

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

**MANNANAZ ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASINDA YENİ TEKNİK VE
STRATEJİLERİN DENENMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Ercan YATMAZ

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2016

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

**MANNANAZ ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASINDA YENİ TEKNİK VE
STRATEJİLERİN DENENMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Ercan YATMAZ

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FDK-2015-681 numaralı proje ve TÜBİTAK-1001 112O167 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

2016

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MANNANAZ ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASINDA YENİ TEKNİK VE
STRATEJİLERİN DENENMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Ercan YATMAZ

DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 26/07/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İrfan TURHAN

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. Mehmet Durdu ÖNER

Yrd. Doç. Dr. Ersin AKINCI

Yrd. Doç. Dr. Zelal POLAT

Z. Zelal
M. İnan
M. Durdu Öner
E. Akinci
Z. Polat

ÖZET

MANNANAZ ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASINDA YENİ TEKNİK VE STRATEJİLERİN DENENMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Ercan YATMAZ

Doktora tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İrfan TURHAN

Temmuz 2016, 95 Sayfa

Galaktomannanlardaki β -1,4 mannoz bağlarını parçalayan β -mannanaz enziminin ana üreticisi farklı *Aspergillus* türlerinden oluşan filamentli fungus grubunun üyeleridir. Enzim rahatlıkla katı kültür besiyerinde veya erlenmayerlerde üretilebilmektedir. Ancak bu tekniklerle üretim sınırlı kalmaktadır. Üstelik mikroorganizma katma değeri yüksek bu ürünleri üretirken havalandırmaya da ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle de biyoreaktörlerin *Aspergillus* fermentasyonlarında kullanılması gerekmektedir. Ancak küflerin aşırı hif gelişimine bağlı olarak biyoreaktörlerde kontrolü oldukça zordur.

Bu çalışmada, magnezyum silikat ve alüminyum oksit mikropartikülleri kullanılarak rekombinant *Aspergillus sojae*'nin hücre gelişiminin keçiyoynuzu ekstraktı besiyerinde kontrolünün sağlanması ve β -mannanaz enzimi üretiminin artırılması amaçlanmıştır. Her iki mikropartikül de erlenmayer ve biyoreaktör fermentasyonlarında hücre gelişimini arttırmış ve kontrolünü sağlamıştır. Ayrıca β -mannanaz enziminin fermentasyon sıvısından kısmi saflaştırılması, liyofilizasyonu ve enzim karakterizasyonu (enzimin çalışma şartları, farklı substratlar varlığında K_m ve V_{max} değerleri, iyon inhibisyonu vs) da gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle farklı oranlarda alüminyum oksit ve magnezyum silikat içeren besiyerleri ile çalkalamalı inkübatör denemeleri gerçekleştirilmiştir. En yüksek β -mannanaz aktivitesi değeri 568,72 U/ml olarak 5 g/L magnezyum silikat ilave edilen erlenmayer denemesinde elde edilmiştir. Besiyerine ilave edilen mikropartikül konsantrasyonu arttıkça hücre pellet çapı değerleri düşmüştür. Ayrıca 10 g/L'den daha fazla magnezyum silikat ilavesi durumunda hücre gelişimi pellet yapı yerine pellet/miselyum karışık tipte gerçekleşmiştir.

Biyoreaktör denemelerinde ise en yüksek β -mannanaz aktivitesi değeri 643,16 U/ml olarak 3 g/L magnezyum silikat ilave edilen besiyerinde hesaplanmıştır. Mikropartikülle gerçekleştirilen tüm biyoreaktör denemeleri ise kontrol fermentasyonundan daha yüksek sonuçlar vermiştir. Ayrıca kontrol fermentasyonu hariç tüm mikropartiküllü biyoreaktör denemelerinde fermentasyon sonlandırılıncaya kadar hif gelişimi kolaylıkla kontrol edilmiştir. Biyoreaktörde gerçekleştirilen denemelerde hiçbir mikropartikül konsantrasyonunda hücre gelişim tipi pellet yapıdan pellet/miselyum karışık tipine dönüşmemiştir.

Kısmi saflaştırma işlemi ise ultrafiltrasyon ile gerçekleştirilmiş ve enzim solüsyonu başarıyla liyofilize edilmiştir. Enzim karakterizasyonu da başarıyla gerçekleştirilmiş ve optimum çalışma pH ve sıcaklık aralığı sırasıyla pH 5-6 ve 50-60°C

olarak belirlenmiştir. Keçiboynuzu gamı da β -mannanaz enzimi için en iyi substrat olarak belirlenmiştir. Keçiboynuzu gamının substrat olarak kullanıldığı denemede V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 2719 U/mg ve 2,26 μ mol/ml olarak hesaplanmıştır. Son olarak farklı reaktiflerin enzim çalışmasına etkisi belirlenmiştir.

Bu çalışma sonucunda β -mannanaz enzimi üretiminde karıştırmalı tip tank biyoreaktör, kısmi saflaştırma işlemlerinde ise ultrafiltrasyon sisteminin kullanılabilceği açıkça gösterilmiştir. Dolayısıyla sonuçlar rekombinant *Aspergillus sojae* ile biyoreaktörde β -mannanaz enziminin üretiminde farklı mikropartikül ajanlarını içeren keçiboynuzu ekstraktının substrat olarak kullanılabilceğini göstermiştir. Bu tekniğin diğer filamentli küflerin büyük ölçekli biyoreaktör sistemlerinde gerçekleştirilecek fermentasyonlarda da kullanılabilceği ve katma değeri yüksek enzimlerin üretilebileceği düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Rekombinant *Aspergillus sojae*, mikropartikül, alüminyum oksit, magnezyum silikat, enzim karakterizasyonu, keçiboynuzu ekstraktı, β -mannanaz

JÜRİ: Doç. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)

Prof. Dr. Mehmet İNAN

Prof. Dr. Mehmet Durdu ÖNER

Yrd. Doç. Dr. Ersin AKINCI

Yrd. Doç. Dr. Zelal POLAT

ABSTRACT

DIFFERENT TECHNIQUES AND STRATEGIES TO PRODUCE AND PARTIAL PURIFICATION OF MANNANASE

Ercan YATMAZ

PhD Thesis in Food Engineering
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İrfan TURHAN
July 2016, 95 Pages

β -mannanases are mainly products of filamentous fungi including different *Aspergillus* species, and can degrade the β -1,4-mannose linkages of galactomannans. It could be easily produced by solid-state fermentation or flask fermentation. However amount of the products are limited. Moreover these microorganisms need air to produce these value-added products. So bioreactors must be used for *Aspergillus* fermentation. However controlling of the filamentous fungi in a broth is very difficult because of high hyphae development.

This study was undertaken to enhance β -mannanase production using magnesium silicate and aluminum oxide as the microparticles, which control cell morphology of recombinant *Aspergillus sojae* in carob extract medium. Both microparticles improved and controlled fungal growth in carob pod extract medium in shake flask and stirred tank bioreactor fermentations. It was also carried out that the partial purification of β -mannanase from fermentation broth, lyophilization, and characterization of the enzyme (working conditions, K_m and V_{max} values of some substrates, reagent inhibition etc.).

First of all, shake flask fermentations were performed by different amounts of aluminum oxide or magnesium silicate in the fermentation media. The highest β -mannanase activity was found as 568,7 U/ml with 5 g/L of magnesium silicate for shake flask fermentations. Increase in microparticle concentration resulted in decrease at the pellet size diameter. Furthermore, more than 10 g/L of magnesium silicate addition changed the filamentous fungi growth type from pellet to pellet/mycelium mixture.

The highest β -mannanase activity for bioreactor fermentations was 643,16 U/ml for 3 g/L of magnesium silicate. And all of the microparticle bioreactor assays were resulted higher β -mannanase activity than control fermentation. All of the fermentation assays except control fermentation could easily control the hyphae development until the end of the fermentation. None of the microparticle concentration changed the microorganism growth type from pellet to pellet/mycelium mix type for bioreactor assays.

Partial purification was completed by ultrafiltration system, and carefully lyophilized. Enzyme characterization was carefully done, and optimum working pH and temperature range were determined to be from pH 5 to pH 6, and 50°C to 60°C respectively. It was also found that locust bean gum was the best substrate for β -mannanase, V_{max} and K_m values for locust bean gum was calculated to be 2719 U/mg, and 2,26 μ mole/ml. Finally effects of reagents on working on β -mannanase enzyme were determined.

As the result, this research was clearly showed that β -mannanase enzyme could be produced in a stirred tank bioreactor with microparticle addition and partial purification could be performed by ultrafiltration system. So results showed that carob pod extract medium with different microparticle agents was a good substrate for recombinant *Aspergillus sojae* to produce β -mannanase enzyme. This technique can also be used for the other filamentous fungi microorganisms to produce the valuable enzymes in higher bioreactor plant systems.

KEYWORDS: Recombinant *Aspergillus sojae*, microparticle, aluminum oxide, magnesium silicate, enzyme characterization, carob pod extract, β -mannanase

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

ÖNSÖZ

İnsan nüfusunun her geçen gün arttığı dünyamızda her türlü tarımsal ürün ve atığın en etkin şekilde kullanımında biyoteknoloji alanında gerçekleştirilmiş gelişmeler önemli bir yer tutmaktadır. Gelişen biyoteknolojik uygulamalar sayesinde tarımsal-gıda atıklarının değerlendirilerek katma değeri yüksek ürünlerin üretilmesiyle hem bu atıkların imha problemi ortadan kalkmakta hem de üretim maliyetleri düşürülmektedir. Bu kapsamda biyoteknolojik yollarla üretilen ürünlerden birisi de β -mannanaz enzimidir. β -mannanaz enzimi hayvan rasyonlarının zenginleştirilmesinden kahve üretimine, kâğıt endüstrisinden temizlik ürünlerine kadar birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Böylesine fazla kullanım alanı olan bir enzimin biyoteknolojik yöntemlerle üretiliyor olması ürünün yılın her zamanı teminini sağlamaktadır.

Bu çalışma kapsamında değerlendirme olanakları kısıtlı olan keçiboynuzu meyvesinin, yüksek şeker içeriği nedeniyle rekombinant *Aspergillus sojae* ile β -mannanaz üretimi, enzimin kısmi olarak saflaştırılması, enzim çalışma şartlarının belirlenmesi, enzimin substrat spesifikliği, K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında öncelikle mikropartikül erlenmayer konsantrasyonları belirlenmiş ve seçilen mikropartikül konsantrasyonlarında yarı-kesikli beslemeli biyoreaktör denemeleri gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktör denemeleri pH ve havalandırmanın etkisi belirlenerek sonlandırılmış ve optimum üretim şartları belirlenmiştir. Üretim yönteminin belirlenmesinden sonra santrifüj ve ultrafiltrasyonun ham enzim solüsyonunun kısmi olarak saflaştırılmasına etkisi belirlenmiştir. Son olarak enzimin çalışma şartları ve substrat spesifikliği ortaya konmuştur.

Fermentasyonla enzimin üretiminden, saflaştırılmasına ve enzimin spesifikasyonlarına kadar tüm basamakları bünyesinde barındıran bu tez çalışmasının farklı enzimlerin üretimine de ışık tutacağı düşünülmektedir. Gıda ve diğer endüstrilerde kullanılan enzimlerin daha fazlasının ülkemizde üretilmeye başlanması ile hem yeni iş imkânları ortaya çıkacak hem de katma değeri yüksek ürünler sayesinde ülke ekonomisi güçlenecek ve dışa bağımsızlığımız biraz daha azalacaktır.

Bana bu konuyu araştırma fırsatı veren, çalışmalarım sırasında bana olan güveni ile beni cesaretlendiren, fikirleri ile her zaman yol gösterici olan, her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. İrfan TURHAN'a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) teşekkürü bir borç bilirim.

Rekombinant *Aspergillus sojae* gen transferi çalışmalarını yürüten Dr. Gökhan DURUKSU ve mikroorganizma temininde katkılarından dolayı Prof. Dr. Zümrüt BEGÜM ÖGEL'e teşekkür ederim. Çalışmaya materyal desteği sağlayan Yenigün A.Ş. yetkililerine, çalışma süresince aynı laboratuvar ortamını paylaştığım çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Mustafa GERMEÇ, Ercan KARAHALİL, Nour Ben BADER, Kübra TARHAN, Fadime DEMİREL ve Merve ILGIN'a teşekkür ederim. Ayrıca bu zorlu süreçte desteklerini esirgemeyen Mert KARAOĞLAN, Araş. Gör. Fatma ERSÖZ, Doç. Dr. Bahattin ÖZDEMİR, Doç. Dr. Ebru İÇİGEN, Öğr. Gör. Serdar ALTUN SABAN, Öğr. Gör. Özkan ERDEM, Öğr. Gör. Özlem YAY ve Bayram DİREK'e teşekkür ederim.

Çalışmamı mali yönden destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine, TÜBİTAK 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projeleri Destekleme programına teşekkür ederim. Doktoram süresince 2211 Yurtiçi Doktora Burs Programı kapsamında yurtiçi araştırma bursu ile destekleyerek katkıda bulunan TÜBİTAK-BİDEB'e ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her evresinde bana inanan, güvenen ve kayıtsız şartsız destekleyen aileme ve eşim Hanife Aydan YATMAZ'a teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	3
2.1. Keçiboynuzu (<i>Ceratonia siliqua</i> L.), Meyvesi, Bileşimi ve Kullanım Alanları ...	3
2.2. Fermentasyon Mikrobiyolojisi.....	6
2.2.1. Mikrobiyal çeşitlilik ve gelişim özellikleri.....	6
2.3. Mikroorganizmaların Gelişmeleri İçin Gerekli Maddeler.....	8
2.4. Mikroorganizmalarda Beslenme Tipleri.....	9
2.5. Fermentasyon Yöntemleri.....	9
2.5.1. Kesikli fermentasyon.....	9
2.5.2. Sürekli fermentasyon.....	9
2.5.3. Yarı-kesikli fermentasyon.....	10
2.6. Mannanların Genel Özellikleri.....	11
2.7. Mannanların Enzimatik Hidrolizi.....	13
2.8. β -Mannanazlar (EC 3.2.1.78).....	14
2.9. β -mannanaz Üreten Mikroorganizmalar.....	14
2.10. β -mannanaz Kullanım Alanları.....	19
2.10.1. Mannooligosakkarit (MOS) üretimi.....	19
2.10.2. İlaç endüstrisi uygulamaları.....	19
2.10.3. Kahve üretiminde β -mannanaz kullanımı.....	19
2.10.4. Hayvan yemlerinin zenginleştirilmesinde MOS'ların kullanımı.....	20
2.10.5. Petrol-gaz kuyusu drenajlarında ve biyoyakıt üretiminde β -mannanaz kullanımı.....	20
2.10.6. Kâğıt endüstrisinde ve deterjan formülasyonlarında β -mannanaz kullanımı.....	21
2.11. Fermentasyonlarda Mikropartikül Kullanımı.....	21
2.12. Yapılmış Çalışmalar.....	24
3. MATERYAL VE METOT.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.2. Keçiboynuzu Ekstraktı Eldesi.....	26
3.3. Kullanılan Mikroorganizma.....	26
3.4. β -mannanaz Üretimi ve Saflaştırılması Deneme Deseni.....	26
3.5. Biyoreaktör Denemeleri İçin Mikropartikül Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	27
3.6. Biyoreaktörde Yarı-Kesikli Beslemeli Fermentasyon.....	28
3.7. Santrifüj ve Ultrafiltrasyon.....	29
3.8. β -mannanaz Aktivitesi Analizi.....	29
3.9. Kalıntı Şeker Analizi.....	30
3.10. Toplam Protein Analizi.....	31
3.11. Görüntüleme Analizi.....	31
3.12. SDS-PAGE Analizi.....	32

3.13.Enzimin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	33
3.14.Enzimin Substrat Spesifikliğinin ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	34
3.15.Farklı Reaktiflerin Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi.....	34
3.16.β-mannazın De-glikozilasyonu.....	34
3.17.Dondurarak Kurutma.....	34
3.18.Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	35
3.19.İstatistiksel Analizler.....	35
4. BULGULAR	37
4.1. Çalkalamalı İnkübatör Kontrol Fermentasyonu.....	37
4.2. Çalkalamalı İnkübatör Alüminyum Oksit Denemeleri	38
4.3. Çalkalamalı İnkübatör Magnezyum Silikat Denemeleri	41
4.4. Çalkalamalı İnkübatör Kontrol ve Mikropartiküllü Fermentasyonların Karşılaştırılması	44
4.5. Biyoreaktör Kontrol Fermentasyonu.....	47
4.6. Biyoreaktör Alüminyum Oksit Denemeleri	50
4.6.1. Biyoreaktörde 1 g/L alüminyum oksit ile fermentasyon.....	50
4.6.2. Biyoreaktörde 10 g/L alüminyum oksit ile fermentasyon.....	53
4.6.3. Biyoreaktörde 15 g/L alüminyum oksit ile fermentasyon.....	55
4.7. Biyoreaktör Magnezyum Silikat Denemeleri.....	57
4.7.1. Biyoreaktörde 1 g/L magnezyum silikat ile fermentasyon	57
4.7.2. Biyoreaktörde 3 g/L magnezyum silikat ile fermentasyon	59
4.7.3. Biyoreaktörde 5 g/L magnezyum silikat ile fermentasyon	61
4.8. Biyoreaktör Denemelerinin Karşılaştırılması.....	63
4.9. pH ve Havalandırmanın Fermentasyon Üzerine Etkisi.....	64
4.10.Farklı Santrifüj ve Ultrafiltrasyon Uygulamalarının Saflaştırma Üzerine Etkisi	67
4.11.Enzimin Optimum Çalışma pH'sının Belirlenmesi	69
4.12.Enzimin Optimum Çalışma Sıcaklığının Belirlenmesi	70
4.13.Enzimin Substrat Spesifikliğinin ve Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	70
4.14.Farklı Reaktiflerin Enzim Aktivitesine Etkisi.....	72
4.15.Fermentasyon ve Ultrafiltrasyon Örneklerinde SDS-PAGE Sonuçları	72
4.16.β-mannazın De-glikozilasyonu.....	73
4.17.Dondurarak Kurutma.....	74
5. TARTIŞMA.....	76
6. SONUÇ	78
7. KAYNAKLAR	80
8. EKLER.....	87
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μg	: mikrogram
$^{\circ}\text{Bx}$: Briks
mm	: milimetre
dk	: dakika
g	: gram
kg	: kilogram
L	: litre
μmol	: mikromol
μm	: mikrometre
mM	: milimol
mg	: miligram
ml	: mililitre
N	: Normal
nm	: nanometre
sa	: saat
%	: yüzde
kDa	: kilodalton
$^{\circ}\text{C}$: santigrat derece
nkat	: nanokat
w/v	: ağırlık/hacim
U	: Unit

Kısaltmalar

A.Ş.	: Anonim Şirketi
ATCC	: American Type Culture Collection
NRRL	: Northern Regional Research Laboratory
d/d	: devir/dakika
l/d	: litre/dakika (1 dakikada beslenen havanın litre olarak miktarı)
DNSA	: Dinitro salisilik asit
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü- Food and Agricultural Organization of the United Nations
Fe-S	: demir sülfür
CO_2	: Karbondioksit
SO_4^{2-}	: Sülfat
HS^-	: Hidrojen sülfür iyonu
DHA	: Dokosaheksaenoik asit
KA	: kuru ağırlık
pH	: Hidrojen iyonlarınıneksi (-) logaritması
t	: zaman
S	: Substrat
P	: Ürün
S_1	: Fermentasyon sonundaki substrat miktarı
S_0	: Fermentasyon başlangıcındaki substrat miktarı

P_1	: Fermentasyon sonundaki ürün miktarı
P_0	: Fermentasyon başlangıcındaki ürün miktarı
K_m	: Michaelis Menten sabiti
V_{max}	: Maksimum enzim hızı
KMS	: Karboksimetilselüloz
KBG	: Keçiboynuzu gamı
PDA	: Patates Dekstroz Agar (Potato Dextrose Agar)
MOS	: Mannooligosakkarit
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TGS	: Tris-Glisin-SDS
TG	: Tris-Glisin
APS	: Amonyum peroksidisülfat
BSA	: Bovine Serum Albümin
PEG	: Polietilen glikol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Keçiboynuzu ve çekirdekleri; aşılı (solda), yabani (sağda)	4
Şekil 2.2. Keçiboynuzundan elde edilen son ürünlerin üretim aşamaları	5
Şekil 2.3. Karşılaştırmalı rRNA gen dizilemesiyle tanımlanmış filogenetik yaşam ağacı.....	7
Şekil 2.4. Farklı mannan formları ve bu yapılara etki eden enzimler (A: lineer mannan, B: mannoz oligosakkarit, C: yan grup içeren galaktomannan, D: lineer glukomannan, E: glukomannoz oligosakkarit, F: yan grup içeren galaktoglukomannan).....	12
Şekil 2.5. Titanyum silikon oksit mikropartikülünün <i>Aspergillus niger</i> SKAn1015 morfolojisine etkisi	22
Şekil 2.6. <i>Aspergillus niger</i> ANip7-MCS-gfp2'nin farklı titanyum silikon oksit konsantrasyonlarında GFP üretiminde metabolik aktivite zonlarının karşılaştırılması (Konfokal lazer tarama mikroskobu).....	23
Şekil 3.1. Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i> β -mannanaz üretimi ve saflaştırılmasında kullanılan deneme deseni	27
Şekil 4.1. Kontrol fermentasyonu şeker tüketimi ve β -mannanaz aktivitesi değerleri	37
Şekil 4.2. Kontrol fermentasyonu hücre gelişim morfolojisi	38
Şekil 4.3. Alüminyum oksit ve kontrol erlenmayer fermentasyonlarına ait β -mannanaz aktivitelerinin ve hücre çaplarının karşılaştırılması	39
Şekil 4.4. Kontrol ve alüminyum oksit erlenmayer denemeleri sekizinci gün hücre görüntüleri	41
Şekil 4.5. Magnezyum silikat ve kontrol erlenmayer fermentasyonlarına ait β -mannanaz aktivitelerinin ve hücre çaplarının karşılaştırılması	43
Şekil 4.6. Kontrol ve magnezyum silikat erlenmayer denemeleri sekizinci gün hücre görüntüleri	44
Şekil 4.7. Alüminyum oksit erlenmayer denemelerinde tüketilen birim şeker karşılık elde edilen birim enzim aktivitesi.....	46
Şekil 4.8. Magnezyum silikat erlenmayer denemelerinde tüketilen birim şeker karşılık elde edilen birim enzim aktivitesi.....	47
Şekil 4.9. Biyoreaktör kontrol fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi.....	49

Şekil 4.10. Biyoreaktör kontrol fermentasyonu yoğun hücre gelişimi (Hücre görüntüleri: Ek 3).....	50
Şekil 4.11. 1 g/L alüminyum oksit biyoreaktör fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi.....	52
Şekil 4.12. Biyoreaktör 1 g/L alüminyum oksit fermentasyonu 1 (solda) ve 9. gün hücre görüntüleri (Ek 4)	53
Şekil 4.13. 10 g/L alüminyum oksit biyoreaktör fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi	54
Şekil 4.14. Biyoreaktör 10 g/L alüminyum oksit fermentasyonu 1 (solda) ve 9. gün hücre görüntüleri (Ek 5)	55
Şekil 4.15. 15 g/L alüminyum oksit biyoreaktör fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi	56
Şekil 4.16. Biyoreaktör 15 g/L alüminyum oksit fermentasyonu 1 (solda) ve 9. gün hücre görüntüleri (Ek 6)	56
Şekil 4.17. 1 g/L magnezyum silikat biyoreaktör fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi	58
Şekil 4.18. Biyoreaktör 1 g/L magnezyum silikat fermentasyonu 1 (solda) ve 9. gün hücre görüntüleri (Ek 7)	58
Şekil 4.19. 3 g/L magnezyum silikat biyoreaktör fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi	60
Şekil 4.20. Biyoreaktör 3 g/L magnezyum silikat fermentasyonu 1 (solda) ve 9. gün hücre görüntüleri (Ek 8)	61
Şekil 4.21. 5 g/L magnezyum silikat biyoreaktör fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi	62
Şekil 4.22. Biyoreaktör 5 g/L magnezyum silikat fermentasyonu 1 (solda) ve 9. gün hücre görüntüleri (Ek 9)	63
Şekil 4.23. pH kontrollü biyoreaktör denemeleri enzim aktivitesi değişimleri	65
Şekil 4.24. pH kontrollü biyoreaktör denemeleri hücre çapı değişimleri	65
Şekil 4.25. Farklı havalandırma oranlarında gerçekleştirilen pH kontrolsüz biyoreaktör denemeleri enzim aktivitesi değişimleri.....	66
Şekil 4.26. Farklı havalandırma oranlarında gerçekleştirilen pH kontrolsüz biyoreaktör denemeleri hücre çapı değişimleri	67

Şekil 4.27. Farklı pH'larda β -mannanaz enzimi aktivite değişimi.....	69
Şekil 4.28. Farklı sıcaklıklarda β -mannanaz enzimi aktivite değişimi	70
Şekil 4.29. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan substratlarda enzimin aktivite değişimi	71
Şekil 4.30. SDS-PAGE analiz sonuçları	73
Şekil 4.31. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası örneğin EndoH enzimi ile muamelesini gösteren SDS-PAGE görüntüsü. M, Marker; EndoH-, muamele edilmemiş örnek; EndoH+, muamele edilmiş örnek.....	74
Şekil 4.32. Liyofilizasyon örnekleri (Soldan sağa sırasıyla, kontrol, Sakkaroz, Jelatin, BSA, PEG).....	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. FAO verilerine göre yıllık toplam keçiyoynuzu üretim miktarları	3
Çizelge 2.2. β -mannanaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar ve fermentasyon şartları	16
Çizelge 2.3. Rekombinant suşlar, β -mannanaz üretim miktarları ve fermentasyon şartları	18
Çizelge 3.1. Keçiyoynuzu besiyeri bileşimi	26
Çizelge 4.1. Alüminyum oksit erlenmayer denemelerine ait şeker tüketim sonuçları	38
Çizelge 4.2. Alüminyum oksit erlenmayer denemelerine ait β -mannanaz aktivitesi sonuçları	39
Çizelge 4.3. Magnezyum silikat erlenmayer denemelerine ait şeker tüketim sonuçları	42
Çizelge 4.4. Magnezyum silikat erlenmayer denemelerine ait β -mannanaz aktivitesi sonuçları	42
Çizelge 4.5. Alüminyum oksit erlenmayer denemelerine ait kinetik değerler	45
Çizelge 4.6. Magnezyum silikat erlenmayer denemelerine ait kinetik değerler	46
Çizelge 4.7. Biyoreaktör kontrol fermentasyonuna ait sonuçlar	48
Çizelge 4.8. Biyoreaktör 1 g/L alüminyum oksit fermentasyonuna ait sonuçlar	51
Çizelge 4.9. Biyoreaktör 10 g/L alüminyum oksit fermentasyonuna ait sonuçlar	53
Çizelge 4.10. Biyoreaktör 15 g/L alüminyum oksit fermentasyonuna ait sonuçlar	55
Çizelge 4.11. Biyoreaktör 1 g/L magnezyum silikat fermentasyonuna ait sonuçlar	57
Çizelge 4.12. Biyoreaktör 3 g/L magnezyum silikat fermentasyonuna ait sonuçlar	59
Çizelge 4.13. Biyoreaktör 5 g/L magnezyum silikat fermentasyonuna ait sonuçlar	61
Çizelge 4.14. Biyoreaktör denemelerine ait kinetik parametreler	63
Çizelge 4.15. pH'nın β -mannanaz fermentasyonu üzerine etkisi	64
Çizelge 4.16. Havalandırmanın β -mannanaz fermentasyonu üzerine etkisi	66

Çizelge 4.17. Santrifüj denemeleri enzim aktivitesi ve saflaştırma katsayısı değerleri.....	68
Çizelge 4.18. Ultrafiltrasyon öncesi ve sonrası β -mannanaz enzimi.....	68
Çizelge 4.19. Farklı substratlara ait V_{max} ve K_m değerleri.....	71
Çizelge 4.20. Farklı reaktifler ve enzim aktivitesi değişimi.....	72
Çizelge 4.21. Keçiboynuzu ekstratından elde edilen besiyerinin farklı solüsyonlarda hazırlanan ultrafiltre edilmiş örneklerinin liyofilizasyonu	75
Çizelge 5.1. β -mannanaz üretim sonuçlarının karşılaştırılması	76

1. GİRİŞ

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua L.*), dört mevsim yaprağını dökmeyen, sağlam dallara ve kalın bir gövdeye sahip Akdeniz orijinli bir bitkidir (Battle ve Tous 1997). Bilimsel adı *Ceratonia siliqua* olan keçiboynuzu meyvesinin adı ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir ve ülkemizde harnup olarak bilinmektedir (Battle ve Tous 1997). Üretim miktarı yıllara göre değişiklik göstermekle birlikte üretimin %90'dan fazlasını İspanya, İtalya, Fas, Portekiz, Yunanistan ve Türkiye karşılamaktadır. Keçiboynuzu meyvesi üretildiği ülkelerde öncelikli olarak keçiboynuzu gamı üretiminde, hayvan rasyonlarında ve insan beslenmesinde kullanılmaktadır (Battle ve Tous 1997). Çekirdeği gam üretiminde kullanılan keçiboynuzu ülkemizde geleneksel yöntemlerle keçiboynuzu pekmezi üretiminde kullanılmaktadır. Batılı ülkelerde ise pekmez üretiminin yanı sıra meyvenin etli kısmı kavru olarak ve değirmende öğütülerek üretilen keçiboynuzu unu zengin besinsel içeriği nedeniyle kakao ikamesi olarak değerlendirilmektedir (Yousif ve Alghzawi 2000). Bu kullanımların yanı sıra son yıllarda keçiboynuzu şurubu veya likörü (alkolsüz) eczanelerde gıda takviyesi olarak satılmaktadır. Ayrıca keçiboynuzundan insülin direncine karşı etkili olan D-pinitol ve türevleri ekstrakte edilmektedir (Oziyci vd 2015).

Tüm bu kullanım alanlarının yanı sıra son yıllarda yapılan çalışmalar yüksek şeker içeriğine sahip keçiboynuzu ekstraktının fermentasyonlarda da kullanılabilirliğini ortaya koymuştur. Dünya'da özellikle enerji ihtiyacının çözülmesinde birçok şeker içeriği yüksek endüstriyel bitki (şeker kamışı ve şeker pancarı gibi) üretilmektedir. Bu endüstriyel bitkilerin yanı sıra tarımsal ürün artıkları da fermentasyonlarda kullanılmaktadır. Burada temel amaç en büyük ekonomik girdi olan substrat maliyetini en aza indirmektir. Ülkemiz ormanlarının doğal üyelerinden biri olan keçiboynuzu ağaçlarının meyvesinden elde edilen ekstrakt yüksek şeker içeriğinin yanı sıra mineral yönünden de oldukça zengindir. Böylesine değerli bir ürünün fermentasyonlarda kullanılabilirliği bilimsel çalışmalarla da ortaya konmuştur.

Biyoteknolojik olarak üretilen ürünler arasında biyoetanol, laktik asit, antibiyotikler, insülin, enzimler vs sayılabilir. Bu ürünlerin her biri oldukça önemli kullanım alanlarına sahip olmakla birlikte gıda ve diğer endüstri dallarında en önemli biyoteknolojik ürün gruplarından birisi de enzimlerdir. Enzimler ilk olarak çeşitli ekstraksiyon metodlarıyla bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilmekteydi. Ancak enzimlere olan ihtiyacın her geçen gün artması yeni üretim tekniklerinin geliştirilmesini gerektirmiştir. Bu yöntemlerden birisi doğal veya rekombinant suşlarla biyoteknolojik olarak enzimlerin üretilmesidir. Doğal ve rekombinant suşlarla üretilen enzimlerden birisi de β -mannanazlardır. β -mannanazlar hayvan rasyonlarının zenginleştirilmesinden kahve üretimine, kâğıt endüstrisinden temizlik ürünlerine kadar birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Kullanım alanı bu kadar geniş olan β -mannanazlar mayalar ve küfler yardımıyla üretilmektedir. Mayalarla gerçekleştirilen üretimler büyük ölçekli olarak sorunsuz gerçekleştirilirken küflerle gerçekleştirilen denemeler erlenmayer ölçeklerinde kalmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında rekombinant *Aspergillus sojae*'nin biyoreaktörde kontrollü bir şekilde geliştirilmesi, β -mannanaz enzimi üretilmesi ve üretilen enzimden santrifüj, ultrafiltrasyon ve liyofilizasyon yöntemleriyle yığın (bulk) enzim üretimi

amaçlanmıştır. Ayrıca üretilen enzimin çalışma şartlarının belirlenmesi, karakterizasyonu ve substrat spesifikliğinin ortaya konması amacıyla K_m ve V_{max} değerleri de hesaplanması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.), Meyvesi, Bileşimi ve Kullanım Alanları

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.), dört mevsim yaprağını dökmeyen, sağlam dallara ve kalın bir gövdeye sahip Akdeniz orijinli bir bitkidir (Battle ve Tous 1997). Bilimsel adı *Ceratonia siliqua* olan keçiboynuzu meyvesinin adı ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. İspanya'da *algarrobo* veya *garrofero*, İtalya'da *carrubo*, Fransa'da *caroubier*, Almanya'da *karubenbaum*, Portekiz'de *alfarrobeira*, Yunanistan'da *charaoupi* ve ülkemizde ise *harnup* olarak bilinmektedir (Battle ve Tous 1997). Üretim miktarı yıllara göre değişiklik göstermekle birlikte 2003-2013 yıllarına bakıldığında yıllık ortalama 171221 ton keçiboynuzu üretildiği görülmektedir. Bu üretimin ise %90'dan fazlasını sırasıyla İspanya, İtalya, Fas, Portekiz, Yunanistan ve Türkiye karşılamaktadır (Çizelge 2.1) (FAO 2015).

