	Gelişim Faktörünün Kaynağı
Vitamin B	Pirinç parlatma işlemi, buğday özü, mayalar
Vitamin B ₂	Tahıllar, Mısır step likörü
Vitamin B ₆	Mısır step likörü, mayalar
Nikotinamid	Karaciğer, penisilin likörü
Pantotenik Asit	Mısır likörü
Vitamin B ₁₂	Karaciğer, silaj, et

2.4. Enzimlerin Endüstriyel Önemi ve Mannanazlar

Enzimler, doğal olarak canlılar tarafından sentezlenen ve tamamı ya da bir kısmı protein yapısında olan biyo-moleküllerdir (Uhlig 1998). Canlı hücredeki bütün biyokimyasal tepkimeler enzimlerin kontrolü ve düzeni altında gerçekleşmektedir. Enzimler yaşam ve canlılığın devamı için temel unsurlardır. İnsanlar tarafından tüketilen bitkisel ve hayvansal kaynaklı gıda maddelerinin; yapı, renk, tat ve koku özellikleri, besleme değerleri üzerinde olumlu ya da olumsuz etkileri söz konusudur. Fermente gıdaların üretimi, etkin mikroorganizmaların içerdikleri enzimlerin aktiviteleri sonucunda gerçekleşmektedir. Günümüzde gıda endüstrisinde kullanılan ticari enzim preparatları bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Aynı zamanda gıda analizlerinde de yararlanılan enzimler endüstriyel atık ve artıklarının değerlendirilmesinde de kullanılarak çevre kirlenmesinin önüne geçilmeye çalışılmaktadır (Bilişli 2009).

Geçmişten günümüze kadar enzimlerin çok farklı kaynaklardan elde edildiği görülmektedir. Bunlar bitkisel, hayvansal ya da endüstriyel anlamda ihtiyacı karşılayabilen mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir (Gupta vd 2003). Ancak endüstriyel alanda kullanılan enzimler ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedir. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilebilme gibi avantajlara sahip olmasıdır. Örneğin mikrobiyal enzimler ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde çok yüksek düzeyde aktivite gösterirler (Wiseman 1987; Horikoshi 1999).

Bitkisel ve hayvansal enzimlerin endüstriyel ihtiyacı karşılayamaması, bu alandaki ilginin artan bir şekilde mikrobiyal enzimlere yönelmesini sağlamıştır. Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyonlara uygunluğu gibi sebeplerden dolayı mükemmel bir enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Rao vd 1998). Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmaların fermentasyonu ile üretilmektedir (Godfrey ve West 1996).

Birçok gıda fermentasyonu için doğu ülkelerinde enzim kaynağı olarak ipliksi mantarlar kullanılmaktadır. Batı ülkelerinde ise modern anlamdaki mikrobiyal enzim teknolojisinin 1896'da 'takadiastase'ın ticareti ile başladığı bilinmektedir. Bu doğu toplumlarından batı dünyasına önemli bir teknolojik transfer olmuştur (Aygan 2008).

2.4.1. Mannanazın endüstriyel uygulamaları

Fermentasyon yoluyla elde edilen mikrobiyal mannanaz gıda, yem ve deterjan endüstrisinde son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların genetik olarak değiştirilebilmesindeki gelişmelerle yeni ve istenilen ürünleri üretebilme yeteneğine sahip mannanaz üretiminin imkânlarında gelişme sağlanmıştır. Toplu üretimi daha kolay olduğundan, ekstraselüler mannanaz önemli bir ticari değere sahiptir. Mannanaz genellikle gıdaların viskozitesinin azaltılması, meyve suyu üretiminde berraklaştırma ve maserasyon işlemlerinde, yem sanayi, kâğıt ve pulp endüstrilerinde ağaç hamurunun enzimatik ağartılmasında, instant kahve üretilmesinde, deterjan ve tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Mikroorganizmaların genetik olarak değiştirilebilmesindeki gelişmeler yeni ve istenilen ürünleri üretebilme yeteneğine sahip mannanaz üretiminin imkânını sağlamıştır. Rekombinant mannanazların gelişimi ve PandG, ChemGen ve Genencor firmaları tarafından bu ürünlerin ticarileştirilmesi biyoteknoloji ve modern mikrobiyolojideki başarılı uygulamalara çok güzel bir örnektir. Ayrıca dünya genelinde birkaç ticari firma başarılı bir şekilde mannanaz ile ilgili olarak piyasada yerini almıştır. Toplu üretimi daha kolay olduğundan, ekstraselüler mannanaz önemli bir ticari değere sahiptir.

a) Kâğıt ve selüloz endüstrisi

Mannanaz, en fazla yumuşak dokulu ağaçların pulpunun enzimatik ağartılmasında galaktomannanın parçalanması için kullanılır. Ağaç liflerinden elde edilen ligninin ekstraksiyonu ve çözünen pulpun ağartılması kâğıt endüstrisindeki en önemli basamaktır. Alkali koşullarda pulpa uygulanan ön işlemin lignine kovalent bağlı hemiselülozları hidrolize ettiği ve böylece ligninin sonradan giderilmesinin kolaylaştığı bilinmektedir (Dhawan ve Kaur 2007). Ayrıca, kâğıt hamuru üretimi aşamasında yüksek sıcaklıklar tercih edilir. Termofilik mannanazlar iç stabilitelelerinden dolayı mezofilik mannanazlara göre böyle yüksek sıcaklıklarda oldukça fazla avantaj sağlarlar. Bunun yanında mannanazın, kâğıt hamurunun parlaklığını arttırmak için klorsuz ağartma prosesinde hidrojen peroksite olan ihtiyacın azaltılmasında da kullanıldığı bildirilmektedir (Dhawan ve Kaur 2007).

b) İnanstant kahve üretiminde kullanımı

Mannan kahve ekstraktının ana bileşeni olup ekstraktın yüksek vizkozitesinden de sorumludur. Bu ise teknolojik olarak hızlı çözünebilir kahve üretimini olumsuz etkileyen faktörlerden bir tanesidir. Farklı mannanaz preparatları kahve mannanlarının hidrolizi için kullanılır. Böylece kahve ekstraktının vizkozitesi önemli oranda düşer. Mannanaz, instant kahve üretiminde dondurarak kurutma boyunca jel formu oluşumunun engellenmesi için ve sıvı kahve ekstraktında bulunan galaktomannanları hidroliz amacıyla da kullanılabilir (Sachslehner vd 2000, Nicolas vd 1998).

c) Deterjan endüstrisinde kullanımı

Karbohidrazların deterjanlarda kullanımı oldukça iyi bilinmektedir. Özellikle amilaz ve selülozlar en yaygın kullanımı olan enzimlerdir. Son yıllarda alkali stabil mannanazlar leke çıkarıcı güçlendiriciler olarak deterjanlarda kullanılmaktadır. Mannanazların, gamlar gibi (galaktomannanlar, glukomannanlar ve guar gam) mannan içeren materyalleri hidrolize ettikleri bilinmektedir. Mannan içeren lekeler genellikle uzaklaştırılması zor lekelerdir. Çünkü mannanların selüloz liflerine tutunma eğilimleri vardır ve bundan dolayı pamuklu ürünlere bağlanırlar. Ayrıca mananın zamklama etkisi de vardır. Bunun anlamı yıkama boyunca serbest kalan katı partiküller görünmeyen mannan kalıntılarına yapışabilirler. Başka bir ifadeyle sadece mannan lekeleri tekrar görünmez, aynı zamanda yıkama boyunca temiz kumaşlara transfer edilebilir. Mannanazlar hidroliz yoluyla mannanın β -1,4- bağlarını kırarlar, bu yıkım ile gam polimerlerini daha küçük karbonhidrat birimlerine dönüştürürler. Bu küçük, suda çözünebilir karbonhidrat birimleri kumaştan uzaklaşır ve yıkama ile atılır. Mannanazlar yıkama boyunca serbest kalan kirlerin çökmesini de sağlarlar (Dhawan ve Kaur 2007).

d) Kümes hayvanlarının yemlerinin besinsel değerinin artırılmasında kullanımı

Kümes hayvanlarındaki yemin dönüşümündeki verimlilik ve elde edilen ağırlıktaki azalma farklı yemlerin bağırsaktaki viskozitesi ile alakalıdır. Hayvan yemi olarak kullanılan unlar yüksek lif bileşimi, düşük lezzet, esansiyel amino asitlerin azlığı ve mannan, galaktomannan, ksilan ve arabinoksilan gibi besleyiciliği azaltan, yüksek viskoziteli bileşenleri içermelerinden dolayı bunların vücutta kullanımı oldukça sınırlıdır. (Dhawan ve Kaur 2007). Bu diyetlerde β -mannanaz kullanımıyla intestinal viskozitenin düşmesi sonucu civcivlerde hem ağırlık azalması hem de yemin dönüşüm verimliliği iyileşmiştir. Son yıllarda soya fasulyesi unu içeren diyetlerde β -mannanın, β -mannanaz tarafından enzimatik yıkımının, etlik piliçler (Jackson vd 2004, Daskiran vd 2004, Lee vd 2003), hindiler (Odetallah vd 2002) ve domuzlardaki (Petty vd 2002) yararlı etkileri ortaya konmuştur.

e) Petrol sondajında kullanımı

Mannanaz gaz ya da petrol sondaj operasyonlarında akışı arttırmak amacıyla da kullanılmaktadır. Ürün akışını kolaylaştırmak için polimer solüsyonun inceltmesi gerekir. Mannanazlar, guar gamı yüksek sıcaklıklarda hidrolize edebilirler (Politz vd 2000). Bundan dolayı bu enzimlerin petrol üretiminde kullanımının hayata geçirilmesinin yararlı olabileceği düşünülmektedir (McCutchen vd 1996).

f) Hindistancevizi etinden yağ ekstraksiyonunda kullanımı

Mannanazlar hindistancevizi etli kısmında enzimatik yağ ekstraksiyonunda kullanılır. Hindistancevizi etinin hücre duvarı yapısının ana bileşenlerini mannan ve galaktomannan oluşturmaktadır (Dhawan ve Kaur 2007). Bu prosesle yüksek yağ verimi elde edilir. Geleneksel metotla yapılan ekstraksiyon ile oluşan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) proteinler gibi yan ürünlerin kalitesini düşürürken, ürünü aflatoksin kontaminasyonuna ve oksidatif acılaşmaya karşı hassaslaştırır.

Enzimatik yağ ekstraksiyonu bu tür problemleri elimine etmenin yanında ürünün duyu kalitesini de artırır. Ayrıca, hindistancevizi yağının kalitesinin iyileşmesi zaten yarı rafine hindistancevizi yağı ile karşılaştırılabilir olduğundan yağın rafine edilmesi ihtiyacını azaltır (Dhawan ve Kaur 2007).

g) Tekstil ve Selülozik elyaf işleme endüstrisinde kullanımı

Mannanaz, tekstil ve selülozik proses endüstrisinde, elyafın hazırlanmasında veya deterjanlarla kombine edilerek temizlenmesinde kullanılır (Palackal vd 2006).

h) Kıvam arttırıcı ajanların indirgenmesinde kullanımı

Guar gum ve keçiyoynuzu gamı gibi galaktomannanlar, kıvam arttırıcı ajan olarak gıdadan tekstile çok geniş kullanım alanına sahiptirler. Mannanaz proses ekipmanlarında kalan gıda maddelerinin viskozitesinin düşürülmesi ve buna bağlı olarak işlem sonrası temizlikte kullanılabilir (Dhawan ve Kaur 2007).

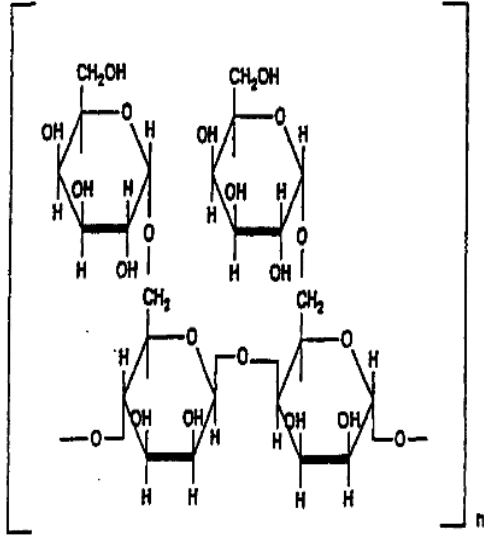
i) Gıda katkı maddesi olarak kullanımı

Mannanazın memelilerin ince bağırsağındaki sindirim enzimlerine karşı dayanıklı olan, fakat kalın bağırsakta *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* türlerine ait probiyotik bakteriler tarafından fermente edilebilen mannanları indirgeyerek insan sağlığına katkıda bulunduğunu ve manooligosakkaritleri de içeren probiyotik oligosakkaritlerin, insanların intestinal mikroflorasındaki bakterilerin gelişimini ve çoğalmasını desteklediği bilinmektedir (Dhawan ve Kaur 2007). Bundan dolayı son yıllarda çeşitli endüstrilerdeki potansiyel uygulamaları nedeniyle mannanaz üzerindeki bilimsel ve ticari dikkat artmıştır. Son yıllarda birkaç ticari ürün başarılı bir şekilde piyasaya sürüldü (Dhawan ve Kaur 2007). Bu amaçla melas, mısır şurubu, peynir altı suyu proteini, şeker kamışı, şeker pancarı, elma posası ve çeşitli gıdaların işlenmesi sonucunda oluşan atıklar ve glukoz, sakaroz ve laktoz gibi saf şekerler de mikroorganizmalar tarafından karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Datta ve Henry 2006, John vd 2007). Bunun dışında spesifik karbonhidrat kaynaklarının kullanımı onların ucuzluğu ve saflığına bağlıdır (Nolasco-Hipolito vd 2002). Bunun yanında saf şekerlerin kullanımı oldukça pahalı olurken şeker içeren atıkların kullanımı daha avantajlı olmaktadır. Bu atıklar içeriklerine göre asit veya enzimatik hidrolize tabi tutulmaktadır. Yaklaşık olarak aynı etkiye sahip olmalarına rağmen asit hidrolizi ekonomik açıdan uygun olması nedeniyle en çok tercih edilendir (Woiciechowski vd 2002). Ayrıca bazı durumlarda protein ve protein benzeri diğer kompleks besinlerde organizmalar için gereklidir. Keçiyoynuzu posası da zengin şeker içeriği, azotlu bileşik ve mineral madde varlığı ile iyi bir substrat niteliğinde olup, zenginleştirmek için diğer substratlara göre daha az isteklere sahiptir.

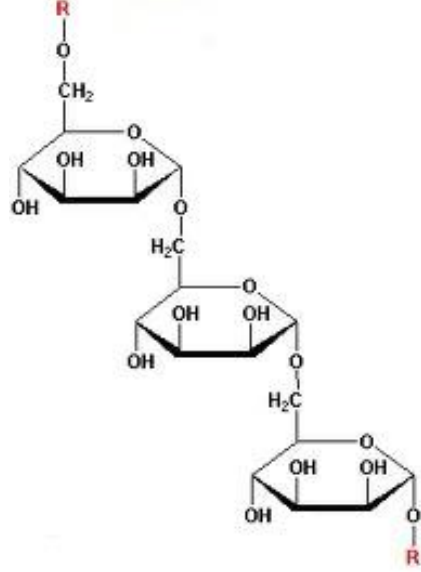
2.4.2. Mannanazların üretimi ve daha önce yapılmış mannanaz çalışmaları

β -mannanazlar (EC 3.2.1.78), doğada yaygın olarak bulunan, yumuşak ve sert dokulu ağaçların, keçiyoynuzu tohumlarının, fasulyedeki hemiselüloz fraksiyonunun bir parçası olan mannan ve heteromannanların (galaktomannan, glukomannan ve

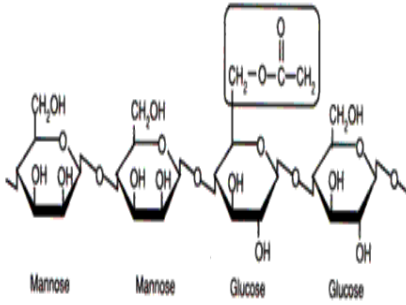
galaktoglukomannan) yapısında bulunan ve β -1,4-D-mannosidik bağları hidrolize uğratan ekstraselüler enzimlerdir.



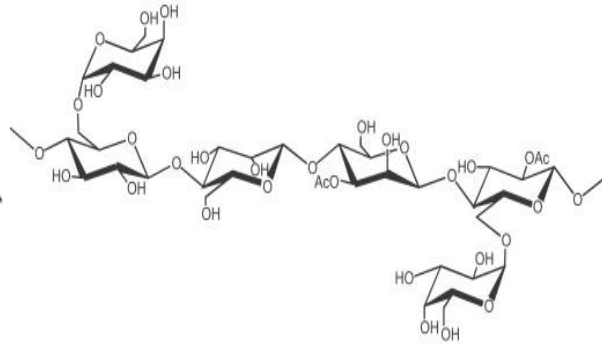
Şekil 2.1. Galaktomannanın kimyasal yapısı



Şekil 2.2. Mannanın kimyasal yapısı



Şekil 2.3. Glukomannanın kimyasal yapısı



Şekil 2.4. Galaktoglukomannanın kimyasal yapısı

Mannan yapısı, β -1,4 bağlı mannoz (Man) kalıntılarında oluşur. Galaktomannan yapısı, bazı mannoz kalıntılarında bağlı α -1,6 bağlı galaktoz (Gal) kalıntılarında, β -1,4 bağlı mannoz (Man) kalıntılarında oluşur. Glukomannan yapısı, β -1,4 bağlı mannoz (Man) ve glukoz (Glc) kalıntılarında oluşur ve Galaktoglukomannan yapısı, β -1,4 bağlı mannoz (Man) ve glukoz (Glc) kalıntıları ve bazı mannoz (Man) kalıntılarında bağlı α -1,6 bağlı galaktoz (Gal) dan oluşmaktadır.

Mannanazlar hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda oluşan doğal bir bileşiktir. Bununla birlikte mikroorganizmalar hızlı gelişimleri, besiyeri ortamının çok büyük olmaması ve genetik müdahalelerin kolay yapılabilmesi açısından en yüksek potansiyele sahip enzim kaynağı olarak tercih edilmektedir. Mannanaz üreten birçok bakteri türü olmasına rağmen, sadece birkaçı ticari olarak kullanılan doğal ya da rekombinant suşlar vardır. Bunların en önemlileri; *Bacillus sp.*, *Streptomyces*, *Caldibacillus cellulovorans*, *Caldicellulosiruptor Rt8B*, *Caldocellum saccharolyticum* (Dhawan and Kaur 2007). *Aspergillus*, 180 adet tür içeren ipliksi mantarlar grubuna dahil edilmektedir. Bu gruba dahil mikroorganizmaların çoğu bitki polisakkaritlerinin degradasyonunda doğada faydalı rol oynamaktadır. Ayrıca endüstriyel ölçekte enzim

üretimi için de önemli mikroorganizmalardır. Bunlar arasında *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus niger* Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından "genel olarak güvenilir kabul edilen" (Generally Recognized as Safe-GRAS) listesinde yer almaktadır. Bunun yanında *A.fumigatus*, insan ölümüne neden olan başlıca enfeksiyon sebebi ve temel bir alerjendir. *A.oryzae*, *A.sojae* ve *A.tamarii* gıda fermentasyonu endüstrisinde kullanılmakta ve aflatoksin üretmediği için güvenilir olarak kabul edilmektedir (Ward vd 2006). *A. oryzae* ve *A.sojae* soya sosu, miso ve sake adı verilen geleneksel fermente içeceklerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wicklow vd 2002).

Bitkilerin hücre duvarındaki polisakaritlerin degradasyonunda *Aspergillus* türleri tarafından üretilen enzimlerin büyük miktarı gıda ve yem endüstrisinde kullanılmaktadır. Çeşitli protein üretimlerinde kullanılabildiğinden dolayı son zamanlarda bazı *Aspergillus* türlerine olan ilgi artmıştır (de Vries and Visser 2001). *Aspergillus* türlerinin bazıları mannanaz üretiminde kullanılmaktadır. *Aspergillus tamarii* galaktomannan içeren bir besiyerinde 29 °C'de fermentasyona bırakıldığında β -mannanaz ürettiği tespit edilmiştir. Fermentasyon sonunda ham ekstraktta enzim aktivitesi Nelson ve Somogy metodu kullanılarak 0.02 U/ml olarak belirlenirken mannanazın spesifik aktivitesi 2.9 U/mg protein olmuştur (Civas vd 1984).

Enzimin saflaştırılması ve genin aşırı ifade edilmesi amacıyla Christgau vd (1994) tarafından yapılan bir çalışmada *Aspergillus aculeatus*'a ait β -mannanaz geni çoğaltılmış ve *Aspergillus oryzae* üzerine yerleştirilmiştir. Elde edilen rekombinant enzimin moleküler ağırlığı 45 kDa, izoelektrik noktası pH 4.5'da, optimum pH'sı 5.0 ve optimum sıcaklığı 60-70 °C olmuştur. Benzer bir çalışmada β -mannanaza sahip moleküler ağırlığı 40 kDa olan ipliksi mantar *Aspergillus niger* 28 °C'de erlenmayerlerde fermentasyona bırakılmıştır. Bu amaçla karbon kaynağı olarak % 5-2 (w:v) keçiyoynuzu gamı, % 0.5 Solka Floc selüloz ve %1 glukoz kullanılmış ve fermentasyon sonucunda mannanaz aktivitesi 90 nkat/ml olarak belirlenmiştir (Ademark vd 1998).

Buğday kepeği ve kahve atıklarından katı kültür fermentasyonu ile *Aspergillus awamori* kullanarak β -mannanaz ve β -mannozidaz üretimi üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada, enzim üretimi için optimum kompozisyonun % 40 kahve atığı ve % 60 buğday kepeği olduğu belirlenmiş ve katı kültürün 1 gramından 50 U β -mannanaz üretilmiştir (Kurakake vd 2001). Yine Feng vd. (2003) yapmış oldukları bir çalışmada *Bacillus licheniformis* NK-27 kullanılarak çalkalamalı flask fermentasyonu çalışmasını gerçekleştirmişlerdir ve en yüksek β -mannanaz aktivitesini 198.2 U/ml olarak belirlemişlerdir.