Çizelge 2.1. FAO verilerine göre yıllık toplam keçiboynuzu üretim miktarları (FAO 2015)

	Ülkelere Göre Yıllık Keçiboynuzu Üretim Miktarları (ton)							
	İspanya	İtalya	Fas	Portekiz	Yunanistan	Türkiye	Kıbrıs	Dünya
2003	70100	18637	25000	13764	14789	14000	6550	170664
2004	91400	19060	26962	16119	14594	14000	6250	196794
2005	59900	31665	25000	13902	14815	12000	6942	170736
2006	56100	26110	23874	22000	14506	12388	5650	168947
2007	56100	32784	25055	20000	15000	12161	3839	173580
2008	60795	31224	19472	21000	15822	12097	6519	174011
2009	53200	30020	20489	21500	14465	14413	3514	164734
2010	56286	25337	20000	22452	15105	14172	10560	170552
2011	38380	44749	20500	23000	20901	13972	12725	181171
2012	40000	30841	20500	23000	22000	14218	9123	166848
2013	40000	9445	20500	23000	22000	14261	9120	145389
Ortalama (ton)	56569	27261	22487	19976	16727	13426	7345	171221
Ortalama (%)	33,04	15,92	13,13	11,67	9,77	7,84	4,29	100

Keçiboynuzu meyvesi besinsel içeriği göz önüne alındığında iki kısım olarak ele alınabilir. Bunlardan birincisi merkezde yer alan ve keçiboynuzu gamı üretiminde kullanılan çekirdekler olup ikinci kısım ise çekirdek çıkarıldıktan sonra geriye kalan ve yenilebilen meyvedir (Ayaz vd 2007). Diğer bir sınıflandırma ise aşılı ve yabani keçiboynuzu şeklindedir ve aşılı keçiboynuzu meyvesinin karbonhidrat içeriği yabandan daha fazladır (Biner vd 2007) (Şekil 2.1). Genel olarak keçiboynuzunun %90'ını meyve eti, %10'unu çekirdek oluştururken (Nagmouchi vd 2009), bazı farklı kökene sahip tiplerde %80'ini meyve eti, %20'sini çekirdek oluşturmaktadır (El Batal vd 2011).

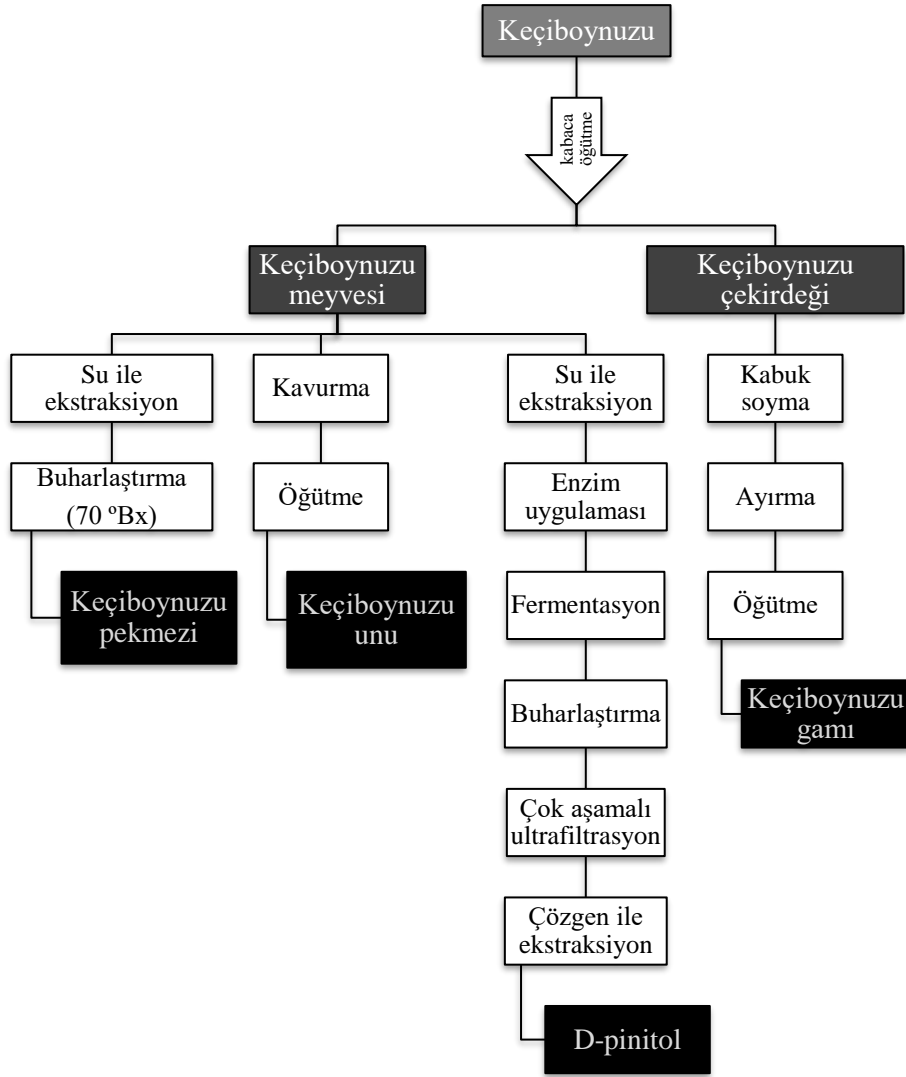


Şekil 2.1. Keçiboynuzu ve çekirdekleri; aşılı (solda), yabani (sağda)

Keçiboynuzu meyvesinin bileşimi ağaçtan ağaca ve yetiştiği yöreye göre değişmekle beraber asıl farklılık yabani veya aşılı olmasından ileri gelmektedir (Tetik vd 2011, Biner vd 2007). Genel olarak keçiboynuzu meyvesi %91-92 toplam kuru madde içermektedir. Bu kuru maddenin %34-42'si sakkaroz, %7-10'u glukoz, %10-12'si fruktozdur (Ayaz vd 2007). Bunların yanı sıra en fazla bulunan amino asitler sırasıyla aspartik asit (18,25 g/100 g protein), alanin (10,55 g/100 g protein), glutamik asit (9,65 g/100 g protein), lösin (9,30 g/100 g protein) ve valinden (9,05 g/100 g protein); fenolik asitler ise sırasıyla benzoik asit türevleri (3276,8 µg/g KA- kuru ağırlık) ve sinamik asit türevlerinden (4,5 µg/g KA) oluşmaktadır (Ayaz vd 2007). Keçiboynuzunun başlıca mineral içeriğini potasyum (970 mg/100 g KA), kalsiyum (300 mg/100 g KA), fosfor (71 mg/100 g KA) ve magnezyum (60 mg/100 g KA) oluştururken iz elementler ise demir (1,88 mg/100 g KA), mangan (1,29 mg/100 g KA), bakır (0,85 mg/100 g KA) ve çinkodan (0,75 mg/100 g KA) oluşmaktadır (Ayaz vd 2007).

Keçiboynuzu meyvesi üretildiği ülkelerde öncelikli olarak keçiboynuzu gamı üretiminde kullanılmasının yanı sıra hayvan rasyonlarında ve insan beslenmesinde de kullanılmaktadır (Battle ve Tous 1997). Keçiboynuzu çekirdeğinin endosperminden elde edilen keçiboynuzu gamının kimyasal bileşimi bir polisakkarit olan galaktomandır. Elde edilen gam gıda endüstrisinde dondurma, çorbalar, peynir, meyve turtaları, konserve etler, şekerleme, fırıncılık ürünleri ve hayvan gıdaları başta olmak üzere birçok gıdada kullanım alanına sahiptir (Battle ve Tous 1997). Çekirdeği gam üretiminde kullanılan keçiboynuzu ülkemizde geleneksel yöntemlerle keçiboynuzu pekmezi üretiminde kullanılmaktadır. Batılı ülkelerde ise pekmez üretiminin yanı sıra meyvenin etli kısmı kavrulularak ve değirmende öğütülerek üretilen keçiboynuzu unu zengin besinsel içeriği nedeniyle kakao ikamesi olarak değerlendirilmektedir (Yousif ve Alghzawi 2000).

Bu kullanımların yanı sıra son yıllarda keçiboynuzu şurubu veya likörü (alkolsüz) eczanelerde gıda takviyesi olarak satılmaktadır. Ayrıca yapılan araştırmalar çok aşamalı ekstraksiyon metodu (ekstraksiyon, enzim uygulaması, fermentasyon, buharlaştırma, ultrafiltrasyon ve çözgen ekstraksiyonu) ile keçiboynuzundan D-pinitol elde edilmesinin de mümkün olduğunu göstermiştir. D-pinitol ve türevleri insülin direncine karşı kullanılabilir olmasından ötürü diyabetliler için önemlidir (Oziyci vd 2015). Keçiboynuzundan elde edilen ürünlerin üretim aşamaları ve son ürünler Şekil 2.2'de özetlenmiştir.



Şekil 2.2. Keçiboynuzundan elde edilen son ürünlerin üretim aşamaları

Keçiboynuzu meyvesini bir bütün olarak ele aldığımızda endüstride meyvenin tamamından farklı yollarla yararlanıldığı görülmektedir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, üretim miktarları yıllara göre değişiklik gösteren keçiboynuzunun meyve etindeki yüksek karbonhidrat içeriğinin farklı alanlarda da değerlendirilebileceğini ortaya koymuştur. Bu alanların başında ise bakteri, küf veya mayaların üretmiş olduğu enzimler ile katma değeri yüksek ürünlerin üretilmesi yani biyoteknolojik uygulamalar oluşturmaktadır. Keçiboynuzu ile katma değeri yüksek ürünlerin üretimi üzerine yapılan denemelerin başında etanol üretimi gelmektedir. Bu kapsamda *Saccharomyces cerevisiae* (Roukas 1993, Turhan vd 2010a, Lima-Costa vd 2012), immobilize *Saccharomyces cerevisiae* (Roukas 1996, Roukas 2004, Yatmaz vd 2013), *Saccharomyces cerevisiae* biyofilm reaktör (Germec vd 2015) ve *Zymomonas mobilis* (Vaheed vd 2011, Mazaheri vd 2012, Mazaheri vd 2014) ile keçiboynuzu ekstraktında etanol üretimleri başarıyla gerçekleştirilmiştir. Mendes vd (2007) 1:10,5 oranında seyreltilmiş oldukları keçiboynuzu ekstraktında *C. cohnii* fermentasyonu ile 1,9 g/L DHA (dokosaheksaenoik asit) üretmişlerdir. Benzer bir çalışmada, melas ile keçiboynuzu ekstraktı *R. toruloides*

NCYC921 ile lipit üretimi karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda en yüksek toplam yağ asidi üretim oranı (1,90 g/L/sa) ve karotenoid üretim oranı (9,79 µg/L/sa) 75 g/L şeker içeren keçiyoynuzu ekstraktında tespit edilmiştir (Freitas vd 2014). Keçiyoynuzu ekstraktı ile organik asit üretimi çalışmaları ise sitrik asit üretimi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu amaçla *Aspergillus niger* (Macris 1975, Roukas 1998a, Roukas 1998b), *Aspergillus niger* MTCC281 ve KLP20 (Lingappa vd 2007), *Aspergillus niger* EMCC1132 (Haider 2014) başarıyla kullanılmıştır. Sitrik asit üretiminin yanı sıra *Lactobacillus casei* ile laktik asit üretimi (Turhan vd 2010b) ve *Actinobacillus succinogenes* 130Z ile süksinik asit üretimi (Carvalho vd 2014) de başarıyla uygulanmıştır. Keçiyoynuzu ekstraktında protein üretiminde ise *Aspergillus niger* (Seker-Pataryas vd 1973, Smail vd 1995) ve *Fusarium moniliforme* (Macris ve Kokke 1977) kullanılarak üretimler gerçekleştirilmiştir. Tüm bu araştırmaların yanı sıra *Pantoea agglomerans* ile biyokontrol ajanı (Manso vd 2010), *Aureobasidium pullulans* ile pullulan (Roukas ve Biliaderis 1995), farklı mikroorganizmalar ile mannitol (Carvalho vd 2011) başarıyla üretilmiştir.

2.2. Fermentasyon Mikrobiyolojisi

Fermentasyon en genel ifade ile organik maddelerin hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi olarak görev yaptığı ve ATP'nin substrat seviyesinde fosforilasyon aracılığı ile üretildiği katabolizma olarak tanımlanabilmektedir. Fermentasyon tekniği yüzyıllardır kullanılmakta olan bir teknik olup genel olarak kullanım amaçları şu şekildedir (Ertugay ve Certel 1995, Smith 2004);

- ❖ Yeni ürün üretiminde mikroorganizmaların kullanılması.
- ❖ Tek hücre proteini olarak mikroorganizmalar tarafından üretilen enzim, vitamin ve antibiyotiklerin üretilmesi.
- ❖ Atıkların mikroorganizmalar yardımıyla arıtılması veya değerlendirilmesi.
- ❖ Enerji eldesi (biyoetanol üretimi).
- ❖ Bazı kimyasal maddelerin fermentasyon esnasında biyosentezi veya transformasyonu.

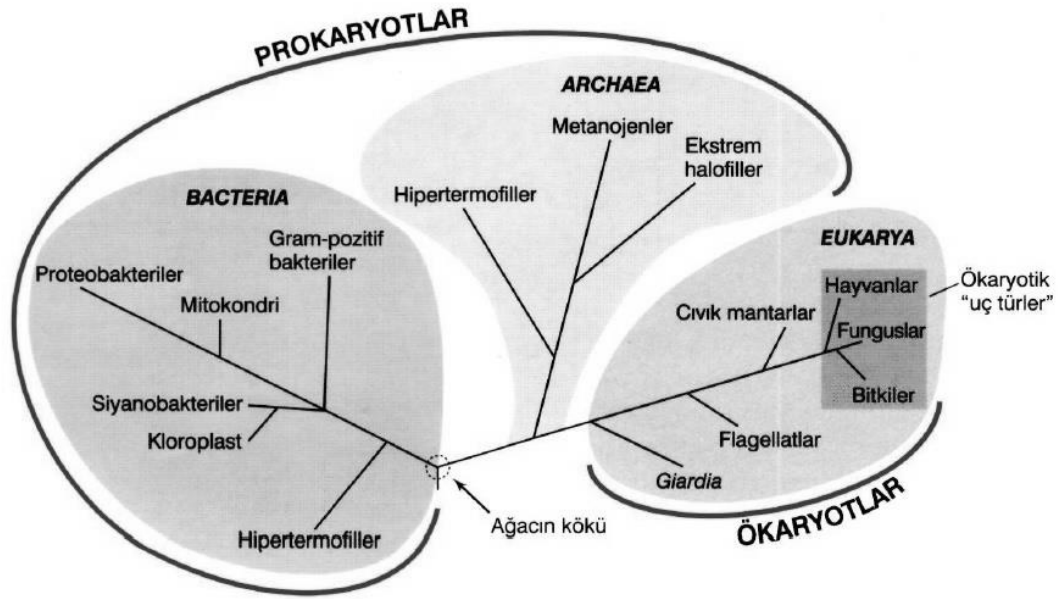
2.2.1. Mikrobiyal çeşitlilik ve gelişim özellikleri

Mikroorganizmalar; ribozomal RNA (rRNA) dizileri karşılaştırılarak filogenetik benzerliklerine göre bakteriler, arkealar ve ökaryotlar olmak üzere üç domainden birine üye olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.3) (Madigan ve Martinko 2006). Bakteri grubunun üyeleri arasında *Proteobakteriler*, *Siyanobakteriler*, Gram pozitif soy hattı, *Plantomyces* grubu, *Spiroketler*, yeşil kükürt bakterileri, yeşil kükürtsüz bakteriler, *Chlamydia* ve *Deinococcus* yer almaktadır. Proteobakterilerin üyeleri arasında *E. coli* ve diğer kemoorganotrofik bakteriler; *Pseudomonas* türleri, *Azotobacter*, *Salmonella* ve diğer pek çok mikroorganizma bulunmaktadır. *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Mycoplasma* gram pozitif soy hattının önemli üyelerindedir. *Siyanobakteriler* ise Dünya'da evrimleşen ilk oksijenik fototroflar olarak oksijen üretimini sağlayan ve Dünya'nın oksijence daha zengin bir hale gelmesini sağlamış mikroorganizmalardır (Tunail 2009).

Arkeaların üyeleri arasında ışığı fototrofik organizmalardan farklı bir yolla kullanabilen *Halobacterium*, metan üreterek enerji gereksinimlerini karşılayan metan

üreten bakteriler, çok yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşamlarını devam ettirebilen halofiller, yüksek sıcaklık ve düşük pH değerlerine dayanıklı termoasidofiller yer almaktadır (Madigan ve Martinko 2006).

Ökaryotik mikroorganizmaların üyeleri arasında ise algler, filamentli funguslar (küfler), tek hücreli funguslar (mayalar), cıvık mantarlar, likenler, bitkiler ve hayvanlar yer almaktadır. Biyoteknolojik öneme de sahip olan funguslar doğal biyolojik yıkım ajanıdır ve ekosistemlerdeki organik maddelerin büyük çoğunluğunun yeniden döngüye girmesini sağlamaktadırlar (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).



Şekil 2.3. Karşılaştırmalı rRNA gen dizilemesiyle tanımlanmış filogenetik yaşam ağacı (Madigan ve Martinko 2006)

Bakteriler bilindiği üzere bir dizi reaksiyonun gerçekleşmesi sonucunda ikiye bölünerek çoğalırlar. Bir bakteriden iki bakterinin oluşması sırasında DNA replikasyonu, hücre uzaması, septum oluşumu, her iki duvarın oluşumu, septumun tamamlanması ve hücrelerin ayrılması ile sonuçlanır. Üreme döngüsü sonucunda her bir bakteri hücresi ihtiyacı olan tüm hücresel unsurları içerir, yani hücresel bileşenlerin tamamı doğru orantılı olarak artar. Bakterilerde bir jenerasyonun ortaya çıkması için gerekli zaman oldukça farklılık arz etmektedir. İdeal koşullarda *E. coli* 20 dakikada bu döngüyü tamamlayabilmektedir (Madigan ve Martinko 2006).

Ökaryotik hücreler temelde mitozla bölünür ve ardından eşeysel üreme gerçekleştirirler. Eşeysiz hücre bölünmesi sırasında ise kromozomların uygun dağılımı mitozla sağlanmaktadır. Genel olarak her ökaryot üyesinin kendine özgü gelişim karakteristiği bulunmaktadır. Biyoteknolojik öneme de sahip olan küfleri ele alacak olursak her filamentin ucundaki hücrenin uzamasıyla hifler oluşmaktadır. Bu hifler bir yüzey boyunca beraber büyüme gösterirse miselyum olarak isimlendirilen ve mikroskopta rahatlıkla görülebilen yapı meydana gelmektedir. Küflerdeki diğer hifsel uzantılarda ise hava ile temas edebilen konidia adı verilen sporlar bulunmaktadır. Bunlar pigmentli eşeysiz sporlar olup kuraklığa dayanıklıdır. Bu yapılar oluştuğunda

miselyumun beyaz rengi değişerek siyah, mavi-yeşil, kırmızı, sarı veya kahverengi renkler ortaya çıkar. Konidialar küflerin yeni habitatlara yayılmasını sağlayan temel yapılar olarak karşımıza çıkmaktadır. Konidiaların yanı sıra gametangiaların birleşmesi sonucu eşeyli sporlar da oluşabilmektedir. Bunlardan bazıları ise askosporlar, bazidiyosporlar, zigosporlardır (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).

2.3. Mikroorganizmaların Gelişmeleri İçin Gerekli Maddeler

Mikroorganizmaların gelişmelerini sağlayabilmeleri için gerekli olan maddelerin tümü besin olarak adlandırılmaktadır. Bir mikroorganizmanın gelişebilmesi için ihtiyaç duyduğu tüm besin öğelerinin ortamda bulunması gerekmektedir. Gereksinim duyulan miktarlarına göre besinler majör elementler (g/L düzeyinde gereksinim duyulanlar) ve minör elementler (mg/L veya µg/L düzeyinde gereksinim duyulanlar) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Tunail 2009).

Majör besinlerin başında karbon ve azot kaynakları gelmektedir. Mikroorganizmalar karbon kaynağını enerji ihtiyaçlarını karşılamak için kullanırlar. Karbon kaynağı olarak saf kimyasallarla fermentasyonlar başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesine rağmen gıda atık ve yan ürünleri de karbon kaynağı olarak kullanılabilir. Bu yaklaşım sayesinde hem bu atık veya yan ürünlerin değerlendirilmesi sağlanmakta hem de fermentasyon girdi maliyetleri azaltılmaktadır (Madigan ve Martinko 2006). İkincil majör besin kaynağı ise yapısal proteinlerin ve enzimlerin üretimlerinde kullanılan azot kaynaklarıdır. Mikroorganizmalar molekül halindeki azotu kullanma yeteneğine sahip olmalarının yanı sıra amonyum tuzları, nitrat ve nitriti de amonyuma dönüştürerek azot kaynağı olarak kullanabilmektedirler (Tunail 2009). Diğer majör besinler ise hücrede nükleik asit ve fosfolipitlerin sentezi için gerekli olan fosfor, hidrojen sülfür (HS⁻) ya da sülfat (SO₄²⁻) halinde inorganik kaynaklardan sağlanan kükürt, enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için gerekli olan potasyum, magnezyum ve hücre duvarını stabilize etmeye yardımcı olan kalsiyumdur (Madigan ve Martinko 2006).

Minör elementler ise hücrelerde eser miktarlarda gereksinim duyulan ancak hayati fonksiyonların yerine gelmesinde rol alan unsurlardır. Bu elementlerden bazıları demir, bor, krom, kobalt, bakır, manganez, molibden, nikel, selenyum, tungsten ve çinkodur (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009). Bu elementlerden demir sitokromlarda ve Fe-S proteinlerinde elektron taşıyıcısı; nikel üreaz enziminin kofaktörü; magnezyum su dehidrogenaz enziminin kofaktörü; bakır mitokondriyal oksidazın bileşeni; çinko dehidrogenazların kofaktörüdür (Tunail 2009).

Tüm bu besin öğelerinin yanı sıra gelişme faktörleri olarak isimlendirilen bazı vitaminler, aminoasitler, pürin ve primidinlerin alınmasına gereksinim duyan mikroorganizmalar da olabilir (Tunail 2009). Bu maddeler genellikle hücre içerisinde kofaktör olarak görev yapmaktadırlar ve bazı mikroorganizmalar gelişim gösterebilmek için bu maddelere gereksinim duyarlar.

2.4. Mikroorganizmalarda Beslenme Tipleri

Mikroorganizmalar gelişmelerini sağlamak için enerjiye ihtiyaç duyarlar ve enerji ihtiyaçlarını farklı yollardan karşılarlar. Mikroorganizmalar enerji gereksinimlerini sağlama yollarına göre ikiye ayrılırlar. Bunlar güneş ışığını kullanarak enerji gereksinimini karşılayan “fototrof mikroorganizmalar” ve kimyasal maddelerin oksidasyonu ile enerji gereksinimini karşılayan “kemotrof mikroorganizmalar”dır (Madigan ve Martinko 2006, Tunail 2009).

Fototrof mikroorganizmalar karbon kaynağı olarak CO₂ kullanıyorsa “fotolitotrof-ototrof”, organik bileşikleri kullanıyorsa da “fotoorganotrof-heterotrof” olarak isimlendirilirler. Kemotrof mikroorganizmalar ise karbon kaynağı olarak CO₂ kullanıyorsa “kemolitotrof-ototrof”, organik bileşikleri kullanıyorsa “kemoorganotrof-heterotrof” olarak isimlendirilirler (Madigan ve Martinko 2006). Ayrıca karbon kaynağı olarak CO₂ ve organik bileşikleri metabolizmalarında kombine olarak kullanabilen veya inorganik ve organik enerji kaynaklarını bir arada kullanabilen mikrostrof mikroorganizmalar da bulunmaktadır (Tunail 2009).

2.5. Fermentasyon Yöntemleri

Çok farklı reaktör sistemleri kurulsa da fermentasyon prosesi temelde üç farklı yöntemle gerçekleştirilmektedir. Bunlar kesikli, yarı-kesikli ve sürekli fermentasyondur. Fermentasyon prosesinde hangi yöntemin seçileceği biyokütlenin substratı kullanma özelliğine ve elde edilecek ürüne göre değişiklik göstermektedir (Shetty vd 2006).

2.5.1. Kesikli fermentasyon

Sisteme sonradan besin kaynağı eklenmediğinden ve ürün çıkarılmadığından kapalı kültür sistemi olarak da adlandırılan kesikli fermentasyon prosesi, stok kültürden ön kültür elde edilmesi ve fermentöre aşılama yapıldıktan sonra üretimin sonlanmasına kadar bir dizi işlemde oluşmaktadır (Shetty vd 2006). Kesikli fermentasyonlarda kültür ortamının kompozisyonu, biyokütle ve metabolit konsantrasyonu sürekli olarak değişim göstermektedir ve mikroorganizma gelişim hızı da fermentasyonun başlangıcında yavaş, sonraki süreçte ise en yüksek seviyelerinde seyretmektedir (Ertugay ve Certel 1995). Kesikli fermentasyonlarda substrat konsantrasyonundaki düşüşe karşın metabolitlerin ortamda birikmesi gelişmeyi sınırlamaktadır (Tunail 2009). Kesikli fermentasyon proselinin hazırlık aşamalarının (sterilizasyon, besiyeri, inokülasyon vs.) kolaylıkla standardize edilebilmesi, cihazın kontrol edilebilirliğinin kolay olması ve bulaşma riskinin azlığı hem bilimsel çalışmalarda hem de endüstride kullanımını kolaylaştıran avantajlarından (Ertugay ve Certel 1995). Etanol üretiminde de yaygın olarak kullanılan kesikli fermentasyonun süresi kullanılan mikroorganizma, elde edilecek ürün ve çalışma koşullarına bağlı olarak saatler veya haftalar sürebilmektedir (Shetty vd 2006).

2.5.2. Sürekli fermentasyon

Sürekli fermentasyon, kullanılmış besiyerine karşılık aynı oranda besin maddelerini içeren besiyerinin ortama beslenmesi ile mikroorganizmaların gelişiminin logaritmik fazda tutulmaya çalışıldığı açık bir sistemdir (Shetty vd 2006). Sürekli

fermentasyonun tercih edilmesinin temel nedeni statik kültür sistemlerinde ortama herhangi bir besin ilavesi veya ortamdaki metabolitlerin uzaklaştırılması söz konusu olmadığından logaritmik fazda seyreden mikroorganizma gelişiminin birkaç generasyon sonrasında durma fazına geçmesidir (Tunail 2009). Mikroorganizmanın durma fazına geçmesinde temel iki etken; ortamda kullanılabilir substrat miktarının azalması ve ortamda metabolitlerin birikmesidir. Mikroorganizmanın durma fazına geçmemesi; ortama sürekli olarak taze besiyeri beslenerek substrat azalımının ve ortamdaki sürekli olarak fermente sıvı alınarak metabolit birikiminin kontrol altına alınması ile sağlanmış olmaktadır. Sürekli sistemlerde dikkat edilecek en önemli durum, kültür kabında belli bir hızla logaritmik fazda gelişen hücreler ile kültür kabından kullanılmış besiyeri içinde uzaklaştırılan hücrelerin (hücre kaybının) dengede tutulmasıdır (Tunail 2009).

2.5.3. Yarı-kesikli fermentasyon

Yarı-kesikli fermentasyon yöntemi, kesikli fermentasyon ile sürekli fermentasyon tekniklerinin her ikisini de içeren bir sistemdir. Mikroorganizma gelişiminden bağımsız olarak üretilen ürünlerde kesikli ve sürekli sistemler uygun değildir. Bu tip sistemler kullanılarak gerçekleştirilen üretimlerde öncelikli olarak yüksek yoğunlukta mikroorganizma gelişiminin sağlanması hedeflenmektedir. Ardından fermentasyon ortamına öncül maddeler, karbon kaynakları ve oksijen ilavesi, hücreyi koruyacak ve ürün üretimini sağlayacak düzeyde eklenerek üretim sağlanmaktadır. Buradan da anlaşılacağı üzere yarı-kesikli fermentasyon gelişim ve üretim fazı olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Yarı-kesikli fermentasyon sistemleri kesikli sistemlerin basit bir şekilde modifiye edilerek oluşturulmasının yanı sıra sürekli sistemlerdeki kontaminasyon riskinin bu sistemde daha az oluşuyla üstündür. Yarı-kesikli fermentasyon sistemleri hücre gelişiminde substrat miktarının gelişimi inhibe ettiği durumlarda ve ürün veya hücre veriminin düşük substrat konsantrasyonlarında daha yüksek olduğu durumlarda (antibiyotik üretimi vs.) tercih edilmektedir (Shetty vd 2006).

Yarı-kesikli fermentasyon teknolojisinin ilk örnekleri 1915’lerde ekmek mayası üretiminde kullanılmıştır. Ekmek mayası üretiminde kesikli fermentasyon tercih edilmesi durumunda yüksek miktarda malt ile fermentasyona başlandığında yüksek gelişim oranı değerleri nedeniyle oksijen ihtiyacı artmaktadır. Eğer ki havalandırma yetersiz olursa anaerobik şartların oluşması sonucunda metabolik yol etanol üretimine dönüştüğünden ekmek mayası üretimi olumsuz etkilenmektedir. Bu sorunun üstesinden gelmek için yarı-kesikli fermentasyon kullanılabilir. Ayrıca mayalardan rekombinant protein üretiminde de yarı-kesikli fermentasyon kullanılması durumunda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve rekombinant protein üretim değerlerinde artış sağlanmıştır (Stanbury vd 1995).

İkincil metabolit olarak üretilen penisilin yarı-kesikli fermentasyon tekniğinin başarıyla uygulandığı örneklerin başında gelmektedir. Penisilin üretimi iki aşamalı bir süreçtir. Birinci aşama “hızlı gelişim fazı” olarak nitelendirilen ve hücre gelişiminin teşvik edildiği süreçtir. İkinci aşama ise “yavaş gelişim fazı” veya “üretim fazı” olarak isimlendirilmekte olup burada amaç hücrenin ölümünü minimize edecek düzeyde substrat konsantrasyonu ile ikincil metabolit olan penisilin üretimini sağlamaktır (Stanbury vd 1995). Birçok enzim üretiminde ise karbon kaynağının hızlı bir şekilde kullanılması sonucunda katabolik baskılama nedeniyle enzim sentezi önlenmektedir. Karbon kaynağı konsantrasyonunu ayarlamamın en basit ve etkin yolu yarı-kesikli fermentasyon

teknığının kullanılması olup bu teknikle lipaz ve selüloz üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir (Stanbury vd 1995).

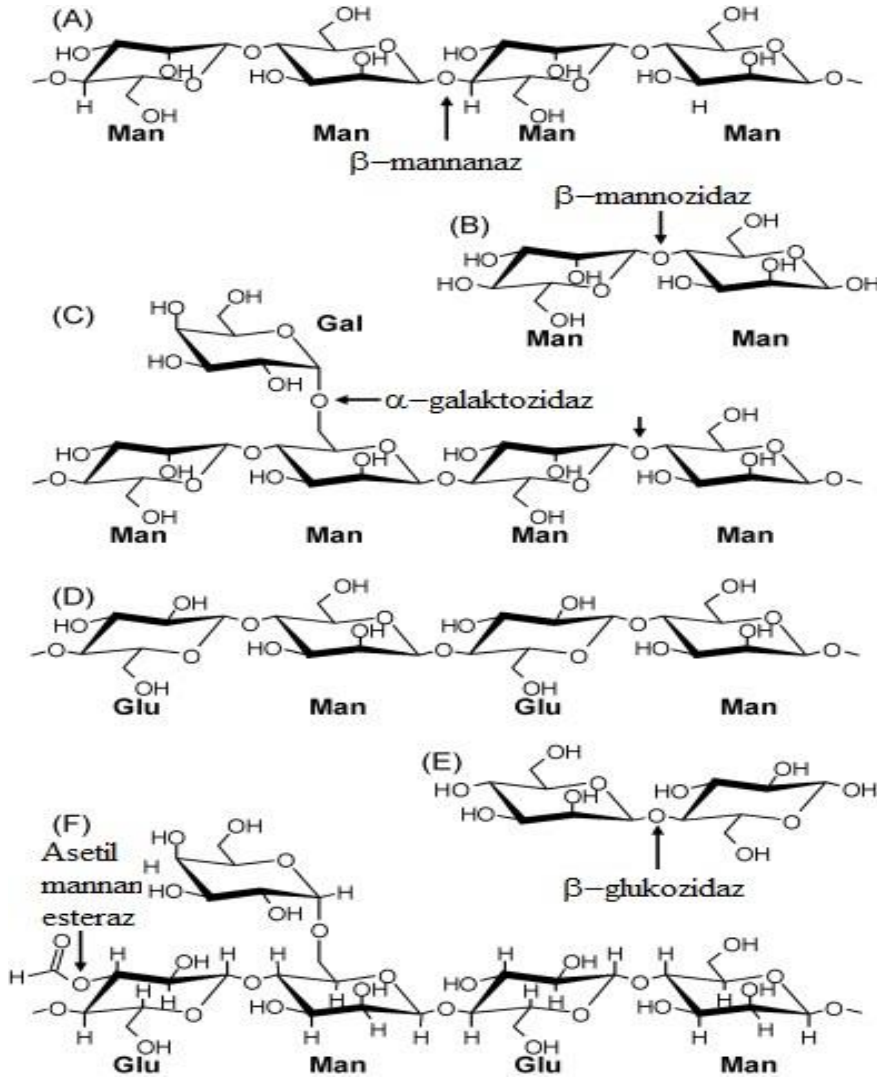
2.6. Mannanların Genel Özellikleri

Mannanlar hücre duvarında yer alan selüloz ve ligninle yakından ilişkili kompleks biyopolimerlerdir. Bu biyopolimerler selüloz mikrofibrillerine çapraz bağlı yapısal karbonhidratlar veya farklı bitkilerin çekirdeklerinde depo karbonhidratlar olarak bulunabilmektedirler (Chauhan vd 2012). Örneğin *Arabidopsis* cinsine mensup bitki türlerinin birçok hücre dokusunda mannanlar bulunmaktadır. Mannanlar yapı itibariyle mannoz, glukoz ve galaktoz alt ünitelerinin farklı miktar ve yapılarda birleşmesinden oluşan polisakkaritlerdir. Mannanların enzimatik hidrolizi sonucunda mikroorganizmalar, insanlar veya hayvanlar tarafından kullanılabilir şekerler oluşmaktadır (Wang 2015).