Lin ve Chen (2004), *Aspergillus niger* NCH-189'in çalkalamalı flask kültürü ile maksimum mannanaz aktivite değerini 28 U/ml olarak bulmuşlardır. *Aspergillus terreus*'dan fitaz ve mannanaz genlerinin *Pichia pastoris* üzerine aktarıldığı bir çalışmada, mannanazın enzim aktivitesi 39.7 U/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca bu enzimin pH 5.5-10.5 değerlerinde aktif olduğu görülürken, en yüksek pH 7.5'a kadar çalıştığı belirlenmiştir. Bunun yanında optimum çalışma sıcaklığının 55 °C olduğu bildirilmiştir (Huang vd 2007).

Chen vd. (2007) yaptıkları çalışmada *Pichia pastoris*'e *Aspergillus sulphures*'un ifade ettiği β -mannanaz geni aktarılmış ve keçiyoynuzu gamı için ifade edilen spesifik aktivite 366 U/mg olarak bulunmuştur. Öztürk vd. (2010) yapmış olduğu bir çalışmada, *Aspergillus sojae* AsT1 kullanılarak melasın % 0.43 NH_4NO_3 , % 0.05 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ve % 0.1 K_2HPO_4 ile zenginleştirilmesi ile β -mannanaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen sonuca göre en yüksek mannanaz aktivitesi 482 U/ml olarak bulunmuştur.

Zhao vd. (2011) *Aspergillus niger* CBS 513.88 geni ile ifade edilen *Pichia pastoris* tarafından β -mannanaz üretimi için 250 ml'lik flasklarda fermentasyon gerçekleştirmişlerdir ve süpernatanta herhangi bir saflaştırma işlemi uygulamadan elde edilen en yüksek mannanaz aktivitesini 430.9 U/mg olarak elde etmişlerdir. Wu vd. (2011) yapmış oldukları bir çalışmada da, *Aspergillus niger* E-30 mutant suşu kullanılmış ve en yüksek β -mannanaz aktivitesi değeri, 1067.5 U/mg olarak keçiyoynuzu gamına karşı saflaştırılmış enzim solüsyonu ile elde edilmiştir.

Zheng vd. (2012) CSD besiyeri ortamı (mısır sarp likörü toz glukozu) kullanarak yapmış oldukları flask fermentasyonu denemelerinde bir çalışmada en yüksek mannanaz aktivitesini 513.3 U/ml olarak bildirmişlerdir. Yin vd. (2012) mannanaz üreten yeni bir bakteri olan *Paenibacillus cookii*'yi kullanmışlar ve saflaştırılmış ve saflaştırılmamış enzimler için en yüksek spesifik aktiviteyi sırasıyla 635.4 U/mg ve 7.0 U/mg olarak elde etmişlerdir.

Biyoteknolojik çalışmalarda alternatif azot kaynaklarının kullanımı ile ilgili yapılan literatür taraması neticesinde tüy unu ile keratinaz üretimi (Brandelli 2011), kırmızı mercimek unu ile laktik asit üretimi (Altaf 2005) ve et-kemik unu, tüy unu, tırnak tozu ile laktik asit ve etanol üretimi (Turhan 2009) çalışmaları yapılmış olmakla birlikte yeterli bilimsel araştırmanın yapılmadığı anlaşılmaktadır. Daha önce rendering ürünleri ve düşük maliyetli bitkisel azot kaynaklarının mannanaz üretiminde alternatif azot kaynağı olarak kullanımına ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bundan dolayı yapılan bu çalışmada derin kültür fermentasyonunda kullanılabilmesi amacıyla bilinen hayvansal katı endüstriyel atıklar ver bazı bitkisel materyaller alternatif azot kaynağı olarak tercih edilmiştir.

Bu çalışmada söz konusu materyallerin farklı miktarları besiyerine ilave edilerek mannanaz üretimine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca düşük maliyetli bir karbon kaynağı olan keçiyoynuzu ekstraktı ile glukoz denemelerde ayrı ayrı kullanılarak enzim aktivite değerlerine olan etkisi belirlenerek çalışma sonunda karşılaştırma yapılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Proje kapsamında mikrobiyal gelişim için karbon kaynağı olarak saf glukoz (> % 99.5) ve çekirdeği çıkarılmış keçiyoynuzu meyvesinden elde edilmiş ekstrakt kullanılmıştır. Mikrobiyal gelişimin diğer ana faktörü olan azot kaynağı için ise 4 tane bitkisel ve 3 tane hayvansal olmak üzere 7 farklı alternatif azot kaynağından faydalanılmıştır. Bunlardan hayvansal olan kaynaklar; et-kemik unu (EKU), balık unu (BU) ve tüy unu (TU) iken bitkisel kökenli olanlar ise kırmızı mercimek (KM), pamuk tohumu (PT), soya proteini (SP) ve mısır zeindir (MZ).

Çalışma kapsamında kullanılan rendering ürünleri Keskinöğlü Tavukçuluk İşl. San Tic. A.Ş. ve Antalya Et Entegre Tesisleri A.Ş'den, pamuk tohumu Antbirlik Pamuk ve Narenciye Tarım Satış Kooperatifleri Birliği'nden, soya proteini ADM Archer Daniels Midland Company (Decatur, IL, ABD)'den, mısır zeini Freeman Industries (Tuckanoe, NY, ABD)'den, keçiyoynuzu Yenigün A.Ş'den, kırmızı mercimek ise yerel bir marketten temin edilmiştir. Materyaller kullanım anına kadar 4°C'da muhafaza edilmiştir.

3.2. Fermentasyonlarda Kullanılan Çalkalamalı İnkübatör

Flasklarda gerçekleştirilen fermentasyon ile mannanaz üretimi için Şekil 3.1'deki çalkalamalı inkübatör (Sartorius Stedim, Certomat, Goettingen, Almanya) kullanılmıştır. Tüm denemeler 30°C sıcaklıkta, 250 ml'lik erlenlere 100 ml besiyeri ilave edilerek 200 rpm çalkalama hızında yapılmıştır (Ozturk 2010).



Şekil 3.1. Sartorius Çalkalamalı İnkübatör

3.3. Kullanılan Mikroorganizma

Bu çalışma kapsamında mannanaz üretimi için rekombinant *Aspergillus sojae* Ast1 kullanılmıştır. Söz konusu mikroorganizma Ortadoğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Zümrüt Begüm ÖGEL'in laboratuvarından temin edilmiştir. Rekombinant *Aspergillus sojae* için stok kültürler, Potato Dextrose Agar (PDA) içeren petri kaplarında 30°C'de 4-5 gün geliştirilmiş ve 4°C'de en fazla 1 ay depolanmıştır. Geliştirilen stok kültürler her ay periyodik olarak yenilenmiştir. PDA'da hazırlanan stok kültürlerin üzerine steril tuz-tween çözeltisi

dökülerek spor süspansiyonu hazırlanmış ve rekombinant *Aspergillus sojae* 15 ml steril falcon tüplerinde karıştırılmıştır. Elde edilen karışımdaki spor sayısı “Thoma lamı” kullanılarak mikroskopta belirlenmiştir.

3.4. Fermentasyon

Fermentasyonun başlatılabilmesi için ilk önce mikrobiyal gelişim açısından gerekli olan besin maddelerini içeren besiyerinin hazırlanması gerekmektedir. Bundan dolayı fermentasyon denemelerinde karbon kaynakları (keçiboynuzu ekstraktı ya da saf glukoz), azot kaynakları (et-kemik unu, tüy unu, balık unu, kırmızı mercimek, pamuk tohumu, soya proteini, mısır zeini) ve diğer zenginleştirme unsurları ilave edildikten sonra karıştırılarak ortam homojen hale getirilmiştir. Ardından 250ml’lik erlen mayerlere paylaşılan besiyeri 121°C’da 15 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur. Steril fermentasyon ortamına tüm denemelerde daha önce gerçekleştirilen bir proje kapsamında (Turhan 2012) elde edilen optimum şartlar referans alınarak başlangıç şeker içeriği 8 °Bx ya da 80g/L olarak ayarlandıktan sonra %7 oranında hücre inokülasyonu yapılmıştır. Hazırlanan besiyeri inokülasyon sonrasında pH kontrolü olmaksızın 30°C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakılmıştır. Fermentasyon ortamına ilave edilen zenginleştirme unsurları ve miktarları Çizelge 3.1.’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Fermentasyon için kullanılan besiyeri içeriği

İçerik	Miktar (%)
Glukoz / Keçiboynuzu Ekstraktı	80 g/L (8°Bx)
Magnezyum sülfat hepta hidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.05
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	0.1
Azot Kaynağı (KM, PT, SP, MZ, EKU, TU, BU)*	0.5, 0.75, 1.0

* **KM:** Kırmızı Mercimek, **PT:** Pamuk Tohumu, **SP:** Soya Proteini, **MZ:** Mısır Zein, **EKU:** Et-Kemik Unu, **TU:** Tüy Unu, **BU:** Balık Unu

3.5. Deneme Deseni

Yapılan çalışma kapsamında piyasada rendering ürünleri olarak da ucuz hayvansal (et-kemik unu, balık unu, tüy unu) ve bitkisel (kırmızı mercimek, mısır zeini, soya proteini ve pamuk tohumu) azot kaynakları besiyeri ortamına ayrı ayrı denemelerde ilave edilmiştir. Fermentasyon ile enzim üretimi için hazırlanacak besiyerlerinde karbon kaynağı olarak çalışmanın ilk yarısında 8 Briks’lik keçiboynuzu ekstraktı, diğer yarısında ise 80 g/L’lik glukoz çözeltisi kullanılmıştır. Tüm fermentasyon denemeleri, sıcaklığın 30 °C’de ve karıştırma hızının 200 rpm’de sabit tutulduğu çalkalamalı inkübatörde 250 mL’lik erlenmayerlerde gerçekleştirilmiştir.

Her biri 10 gün süren fermentasyonlarda her gün iki örnek alınarak kalıntı şeker, enzim aktivitesi, biyokütle ve pH olmak üzere dört farklı parametre üzerinden ilgili analizler ve ölçümler yapılarak sonuçlar kaydedilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde yapılan çalışmalarda her bir azot kaynağı için %0.5, %0.75 ve %1.0 olmak üzere üç farklı miktar denenmiştir. Azot kaynaklarının enzim aktivitesine olan etkisini daha net görebilmek için herhangi bir azot kaynağı kullanılmaksızın bir kontrol çalışması

yapılmıştır. Ayrıca alınan her örneğin arzu edilmeyen bir değişikliğe (enzim aktivitesinde artma ya da azalma gibi) uğramaması için analiz zamanına kadar +4 °C’da muhafaza edilmiştir. En yüksek mannanaz aktivitesinin elde edildiği karbon kaynağı, azot kaynağı ve miktarı kombinasyonu için biyoreaktör denemesi yapılmıştır. Bu amaçla toplam 45 adet fermentasyon paralelleri ile birlikte gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.2’de farklı azot kaynakları kullanılarak yapılacak fermentasyon çalışmalarına ait deneme deseni verilmiştir.

Çizelge 3.2. Farklı azot ve karbon kaynakları ile mannanaz üretimi için deneme deseni

	KEÇİBOYNUZU (8°Bx)			SAF GLUKOZ (80 g/L)		
	%1 N*	% 0,75 N	% 0,5 N	%1 N	% 0,75 N	% 0,5 N
Bitkisel						
Azot						
Kaynakları						
Kırmızı mercimek						
Soya Proteini						
Mısır Zeini						
Pamuk Tohumu						
Hayvansal						
Azot						
Kaynakları						
Balık Unu						
Et-Kemik Unu						
Tüy Unu						

*0.5N, 0.75N ve 1N ile her bir farklı çalışma için hazırlanan besiyerindeki azot kaynağı yüzdesini (g/L) göstermektedir.

Çizelge 3.2’de de görüldüğü gibi proje kapsamında yapılan çalışmaları 5 başlık altında özetlemek mümkündür;

1. İki farklı karbon kaynağında, üç farklı konsantrasyonda dört farklı bitkisel azot kaynağı ile yapılan fermentasyonlar (24 deneme)
2. İki farklı karbon kaynağında, üç farklı konsantrasyonda üç farklı hayvansal azot kaynağı ile yapılan fermentasyonlar (18 deneme)
3. İki farklı karbon kaynağında herhangi bir azot kaynağı içermeyen besiyeri ortamında gerçekleştirilen kontrol amaçlı fermentasyonlar (2 deneme)
4. En iyi olarak belirlenen karbon ve azot kaynaklarında fermentör çalışması (1 deneme)
5. Alternatif karbon ve azot kaynakları ile gerçekleştirilen fermentasyonların ekonomik analizi

3.6. Yöntem

3.6.1. Mannanaz aktivitesinin belirlenmesi

Fermentasyon ortamından alınan örneklerde mannanaz aktivitesi belirlenmiştir. Bu amaçla endo-beta-1,4 mannanaz, DNS (dinitro salisilik asit) metodu ile tespit edilmiştir. Öncelikle Na-sitrat tamponunda (pH 6) keçiyoynuzu gamı solüsyonu (%0.05 w/v) hazırlanmıştır ve belirtilen solüsyonun 1.8 ml'si ile 0.2 ml 20 kat seyreltilmiş fermentasyon örneklerinin berrak kısmı bir test tüpünde karıştırılmıştır. Sıcaklığı 50°C olan su banyosunda 5 dk süren inkübasyonun ardından 3 ml DNS çözeltisi eklenmiştir. Tüpler daha sonra 90°C'lik su banyosunda 15 dk kaynatılmış, en son olarak da soğutulmak üzere buz banyosuna aktarılmıştır.

Elde edilen örnekler 540 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüş (Bailey vd 1992) ve değerler mannoz standart kurvesinden faydalanılarak aktivite tespitinde kullanılmıştır. Mannanaz aktivitesinin tanımlanmasına uygun olarak elde edilen aktivite değerleri U/ml olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin bir birimi (1U=16.7 nkat), bir dakikada 1 µmol D-mannoz'a eşit gelen indirgen şekerleri serbest hale geçiren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Puchart vd 2004).

Mannoz standart kurvesi, farklı konsantrasyonlarda D-mannozun (0-10 µmol/ml) hazırlanması ve DNS metodu uygulandıktan sonra 540 nm'de absorbanslarının ölçülmesi ile çizilmiştir. Standart kurve çizildikten sonra aşağıdaki denklem oluşturulmuştur.

$$\begin{aligned} OD_{540} &= a \times C_{\text{mannoz}} + b \\ OD_{540} &= 3,4522 \times C_{\text{mannoz}} - 0,0607 \end{aligned} \quad (1)$$

Denklemden,

a: Standart kurvenin eğimi

b: Standart kurvenin kesim noktası

C_{mannoz} = mannoz konsantrasyonu (µmol/ml)

Örneklerin indirgen şeker içeriği Eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır. Mannanaz aktivitesinin belirlenmesinde her bir örnek için mannoz konsantrasyonuna eşit olan indirgen şeker miktarı kullanılmıştır. Bu amaçla;

$$\text{Mannanaz Aktivitesi (U/ml)} = C_{\text{mannoz}} \times R_v \times D_f / t \quad (2)$$

Denklemden,

DF: Dilüsyon faktörü

R_v : Test tüpündeki toplam hacim/enzim solüsyonunun hacmi

t: Reaksiyonda kalma zamanı (dk)

2 No'lu eşitlik kullanılarak enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

3.6.2. Kalıntı şeker analizi

Flasklardan alınan örneklerdeki şeker analizi 3,5 dinitrosalisilik asit kullanılarak DNS metodu ile yapılmıştır (Miller 1959). Bu amaçla 0.1 ml örnek üzerine 3.9 ml saf su eklenmiştir. Aynı test tüplerine 0.08 ml 12M HCl asit eklenerek karıştırıldıktan sonra 90°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilerek hidroliz edilmiştir. Hidroliz sonrası üzerine 0.2 ml 5N KOH eklenerek karıştırılmış ve 3 ml'lik kısmı yeni bir tüpe alınarak üzerine 3 ml DNSA çözeltisi eklenmiştir. Solüsyon karıştırıldıktan sonra 90 °C'lik su banyosunda 15 dakika bekletilmiş ve son olarak 1 ml % 40 potasyum sodyum tartarat eklenmiştir. Örnekler soğutulduktan sonra 575 nm'de spektrofotometrik okuma yapılarak standart sakaroz çözeltisi ile hazırlanmış kurve üzerinden şeker miktarı hesaplanmıştır.

3.6.3. Toplam hücre kütle (biyokütle) miktarı

Çalkalamalı inkübatör ve reaktörden belirtilen zaman aralıklarında alınan örneklerde canlı gelişimini takip etmek için canlı hücre miktarı analiz edilmiştir. Bu amaçla örnek filtre kâğıtlarından (Whatman No:1) süzülüp, 60°C'de 24 saat kurutulularak ağırlığı sabit tartıma getirilmiştir. Fermentasyon süresince alınan tüm örneklerde bu işlem gerçekleştirilmiştir.

3.6.4. Kinetik parametrelerin belirlenmesi

Çalkalamalı inkübatörden alınan örneklerde şeker, biyokütle miktarı, mannanaz aktivitesi analizleri yapıldıktan sonra elde edilen veriler doğrultusunda;

- ✓ Şeker tüketimi (g/L)
- ✓ Mannanaz aktivitesi (U/ml)
- ✓ Maksimum tüketim oranı (g/L/saat)
- ✓ Maksimum üretim oranı (g/L/saat)
- ✓ Maksimum gelişim oranı (g/L/gün)
- ✓ Spesifik gelişim oranı (1/saat)
- ✓ Canlı hücrelerin iki katına çıkma süresi (Doubling time) (saat)

Fermentasyon sonrası şeker tüketim miktarı (S): $S = S_0 - S_1$ olup g/ml olarak hesaplanmıştır. Maksimum üretim ve tüketim oranları da;

Üretim oranı (U/ml/sa) = Mannanaz aktivitesi kurvesinin en dik kısmının eğimi,

Tüketim oranı (g/L/sa) = Şeker kurvesinin en dik kısmının eğimi kullanılarak hesaplanmıştır (Shuler ve Kargi 2008).

3.6.7. İstatistiksel değerlendirmeler

Biyokütle miktarı, enzim ve şeker analiz sonuçlarına ait değerlerin standart hataları SAS istatistiksel analiz yazılım programı (SAS 9.00, North Carolina, USA) kullanılarak hesaplanmıştır. Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanarak aynı sütundaki faktör ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olup olmadığı %95 güvenlik seviyesinde hesaplanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Proje kapsamında kullanılan bitkisel ve hayvansal kökenli materyallerin iki farklı substratta üç farklı miktarı ile mannanaz üretimleri gerçekleştirilmiştir.

4.1. Kırmızı Mercimek

4.1.1. Keçiboynuzu substratında farklı kırmızı mercimek miktarlarının kullanılması

Keçiboynuzu ekstraktı ile hazırlanan besiyerine %0,50 oranında KM ilave edilerek gerçekleştirilen denemede maksimum enzim aktivitesi değeri fermentasyonun 4. gününde $228,23 \pm 0,36$ U/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Maksimum aktiviteye ulaşılan 4. günden itibaren enzim aktivite değerlerinin giderek azaldığı görülmüştür. Ulaşılan maksimum biyokütle miktarı $18,29 \pm 1,05$ g/L olarak tespit edilirken fermentasyon sonunda ortamda kalan şeker miktarı ise $4,72 \pm 0,71$ g/L olarak hesaplanmıştır.

Besiyerindeki KM oranının % 0,75 olduğu denemede maksimum enzim aktivitesi $217,91 \pm 25,45$ U/ml olarak tespit edilmiştir. En yüksek biyokütle konsantrasyonuna ($21,60 \pm 0,60$ g/L) 4.günde ulaşılmıştır. Fermentasyon sonunda ortamda kalan şeker miktarı ise $4,96 \pm 0,47$ g/L olarak belirlenmiştir.

%1'lik denemede maksimum enzim aktivite değeri $247,11 \pm 6,63$ U/ml olarak tespit edilmiştir. Maksimum biyokütle konsantrasyonuna ($23,10 \pm 0,72$ g/L) ise fermentasyonun 10. gününde ulaşılmıştır. Çalışma sonunda kalıntı şeker miktarı $3,95 \pm 0,61$ g/L olarak belirlenmiştir. Her üç denemede de maksimum aktiviteye ulaşıldığı günden itibaren enzim aktivite değerlerinin giderek azaldığı görülmektedir.

Çizelge 4.1. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin kırmızı mercimek içeren keçiyoynuzu ekstraktında gelişimi

Zaman (Gün)	%0,50			%0,75			%1,0		
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)
B	74,38±1,37 ^a	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^e	78,09±1,54 ^{ab}	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^e	88,26±1,35 ^a	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^c
0	71,66±0,46 ^a	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^e	83,20±5,42 ^a	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^e	75,82±1,33 ^a	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^c
1	73,95±0,87 ^a	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^e	73,18±1,32 ^b	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^e	76,39±0,47 ^a	0,00±0,00 ^f	3,72±0,03 ^c
2	44,15±0,32 ^b	132,62±4,97 ^c	14,81±1,2 ^a	40,18±1,26 ^c	192,48±0,23 ^a	16,08±0,19 ^a	57,56±2,15 ^c	115,73±0,88 ^e	19,74±4,06 ^a
3	33,54±0,76 ^c	179,07±3,9 ^b	16,15±1,2 ^{dc}	29,61±0,67 ^d	198,44±21,85 ^a	21,60±0,60 ^b	38,87±0,58 ^d	175,02±0,58 ^{bcd}	19,95±3,35 ^b
4	26,30±0,80 ^d	228,23±0,36 ^a	18,29±1,05 ^{bc}	22,01±0,02 ^e	217,91±25,45 ^a	20,66±0,99 ^b	25,67±0,61 ^e	222,32±23,09 ^{ab}	22,53±0,55 ^b
5	21,08±3,90 ^e	175,79±5,70 ^b	17,23±1,07 ^{dc}	13,17±0,61 ^f	142,35±5,81 ^b	20,40±0,13 ^b	18,33±0,63 ^f	247,11±6,63 ^a	23,10±0,72 ^b
6	31,88±2,57 ^c	122,39±12,11 ^c	19,72±0,36 ^{ab}	22,27±0,02 ^e	139,76±5,22 ^b	18,18±0,47 ^c	12,69±0,25 ^g	194,25±0,55 ^{bc}	22,59±0,42 ^b
7	22,17±0,00 ^{de}	99,20±13,38 ^d	15,28±0,19 ^d	12,82±0,00 ^f	60,98±1,07 ^c	19,89±0,17 ^{bc}	8,06±0,30 ^h	139,14±10,35 ^d	20,89±2,55 ^b
8	10,40±0,50 ^f	77,33±4,57 ^{de}	16,72±0,19 ^{dc}	7,07±0,28 ^g	69,15±12,19 ^c	19,90±1,70 ^{bc}	5,37±0,43 ^{hi}	125,87±1,84 ^d	21,28±0,81 ^b
9	6,61±0,74 ^g	70,52±12,91 ^e	16,87±0,81 ^{dc}	6,44±0,17 ^g	65,99±5,92 ^c	17,96±0,70 ^c	4,44±0,25 ⁱ	149,72±5,39 ^{cd}	20,53±0,09 ^b
10	4,72±0,71 ^g	92,72±5,30 ^{de}	16,34±0,71 ^{dc}	4,96±0,47 ^g	84,41±13,46 ^c	17,76±0,43 ^c	3,95±0,61 ⁱ	161,61±19,92 ^{cd}	21,12±0,65 ^b

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$)

4.1.2. Glukoz substratında farklı kırmızı mercimek miktarlarının kullanılması

Substrat olarak glukoz kullanılan ve %0,50 oranında KM ilave edilen besiyerinde yapılan fermentasyon çalışmasında en yüksek enzim aktivitesi $78,55 \pm 15,08$ U/ml olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Fermentasyon sonundaki kalıntı şeker miktarının $49,41 \pm 0,87$ g/L olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte fermentasyonun 4.gününe kadar enzim aktivitesi tespit edilememiştir. Maksimum aktiviteye ulaşıldığı 6.günden itibaren ise aktivite değerleri giderek azalmıştır.

KM'nin %0,75 oranında eklendiği denemeye ait maksimum aktiviteye ($104,02 \pm 28,11$ U/ml) ve maksimum biyokütle konsantrasyonuna ($14,11 \pm 2,17$ g/L) 5.günde ulaşılmıştır. Kalıntı şeker miktarı $27,82 \pm 0,21$ g/L olarak hesaplanmıştır.

%1 KM kullanıldığında maksimum enzim aktivitesi fermentasyonun 5.gününde $86,44 \pm 31,24$ U/ml olarak belirlenmiştir. Maksimum biyokütle konsantrasyonu ve çalışma sonunda ortamda kalan şeker miktarı sırasıyla $11,07 \pm 0,56$ g/L ve $2,04 \pm 1,56$ g/L olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin kırmızı mercimek içeren glukoz substratında gelişimi

Zaman (Gün)	%0,50			%0,75			%1,0		
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)
B	79,08±0,74 ^a	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	86,87±1,95 ^a	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c	85,25±0,00 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^d
0	74,66±1,20 ^a	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	81,78±0,04 ^{ab}	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c	79,22±0,07 ^{ab}	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^d
1	76,31±0,18 ^a	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	82,60±0,21 ^{ab}	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c	82,22±1,13 ^{ab}	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^d
2	74,27±0,87 ^a	0,00±0,00 ^d	4,54±0,88 ^c	78,71±0,39 ^b	26,10±0,05 ^c	11,65±1,24 ^a	77,99±0,28 ^b	13,85±0,48 ^b	14,29±0,88 ^{ab}
3	68,32±2,93 ^b	0,00±0,00 ^d	8,18±0,26 ^{abc}	69,37±1,54 ^c	50,46±0,23 ^c	14,36±1,19 ^a	68,68±1,93 ^c	85,61±3,51 ^a	17,31±0,38 ^a
4	64,12±0,46 ^{bc}	40,07±13,09 ^{bc}	4,51±0,44 ^c	68,39±1,15 ^c	78,46±13,37 ^{ab}	6,47±0,95 ^b	62,38±0,57 ^c	59,05±7,86 ^{ab}	10,79±3,15 ^{bc}
5	59,83±0,16 ^{cde}	16,85±2,43 ^{cd}	5,86±0,95 ^{abc}	58,43±1,21 ^d	104,12±28,12 ^a	14,11±2,17 ^a	54,86±1,89 ^d	86,44±31,24 ^a	15,70±1,02 ^a
6	67,12±0,17 ^b	78,55±15,09 ^a	6,77±0,65 ^{abc}	57,27±1,47 ^d	7,69±0,19 ^c	9,88±0,70 ^{ab}	26,97±3,98 ^e	20,80±8,25 ^b	11,04±0,92 ^{ba}
7	62,51±0,25 ^{bcd}	68,26±9,38 ^{ab}	9,71±1,25 ^a	52,09±0,30 ^e	16,27±4,54 ^d	10,26±0,62 ^{ab}	15,28±4,83 ^f	14,03±0,03 ^c	9,24±0,93 ^c
8	56,50±0,20 ^e	45,82±6,75 ^{abc}	8,97±3,43 ^{ab}	46,04±3,24 ^e	50,99±1,95 ^{bc}	10,52±1,24 ^{ab}	6,40±0,05 ^g	0,00±0,00 ^b	11,19±0,21 ^{bc}
9	57,25±4,55 ^{de}	58,57±13,5 ^{cd}	8,29±1,36 ^{abc}	35,61±2,93 ^g	0,00±0,00 ^c	12,52±4,09 ^a	3,50±0,73 ^g	0,00±0,00 ^b	11,64±0,58 ^{bc}
10	49,41±0,87 ^f	37,23±9,68 ^{bcd}	5,36±0,47 ^{bc}	27,82±0,21 ^h	0,00±0,00 ^c	13,23±0,31 ^a	2,04±1,56 ^g	0,00±0,00 ^b	11,07±0,56 ^{bc}

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$)

4.1.3. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin kırmızı mercimek içeren denemelere ait kinetik parametreler

KM ile keçiyoynuzu ekstraktında yapılan çalışmalarda en yüksek enzim aktivitesine (247,11 U/ml) %1 oranında KM ilave edilen fermentasyonda ulaşılrken en yüksek şeker tüketimi (78,24 g/L) KM'nin %0,75 oranında ilave edildiği besiyerinde gerçekteşmiştir (Çizelge 4.3). En yüksek maksimum üretim oranı ise 73,11 U/mL/gün olarak %0,50'lik denemede hesaplanmıştır.

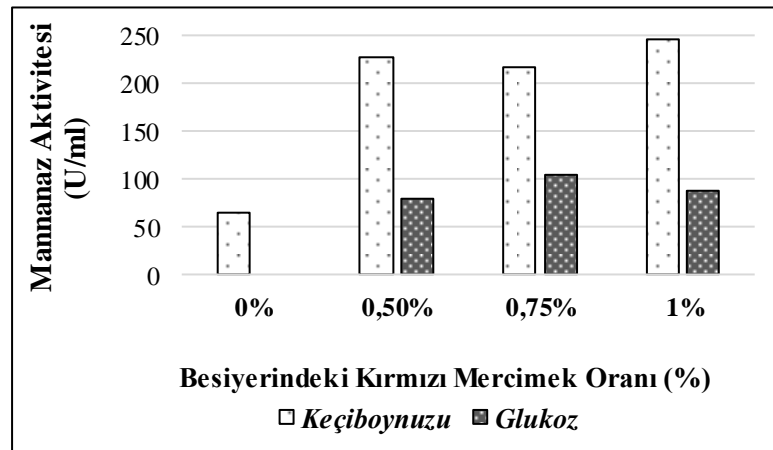
Karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı fermentasyonlarda en yüksek enzim aktivite değeri (104,12 U/ml) ve en yüksek gelişim oranı (2,30 g/L/gün) %0,75'lik fermentasyonda belirlenmiştir. Glukozda yapılan %0,50, %0,75 ve %1'lik fermentasyonlara ait maksimum üretim oranları sırasıyla 20,40 U/ml/gün, 20,16 U/ml/gün ve 16,28 U/ml/gün olarak hesaplanmıştır. Glukoz denemelerinden en yüksek maksimum üretim oranı 10,45 g/L/gün olarak %1'lik denemede tespit edilmiştir.

Fermentasyonda substrat olarak keçiyoynuzu ekstraktının kullanılması ile elde edilen kinetik parametre değerleri ile glukoz kullanılan denemelerden elde edilenler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$). En düşük şeker tüketiminin her iki substratta da %0,50'lik denemelerde gerçekteştiği belirlenmiştir. Her iki substratta da azot kaynağı olarak 3 farklı miktarda KM ilave edilerek gerçekteştirilen fermentasyonlarda en yüksek enzim aktivitesine (247,11 U/ml) keçiyoynuzu ekstraktından hazırlanan ve %1 oranında KM kullanılan çalışmada ulaşılmıştır (Şekil 4.1)

Çizelge 4.3. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin KM içeren denemelerine ait kinetik parametreler

	KM Miktarları (Keçiboynuzu Ekstraktında)			KM Miktarları (Glukoz Substratında)		
	%0,50	%0,75	%1	%0,50	%0,75	%1
Şeker Tüketimi (g/L)	66,94	78,24	75,82	25,25	53,96	77,18
Mannanaz Aktivitesi (U/ml)	228,23	217,91	247,11	78,55	104,12	86,44
Mak. Tüketim Oranı, (-ds/dt) _{max} (g/L/gün)	3,36	4,48	11,26	2,53	5,83	10,45
Mak. Üretim Oranı, (dp/dt) _{max} (U/ml/gün)	73,11	65,97	64,48	20,40	26,99	29,65
Mak. Gelişim Oranı, (dx/dt) _{max} (g/L/gün)	2,76	1,75	4,31	1,12	2,30	0,36
Spesifik Gelişim Oranı (gün ⁻¹)	0,34	0,21	0,47	0,10	0,07	0,06
İkiye Katlanma Süresi (t _d) (gün)	2,05	3,28	1,46	6,93	9,86	11,95

Tüm veriler göz önüne alındığında keçiboynuzu ekstraktında gerçekleştirilen denemelerin maksimum aktiviteler açısından glukoz substratında yapılan çalışmalardan daha yüksek değerlere sahip olduğu gözlemlenebilmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Farklı miktarlarda kırmızı mercimek içeren keçiboynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki denemelere ait maksimum aktiviteler

4.2. Pamuk Tohumu

4.2.1. Keçiboynuzu substratında farklı pamuk tohumu miktarlarının kullanılması

Karbon kaynağı olarak keçiboynuzu ekstraktının kullanıldığı ve %0,5 oranında PT ilave edilen fermentasyon çalışmasında maksimum enzim aktivitesi $202,40 \pm 3,69$ U/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Aynı çalışmanın farklı günlerdeki biyokütle miktarları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($P < 0,05$). %0,5'lik çalışmaya ait besiyerinden farklı günlerde alınan örneklerde yapılan enzim analizi sonuçlarında değişken değerler tespit edilmiştir. Aktivite değerlerinin maksimuma ulaşılmasının ardından düşüşlerin olduğu görülmektedir. Fermentasyon başlangıcında ortam pH'sının 5,24 olmasına rağmen fermentasyon süresince besiyerinde meydana gelen değişimler ile ortam asitliğinin artarak fermentasyon sonunda pH değerinin 4,66'ya düştüğü tespit edilmiş ve enzim aktivite değerlerindeki azalmaya ortam asitliğindeki değişimin neden olduğu belirlenmiştir.

%0,75 oranında PT kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyonda maksimum enzim aktivitesine ($279,82 \pm 14,05$ U/ml) 4.günde ulaşılmıştır. Bu çalışmaya ait farklı günlerde tespit edilen kalıntı şeker miktarları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Fermentasyon sonunda ortamda kalıntı şeker miktarı $6,94 \pm 1,97$ g/L olarak tespit edilmiştir. Maksimum biyokütle miktarına ($15,11 \pm 0,80$ g/ml) ise fermentasyonun 8.gününde ulaşılmıştır.

%1 KM ilavesi yapılan denemede en yüksek enzim aktivite değeri ve en yüksek biyokütle konsantrasyonu sırasıyla $315,75 \pm 28,29$ U/ml ve $22,21 \pm 0,11$ g/L olarak tespit edilmiştir. Fermentasyon sonunda ortamdaki kalıntı şeker miktarı da $5,38 \pm 0,12$ g/L olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin pamuk tohumu içeren keçiyoynuzu substratında gelişimi

Zaman (Gün)	%0,50			%0,75			%1,0		
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)
B	72,55±0,35 ^a	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^e	72,36±0,43 ^a	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^d	73,97±0,26 ^a	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c
0	66,19±0,61 ^b	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^e	68,33±2,24 ^a	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^d	67,48±1,69 ^b	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c
1	67,19±0,06 ^b	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^e	70,42±0,96 ^a	25,89±0,06 ^e	0,00±0,00 ^d	67,22±0,76 ^b	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c
2	48,17±0,63 ^c	113,48±2,47 ^c	9,34±0,59 ^d	50,37±1,39 ^b	254,96±1,74 ^a	10,99±0,13 ^c	50,42±1,78 ^c	169,25±20,87 ^c	16,94±4,16 ^b
3	44,47±1,74 ^c	190,02±23,92 ^a	9,62±0,01 ^d	36,35±1,35 ^c	213,48±4,55 ^b	12,77±2,01 ^{abc}	37,83±1,39 ^d	212,97±9,76 ^{bc}	13,77±1,89 ^b
4	36,00±1,55 ^d	87,30±7,23 ^c	10,42±0,47 ^{cd}	26,26±1,24 ^d	279,82±14,06 ^a	12,91±1,40 ^{abc}	29,27±3,81 ^e	236,42±45,12 ^b	13,95±0,65 ^b
5	26,63±0,72 ^e	202,40±3,69 ^a	11,49±0,43 ^{ba}	24,84±0,04 ^d	103,05±26,06 ^c	13,26±0,50 ^{abc}	21,34±3,35 ^f	315,75±28,30 ^a	15,13±2,18 ^b
6	19,87±2,63 ^f	67,94±18,76 ^{cd}	9,62±0,75 ^d	18,69±1,44 ^e	75,04±3,41 ^c	11,82±0,54 ^{bc}	17,76±1,17 ^{fg}	156,78±10,74 ^c	14,04±0,18 ^b
7	14,44±2,95 ^h	135,17±2,05 ^b	12,38±0,53 ^{ab}	12,29±1,04 ^f	24,93±0,19 ^d	14,99±0,20 ^a	18,75±0,51 ^{fg}	95,87±15,26 ^d	14,49±0,74 ^b
8	9,24±1,87 ^h	9,03±4,81 ^{de}	13,06±4,81 ^a	9,85±1,68 ^{fg}	19,25±4,60 ^d	15,11±0,80 ^a	13,30±1,99 ^{gh}	50,72±2,80 ^d	16,39±0,04 ^b
9	8,07±1,65 ^h	11,18±1,11 ^d	12,05±0,17 ^{ab}	7,89±0,85 ^g	13,51±2,05 ^{ef}	14,25±0,85 ^{ab}	8,75±1,95 ^{hi}	88,37±16,16 ^d	22,21±1,14 ^a
10	8,58±1,29 ^h	4,73±0,92 ^e	12,08±0,45 ^{ab}	6,94±1,97 ^g	14,99±9,88 ^e	13,84±1,15 ^{abc}	5,38±0,12 ⁱ	0,00±0,00 ^e	16,92±0,07 ^b

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$)

4.2.2. Glukoz substratında farklı pamuk tohumu miktarlarının kullanılması

Karbon kaynağı olarak glukoz kullanılan besiyerine %0,50 PT ilave edilerek gerçekleştirilen denemede sadece iki gün aktivite belirlenmiş ve en yüksek enzim aktivitesi $37,38 \pm 1,08$ U/ml olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Bu denemeye ait maksimum biyokütle konsantrasyonuna ($12,31 \pm 0,25$ g/L) ise 10. günde ulaşılmıştır. Fermentasyonun son gününe ait besiyeri örneğinde $29,25 \pm 1,47$ g/L kalıntı şeker tespit edilmiştir.

%0,75'lik denemeye ait verilere bakıldığında ulaşılabilen en yüksek aktivite değerinin $27,86 \pm 1,13$ U/ml olduğu görülmektedir. Maksimum biyokütle konsantrasyonuna ($13,45 \pm 0,34$ g/L) ise çalışmanın son gününde ulaşılmıştır. Çalışma sonunda kalıntı şeker miktarı $4,21 \pm 0,98$ g/L olarak tespit edilmiştir.

%1'lik fermentasyon çalışmasına ait maksimum aktivite değeri $58,26 \pm 2,13$ U/ml olarak fermentasyonun 8.gününde tespit edilmiştir. Maksimum biyokütle konsantrasyonuna ($15,00 \pm 0,05$ g/L) ise fermentasyonun son gününde ulaşılmıştır. Bu denemeye ait besiyerinde şekerin neredeyse tamamının tüketildiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin pamuk tohumu içeren glukoz substratında gelişimi

Zaman (Gün)	%0,50			%0,75			%1,0		
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)
B	90,92±0,28 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^e	90,24±1,44 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^f	85,97±0,00 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^f
0	83,20±0,32 ^b	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^e	85,25±0,08 ^{ab}	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^f	81,48±0,41 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^f
1	91,26±2,17 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^e	84,05±3,31 ^{ab}	27,86±1,13 ^a	0,00±0,00 ^f	80,18±1,30 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^f
2	79,20±1,02 ^b	37,38±1,08 ^a	12,85±1,54 ^a	79,17±0,32 ^b	9,70±4,95 ^a	14,94±0,21 ^a	73,14±2,02 ^b	58,26±2,13 ^a	14,08±1,26 ^{abc}
3	67,85±1,53 ^c	15,96±0,98 ^b	8,12±0,35 ^d	66,38±0,81 ^c	23,28±1,64 ^a	10,27±0,37 ^{de}	55,83±1,53 ^c	0,00±0,00 ^c	10,92±0,68 ^{de}
4	56,32±4,29 ^d	0,00±0,00 ^c	8,74±0,86 ^{cd}	50,65±3,00 ^d	0,00±0,00 ^a	10,68±0,58 ^{de}	37,82±3,90 ^d	0,00±0,00 ^c	10,05±0,33 ^e
5	50,79±0,66 ^d	0,00±0,00 ^c	8,25±0,11 ^d	38,17±0,80 ^e	0,00±0,00 ^a	9,72±0,12 ^e	25,69±3,49 ^e	0,00±0,00 ^c	10,71±0,58 ^{de}
6	38,78±3,18 ^e	0,00±0,00 ^c	9,78±0,15 ^{cd}	28,92±1,45 ^f	0,00±0,00 ^a	10,05±0,18 ^e	12,65±2,88 ^f	0,00±0,00 ^c	11,16±0,72 ^{de}
7	39,92±0,85 ^e	0,00±0,00 ^c	9,55±0,00 ^{cd}	11,73±4,20 ^g	0,00±0,00 ^a	11,57±0,64 ^{cd}	4,87±0,96 ^g	0,00±0,00 ^c	12,76±0,35 ^{bcd}
8	30,60±0,14 ^f	0,00±0,00 ^c	10,37±0,25 ^{bc}	6,90±1,56 ^{gh}	0,00±0,00 ^a	12,68±0,98 ^{bc}	4,79±0,03 ^g	51,31±0,06 ^b	11,96±0,08 ^{cde}
9	31,88±2,02 ^f	0,00±0,00 ^c	11,85±0,96 ^{ab}	6,54±1,20 ^{gh}	0,00±0,00 ^a	12,87±0,34 ^{bc}	2,20±1,26 ^g	0,00±0,00 ^c	14,43±1,33 ^{ab}
10	29,25±1,47 ^f	0,00±0,00 ^c	12,31±0,25 ^a	4,21±0,98 ^h	0,00±0,00 ^a	13,45±0,34 ^b	0,68±0,09 ^g	0,00±0,00 ^c	15,00±0,52 ^a

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P < 0,05$)

4.2.3. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin pamuk tohumu içeren denemelerine ait kinetik parametreler

Keçiboynuzu ekstraktına %0,5 %0,75 ve %1 PT ilave edilerek yapılan çalışmalardaki maksimum aktivite değerleri sırasıyla 202,4 U/ml, 279,8 U/ml ve 315,75 U/ml olarak belirlenmiştir. (Çizelge 4.6). Keçiboynuzunda yapılan denemeler arasındaki en yüksek şeker tüketimi ve maksimum gelişim oranı sırasıyla 62,10 g/L, 1,48 g/L/gün olarak %1 oranında PT ilave edilen besiyerinde tespit edilmiştir. En yüksek maksimum tüketim oranı (7,96 g/L/gün) ise %0,75 oranında PT ile yapılan fermentasyon çalışmasında hesaplanmıştır.