Mannanları dört alt grupta sınıflandırmak mümkündür. Bunlar; lineer mannan, glukomannan, galaktomannan ve galaktoglukomannandır. Bu polisakkaritlerin tamamı β -1,4 bağlı mannoz veya glukoz ve mannoz kombinasyonlarını barındıran ana yapıdan oluşmaktadır. Ayrıca bu ana yapılar, α -1,6 noktalarından bağlı galaktoz yan gruplarını da içerebilmektedir (van Zyl vd 2010). Dört farklı mannan grubuna ait yapılar ve bu yapılara etki eden enzimler Şekil 2.4'te verilmiştir. Bu mannanların tamamı tohum besin deposu ve/veya yapısal bileşen olarak işlev görmektedir. Galaktomannanlar, bakliyatlarda tohum besin deposu olarak görev yapmakta ve tohumun kuru ağırlığının %30'unu oluşturmaktadır (Wang 2015).

Lineer mannanlar homopolisakkarittirler. Bunların ana iskeletini β -1,4 bağlı D-mannoz kalıntıları oluştururken %5'den daha az galaktoz da içerebilmektedirler. Bu mannanlardan bazıları, özellikle "aloe vera"da bulunanlar immüno-farmakolojik ve tedavi edici özellikler gösterebilmektedirler. Lineer mannanlar ağaçların ve bazı bitki çekirdeklerinin majör bileşenlerindedir [özellikle Afrika hurma kozalağı (*ivory nuts*; *Phytelphas macrocarpa*), domates (*Solanum lycopersicum*) ve yeşil kahve çekirdeği]. Lineer mannanlar *Leguminosae* familyası üyelerinden "pinho cuiabano"nun (*Schizolobium amazonicum*) çekirdeklerinde de bulunabilmektedir. Lineer mannanlar suda çözünmezler ve bu nedenle de bitki dokularının yapısal hemiselülozlarında mekanik zararlara karşı önemli roller üstlenirler (Moreira ve Filho 2008, Wang 2015).

Glukomannanlar, kozalaklı ağaçların hemiselüloz fraksiyonunun majör bileşeni iken iğne yapraklı ağaçların da hemiselüloz fraksiyonunun %50'sini oluşturmaktadırlar. Genel olarak yapısında lineer β -1,4 bağlı D-mannoz ana zinciri ve 3:1 oranında D-glukoz kalıntıları bulunmaktadır (Malgas vd 2015). Glukomannanlar hücre duvarı bileşenlerinden selüloz ve ksilan ile yakından ilişkilidir (van Zyl vd 2010). Glukomannanların mannoz:glukoz oranı 4:1-1:1 aralığında ve polimerizasyon derecesi 200'den yüksek ise suda çözünebilmektedirler. Konjac bitki yumrusunun %60-80'ini oluşturan glukomannanlar ana depo karbonhidratı olarak görev yapmaktadır. Konjac glukomannanı suda çözünebilir olması ve çok fazla bulunması nedeniyle gıda endüstrisi ve ilaç araştırmalarında çok geniş bir kullanım alanına sahiptir (Wang 2015).



Şekil 2.4. Farklı mannan formları ve bu yapılarla etki eden enzimler (A: lineer mannan, B: mannoz oligosakkarit, C: yan grup içeren galaktomannan, D: lineer glukomannan, E: glukomannoz oligosakkarit, F: yan grup içeren galaktoglukomannan) (van Zyl vd 2010)

Bitki galaktomannanları, suda çözünür β-1,4 bağlı D-mannoz kalıntılarına α-1,6 noktalarından bir tane bağlanmış D-galaktoz yan ünitelerinden oluşmaktadır. Galaktomannanların reolojik özelliklerinden (kıvam arttırıcı ve diğer etkileri) dolayı gıda uygulamaları ve endüstriyel kullanımları oldukça yaygındır. Galaktomannanların asıl kaynağı *Leguminosae* familyası bitkilerinin çekirdeklerinin endosperm bölümüdür (Moreira ve Filho 2008). Bunun yanı sıra *Leguminosae* familyasından olmayan bazı bitkilerde (*Cocos nucifera* ve *Elaies guineensis*) de bulunabilmektedirler. Galaktomannanlar çekirdeğin çimlenme zamanı geldiğinde enerji kaynağı olmalarının yanı sıra suyu çekirdekte muhafaza ettiklerinden yüksek sıcaklıklarda çekirdeğin su kaybını önleyerek burada yer alan enzimlerin denatürasyonunun önüne geçmektedirler (Moreira ve Filho 2008, Wang 2015). Galaktomannanlar suda çözünürler ancak çözünürlükleri ana zincire bağlı hidrofilitik galaktoz sayısına göre değişmektedir. Endüstriyel açıdan önemli üç galaktomannan sırasıyla keçiyoynuzu gamı (*Ceratonia*

siliqua), guar gam (*Cyamopsis tetragonoloba* veya *Cyamopsis psoraloides*) ve tara gamdır (*Caesalpinia spinosa*).

Keçiboynuzu gamı (E-410), *Leguminosae* familyasından *Ceratonia siliqua* türü ağaçların meyve çekirdeklerinin gerekli işlemlerden geçirilmesi sonucunda elde edilir. Elde edilen gam yüksek moleküler ağırlığa sahip galaktomannandan oluşmaktadır. Gamın ana iskeletini β -1,4 bağlı mannoz üniteleri oluştururken yan zincirleri ise 1,6 bağlı galaktoz üniteleri oluşturmaktadır. Keçiboynuzu gamı mannoz:galaktoz oranı 4:1'dir. Keçiboynuzu gamı; galaktomannan (%80-85), nem (%10-12), protein (%5-6), lipit (%0,5-0,6), ham lif (%0,8-1) ve külden (%0,5-1) oluşmaktadır. Çok yaygın kullanım alanına sahip olan keçiboynuzu gamının kullanım alanları sırasıyla yenilebilir filmler, içecekler, unlu mamuller, makarnalar, dondurma, az yağlı yoğurt, diğer gıda ürünleri ve ilaçlardır (Prajapati vd 2013, Barak ve Mudgil 2014).

Guar gam (E-412) da *Leguminosae* familyasından kuraklığa dayanıklı bir bitki olan *Cyamopsis tetragonoloba*'nın meyve çekirdeklerinden elde edilir. Guar gamın kimyasal yapısı da keçiboynuzu gamına benzemektedir. Araştırmalara göre mannoz:galaktoz oranı 2:1'dir. Keçiboynuzu gamı gibi guar gam da çok yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu alanlardan bazıları içecekler, işlenmiş peynirler, süt ürünleri, işlenmiş et ürünleri, unlu mamuller ve soslardır (Mudgil vd 2014).

Tara gam (E-417) Ekvator, Peru ve Doğu Afrika'da yetişen tara bitkisinden elde edilmektedir. Tara gam, donmuş tatlılarda buz kristallerinin büyüklük kontrolünde ve işlenmiş et ürünlerinin jel yapısının geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Soğuk çözeltilerde viskozite değerleri keçiboynuzu ve guar gama benzerken ısıtılan çözeltilerde tara gam daha yüksek viskozite değerlerine sahiptir. Tara gamın mannoz:galaktoz oranı 3:1'dir (Wang 2015).

Mannan alt familyalarının belki de en karmaşık olanı galaktoglukomannanlardır. Galaktoglukomannanlar rastgele dağılmış β -1,4 bağlı D-mannoz ve D-glukoz ana zincirinden oluşmaktadır. Bu ana zincirdeki yalnızca D-mannoz ünitelerine α -1,6 bağlı D-galaktoz alt üniteleri dallanma noktalarını oluşturmaktadır (Malgas vd 2015). Galaktoglukomannanlarda mannoz:glukoz:galaktoz oranı 3:1:1'dir. Ayrıca O-asetil grupları da içerebilirler (van Zyl vd 2010). Asetil içeriği %5,9 ila %8,8 arasında değişmektedir. Asetilenmiş galaktoglukomannanlar kozalaklı ağaçlardaki hemiselülozun majör bileşenidir. Galaktoglukomannanların sudaki çözünürlüğü D-galaktoz yan ünitelerin miktarıyla yakından ilişkilidir (Moreira ve Filho 2008). Ekonomik değeri oldukça yüksek olan Norveç ladininde (*Picea abies*) %10-20 oranında O-asetillenmiş galaktoglukomannanlar yer almaktadır. Norveç ladinlerinin ana kullanım alanları kereste, pulp ve kâğıt endüstrisidir. Ladin galaktoglukomannanları yaygın olarak araştırılmış olup mannoz:glukoz:galaktoz oranı 3,5-4,5:1:0,5-1'dir. Kozalaklı ağaçların yanı sıra *Populus monilifera*, zemin çamı (sürünen sedir; *Lycopodium*), böğürtlen ve eğreltiotunda da galaktoglukomannanlar bulunmaktadır (Wang 2015).

2.7. Mannanların Enzimatik Hidrolizi

Lignoselülozik bileşiklerin iç içe karmaşık yapısında yer alan selüloz ve hemiselüloz yapıyı yıkıma uğratacak enzimin, farklı etkilere sahip hidrolitik enzimlerin

karışımından oluşması gerekmektedir. Benzer durum mannanları yıkıma uğratacak enzimler için de geçerlidir. Bir önceki bölümde açıklandığı gibi mannanlar birbirinden farklı yapılara sahip karmaşık polisakkaritlerdir. Bu karmaşıklığa sahip mannanlara etki edecek enzimler ise, odunsu materyallerden enerji elde edebilen fungus ve bakteriler vasıtasıyla üretilmektedir (van Zyl vd 2010).

Mannanlara etki eden enzimler (Şekil 2.3):

- β -mannanazlar (EC 3.2.1.78) : β -1,4-D-mannan mannohidrolaz
- β -mannozidazlar (EC 3.2.1.25) : β -1,4-D-mannopiranozid hidrolaz
- β -glukozidazlar (EC 3.2.1.21) : β -1,4-D-glukozid glukohidrolaz
- Asetil mannan esteraz (EC 3.1.1.16)
- α -galaktozidaz (3.2.1.22) : α -1,6-galaktozid galaktohidrolaz

Yukarıda sıralanmış enzimlerden asetil mannan esteraz ve α -galaktozidaz, mannan yapılarına bağlanmış yan grupların ayrılmasından sorumludurlar (Moreira ve Filho 2008). β -mannozidazlar, mannanlar ve manno oligosakkaritlerin indirgen olmayan uçlarından başlayarak β -1,4 bağlı mannozların hidrolizini gerçekleştiren ekzo-enzimlerdir. β -glukozidazlar ise β -mannanaz aktivitesi sonucu ortaya çıkan gluko- ve galaktomannanları indirgen olmayan uçtan başlayarak β -1,4 bağları hidrolize eden ekzo-enzimlerdir (Malgas vd 2015).

2.8. β -Mannanazlar (EC 3.2.1.78)

β -mannanazlara ait bilgiler incelendiğinde gen ekspresyonlarının genetik düzenlenmesinin selülozlar ve ksilanazlar kadar iyi bilinmediği görülmektedir. Ancak β -mannanazların fungal yapılardaki oluşumunun diğer selülozlar ve ksilanazlara benzediği varsayılmaktadır (van Zyl vd 2010). β -mannanazlar, amino asit dizilimlerine göre glikoz hidrolaz GH5 ve GH26 familyalarında gruplandırılmaktadır. Bu iki familyada en geniş glikoz hidrolaz klanı (GH-A) olarak sınıflandırılmaktadır (Chauhan vd 2012). β -mannanazlar, mannanlardaki β -1,4 bağlarının rastgele parçalanmasından ve yeni uçların oluşmasından sorumlu endo-enzimlerdir (Şekil 2.3). Galaktomannanların ve galaktoglukomannanların β -mannanazlar tarafından parçalanmasında ana yapıya bağlı yapıların tipi ve miktarı da etkilidir (Moreira ve Filho 2008). β -mannanazlar tarafından hidrolize uğrayan mannanlardan genellikle mannobioz ve mannotrioz oluşmaktadır.

2.9. β -mannanaz Üreten Mikroorganizmalar

β -mannanaz üretimi kullanılan besiyeri içeriği ve fermentasyon şartlarına göre değişmektedir. Üretime etki eden ana unsurlar; inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, karbon ve azot kaynakları, inorganik tuzlar, karıştırma hızı ve çözünmüş oksijen konsantrasyonudur (Chauhan vd 2012). Farklı mikroorganizmalar β -mannanaz üretiminde farklı inkübasyon sürelerine ihtiyaç duymaktadırlar. Örneğin bakterilerde inkübasyon süresi; *Acinetobacter* türlerinde 24 saat yeterli iken *Bacillus* türleri 96 saate ihtiyaç duymaktadırlar. Funguslarda ise *Streptomyces* türlerinde inkübasyon süresi 3 gün iken *Aspergillus* türlerinde bu süre 11 güne kadar çıkmaktadır. Fermentasyon sıcaklığı olarak genellikle mezofillerin sıcaklık aralığı önerilmektedir. Ancak genel uygulama çalışılan mikroorganizmanın optimal inkübasyon sıcaklığının seçilmesi yönündedir.

Ortamın pH değeri ise bakteriler için bazik, funguslar için ise asidik olarak ayarlandığında mikroorganizmanın gelişimi ve β -mannanaz üretimi olumlu etkilenmektedir (Chauhan vd 2012).

Bilindiği üzere fermentasyon şartları çalışılan mikroorganizmanın gelişim mekanizmasına göre değişiklik göstermektedir. Bu nedenle her mikroorganizma için en iyi üretim yönteminin belirlenmesi amacıyla denemeler gerçekleştirilmektedir. β -mannanaz üretimi için genel gereksinimlerden yukarıda kısaca bahsedilmiştir. Çizelge 2.2'de ise β -mannanaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar ve fermentasyon şartları özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. β -mannanaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar ve fermentasyon şartları (Chauhan vd 2012)

Mikroorganizma	Karbon kaynağı	Fermentasyon şartları
<i>Acinetobacter</i> sp. ST 1-1	CM ^a /LBG ^b	SF ^c , 37°C, 24 sa, 150 d/d
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IOA1	GM ^d	SF ^c , 35°C, 24 sa, 150 d/d, pH 7
<i>Bacillus circulans</i> M-21	GG ^e	SF ^c , 32°C, 36 sa, 180 d/d, pH 8
<i>Bacillus</i> sp. N16-5	KM ^f	SF ^c , 37°C, 34 sa, 230 d/d, pH 9,5-10
<i>Bacillus</i> sp. MSJ-5	KP ^g	SF ^c , 32°C, 32 sa, 220 d/d, pH 7
<i>Bacillus</i> sp. MG-33	WB ^h /Ham buğday zengini soya pulpu	SSF ⁱ , 30°C, 96 sa, pH 7
<i>Bacillus subtilis</i> SUT1	BIM ^j	SF ^c , 30°C, 24 sa, 150 d/d
<i>Bacillus subtilis</i> strain (CD-3, CD-6, CD-9, CD-10, CD-23, CD-25)	BFM ^k	SF ^c , 37°C, 24 sa, 180 d/d
<i>Cellulosimicrobium</i> sp. HY-13	LBG ^b /M9 besiyeri	SF ^c , 37°C, 48 sa, 180 d/d
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	BIM ^j	SF ^c , 30°C, 24 sa, 150 d/d
<i>Klebsiella oxytoca</i> CW23	CM ^a /LBG ^b	SF ^c , 37°C, 18 sa, 150 d/d
<i>Paenibacillus</i> sp. MSL-9	GG ^e	SF ^c , 30°C, 48 sa, 160 d/d, pH 8
<i>Paenibacillus</i> sp. DZ3	LB ^l /Glukomannan	SF ^c , 37°C, 120 sa, 200 d/d
<i>Aspergillus niger</i>	LBG ^b	SF ^c , 37°C, 168 sa, 180 d/d
<i>Aspergillus flavus</i>	LBG ^b	SF ^c , 37°C, 168 sa, 180 d/d
<i>Aspergillus niger</i> LW-1	PP ^m /LBG ^b	SSF ⁱ , 32°C, 96 sa
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 20114	Peptone	SF ^c , 30°C, 264 sa, 150 d/d
<i>Aspergillus niger</i> FTCC 5003	PKC ⁿ	SF ^c , 30°C, 192 sa, 150 d/d, pH 5,5
<i>Aspergillus niger</i> FTCC 5003	PKC ⁿ	SSF ⁱ , pH 5
<i>Aspergillus niger</i> USM F-4	Melas/PKC ⁿ	SSF ⁱ , 30°C, 120 sa
<i>Aspergillus niger</i>	GG ^e	SF ^c , 30°C, 240 sa, 150 d/d
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 3448	LBG ^b	Statik kültür, 30°C, 168 sa
<i>Penicillium occitanis</i> Pol 6	CSFL ^o	30°C, 168 sa
<i>Scopulariopsis candida</i> LMK 004	LBG ^b	SF ^c , 25°C, 150 d/d
<i>Scopulariopsis candida</i> LMK 008	LBG ^b	SF ^c , 25°C, 150 d/d
<i>Trichoderma reesi</i>	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. PG-08-03	GG ^e	SF ^c , 37°C, 72 sa, 200 d/d, pH 8

^aKurutulmuş Hindistan cevizi unu, ^bKeçiyoynuzu gamı, ^cDerin kültür fermentasyonu, ^dGalaktomannan, ^eGuar gamı, ^fKonjac mannan, ^gKonjac unu, ^hBuğday kepeği, ⁱKatı kültür fermentasyonu, ^jBakteri izolasyon besiyeri, ^kBakteri fermentasyon besiyeri, ^lLuria sıvı besiyeri, ^mPatates kabuğu, ⁿPalmiye çekirdeği artığı/keki, ^oKeçiyoynuzu çekirdeği unu sıvı besiyeri

Çizelge 2.2 incelendiğinde farklı karbon kaynaklarının doğal olarak β -mannanaz üreten mikroorganizmalarda kullanılabildiği görülmektedir. En çok kullanılan substratın keçiyoynuzu gamı olduğu görülmektedir. Bu durumun asıl nedeni enzim üretiminin substratı varlığında indüklenmesidir (Moreira ve Filho 2008). Çizelgede de genel yaklaşım olarak mannan bazlı karbon kaynaklarının kullanıldığı açıkça görülmektedir. Bu kaynakların yanı sıra melas, buğday kepeği, palmiye çekirdeği artığı/keki, patates kabuğu gibi ürünler de karbon kaynağı olarak rahatlıkla tercih edilebilir.

β -mannanaz üretiminde doğal mikroorganizmaların kullanılmasının yanı sıra rekombinant suşlar da kullanılabilmektedir. Bu amaçla heterolog ekspresyon yöntemiyle funguslara aktarılan genler vasıtasıyla fungal ve bakteri β -mannanazlarının etkin bir şekilde üretimi derin kültür fermentasyonu ile gerçekleştirilmektedir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Rekombinant suşlar, β -mannanaz üretim miktarları ve fermentasyon şartları (van Zyl vd 2010)

Doğal suş	Rekombinant suş	Aktivite (U/ml)	Fermentasyon şartları
<i>Agaricus bisporus</i> CEL4	<i>S. cerevisiae</i>	0,0058	-
<i>A. bisporus</i> CEL4	<i>P. pastoris</i>	0,199	Sentetik besiyeri
<i>Armillariella tabescens</i>	<i>P. pastoris</i>	1,067	72 sa indüksiyon
<i>Aspergillus aculemans</i> Man1	<i>Y. lipolytica</i>	1574,7	Yarı-kesikli fermentasyon, sentetik besiyeri, 60 sa
		787,5	Çalkalamalı inkübatör, sentetik besiyeri
		404,76	Kesikli fermentasyon, sentetik besiyeri, 50 sa
<i>A. aculemans</i> Man1	<i>A. niger</i>	1000	Çalkalamalı inkübatör, 200 d/d, 7 gün, sentetik besiyeri
<i>A. aculemans</i> Man1	<i>S. cerevisiae</i>	31,39	Çalkalamalı inkübatör, 4 gün, sentetik besiyeri
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>A. sojae</i>	352	Çalkalamalı inkübatör, 6 gün, sentetik besiyeri
<i>A. fumigatus</i>	<i>P. pastoris</i>	61	Çalkalamalı inkübatör, sentetik besiyeri, 155 d/d, 3 gün, indüksiyondan sonra 10 sa
<i>A. niger</i>	<i>P. pastoris</i>	669	Çalkalamalı inkübatör, %2 metanol, 96 sa, 28°C
<i>A. sulphurous</i> Mann	<i>P. pastoris</i>	96	Çalkalamalı inkübatör, sentetik besiyeri
<i>A. terreus</i> MAN	<i>P. pastoris</i>	39,4	Çalkalamalı inkübatör, indüksiyondan sonra 3 gün
<i>Bispora</i> sp.	<i>P. pastoris</i>	500	Yarı-kesikli fermentasyon
<i>Mytilus edulis</i>	<i>P. pastoris</i>	41,01	Fermentör, sürekli fermentasyon, 10 gün, 17°C
<i>Orpinomyces</i> sp. ManA	<i>S. cerevisiae</i>	1,15	Sentetik besiyeri, sürekli fermentasyon
<i>Phialophora</i> sp. P13	<i>P. pastoris</i>	11,8	Çalkalamalı inkübatör, sentetik besiyeri, metanolle indüksiyon
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> Man5D	<i>A. niger</i>	100	Sentetik besiyeri
<i>Trichoderma reesei</i> Man1	<i>P. pastoris</i>	12	
<i>T. reesei</i> Man1	<i>S. cerevisiae</i>	0,13	Çalkalamalı inkübatör, 200 d/d, 48 sa
<i>T. reesei</i> Man1	<i>T. reesei</i>	1,8	Çalkalamalı inkübatör, 160 d/d

Yüksek miktarda üretime olanak sağlayan rekombinant fungal sistemlerin kullanımı sonucunda süpernatanttan enzim kolaylıkla saflaştırılmaktadır. Bu durum üretim maliyetlerini düşürdüğünden endüstriyel üretimlerin önünü açmaktadır (van Zyl vd 2010).

2.10. β -mannanaz Kullanım Alanları

Substrat spesifikliği yüksek olan β -mannanaz grubu enzimlerin çok farklı kullanım alanları mevcuttur. Bu bölümde β -mannanaz enziminin kullanım alanlarına değinilecektir.

2.10.1. Mannooligosakkarit (MOS) üretimi

Diyet lifleri suda çözünebilirlik özelliklerine göre ikiye ayrılmaktadırlar. Suda çözünemeyen diyet lifleri selüloz, pektin ve selüloz benzeri polisakkaritler olup bunların su absorbe etme kabiliyeti yüksek olduğundan sindirim sisteminde dışkıyı yumuşatma özelliği gösterirler. Diğer bir grup ise suda çözünen diyet lifleri olup bunlara genel olarak mannooligosakkaritler denmektedir. Suda çözünebilir diyet lifleri de insanlar tarafından sindirilemeyen polisakkaritlerdir. Bu grubun üyeleri suda çözündüklerinden sindirim sisteminde geçerken bağırsak mikroflorası tarafından besin kaynağı olarak kullanılırlar. Bağırsak mikroflorasının bu faaliyeti sonucunda ise insan sağlığı için yararlı maddeler oluşmaktadır.

Suda çözünebilir MOS'ların başında keçiyoynuzu gamı, guar gam, tara gam ve konjac unu sayılabilir. Bu MOS'lar β -mannanaz enzimi vasıtasıyla kısmi olarak parçalandıklarında mikroorganizmalar tarafından kullanılabilir MOS ortaya çıkmaktadır. β -mannanaz enziminin ana kullanım alanlarından birisini, insan sağlığı açısından önemli olan bu MOS'ların üretimi oluşturmaktadır. Günde 3 g MOS tüketildiğinde yağ emiliminin azaldığı ve bu azalmanın yağ metabolizmasını olumsuz etkilemediği tespit edilmiştir. Kısmi olarak hidrolize edilen guar gam içeceklerde kullanılmıştır. Bu kullanım sonucunda kronik bağırsak rahatsızlığında azalma olduğü görülmüştür. Ayrıca kısmi hidrolize guar gam kullanılarak hazırlanan rehidrasyon çözeltilerinin çocuklarda akut olmayan ishalin tedavi süresini kısalttığı görülmüştür. MOS'ların bu ve buna benzer birçok yararı bulunmaktadır. İnsan sağlığına olumlu etkileri oldukça fazla olan MOS'ların üretilmesinde kompleks enzim çözeltileri yerine β -mannanaz kullanımının yeterli olduğü bildirilmiştir (van Zyl vd 2010, Chauhan vd 2012).

2.10.2. İlaç endüstrisi uygulamaları

Hastaların sağlığına kavuşmasında en temel unsurlardan birisi de ilaçların hedeflenen bölümde ve hızlı bir şekilde çözünmesidir. Bu amaçla kullanılan katkıların başında mannoz gelmektedir. Mannozy, ilaçların hazırlanmasında tabletlerin yapı özelliklerini geliştirmesinden ve hızlı çözünmeyi sağlamasından dolayı tercih edilmektedir. Bu üstün özelliklerinden dolayı her geçen gün kullanımı artmakta olan mannoz, zengin mannan içeren substratların β -mannanaz vasıtasıyla parçalanmasıyla elde edilmektedir. Bu amaçla β -mannanaz enziminin yanı sıra selülaz ve/veya α -galaktozidaz ile kombine edilmesinin de mannoz verimine olumlu bir katkısının olmadığı bildirilmiştir (van Zyl vd 2010, Chauhan vd 2012).

2.10.3. Kahve üretiminde β -mannanaz kullanımı

Çözünür kahve, kavrulmuş kahve çekirdeklerinin sıcak su ile ekstraksiyonu sonucunda elde edilen çözeltilerin püskürtülerek veya dondurularak kurutulmasıyla elde edilen

üründür. Kahve ekstraktında bulunan mannanlar viskoziteyi arttırdığından sonraki aşamalarda hedeflenen sonuçların elde edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle küflerden elde edilen β -mannanaz enzimi kullanılmakta ve mannanlar parçalanarak viskozite azaltılmaktadır. Bu sayede kahve ekstraktının konsantrasyon maliyeti de düşmektedir. Kahve üretimindeki hedeflere ulaşılmasının yanı sıra kahve çekirdeği artıkları da β -mannanaz enzimi ile muamele edilerek MOS'lar üretilmektedir (Chauhan vd 2012).

2.10.4. Hayvan yemlerinin zenginleştirilmesinde MOS'ların kullanımı

Doğada yaygın olarak bulunan mannanlar hayvan yemlerinde bulunan ve yemlerin besinsel değerini artırıcı olarak kullanılan soya unu, guar unu, palmye çekirdeği unu ve susam ununda da bulunmaktadır. Domuz ve kümes hayvanları insanlar gibi tek bölmeli mideye sahip olduklarından yüksek lif içeriğine sahip mannanları sindirememektedirler. Bu nedenle mannanlarla zenginleştirilmiş yemlere β -mannanaz ilave edilerek mannanların parçalanması ve hapsolmuş besinsel öğelerden yararlanılması; on iki parmak bağırsağı ve ince bağırsaktaki villusların yüksekliğini arttırarak emilim düzeylerinin artmasını ve bağırsaktaki besinlerin viskozitesinin azalmasını sağlamaktadır. Sonuç olarak domuz ve kümes hayvanlarının beslenme kalitesi arttığından kaliteli ve sağlıklı bir beslenme sağlanmış olmaktadır (van Zyl vd 2010).

2.10.5. Petrol-gaz kuyusu drenajlarında ve biyoyakıt üretiminde β -mannanaz kullanımı

Sanayileşmiş ülkelerin en temel ihtiyaçlarının başında enerji ihtiyacının karşılanması gelmektedir. Petrol ve gaz kuyularından hedeflenen ürünün çıkartılmasında birçok farklı proses uygulanmaktadır. Bunlardan birisi de hedeflenen derinliğe ulaşıldığında kullanılan ve kaya tabakasında çatlak oluşturmaya yarayan çözeltilerdir. Bu amaçla hazırlanan çözeltilerin bileşenlerinden birisi de viskoziteyi arttırmaya yarayan guar gamdır. Hazırlanan ve hedefte görevini yerine getiren çözeltilerin pompalarla yeniden dışarıya pompalanabilmesi için sıcaklığa dayanıklı β -mannanaz kullanılmaktadır. Bu sayede fraksiyonlarına parçalanan guar gam viskozite artırma fonksiyonunu artık yerine getiremediğinden çözeltiler pompalanabilir hale gelmekte ve ortamdan uzaklaştırılan çözeltilerin ardından petrol veya gaz sondajına devam edilmektedir (Chauhan vd 2012).

Enerji elde edilmesinde petrol ve gaz kuyularının kullanımı büyük önem arz etmekle beraber bu kaynaklara ait stoklar sınırlıdır. Bu temel sorun neticesinde araştırmacılar yeni teknik ve stratejiler oluşturma yoluna gitmişlerdir. Petrol ve gaz kullanımına alternatif olarak yenilenebilir kaynaklardan enerji elde edilmesi en popüler yaklaşımlardan birisi olmuştur. Lignoselülozik kaynaklardan biyoetanol üretilmesinde substrat kaynakları farklı enzim karışımları ile muamele edilerek mikroorganizmalar tarafından kullanılabilir basit şekerlere indirgenmekte ve mikrobiyal faaliyet sonucunda biyoetanol üretilmektedir. Bu enzim karışımlarında selülazlar, ksilanaz ve β -mannanaz bulunmaktadır. Bu sayede mannanlar ve lingoselülozik bileşenlerin neredeyse tamamı basit şekerlere indirgenmekte ve yenilenebilir kaynaklardan maksimum fayda sağlanmaktadır. Örneğin bu amaçla kullanılabilen palm çekirdeği ununda yüksek oranda glukoz ve galaktomannanlarda yüksek oranda heksoz şekeri bulunmaktadır. Palm

çekirdeği unu selüloz, β -mannanaz ve β -mannozidaz karışımı ile muamele edildiğinde verim 200 g etanol/kg palm çekirdeği unu olarak gerçekleşmiştir (van Zyl vd 2010).

2.10.6. Kâğıt endüstrisinde ve deterjan formülasyonlarında β -mannanaz kullanımı

Kâğıt hamurunun enzim uygulamasıyla ağartılması sürecinde β -mannanaz enzimi vasıtasıyla hamurdaki selüloza etki etmeden mannan bileşenlerinin ayrılması sağlanmaktadır. Kâğıt hamurunun ağartılmasında ağaç liflerinin uzaklaştırılması önemli bir yer tutmaktadır. Bu amaçla bazik çözeltiler de kullanılabilmesine rağmen bazik çözeltilerin kalıntıları doğaya zarar verebilmektedir. Bu nedenle de ksilanaz, β -mannanaz ve diğer enzimleri içeren bir karışım kullanılarak ligninin uzaklaştırılması sağlanmakta ve bu uygulama bazik çözeltilerle lignin uzaklaştırılması prosesine eşdeğer sonuçlar sağlamaktadır (van Zyl vd 2010).

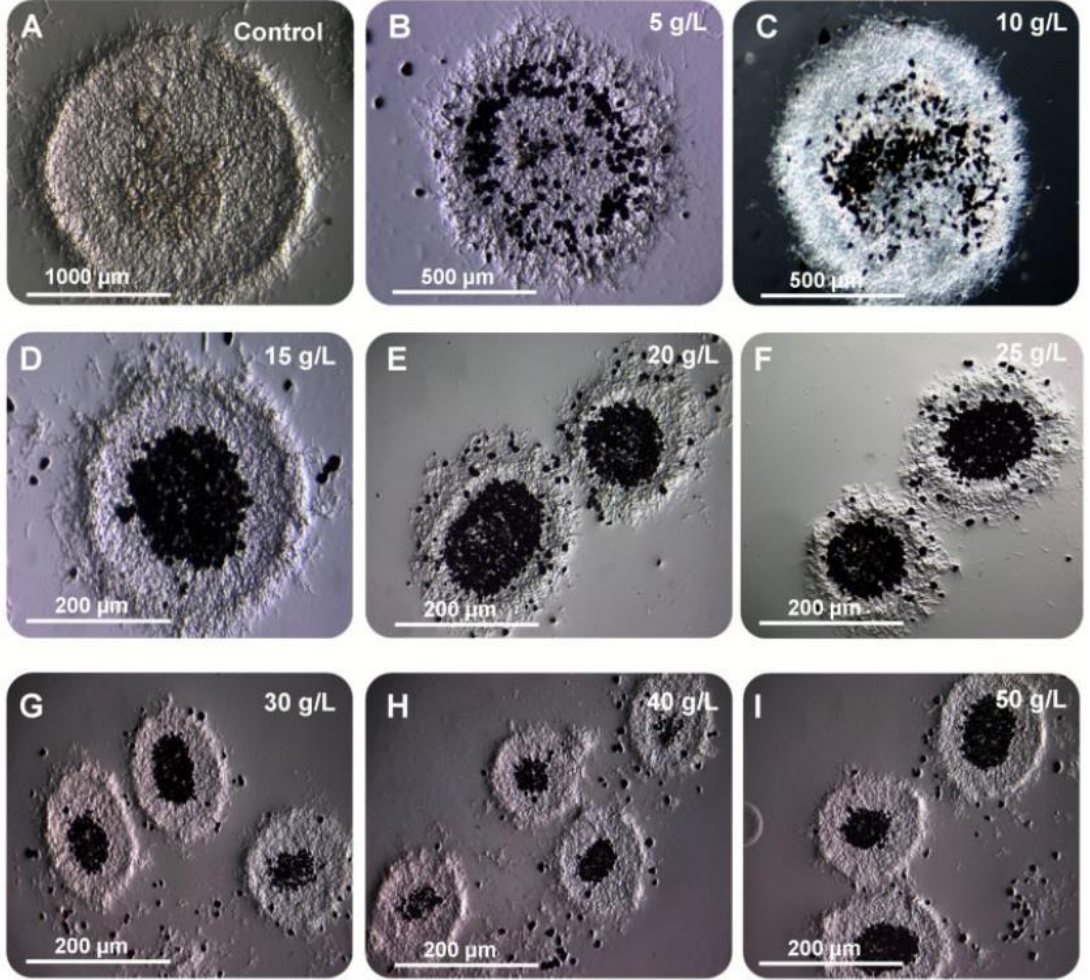
Kâğıt hamurundan lignin uzaklaştırılmasının yanı sıra deterjan formülasyonlarında da bazik β -mannanazlar leke çıkarıcı ajan olarak kullanılmaktadır. Bilindiği gibi dondurmalarda, soslarda, saç jellerinde, şampuanlarda, diş macunları vb ürünlerde gamlar kullanılmaktadır. Bu ürünlerin kıyafetlere bulaşması durumunda selüloza yüksek bağımlılık gösterdiğinden temizliğin başarı ile gerçekleşmesi zorlaşmaktadır. Bu nedenle de farklı konsantrasyon ve özelliklerdeki β -mannanazlar deterjan formülasyonlarına ilave edilmekte ve deterjanın temizleme kapasitesi artırılmaktadır (Chauhan vd 2012).