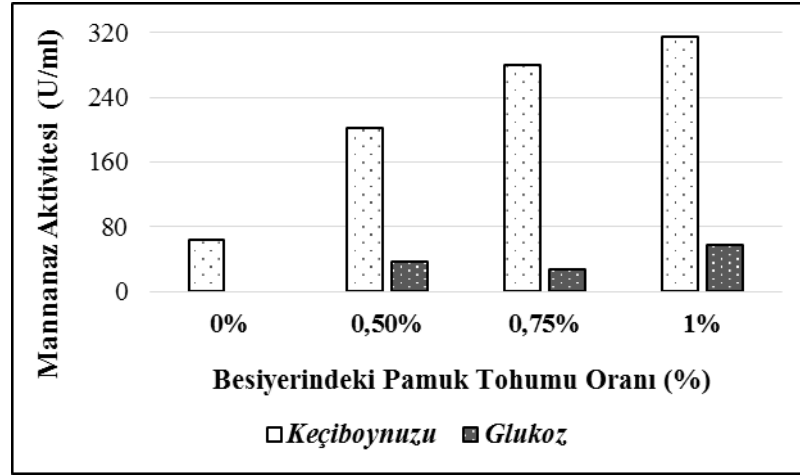
Glukoz substratında yapılan denemelerde belirlenen en yüksek enzim aktivitesine (58,26 U/ml) %1 PT ilave edilen çalışmada ulaşılmıştır. En yüksek maksimum gelişim oranı (0,81 g/L/gün) da %0,75'lik fermentasyonda tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin pamuk tohumu içeren denemelerine ait kinetik parametreler

	Pamuk Tohumu Miktarları (Keçiboynuzu Ekstraktında)			Pamuk Tohumu Miktarları (Glukoz Substratında)		
	%0,50	%0,75	%1.0	%0,50	%0,75	%1.0
Şeker Tüketimi (g/L)	56,95	58,49	62,10	53,95	81,04	80,80
Mannanaz Aktivitesi (U/ml)	202,4	279,82	315,75	37,38	27,86	58,26
Mak. Tüketim Oranı, (-ds/dt) _{max} (g/L/gün)	7,83	7,96	6,86	6,89	10,98	12,53
Mak. Üretim Oranı, (dp/dt) _{max} (U/ml/gün)	95,01	74,31	64,53	9,08	5,82	2,54
Mak. Gelişim Oranı, (dx/dt) _{max} (g/L/gün)	1,28	1,47	1,48	0,61	0,81	0,66
Spesifik Gelişim Oranı (gün ⁻¹)	0,05	0,03	0,03	0,06	0,07	0,05
İkiye Katlanma Süresi (T _d) (gün)	13,56	20,62	20,76	11,44	9,88	12,96

Her iki karbon kaynağında yapılan çalışmalardan elde edilen veriler göz önüne alındığında maksimum enzim aktivitesi (315,75 U/ml) ve maksimum gelişim oranı (1,48 g/L/gün) değerlerine keçiboynuzu substratında %1 pamuk tohumu kullanılan denemede ulaşıldığı görülmektedir. En düşük enzim aktivitesi ise 27,86 U/ml olarak %0,75 oranında pamuk tohumu ile glukoz substratında yapılan fermentasyonda

hesaplanmıştır (Şekil 4.2). Her iki substratta da şeker tüketimi en düşük denemelerin %0,5 oranında PT kullanılan fermentasyonlar olduğu görülmektedir. Keçiyoynuzu substratında gerçekleştirilen denemelere ait kinetik parametreler ile glukozda yapılan denemelere ait kinetik parametreler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$).



Şekil 4.2. Farklı miktarlarda pamuk tohumu içeren keçiyoynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki mannanaz üretim denemeleri

4.3. Mısır Zeini

4.3.1. Keçiyoynuzu substratında farklı mısır zeini miktarlarının kullanılması

Keçiyoynuzu ekstraktı ile besiyeri ortamına %0,5 oranında mısır zeini ilave edilen fermentasyonda maksimum enzim aktivitesi değeri $203,37\pm 10,07$ U/ml olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7). Maksimum aktiviteye ulaşılan çalışmanın 3.günüden sonra aktivite değerlerinde düşüşlerin olduğu görülmektedir. Fermentasyon sonunda kalıntı şeker miktarı $8,27\pm 2,01$ g/L olarak belirlenmiştir. En yüksek biyokütle değeri ($10,46\pm 0,37$ g/L) ise fermentasyonun 5.gününde tespit edilmiştir.

Keçiyoynuzu ekstraktında %0,75 mısır zeini içeren fermentasyonun maksimum enzim aktivitesine ($200,33\pm 41,20$ U/ml) çalışmanın 8.gününde, en yüksek biyokütle konsantrasyonuna ($8,11\pm 0,09$ g/L) ise 10.gününde ulaşılmıştır. %0,75'lik denemenin farklı günlerine ait kalıntı şeker miktarları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$).

Fermentasyon ortamına %1 oranında zein ilave edilerek gerçekleştirilen denemede maksimum enzim aktivitesi $228,17\pm 6,59$ U/ml ve maksimum biyokütle miktarı $15,78\pm 0,06$ g/L olarak hesaplanmıştır. Fermentasyon sonrası kalıntı şeker miktarı ise $8,04\pm 0,47$ g/L olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin mısır zeini içeren keçiyoynuzu substratında gelişimi

Zaman (Gün)	%0,50			%0,75			%1,0		
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)
B	79,37±4,22 ^a	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c	75,84±1,05 ^a	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c	73,77±0,65 ^a	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^f
0	68,74±0,83 ^b	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c	67,71±3,91 ^b	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c	70,02±0,78 ^b	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^f
1	67,58±3,44 ^b	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c	69,31±0,48 ^b	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c	70,13±0,15 ^b	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^f
2	51,36±0,72 ^c	139,87±13,48 ^c	5,29±0,69 ^b	52,93±0,41 ^c	113,88±16,67 ^{cd}	5,43±0,61 ^b	64,27±0,10 ^c	66,91±3,93 ^f	5,98±1,66 ^{de}
3	39,74±2,22 ^d	203,37±10,07 ^a	7,18±0,35 ^{ab}	40,36±1,22 ^d	135,29±0,65 ^{bcd}	7,64±0,92 ^a	48,39±0,15 ^d	102,29±8,90 ^e	9,25±3,79 ^{cd}
4	30,20±0,11 ^e	148,88±28,85 ^c	6,35±0,46 ^b	32,36±0,80 ^e	135,33±4,94 ^{bcd}	6,91±0,68 ^{ab}	36,04±2,00 ^e	134,88±8,76 ^d	6,40±0,26 ^{cde}
5	24,76±0,67 ^{ef}	116,69±17,12 ^{cd}	10,46±3,73 ^a	22,43±2,63 ^f	137,95±10,58 ^{bcd}	8,00±0,77 ^a	24,85±0,76 ^e	183,39±14,26 ^b	10,79±0,41 ^{bc}
6	23,13±0,95 ^f	153,98±0,06 ^{bc}	7,86±0,57 ^{ab}	21,70±3,24 ^f	170,80±4,27 ^{abc}	7,28±0,50 ^a	27,67±0,57 ^f	183,08±2,62 ^b	10,37±0,64 ^{bcd}
7	18,56±2,55 ^f	154,74±0,50 ^{bc}	7,78±0,00 ^{ab}	14,80±0,32 ^{gh}	192,94±12,81 ^{ab}	7,71±0,22 ^a	24,10±0,50 ^e	228,17±6,59 ^a	9,95±0,74 ^{bcd}
8	18,43±0,45 ^f	188,24±19,44 ^{ab}	8,39±0,18 ^{ab}	16,76±2,39 ^g	200,33±41,20 ^a	7,82±0,11 ^a	16,76±0,61 ^b	140,02±2,02 ^{cd}	17,04±1,68 ^a
9	8,27±2,01 ^g	99,99±0,92 ^d	7,97±0,12 ^{ab}	11,33±2,17 ^{gh}	103,66±29,68 ^d	6,93±0,55 ^{ab}	11,26±0,40 ⁱ	156,61±6,15 ^c	14,26±1,37 ^{ab}
10	8,72±0,85 ^g	97,72±5,45 ^d	7,72±0,03 ^{ab}	8,55±0,23 ^h	160,69±20,79 ^{abcd}	8,11±0,09 ^a	8,04±0,47 ^j	149,94±3,19 ^{cd}	15,78±0,64 ^a

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P < 0,05$)

4.3.2. Glukoz substratında farklı mısır zeini miktarlarının kullanılması

Besiyerine glukoz ve farklı oranlarda mısır zeini ilave edilerek yapılan denemelerden %0,50'lik fermentasyonda maksimum enzim aktivitesi $47,28 \pm 3,05$ U/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Çalışmanın sonunda besiyerindeki kalıntı şeker miktarı $42,25 \pm 1,73$ g/L olarak tespit edilmiştir. Diğer glukoz denemelerine nispeten şeker tüketimi oldukça düşük olmuştur.

%0,75 mısır zeini bulunan besiyerinde maksimum enzim aktivitesine ($80,14 \pm 1,40$ U/ml) çalışmanın 7. gününde ulaşılmıştır. Fermentasyon sonrası ortamda $26,30 \pm 2,80$ g/L kalıntı şeker olduğu belirlenmiştir.

Glukoz substratına %1 mısır zeini ilave edilerek gerçekleştirilen fermentasyonun maksimum enzim aktivitesi değeri $67,02 \pm 6,77$ U/ml olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonunda ortamdaki kalıntı şeker miktarı $8,74 \pm 0,00$ g/L olarak tespit edilmiştir. Mısır zeini ile glukoz substratında yapılan denemelerde fermentasyon süresince enzim aktivitesi değerleri değişiklikler göstermiştir.

Glukoz substratında gerçekleştirilen mısır zeini denemelerinde zein taneciklerinin günlük örnek alımında mikroorganizmalardan uzaklaştırılmadığı için biyokütle konsantrasyonunun hesaplanması yapılamamıştır.

Çizelge 4.8. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin mısır zeini içeren glukoz substratında gelişimi

Zaman (Gün)	% 0,50		% 0,75		% 1,0	
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)
B	89,35±1,11 ^a	0,00±0,00 ^b	85,80±0,58 ^a	0,00±0,00 ^g	86,91±1,37 ^a	0,00±0,00 ^a
0	89,97±0,46 ^a	0,00±0,00 ^b	81,29±0,26 ^{ab}	0,00±0,00 ^g	82,12±2,09 ^{abc}	0,00±0,00 ^a
1	88,10±0,74 ^{ab}	0,00±0,00 ^b	81,77±1,83 ^{ab}	64,30±7,71 ^{bc}	82,48±1,44 ^{abc}	0,00±0,00 ^a
2	87,26±0,20 ^{ab}	0,00±0,00 ^b	81,35±0,92 ^{ab}	50,50±15,29 ^{cd}	83,64±2,31 ^{ab}	21,91±1,76 ^g
3	86,14±1,59 ^{ab}	0,00±0,00 ^b	76,56±1,85 ^{bc}	74,12±6,01 ^{ab}	77,37±0,96 ^{bc}	20,16±0,18 ^g
4	75,14±0,39 ^c	0,00±0,00 ^b	76,49±3,71 ^{bc}	29,23±11,98 ^{ef}	75,82±1,66 ^c	32,48±3,24 ^f
5	76,01±0,92 ^c	9,92±0,00 ^b	69,26±3,84 ^c	70,78±2,70 ^{ab}	62,62±0,89 ^d	46,32±0,03 ^d
6	72,97±1,14 ^c	12,98±0,00 ^b	62,75±3,96 ^c	69,75±3,82 ^{bc}	56,32±4,62 ^d	28,36±6,99 ^a
7	58,35±1,06 ^d	47,28±3,05 ^a	54,61±0,90 ^d	80,14±1,40 ^a	43,48±2,60 ^e	116,69±4,02 ^a
8	50,66±1,32 ^e	32,66±4,38 ^a	42,74±5,23 ^e	46,29±4,46 ^{cd}	36,26±1,41 ^f	38,72±2,36 ^e
9	43,12±4,34 ^f	0,00±0,00 ^b	34,74±2,03 ^f	0,00±0,00 ^g	29,14±3,98 ^f	98,93±2,76 ^b
10	42,25±1,73 ^f	0,00±0,00 ^b	26,30±2,80 ^f	24,16±1,88 ^g	8,74±0,00 ^g	67,02±6,77 ^c

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$)

4.3.3. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin mısır zeini içeren denemelerine ait kinetik parametreler

Mısır zeini ile keçiyoynuzu ve glukoz substratında yapılan denemelere ait kinetik parametreler incelendiğinde keçiyoynuzu ekstraktında yapılan denemelerde ulaşılan aktivitelerin en yükseği 228,17 U/ml olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.9). %0,5, %0,75 ve %1 oranlarında zein ilave edilen besiyerlerindeki fermentasyonlarda maksimum üretim oranları sırasıyla 48,07 U/ml/gün, 24,60 U/ml/gün ve 35,64 U/ml/gün olarak belirlenmiştir. Keçiyoynuzu ile yapılan %0,5'lik fermentasyonda en yüksek maksimum gelişim oranı 2,20 g/L/gün olarak tespit edilmiştir.

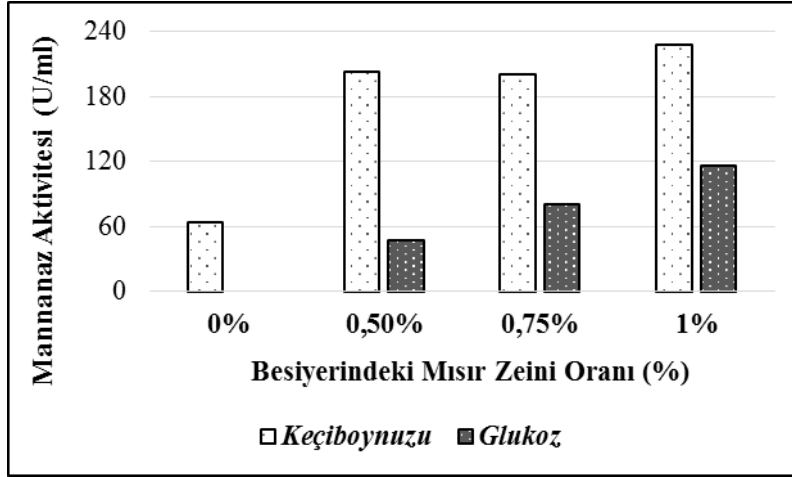
Glukozda gerçekleştirilen denemelerde ise en yüksek aktivite değeri 116,69 U/ml olarak %1 oranında mısır zeini bulunan fermentasyonda belirlenmiştir. Aynı zamanda bu denemede glukoz ile yapılan denemelerdeki en yüksek tüketim oranı 22,53 g/L/gün olarak tespit edilmiştir. Besiyerinde bulunan zein yüzdesine göre sıralandığında maksimum üretim oranları sırasıyla 10,57 U/ml/gün, 3,25 U/ml/gün ve 7,92 U/ml/gün olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.9. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin zein içeren denemelerine ait kinetik parametreler

	Zein Miktarları (Keçiyoynuzu Ekstraktında)			Zein Miktarları (Glukoz Substratında)		
	%0,50	%0,75	%1,0	%0,50	%0,75	%1,0
Şeker Tüketimi (g/L)	60,02	59,15	61,98	40,73	54,99	73,38
Mannanaz Aktivitesi (U/ml)	203,37	200,33	228,17	47,28	80,14	116,69
Mak. Tüketim Oranı, (-ds/dt)max (g/L/gün)	6,71	11,43	11,81	14,47	8,56	22,53
Mak. Üretim Oranı, (dp/dt)max (U/ml/gün)	48,07	24,60	35,64	13,84	20,86	18,89
Mak. Gelişim Oranı, (dx/dt)max (g/L/gün)	2,20	1,75	1,35	-	-	-
Spesifik Gelişim Oranı (gün ⁻¹)	0,19	0,11	0,15	-	-	-
İkiye Katlanma Süresi (t _d) (gün)	3,61	6,53	4,48	-	-	-

Mısır zeini ile keçiyoynuzu substratında yapılan denemeler enzim aktivite değerleri açısından glukozda gerçekleştirilenler ile karşılaştırıldığında aradaki farkın

istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$) (Şekil 4.3). Zein ile yapılan tüm değerler incelendiğinde en yüksek enzim aktivitesine (228,17 U/ml) keçiyoynuzunda yapılan %1'lik fermentasyonda ulaşıldığı görülmektedir. Her iki substratta da en yüksek tüketim oranları %1'lik denemelerde hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. Farklı miktarlarda mısır zeini içeren keçiyoynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki maksimum aktivite değerleri

4.4. Soya Proteini

4.4.1. Keçiyoynuzu substratında farklı soya proteini miktarlarının kullanılması

Bir başka bitkisel azot kaynağı olan SP ile hazırlanan besiyerlerinde gerçekleştirilen fermentasyona ait örneklerin analiz sonuçları incelendiğinde en yüksek enzim aktivitesi $445,02\pm 33,23$ U/ml olarak keçiyoynuzu ekstraktının % 0,5 oranında SP ile zenginleştirildiği denemede belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Maksimum biyokütle miktarı $17,77\pm 0,35$ g/L olarak çalışmanın 8. gününde tespit edilmiştir. Kalıntı şeker miktarı ise fermentasyon sonunda $1,83\pm 0,08$ g/L olarak hesaplanmıştır.

%0,75'lik fermentasyon denemesinde maksimum enzim aktivitesi $525,93\pm 29,96$ U/ml olarak tespit edilmiştir. Fermentasyon sonrası kalıntı şeker miktarı $1,64\pm 1,08$ g/L olarak hesaplanmıştır. En yüksek biyokütle konsantrasyonuna ($18,88\pm 1,08$ g/L) ise fermentasyonun son günü ulaşılmıştır.

%1 oranında SP ilave edilen fermentasyon denemesinde en yüksek enzim aktivitesi $434,25\pm 8,48$ U/ml olarak hesaplanmıştır. Çalışmanın son günü biyokütle konsantrasyonu en yüksek değerine ($22,58\pm 0,45$ g/L) ulaşmıştır. Fermentasyon süresi sonunda ortamdaki kalıntı şeker miktarı $1,56\pm 0,23$ g/L olarak belirlenmiştir.

SP ile keçiyoynuzu ekstraktında yapılan üç denemenin analiz sonuçları incelendiğinde en yüksek enzim aktivite değerine ($525,93\pm 29,96$ U/ml) % 0,75 oranında mısır zeini ile yapılan fermentasyonda ulaşıldığı görülmektedir. Farklı günlerde

besiyerinden alınan örneklere ait kalıntı şeker miktarları arasındaki farkın her üç denemede de istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$).

Çizelge 4.10. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin soya proteini içeren keçiyoynuzu substratında gelişimi

Zaman (Gün)	%0,50			%0,75			%1,0		
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)
B	57,56±0,00 ^a	0,00±0,00 ^h	0,00±0,00 ^h	86,19±0,91 ^a	0,00±0,00 ^g	0,00±0,00 ^f	83,23±4,20 ^a	0,00±0,00 ^g	0,00±0,00 ^f
0	58,10±2,39 ^a	0,00±0,00 ^h	0,00±0,00 ^h	82,27±1,94 ^a	0,00±0,00 ^g	0,00±0,00 ^f	82,33±4,11 ^a	0,00±0,00 ^g	0,00±0,00 ^f
1	56,83±2,74 ^a	0,00±0,00 ^h	3,68±0,21 ^g	90,46±1,44 ^a	0,00±0,00 ^g	3,68±0,21 ^e	80,68±1,57 ^a	0,00±0,00 ^g	3,68±0,21 ^e
2	54,89±0,04 ^a	135,45±8,63 ^g	11,77±0,66 ^f	59,55±4,85 ^b	173,45±32,56 ^f	11,71±0,10 ^d	57,19±0,82 ^b	157,47±25,04 ^f	14,69±0,40 ^d
3	34,08±1,48 ^b	250,18±13,03 ^{ef}	13,52±1,17 ^{de}	41,47±0,04 ^c	265,52±18,05 ^e	13,10±0,94 ^d	36,00±0,41 ^c	211,90±12,74 ^{de}	15,53±0,46 ^{cd}
4	20,10±0,36 ^c	254,96±18,43 ^e	14,76±0,32 ^{cd}	20,68±1,57 ^d	316,86±20,91 ^{de}	16,71±0,56 ^{bc}	20,70±1,59 ^d	318,82±11,78 ^c	18,97±2,78 ^b
5	16,61±0,22 ^c	311,50±20,51 ^d	12,44±0,23 ^{ef}	14,39±6,93 ^d	416,01±34,09 ^{bc}	16,73±0,91 ^{bc}	10,29±0,58 ^e	364,62±8,92 ^b	18,35±0,62 ^{bc}
6	12,28±0,92 ^d	311,91±12,83 ^d	12,35±0,35 ^{ef}	14,32±0,00 ^d	338,41±3,49 ^{de}	15,79±0,54 ^c	5,92±1,19 ^{ef}	434,25±8,48 ^a	19,02±0,70 ^b
7	3,89±0,71 ^e	234,12±29,89 ^{ef}	15,83±0,86 ^{bc}	5,45±0,52 ^e	333,15±2,23 ^{de}	17,65±0,38 ^{abc}	3,54±0,55 ^f	182,20±9,51 ^{ef}	18,11±0,15 ^{bc}
8	2,63±0,18 ^e	435,91±29,04 ^{ab}	17,77±0,35 ^a	3,57±1,01 ^e	423,65±22,76 ^{cd}	17,59±0,54 ^{abc}	2,14±0,11 ^f	228,70±17,61 ^d	20,36±0,68 ^{ab}
9	2,58±0,43 ^e	445,02±33,23 ^a	16,52±0,35 ^{ab}	2,22±0,14 ^e	474,81±9,83 ^{ab}	19,65±2,20 ^a	2,28±0,25 ^f	216,98±12,05 ^{de}	19,98±1,22 ^{ab}
10	1,83±0,08 ^e	402,81±0,02 ^c	17,17±0,05 ^{ab}	1,64±1,08 ^e	525,93±29,96 ^a	18,88±1,08 ^{ab}	1,56±0,23 ^f	207,65±1,03 ^{de}	22,58±0,45 ^a

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$)

4.4.2. Glukoz substratında farklı soya proteini miktarlarının kullanılması

Karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı SP denemelerinden besiyerine %0,5 oranında SP ilave edilen fermentasyonda maksimum enzim aktivitesi ve maksimum biyokütle konsantrasyonu sırasıyla $56,11 \pm 2,61$ U/ml ve $11,16 \pm 1,06$ g/L olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Fermentasyon tamamlandığında ortamdaki şekerin tamamının kullanıldığı tespit edilmiştir.

%0,75'lik denemede en yüksek enzim aktivitesi $59,23 \pm 9,17$ U/ml olarak hesaplanmıştır. En yüksek biyokütle konsantrasyonuna ise ($11,08 \pm 1,47$ g/L) fermentasyonun son günü ulaşılmıştır.

%1 oranında SP ilave edilen denemede maksimum enzim aktivitesine ($245,76 \pm 19,34$ U/ml) 7.günde ulaşılmıştır. Maksimum biyokütle konsantrasyonu $11,13 \pm 0,31$ g/L olarak belirlenmiştir.

Glukoz substratında SP kullanılarak gerçekleştirilen her üç denemede de ortamdaki şekerin tamamına yakınınının kullanıldığı ve günler arası kalıntı şeker farkının istatistiksel olarak önemli olduğu hesaplanmıştır ($P < 0,05$).

Çizelge 4.11. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin soya proteini içeren glukoz substratında gelişimi

Zaman (Gün)	%0,50			%0,75			%1,0		
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)
B	92,22±0,50 ^a	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^e	92,59±4,79 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	90,74±1,42 ^a	0,00±0,00 ^h	0,00±0,00 ^d
0	89,68±1,11 ^a	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^e	86,25±1,59 ^{ab}	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	84,66±2,67 ^b	0,00±0,00 ^h	0,00±0,00 ^d
1	90,46±0,59 ^a	0,00±0,00 ^d	5,05±1,50 ^d	84,64±1,72 ^{ab}	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	78,74±1,07 ^c	42,76±7,78 ^g	0,00±0,00 ^d
2	85,10±3,55 ^c	0,00±0,00 ^d	4,32±0,11 ^d	78,30±6,92 ^b	0,00±0,00 ^c	1,50±0,20 ^c	73,99±4,12 ^c	37,12±5,43 ^g	1,80±0,21 ^d
3	80,94±1,54 ^c	0,00±0,00 ^d	6,29±1,03 ^{cd}	64,30±2,72 ^c	27,1±3,05 ^{bc}	8,92±1,65 ^{ab}	60,13±0,32 ^d	51,21±1,91 ^f	7,02±1,80 ^c
4	61,09±2,09 ^c	24,64±0,08 ^b	6,39±0,97 ^{cd}	58,68±0,39 ^c	27,84±0,12 ^{bc}	7,86±0,21 ^{ab}	46,48±0,65 ^e	76,01±16,77 ^d	7,48±0,58 ^{bc}
5	49,00±0,24 ^d	2,61±0,30 ^d	7,66±0,26 ^{bc}	37,31±3,57 ^d	59,23±9,17 ^a	6,97±0,25 ^{ab}	32,75±0,37 ^f	93,48±16,30 ^{ab}	7,18±0,02 ^c
6	22,77±1,48 ^e	22,16±1,08 ^b	8,35±0,15 ^{bc}	22,28±0,03 ^e	39,17±1,58 ^{ab}	7,74±0,59 ^{ab}	12,81±0,02 ^g	61,88±2,65 ^e	9,67±0,15 ^{ab}
7	10,18±1,20 ^f	20,54±6,69 ^b	7,92±0,09 ^{bc}	15,54±10,59 ^{ef}	0,00±0,00 ^c	7,61±1,98 ^{ab}	6,29±3,85 ^h	245,76±19,34 ^a	8,28±0,69 ^{bc}
8	3,69±0,41 ^g	13,83±1,09 ^d	8,46±0,59 ^{bc}	6,66±2,78 ^g	0,00±0,00 ^c	8,51±0,29 ^{ab}	0,84±0,64 ^h	144,53±9,63 ^c	10,82±1,34 ^a
9	0,58±0,58 ^g	11,44±0,15 ^c	9,52±0,34 ^{ab}	2,82±2,57 ^g	0,00±0,00 ^c	8,39±1,80 ^{ab}	0,27±0,28 ^h	194,48±8,3 ^b	10,87±0,86 ^a
10	0,00±0,00 ^g	56,11±2,61 ^a	11,16±1,06 ^a	0,28±0,27 ^g	0,00±0,00 ^c	11,08±1,47 ^a	0,09±0,09 ^h	149,31±5,06 ^c	11,13±0,31 ^a

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$)

4.4.3. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin soya proteini içeren denemelerine ait kinetik parametreler

SP ile keçiyoynuzu ekstraktında yapılan denemelerde en yüksek enzim aktivite değeri 525,93 U/ml olarak %0,75 oranında SP ilave edilen fermentasyonda tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). %0,50, %0,75 ve %1 oranlarında SP ile gerçekleştirilen denemelerde maksimum tüketim oranları sırasıyla 9,90 g/L/gün 19,10 g/L/gün 14,52 g/L/gün olarak belirlenmiştir. Maksimum gelişim oranı ise %0,75 oranında SP ile zenginleştirilen denemede 3,82 g/L/gün olarak hesaplanmıştır.

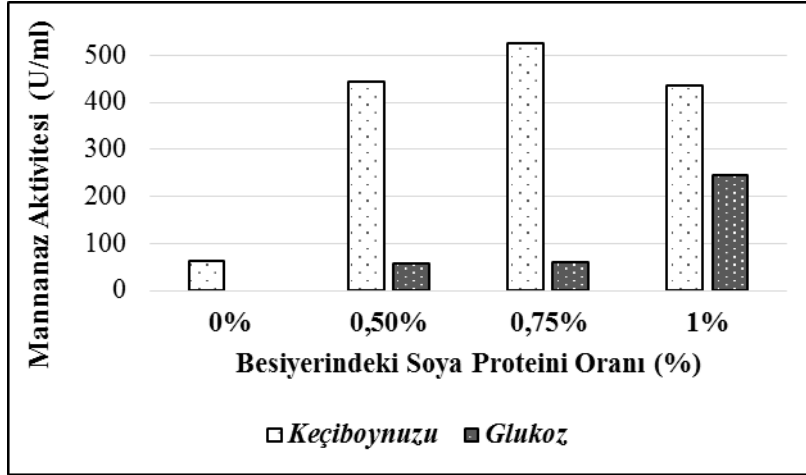
Glukoz substratında SP ile yapılan fermentasyonlarda en yüksek enzim aktivitesine (245,76 U/ml) %1'lik fermentasyonda ulaşılmıştır. Maksimum üretim oranları %0,5, %0,75 ve %1'lik denemelerde sırasıyla 3,43 U/ml/gün 17,81 U/ml/gün ve 19,56 U/ml/gün olarak hesaplanmıştır. Glukoz ile yapılan denemelerden en yüksek maksimum gelişim oranına (1,14 g/L/gün) %1'lik fermentasyonda ulaşılmıştır.

Keçiyoynuzu ekstraktı ve %0,75 oranında SP ilave edilen çalışmada belirlenen maksimum tüketim oranı (19,10 g/L/gün), maksimum gelişim oranı (3,82 g/L/gün) ve spesifik gelişim oranı (0,52 gün⁻¹) SP ile yapılan diğer tüm denemelerden elde edilen değerler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$)

Çizelge 4.12. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin soya proteini içeren denemelerine ait kinetik parametreler

	Soya Proteini Miktarları (Keçiyoynuzu Ekstraktında)			Soya Proteini Miktarları (Glukoz Substratında)		
	%0,50	%0,75	%1.0	%0,50	%0,75	%1.0
Şeker Tüketimi (g/L)	56,27	80,63	82,33	89,68	85,96	84,57
Mannanaz Aktivitesi (U/ml)	402,81	525,93	445,02	56,11	59,23	245,76
Mak. Tüketim Oranı, (-ds/dt) _{max} (g/L/gün)	9,60	19,10	14,52	14,19	10,43	11,71
Mak. Üretim Oranı, (dp/dt) _{max} (U/ml/gün)	74,25	97,54	82,85	14,19	17,81	19,56
Mak. Gelişim Oranı, (dx/dt) _{max} (g/L/gün)	1,64	3,82	1,72	0,69	0,67	1,14
Spesifik Gelişim Oranı (gün ⁻¹)	0,21	0,52	0,18	0,09	0,08	0,08
İkiye Katlanma Süresi (t _d) (gün)	3,30	1,32	3,91	7,38	9,07	8,78

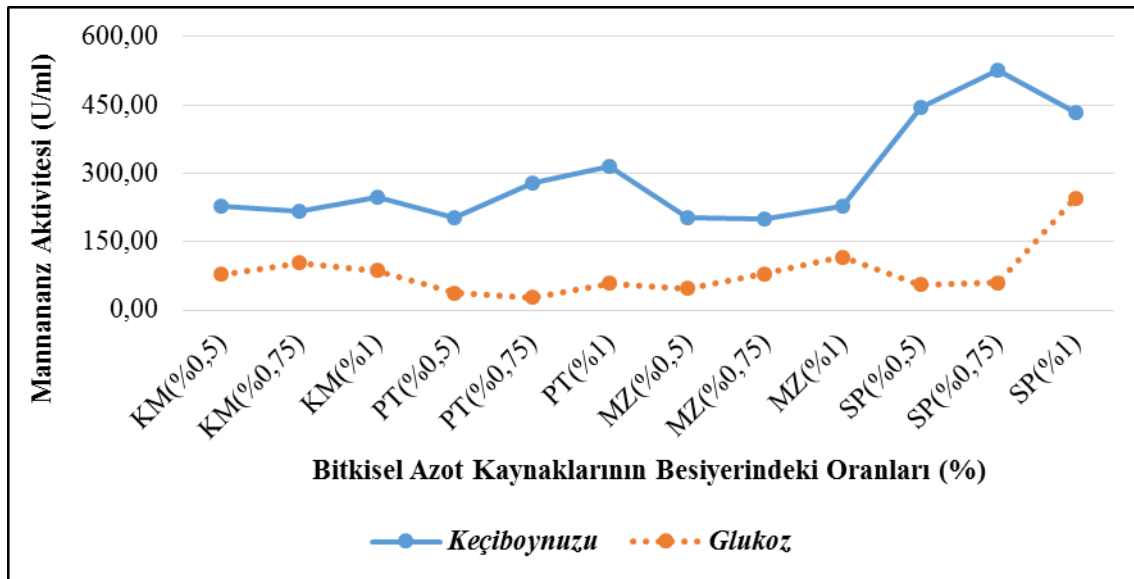
Soya Proteinini ile yapılan tüm denemelere ait aktivite değerleri incelendiğinde en yüksek mannanaz aktivite değerine (525,93 U/ml) besiyerinde keçiboynuzu ekstraktı ile %0,75 oranında soya proteini bulunan fermentasyonda ulaşıldığı görülmektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Farklı miktarlarda zein içeren keçiboynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki maksimum aktivite değerleri

4.5.Bitkisel Azot Kaynaklarının Genel Değerlendirilmesi

Bitkisel materyaller ile her iki subtratta da en yüksek enzim aktivite değerlerine soya proteinin kullanıldığı fermentasyonlarda ulaşılmıştır. Keçiboynuzu substratında en yüksek aktivite değeri (525,93U/ml) soya proteinin %1 oranında, glukoz substratındaki en yüksek aktivite değerine (245,76U/ml) ise besiyerinin soya proteini ile %0,75 oranında zenginleştirildiği denemelerde tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Farklı miktarlarda bitkisel kaynakların bulunduğu keçiboynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki maksimum enzim aktiviteleri

Keçiboynuzu substratına üç farklı oranda bitkisel azot kaynağı ilavede dilerek hazırlanan besiyerlerinde gerçekleştirilen fermentasyonlarda ulaşılan maksimum enzim aktivite değerleri en yüksekten en düşüğe doğru; SP_(%0,75): 525,93U/ml, SP_(%1): 445,02U/ml, SP_(%0,5): 402,81 U/ml, PT_(%1):315,75 U/ml, PT_(%0,75): 279,82U/ml, KM_(%1): 247,11U/ml, KM_(%0,5): 228,23 U/ml, MZ_(%1): 228,17 U/ml, KM_(%0,75): 217,91U/ml, MZ_(%0,5): 203,37U/ml, PT_(%0,5): 202,4 U/ml ve MZ_(%0,75): 200,33 U/ml şeklindedir. Glukoz substratında yapılan denemeler için aynı sıralama yüksekten düşüğe doğru; SP_(%1): 245,76 U/ml, MZ_(%1): 116,69 U/ml, KM_(%0,75): 104,02 U/ml, KM_(%1): 86,44 U/ml, MZ_(%0,75): 80,14 U/ml, KM_(%0,5): 78,55 U/ml, SP_(%0,75): 59,23 U/ml, PT_(%1): 58,26 U/ml, SP_(%0,5): 56,11 U/ml, MZ_(%0,5): 47,28 U/ml, PT_(%0,5): 37,38 U/ml ve PT_(%0,75): 27,86 U/ml şeklindedir.

Keçiboynuzu ekstraktının kullanıldığı denemelere ait enzim aktivite değerleri ile glukoz kullanılarak ulaşılan aktiviteler karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$).

4.6. Et-Kemik Unu

4.6.1. Keçiboynuzu substratında farklı et-kemik unu miktarlarının kullanılması

EKU'nun üç farklı miktarı ile keçiboynuzu substratında gerçekleştirilen denemelerden besiyerine %0,50 oranında EKU ilave edilen çalışmanın maksimum enzim aktivitesi $530,77\pm 15,8$ U/ml olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.13). Maksimum biyokütle miktarı fermentasyonun 10.gününde $12,08\pm 0,22$ g/L olarak belirlenmiştir. Çalışma sonundaki kalıntı şeker miktarı ise $5,55\pm 1,84$ g/L olarak tespit edilmiştir.

%0,75 oranında EKU bulunan besiyerindeki fermentasyonda maksimum aktivite değerine ($597,31\pm 10,18$ U/ml) ve maksimum biyokütle konsantrasyonuna ($12,30\pm 0,12$ U/ml) 10.günde ulaşıldığı görülmektedir. Fermentasyon süresi sonundaki kalıntı şeker miktarı da $4,31\pm 0,21$ g/L olarak belirlenmiştir.

%1 oranında EKU ilavesi ve keçiboynuzu ekstraktı kullanılarak hazırlanmış besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonda maksimum enzim aktivite değerine ($315,79\pm 1,67$ U/ml) 8. Günde ulaşılmıştır. En yüksek biyokütle değeri ise $17,11\pm 2,30$ g/L olarak tespit edilmiştir. Fermentasyon sonunda besiyerinde kalan şeker miktarı $10,06\pm 0,18$ g/L olarak hesaplanmıştır.

Her üç denemede de kalıntı şeker miktarları bazında günler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$).

Çizelge 4.13. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin farklı miktarlarda et-kemik unu içeren keçiyoynuzu substratında gelişimi

Zaman (Gün)	%0,50			%0,75			%1,0		
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)
B	82,01±0,98 ^a	0,00±0,00 ^g	0,00±0,00 ^b	83,05±0,98 ^a	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^d	78,65±0,43 ^a	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^d
0	74,43±2,76 ^a	0,00±0,00 ^g	0,00±0,00 ^b	76,74±0,52 ^a	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^d	70,66±0,02 ^b	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^d
1	74,69±0,69 ^a	72,75±3,32 ^g	0,00±0,00 ^b	75,40±0,10 ^a	49,95±12,35 ^e	0,00±0,00 ^d	69,42±1,19 ^b	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^d
2	48,28±6,18 ^b	186,93±4,57 ^{ef}	9,70±0,70 ^a	46,22±6,90 ^b	185,33±4,80 ^e	5,63±0,92 ^c	53,93±0,71 ^c	93,20±4,19 ^e	11,16±0,06 ^{bc}
3	45,12±7,75 ^b	196,00±7,05 ^f	10,24±0,04 ^a	43,34±5,16 ^b	266,24±12,57 ^e	10,01±1,24 ^{bc}	37,91±0,39 ^d	143,57±23,38 ^d	15,51±0,94 ^{ab}
4	31,73±0,28 ^c	263,26±8,86 ^{de}	10,03±0,63 ^a	30,10±1,39 ^c	252,71±21,82 ^{de}	11,79±1,39 ^{ab}	28,33±1,79 ^e	141,69±12,90 ^d	12,86±1,92 ^{abc}
5	30,18±0,13 ^c	273,96±3,61 ^{cde}	10,42±2,10 ^a	23,25±0,00 ^{cd}	331,87±3,13 ^{cd}	11,04±1,54 ^{ab}	27,81±6,23 ^e	185,08±20,10 ^c	10,96±0,84 ^{bc}
6	22,90±0,70 ^{cd}	298,95±0,58 ^{cbd}	11,84±0,51 ^a	19,17±0,97 ^d	421,89±10,85 ^{bc}	14,89±3,44 ^a	18,59±1,48 ^f	196,08±0,71 ^c	17,11±2,30 ^a
7	18,42±1,36 ^{de}	324,27±12,40 ^{cbd}	8,96±0,09 ^a	18,26±2,57 ^d	502,45±7,01 ^b	8,42±0,23 ^{bc}	17,45±0,39 ^f	299,53±11,40 ^{ab}	14,42±3,09 ^{abc}
8	11,09±0,45 ^{ef}	366,68±20,61 ^{abc}	9,69±1,10 ^a	8,43±1,33 ^e	548,49±20,15 ^{ab}	9,53±1,21 ^{bc}	12,95±2,37 ^f	315,79±1,67 ^a	13,53±0,92 ^{abc}
9	8,62±1,12 ^{ef}	379,41±8,07 ^{ab}	11,27±2,01 ^a	5,31±0,86 ^e	560,68±16,04 ^b	11,06±1,20 ^{ab}	5,41±0,70 ^g	290,27±18,42 ^{ab}	12,07±1,64 ^{bc}
10	5,55±1,84 ^f	530,77±15,8 ^a	12,08±2,22 ^a	4,31±0,21 ^e	597,31±10,18 ^a	12,30±0,00 ^{ab}	4,54±1,70 ^g	261,99±16,20 ^b	10,06±0,18 ^c

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$)

4.6.2. Glukoz substratında farklı et-kemik unu miktarlarının kullanılması

%0,50 oranında EKV ilave edilerek glukoz substratında gerçekleştirilen fermentasyonda maksimum enzim aktivite değerine ($52,81 \pm 3,46$ U/ml) ve maksimum biyokütle konsantrasyonuna ($7,66 \pm 0,05$ g/L) fermentasyonun 10. gününde ulaşıldığı görülmektedir (Çizelge 4.14). Başlangıç şeker miktarı $88,89 \pm 1,20$ g/L olan çalışma tamamlandığında kalıntı şeker miktarının $63,62 \pm 1,42$ g/L olarak tespit edildiğinden dolayı şeker tüketiminin oldukça düşük olduğu görülmektedir.

Besiyerine %0,75 EKV ilavesi yapılan denemenin maksimum aktivite değeri $84,14 \pm 5,39$ U/ml olarak 8. günde tespit edilmiştir. Fermentasyon sonunda kalıntı şeker miktarı $55,33 \pm 1,23$ g/L olarak ölçülmüştür.

%1 EKV ile yapılan fermentasyonda ise maksimum aktivite değeri $303,67 \pm 2,78$ U/ml olarak tespit edilmiştir. Ulaşılan maksimum biyokütle konsantrasyonu $18,24 \pm 1,31$ g/L olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.14. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin farklı miktarlarda et-kemik unu içeren glukoz substratında gelişimi

Zaman (Gün)	%0,50			%0,75			%1,0		
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)
B	88,89±1,20 ^a	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	90,07±0,83 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	94,36±4,94 ^a	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^d
0	81,72±3,02 ^b	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	84,10±0,08 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	86,26±5,16 ^{ab}	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^d
1	82,66±0,48 ^b	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	84,99±2,55 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	80,42±0,35 ^{bc}	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^d
2	74,64±0,48 ^c	18,30±0,07 ^{bcd}	0,00±0,00 ^d	72,38±1,15 ^b	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	73,42±0,15 ^{cd}	30,37±1,60 ^e	0,00±0,00 ^d
3	73,58±0,72 ^{cd}	39,4±5,03 ^{bcd}	7,04±1,55 ^b	73,64±1,85 ^b	0,00±0,00 ^c	9,89±3,01 ^{ab}	70,68±0,04 ^{cde}	41,00±2,91 ^e	14,27±1,65 ^{ab}
4	69,61±1,37 ^{cd}	37,73±2,53 ^{bcd}	4,74±1,20 ^c	73,64±0,07 ^b	5,28±0,04 ^c	8,43±0,81 ^c	70,59±0,17 ^{cde}	62,46±1,03 ^e	13,44±0,90 ^b
5	70,68±0,22 ^{cd}	0,00±0,00 ^d	7,06±0,22 ^b	73,01±2,55 ^b	14,03±0,08 ^c	12,46±0,81 ^a	67,04±3,53 ^{def}	45,04±2,36 ^e	12,36±1,63 ^{bc}
6	73,40±0,20 ^{cd}	0,00±0,00 ^d	6,99±0,31 ^b	66,89±4,68 ^{bc}	78,4±8,40 ^{abc}	8,46±1,67 ^b	60,87±0,69 ^{ef}	48,81±5,61 ^e	8,68±0,64 ^c
7	70,29±0,98 ^{cd}	32,81±15,79 ^{abc}	7,63±0,00 ^b	69,15±3,31 ^b	59,9±0,59 ^{bc}	9,57±0,01 ^{ab}	58,02±4,90 ^{fg}	97,73±9,76 ^d	10,80±0,47 ^{bc}
8	69,95±2,85 ^{cd}	44,27±0,24 ^{ab}	9,54±0,27 ^a	61,38±1,38 ^{bc}	84,14±5,39 ^a	10,31±0,82 ^{ab}	47,40±6,98 ^g	238,84±26,16 ^b	14,28±0,90 ^{ab}
9	70,65±0,20 ^{cd}	50,69±6,58 ^a	5,97±0,10 ^{bc}	56,78±0,16 ^d	76,32±18,33 ^{ab}	9,99±0,80 ^{ab}	32,57±4,64 ^h	193,39±7,58 ^c	18,24±1,31 ^a
10	63,62±1,43 ^e	52,81±3,46 ^a	7,66±0,05 ^b	55,33±1,23 ^d	82,68±2,29 ^a	10,35±0,62 ^{ab}	8,94±0,39 ⁱ	303,67±2,79 ^a	14,95±3,40 ^{ab}

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$)

4.6.3. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin et-kemik unu içeren denemelerine ait kinetik parametreler

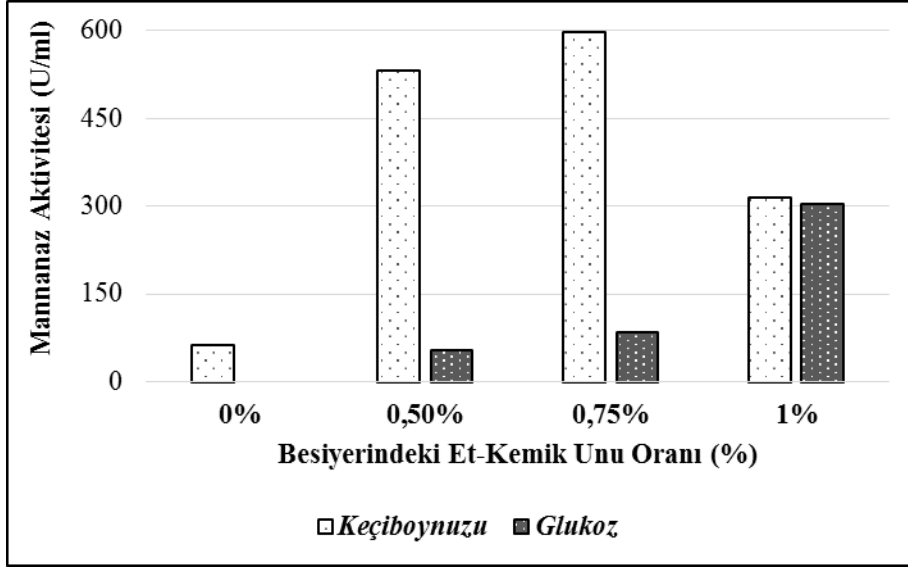
EKU ile keçiyoynuzu substratında gerçekleştirilen fermentasyonlardan en yüksek enzim aktivitesi (597,31 U/ml) %0,75 oranında EKU ile zenginleştirilen besiyerindeki denemede tespit edilmiştir (Çizelge 4.15). Keçiyoynuzu substratında yapılan %0,50, %0,75 ve %1'lik fermentasyonlara ait maksimum gelişim oranları sırasıyla 2,12 g/L/gün, 2,64 g/L/gün ve 2,35 g/L/gün olarak belirlenmiştir.