2.11. Fermentasyonlarda Mikropartikül Kullanımı

Çalkalamalı inkübatörde ve farklı tip biyoreaktörlerde gerçekleştirilen derin kültür fermentasyonlarında küfler iki farklı formda gelişebilirler. Bu formlar serbest hifler (mikroskopik pelletler) veya küresel hif yığınlarıdır (makroskopik pelletler). Bu gelişim farklılıkları küflerin birincil ve ikincil metabolit üretim eğilimlerini değiştirmektedir. Ancak bu formlardan hangisinin daha iyi sonuç vereceği bilinmemektedir (Gonciarz vd 2016). Burada temel sorun hiflerin gelişimlerinin kontrol altına alınmasının zor olması ve küf sporlarının bir diğer küf sporuyla birleşme eğiliminin çok yüksek olmasıdır. Bu durum ekstraselüler enzim üretimlerinde enzimin besiyerine geçişini zorlaştıran bir etki olabilmektedir. Bu durumun üstesinden gelebilmek ve küf sporlarının gelişimini kontrol altına alabilmek için son zamanlarda yeni bir yaklaşım ortaya konmuştur.

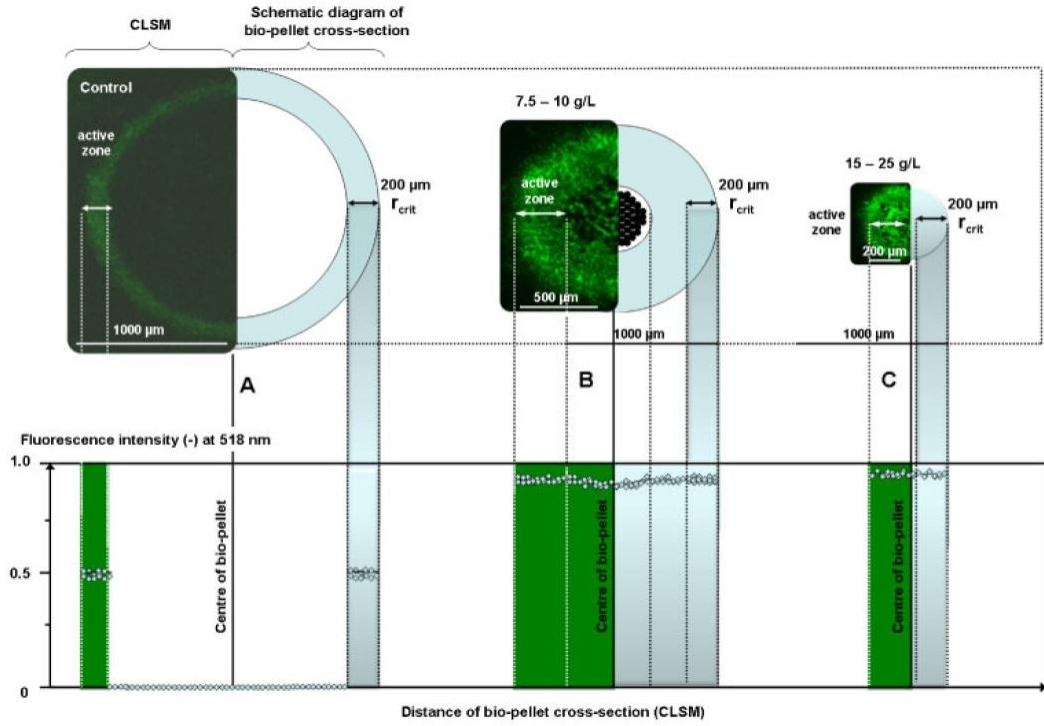
Bu yaklaşımın ana prensibi besiyeri ortamına sporların bileşmesini sınırlayan bir ajan ilave etmektir. Bu amaçla kullanılan ajanların başında sırasıyla alüminyum oksit ve magnezyum silikat gelmektedir. Besiyerine inokülasyondan hemen önce ilave edilen bu ajanlar pellet yapılarının içerisine girerek diğer hücrelerle birleşmeleri sınırlandırmaktadır. Genel olarak mikropartikül konsantrasyonu arttıkça hücre/pellet çapları da düşmektedir. Ancak hücre boyutundaki bu düşüş her zaman üretim değerlerinde artışla sonuçlanmamaktadır. Genellikle enzim üretimlerinde denenmeye başlanmış olan bu yöntemde en uygun mikropartikül konsantrasyonunun belirlenmesine çalışılmakta ve farklı fermentasyon teknikleri ile kombine edilerek üretim değerlerinin artması amaçlanmaktadır (Kaup vd 2008, Driouch vd 2010, Driouch vd 2012).

Burada temel amaç mikroorganizmaların gelişimi sağlanırken hücre boyutlarının kontrol altına alınması ve birbirlerine yapışarak gelişim özelliklerinin değişmemesidir. Bu nedenle ortama farklı miktarlarda mikropartikül eklenir ve filamentli fungusların gelişim süresince birbirlerine yapışmalarının minimum düzeyde kalması amaçlanır. Ortama inokulasyondan hemen önce ilave edilen mikropartiküller mikroorganizma tarafından pellet içerisine alınmakta ve mikropartikül konsantrasyonuna göre hücre boyutları sınırlanmaktadır (Driouch vd 2012) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Titanyum silikon oksit mikropartikülünün *Aspergillus niger* SKAn1015 morfolojisine etkisi (Driouch vd 2012)

Şekil 2.5'ten de rahatlıkla görüldüğü üzere mikropartikül konsantrasyonu arttıkça hücre çapları küçülmüştür. Hücre çaplarının küçülmesi sonucunda ise hücrenin hedef ürünü ürettiği aktif zonda artışlar gerçekleşmiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. *Aspergillus niger* ANip7-MCS-gfp2'nin farklı titanyum silikon oksit konsantrasyonlarında GFP üretiminde metabolik aktivite zonlarının karşılaştırılması (Konfokal lazer tarama mikroskobu) (Driouch vd 2012)

Burada kontrol fermentasyonunda ortamda mikropartikül yokken pellet boyutu büyük olmasına karşın aktif zonun yalnızca çepere yakın 200µm'lik bir bölge olduğu görülmektedir. Ancak 7,5-10 g/L titanyum silikon oksit ilavesi sonucunda pellet boyutu küçülmesine karşın aktif zon 500µm olarak belirlenmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda titanyum silikon oksit ilavesi sonucunda ise pellet boyutu küçülmeye devam etmiş ve kritik aktif zon değeri 200µm olarak belirlenmiştir. Hücre boyutunun küçülmesine karşın aktif zon oranının artmış olması sonucunda hücreler daha etkin çalışmakta ve hedeflenen ürünün üretim değerleri de artmaktadır. *Aspergillus niger*'in glukoamilaz üretiminde kullanıldığı bu çalışmada glukoamilaz aktivite değerleri kontrol ve 25 g/L titanyum silikon oksit için sırasıyla erlenmayer denemelerinde 15 U/ml ve 190 U/ml; kesikli biyoreaktör denemelerinde 50 U/ml ve 320 U/ml ve yarı-kesikli biyoreaktör denemelerinde ise 140 U/ml ve 1080 U/ml olarak elde edilmiştir (Driouch vd 2012). Aktif zonun önemi pellet yapıda gelişim gösteren küflerde kritik bir çap değerine kadar besin ve oksijenin kullanılabilir olmasıdır. Bu kritik zon değeri *Aspergillus niger* ile gerçekleştirilen çalışmada 200µm olmasına karşın titanyum silikon oksit ilavesi ile öncelikle bu zon değerinin artması ve belirli bir konsantrasyonun üzerinde de pellet yapıda gelişim gösteren hücrenin tamamının aktifleşmesi sağlanmıştır (Driouch vd 2012). Sonuç olarak kütle transfer değerleri artmış ve kontrole göre pelletin daha derinlerine penetrasyon gerçekleşmiştir.

Küflerle gerçekleştirilen enzim üretiminde mikropartikül kullanılarak gerçekleştirilen benzer çalışmalardan birinde *Caldariomyces fumago* kullanılarak klorperoksidaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla alüminyum oksit ve magnezyum

silikatın farklı konsantrasyonları denenmiş ve 10-12 günlük fermentasyon sonunda 1000 U/ml aktivite elde etmişlerdir (Kaup vd 2008).

Bir başka çalışmada ise alüminyum oksit ve magnezyum silikat mikropartiküllerinin de hücre çaplarını düşürerek üretimleri artırdığı ancak alüminyum oksitin daha yüksek konsantrasyonda kullanılması gerektiği belirlenmiştir (Driouch vd 2010). *Aspergillus ficuum* kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada ise alüminyum oksit ve magnezyum silikat kullanılarak erlenmayer (Coban vd 2015a) ve yarı-kesikli beslemeli ve sürekli (Coban vd 2015b) fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Erlenmayer fermentasyonlarında 15 g/L alüminyum oksit veya magnezyum silikat kullanıldığında hücre çapı değeri 800µm'den sırasıyla 500µm ve 200µm'ye düşerken enzim aktivitesi değeri ise 1,02 U/ml'den sırasıyla 2,01 U/ml ve 2,93 U/ml'ye çıktığı belirlenmiştir (Coban vd 2015a). Gerçekleştirilen sürekli fermentasyon denemeleri sonucunda ise üretim oranı değeri 0,293 U/ml/sa'den 0,621 U/ml/sa'e yükselmiştir (Coban vd 2015b).

2.12. Yapılmış Çalışmalar

Daha önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi β-mannanaz enzimi üretiminde çok farklı mikroorganizmalar ve fermentasyon teknikleri kullanılmıştır (Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3). Bu bölümde kullanılan mikroorganizmalardan bazılarında daha detaylı değinilmiştir.

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*'a aktarılmıştır. 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-mannanaz üretimi için 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 β-mannanaz aktivitesi 90 nkat/ml olarak belirlenmiştir (Ademark vd 1998).

Aspergillus terreus'dan fitaz ve β-mannanaz genlerinin *Pichia pastoris* üzerine aktarıldığı bir çalışmada, β-mannanazın enzim aktivitesi 39,7 U/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca bu enzimin pH 5,5-10,5 değerlerinde aktif olduğu görülürken, en yüksek aktivite değeri pH 7,5'da elde edilmiştir. Bunun yanında optimum çalışma sıcaklığının 55 °C olduğu bildirilmiştir (Huang vd 2007).

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 erlenmayerlerde fermentasyon çalışmasını gerçekleştirmişlerdir ve en yüksek β-mannanaz aktivitesini 198,2 U/ml olarak belirlemişlerdir.

Chen vd (2007) yaptıkları çalışmada *Pichia pastoris*'e *Aspergillus sulphures*'un ifade ettiği β -mannanaz geni aktarılmış ve keçiboynuzu gamı için ifade edilen spesifik aktivite 366 U/mg olarak bulunmuştur. Ozturk vd (2010) yapmış olduğu bir çalışmada, *Aspergillus sojae* 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 β -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 erlenmayerlerde fermentasyon gerçekleştirmişlerdir ve süpernatanta herhangi bir saflaştırma işlemi uygulamadan elde edilen en yüksek β -mannanaz aktivitesini 430,9 U/mg olarak elde etmişlerdir. Wu vd (2011) yapmış oldukları bir çalışmada da, *Aspergillus niger* E-30 mutant suşu kullanmış ve en yüksek β -mannanaz aktivitesi değeri, 1067,5 U/mg olarak keçiboynuzu gamına karşı saflaştırılmış enzim solüsyonu ile elde etmiştir.

Zheng vd (2012) CSD besiyeri ortamı (mısır sarp likörü toz glukozu) kullanarak yapmış oldukları erlenmayer fermentasyonu denemelerinde en yüksek β -mannanaz aktivitesini 513,3 U/ml olarak bildirmişlerdir. Yin vd (2012) β -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.

Bu tez kapsamında küflerin biyoreaktörde gelişim sorunlarını çözmek adına öncelikle yeni bir yaklaşım olan mikropartikül kullanımı ile fermentasyonların gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Öncelikle erlenmayer fermentasyonları ile alüminyum oksit ve magnezyum silikat için en uygun konsantrasyonların belirlenmesi ve ardından bu konsantrasyonlar kullanılarak biyoreaktör denemelerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Ardından üretilen enzimin fermentasyon ortamından farklı santrifüj ve ultrafiltrasyon uygulamaları ile konsantre halde elde edilmesi, elde edilen enzimin dondurarak kurultulması ve enzimin optimum çalışma ve karakterizasyon çalışmalarının yürütülmesi amaçlanmıştır. Tüm bu hedeflerin detayları ve izlenecek yol, materyal ve metot kısmında detaylı olarak verilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Proje kapsamında kullanılan kırılmış ve çekirdeği çıkarılmış keçiboynuzu meyvesi, Antalya’da keçiboynuzu meyvesini ve işlenmiş ürünlerini ihraç eden Yenigün Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş.’den temin edilmiştir. Keçiboynuzu meyvesi ekstraksiyon amacıyla kullanılabileceği kadar 4°C’de depolanmıştır.

3.2. Keçiboynuzu Ekstraktı Eldesi

Keçiboynuzu meyvesinden β -mannanaz enzimi üretiminde fermentasyonlarda kullanılacak ekstraktın üretimi için 5-7 mm kalınlığındaki keçiboynuzu parçaları 1:4 meyve:su oranında 80°C’de 2 saat süre ekstraksiyona bırakılmıştır (Turhan vd 2010a). Ekstraksiyon süresince karışım her 15 dakikada bir karıştırılmıştır. Elde edilen ekstrakt kaba filtrasyon yoluyla katı partiküllerinden arındırılmıştır. Ekstraktın şeker konsantrasyonu deiyonize su ile seyreltilerek 40 g/L’ye ayarlanmıştır. Ayrıca yarı-kesikli beslemeli fermentasyonlar için de 10°Bx keçiboynuzu ekstraktı karbon kaynağı stoğu olarak kullanılmıştır. Tüm fermentasyon denemelerinde kullanılacak olan ekstraktlar taze olarak hazırlanmış ve bekletilmeden sterilize edilerek kullanılmıştır.

3.3. Kullanılan Mikroorganizma

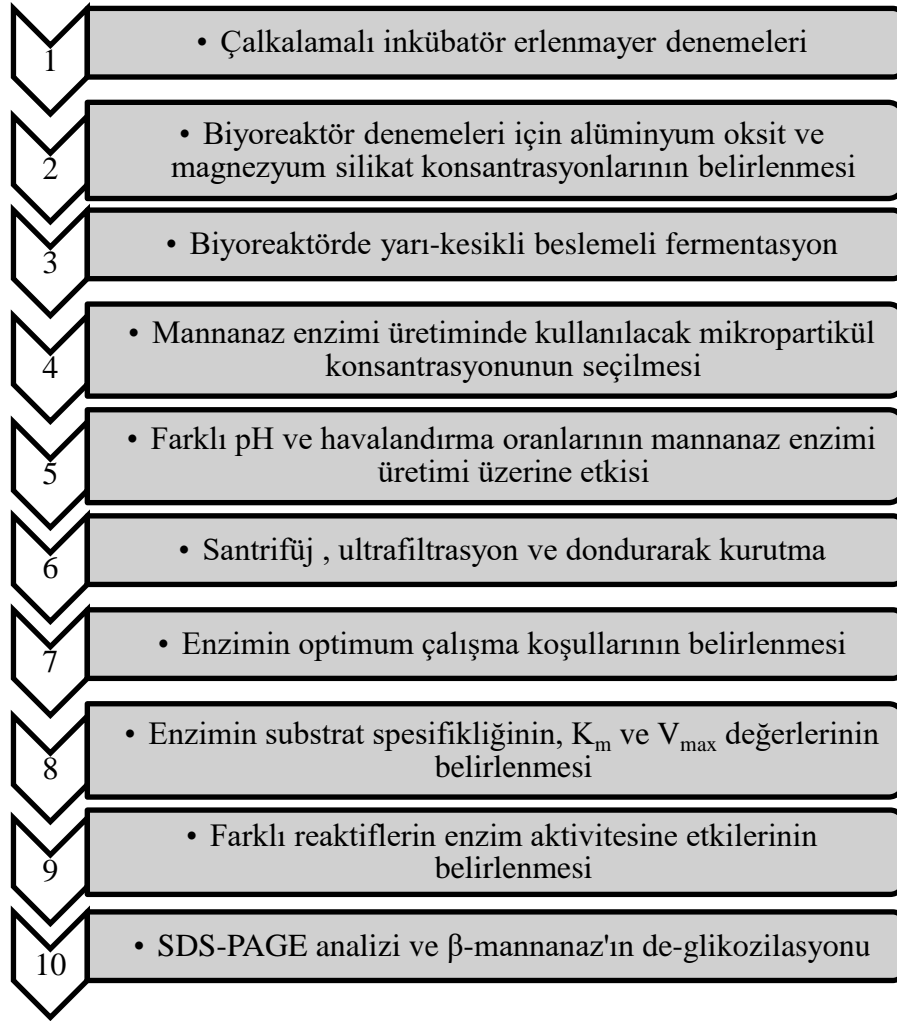
β -mannanaz üretiminde kullanılan rekombinant *Aspergillus sojae* AsT1 (Duruksu vd 2009), Prof. Dr. Zümrüt Begüm Ögel’in laboratuvarından temin edilmiştir. Rekombinant *Aspergillus sojae* AsT1 için stok kültürler, Potato Dextrose Agar (PDA) içeren petrilere 30°C’de 4-5 gün geliştirilmiş ve 4°C’de en fazla 1 ay depolanmıştır. Stok kültürlerin canlılığını devam ettirebilmesi için her ay periyodik olarak yenilenmiştir. Tüm fermentasyon denemelerinde ise Çizelge 3.1’de verilen keçiboynuzu besiyeri kullanılmıştır (Ozturk vd 2010).

Çizelge 3.1. Keçiboynuzu besiyeri bileşimi

Bileşen	Miktar (g/L)
Keçiboynuzu ekstraktı	100 ml veya 1,5 L (4 °Bx)
Maya ekstraktı	4,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
K ₂ HPO ₄	1,0

3.4. β -mannanaz Üretimi ve Saflaştırılması Deneme Deseni

Rekombinant *Aspergillus sojae* kullanılarak gerçekleştirilen β -mannanaz enzimi üretimi ve saflaştırılmasında kullanılan deneme deseni Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Rekombinant *Aspergillus sojae* β -mannanaz üretimi ve saflaştırılmasında kullanılan deneme deseni

Bu tez çalışmasında santrifüj, saflaştırma, SDS-PAGE, glikozilasyon ve liyofilizasyon aşamaları TÜBİTAK 1001-1120167 numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerin bazıları bu tez kapsamında Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri FDK-2015-681 numaralı proje kapsamında yeniden tasarlanmış, üretim denemeleri geliştirilmiş, santrifüj, ultrafiltrasyon, enzim karakterizasyonu ve substrat spesifikliği denemeleri tekrarlanmıştır.

3.5. Biyoreaktör Denemeleri İçin Mikropartikül Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Fermentasyon ortamındaki besin maddelerinin rekombinant *Aspergillus sojae* tarafından daha etkin kullanımını sağlamak ve fermentasyon ortamında küfler tarafından oluşturulan hiflerin bağımsız olarak çalışmasını gerçekleştirmek için fermentasyon ortamına mikropartiküller eklenerek fermentasyon etkinliğinin artırılması amaçlanmıştır (Kaup vd 2008, Driouch vd 2010, Driouch vd 2012). Bu amaçla öncelikle erlenmayer

denemeleri gerçekleştirilmiş ve reaktör denemelerinde kullanılacak olan 3'er adet mikropartikül konsantrasyonu seçilmiştir.

Mikropartiküllerin fermentasyon ortamına ilave edilmeden önce kendi özel tamponunda hazırlanması ve sterilize edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle erlenmayer denemeleri için farklı konsantrasyonlarda alüminyum oksit (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 g/L) 100 mM sitrat tamponunda (pH:6,5) (Kaup vd 2008) ve magnezyum silikat (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 g/L) 50 mM Na-asetat tamponunda (pH:6,5) (Driouch vd 2010) hazırlanmıştır. Hazırlanan mikropartiküller 121,1°C'de 20 dakika sterilize edildikten sonra yukarıda bileşimi verilen zenginleştirilmiş keçiyoynuzu ekstraktına inokülasyondan hemen önce ilave edilmiştir. Rekombinant *Aspergillus sojae* sporları fermentasyon ortamına süspansiyon halinde inoküle edilmiş (%1- en az 1×10^7 spor içerecek şekilde) ve 30°C'de 200 d/d hızda fermentasyon başlatılmıştır (Ozturk vd 2010). 10 günlük deneme süresince alınan örneklerde enzim aktivitesi, kalıntı şeker analizi ve görüntüleme analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda her bir mikropartikül için en yüksek verimin elde edildiği 3 konsantrasyon belirlenmiş ve biyoreaktör denemelerinde bu konsantrasyonlar kullanılmıştır.

3.6. Biyoreaktörde Yarı-Kesikli Beslemeli Fermentasyon

β -mannanaz enzimi ölçek büyütme denemeleri laboratuvar tipi; pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen ve köpük kontrolü yapabilen, karıştırma özelliğine sahip biyoreaktörde (Sartorius Biostat B, Germany) gerçekleştirilmiştir. Tüm biyoreaktör denemeleri 1,5L çalışma hacminde, 30°C sıcaklıkta, 1 l/d havalandırma oranı ve minimum 400 d/d'de gerçekleştirilmiştir (Başlangıç karıştırma hızı tüm denemelerde 400 d/d olarak ayarlanmıştır. Hücre gelişimine bağlı olarak ikinci günden sonra kademeli olarak arttırılarak maksimum 550 d/d'ya çıkarılmıştır. Daha yüksek karıştırma değerlerine, hücrelerin gelişimi olumsuz etkilendiğinden çıkılmamıştır).

Ekstraksiyon sonrası süzülen keçiyoynuzu ekstraktının çözünür kuru maddesi ayarlanıp zenginleştirme işlemi tamamlandıktan sonra biyoreaktör 121,1°C'de 20 dk sterilize edilmiş olup, pH kontrollü çalışmalarda 2N NaOH ve 2N HCl kullanılmıştır. Gerekli olması halinde köpük önleyici ajanlar da kullanılmış ve fermentasyonun stabil bir şekilde devam etmesi sağlanmıştır. Biyoreaktör denemeleri için erlenmayer denemelerinde olduğu gibi besiyeri ve mikropartiküller ayrı ayrı hazırlanmış ve inokülasyondan hemen önce mikropartiküller fermentasyon ortamına eklenmiştir.

Biyoreaktörde gerçekleştirilen denemelerde alınan örnekler hemen analiz edilmiş ve şeker konsantrasyonu takip edilmiştir. Şeker konsantrasyonu 5 g/L'nin altına düştüğü durumlarda hemen taze ve steril 10 °Bx keçiyoynuzu ekstraktından 80-100 ml ilave edilerek fermentasyon ortamında şeker konsantrasyonu 5-5,5 g/L değerine getirilmiştir. Bu işlem 24 saat sonra da tekrarlanmış ve ikinci beslemeden sonra fermentasyon işlemi 9. günde sonlandırılmıştır. Biyoreaktörden alınan örneklerde hücre morfolojisi, enzim aktivitesi ve kalıntı şeker miktarı analizleri gerçekleştirilmiştir.

Yarı-kesikli biyoreaktör denemelerinin başarıyla tamamlanmasından sonra farklı pH'larda (pH 4, pH 5, pH 6 ve pH 7) ve havalandırma değerlerinde (0,5, 1 ve 1,5 l/d) fermentasyonlar da gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerle pH kontrolünün ve havalandırma

oranlarının fermentasyon üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca tüm fermentasyon denemeleri 3'er tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.7. Santrifüj ve Ultrafiltrasyon

Üretimde en etkin yolun belirlenmesi amacıyla çalkalamalı inkübatörde kesikli fermentasyon ve biyoreaktörde yarı-kesikli fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Ardından elde edilen fermente sıvıya farklı metotlar uygulanarak elde edilen ham enzim solüsyonunun safsızlıklardan arındırılması ve kısmen konsantre edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir.

Santrifüj işleminin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 3 farklı çevirme hızı (7000, 10000, 15000 d/d) ve 3 farklı süre (5, 10, 15 dakika) kombinasyonları kullanılmıştır. İşlem sonrası süpernatanttan örnek alınmış ve enzim aktivitesi analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca alınan örneklerde toplam protein analizi gerçekleştirilerek saflaştırma katsayısı hesaplanmış ve santrifüj işleminin konsantrasyon amacıyla kullanılabilirliği belirlenmeye çalışılmıştır.

Santrifüj işleminden sonra elde edilen berrak kısımdan daha konsantre enzim solüsyonu elde etmek amacıyla laboratuvar tipi Sartocoon Slice 200 model (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) cihaz ile ultrafiltrasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 30 kDa ve 10 kDa'luk ayırma sınırlarına sahip ultrafiltreler seçilmiştir. Ultrafiltrasyon işlemi için membran takıldıktan sonra 500 ml deiyonize su geçirilerek membran stok solüsyonunun uzaklaşması sağlanmıştır. Ardından deiyonize su ile sistemin sıcaklığı oda sıcaklığına getirilmiştir. Ardından örnek sistemden geçirilmeye başlanarak retentat ve permeattan 100 ml örnek atılmıştır. Sistem örnekle yıkandıktan hemen sonra ultrafiltrasyon işlemine 1000 ml ham enzim solüsyonu ile başlanmıştır. Ultrafiltrasyon işlemi 900 ml permeat ve 100 ml retentat kalıncaya kadar devam edilmiştir. Böylelikle hacmen %90 permeat ve %10 retentat olacak şekilde ultrafiltrasyon işlemi tamamlanmıştır. Permeat ve retentattan alınan örneklerde enzim aktivitesi ve toplam protein analizleri yapılarak saflaştırma etkinlik katsayısı belirlenmiş ve işlemin etkinliği ortaya konmuştur.

Ultrafiltrasyon işlemi sonrası temizlik için sistemden 200-300 ml deiyonize su geçirilmiştir. Ardından 45-50°C'deki 1N NaOH çözeltisi sistemden 1 saat sirküle edilmiştir. 1 saat sonunda NaOH çözeltisi permeat vanası açılarak atılmıştır. Sistemden 600 ml deiyonize su geçirilerek NaOH çözeltisinin kartuşlardan tamamen uzaklaşması sağlanmıştır. Son olarak %20'lik etanol:su çözeltisinden 500 ml sistemden geçirilerek kartuş %20'lik etanol:su çözeltisinde +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Tüm santrifüj ve ultrafiltrasyon işlemleri de 3'er tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.8. β -mannanaz Aktivitesi Analizi

Fermentasyon, ultrafiltrasyon ve santrifüj sonrası alınan örneklerde β -mannanaz aktivitesi değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla endo- β -1,4 β -mannanaz aktivitesi DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) metodu kullanılmıştır. Öncelikle Na-sitrat tamponunda (pH 6) keçiboynuzu gamı solüsyonu (%0,05 w/v) hazırlanmış ve belirtilen solüsyonun 1,8 ml'si ile 0,2 ml 20 kat seyreltilmiş fermentasyon örneklerinin berrak kısmı bir test tüpünde

karıştırılmıştır. Su banyosunda 50°C’de 5 dk inkübasyona bırakılan örneklere 3 ml DNS çözeltisi eklenmiş ve tüpler daha sonra 90°C’lik su banyosunda 15 dk kaynatılarak soğutulmak üzere buz banyosuna aktarılmıştır. Elde edilen örnekler 540 nm’de spektrofotometrede ölçülmüş ve değerler mannoz standart kurvesinden faydalanılarak aktivite belirlenmesinde kullanılmıştır (Puchart vd 2004).

Enzim analizinde kullanılmak üzere hazırlanan mannoz standart kurvesi Ek-1’de verilmiş olup bu kurveden faydalanılarak oluşturulan denklemler aşağıda verilmiştir.

$$C_{\text{mannoz}} = a \times \text{Abs}_{540} - b \longrightarrow C_{\text{mannoz}} = 3,4522 \times \text{Abs}_{540} - 0,0607$$

C_{mannoz} = mannoz konsantrasyonu ($\mu\text{mol/ml}$)
 Abs_{540} = 540 nm’de okunan absorbans değeri
 a = standart kurvenin eğimi; b = sabit sayı

Abs_{540} değerinin hesaplanmasında [$\text{Abs}_{\text{örnek}} - (\text{Abs}_{\text{substratblank}} + \text{Abs}_{\text{enzimblank}})$] denkleminde yararlanılarak substrat ve enzimin analize etkisi sıfırlanmaktadır. Burada; $\text{Abs}_{\text{örnek}}$ için enzim analizinde substrat ile 20 kat seyreltilmiş fermentasyon örneği karıştırılarak inkübe edilmiştir. $\text{Abs}_{\text{substratblank}}$ için ise 20 kat seyreltilmiş substrat örneği ilave edilmiş ve inkübe edilmiştir. $\text{Abs}_{\text{enzimblank}}$ için ise substrat üzerine 20 kat seyreltilmiş fermentasyon örneği ilave edilmiş ve inkübe edilmeden direkt DNS eklenerek renk değişimi sağlanmıştır. Açıklamak gerekirse; $\text{Abs}_{\text{enzimblank}}$ ortamda bulunan şekerden kaynaklı abs değerini, $\text{Abs}_{\text{substratblank}}$ enzim analizinde kullanılan substrattan kaynaklı abs değerini ve $\text{Abs}_{\text{örnek}}$ ise fermentasyon örneğindeki enzim aktivitesi ve ortamdaki şeker ve enzimin abs değerini ifade etmektedir. Sonuç olarak Abs_{540} yukarıdaki denklik kullanılarak belirlenmiş ve yalnızca enzim aktivitesinden kaynaklı abs değişimi belirlenerek enzim aktivitesi değerleri hesaplanmıştır (Burada kör olarak 2 ml su+3 ml DNS kullanılmıştır).

Abs_{540} değerinin hesaplanmasında bir diğer yol [$\text{Abs}_{\text{örnek}} - \text{Abs}_{\text{enzimblank}}$] şeklindedir. Burada temel fark körün hazırlanmasıdır. Öyle ki analizde kör 1,8 ml LBG (%0,05), 0,2 ml su ve 3 ml DNS olarak hazırlandığında substrattan kaynaklı abs değişimi körde de gerçekleştiğinden yalnızca fermentasyon sıvısındaki şekerden kaynaklı abs değişiminin belirlenmesi yeterli olacaktır. Bu amaçla yukarıda açıklanan $\text{Abs}_{\text{enzimblank}}$ prosedürünün uygulanması ve $\text{Abs}_{\text{örnek}}$ ’den çıkarılmasıyla Abs_{540} değeri hesaplanmış olacaktır.

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

R_v = Test tüpündeki toplam solüsyon hacmi / enzim solüsyonunun hacmi

DF = Dilüsyon faktörü

t = Reaksiyon süresi (dk)

3.9. Kalıntı Şeker Analizi

Fermentasyon örneklerinde kalıntı şeker miktarı analizleri DNSA (3,5-dinitrosalisilik asit) analiz metodu ile belirlenmiştir (Miller 1959). Öncelikle analizde kullanılacak çözeltiler; DNSA çözeltisi (10 g/L NaOH, 10 g/L DNSA ve 0,5 g/L

sodyumsülfite), Rachele tuz çözeltisi (%40'lık potasyum sodyum tartarat) ve 5N KOH hazırlanmıştır.

Analizin yapılışı: 0,1 ml örnek, 3,9 ml deiyonize su ve 0,08 ml 12M HCl asit deney tüpünde karıştırılarak 90°C'lik su banyosunda 10 dk bekletilerek hidrolizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu noktada tüp içerisindeki örneklerin hidroliz sıcaklığında olmasına dikkat edilmiştir. Sıcaklığı kontrol etmek amacıyla termometre yerleştirilmiş bir tüp kontrol olarak kullanılmıştır. Metotta belirtilen sıcaklığa ulaşıldıktan sonra süre başlatılmıştır. Daha sonra hidrolizat üzerine 0,2 ml 5N KOH eklenerek nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen karışımdan yeni bir tüpe 3 ml alınarak üzerine 3 ml DNSA solüsyonu eklenmiş ve renk değişiminin gerçekleşmesi için karışım vorteksledikten sonra 90°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Ardından renk stabilizasyonu amacıyla 1 ml %40 Rachele tuz çözeltisi eklenerek soğutulmuş ve 575 nm dalga boyunda okuma yapıp Ek-2'de verilmiş olan standart sakkaroz çözeltisi ile hazırlanmış kurveden şeker miktarı hesaplanmıştır.

Sakkaroz standart kurvesinden yararlanılarak oluşturulan denklem ve detayları aşağıdaki gibidir.

$$C_{\text{şeker}} = a \times Ab_{575} + b \longrightarrow C_{\text{şeker}} = 57,298 \times Ab_{575} + 0,3979$$

$C_{\text{şeker}}$ = şeker konsantrasyonu (g/L)

Ab_{575} = 575 nm'de okunan absorban değer

a = standart kurvenin eğimi; b = sabit sayı

3.10. Toplam Protein Analizi

Ultrafiltrasyon ve santrifüjün etkinliğinin belirlenmesi için toplam protein analizi yapılmıştır. Bu amaçla Thermo Scientific Coomassie (Bradford) Protein Assay kit kullanılmıştır. Bu kitin içeriği şu şekildedir:

Coomassie (Bradford) Protein Assay Reagent (950 ml): Suda hazırlanmış Coomassie G-250 boyası, metanol, fosforik asit ve çözüldürücü ajanlar.