Glukoz substratına %0,50, %0,75 ve %1 oranlarında EKU ilavesi ile yapılan çalışmalarda ulaşılan maksimum enzim aktivite değerleri sırasıyla 52,81 U/ml, 84,14 U/ml ve 303,67 U/ml olarak belirlenmiştir. Maksimum tüketim oranları ise yine sırasıyla 3,33 g/L/gün, 3,61 g/L/gün ve 16,21 g/L/gün olarak hesaplanmıştır.

EKU ile yapılan tüm denemeler göz önüne alındığında en yüksek aktiviteye (597,31 U/ml) keçiyoynuzu ekstraktına %0,75 EKU ilave edilen besiyerinde ulaşılmıştır (Şekil 4.6).

Çizelge 4.15. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin et-kemik unu içeren denemelerine ait kinetik parametreler

	Et-Kemik Unu Miktarları (Keçiyoynuzu Ekstraktında)			Et-Kemik Unu Miktarları (Glukoz Substratında)		
	%0,50	%0,75	%1.0	%0,50	%0,75	%1.0
Şeker Tüketimi (g/L)	68,88	72,43	62,25	18,09	28,77	77,32
Mannanaz Aktivitesi (U/ml)	436,92	597,31	315,79	52,81	84,14	303,67
Mak. Tüketim Oranı, (-ds/dt) _{max} (g/L/gün)	7,89	10,38	9,77	3,33	3,61	16,21
Mak. Üretim Oranı, (dp/dt) _{max} (U/ml/gün)	38,42	76,24	40,99	16,35	18,56	56,60
Mak. Gelişim Oranı, (dx/dt) _{max} (g/L/gün)	2,12	2,64	2,35	1,02	0,93	3,21
Spesifik Gelişim Oranı (gün ⁻¹)	1,00	0,20	0,05	0,08	0,1	3,98
İkiye Katlanma Süresi (t _d) (gün)	0,69	3,39	13,67	8,26	7,00	0,17



Şekil 4.6. Farklı miktarlarda et-kemik unu içeren keçiboynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki denemelere ait maksimum aktiviteler

4.7. Tüy Unu

4.7.1. Keçiboynuzu substratında farklı tüy unu miktarlarının kullanılması

Hayvansal materyallerden bir diğeri olan TU ile keçiboynuzu substratında gerçekleştirilen fermentasyonlardan %0,50'lik denemede maksimum enzim aktivitesi $231,02 \pm 1,80$ U/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.16). Maksimum biyokütle konsantrasyonu ve çalışma sonunda ortamda kalan şeker miktarı ise sırasıyla $14,29 \pm 3,07$ g/L, $5,54 \pm 2,09$ g/L olarak hesaplanmıştır.

%0,75 TU ilave edilen keçiboynuzu ekstraktında yapılan fermentasyonda maksimum enzim aktivite değeri $200,70 \pm 0,39$ U/ml olarak tespit edilmiştir. En yüksek biyokütle konsantrasyonu da $15,46 \pm 0,54$ g/L olarak belirlenmiştir.

%1'lik fermentasyonda maksimum enzim aktivitesi değeri $355,77 \pm 5,37$ U/ml olarak belirlenmiştir. En yüksek biyokütle konsantrasyonu $16,39 \pm 3,39$ g/L olarak hesaplanırken fermentasyon sonunda ortamda kalan şeker miktarı ise $4,57 \pm 1,88$ g/L olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.16. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin farklı miktarlarda tüyünü içeren keçiyoynuzu substratında gelişimi

Zaman (Gün)	%0,50			%0,75			%1,0		
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)
B	76,49±0,63 ^a	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c	78,72±6,57 ^a	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^c	71,55±1,05 ^a	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^b
0	71,31±2,99 ^{ab}	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c	65,25±0,34 ^b	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^c	67,80±0,70 ^b	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^b
1	66,76±0,74 ^b	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^c	66,37±0,24 ^b	0,00±0,00 ^f	0,00±0,00 ^c	66,56±0,09 ^b	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^b
2	53,93±0,37 ^c	98,88±7,43 ^b	7,69±0,13 ^b	51,34±1,41 ^c	110,42±4,93 ^{cd}	10,23±1,88 ^b	50,16±1,00 ^c	151,86±0,42 ^c	12,60±1,31 ^a
3	37,54±0,17 ^d	109,77±6,29 ^b	9,07±0,14 ^{ab}	36,41±1,33 ^d	147,89±12,17 ^c	13,41±3,62 ^{ab}	32,45±0,56 ^d	193,90±16,23 ^c	12,91±0,00 ^a
4	26,37±2,68 ^e	231,02±1,80 ^a	11,05±3,29 ^{ab}	26,13±0,85 ^e	200,70±0,39 ^b	11,84±2,57 ^{ab}	24,65±1,89 ^e	163,26±46,84 ^c	12,02±2,25 ^a
5	24,48±0,91 ^{ef}	70,75±17,48 ^c	9,96±1,45 ^{ab}	19,35±0,32 ^e	143,55±30,65 ^c	11,61±0,75 ^{ab}	21,18±0,78 ^f	280,09±37,58 ^b	13,93±2,57 ^a
6	19,85±0,46 ^{fg}	31,49±0,62 ^d	9,51±0,02 ^{ab}	20,76±1,21 ^e	130,53±1,43 ^c	12,61±0,41 ^{ab}	14,49±0,02 ^g	302,48±16,00 ^{ab}	14,60±0,66 ^a
7	14,52±0,48 ^{gh}	215,27±4,12 ^a	12,54±2,76 ^{ab}	22,83±2,48 ^e	80,00±7,23 ^{de}	11,49±0,49 ^{ab}	12,30±0,88 ^g	326,06±0,79 ^{ab}	11,32±1,33 ^a
8	12,16±4,22 ^{hi}	96,22±2,74 ^b	14,29±3,07 ^a	6,43±3,00 ^f	319,50±2,86 ^a	12,55±0,34 ^{ab}	12,35±0,01 ^g	186,26±36,23 ^c	12,35±1,18 ^a
9	6,84±1,79 ^{ij}	55,13±18,74 ^{cd}	12,66±1,59 ^{ab}	6,17±0,81 ^f	51,00±2,64 ^e	13,64±0,42 ^{ab}	6,05±0,49 ^h	355,77±5,37 ^a	13,55±1,98 ^a
10	5,54±2,09 ^j	56,65±5,83 ^{cd}	12,09±0,05 ^{ab}	3,02±0,49 ^f	116,63±29,34 ^{cd}	15,46±0,54 ^a	4,57±1,88 ^h	352,83±2,15 ^a	16,39±3,39 ^a

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P < 0,05$)

4.7.2. Glukoz substratında farklı tüy unu miktarlarının kullanılması

TU ile glukoz substratında yapılan denemelerden %0,5 oranında TU ilave edilerek hazırlanan besiyerinde gerçekleştirilen denemede ulaşılan maksimum enzim aktivitesi $55,89 \pm 18,48$ U/ml olarak belirlenmiştir (izelge 4.17). Maksimum biyokütle konsantrasyonu $9,10 \pm 1,05$ g/L olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonunda ortamda kalan şeker miktarı ise $58,41 \pm 0,26$ g/L olarak tespit edilmiştir.

%0,75'lik fermentasyonda maksimum enzim aktivitesine ($48,55 \pm 17,15$ U/ml) alışmanın 5. gününde ulaşılmıştır. Fermentasyon boyunca ulaşılabilen en yüksek biyokütle konsantrasyonu $11,91 \pm 0,89$ g/L olarak belirlenmiştir. Fermentasyon sonunda ortamda kalan şeker miktarı $62,58 \pm 0,49$ g/L olarak tespit edilmiştir.

%1'lik fermentasyonda maksimum enzim aktivitesine ($98,33 \pm 4,79$ U/ml) ve maksimum biyokütle konsantrasyonuna ($18,12 \pm 0,41$ g/L) fermentasyonun 10. gününde ulaşılmıştır. Çalışma sonunda ortamda kalan şeker miktarı ise $55,58 \pm 3,50$ g/L olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.17. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin farklı miktarlarda tüy ünen içeren glukoz substratında gelişimi

Zaman (Gün)	%0,50			%0,75			%1,0		
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)
B	87,49±2,24 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	87,37±1,87 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^g	88,13±2,92 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^f
0	86,97±3,20 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	78,78±1,44 ^c	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^g	80,35±0,76 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^f
1	83,94±0,37 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	82,16±1,50 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^g	79,17±3,94 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^f
2	76,47±1,09 ^b	0,00±0,00 ^c	4,40±0,08 ^b	74,29±0,58 ^d	0,00±0,00 ^b	6,20±0,63 ^f	73,08±1,30 ^c	49,61±3,10 ^{ab}	8,15±0,36 ^e
3	77,17±3,90 ^b	9,37±6,38 ^{bc}	6,19±2,16 ^{ab}	71,64±0,34 ^{de}	10,33±6,97 ^{ab}	6,32±0,68 ^f	70,16±0,08 ^{cd}	35,55±9,22 ^{ab}	8,69±0,43 ^e
4	76,76±2,39 ^b	12,80±10,53 ^{bc}	4,42±0,10 ^b	70,48±0,02 ^{ef}	41,93±10,29 ^a	7,11±0,63 ^f	67,00±0,76 ^{cde}	67,97±3,19 ^{ab}	9,12±0,47 ^e
5	68,98±0,67 ^{cd}	51,42±9,55 ^a	6,66±0,23 ^{ab}	69,74±0,46 ^{ef}	48,55±17,15 ^a	9,21±0,39 ^{cd}	66,69±0,82 ^{de}	68,56±5,16 ^a	13,97±0,16 ^c
6	66,84±2,37 ^{cd}	55,89±18,48 ^a	6,45±0,40 ^{ab}	68,41±0,21 ^f	38,21±20,88 ^{ab}	8,77±0,36 ^{de}	66,19±0,06 ^{de}	61,66±2,34 ^a	12,16±0,73 ^d
7	70,48±1,31 ^{bc}	35,29±0,96 ^{ab}	7,76±1,46 ^a	64,88±0,19 ^g	25,72±18,21 ^{ab}	11,91±0,89 ^a	61,49±1,09 ^{efg}	56,93±0,22 ^{ab}	15,12±0,02 ^b
8	61,94±2,68 ^{de}	0,00±0,00 ^c	7,97±1,36 ^a	71,70±0,21 ^{de}	19,04±3,52 ^{ab}	9,93±0,80 ^{cbd}	63,62±1,15 ^{ef}	56,79±5,16 ^{ab}	12,42±0,01 ^d
9	71,62±2,46 ^{bc}	0,00±0,00 ^c	9,10±1,05 ^a	68,57±0,41 ^f	0,00±0,00 ^b	11,12±0,63 ^{ab}	58,61±0,94 ^{ef}	34,13±2,37 ^{ab}	13,91±0,29 ^c
10	58,41±0,26 ^e	37,08±1,23 ^{ab}	8,09±0,17 ^a	62,58±0,49 ^g	20,74±0,37 ^{ab}	10,74±0,46 ^{abc}	55,58±3,50 ^g	98,33±4,79 ^a	18,12±0,41 ^a

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P < 0,05$)

4.7.3. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin tüy unu içeren denemelerine ait kinetik parametreler

Keçiboynuzu ekstraktında TU ile yapılan denemelerde en yüksek enzim aktivitesi (355,77 U/ml) %1'lik fermentasyonda tespit edilmiştir (izelge 4.18). Keçiboynuzu ekstraktı ve %0,5, %0,75, %1'lik oranında TU ile zenginleştirilerek yapılan fermentasyonların maksimum üretim oranları sırasıyla 70,39 U/ml/gün, 63,96 U/ml/gün ve 54,67 U/ml/gün olarak hesaplanmıştır. %0,5 oranında TU kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyon denemesi maksimum gelişim oranı en yüksek (3,45U/ml/gün) alışma olarak belirlenmiştir.

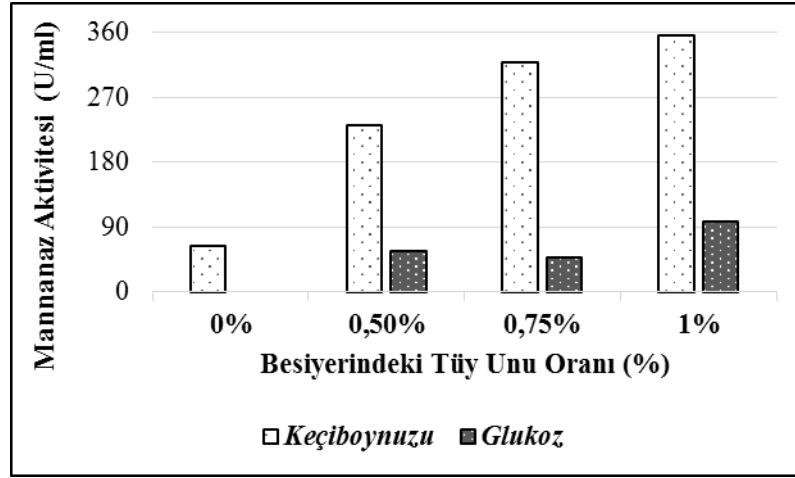
Glukoz ile gerçekleştirilen denemelerde en yüksek enzim aktivitesine (98,33U/ml) %1 oranında TU ilave edilerek yapılan fermentasyon çalışmasında ulaşılmıştır. Glukoz ve %0,5, %0,75, %1'lik oranında TU ilave edilerek yapılan fermentasyonların maksimum üretim oranları sırasıyla 15,38 U/ml/gün, 17,73 U/ml/gün ve 15,66 U/ml/gün olarak hesaplanmıştır.

Her iki substratta da yapılan çalışmaların şeker tüketimi, maksimum üretim ve maksimum tüketim oranları arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$).

Çizelge 4.18. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin tüy unu içeren denemelerine ait kinetik parametreler

	Tüy Unu Miktarları (Keçiboynuzu Ekstraktında)			Tüy Unu Miktarları (Glukoz Substratında)		
	%0,5	%0,75	%1	%0,5	%0,75	%1
şeker Tüketimi (g/L)	65,77	62,23	63,23	28,56	16,19	24,77
Mannanaz Aktivitesi (U/ml)	231,02	319,50	355,77	55,89	48,55	98,33
Mak. Tüketim Oranı, (-ds/dt) _{max} (g/L/gün)	13,76	11,93	6,13	4,52	2,87	3,94
Mak. Üretim Oranı, (dp/dt) _{max} (U/ml/gün)	70,39	63,96	54,67	15,38	17,73	15,66
Mak. Gelişim Oranı, (dx/dt) _{max} (g/L/gün)	3,45	1,30	2,73	0,82	1,93	2,89
Spesifik Gelişim Oranı (gün ⁻¹)	0,18	0,10	0,12	0,08	0,13	0,09
İkiye Katlanma Süresi (T _d) (gün)	3,83	7,13	5,77	8,32	5,31	7,67

TU ile yapılan çalışmalarda en yüksek enzim aktivitesi keçiyoynuzu ekstraktı ile %1 oranında tüy unu ilave edilen fermentasyonda belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Farklı miktarlarda tüy unu içeren keçiyoynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki denemelere ait maksimum aktiviter

4.8. Balık Unu

4.8.1. Keçiyoynuzu substratında farklı balık unu miktarlarının kullanılması

BU ile keçiyoynuzu substratında yapılan denemelerden %0,5 oranında BU ilave edilerek gerçekleştirilen fermentasyonda maksimum enzim aktivitesi $277,4\pm 5,61$ U/ml olarak belirlenmiştir (izelge 4.19). Maksimum biyokütle konsantrasyonu $12,24\pm 0,10$ g/L olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonunda ortamda kalan şeker miktarı ise $4,66\pm 0,05$ g/L olarak tespit edilmiştir.

%0,75'lik fermentasyonda maksimum enzim aktivitesine ($267,82\pm 13,19$ U/ml) alışmanın 9. gününde ulaşılmıştır. Fermentsyon boyunca ulaşılabilen en yüksek biyokütle konsantrasyonu $13,45\pm 0,12$ g/L olarak belirlenmiştir. Fermentasyon sonunda ortamda kalan şeker miktarı ise $4,68\pm 1,51$ g/L olarak hesaplanmıştır.

%1'lik fermentasyonda maksimum enzim aktivitesine ($310,74\pm 7,91$ U/ml) fermentasyonun 7. gününde ulaşılmıştır. Maksimum biyokütle konsantrasyonu ise $15,76\pm 0,26$ g/L olarak belirlenmiştir. Çalışma sonunda ortamda kalan şeker miktarı $4,91\pm 0,09$ g/L olarak tespit edilmiştir.

Her üç çalışmada da genel olarak günler arasındaki kalıntı şeker miktarı farkının istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Üç denemede de enzim aktivite değerlerinin değişken değerler aldığı görülmektedir.

Çizelge 4.19. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin farklı miktarlarda balık unu içeren keçiyoynuzu substratında gelişimi

Zaman (Gün)	%0,50			%0,75			%1,0		
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)
B	90,74±4,86 ^a	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^h	73,10±5,56 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	77,84±1,13 ^a	0,00±0,00 ^g	0,00±0,00 ^b
0	74,36±2,01 ^b	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^h	74,12±0,22 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	71,94±1,44 ^b	0,00±0,00 ^g	0,00±0,00 ^b
1	76,39±1,87 ^b	38,59±2,56 ^d	0,00±0,00 ^h	74,60±0,63 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	73,40±0,91 ^{ab}	0,00±0,00 ^g	0,00±0,00 ^b
2	55,52±5,18 ^c	113,93±16,11 ^{bc}	7,57±0,01 ^g	61,79±2,27 ^b	87,79±7,27 ^{bc}	8,77±0,02 ^b	58,09±0,35 ^c	125,07±5,89 ^e	10,10±0,09 ^a
3	42,90±2,13 ^d	184,41±1,93 ^b	8,45±0,04 ^{fg}	45,04±3,05 ^c	90,97±7,78 ^{bc}	9,33±0,03 ^b	39,16±0,06 ^d	156,25±1,22 ^d	11,97±0,05 ^a
4	38,44±0,59 ^d	163,46±29,16 ^{bc}	8,76±0,03 ^{efg}	38,24±0,65 ^d	94,83±14,93 ^{bc}	13,45±0,12 ^{ab}	40,31±0,87 ^d	225,55±1,57 ^c	11,38±0,10 ^a
5	31,73±8,67 ^{de}	67,01±14,96 ^c	10,37±0,04 ^{cde}	26,28±0,44 ^e	214,74±7,50 ^{ab}	16,89±0,62 ^a	26,17±1,26 ^e	280,64±17,07 ^b	13,48±0,13 ^a
6	23,19±0,25 ^{ef}	80,92±26,72 ^c	9,47±0,04 ^{efd}	20,75±2,19 ^{ef}	123,54±32,09 ^{ab}	12,21±0,07 ^{ab}	22,12±3,62 ^e	228,76±1,76 ^c	13,87±0,24 ^a
7	16,18±1,60 ^{fg}	76,79±27,23 ^c	11,75±0,14 ^{bc}	17,58±1,74 ^{fg}	164,90±5,87 ^b	12,66±0,14 ^{ab}	16,51±1,53 ^f	310,74±7,91 ^a	15,76±0,26 ^a
8	16,59±2,02 ^{fg}	148,4±4,14 ^{bc}	10,57±0,04 ^{bcd}	13,25±0,24 ^g	61,51±2,50 ^{bc}	10,45±0,05 ^{ab}	11,75±2,83 ^f	297,41±1,30 ^{ab}	15,19±0,42 ^a
9	9,75±1,10 ^{gh}	27,51±3,03 ^d	14,22±0,00 ^a	10,71±0,69 ^{gh}	267,82±13,19 ^a	12,74±0,18 ^{ab}	5,98±0,49 ^g	97,44±9,16 ^f	14,65±0,08 ^a
10	4,66±0,05 ^h	277,4±5,61 ^a	12,24±0,10 ^b	4,68±1,51 ^h	88,95±1,28 ^{bc}	11,78±0,08 ^{ab}	4,91±0,09 ^g	105,35±3,99 ^{ef}	12,35±0,23 ^a

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$)

4.8.2. Glukoz substratında farklı balık unu miktarlarının kullanılması

BU ile glukoz substratında yapılan fermentasyon denemelerinden %0,5 oranında BU ilave edilerek gerçekleştirilen denemede maksimum enzim aktivitesi $97,18 \pm 12,52$ U/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.20). Maksimum biyokütle konsantrasyonu ($15,12 \pm 0,28$ g/L) olarak hesaplanmıştır. Fermentasyon sonunda ortamda kalan şeker miktarı ise $0,24 \pm 0,30$ g/L olarak tespit edilmiştir.