Albümin standart ampülleri (2 mg/ml, 10 ampül): %0,9 tuz ve %0,05 sodyum azit solüsyonunda hazırlanmış 2 mg/ml konsantrasyonda bovine serum albümin.

Analizin yapılışı: 0,03 ml standart veya örnekle 1,5 ml Coomassie Reagent tüpte karıştırılmıştır. Daha stabil ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından standart ve örneklerin tamamı 595 nm'de okutulmuştur. Blank ile düzeltilmesi yapılmış standart absorbanları kullanılarak standart kurve çizdirilmiş ve diğer örneklerin toplam protein miktarı µg/ml olarak hesaplanmıştır.

3.11. Görüntüleme Analizi

Tüm fermentasyon denemelerinde hücre morfolojisinin belirlenmesi amacıyla Stemi 2000-C ve AxioCam ERc5s (Zeiss, Germany) stereomikroskop sistemi

kullanılmıştır. Görüntüleme analizleri erlenmayer ve biyoreaktör örneklerinin tamamında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla fermentasyon ortamından alınan örnekler santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve elde edilen hücreler deiyonize su ile en az iki kez yıkanmıştır. Ardından başlangıç hacmine deiyonize su ile seyreltilen örnekler stereomikroskopta analiz edilmiştir. Örneklerin görüntüleme işlemleri sonucunda hücrelerin pellet veya misel yapıda olup olmadıkları tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra hücre çapları ImageJ programı (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) kullanılarak hesaplanmıştır. Program sayesinde görüntüde yer alan tüm hücrelerin çapları ölçülmüş ve istatistiksel hesaplamalar için örneklem genişletilmiştir.

3.12. SDS-PAGE Analizi

SDS-PAGE analizinin başarıyla gerçekleştirilebilmesi için aşağıdaki çözeltiler hazırlanmıştır.

4X Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-Cl pH 8,8): 12,1 g Tris-Base tartılarak deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. HCl ile pH ayarlanmıştır.

8X Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-Cl pH 6,8): 12,1 g Tris-Base tartılarak deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. HCl ile pH ayarlanmıştır.

%30 Akrilamid Karışımı: 2,9 g akrilamid ve 0,1 g N,N'-metilen bisakrilamid tartılarak deiyonize su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım amber renkli şişede +4°C'de muhafaza edilmiştir.

%20 APS (Amonyum peroksidisülfat): 30 mg APS tartılarak 150µl deiyonize su ile karıştırılmıştır. Kullanım öncesi taze olarak hazırlanmıştır.

1 M DTT: 1,55 g DTT tartılarak 10 ml nükleaz içermeyen deiyonize suda çözündürülmüştür. 0,5 ml santrifüj tüpüne alikotlanmış ve -20°C'ye kaldırılmıştır.

4X SDS Jel Yükleme Tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6,8, %8 SDS, %0,4 Bromfenol mavisi, %40 Gliserol): 2 ml 1 M Tris-Cl pH 6,8, 4 ml %20 SDS, 40 µg bromfenol mavisi ve 4 ml %100 gliserol karıştırılarak hazırlanmıştır.

5X TGS Tamponu (0,025 M Tris-Base, 0,192 M Glisin, %0,1 SDS pH 8,3): 15,1 g Tris-Base, 94 g glisin ve 5 g SDS tartılmış ve 1000 ml'ye deiyonize su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

10X TG Tamponu (1,92 M Glisin, 0,25 M Tris-Base): 144 g glisin ve 30,3 g Tris-Base tartılmış ve 1000 ml'ye deiyonize su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

Staining solüsyonu: %0,1 Coomassie Blue R250; %10 asetik asit, %50 metanol ve %40 deiyonize su içinde hazırlanmıştır.

Destaining solüsyonu: %10 asetik asit, %20 metanol ve %70 deiyonize su karıştırılarak hazırlanmıştır.

SDS-PAGE protokolü:

1. Jel kaseti hazırlanmış ve tarağın 0,5 cm altı işaretlenerek tarak çıkartılmıştır.
2. Ayırma jeli; 4,1 ml deiyonize su, 3,3 ml %30 akrilamid karışımı, 2,5 ml 4X Ayırma jeli tamponu, 50 µl %20 SDS, 50 µl %20 APS ve 4 µl TEMED karıştırılarak hazırlanmıştır.
3. Hazırlanan ayırma jeli işaretli yere kadar şırınga yardımıyla hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülmüştür.
4. Şırınga yardımıyla jelin üzeri saf su ile kaplanmıştır ve 45 dk jelin polimerize olması beklenmiştir.
5. Kaset yan yatırılmış ve eklenen suyun tamamı uzaklaştırılmıştır.
6. Yükleme jeli; 3,45 ml deiyonize su, 850 µl %30 akrilamid karışımı, 625 µl 8X yükleme jeli tamponu, 25 µl %20 SDS, 25 µl %20 APS ve 5 µl TEMED karıştırılarak hazırlanmıştır.
7. Cam plakalar arasında kalan boşluk yükleme jeli ile doldurulmuştur.
8. 45 dk jelin polimerize olması beklenmiştir.
9. Bu bekleme süresince 7 µl 4X SDS Jel yükleme tamponu, 20 µl örnek ve 2,5 µl 1M DTT karıştırılarak örnekler hazırlanmıştır.
10. Örnekler ısı bloğunda 70°C'de 10 dk bekletilmiştir.
11. Yükleme jeli katılınca tarak çıkartılmış ve jel tankı 1X yürütme tamponu (TGS) ile doldurulmuştur.
12. Kuyucuk boşluklarındaki hava kabarcıklarını çıkarmak ve kuyuları belirginleştirmek için kuyucuklar tamponla yıkanmıştır.
13. Jel elektroforez işlemi için OWL P8D8 (Thermo Scientific) cihazı kullanılmıştır.
14. Jele örnekler yüklenmeden önce 150V'da 15-20 dk ön yürütme yapılmıştır.
15. 15-20 µl örnek kuyucuklara yüklenmiştir. Ayrıca ilk ve son kuyucuklara markır yüklenmiştir.
16. Boya jelin altına ulaşınca kadar 1-1,5 sa 150V'da yürütülmüştür.
17. Cam plakalar ayrılmış ve jelin 1 numaralı örneğin yüklendiği kısım işaretlenmiştir.
18. Cam petri içinde deiyonize su ile 10-15 dk çalkalayıcıda yıkanmıştır.
19. Su dökülmüş ve jelin üzerini kapatacak kadar staining solüsyonu eklenerek 1 saat çalkalanarak jel boyanmıştır.
20. Ardından staining solüsyonu dökülmüştür. Destaining solüsyonu eklenmiş ve ara sıra değiştirilerek 1 saat boyanın uzaklaşması için çalkalayıcıda karıştırılmıştır.
21. Boya giderildikten sonra deiyonize suda jel eski haline gelene kadar karıştırılmış ve görüntüsü LiCor (Odyssey) cihazı kullanılarak alınmıştır.

3.13. Enzimin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Üretilen enzimin optimum çalışma koşullarını belirlemek amacıyla öncelikle pH 3,0-9,0 aralığında %0,5'lik keçiyoynuzu gamı solüsyonu hazırlanmıştır. Keçiyoynuzu gamı solüsyonunun hazırlanmasında farklı pH tamponları; sodyum sitrat (pH 3,5-6), sodyum asetat (pH 4,0-5,5), MOPS (pH 6,0-8,0), sodyum fosfat (pH 6,0-8,0), CHES (pH

8,0-10,0) ve CAPS (pH 9,0-11,0) kullanılmıştır. Farklı pH'larda hazırlanan keçiyoynuzu gamı solüsyonu enzim analizinde substrat olarak kullanılmış ve enzim aktivitesi analizleri yapılmıştır (Duruksu vd 2009).

Optimum çalışma pH'sının belirlenmesinden sonra enzimin farklı sıcaklıklardaki aktivite değişimi belirlenmiştir. Bu amaçla 30-80°C aralığındaki farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesi analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak enzimin optimum çalışma sıcaklığı belirlenmiştir (Duruksu vd 2009).

3.14. Enzimin Substrat Spesifikliğinin ve Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Üretilen enzimin substrat spesifikliğinin belirlenmesinde enzimin etki edebileceği substratlar önceden belirlenir ve hazırlanan substrat ekstraktları enzim ile muamele edilerek parçalanma ürünlerine bakılır. β -mannanaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla da substrat olarak keçiyoynuzu gamı, guar gam, karboksimetilselüloz, nişasta ve jelatin kullanılmıştır (Katrolia vd 2012). Her substrattan 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 16 ve 20 mg/ml konsantrasyonlarında hazırlanmış ve enzim aktivitesi analizlerinde substrat olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar vasıtasıyla substrat-enzim aktivitesi grafiği GraphPad PRISM 6 kullanılarak oluşturulmuştur. Oluşturulan grafikten enzimin substrat afinitesi (ilgisi) ve enzimin hızı hakkında bilgi veren K_m (Michaelis Menten sabiti) ve V_{max} (Maksimum enzim hızı) değerleri hesaplanmıştır.

3.15. Farklı Reaktiflerin Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi

Saflaştırılmış ve aktivite değeri analizle belirlenmiş olan enzim preparatının farklı reaktiflerle muamelesi sonrası aktivite değerlerindeki değişimin belirlenmesi amacıyla farklı iyonlar varlığında denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 1 mM hazırlanan metal iyonları (K^+ , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Li^+ , Mn^{2+} , Ag^+) ve metal şelat ajanı (EDTA) ile enzimin optimum çalışma sıcaklığında ve pH solüsyonunda 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra enzim aktivitesi analizi yapılarak enzimin aktivite kaybı veya artışı belirlenmiştir (Katrolia vd 2012).

3.16. β -mannanazın De-glikozilasyonu

β -mannanaz enziminin aktif uçlarına herhangi bir maddenin bağlanıp bağlanmadığını tespit etmek amacıyla de-glikozilasyon analizi yapılmıştır. 10 μ g β -mannanaz enzimi 100°C'de denatüre edildikten sonra 250 U endo- β -N-asetilglikozaminidaz ile 2 saat 37°C'de muamele edilmiş ve sonra SDS-PAGE'de kontrol örneğine karşı analiz edilmiştir (Katrolia vd 2012).

3.17. Dondurarak Kurutma

Elde edilen yığın (bulk) enzim solüsyonundan toz enzim preparatı üretmek amacıyla dondurarak kurutma prosesi uygulanmıştır. Bu amaçla farklı formülasyonlarda karışımlar hazırlanmıştır. Sırasıyla 200 mM sakkaroz; 200 mM sakkaroz+%1 BSA (Bovine serum albümin); 200 mM sakkaroz+%0,5 jelatin; 200 mM sakkaroz+%1 PEG (Polietilen glikol) olmak üzere dört farklı formülasyon denenmiştir. Hazırlanan

liyofilizasyon stabilizatörleri eşit oranda enzim preparatı ile karıştırıldıktan sonra dondurarak kurutma prosesine tabii tutulmuştur. Bu amaçla laboratuvar tipi dondurarak kurutucu (LABCONCO, Freezone 2,5 Plus, USA) kullanılmış olup çalışma şartları; -85 °C, 200 mTorr'da 2 saattir. Liyofilizasyon sonrası elde edilen üründen fosfor pentoksit ile vakumlu desikatörde 7 gün oda sıcaklığında muhafaza edilerek su uçurulmuştur. Elde edilen üründe enzim aktivitesi analizi yapılarak dondurarak kurutmanın etkinliği belirlenmiştir (Srirangsan vd 2011).

3.18. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Reaktörden alınan örneklerde şeker ve β -mannanaz aktivitesi analizleri yapıldıktan sonra elde edilen veriler doğrultusunda;

- ❖ Şeker tüketimi (g/L)
- ❖ β -mannanaz aktivitesi (U/ml)
- ❖ Maksimum tüketim oranı (g/L/gün)
- ❖ Maksimum üretim oranı (U/ml/gün)
- ❖ Verim ($Y_{P/S}$) (U/g)

kinetik parametreleri belirlenmiştir.

Hesaplamalar S (substrat) ve P (ürün) olmak üzere aşağıdaki denklemlerden yararlanılarak hesaplanmıştır.

Gelişmenin sonunda şeker tüketimi;

$$S = S_1 - S_0 \text{ olup g/L olarak hesaplanmıştır.}$$

Gelişmenin sonunda ürün miktarı;

$$P = P_1 - P_0 \text{ olup g/L olarak hesaplanmıştır.}$$

Bunların yanı sıra maksimum üretim ve tüketim oranları da;

Maksimum üretim oranı (g/L/sa) = β -mannanaz aktivitesi kurvesinin en dik kısmının eğimi,

Maksimum tüketim oranı (g/L/sa) = Şeker kurvesinin en dik kısmının eğimi,

Verim ($Y_{P/S}$) (U/g): Enzim aktivitesi/Tüketilen toplam şeker konsantrasyonu

denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır (Shuler ve Kargi 2008).

3.19. İstatistiksel Analizler

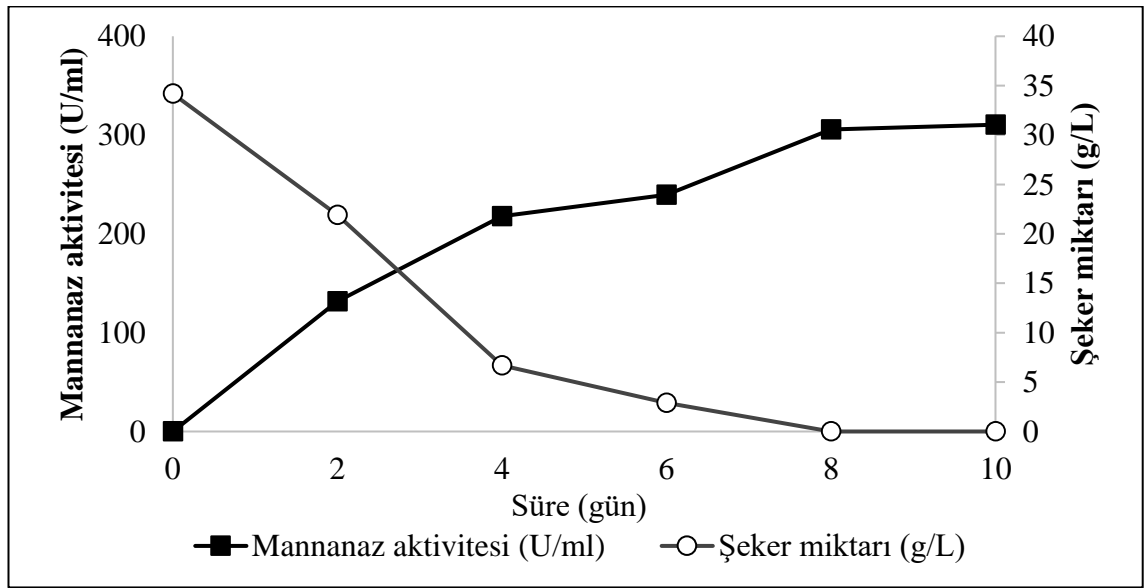
Araştırma tesadüf parselleri deneme deseninin faktöriyel düzenlenmesi şeklinde planlanmış, araştırmadan elde edilen sonuçlar varyans analizine ve önemli bulunan ana varyasyon kaynakları ortalamaları Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine tabi tutulmuştur.

Faktör sayısının ikiye aşmaması durumunda, faktör ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olup olmadığını bulmak için varyans analizi yöntemine başvurulmuştur. Duncan, çoklu karşılaştırma testlerinden biri olup, faktör ortalamaları arasındaki farkı test etmek için kullanılmıştır (Düzgüneş vd 1987). Varyans analizlerinde ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testlerinde asgari güven sınırı %95 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Çalkalamalı İnkübatör Kontrol Fermentasyonu

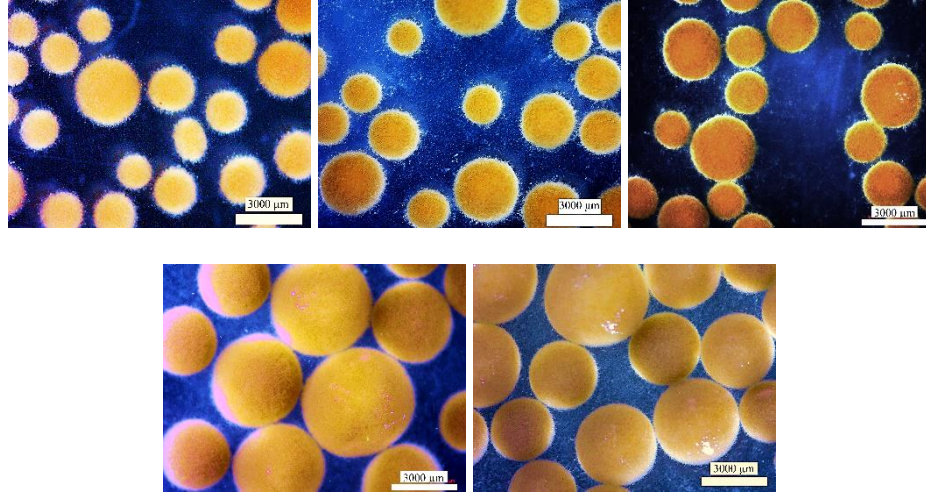
Mikropartikül kullanım sonucu elde edilen sonuçları karşılaştırmak amacıyla öncelikle çalkalamalı inkübatörde keçiyoynuzu besiyeri kullanılarak mikropartikülsüz kesikli fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilen kontrol fermentasyonları 30°C ve 200 d/d'da 10 günde tamamlanmıştır. Analizler sonucunda 8. günde ortamdaki şekerin tamamının (34,18±0,44 g/L) kullanıldığı tespit edilmiştir. Maksimum β-mannanaz aktivitesi değeri ise 10. günde 310,50±9,67 U/ml olarak belirlenmiştir. Fermentasyon süresince şeker tüketimi ve β-mannanaz aktivitesi değerlerine ait değişim Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Kontrol fermentasyonu şeker tüketimi ve β-mannanaz aktivitesi değerleri

Çalkalamalı inkübatör kontrol fermentasyonunda şeker kullanımına paralel olarak enzim üretiminin de başarıyla gerçekleştiği görülmüştür. İkinci günde enzim aktivitesi değeri 131,76±5,38 U/ml iken sekizinci günde bu değer 305,66±10,01 U/ml olmuştur. Benzer şekilde ikinci günde fermentasyon ortamındaki şeker miktarı 21,93±0,65 g/L iken sekizinci günde bu değer 0 g/L'ye inmiştir. Şeker tüketim ve β-mannanaz üretim oranları ise sırasıyla 5,46 g/L/gün ve 35,95 U/ml/gün olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak mikropartikülsüz gerçekleştirilen çalkalamalı inkübatör kontrol fermentasyonu denemelerinde rekombinant *Aspergillus sojae* şekerin tamamını etkin olarak kullanmış ve β-mannanaz enzimi üretiminde başarılı olmuştur.

Kontrol fermentasyonunda maksimum hücre çapı büyüklüğü 1482,78±117,32µm olarak 8. günde alınan örneklerde hesaplanmıştır. Hücre morfolojisinin belirlenmesi amacıyla alınan görüntüler de Şekil 4.2'de verilmiştir. Hücre görüntüleri incelendiğinde de bu durum rahatlıkla gözlemlenmektedir. Ayrıca misel oluşumu gözlenmemiş olup hücreler pellet olarak gelişim göstermişlerdir.



Şekil 4.2. Kontrol fermentasyonu hücre gelişim morfolojisi (Sırasıyla 2, 4, 6, 8 ve 10. gün örnekleri)

4.2. Çalkalamalı İnkübatör Alüminyum Oksit Denemeleri

Çalkalamalı inkübatör kontrol fermentasyonu tamamlandıktan sonra öncelikle alüminyum oksit erlenmayer fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 1, 3, 5, 10, 15, 20 ve 25 g/L alüminyum oksit içerecek şekilde hazırlanan keçiyoynuzu besiyerlerine rekombinant *Aspergillus sojae* inoküle edilmiş, 10 gün süreyle 200 d/d ve 30°C’de fermentasyona bırakılmıştır. Alınan örneklerde β -mannanaz aktivitesi, şeker miktarı ve hücre morfolojisi analizleri yapılarak kontrol fermentasyonu ile karşılaştırılmıştır.

Alüminyum oksit erlenmayer denemelerinde ortamdaki şeker rekombinant *Aspergillus sojae* tarafından sorunsuzca kullanılmıştır. Fermentasyon ortamındaki şekerin tamamının bütün alüminyum oksit konsantrasyonlarında tükendiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Alüminyum oksit erlenmayer denemelerine ait şeker tüketim sonuçları

Alüminyum oksit kons. (g/L)	Şeker miktarı (g/L)				
	0. gün	2. gün	4. gün	6. gün	8. gün
1	34,03±0,59	23,35±0,38	7,42±0,03	2,86±0,09	0,00±0,00
3	34,57±0,06	27,21±0,93	8,98±0,13	2,86±0,06	0,00±0,00
5	34,54±0,09	27,06±0,59	10,21±0,19	2,94±0,03	0,00±0,00
10	34,80±0,18	25,95±0,36	10,54±0,24	2,81±0,1	0,00±0,00
15	34,36±0,27	24,23±0,78	9,25±1,20	2,86±0,1	0,00±0,00
20	34,06±0,56	25,35±0,59	10,94±0,19	2,97±0,05	0,00±0,00
25	34,42±0,21	24,15±0,22	9,75±0,23	2,89±0,11	0,00±0,00

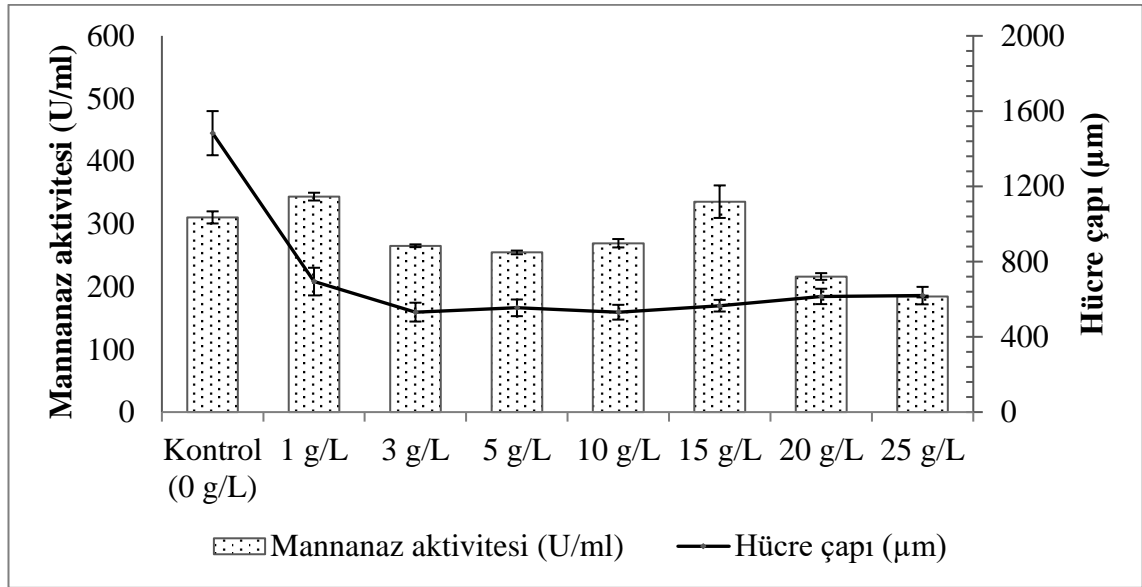
β -mannanaz enzimi üretimi genellikle şeker kullanımına paralel olarak devam etmektedir. Ancak ortamda şeker tükense bile hücreler enzim üretmeye devam edebilmektedirler. Rekombinant *Aspergillus sojae*’de bu durum bir arada

gerçekleşmektedir. Çizelge 4.2’de de görüldüğü üzere ortamdaki şeker sekizinci günde tükenmiş olmasına rağmen enzim aktivitesi değerleri artış göstermektedir.

Çizelge 4.2. Alüminyum oksit erlenmayer denemelerine ait β -mannanaz aktivitesi sonuçları

Alüminyum oksit kons. (g/L)	β -mannanaz aktivitesi (U/ml)					
	0. gün	2. gün	4. gün	6. gün	8. gün	10. gün
1	0,00±0,00	136,64±3,42	148,68±3,04	269,58±3,66	288,40±6,56	343,64±6,21
3	0,00±0,00	123,36±0,77	200,02±5,54	253,53±9,97	264,81±3,64	265,27±2,20
5	0,00±0,00	141,08±4,32	201,90±4,73	243,13±7,80	247,20±6,14	254,65±2,94
10	0,00±0,00	141,15±4,59	189,39±5,77	265,72±13,00	281,67±2,32	269,30±6,71
15	0,00±0,00	150,47±8,77	180,88±5,64	219,96±11,33	270,97±2,36	335,58±25,93
20	0,00±0,00	161,10±5,51	160,05±2,95	197,51±5,39	248,01±3,59	216,25±5,35
25	0,00±0,00	140,26±6,89	153,61±8,05	211,91±8,38	237,31±6,00	184,32±1,40

En yüksek β -mannanaz aktivitesi değeri 343,64±6,21 U/ml olarak 1 g/L alüminyum oksit kullanılan denemelerde elde edilmiştir. Bu denemeleri 335,58±25,93 U/ml ve 269,30±6,71 U/ml β -mannanaz aktivitesi sonuçlarıyla 10 g/L ve 15 g/L alüminyum oksit içeren denemeler izlemiştir. Alüminyum oksit konsantrasyonu arttıkça β -mannanaz enzimi üretim değerleri ve dolayısıyla da aktivite değerlerindeki azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Öyle ki en düşük β -mannanaz aktivitesi değeri 184,32±1,40 U/ml olarak 25 g/L alüminyum oksit içeren besiyerinde gerçekleştirilen denemede elde edilmiştir. 10. gün hücre çapı ve β -mannanaz aktivitesi değerleri Şekil 4.3’te verilmiştir.



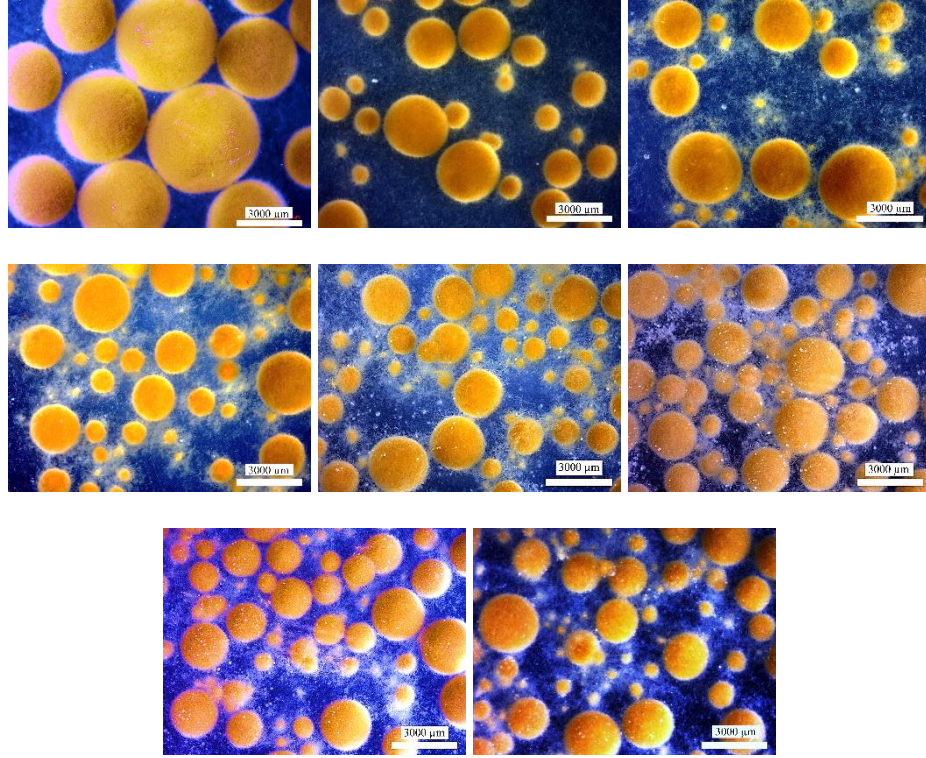
Şekil 4.3. Alüminyum oksit ve kontrol erlenmayer fermentasyonlarına ait β -mannanaz aktivitelerinin ve hücre çaplarının karşılaştırılması

Çalkalamalı inkübatör alüminyum oksit denemelerinde mikropartikül konsantrasyonu arttıkça hücre çapı değerlerinin hızla düştüğü, alüminyum oksit

konsantrasyonu 15 g/L ve üzerine çıktığında ise hücre çapı değerlerinin yeniden arttığı belirlenmiştir. Mikroorganizma çapı değerlerindeki bu azalış ve artışın istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Kontrol fermentasyonu β -mannanaz aktivitesi ve hücre çapı değerleri sırasıyla $310,50\pm 9,67$ U/ml ve $1482,78\pm 117,32\mu\text{m}$ 'dir. Alüminyum oksit varlığında gerçekleştirilen denemelerde ise en yüksek β -mannanaz aktivitesi ve hücre çapı değerleri $343,64\pm 6,21$ U/ml ve $693,77\pm 73,42\mu\text{m}$ olarak 1 g/L mikropartikül konsantrasyonunda elde edilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda hücre çapı değerleri azalırken β -mannanaz aktivitesi değerleri de istatistiksel olarak azalmıştır ($p<0,05$). Ancak 15 g/L alüminyum oksit konsantrasyonunda hücre çapı değerlerinde artış gözlemlenmiş ve hücre çapı değeri $565,65\pm 30,97\mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Aynı konsantrasyonda β -mannanaz aktivitesi değeri ise $335,58\pm 25,93$ U/ml olarak belirlenmiştir. Bu durum açıkça göstermektedir ki ilave edilen alüminyum oksit konsantrasyonu belirli bir konsantrasyona kadar hücre çapında azalmalara neden olurken sınır değerler aşıldığında hücre çapı değerleri kısmen artmıştır. Öyle ki hücre çapı değerlerinin farkını yani hücrelerin homojenliğini ortaya koyan standart hata değerleri de hücre çapı değerleriyle benzerlik göstermiş ve uç değerlerde daha yüksek değerler hesaplanmıştır.

Hücre çaplarındaki farklılık çap değerlerinin hesaplanması amacıyla alınan görüntülerde de açıkça görülmektedir (Şekil 4.4). Bütün fermentasyon denemelerinde farklı büyüklükteki hücreler bir arada gelişim göstermişlerdir. Bütün alüminyum oksit denemelerinde hücreler pellet halinde gelişmişler ve misel gelişimler 1. günden sonraki örneklerde tespit edilmemiştir.



Şekil 4.4. Kontrol ve alüminyum oksit erlenmayer denemeleri sekizinci gün hücre görüntüleri (Soldan sağa sırayla; kontrol, 1 g/L, 3 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L ve 25 g/L alüminyum oksit konsantrasyonunda gerçekleştirilen denemeler)

4.3. Çalkalamalı İnkübatör Magnezyum Silikat Denemeleri

Çalkalamalı inkübatör denemeleri için farklı konsantrasyonlarda (1, 3, 5, 10, 15, 20 ve 25 g/L) magnezyum silikat içeren erlenmayerler 30°C, 200 d/d'da 10 gün süreyle fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyon süresince alınan örneklerde şeker miktarı, β -mannanaz aktivitesi ve hücre morfolojisi analizleri gerçekleştirilmiştir.

Alüminyum oksit ve kontrol erlenmayer fermentasyonlarında olduğu gibi magnezyum silikat erlenmayer fermentasyonlarında da şekerin tamamı sekizinci günde tüketilmiştir (Çizelge 4.3). Bu durum erlenmayer denemelerinde rekombinant *Aspergillus sojae*'nin şekeri etkin bir şekilde mikropartikül varlığında veya yokluğunda kullanabildiğini ortaya koymuştur. Ancak fermentasyon ortamında magnezyum silikat olması halinde şeker tüketim hızlarında artış olmuştur. Bu durum Çizelge 4.3'de görülmekle birlikte kinetik parametreler incelendiğinde bu hız artışının istatistiksel olarak da önemli olduğu görülmektedir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.3. Magnezyum silikat erlenmayer denemelerine ait şeker tüketim sonuçları

Magnezyum silikat kons. (g/L)	Şeker miktarı (g/L)				
	0. gün	2. gün	4. gün	6. gün	8. gün
1	33,70±0,92	13,65±0,36	3,03±0,03	1,34±0,00	0,00±0,00
3	34,51±0,12	12,41±0,20	2,99±0,05	1,33±0,01	0,00±0,00
5	34,42±0,21	12,78±0,35	2,93±0,03	1,31±0,02	0,00±0,00
10	33,73±0,89	11,37±0,34	2,81±0,03	1,28±0,00	0,00±0,00
15	34,54±0,09	11,87±0,24	2,87±0,04	1,30±0,01	0,00±0,00
20	33,79±0,83	12,35±0,27	2,86±0,03	1,30±0,01	0,00±0,00
25	34,12±0,50	13,22±0,51	2,87±0,12	1,31±0,02	0,00±0,00

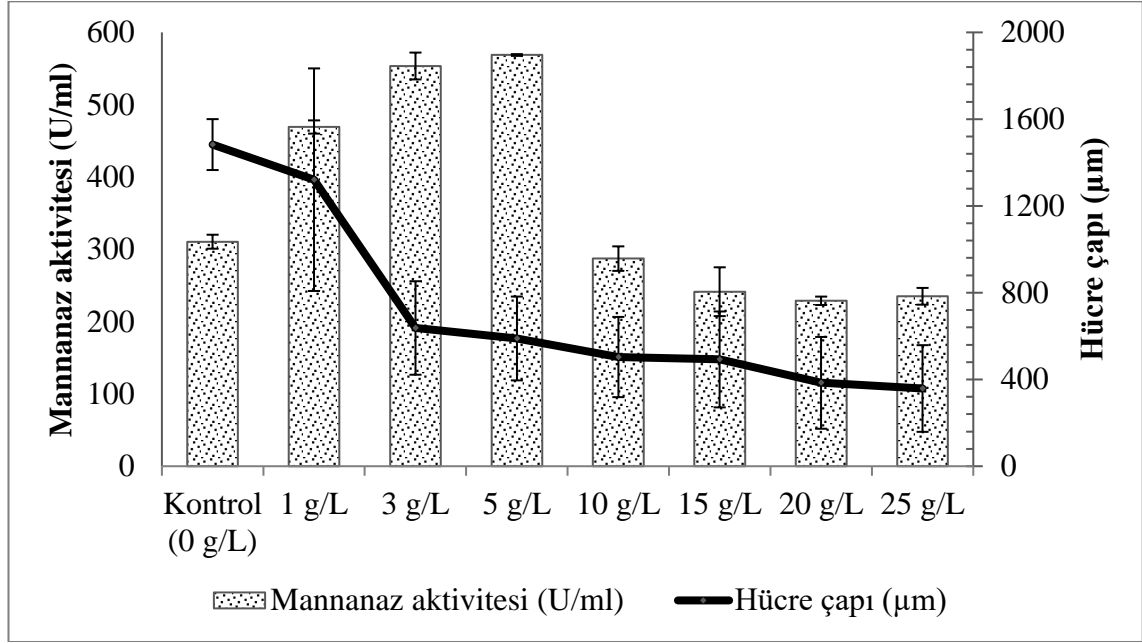
Magnezyum silikat denemelerinde hesaplanan enzim aktivitesi değerleri Çizelge 4.4’de verilmiştir. Magnezyum silikat erlenmayer denemelerinde en yüksek β -mannanaz aktivitesi değeri $568,72 \pm 1,22$ U/ml olarak 5 g/L mikropartikül konsantrasyonunda elde edilmiştir. Magnezyum silikat konsantrasyonu 3 ve 1 g/L olduğunda ise sırasıyla $553,53 \pm 18,55$ U/ml ve $469,13 \pm 9,15$ U/ml enzim aktivitesi değerleri elde edilmiştir. 5 g/L’den daha fazla magnezyum silikat ilave edildiğinde ise enzim aktivitesi değerlerinde düşüşler olmuştur. En düşük enzim aktivitesi değeri $228,79 \pm 5,82$ U/ml olarak 20 g/L magnezyum silikat konsantrasyonunda elde edilmiştir. Sonuç olarak alüminyum oksit erlenmayer denemelerinde olduğu gibi magnezyum silikat erlenmayer denemelerinde de uygun konsantrasyonlarda mikropartikül kullanımında enzim aktivitesinde artış gözlemlenmiş ve daha yüksek konsantrasyonlarda ise aktivite değerlerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmalar gerçekleşmiştir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.4. Magnezyum silikat erlenmayer denemelerine ait β -mannanaz aktivitesi sonuçları

Magnezyum silikat kons. (g/L)	β -mannanaz aktivitesi (U/ml)					
	0. gün	2. gün	4. gün	6. gün	8. gün	10. gün
1	0,00±0,00	130,16±5,99	235,03±12,15	350,75±13,98	450,31±7,59	469,13±9,15
3	0,00±0,00	127,40±2,62	222,94±1,70	365,97±11,59	499,94±25,02	553,53±18,55
5	0,00±0,00	107,05±1,41	199,77±2,98	355,63±5,61	543,98±6,28	568,72±1,22
10	0,00±0,00	35,83±2,10	21,85±1,16	101,51±8,18	253,19±15,16	287,14±16,95
15	0,00±0,00	29,11±2,30	11,02±0,99	69,21±5,93	190,53±21,05	241,37±33,76
20	0,00±0,00	27,71±1,08	6,41±0,97	59,72±3,34	177,36±9,68	228,79±5,82
25	0,00±0,00	31,11±2,12	7,01±0,57	55,12±9,20	173,90±13,65	235,01±11,57

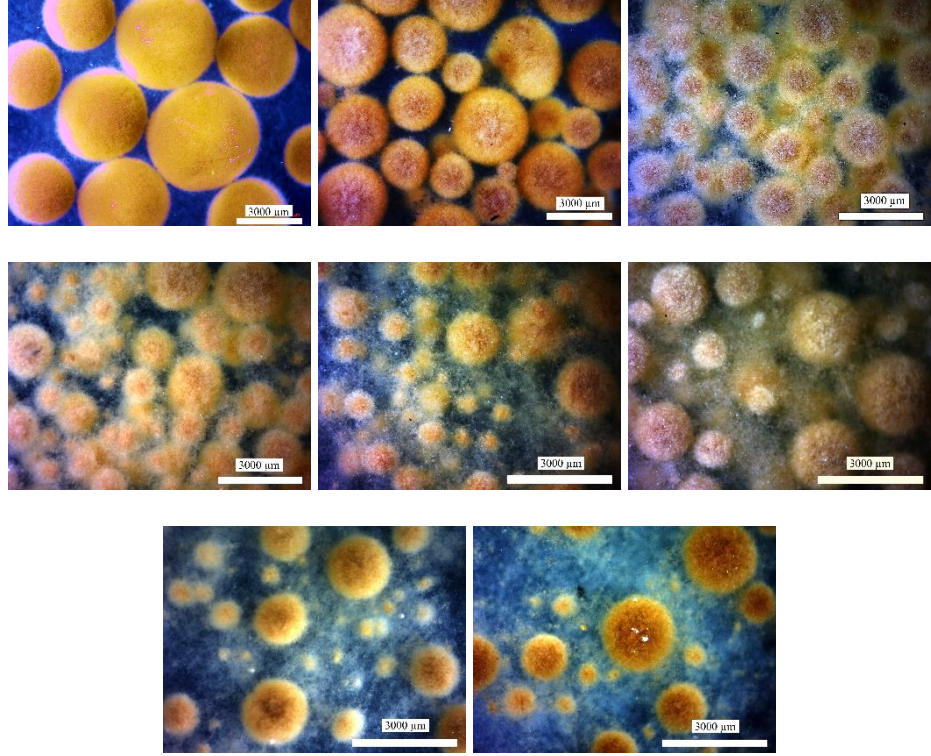
Magnezyum silikat erlenmayer denemelerinde β -mannanaz aktivitesi değerlerinin hücre büyüklüğü ile ilişkisinin gösterilmesi amacıyla enzim aktivitesi ve hücre çapı değerleri Şekil 4.5’de karşılaştırılmıştır. Burada ilk dikkat çeken durum hücre çapı standart hata değerlerinin yani hücre boyut farklılıklarının kontrol ve alüminyum oksit erlenmayer denemelerinden oldukça yüksek olmasıdır. Bu farklılık Şekil 4.5’te verilen hücre görüntülerinde de açıkça görülmektedir. Bu farklılık enzim aktivitesi değerlerini olumsuz etkilememiş olup ilk üç konsantrasyonda (1, 3 ve 5 g/L magnezyum silikat)

enzim aktivitesinde artış olurken daha yüksek konsantrasyonlarda magnezyum silikat kullanımlarında aktivitede düşüşler olmuştur.



Şekil 4.5. Magnezyum silikat ve kontrol erlenmayer fermentasyonlarına ait β -mannanaz aktivitesinin ve hücre çaplarının karşılaştırılması

Hücre çapları ilave edilen magnezyum silikat konsantrasyonu arttıkça düşmüş ve en düşük hücre çapı değeri $358,33 \pm 199,76 \mu\text{m}$ olarak 25 g/L magnezyum silikat konsantrasyonunda elde edilmiştir. Hücre çaplarındaki bu düşüş hücrelerin gelişim tiplerinde de farklılıklar ortaya koymuştur. Öyle ki ilk üç magnezyum silikat konsantrasyonunda (1, 3 ve 5 g/L) hücreler yalnızca pelletler halinde gelişim göstermişken daha yüksek mikropartikül konsantrasyonlarında pellet+misel karışık tip gelişim gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Bu gelişimdeki farklılık enzim aktivitesi değerlerini de etkilemiş ve enzim aktivitesi değerleri karışık tip hücre gelişiminin gözlemlendiği mikropartikül konsantrasyonlarında düşmüştür. Örneğin 5 g/L magnezyum silikat konsantrasyonunda enzim aktivitesi değeri 568,72 U/ml olarak hesaplanmışken ortamda 10 g/L magnezyum silikat bulunduğunda enzim aktivitesi değeri 287,14 U/ml'ye kadar düşmüştür. Bunun yanı sıra daha yüksek konsantrasyonlarda mikropartikül ilavesinin de enzim üretimi ve dolayısıyla aktivite değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.6. Kontrol ve magnezyum silikat erlenmayer denemeleri sekizinci gün hücre görüntüleri (Soldan sağa sırayla; kontrol, 1 g/L, 3 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L ve 25 g/L magnezyum silikat konsantrasyonunda gerçekleştirilen denemeler)

4.4. Çalkalamalı İnkübatör Kontrol ve Mikropartiküllü Fermentasyonların Karşılaştırılması

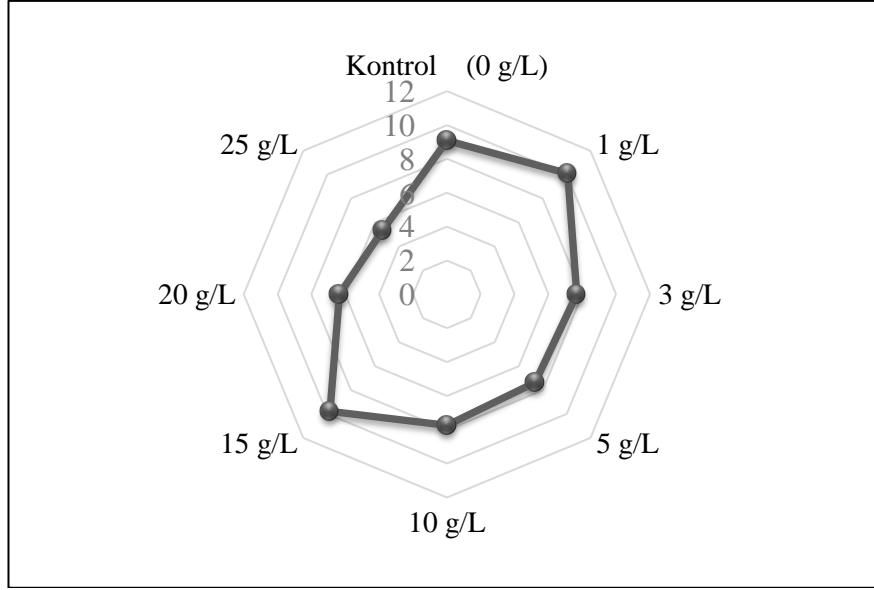
Reaktör denemelerinde kullanılacak alüminyum oksit konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla kinetik parametreler hesaplanmıştır (Çizelge 4.5). Ortamdaki şekerin tamamı tüketildiğinden ve şeker tüketim değerlerindeki fark istatistiksel olarak önemli olmadığından alüminyum oksit biyoreaktör konsantrasyonlarının belirlenmesinde β -mannanaz aktivitesi ve β -mannanaz üretim oranı değerleri dikkate alınmıştır.

Çizelge 4.5. Alüminyum oksit erlenmayer denemelerine ait kinetik değerler

Al-oksit kons. (g/L)	Şeker tüketim oranı (g/L/gün)	β -mannanaz üretim oranı (U/ml/gün)*	Maksimum β -mannanaz aktivitesi değerleri (U/ml)*	Toplam Şeker tüketim değerleri (g/L)	Hücre morfolojisi
Kontrol	5,46 ^b	35,95 ^a	310,50 ^a	34,18 ^a	Büyük pellet
1	5,47 ^b	35,49 ^a	343,64 ^a	34,03 ^a	Büyük pellet
3	5,67 ^a	32,99 ^{ab}	265,27 ^b	34,57 ^a	Pellet
5	5,58 ^{ab}	29,82 ^{bcd}	254,65 ^b	34,54 ^a	Pellet
10	5,57 ^{ab}	34,40 ^a	269,30 ^b	34,80 ^a	Pellet
15	5,47 ^b	30,57 ^{bc}	335,58 ^a	34,36 ^a	Pellet
20	5,39 ^b	26,62 ^d	248,21 ^b	34,06 ^a	Pellet
25	5,45 ^b	27,31 ^{cd}	237,31 ^b	34,42 ^a	Pellet

*İstatistiksel fark önemli bulunmuştur (p<0,05).

Kontrol fermentasyonundan daha yüksek enzim aktivitesinin elde edildiği 1 g/L ve 15 g/L alüminyum oksit konsantrasyonları biyoreaktör denemeleri için seçilen ilk iki değer olmuştur. Üçüncü değer için ise kontrol fermentasyonuna en yakın iki β -mannanaz aktivitesi değerinin elde edildiği 3 g/L ve 10 g/L'lik mikropartikül konsantrasyonuna ait diğer kinetik parametreler karşılaştırılmıştır. Bu kinetik parametrelerden en önemlisi β -mannanaz enzimi üretim oranı değeri olup bu değer 3 g/L ve 10 g/L'lik konsantrasyonlar için sırasıyla 32,99 U/ml/gün ve 34,40 U/ml/gün olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar neticesinde 10 g/L'lik alüminyum oksit konsantrasyonunda enzim üretimi daha hızlı gerçekleştiğinden ve bu fark istatistiksel olarak önemli olduğundan biyoreaktör denemelerinde kullanılacak üçüncü konsantrasyon olarak seçilmiştir (p<0,05). Üretilen birim enzime karşılık tüketilen birim şeker miktarının gösterildiği Şekil 4.7 incelendiğinde de enzim üretiminde en başarılı üç alüminyum oksit konsantrasyonunun 1 g/L, 10 g/L ve 15 g/L olduğu görülmektedir.



Şekil 4.7. Alüminyum oksit erlenmayer denemelerinde tüketilen birim şekere karşılık elde edilen birim enzim aktivitesi (U β -mannanaz aktivitesi/mg şekere)

Alüminyum oksit denemelerinde olduğu gibi magnezyum silikat erlenmayer denemelerinde de biyoreaktörde kullanılacak konsantrasyonların belirlenmesi amacıyla kinetik parametreler hesaplanmıştır (Çizelge 4.6). Daha önceki bölümlerde de açıklandığı üzere magnezyum silikat erlenmayer denemelerinde de ortamdaki şekerin tamamı rekombinant *Aspergillus sojae* tarafından kullanılmış ve şeker tüketim değerlerinin istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle de magnezyum silikat erlenmayer denemelerinde de enzim aktivitesi ve enzim üretim oranı değerleri dikkate alınarak biyoreaktör magnezyum silikat mikropartikül konsantrasyonları belirlenmiştir.

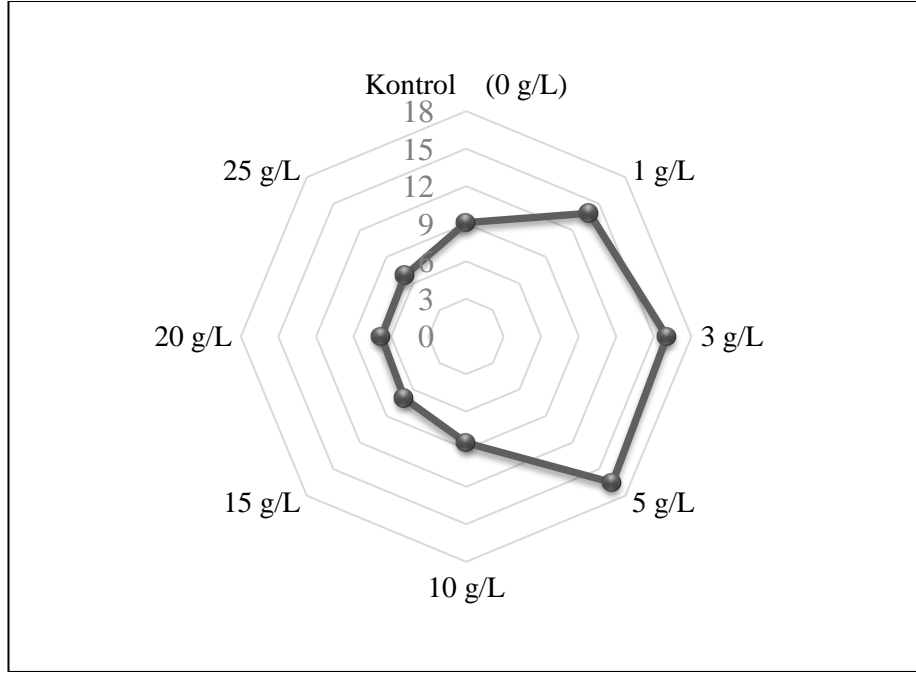
Çizelge 4.6. Magnezyum silikat erlenmayer denemelerine ait kinetik değerler

Mg-silikat kons. (g/L)	Şeker tüketim oranı (g/L/gün)*	β -mannanaz üretim oranı (U/ml/gün)*	Maksimum β -mannanaz aktivitesi değerleri (U/ml)*	Toplam Şeker tüketim değerleri (g/L)	Hücre morfolojisi
Kontrol	5,46 ^b	35,95 ^d	310,50 ^c	34,18 ^a	Büyük pellet
1	7,67 ^a	56,06 ^b	469,13 ^b	33,70 ^a	Büyük pellet
3	7,88 ^a	61,92 ^{ab}	553,53 ^a	34,51 ^a	Pellet
5	7,87 ^a	66,83 ^a	568,72 ^a	34,42 ^a	Pellet
10	7,73 ^a	47,38 ^c	287,14 ^{cd}	33,73 ^a	Pellet+misel
15	7,92 ^a	40,62 ^{cd}	241,37 ^{ed}	34,54 ^a	Pellet+misel
20	7,73 ^a	39,24 ^{cd}	228,79 ^e	33,79 ^a	Pellet+misel
25	7,81 ^a	40,14 ^{cd}	235,01 ^{ed}	34,12 ^a	Pellet+misel

*İstatistiksel fark önemli bulunmuştur (p<0,05).

Şeker tüketim oranları incelendiğinde rekombinant *Aspergillus sojae*'nin şekeri diğer erlenmayer denemelerine göre daha hızlı kullandığı tespit edilmiştir. En yüksek

şeker tüketim oranı 7,92 g/L/gün olarak 15 g/L mikropartikül konsantrasyonunda ve pellet+misel karışık tip hücre gelişiminde gözlemlenmiştir. Ancak şeker tüketim oranlarındaki bu artış maalesef enzim aktivitesi değerlerine yansımamıştır. Öyle ki en yüksek β -mannanaz aktivitesi ve β -mannanaz üretim oranı değerleri 1, 3 ve 5 g/L magnezyum silikat içeren erlenmayer denemelerinde elde edilmiştir. Enzim aktivitesi ve üretim oranı değerlerindeki bu artış istatistiksel olarak da önemli olduğundan bu üç değer biyoreaktör denemelerinde kullanılmak üzere seçilmiştir ($p<0,05$). Şekil 4.8’de de açıkça görüldüğü üzere birim şeker başına elde edilen birim enzim aktivitesi değeri en yüksek 1, 3 ve 5 g/L magnezyum silikat içeren besiyerlerinde elde edilmiştir.



Şekil 4.8. Magnezyum silikat erlenmayer denemelerinde Tüketilen birim şeker karşılık elde edilen birim enzim aktivitesi (U β -mannanaz aktivitesi/mg şeker)

4.5. Biyoreaktör Kontrol Fermentasyonu

Biyoreaktörde yarı-kesikli beslemeli fermentasyonlar için kontrol (mikropartikülsüz) denemeleri; 400 d/d, 30°C ve 1 l/d hava besleme şartlarında gerçekleştirilmiştir. Alınan örneklerde β -mannanaz aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı analizleri gerçekleştirilmiştir. Üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilen kontrol fermentasyonundan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7’de verilmiştir.

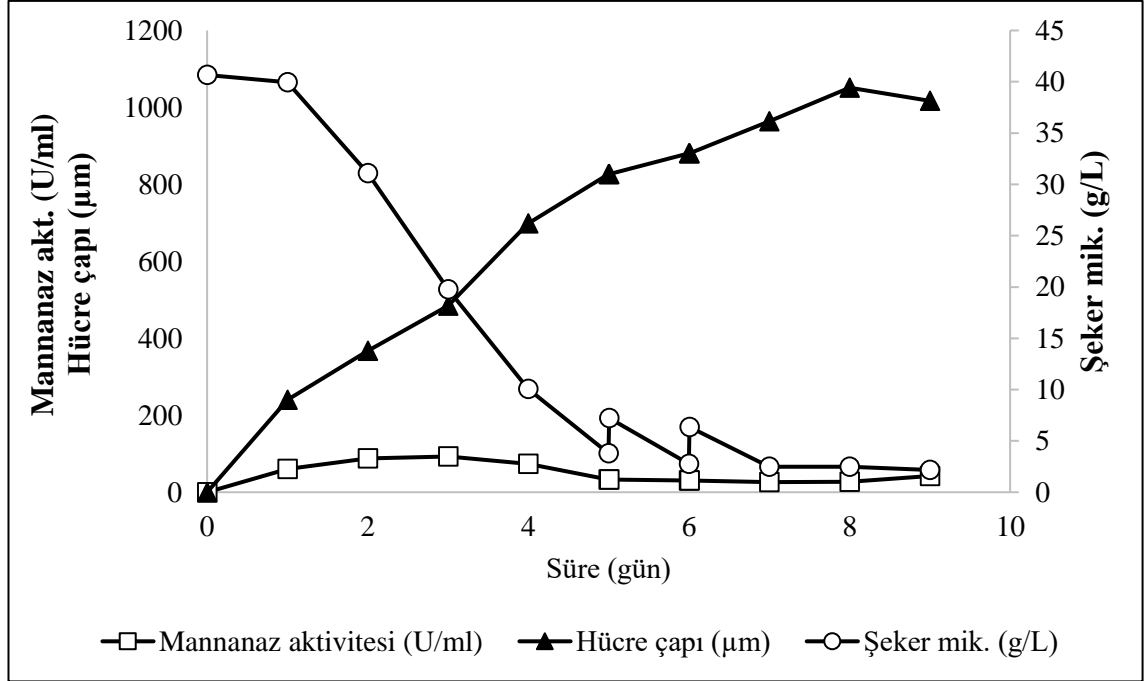
Çizelge 4.7. Biyoreaktör kontrol fermentasyonuna ait sonuçlar

Gün	β -mannanaz aktivitesi (U/ml)	Şeker mik. (g/L)	Hücre çapı (μ m)
0	0 \pm 0	40,66 \pm 0,66	0 \pm 0
1	60,23 \pm 5,46	39,96 \pm 0,38	240,24 \pm 5,65
2	88,12 \pm 3,82	31,08 \pm 0,02	367,75 \pm 15,32
3	92,86 \pm 3,14	19,78 \pm 0,17	484,47 \pm 18,83
4	73,59 \pm 5,55	10,05 \pm 0,04	698,62 \pm 15,29
5	32,74 \pm 9,97	3,78 \pm 0,08	826,5 \pm 26,82
5,007	32,74 \pm 9,97	7,22 \pm 0,26	826,5 \pm 26,82
6	30,4 \pm 11,84	2,75 \pm 0,04	880,42 \pm 20,67
6,007	30,4 \pm 11,84	6,34 \pm 0,03	880,42 \pm 20,67
7	26,21 \pm 9,23	2,49 \pm 0,04	963,84 \pm 36,47
8	27,39 \pm 15,92	2,47 \pm 0,23	1051,26 \pm 24,44
9	42,17 \pm 14,15	2,17 \pm 0,06	1017,06 \pm 20,14

Rekombinant *Aspergillus sojae*, erlenmayer denemelerinde olduğu gibi biyoreaktör kontrol fermentasyonunda da şekeri etkin bir şekilde kullanmıştır. Beşinci günde şeker konsantrasyonu 5 g/L'nin altına düştüğünde uygulanan yarı-kesikli beslemeli fermentasyon tekniği nedeniyle taze keçiyoynuzu ekstraktı ile besleme yapılmıştır. Beslemeler sonrası fermentasyon bir süre daha devam ettirilmiş ve dokuzuncu günde şeker konsantrasyonu 2,17 \pm 0,06 g/L olarak hesaplanmıştır.

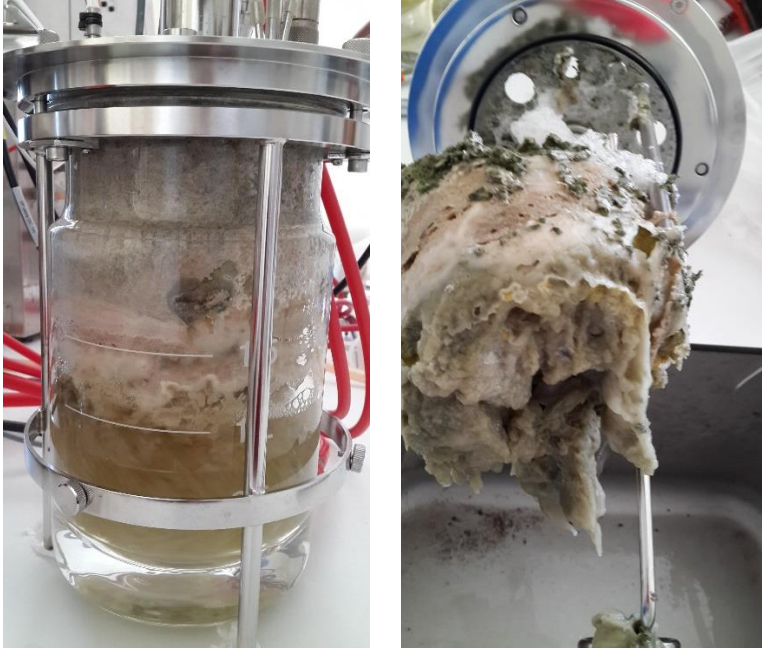
Şeker tüketiminde ve hücre gelişiminde herhangi bir sorun olmamasına karşın enzim aktivitesi değerleri erlenmayer denemelerinden daha düşük olmuştur. Öyle ki biyoreaktör kontrol fermentasyonu en yüksek β -mannanaz aktivitesi değeri 92,86 \pm 3,14 U/ml olarak fermentasyonun üçüncü gününde belirlenmiştir. Fermentasyonun ilerleyen aşamalarında da enzim aktivitesi değerleri düşmüştür. Yarı-kesikli fermentasyon tekniği kapsamında enzim üretimini arttırmayı hedefleyen şeker ilaveleri sonrası hücre pellet çapları artmasına ve hücre gelişimi devam etmesine karşın enzim üretimleri istenilen düzeylere ulaşamamıştır (Şekil 4.9).

Kontrol fermentasyonlarında hücre büyüklüğünü sınırlayıcı ajanlar (alüminyum oksit veya magnezyum silikat) kullanılmadığından fermentasyon süresince genel olarak hücre çapı değerlerinin arttığı gözlemlenmiştir. En yüksek hücre çapı değeri sekizinci günde 1051,26 \pm 24,44 μ m olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Biyoreaktör kontrol fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi

Daha önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi biyoreaktörlerde küflerle gerçekleştirilen fermentasyonlarda hücre kontrolü ve tekrarlanabilir sonuç eldesi oldukça güçtür. Çünkü zor şartlarda üreme yeteneğine sahip olan küfler, kendilerine özel hazırlanmış ortamlarda rahatlıkla ve hızla gelişebilmektedirler. Sonuç olarak aşırı hücre gelişimi ve köpürme nedeniyle fermentasyon kabı çeperlerine hücreler yapıştığından ciddi hücre kayıpları gerçekleşebilmektedir. Yarı-kesikli beslemeli biyoreaktör kontrol denemelerinde de mikropartikül gibi hücre boyutunu sınırlayıcı bir ajan kullanılmadığından hücrelerin birbirine ve fermentasyon kabı çeperlerine yapışması engellenememiştir (Şekil 4.10). Bu nedenle sürekli hücre kayıpları yaşanmış ve enzim aktivitesi değerleri istenilen düzeyde gerçekleşmemiştir. Çünkü gelişen ve belirli olgunluğa erişen hücreler çeperlere yapışarak besiyerinden ayrılmış ve enzim üretiminde etkin olamamıştır.



Şekil 4.10. Biyoreaktör kontrol fermentasyonu yoğun hücre gelişimi (Hücre görüntüleri: Ek 3)

4.6. Biyoreaktör Alüminyum Oksit Denemeleri

Biyoreaktörde kontrol fermentasyonunun tamamlanmasının ardından erlenmayer denemeleri sonucu seçilen alüminyum oksit konsantrasyonları (1, 10 ve 15 g/L) kullanılarak biyoreaktör denemeleri gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonların tamamı yarı-kesikli beslemeli olarak 400 d/d, 30°C ve 1 l/d hava besleme şartlarında gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonların tamamında alınan örneklerde şeker analizleri yapılarak şeker tüketimi takip edilmiştir. Fermentasyon ortamındaki şeker konsantrasyonu 5 g/L'nin altına düştüğü gün ve 24 saat sonra olmak üzere iki defa şeker ilavesi gerçekleştirilmiş (80-100 ml 10°Bx keçiyoynuzu ekstraktı) ve fermentasyonlar dokuzuncu günde sonlandırılmıştır.

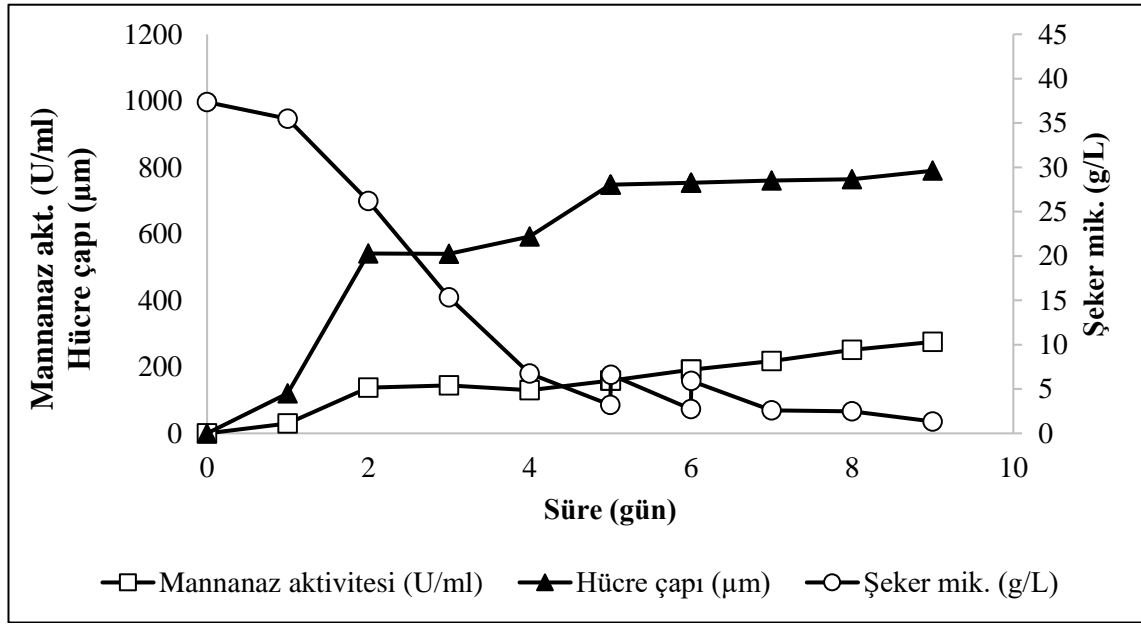
4.6.1. Biyoreaktörde 1 g/L alüminyum oksit ile fermentasyon

1 g/L alüminyum oksit konsantrasyonunda yarı-kesikli beslemeli olarak biyoreaktörde gerçekleştirilen denemelere ait β -mannanaz aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Biyoreaktör 1 g/L alüminyum oksit fermentasyonuna ait sonuçlar

Gün	β -mannanaz aktivitesi (U/ml)	Şeker mik. (g/L)	Hücre çapı (μ m)
0	0 \pm 0	37,35 \pm 0,54	0 \pm 0
1	29,9 \pm 10,23	35,49 \pm 0,64	119,95 \pm 18,18
2	137,62 \pm 28,29	26,21 \pm 1,32	540,97 \pm 18,32
3	144,55 \pm 35,12	15,34 \pm 1,18	539,75 \pm 24,24
4	129,49 \pm 15,61	6,76 \pm 0,38	591,75 \pm 25,92
5	158,86 \pm 28,19	3,19 \pm 0,23	747,25 \pm 25
5,007	158,86 \pm 28,19	6,6 \pm 0,36	747,25 \pm 25
6	191,43 \pm 21,66	2,74 \pm 0,32	753,79 \pm 24,31
6,007	191,43 \pm 21,66	5,9 \pm 0,33	753,79 \pm 24,31
7	217,52 \pm 20,85	2,6 \pm 0,42	759,87 \pm 22,16
8	250,63 \pm 5,52	2,47 \pm 0,37	764,55 \pm 27,93
9	274,94 \pm 21,54	1,34 \pm 0,77	789,65 \pm 53,87

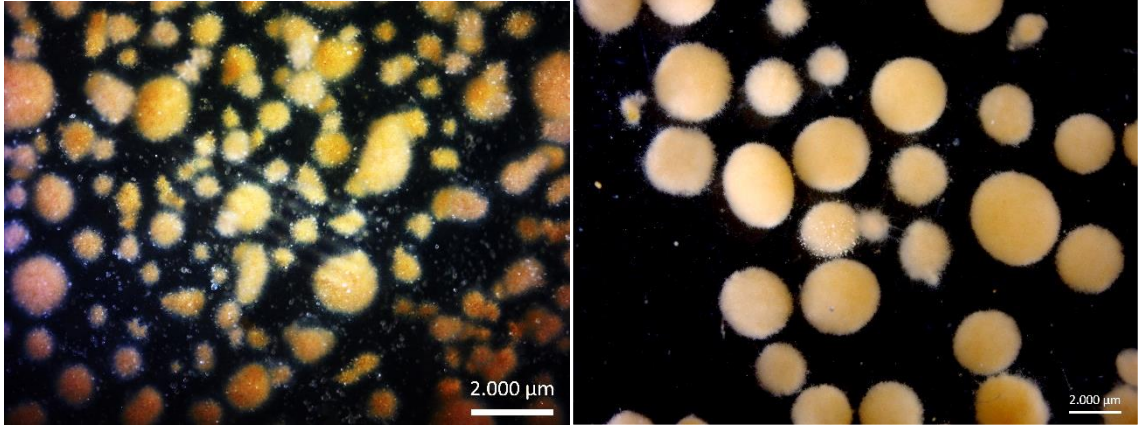
1 g/L alüminyum oksit kullanılarak gerçekleştirilen biyoreaktör fermentasyonu süresince şeker miktarı azalırken; enzim aktivitesi ve hücre çapı değerleri sürekli artmıştır. Başlangıç şeker miktarı 37,35 \pm 0,54 g/L iken 5. gün sonunda şeker miktarı 3,19 \pm 0,23 g/L seviyelerine düşmüştür. Şeker azalmasına bağlı olarak 5 ve 6. günlerde 10°Bx taze keçiyoynuzu ekstraktı kullanılarak 80-100 ml substrat ilavesi gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonun 1 ve 2. günleri incelendiğinde enzim aktivitesi ve hücre çapı değerlerinde ciddi bir artış gerçekleştiği görülmektedir. Fermentasyonun devamında enzim aktivitesi değerlerinde büyük bir değişme olmasa da substrat ilavesinden sonra enzim aktivitesinde artışlar olmuş ve en yüksek β -mannanaz aktivitesi 274,94 \pm 21,54 U/ml olarak 9. günde hesaplanmıştır. Benzer şekilde en yüksek hücre çapı değeri de yine fermentasyonun son gününde 789,65 \pm 53,87 μ m olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. 1 g/L alüminyum oksit biyoreaktör fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi

Şekil 4.11 incelendiğinde 2. ve 4. günlerde hücre büyüklüğünde gerçekleşen durağanlığın enzim aktivitesi değerlerini de olumsuz etkilediği görülmektedir. Ancak bu durağanlık şeker tüketiminde bir azalmaya neden olmamış ve şekerin tüketimi logaritmik olarak devam etmiştir. 5. gün ve sonrasında ise enzim aktivitesi değeri hücre büyüklüğünden bağımsız olarak artmakta ve en yüksek değerine fermentasyon sonunda ulaşmaktadır.