%0,75'lik fermentasyonda maksimum enzim aktivitesine ($100,86 \pm 5,45$ U/ml) çalışmanın 3. gününde ulaşılmıştır. Fermentasyon boyunca ulaşılabilen en yüksek biyokütle konsantrasyonu $15,60 \pm 0,16$ g/L olarak belirlenmiştir. Çalışma sonunda ortamda kalan şeker miktarı $4,88 \pm 0,35$ g/L olarak tespit edilmiştir.

%1'lik fermentasyonda maksimum enzim aktivitesi ve maksimum biyokütle konsantrasyonu sırasıyla $182,98 \pm 33,27$ U/ml ve $18,69 \pm 0,0$ g/L olarak hesaplanmıştır. Fermentasyon sonunda ortamda kalan şeker miktarı ise $7,00 \pm 1,52$ g/L olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.20. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin farklı miktarlarda balık unu içeren glukoz substratında gelişimi

Zaman (Gün)	%0,50			%0,75			%1,0		
	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)	Kalıntı Şeker (g/L)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Biyokütle (g/L)
B	133,50±0,00 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^d	115,60±0,00 ^a	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	103,55±0,00 ^a	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^b
0	112,72±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^d	103,55±0,00 ^a	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	81,74±0,00 ^b	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^b
1	95,79±0,00 ^{bc}	35,50±7,68 ^{bc}	0,00±0,00 ^d	102,10±2,48 ^a	15,10±4,77 ^{cd}	0,00±0,00 ^d	81,37±1,33 ^{bc}	55,26±11,75 ^{cd}	0,00±0,00 ^b
2	86,02±0,00 ^c	32,22±2,07 ^{bc}	0,00±0,00 ^d	98,96±0,74 ^a	41,32±23,01 ^{bcd}	0,00±0,00 ^d	76,56±0,00 ^c	104,99±13,90 ^b	0,00±0,00 ^b
3	85,06±0,00 ^c	60,04±13,81 ^{bc}	7,49±0,28 ^c	77,11±1,59 ^b	100,86±5,45 ^a	13,87±0,17 ^{cd}	57,52±4,25 ^d	182,98±33,27 ^a	17,26±0,16 ^a
4	77,37±0,00 ^c	51,79±2,50 ^{bc}	9,35±0,21 ^{bc}	64,40±4,70 ^{bc}	77,68±26,92 ^{ab}	14,53±0,10 ^{ab}	51,09±1,52 ^e	91,40±7,46 ^{bc}	15,18±0,03 ^a
5	77,52±3,99 ^c	22,81±6,26 ^{bc}	10,33±0,02 ^{abc}	52,05±6,32 ^c	45,54±9,14 ^{bc}	15,60±0,16 ^a	47,39±1,00 ^e	48,14±5,12 ^d	14,95±0,06 ^a
6	50,24±5,18 ^d	33,58±7,35 ^{bc}	13,01±0,11 ^{ab}	21,85±1,57 ^d	65,75±6,15 ^{ab}	11,86±0,10 ^{bc}	16,34±1,39 ^f	57,44±7,43 ^{cd}	14,88±0,01 ^a
7	57,33±4,73 ^d	97,18±12,52 ^a	10,64±0,16 ^{abc}	17,93±6,12 ^{de}	62,11±0,55 ^{ab}	10,80±0,16 ^c	9,85±0,11 ^g	33,53±7,41 ^{de}	15,21±0,33 ^a
8	27,39±7,75 ^e	94,14±3,55 ^a	11,49±0,20 ^{abc}	18,10±4,07 ^{de}	14,74±0,34 ^{cd}	12,49±0,01 ^{cd}	7,94±1,46 ^g	40,26±0,75 ^d	18,69±0,06 ^a
9	23,68±18,15 ^e	24,25±0,42 ^{bc}	13,08±0,08 ^{ab}	15,43±9,65 ^{de}	10,14±0,02 ^{cd}	15,19±0,07 ^a	7,00±1,52 ^g	27,25±1,50 ^{de}	18,31±0,26 ^a
10	0,24±0,30 ^f	35,92±13,69 ^{bc}	15,12±0,28 ^a	4,88±0,35 ^e	18,72±4,63 ^{cd}	13,71±0,09 ^{cd}	7,22±0,22 ^g	44,75±4,38 ^d	14,87±0,04 ^a

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir ($P<0,05$)

4.8.3. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin balık unu içeren denemelerine ait kinetik parametreler

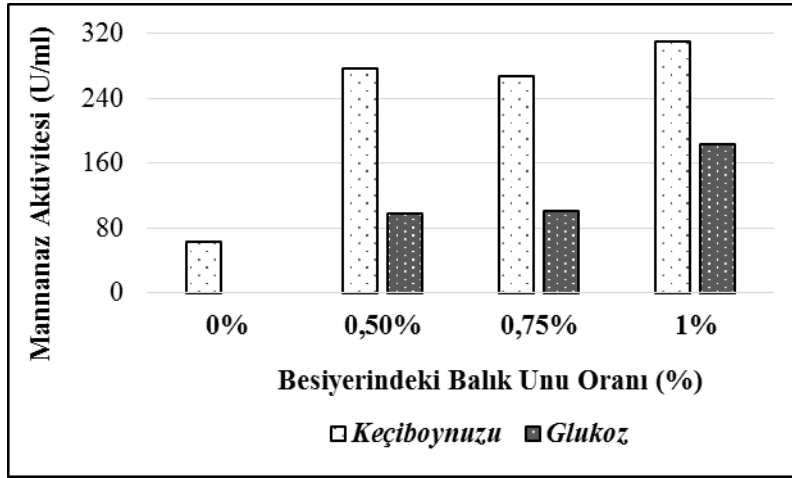
Balık unu (BU) ile keçiyoynuzu ekstraktında yapılan denemelerde en yüksek enzim aktivitesi (310,74 U/ml) %1'lik fermentasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.18). Keçiyoynuzu ekstraktının %0,5, %0,75, %1'lik oranında BU ile zenginleştirilerek hazırlanan besiyerlerindeki fermentasyonların maksimum üretim oranları sırasıyla 0,02 U/ml/gün, 14,05 U/ml/gün ve 45,14 U/ml/gün olarak hesaplanmıştır. %0,75 oranında BU kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyon denemesi maksimum gelişim oranı en yüksek çalışma (19,04 U/ml/gün) olarak tespit edilmiştir.

Glukoz ile gerçekleştirilen denemelerde en yüksek enzim aktivitesine (182,98 U/ml) %1 oranında BU ilave edilerek yapılan fermentasyon çalışmasında ulaşılmıştır. Glukoz ve %0,5, %0,75, %1 oranlarında BU ilave edilerek yapılan fermentasyonların maksimum üretim oranları sırasıyla 0,02 U/ml/gün, 0,03 U/ml/gün ve 0,02 U/ml/gün olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.21. Rekombinant *Aspergillus sojae*'nin balık unu içeren denemelerine ait kinetik parametreler

	Balık Unu Miktarları (Keçiyoynuzu Ekstraktında)			Balık Unu Miktarları (Glukoz Substratında)		
	%0.50	%0.75	%1.0	%0.50	%0.75	%1.0
Şeker Tüketimi (g/L)	69,70	69,44	67,03	99,51	97,97	74,51
Mannanaz Aktivitesi (U/ml)	184,41	267,83	310,74	109,41	100,86	182,98
Mak. Tüketim Oranı, (-ds/dt)max (g/L/gün)	9,16	12,02	17,12	14	17,93	13,06
Mak. Üretim Oranı, (dp/dt)max (U/ml/gün)	48,09	43,65	45,14	43,30	32,35	59,87
Mak. Gelişim Oranı, (dx/dt)max (g/L/gün)	2,19	19,04	8,12	2,89	1,14	1,90
Spesifik Gelişim Oranı (gün ⁻¹)	0,08	0,03	0,09	0,18	0,09	0,11
İkiye Katlanma Süresi (T _d) (gün)	8,95	2,33	7,72	3,95	7,60	6,08

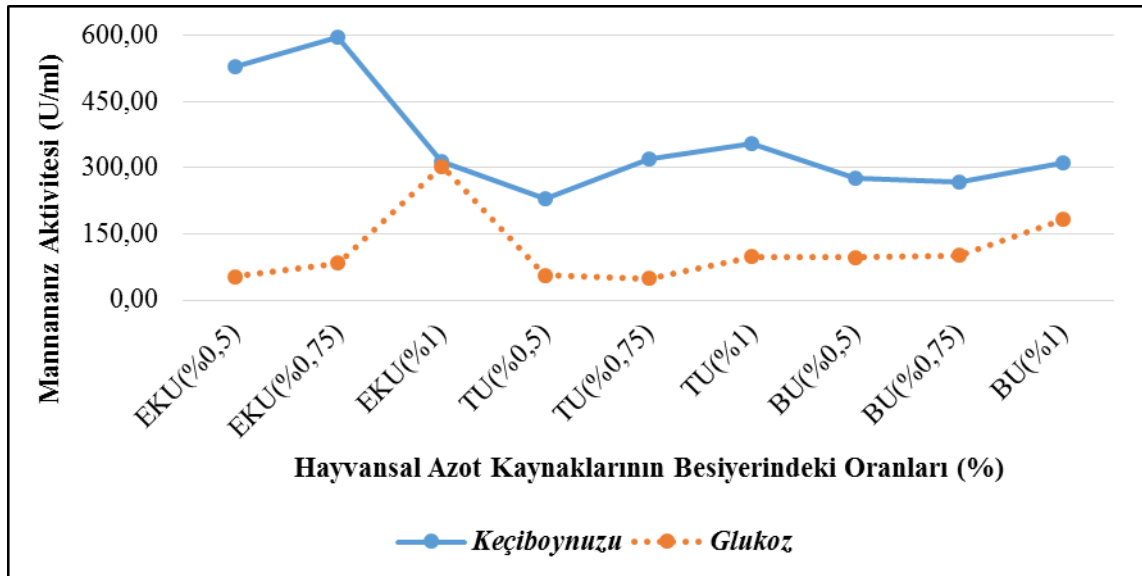
BU ile yapılan 6 denemede en yüksek aktiviteye (310,74 U/ml) keçiyoynuzu substratında %1 BU ilave edilerek gerçekleştirilen fermentasyonda ulaşılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Farklı miktarlarda balık unu içeren keçiyoynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki mannanaz üretim denemeleri

4.9. Hayvansal Azot Kaynaklarının Genel Değerlendirilmesi

Kullanılan hayvansal kökenli materyallerin farklı miktarları ile yapılan denemelere ait maksimum enzim aktivite değerleri incelendiğinde her iki substratta da en yüksek aktivite değerlerine EKU ile yapılan fermentasyonlarda ulaşıldığı görülmektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Farklı miktarlarda hayvansal azot kaynağı içeren keçiyoynuzu ekstraktı ve glukoz substratındaki denemelere ait maksimum aktivite değerleri

Keçiboynuzu ekstraktına üç farklı oranda hayvansal azot kaynağı ilave edilerek hazırlanan besiyerlerinde gerçekleştirilen fermentasyonlarda ulaşılan maksimum enzim aktivite değerleri en yüksekten en düşüğe doğru; EKU(%0,75): 597,31 U/ml, EKU(%0,5): 530,77 U/ml, TU(%1): 355,77 U/ml, TU(%0,75): 319,5 U/ml, EKU(%1): 315,79 U/ml, BU(%1): 310,74 U/ml, BU(%0,5): 277,4 U/ml, BU(%0,75): 267,82 U/ml, TU(%0,5): 231,02 U/ml şeklindedir. Glukoz substratında yapılan denemeler için aynı sıralama; EKU(%0,75): 84,14/ml, EKU(%0,5): 52,81 U/ml, TU(%1): 98,33 U/ml, TU(%0,75): 48,55 U/ml, EKU(%1): 303,67 U/ml, BU(%1): 182,98 U/ml, BU(%0,5): 97,18 U/ml, BU(%0,75):100,86 U/ml, TU(%0,5): 55,89 U/ml şeklindedir.

Her iki substratta %1 oranında EKU ile yapılan denemeler dışındaki iki karbon kaynağıyla yapılan fermentasyonlara ait tüm aktivite değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). Hem glukoz hem de keçiboynuzu substratında farklı miktarlarda balık unu ilave edilerek gerçekleştirilen fermentasyonlarda en yüksek aktivite değerlerine %1'lik denemelerde ulaşıldığı görülmektedir.

4.10. Bitkisel ve Hayvansal Azot Kaynaklarının Karşılaştırılması

Çalışmada kullanılan bitkisel ve hayvansal azot kaynaklarının kullanıldığı fermentasyonlarda en yüksek enzim aktivite değerlerine keçiboynuzu substratında ulaşılmıştır (Çizelge 4.22). Bu değerler bitkisel kaynaklardan SP'nin %0,75 oranında eklendiği denemede 525,93 U/ml olarak, hayvansal kaynaklardan EKU'nun besiyeri ortamına %0,75 oranında ilave edildiği fermentasyonda ise 597,31 U/ml olarak tespit edilmiştir.

Tüm hayvansal ve bitkisel azot kaynakları ile yapılan fermentasyon denemelerine ait maksimum üretim hızları incelendiğinde keçiboynuzu ekstraktı ve glukozda yapılan denemelere ait maksimum üretim oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

Çizelge 4.22. Kullanılan azot kaynaklarına ait maksimum enzim aktivite değerleri (U/ml)

	Keçiboynuzu			Glukoz		
	%0,5	%0,75	%1	%0,5	%0,75	%1
KM	228,23	217,91	247,11	78,55	104,02	86,44
PT	202,4	279,82	315,75	37,38	27,86	58,26
MZ	203,37	200,33	228,17	47,28	80,14	116,69
SP	445,02	525,93	434,25	56,11	59,23	245,76
EKU	530,77	597,31	315,79	52,81	84,14	303,67
TU	231,02	319,5	355,77	55,89	48,55	98,33
BU	277,4	267,82	310,74	97,18	100,86	182,98

Çalışma kapsamında ulaşılan en yüksek enzim aktivite değerlerinin tespit edildiği SP ve EKU ilave edilerek keçiyoynuzu substratında gerçekleştirilen denemelerde maksimum üretim oranları SP(%0,5): 74,25 U/ml/gün, SP(%0,75): 97,54 U/ml/gün, SP(%1): 82,85 U/ml/gün, EKU(%0,5): 38,42 U/ml/gün, EKU(%0,75): 76,24 U/ml/gün, EKU(%1): 40,99 U/ml/gün olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.23). Aynı kaynakların glukoz substratındaki maksimum üretim oranları ise SP(%0,5): 14,19 U/ml/gün, SP(%0,75): 17,81 U/ml/gün SP(%1): 19,56 U/ml/gün, EKU(%0,5): 16,35 U/ml/gün, EKU(%0,75): 18,56 U/ml/gün, EKU(%1): 56,6 U/ml/gün olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.23. Kullanılan farklı azot kaynaklarına ait maksimum üretim oranları (U/ml/gün)

	Keçiyoynuzu			Glukoz		
	%0,5	%0,75	%1	%0,5	%0,75	%1
KM	73,11	65,97	64,48	20,4	26,99	29,65
PT	95,01	74,31	64,53	9,08	5,82	2,54
MZ	48,07	24,60	35,64	13,84	20,86	18,89
SP	74,25	97,54	82,85	14,19	17,81	19,56
EKU	38,42	76,24	40,99	16,35	18,56	56,6
TU	70,39	63,96	54,67	15,38	17,73	15,66
BU	48,09	43,65	45,14	43,30	32,35	59,87

Turhan vd. (2012) tarafından üç farklı azot kaynağının üç farklı oranıyla (%0,5, %0,75 ve %1.0) zenginleştirildiği keçiyoynuzu substratında mannanaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Azot kaynağı olarak amonyum nitrat (AN), et ekstraktı (EE) ve maya ekstraktının (ME) kullanıldığı projede ulaşılan maksimum enzim aktiviteleri AN(%0,5): 695,6 U/ml, EE(%0,5): 472 U/ml, ME(%0,5): 423,6 U/ml olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada ulaşılan en yüksek aktiviteler ise EKU(%0,75): 597,31 U/ml, EKU(%0,5): 530,77 U/ml ve SP(%0,75): 525,93 U/ml olarak belirlenmiştir. Bu değerler ile sözkonusu projede ulaşılan aktivite değerleri karşılaştırıldığında tez kapsamında kullanılan materyallerin pahalı kaynaklara alternatif olabileceği görülmektedir.

4.11. En İyi Olarak Belirlenen Karbon ve Azot Kaynaklarında Fermentör Çalışması

Proje kapsamında yapılan 42 denemeye ait veriler incelendiğinde en yüksek enzim aktivitesine (597,31 U/ml) karbon kaynağı olarak keçiyoynuzu ekstraktının kullanıldığı ve %0,75 oranında EKU ile azotça zenginleştirilen besiyerinde yapılan fermentasyonda ulaşıldığı görülmüştür. EKU'nun aynı oranı kullanılarak bir fermentör denemesi gerçekleştirilmiş ancak ölçek büyütmeden kaynaklanan sorunlardan dolayı enzim aktivitesi 12 U/ml olarak tespit edilmiştir.

4.12. Azotça Zenginleştirilmemiş Fermentasyon Denemeleri

Mannanaz üretiminde alternatif azot kaynağı olabileceği düşünülen materyallerin enzim aktivitesine etkisini daha net görebilmek için herhangi bir azot kaynağı ilave edilmeksizin hem glukoz hem de keçiyoynuzu substratında diğer tüm koşulların aynı olduğu birer fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Yapılan fermentasyonlar neticesinde keçiyoynuzu ekstraktında maksimum enzim aktivitesi $63,68 \pm 0,12$ U/ml olarak hesaplanmış, glukoz substratında ise enzim aktivitesi tespit edilememiştir. Keçiyoynuzu ile yapılan denemede şeker tüketimi 43 g/L, glukoz denemesinde ise 4 g/L gerçekleşmiştir.

4.13. Alternatif Karbon ve Azot Kaynaklarının Ekonomik Analizi

Mannanaz üretimindeki kullanım potansiyeli belirlenmeye çalışılan bazı materyallerin endüstriyel çalışmalarda kullanılabilirliğini daha net tespit edebilmek için temel bir ekonomik analiz yapılmıştır. Ekonomik analiz için 100ml'lik bir besiyeri referans kabul edilerek ekonomik uygunluk belirlenmiştir (Çizelge 4.24).

Keçiyoynuzu substratına %1 oranında bitkisel veya hayvansal azot kaynağı ilave edilerek hazırlanan 100 ml'lik bir besiyeri maliyeti hesaplanmıştır. Toplam maliyetler her bir kaynak için KM: 0,674 TL, PT: 0,640 TL, MZ: 1,150 TL, SP: 0,794 TL, EKV: 0,650 TL, TU:0,675 TL, BU:0,725 TL şeklinde hesaplanmıştır. Aynı şekilde glukoz substratına %1 oranında bitkisel veya hayvansal azot kaynağı ilave edilerek hazırlanan 100 ml'lik bir besiyerinin maliyeti hesaplanmıştır. Toplam maliyetler her bir kaynak için KM: 0,949 TL, PT: 0,915 TL, MZ: 1,425 TL, SP: 1,069 TL, EKV:0,925 TL, TU: 0,95 TL, BU: 1,0 TL şeklinde hesaplanmıştır.

Çizelge 4.24. Mannanaz üretiminde yüksek maliyetli kaynaklar ile alternatif kaynakların ekonomik analizi

		Fiyat (TL/Kg)	Kullanılan miktar (g)	Kullanılan materyalin maliyeti (TL)	KB için toplam maliyet (TL)	G için toplam maliyet (TL)	Maksimum Aktivite (U/ml)
Alternatif Azot Kaynakları	Kırmızı Mercimek	1,95	25	0,049	0,674	0,949	247,11
	Pamuk Tohumu	0,6	25	0,015	0,640	0,915	315,75
	Mısır Zeini	21	25	0,525	1,150	1,425	228,17
	Soya Proteini	6,75	25	0,169	0,794	1,069	525,93
	Et-Kemik Unu	1	25	0,025	0,650	0,925	597,31
	Tüy Unu	2	25	0,050	0,675	0,950	355,77
	Balık Unu	4	25	0,100	0,725	1,000	310,74
Saf Azot Kaynakları	Maya Ekstraktı (YE)	340	25	8,500	9,125	9,400	695,6
	Et Ekstraktı (EE)	250	25	6,250	6,875	7,150	472
	Amonyum nitrat (AN)	112	25	2,800	3,425	3,700	423,6
Diğer	MgSO ₄ .7H ₂ O	100	1,25	0,125			
	K ₂ HPO ₄	150	2,5	0,375			
Karbon Kaynakları	Glukoz (G)	50	8	0,400			
	Keçiboynuzu (KB)	5	25	0,125			

5. SONUÇ

Bu çalışma ile 7 farklı azot kaynağının 3 farklı miktarda ve ayrı ayrı denemelerde fermentasyon ortamına ilave edilerek mannanaz üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Kalıntı şeker miktarı, enzim aktivitesi ve biyokütle miktarlarının ortalama değerleri arasındaki farkların istatistiksel olarak önemi %95 güven düzeyinde hesaplanmıştır. Herhangi bir azot kaynağı olmaksızın gerçekleştirilen kontrol çalışmaları ile de alternatif azot kaynağı olabileceği düşünülen materyallerin enzim aktivite değerlerine etkisi daha net görülmüştür.

Bitkisel materyallerden kırmızı mercimek ile ulaşılan maksimum aktivite değeri keçiyoynuzu ve glukoz substratında sırasıyla 247,11 U/ml ve 104,02 U/ml olarak tespit edilmiştir. Pamuk tohumu ile yapılan çalışmalar keçiyoynuzu ekstraktında 315,75 U/ml, glukoz substratında ise 58,26 U/ml olarak belirlenmiştir. Mısır zeini kullanılarak yapılan fermentasyon çalışmalarında 228,17 U/ml, glukozda ise 116,69 U/ml'ye ulaşılmıştır. Soya proteini ile yapılan denemelerde maksimum aktivite değerleri keçiyoynuzu ekstraktı ile zenginleştirilmiş besiyerinde 525,93 U/ml, glukoz substratında ise 245,7 U/ml olarak belirlenmiştir. Bitkisel materyallerden en yüksek enzim aktiviteleri hem keçiyoynuzu hem de glukoz substratına soya proteini eklenen fermentasyonlarda sırasıyla 525,93 U/ml ve 245,76 U/ml olarak tespit edilmiştir.

Et-kemik unu ile yapılan denemelerde maksimum enzim aktivitesi keçiyoynuzu substratında 597,31 U/ml, glukozda ise 303,67 U/ml olarak belirlenmiştir. Tüy ununun kullanıldığı fermentasyonlarda keçiyoynuzu ve glukozda ulaşılan maksimum aktiviteler sırasıyla 355,77 U/ml ve 98,33 U/ml olarak tespit edilmiştir. Balık unu ile zenginleştirilerek hazırlanan besiyerlerinde en yüksek enzim aktivite değerleri keçiyoynuzu substratında 310,74 U/ml, glukozda ise 182,98 U/ml olarak hesaplanmıştır. Hayvansal materyaller ile gerçekleştirilen denemelerde en yüksek enzim aktivite değeri 597,31 U/ml olarak et-kemik unu ile keçiyoynuzu ekstraktı içeren besiyerindeki fermentasyon çalışmasında ulaşılmıştır.

Çalışma kapsamında bitkisel ve hayvansal azot kaynaklarıyla yapılan tüm denemelerde ulaşılan aktivite değerlerinin en yüksek %0,75 oranında et-kemik unu ile keçiyoynuzu substratında yapılan denemede tespit edilmiştir.

Yapılan ekonomik analiz ile alternatif bir karbon kaynağı olan keçiyoynuzu ile kullanılan azot kaynaklarının mannanaz üretiminde maliyetleri yaklaşık % 80 düşürebileceği görülmüştür.

Bu çalışma kapsamında elde edilen verilerin endüstriye aktarılabilir özellikte olduğu, günümüzde mikrobiyal enzim üretiminde düşük maliyetli bir karbon kaynağı olarak kullanılan keçiyoynuzu meyvesi ile birlikte mikrobiyal gelişimin diğer ana faktör olan azotun da alternatif materyallerden sağlanması noktasında gelecekte yapılabilecek daha kapsamlı çalışmalara ışık tutacak nitelikte olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- ABDESHANIAN, P., SAMAT N, HAMİD, AA., YUSOFF, WMW. 2009. Utilization of palm kernel cake for production of β -mannanase by *Aspergillus niger* FTCC 5003 in solid state fermentation using an aereated column bioreactor. *J Microbiol Biotechnology* 37:103–109
- ADEMARK, P., VARGA, A., MEDVE, J., HARJUNPÄÄ, V., DRAKENBERG, T., TJERNELD, F., and STÅLBRAND, H. 1998. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: Purification and properties of a β -mannanase. *Journal of Biotechnology*, 63(3): 199-210.
- ALTAF, M., VENKATESHWAR, M., SRİJANA, M., and REDDY, G. 2007. An economic approach for l-(+) lactic acid fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using inexpensive carbon and nitrogen sources. *Journal of Applied Microbiology*, 103(2): 372-380.
- ALTAF, M., NAVEENA, B.J., and REDDY, G. 2007. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L (+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. *Bioresource Technology*, 98(3): 498-503.
- ALTAF, M.D., NAVEENA, B.J., VENKATESHWAR, M., KUMAR, E.V., and REDDY, G. 2006. Single step fermentation of starch to l (+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract–Optimization by RSM. *Process Biochemistry*, 41(2): 465-472.
- ALTAF, M., NAVEENA, B.J., and REDDY, G. 2005. Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L (+) lactic acid from starch by amyolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 43(3): 235-239.
- ANONİM, 2009. FAO. Production of carob fruit annual.
- YASİNA, M., BHUTTOB, A.W., BAZMİA, A.A., and KARİMB, S. 2010. Efficient utilization of rice-wheat straw to produce value-added composite products. *International Journal*, 1(2): 13-143.
- ARDA, M. 2000. Temel Mikrobiyoloji, Medisan Yayinevi, Ankara
- ASLANTAŞ, Y., KUTLU, H.R. 2004. Yem kaynağı olarak rendering ürünlerinin hayvan beslemede kullanımı, Adana
- AYDIN, G. 2000. Yem güvenliğinde dioksin, Türkiye Yem Sanayicileri Birliği Yem Magazin Dergisi: 26-55.

- AYGAN, A. 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selüloz Ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 186 s.
- AZİZ SA, ONG LGA, HASSAN MA, KARİM MIA. 2008. Production parameters optimization of mannanase production from *Aspergillus niger* FTCC 5003 using palm kernel cake as carbon source, *Asi J Biochem* 3(5):297–307
- BAILEY, M.J., BİELY, P. and POUTANEN, K. 1992. Interlaboratory testing methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23: 257-270.
- BATLLE, I., TOUS, J. 1997. Carob Tree. *Ceratonia Siliqua* L. Promoting The Conservation And Use Of Underutilized And Neglected Crops. 17. Institute Of Plant Genetics And Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 92 p.
- BİLİŞLİ, A. 2009. Gıda Kimyası, Sidas Yayınları, İzmir, 355 s.
- BROCK, T.D. 1984. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*. Sinauer Associates Incorporated. 308 p.
- CHAUHAN, P.S., PURİ, N., SHARMA, P., and GUPTA, N. 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(5): 1817-1830.
- CHEN, X., CAO, Y., DİNG, Y., LU, W., and Lİ, D. 2007. Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* β -mannanase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 128(3): 452-461.
- CHRİSTGAU, S., KAUPPINEN, S., VİND, J., KOFOD, L.V., and DALBØGE H., 1994. Expression cloning, purification and characterization of a beta-1, 4-mannanase from *Aspergillus aculeatus*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 33(5): 917-925.
- CIVAS A., EBERHARD R., LE DİZET P., and PETEK F., 1984. Glycosidases induced in *Aspergillus tamari* secreted α -D-galactosidase and β -D-mannanase. *Biochem. J.* 219: 857-863
- DASKİRAN, M., TEETER, R. G., FODGE, D., and HSİAO, H. Y. 2004. An evaluation of endo-beta-D-mannanase (Hemicell) effects on broiler performance and energy use in diets varying in beta-mannan content. *Poultry Science*, 83(4): 662-668.
- DE VRİES, R. P., and VİSSER, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4): 497-522.

- DHAWAN, S., and KAUR, J. 2007. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(4): 197-216.
- ERTUĞRUL, E. 2000. Türkiye kalkınma bankası sektörel araştırmalar et ve et ürünleri raporu, TKB Matbaası, Ankara, 84 s.
- ERKMEN, O. 2010. Gıda Mikrobiyolojisi, Efil Yayınları, Ankara, 551 s.
- FENG, Y., HE, Z., ONG, S.L., HU, J., ZHANG, Z., and NG, W.J. 2003. Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum β -mannanase production. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2): 282-289.
- GODFREY, T., WEST, S., 1996. The application of enzymes in industry, *Industrial enzymology*, 2nd edn. The Nature Press, New York, p. 512.
- GUPTA, R., GİGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMİ, V. K., and CHAUHAN B. 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11): 1599-1616.
- HORİKOSHİ, K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnolgy. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63 (4): 735-750.
- JACKSON, M.E., GERONIAN, K., KNOX, A., MCNAB, J., and MCCARTNEY, E. 2004. A dose-response study with the feed enzyme β -Mannanase in broilers provided with corn-soybean meal based diets in the absence of antibiotic growth promoters. *Poultry Science*. 83: 1992-1996.
- JOHN, R.P., NAMPOOTHİRİ, K.M., and PANDEY, A. 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3): 524-534.
- KARKACIER, M., ARTIK, N., 1995. Keçiboynuzunun (*Ceratonia Siliqua* L.) fiziksel özellikleri, kimyasal bileşimi ve ekstraksiyon koşulları. *Gıda*, 20: 131-136
- KOTE NV., PATİL AGG., MULİMANİ, VH. 2009. Optimization of the production of thermostable endo- β -1,4 mannanase from a newly isolated *Aspergillus niger* gr and *Aspergillus flavus* gr. *Appl Biochem Biotechnol* 152: 213–223
- KURAKAKE, M.; KOMAKI, T. 2001. Production of β -mannanase and β -mannosidase from *Aspergillus awamori* K4 and their properties. *Current Microbiology*, 42.6: 377-380.
- LEE, J.T., BAİLEY, C.A., and CARTWRİIGHT, A.L. 2003. Beta-mannanase ameliorates viscosity-associated depression of growth in broiler chickens fed guar germ and hull fractions. *Poultry Science*, 82(12): 1925-1931.
- LİN, SS., DOU, WF., XU, H., Lİ, HZ., XU, ZH., MA, Y. 2007. Optimization of medium composition for the production of alkaline β -mannanase by alkaliphilic

- Bacillus* sp. N16-5 using response surface methodology. *Appl Microbiol Biotechnol* 75(5): 1015–1022
- LİN, T.C., and CHEN, C. 2004. Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger* NCH-189 using defatted copra based media. *Process Biochemistry*, 39(9): 1103-1109.
- MABROUK, M.E., and EL AHWANY, A.M. 2008. Production of 946-mannanase by *Bacillus amylolequifaciens* 10A1 cultured on potato peels. *African Journal of Biotechnology*, 7(8): 1123-1128.
- MANJULA, S., SHİNDE, M., LALİTHA, J. 2010. Optimization of culture conditions for the production of β -mannanase from an agar utilizing *Paenibacillus* sp. MSL-9. *The Bioscan* 5(1): 75–79
- MİLLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3): 426-428
- MOU, H., ZHOU, F., JİANG, X., LİU, Z. 2011. Production, purification and properties of β -mannanase from soil bacterium *Bacillus circulans* M-21. *J Food Biochem* 35: 1451–1460
- MCCUTCHEN, C.M., DUFFAUD, G.D., LEDUC, P., PETERSON, A.R.H., TAYAL, A., KHAN, S.A. and KELLY, R.M. 1996. Characterization of Extremely Thermostable Enzymatic Breakers (cu-1,6- Galactosidase and p-1,4=Mannanase) from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga neapolitana* 5068 for Hydrolysis of Guar Gum. *Biotechnology and Bioengineering*, 52: 332-339.
- MEEKER, D.L., and HAMILTON, C.R. 2006. An overview of the rendering industry. *Essentials of Rendering: All About the Animal By-product Industry*. Arlington, VA National Renderers Association (Ed DL Meeker), 1-16.
- MİTCHELL, D.A., KRİEGER, N., STUART, D.M., and PANDEY, A. 2000. New developments in solid-state fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, 35(10): 1211-1225.
- MOHAMAD, S.N., RAMANAN, R.N., MOHAMAD, R., ARİFF, A.B. 2011. Improved mannan degrading enzymes production by *Aspergillus niger* through medium optimization. *New Biotechnology* 28: 146–152
- MUHTAR, S., 2000. *Aspergillus niger* kullanılarak melastan sitrik asit üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 74 s.
- NİCOLAS, P., RAETZ, E., REYMOND, S., and SAUVAGEAT, J.L. 1998. *U.S. Patent No. 5,714,183*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- NOLASCO-HİPOLİTO, C., MATSUNAKA, T., KOBAYASHİ, G., SONOMOTO, K., and İSHİZAKİ, A. 2002. Synchronized fresh cell bioreactor system for continuous l-(+)-lactic acid production using *Lactococcus lactis* IO-1 in hydrolysed sago starch. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(3): 281-287.
- OKAFOR, N. 2007. Modern Industrial Microbiology, Science Publishers. Enfield NH, USA, p. 530
- ÖZŞÖLEN, F. 2010. Katı Faz fermentasyonu ile ligninolitik enzim üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 73 s.
- ÖZTÜRK, B. 2008. Optimization of mannanase production from Recombinant *Aspergillus sojae* and analysis of galactomannan hydrolysis, Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Ankara, 104 s.
- ÖZTÜRK, B. CEKMECELİOĞLU, D., and OGEL, Z.B. 2010. Optimal conditions for enhanced β -mannanase production by recombinant *Aspergillus sojae*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(3): 135-139.
- PALACKAL, N., LYON, C. S., ZAİDİ, S., LUGİNBÜHL, P., DUPREE, P., GOUBET, F., and STEER, B. A. 2007. A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut, *Applied microbiology and biotechnology*, 74(1): 113-124.
- PETTEY, L.A., CARTER, S.D., SENNE, B.W., and SHRİVER, J.A. 2002. Effects of beta-mannanase addition to corn-soybean meal diets on growth performance, carcass traits, and nutrient digestibility of weanling and growing-finishing pigs, *Journal of animal science*, 80(4): 1012-1019.
- POLİTZ, O., KRAH, M., THOMSEN, K.K., and BORRİSS, R.R. 2000. A highly thermostable endo-1,4-beta-mannanase from the marine bacterium *Rhodothermus marinus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 53(6): 715-721.
- PUCHART, V., VRANSKA M., SVOBODA P., 2004. Purification and characterization of two forms of endo-beta-1,4-mannanase from a thermatolerant fungus *Aspergillus fumigatus* IMI 385718 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochimica Et Biophysica Acta-general subjects*. 1674: 239-250.
- RASHİD, S.A., DARAH, I., OMAR, I.C. 2010. Utilization of palm kernel cake for the production of mannanase by an indigenous filamentous fungus, *Aspergillus niger* USM F4 under solid state fermentation. *Int Microbiol* 9:1 (37): 103-109
- RENGE, V., KHEDKAR, S., and NANDURKAR, N.R. 2012. Enzyme synthesis by fermentation method: A Review, *Scientific Reviews and Chemical Communications*, 2(4): 585-590

- ROBINSON, T., SINGH, D., and NIGAM P. 2001. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(3): 284-289.
- SACHSLEHNER, A., FOIDL, G., FOIDL, N., GÜBITZ, G., and HALTRICH, D. 2000. Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*, *Journal of biotechnology*, 80(2): 127-134.
- SCRAGG, A. H., 1988. Biotechnology for engineers, Biological Systems in Technological Processes. Ellis Horwood Limited, London, 221-223.
- SEÇMEN, Ö. 1974. *Ceratonia siliqua L.*' nin Ekolojisi. İzmir, *Bitki 1* (4): 533-543.
- SEÇMEN, Ö. 1975. Studies in the Biosystematics of *Ceratonia siliqua L.* Proceedings of The Third MPP Meeting. İzmir. In Turkey.
- STANBURY, P.F. and WHITAKER, A. 1984. Principles of Fermentation Technology. Academic Press. London, 247 pp.
- SHULER, M.L. and KARGI, F. 2008. Bioprocess Engineering, Basic Concepts. Prentice Hall PTR, New Jersey, pp 535.
- TURHAN, I., BIALKA, L.K., DEMİRCİ, A. and KARHAN, M. 2010. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 101 (14): 5290-5296.
- TURHAN, I., BIALKA, L.K., DEMİRCİ, A. and KARHAN, M. 2010a. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 101 (14): 5290-5296.
- TURHAN, I., BIALKA, L.K., DEMİRCİ, A. and KARHAN, M. 2010b. Enhanced lactic acid production from carob extract by *Lactobacillus casei* using invertase pretreatment. *Food Biotechnology*. 24(4): 364-374.
- TURHAN, İ. 2009. Keçiboynuzu meyvesinden fermentasyon yoluyla laktik asit ve etanol üretimi, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 200 s.
- TURHAN, İ. 2013. Mannanaz üretiminde farklı azot kaynakları ve miktarlarının cevap yüzey metodu kullanılarak optimize edilmesi, Bilimsel Araştırma Proje Raporu, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 47 s.
- UANG, S.P., WANG, C.L., ZHANG, G.M., and MA, L.X. 2007. Construction of a double functional recombinant strain of *Pichia pastoris* co-expressing phytase and mannanase and the enzymatic analyses. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 47(2): 280-284.
- UHLIG, H. 1998. Industrial Enzymes And Their Applications. John WileyandSons, Inc. New York.

- VIJAYALAXMI, S., APPAIAH, K. A., JAYALAKSHMI, S.K., MULIMANI, V.H., and SREERAMULU, K. 2013. Production of Bioethanol from Fermented Sugars of Sugarcane Bagasse Produced by Lignocellulolytic Enzymes of *Exiguobacterium sp.* VSG-1. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(1), 246-260.
- WISEMAN, A. 1987. Handbook Of Enzyme Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, 274-373 p.
- WARD, O.P., QIN, W.M., DHANJOON, J., YE, J., and SINGH, A. 2006. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in applied microbiology*, 58, 1-75.
- WICKLOW, D.T., MCALPIN, C.E., and PETERSON, S.W., 2002. Common genotypes (RFLP) within a diverse collection of yellow-green aspergilli used to produce traditional Oriental fermented foods. *Mycoscience*, 43(4): 289-297.
- WOJCIECHOWSKI, A. L., NITSCHKE, S., PANDEY, A., and SOCCOL, C.R. 2002. Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(3): 393-400.
- WU, M., TANG, C., LI, J., ZHANG, H., and GUO, J. (2011). Bimutation Breeding of *Aspergillus niger* strain for enhancing β -mannanase production by solid-state fermentation. *Carbohydrate research*, 346(14): 2149-2155.
- YANG, P., LI, Y., WANG, Y., MENG, K., LUO, H., YUAN, Y., BAI, Y., ZHAN, Z., YAO, B. 2009a. A novel β -mannanase with high specific activity from *Bacillus circulans* CGMCC1554: gene cloning, expression and enzymatic characterization. *App Biochem Biotechnology* 159: 85–94
- YAZICIOĞLU, T., ÖMEROĞLU, S. ve CERİTOĞLU, A. 1983. Keçiboynuzundan pekmez ve içki ispiertosu yapılması üzerinde bir araştırma. TÜBİTAK Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Enstitüsü Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümü. Yayın No:67.
- YIN, L.J., TAI, H.M., JIANG, S.T. 2012. Characterization of Mannanase from a Novel Mannanase-Producing Bacterium. *J. Agric Food Chem*, 60: 6425-31.
- ZHAO, W., ZHENG, J., and ZHOU, H. B. 2011. A thermotolerant and cold-active mannan endo-1, 4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* CBS 513.88: Constitutive overexpression and high-density fermentation in *Pichia pastoris*. *Bioresource technology*, 102(16): 7538-7547.
- ZHENG, J., ZHAO, W., GUO, N., LIN, F., TIAN, J., WU, L., and ZHOU, H. 2012. Development of an industrial medium and a novel fed-batch strategy for high-level expression of recombinant β -mananase by *Pichia pastoris*. *Bioresource technology*, 118: 257-264.

ZHENG, J., ZHAO, W., GUO, N., LIN, F., TIAN, J., WU, L., ZHOU, H. 2012. Development of an industrial medium and a novel fed-batch strategy for high-level expression of recombinant β -mannanase by *Pichia pastoris*. *Bioresource Technology*; 118: 257-64

7.EKLER

Ek 1. Azot Kaynağı Olarak Değerlendirilen Bitkisel, Hayvansal Materyaller Ve Azot Oranları



M. Zeini(~%14) Kırmızı Mercimek(~%4) Pamuk Tohumu(~%6) Soya Proteini(~%14)

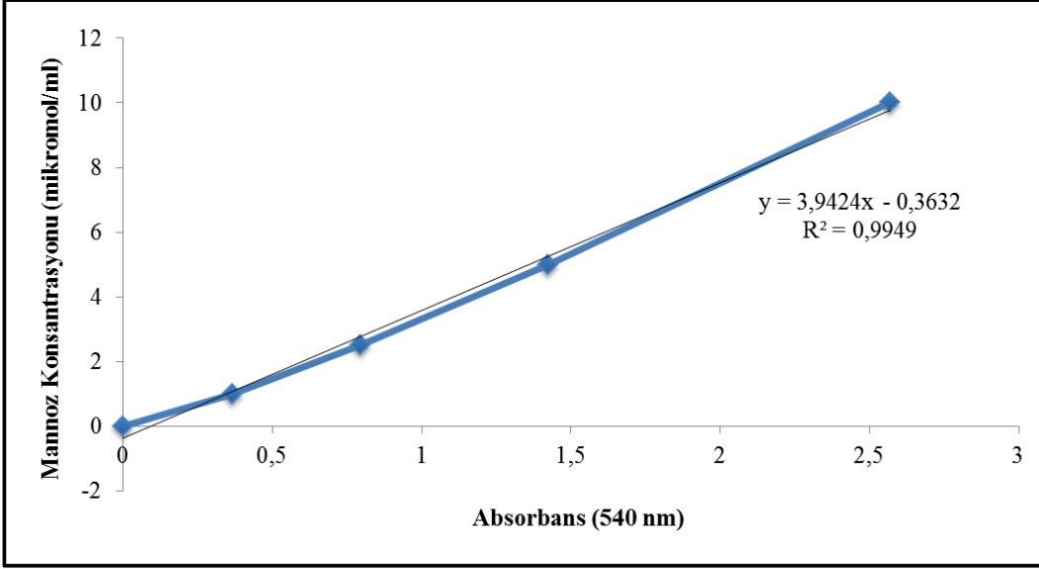


Balık Unu (~%10,4) Et-Kemik Unu (~%8) Tüy Unu (~%13,5)

Ek 2. Mısır Zeinin Flask Çalışmalarındaki Görüntüsü



Ek 3. Kalıntı Şeker Miktarın Hesaplandığı Standart MannoZ Kurvesi



ÖZGEÇMİŞ

Ercan KARAHALİL, 1989 yılında Kastamonu'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2007 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. Eylül 2012'de Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.