Fermentasyon ortamına 1 g/L alüminyum oksit ilavesi hem hücre büyüklüklerini azaltarak hem de hücrelerin birbirine yapışmasını engelleyerek fermentasyonun daha kontrollü ve stabil gerçekleşmesini sağlamıştır. Rekombinant *Aspergillus sojae* yalnızca pellet yapıda gelişim göstermiş ve çok farklı büyüklükteki hücreler bir arada gelişim göstermişlerdir (Şekil 4.12). Köpürme minimum düzeyde kaldığı için fermentasyon ortamından hücre kaybı da az olmuştur.



Şekil 4.12. Biyoreaktör 1 g/L alüminyum oksit fermentasyonu 1 (solda) ve 9. gün hücre görüntüleri (Ek 4)

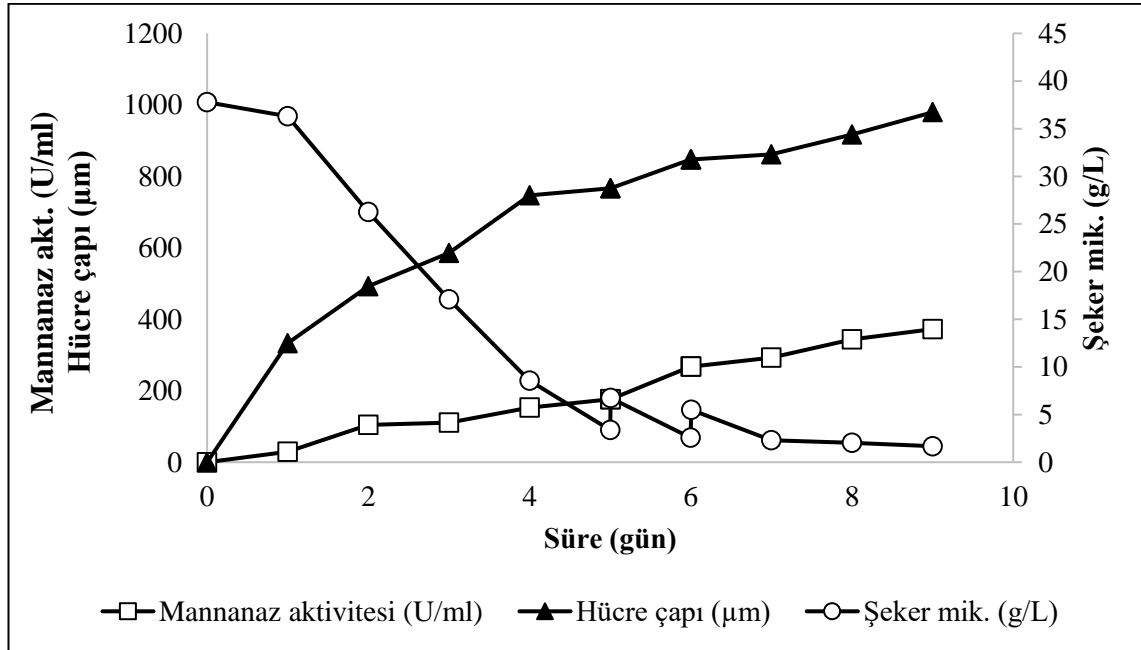
4.6.2. Biyoreaktörde 10 g/L alüminyum oksit ile fermentasyon

Fermentasyon ortamına mikropartikül ilavesi hücre gelişimini kontrol altına alarak fermentasyonların daha etkin ve tekrarlanabilir olmasını sağlamaktadır. Mikropartiküller bu işlevi genel olarak hücre büyüklüğünü azaltarak ve hücrelerin birbirine yapışmalarını önleyerek gerçekleştirirler. Ancak biyoreaktör kontrol fermentasyonu ile 10 g/L alüminyum oksit biyoreaktör denemesi kıyaslandığında hücre çapı değerleri benzer sonuçlar vermiştir. Öyle ki hücre gelişimi mikropartikül ilavesiyle kontrol altına alınmasına rağmen hücre büyüklükleri kontrol fermentasyonuna oldukça yakın gerçekleşmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Biyoreaktör 10 g/L alüminyum oksit fermentasyonuna ait sonuçlar

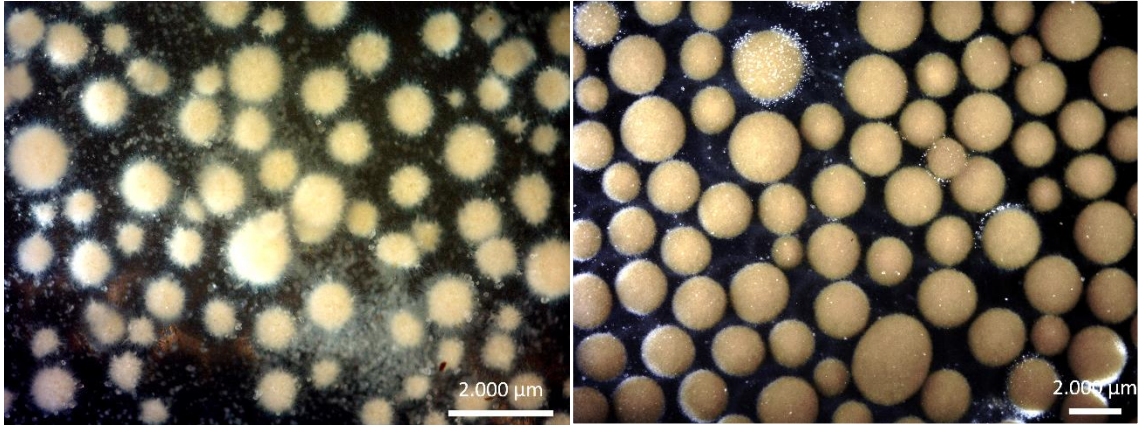
Gün	β -mannanaz aktivitesi (U/ml)	Şeker mik. (g/L)	Hücre çapı (μ m)
0	0±0	37,78±0,67	0±0
1	29,36±10,72	36,29±0,64	332,83±12,68
2	104,22±2,71	26,24±1,64	492,77±17,05
3	110,71±20,63	17,08±1,68	585,55±13,71
4	152,39±22,86	8,54±0,44	746,83±17,28
5	176,46±18,24	3,39±0,3	766,44±16,61
5,007	176,46±18,24	6,73±0,07	766,44±16,61
6	267,78±25,06	2,58±0,23	847,42±21,33
6,007	267,78±25,06	5,49±0,11	847,42±21,33
7	292,84±23,92	2,29±0,4	861,84±24,83
8	343,93±2,6	2,02±0,17	917,24±21,47
9	372,36±4,84	1,68±0,12	979,34±23,62

Hücre çapı değerleri kısmen düşmesine rağmen fermentasyon ortamındaki hücre gelişimini iyileştirmesi ve fermentasyon kabına hücre yapışmalarını en aza indirmesi nedeniyle 10 g/L alüminyum oksit konsantrasyonunda gerçekleştirilen yarı-kesikli beslemeli β -mannanaz fermentasyonunda enzim aktivitesi değerlerinde artış gözlemlenmiştir. En yüksek β -mannanaz aktivitesi değeri $372,36 \pm 4,84$ U/ml olarak fermentasyonun son gününde hesaplanmıştır. Fermentasyon süresince hücre çapı değerleri incelendiğinde hücre büyüklüğündeki artış ile enzim aktivitesi arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Özellikle substrat ilavelerinden sonra enzim aktivitesi hızla artmış ve fermentasyonun son gününde en yüksek değerine ulaşmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. 10 g/L alüminyum oksit biyoreaktör fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi

Yarı-kesikli fermentasyon kapsamında iki kez substrat ilavesi gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda en yüksek rekombinant *Aspergillus sojae* hücre çapı $979,34 \pm 23,62 \mu\text{m}$ olarak dokuzuncu günde ölçülmüştür. Hücre çapı değerleri kontrol fermentasyonu ile benzerlik göstermesine rağmen hücrelerin birbirine yapışması sınırlandırdığından fermentasyon kabı çeperlerine yapışarak gerçekleşen hücre kaybı da 10 g/L alüminyum oksit kullanımıyla minimize edilmiştir. Gelişmiş olgun hücrelerin kaybının en aza indirgenmesi enzim aktivitesinde artışla sonuçlanmıştır. Hücrelerin fermentasyonun ilk ve son günündeki durumlarını gösteren görüntüler Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.14. Biyoreaktör 10 g/L alüminyum oksit fermentasyonu 1 (solda) ve 9. gün hücre görüntüleri (Ek 5)

4.6.3. Biyoreaktörde 15 g/L alüminyum oksit ile fermentasyon

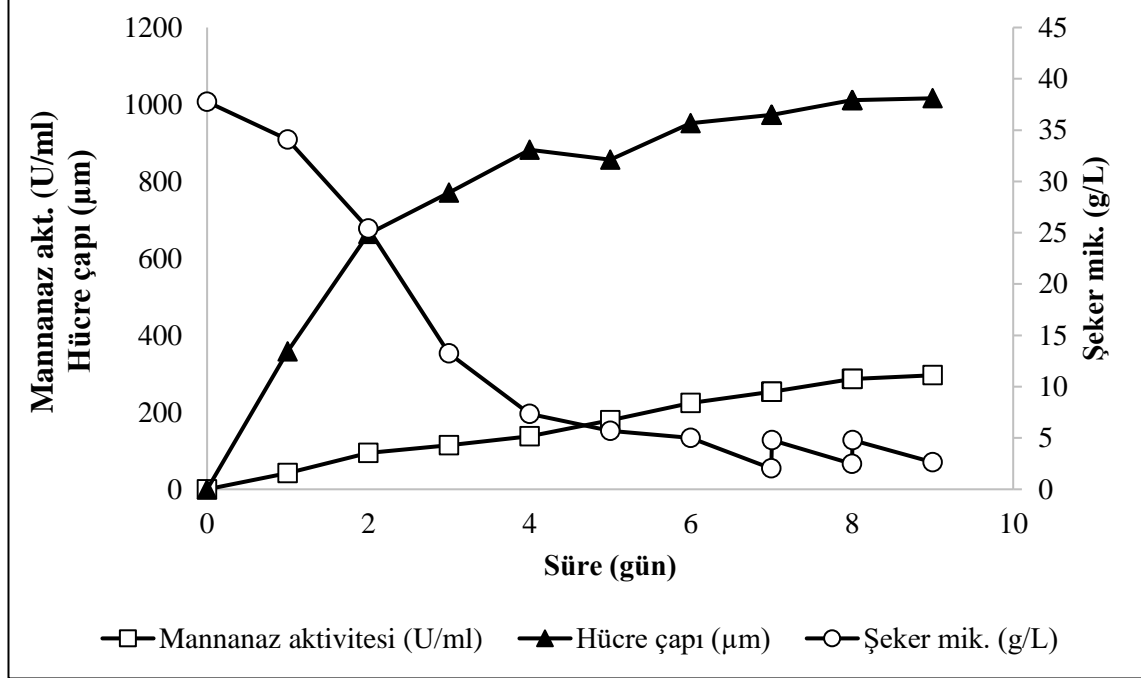
Yarı-kesikli beslemeli biyoreaktör alüminyum oksit fermentasyonlarından sonuncusu 15 g/L mikropartikül konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon süresince alınan örneklerde enzim aktivitesi, şeker analizi ve hücre çapı analizleri gerçekleştirilmiş olup sonuçlar Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Biyoreaktör 15 g/L alüminyum oksit fermentasyonuna ait sonuçlar

Gün	β -mannanaz aktivitesi (U/ml)	Şeker mik. (g/L)	Hücre çapı (μ m)
0	0 \pm 0	37,76 \pm 1,12	0 \pm 0
1	41,75 \pm 14,45	34,09 \pm 0,59	358,55 \pm 11,25
2	94,45 \pm 9,27	25,4 \pm 2,45	663,8 \pm 19,83
3	114,39 \pm 23,63	13,23 \pm 1,63	771 \pm 20,95
4	137,98 \pm 14,41	7,34 \pm 1,19	882,4 \pm 19,83
5	179,11 \pm 7,6	5,71 \pm 0,63	856,8 \pm 25,44
6	223,92 \pm 1,78	5,01 \pm 0,11	951,46 \pm 23,71
7	253,43 \pm 7,55	2,03 \pm 0,15	972,83 \pm 23,92
7,007	253,43 \pm 7,55	4,79 \pm 0,79	972,83 \pm 23,92
8	286,99 \pm 21,96	2,47 \pm 0,65	1011,13 \pm 24,75
8,007	286,99 \pm 21,96	4,79 \pm 1,26	1011,13 \pm 24,75
9	296,28 \pm 15,95	2,65 \pm 0,73	1016,13 \pm 20,14

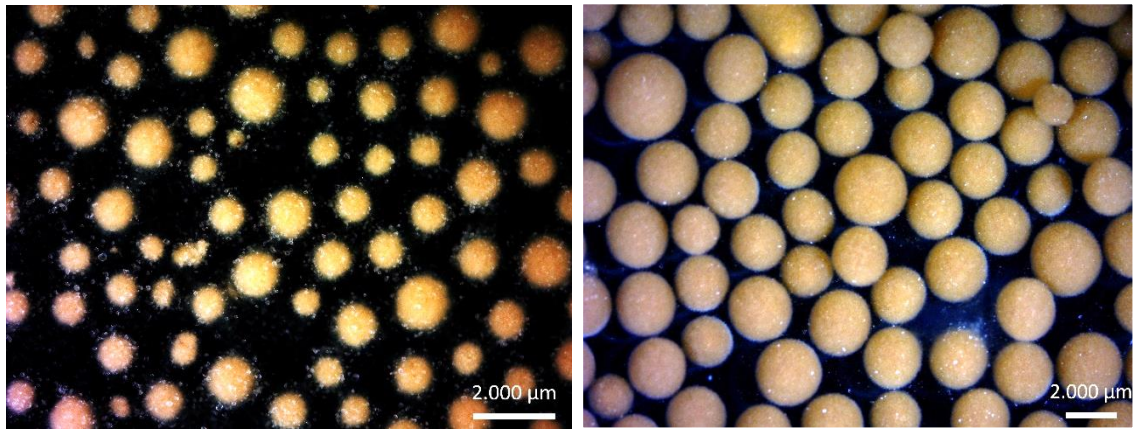
Diğer alüminyum oksit konsantrasyonlarına kıyasla 15 g/L’lik mikropartikül konsantrasyonunda gerçekleştirilen denemelerde şekerin ancak 7. günde 5 g/L’nin altına düştüğü tespit edilmiştir. Buna bağlı olarak substrat ilavesi 7. ve 8. günlerde yapılmasına rağmen diğer biyoreaktör denemelerinde olduğu gibi fermentasyon 9. günde sonlandırılmıştır. Fermentasyon süresince alınan örneklerde en yüksek β -mannanaz

aktivitesi değeri $296,28 \pm 15,95$ U/ml olarak 9. günde hesaplanmıştır. Fermentasyon süresince hücre çapı değerlerinin ve enzim aktivitesi değerlerinin ise arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.15). Fermentasyon süresince en yüksek hücre çapı değeri $1016,13 \pm 20,14 \mu\text{m}$ olarak 9. günde belirlenmiştir.



Şekil 4.15. 15 g/L alüminyum oksit biyoreaktör fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi

15 g/L alüminyum oksit kullanımıyla gerçekleştirilen biyoreaktör denemesinde de fermentasyonun ilk gününden sonuna kadar hücre gelişimi pelletler şeklinde olmuştur (Şekil 4.16). Ayrıca hücrelerin birbirine ve fermentasyon kabı çeperlerine yapışması da en az indirgiğinden enzim üretimi olumsuz etkilenmemiş ve stabil bir fermentasyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır.



Şekil 4.16. Biyoreaktör 15 g/L alüminyum oksit fermentasyonu 1 (solda) ve 9. gün hücre görüntüleri (Ek 6)

4.7. Biyoreaktör Magnezyum Silikat Denemeleri

Magnezyum silikat erlenmayer denemeleri sonucunda yarı-kesikli beslemeli biyoreaktör denemeleri için belirlenen konsantrasyonlarda 400 d/d, 30°C ve 1 l/d hava besleme şartlarında yarı-kesikli beslemeli fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonların tamamında alınan örneklerde şeker analizleri yapılarak şeker tüketimi takip edilmiştir. Fermentasyon ortamındaki şeker konsantrasyonu 5 g/L'nin altına düştüğü gün ve 24 saat sonra olmak üzere iki defa taze substrat ilavesi gerçekleştirilmiş (80-100 ml 10°Bx keçiboynuzu ekstraktı) ve fermentasyonlar dokuzuncu günde sonlandırılmıştır.

4.7.1. Biyoreaktörde 1 g/L magnezyum silikat ile fermentasyon

Magnezyum silikat biyoreaktör denemelerine öncelikle 1 g/L'lik mikropartikül konsantrasyonuyla başlanmıştır. Fermentasyon süresince alınan örneklerde gerçekleştirilen enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı analizlerine ait sonuçlar Çizelge 4.11'de verilmiştir.

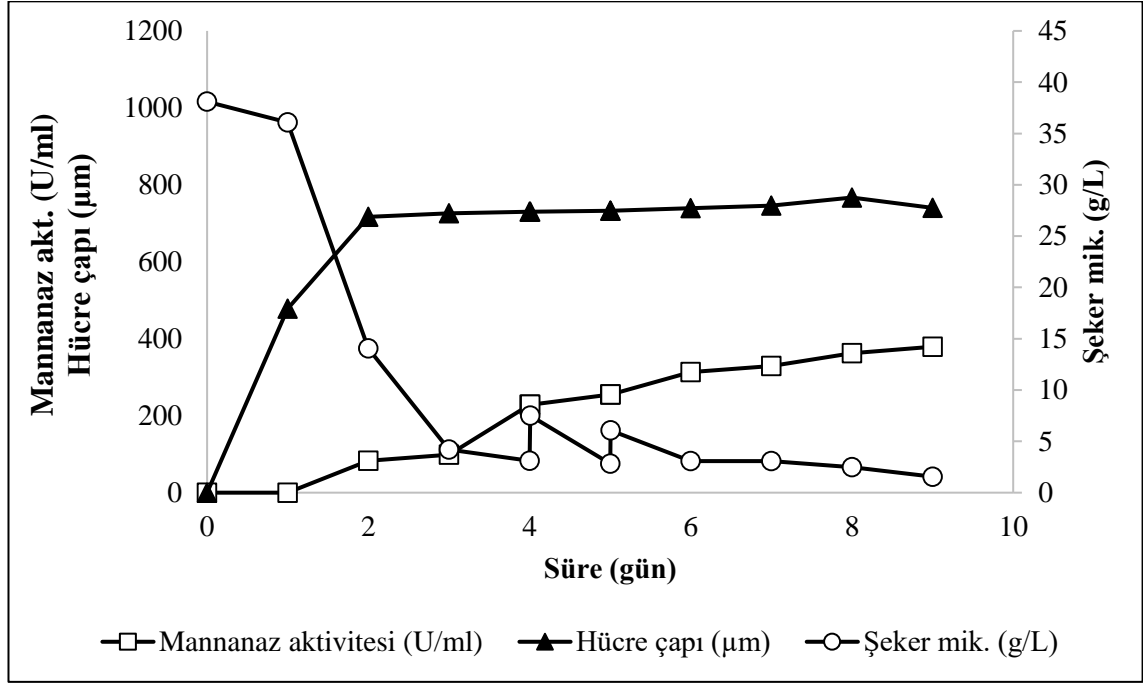
Çizelge 4.11. Biyoreaktör 1 g/L magnezyum silikat fermentasyonuna ait sonuçlar

Gün	β -mannanaz aktivitesi (U/ml)	Şeker mik. (g/L)	Hücre çapı (μ m)
0	0±0	38,1±1,09	0±0
1	0±0	36,08±0,48	478,03±9,26
2	83,14±5,18	14,05±0,44	717,14±18,34
3	98,65±8,74	5,19±0,8	725,95±24,01
4	228,27±17,72	3,11±0,09	730,28±13,97
4,007	228,27±17,72	7,5±0,18	730,28±13,97
5	254,9±5,29	2,83±0,06	732,72±10,71
5,007	254,9±5,29	6,07±0,55	732,72±10,71
6	312,91±13,31	3,06±0	739,04±16,72
7	329,01±2,53	3,09±0,06	746,29±13,93
8	362,23±0,32	2,49±0,3	766,96±11,37
9	379,23±9,06	1,56±0,21	739,88±7,93

1 g/L magnezyum silikat biyoreaktör denemesinde başlangıç şeker konsantrasyonu 38,1±1,09 g/L iken bu değer 4. gün sonunda 3,11±0,09 g/L seviyesine düşmüştür. Taze substrat ilavesi ile gerçekleştirilen beslemeler sonucu ortamda bulunan şekerin kullanımı devam etmiştir. Fermentasyon süresince enzim aktivitesi değerleri artmış ve en yüksek β -mannanaz aktivitesi değeri ise 379,23±9,06 U/ml olarak fermentasyonun son gününde elde edilmiştir.

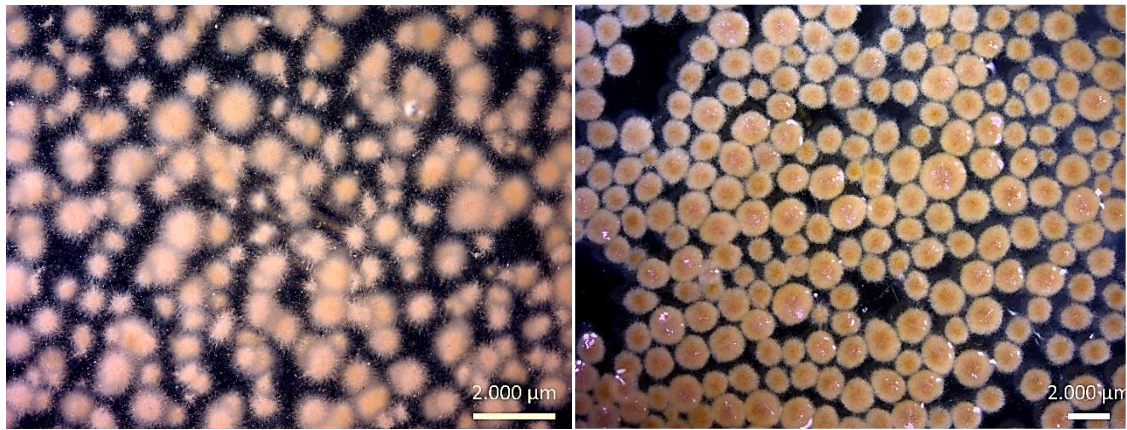
Rekombinant *Aspergillus sojae* fermentasyon süresince şekerini etkin bir şekilde kullanmasına karşın ikinci günden sonra hücre çapı değerlerindeki artış minimum düzeyde kalmıştır. Öyle ki 2. gün hücre çapı değeri 717,14±18,34 μ m iken fermentasyon

süresince en yüksek hücre çapı değeri $766,96 \pm 11,37 \mu\text{m}$ olarak 8. günde hesaplanmıştır. Bu durum Şekil 4.17’de rahatlıkla görülmektedir.



Şekil 4.17. 1 g/L magnezyum silikat biyoreaktör fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi

Şekil 4.17 incelendiğinde 1 g/L magnezyum silikat varlığında enzim aktivitesi değerlerinin hücre çapı değişiminden bağımsız olarak gerçekleştiği görülmektedir. Şeker konsantrasyonu 3 g/L'nin altına inmesine rağmen 7. günden sonra da enzim aktivitesi değerlerindeki artış devam etmiştir. Bunların yanı sıra 1 ve 9. gün hücre görüntüleri karşılaştırıldığında da tekdüze bir hücre gelişiminin olduğu görülmektedir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Biyoreaktör 1 g/L magnezyum silikat fermentasyonu 1 (solda) ve 9. gün hücre görüntüleri (Ek 7)

4.7.2. Biyoreaktörde 3 g/L magnezyum silikat ile fermentasyon

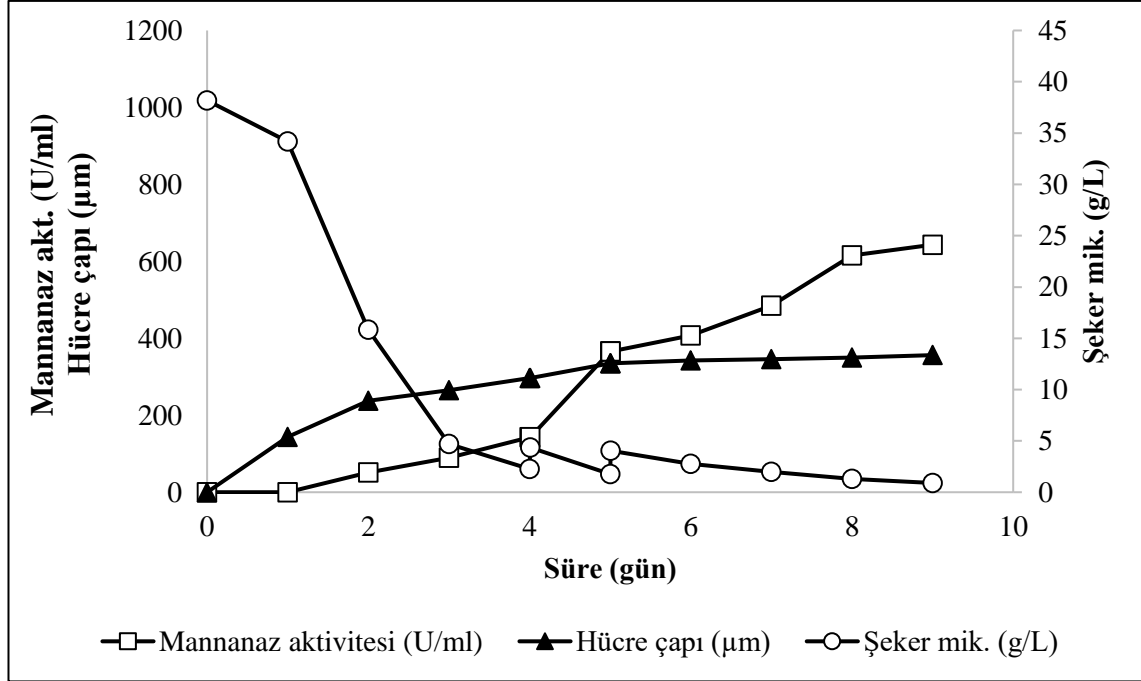
3 g/L magnezyum silikat konsantrasyonunda gerçekleştirilen yarı-kesikli beslemeli biyoreaktör denemelerinde şeker miktarı 4. günde $2,28 \pm 0,52$ g/L seviyelerine düşmüştür. Hücre çapı değerleri şeker tüketim hızına rağmen aynı düzeyde artmamış ve 4. günde $296,81 \pm 7,22 \mu\text{m}$ olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Biyoreaktör 3 g/L magnezyum silikat fermentasyonuna ait sonuçlar

Gün	β -mannanaz aktivitesi (U/ml)	Şeker mik, (g/L)	Hücre çapı (μm)
0	0 ± 0	$38,18 \pm 1,7$	0 ± 0
1	0 ± 0	$34,17 \pm 2,43$	$144,01 \pm 5,94$
2	$51,57 \pm 19,08$	$15,85 \pm 3,73$	$237,78 \pm 11,03$
3	$89,63 \pm 56,6$	$4,7 \pm 1,77$	$265,04 \pm 8,03$
4	$142,72 \pm 78,35$	$2,28 \pm 0,52$	$296,81 \pm 7,22$
4,007	$142,72 \pm 78,35$	$4,37 \pm 0,87$	$296,81 \pm 7,22$
5	$365,89 \pm 9,61$	$1,76 \pm 0,5$	$335,26 \pm 8,77$
5,007	$365,89 \pm 9,61$	$4,03 \pm 1,44$	$335,26 \pm 8,77$
6	$407,03 \pm 17,31$	$2,78 \pm 0,39$	$342,03 \pm 9,66$
7	$484,29 \pm 9,48$	$2 \pm 0,12$	$346,17 \pm 11,63$
8	$615,41 \pm 25,82$	$1,31 \pm 0,33$	$349,66 \pm 9,98$
9	$643,16 \pm 11,71$	$0,9 \pm 0,21$	$356,3 \pm 9,26$

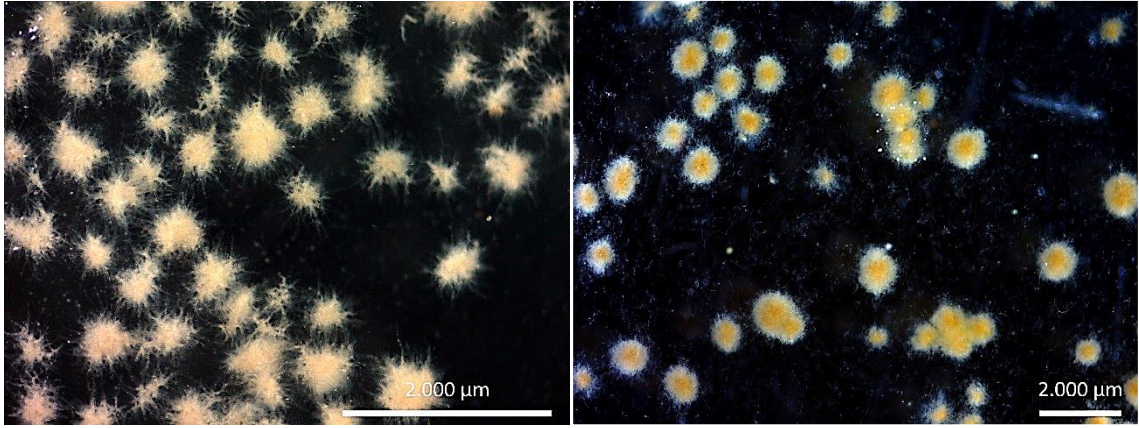
Sonuçlar incelendiğinde ilk dikkat çeken sonuç fermentasyon süresince rekombinant *Aspergillus sojae* hücre çapı değerlerinin $400 \mu\text{m}$ 'nin altında kalmasıdır. En yüksek hücre çapı değeri $356,3 \pm 9,26 \mu\text{m}$ olarak fermentasyonun 9. gününde hesaplanmıştır. Daha önceki bazı denemelerde hücre çapındaki artış enzim aktivitesinde de artışla sonuçlanmıştı. Ancak 3 g/L magnezyum silikat biyoreaktör denemesinde hücre çapı değerlerindeki bu düşüş enzim aktivitesinde istatistiksel olarak önemli düzeyde artışla sonuçlanmıştır ($p < 0,05$). Öyle ki tüm biyoreaktör denemeleri içerisinde en yüksek β -mannanaz aktivitesi değeri 3 g/L magnezyum silikat konsantrasyonunda $643,16 \pm 11,71$ U/ml olarak gerçekleşmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde ilk dikkat çeken ayrıntı hücre büyüklüğünde düşüş olmasına rağmen yarı-kesikli fermentasyon tekniği kapsamında gerçekleştirilen taze substrat ilavesinin enzim aktivitesini arttırmasıdır. Şekil 4.19 incelendiğinde 4. gün ve sonrasında gerçekleştirilen substrat ilaveleri sonrasında enzim aktivitesinde hızlı bir artış olduğu açıkça görülmektedir. Fermentasyon sonlandırılana kadar enzim aktivite değerlerindeki bu artış azalarak devam etmiştir.



Şekil 4.19. 3 g/L magnezyum silikat biyoreaktör fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi

Tüm bu olumlu sonuçların yanında 3 g/L magnezyum silikat kullanımı hücre gelişimi kontrolünde bazı sorunları da beraberinde getirmiştir. Öncelikle çok yüksek bir hücre gelişimi olmaktadır ve bu yoğunluk fermentasyonun 2. ve 3. günlerinde karıştırmanın ve köpük kırıcının etkinliğini azaltmaktadır. Buna bağlı olarak köpürmeler sonucunda hücrelerin büyük bir çoğunluğu fermentasyon kabının çeperlerine yapışmakta ve ciddi bir hücre kaybı yaşanmaktadır. Buna rağmen enzim aktivitesi değerleri bu durumdan olumsuz etkilenmemiş ve en yüksek enzim aktivitesi değerleri bu denemede elde edilmiştir. Ancak yüksek hücre yoğunluğu nedeniyle görüntülemeye yaşanan zorluklar nedeniyle hücrelerin ekstra seyreltilmesi (1:3 hücre:su oranında) gerekmiştir. Şekil 4.20'de 1. ve 9. gün görüntüleri verilen rekombinant *Aspergillus sojae*'nin düşük hücre yoğunluğunun nedeni de budur.



Şekil 4.20. Biyoreaktör 3 g/L magnezyum silikat fermentasyonu 1 (solda) ve 9. gün hücre görüntüleri (Ek 8)

4.7.3. Biyoreaktörde 5 g/L magnezyum silikat ile fermentasyon

En yoğun hücre gelişimine karşılık en hızlı şeker tüketimi 5 g/L magnezyum silikat konsantrasyonunda gerçekleştirilen biyoreaktör denemesinde elde edilmiştir. Öyle ki başlangıçta ortama ilave edilen şekerin yaklaşık %85'i fermentasyonun 3. gününde tüketilmiştir (Çizelge 4.13).

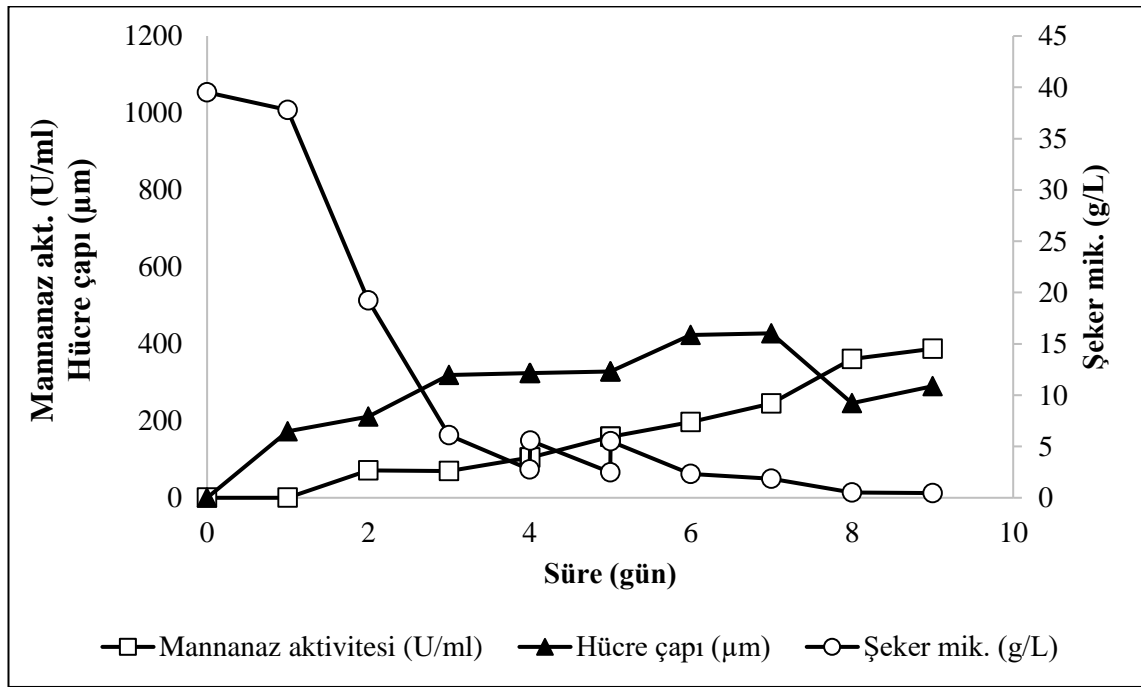
Çizelge 4.13. Biyoreaktör 5 g/L magnezyum silikat fermentasyonuna ait sonuçlar

Gün	β -mannanaz aktivitesi (U/ml)	Şeker mik, (g/L)	Hücre çapı (μ m)
0	0 \pm 0	39,51 \pm 0,58	0 \pm 0
1	0 \pm 0	37,79 \pm 1,42	172,69 \pm 2,28
2	71,17 \pm 8,3	19,23 \pm 2,28	210,72 \pm 4,86
3	69,74 \pm 10,38	6,1 \pm 1,28	318,87 \pm 15,7
4	104,75 \pm 16,74	2,77 \pm 0,4	324,12 \pm 17,05
4,007	104,75 \pm 16,74	5,56 \pm 0,55	324,12 \pm 17,05
5	158,45 \pm 10,16	2,47 \pm 0,26	327,79 \pm 13,3
5,007	158,45 \pm 10,16	5,51 \pm 0,79	327,79 \pm 13,3
6	197,15 \pm 29,36	2,33 \pm 0,03	423,11 \pm 16,65
7	244,72 \pm 41,97	1,87 \pm 0,17	427,38 \pm 14,91
8	360,3 \pm 44,65	0,52 \pm 0,01	245,86 \pm 7,07
9	387,16 \pm 38,81	0,46 \pm 0,01	289,85 \pm 6,76

Şeker miktarındaki bu hızlı düşüşe karşılık enzim aktivitesi değeri aynı hızda artış göstermemiştir. Şeker tüketimi ve hücre gelişimi sorunsuz gerçekleşmesine rağmen enzim aktivite değerleri ancak 5. günden sonra 200 U/ml seviyelerinin üzerine çıkabilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi değeri 387,16 \pm 38,81 U/ml olarak fermentasyonun son gününde hesaplanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde substrat ilaveleri

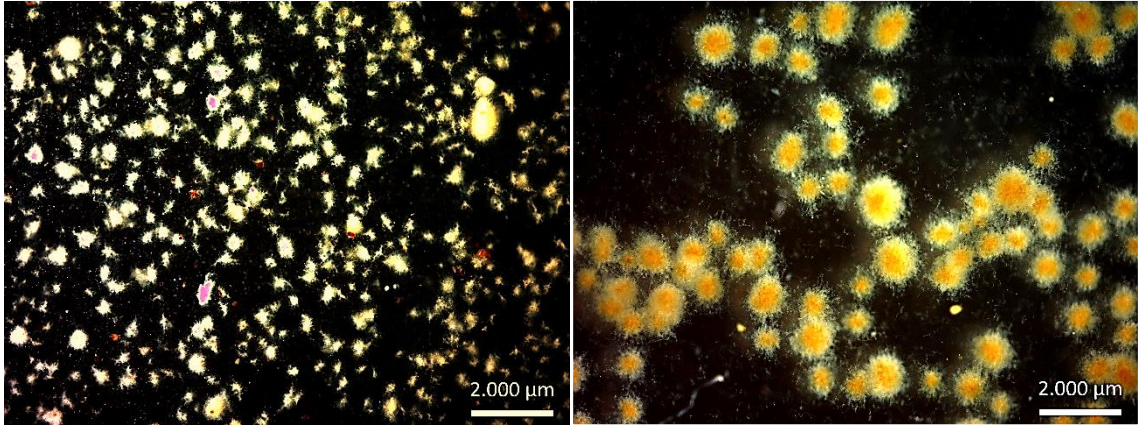
sonrasında yine şeker etkin bir şekilde kullanılmış ve 6. günde şeker miktarı 3 g/L'nin altına düşmüş ve enzim aktivitesindeki artışlar fermentasyon sonlanıncaya kadar devam etmiştir.

3 g/L magnezyum silikat biyoreaktör denemelerinde olduğu gibi bu denemede de hücre çapı değerleri oldukça düşük olduğundan yüksek hücre gelişimi gerçekleşmiştir. Benzer şekilde 2 ve 3. günlerde hücre miktarı oldukça yüksek olduğundan karıştırma ve köpük kırıcının etkinliği azalmıştır. Hücre çapı değerleri incelendiğinde ise çap değerlerinin sürekli arttığı ancak 7. günden sonra neredeyse yarı yarıya düştüğü gözlemlenmiştir. Bu durumun asıl nedeni 7. gün sonunda fermentasyon kabı çeperine yapışarak hücrelerin büyük bir çoğunluğunun kaybedilmesidir. Bu kayıp nedeniyle hücre çapı değerlerinde de ani bir değişim gözlemlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. 5 g/L magnezyum silikat biyoreaktör fermentasyonu enzim aktivitesi, şeker miktarı ve hücre çapı değişimi

5 g/L magnezyum silikat biyoreaktör denemesinde en yüksek hücre çapı değeri $427,38 \pm 14,91 \mu\text{m}$ olarak fermentasyonun 7. gününde ölçülmüştür. Fermentasyonun ilerleyen günlerinde yoğun bir hücre kaybı yaşandığından hücre çapı değerlerinde ani bir değişiklik olmuştur. Bu durum hücre görüntülerine de yansımıştır. Şekil 4.22 incelendiğinde 1. ve 9. gün arasındaki hücre yoğunluğu farkı açıkça görülmektedir.



Şekil 4.22. Biyoreaktör 5 g/L magnezyum silikat fermentasyonu 1 (solda) ve 9. gün hücre görüntüleri (Ek 9)

4.8. Biyoreaktör Denemelerinin Karşılaştırılması

Yarı-kesikli beslemeli olarak mikropartikülsüz ve farklı mikropartiküllerle gerçekleştirilen biyoreaktör denemelerine ait kinetik parametreler Çizelge 4.14'de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Biyoreaktör denemelerine ait kinetik parametreler

Mikropartikül kons. (g/L)	Şeker tüketim oranı (g/L/gün)*	β -mannanaz üretim oranı (U/ml/gün)*	Maksimum β -mannanaz aktivitesi değerleri (U/ml)*	Toplam Şeker tüketim değerleri (g/L)
Kontrol	8,16 ^b	30,65 ^c	92,86 ^d	45,52 ^a
Alüminyum oksit	1	7,65 ^b	27,71 ^c	42,99 ^{ab}
	10	7,55 ^b	42,55 ^b	42,35 ^{ab}
	15	5,48 ^c	33,94 ^c	40,19 ^b
Magnezyum silikat	1	10,09 ^a	47,65 ^b	44,17 ^a
	3	10,13 ^a	89,91 ^a	41,64 ^{ab}
	5	10,52 ^a	47,98 ^b	44,88 ^a

*İstatistiksel fark önemli bulunmuştur (p<0,05).

Biyoreaktör denemelerinde en yüksek şeker tüketimi 45,52 g/L ile kontrol fermentasyonunda elde edilmişken en yüksek şeker tüketim oranı 10,52 g/L/gün ile 5 g/L magnezyum silikat konsantrasyonunda elde edilmiştir. Magnezyum silikat biyoreaktör denemelerinde şeker tüketim oranları 10 g/L/gün seviyelerinde gerçekleşmiştir. En düşük şeker tüketim oranı ise 5,48 g/L/gün ile 15 g/L alüminyum oksit konsantrasyonunda hesaplanmıştır. Şeker tüketim miktarlarındaki değişim istatistiksel olarak önemli olmamasına karşın şeker tüketim oranlarındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir (p<0,05).

Şeker tüketim oranı alüminyum oksit biyoreaktör denemelerinden yüksek olmasına rağmen en düşük enzim aktivitesi 92,86 U/ml olarak kontrol fermentasyonunda gerçekleşmiştir. En yüksek β -mannanaz aktivitesi ise 643,16 U/ml olarak 3 g/L magnezyum silikat konsantrasyonunda gerçekleştirilen biyoreaktör fermentasyonunda elde edilmiştir. En yüksek β -mannanaz üretim oranı da 89,91 U/ml/gün olarak 3 g/L magnezyum silikat konsantrasyonunda hesaplanmıştır. Bu değeri sırasıyla 47,98 U/ml/gün ve 47,65 U/ml/gün değerleriyle 5 ve 1 g/L magnezyum silikat denemeleri izlemiştir. Çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen erlenmayer denemelerinde olduğu gibi yarı-kesikli beslemeli biyoreaktör denemelerinde de en yüksek enzim aktivitesi ve üretim oranı değerleri magnezyum silikatın mikropartikül olarak kullanıldığı denemelerde elde edilmiştir.

Elde edilen veriler ışığında mikropartikül türü ve miktarının enzim aktivitesi ve üretim oranı değerleri için istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Sonuç olarak pH ve havalandırma denemelerinde kullanılmak üzere istatistiksel olarak en iyi sonuçların elde edildiği 3 g/L magnezyum silikat konsantrasyonu seçilmiştir ($p<0,05$).

4.9. pH ve Havalandırmanın Fermentasyon Üzerine Etkisi

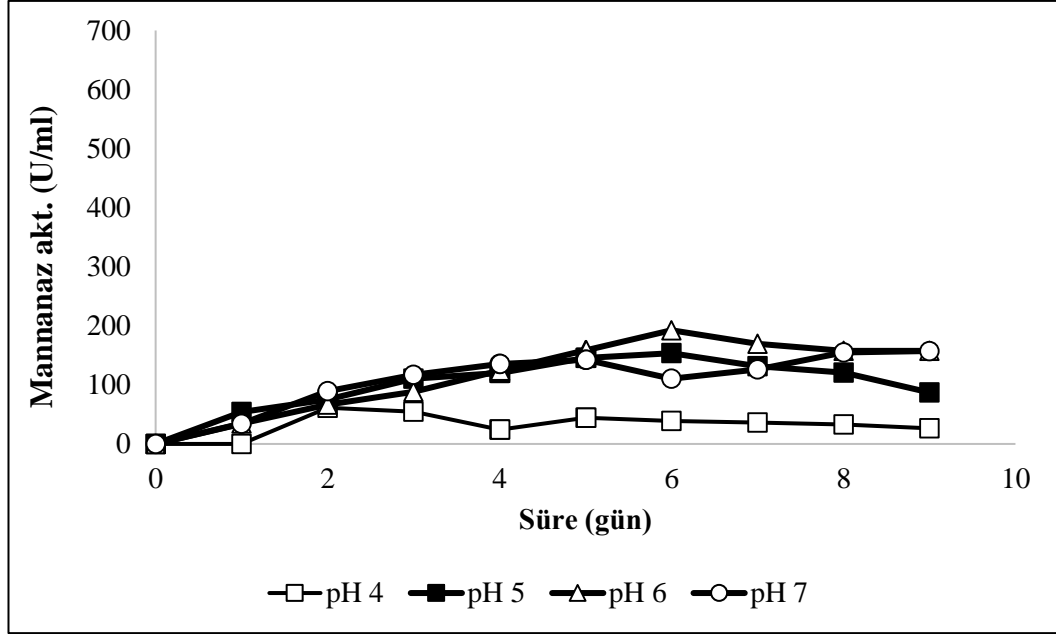
Rekombinant *Aspergillus sojae* β -mannanaz fermentasyonlarına pH'nın etkisinin belirlenmesi amacıyla 3 g/L magnezyum silikat konsantrasyonunda yarı-kesikli beslemeli fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Denemeler süresince elde edilen sonuçlardan hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 4.15'te verilmiştir.

Çizelge 4.15. pH'nın β -mannanaz fermentasyonu üzerine etkisi

pH	Şeker tüketim oranı (g/L/gün)	β -mannanaz üretim oranı (U/ml/gün)*	Maksimum β -mannanaz aktivitesi değerleri (U/ml)*	Toplam Şeker tüketim değerleri (g/L)
4,0	10,52 ^a	22,54 ^c	61,24 ^c	49,77 ^a
5,0	11,33 ^a	27,15 ^b	153,63 ^b	48,27 ^{ab}
6,0	11,02 ^a	31,50 ^a	192,50 ^a	46,15 ^{ab}
7,0	10,48 ^a	30,10 ^{ab}	157,31 ^b	44,60 ^b

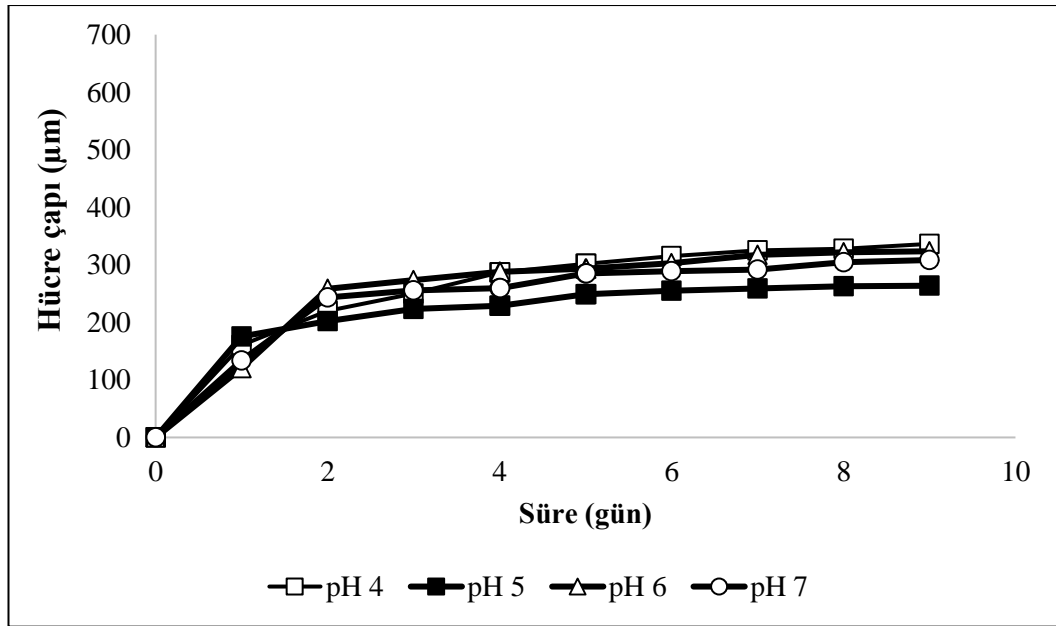
*İstatistiksel fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Yarı-kesikli beslemeli biyoreaktör üretimlerinde pH kontrolünün uygulanması enzim aktivitesi değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir düşüşle sonuçlanmıştır ($p<0,05$). pH kontrollü fermentasyonlar sonucunda en yüksek ve en düşük β -mannanaz aktivitesi değerleri 192,5 \pm 0,35 U/ml (pH 6,0) ve 61,24 \pm 1,46 U/ml (pH 4,0) olarak elde edilmiştir. Fermentasyon süresince elde edilen β -mannanaz aktivitesi değerleri incelendiğinde bazı günler enzim aktivitesi değerlerinde ani düşüşler ve artışlar olduğu görülmüştür (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. pH kontrollü biyoreaktör denemeleri enzim aktivitesi değişimleri

Fermentasyon süresince enzim aktivitesi değerleri değişkenlik gösterirken hücre çapı değerleri düzenli azalan olarak artış göstermiştir (Şekil 4.24). Maksimum hücre çapı değerleri pH 4,0, pH 5,0, pH 6,0 ve pH 7,0 için sırasıyla $336,38 \pm 10,01 \mu\text{m}$, $263,67 \pm 8,37 \mu\text{m}$, $323,55 \pm 20,81 \mu\text{m}$ ve $308,28 \pm 11 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak pH değerinin hücre çapı ve enzim aktivitesi değerlerini etkilediği ancak pH kontrolsüz fermentasyondan istatistiksel olarak daha iyi sonuçlar vermediği belirlenmiştir ($p < 0,05$). Bu nedenle havalandırma denemeleri pH kontrolsüz olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.24. pH kontrollü biyoreaktör denemeleri hücre çapı değişimleri

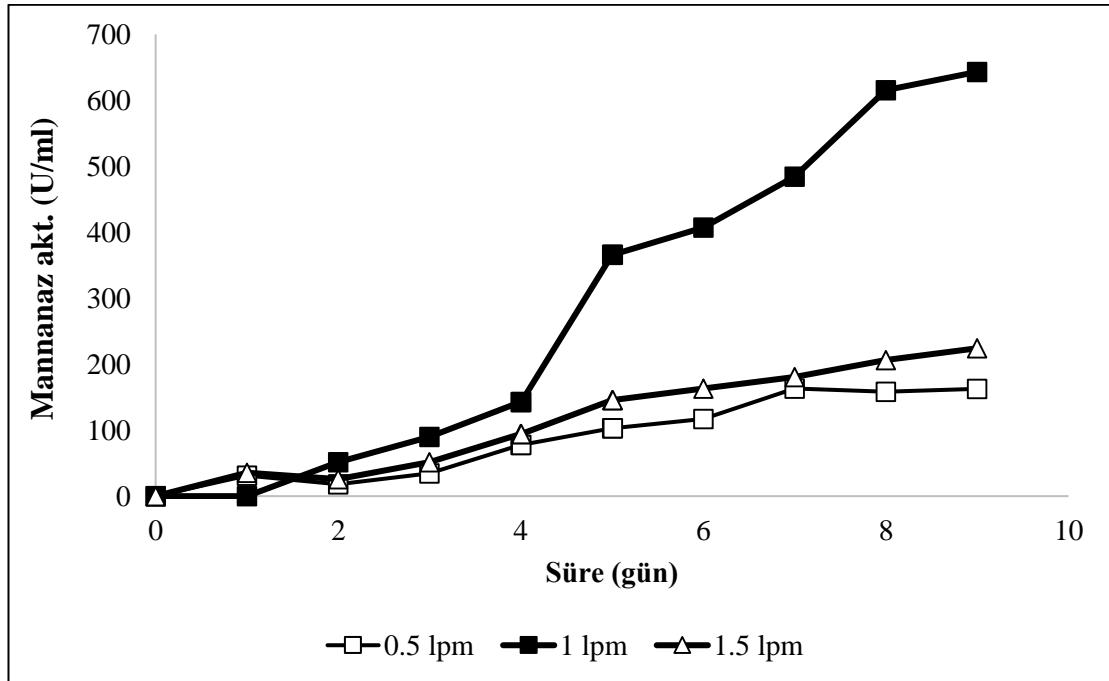
Rekombinant *Aspergillus sojae* β -mannanaz fermentasyonlarına farklı havalandırma oranlarının etkisinin belirlenmesi amacıyla 3 g/L magnezyum silikat konsantrasyonunda pH kontrolsüz yarı-kesikli beslemeli fermentasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Denemeler süresince elde edilen sonuçlardan hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 4.16'de verilmiştir.

Çizelge 4.16. Havalandırmanın β -mannanaz fermentasyonu üzerine etkisi

Havalandırma oranı (l/d)	Şeker tüketim oranı (g/L/gün)	β -mannanaz üretim oranı (U/ml/gün)*	Maksimum β -mannanaz aktivitesi değerleri (U/ml)*	Toplam Şeker tüketim değerleri (g/L)
0,5	10,72 ^a	22,28 ^b	163,17 ^c	45,56 ^a
1,0	10,13 ^a	89,91 ^a	643,16 ^a	41,64 ^a
1,5	10,96 ^a	26,68 ^b	224,21 ^b	45,10 ^a

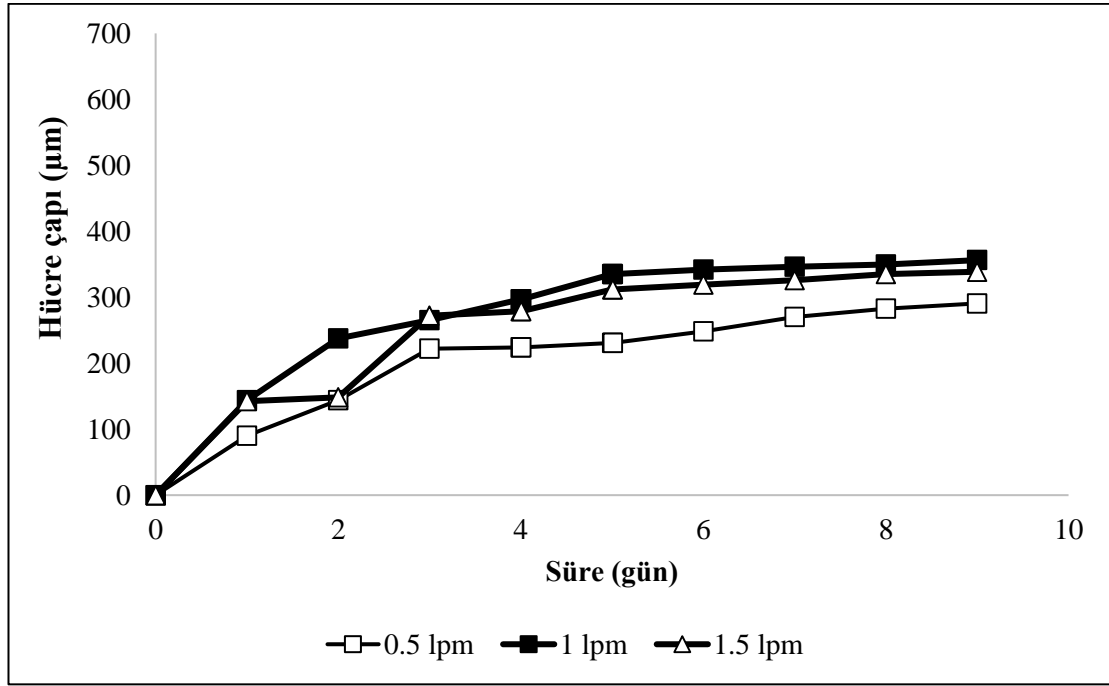
*İstatistiksel fark önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

Havalandırma oranları 0,5 ve 1,5 l/d olduğunda şeker tüketim oranları ve toplam şeker tüketim değerlerinde istatistiksel olarak önemli bir farklılık belirlenmemiştir ($p < 0,05$). Bu durum β -mannanaz aktivitesi değerlerini olumlu etkilememiş olup daha düşük şeker tüketimine rağmen en yüksek enzim aktivitesi değeri $643,16 \pm 11,71$ U/ml olarak 1 l/d havalandırma oranında elde edilmiştir. pH kontrollü denemelerin aksine pH kontrolsüz olarak gerçekleştirilen denemelerde enzim aktivitesi değerlerinde ani düşüşler gözlemlenmemiştir (Şekil 4.25). Üç havalandırma oranında da en yüksek enzim aktivitesi değeri fermentasyon sonunda elde edilmiştir.



Şekil 4.25. Farklı havalandırma oranlarında gerçekleştirilen pH kontrolsüz biyoreaktör denemeleri enzim aktivitesi değişimleri

Havalandırma oranındaki değişim fermentasyon ortamındaki çözülmüş oksijen konsantrasyonunu değiştirdiğinden hücrelerin gelişimleri de etkilenmektedir. Bu etkilenme sonucunda hücrelerin gelişim hızı ve doğal olarak da hücre büyüklükleri direkt olarak etkilenmektedir. Her ne kadar magnezyum silikat hücre büyümesini düzenleyici ajan olarak kullanılsa da çevresel faktörler hücre büyüklüklerinde direkt olarak etkili olmaktadır. Havalandırma oranının değiştirilmesi aynı şartlarda gerçekleştirilen fermentasyonlarda hücre pellet çaplarında da istatistiksel olarak önemli farklılıklara neden olmuştur ($p < 0,05$). Fermentasyon süresince elde edilen en yüksek hücre çapı değerleri sırasıyla $290,66 \pm 3,17 \mu\text{m}$ (0,5 l/d), $356,3 \pm 9,26 \mu\text{m}$ (1 l/d) ve $338,71 \pm 10,37 \mu\text{m}$ (1,5 l/d) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Farklı havalandırma oranlarında gerçekleştirilen pH kontrolsüz biyoreaktör denemeleri hücre çapı değişimleri

Tüm denemeler sonucunda rekombinant *Aspergillus sojae* β -mannanaz yarı-kesikli beslemeli biyoreaktör üretimleri için şartlar; 400 d/d, 30°C, 1 l/d havalandırma ve pH kontrolsüz olarak belirlenmiştir. İstatistiksel hesaplamalar ve karşılaştırmalar sonucunda da en uygun mikropartikül konsantrasyonunun 3 g/L magnezyum silikat olduğu belirlenmiştir. Bundan sonraki saflaştırma ve diğer aşamalar için kullanılacak ham enzim ekstraktı bu şartlarda üretilen β -mannanaz enzimi ile gerçekleştirilmiştir.

4.10. Farklı Santrifüj ve Ultrafiltrasyon Uygulamalarının Saflaştırma Üzerine Etkisi

Ham enzim ekstraktının saflaştırılmasında ilk işlem olarak uygulanması düşünülen santrifüj prosesinin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 3 farklı çevirme hızı (7000, 10000, 15000 d/d) ve 3 farklı sürede (5, 10, 15 dakika) santrifüj denemeleri gerçekleştirilmiştir. Denemeler sonrası süpernatanttan alınan örneklerde enzim aktivitesi ve toplam protein miktarı analizleri yapılmıştır (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. Santrifüj denemeleri enzim aktivitesi ve saflaştırma katsayısı değerleri

Örnek	β-mannanaz aktivitesi (U/mg)		Saflaştırma katsayısı
	Başlangıç	Santrifüj sonrası	
7000 d/d-5 dk	2149,86	2030,25 ^b	0,94 ^b
7000 d/d-10 dk	2149,86	2006,44 ^b	0,93 ^b
7000 d/d-15 dk	2149,86	2208,04 ^{ab}	1,03 ^{ab}
10000 d/d-5 dk	2149,86	2180,70 ^{ab}	1,01 ^{ab}
10000 d/d-10 dk	2149,86	2177,50 ^{ab}	1,01 ^{ab}
10000 d/d-15 dk	2149,86	2041,01 ^b	0,95 ^b
14000 d/d- 5 dk	2149,86	2173,58 ^{ab}	1,01 ^{ab}
14000 d/d- 10 dk	2149,86	2342,59 ^a	1,09 ^a
14000 d/d- 15 dk	2149,86	2364,98 ^a	1,10 ^a

*İstatistiksel fark önemli bulunmuştur (p<0,05).

Santrifüj denemelerine ait sonuçlar incelendiğinde en yüksek spesifik enzim aktivitesi değerleri 14000 d/d-10 dk ve 14000 d/d-15 dk uygulamalarında elde edilmiş olup santrifüj işleminin enzim aktivitesi üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (p<0,05). Bu uygulamalar sonucunda saflaştırma katsayısı değerleri ise sırasıyla 1,09 ve 1,10 olarak gerçekleşmiş olup bu değişimin de istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (p<0,05). Endüstriyel üretimlerde oldukça yüksek hacimlerde çalışıldığından uygulanacak her proses maliyetin artmasına neden olduğundan santrifüj işleminin yalnızca sürekli bir sistemde uygulanması halinde hücre ile fermentasyon sıvısının ayrılmasında başarıyla kullanılabilceği düşünülmektedir.

Santrifüj işleminden sonra elde edilen berrak kısımdan daha konsantre enzim solüsyonu elde etmek amacıyla laboratuvar tipi Sartocoon Slice 200 model (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) cihaz ile ultrafiltrasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 30 kDa ve 10 kDa'luk ayırma sınırlarına sahip filtreler seçilmiştir. Ultrafiltrasyon işlemi sonrası permeat ve retentat toplanmıştır. Alınan örneklerde toplam protein ve enzim aktivitesi analizleri yapılarak saflaştırma katsayısı hesaplanmıştır (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. Ultrafiltrasyon öncesi ve sonrası β-mannanaz enzimi

	Toplam protein (mg)*	Toplam enzim aktivitesi (U)*	Spesifik aktivite (U/mg)*	Hacim (ml)	Saflaştırma katsayısı*
UF Öncesi	178,02 ^a	387480,8 ^a	2176,65 ^b	1000	1 ^b
10 kDa UF Retentat	38,38 ^b	99132,81 ^b	2582,92 ^a	100	1,19 ^a
10 kDa UF Permeat	0 ^c	0 ^c	0 ^c	900	0 ^c
30 kDa UF Retentat	35,91 ^b	97642,61 ^b	2718,89 ^a	100	1,25 ^a
30 kDa UF Permeat	0 ^c	0 ^c	0 ^c	900	0 ^c

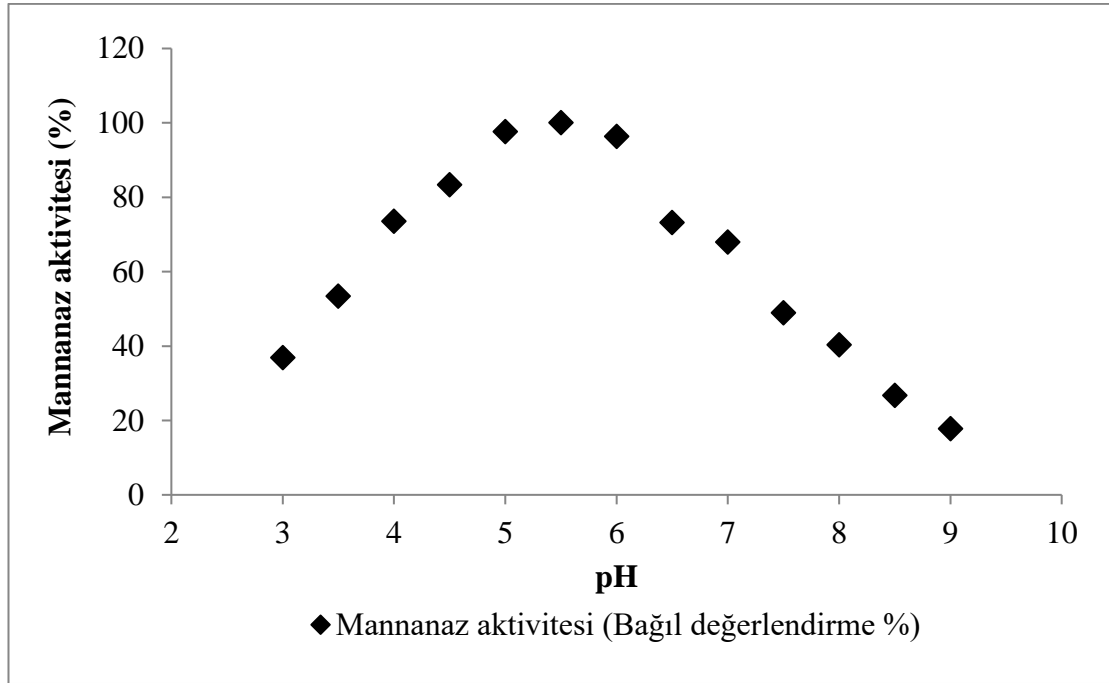
*İstatistiksel fark önemli bulunmuştur (p<0,05).

10 ve 30 kDa membranların permeat kısmından alınan örneklerde β-mannanaz enzimi ve aktivitesi tespit edilememiştir. Enzimin moleküler ağırlığı 50-60 kDa olduğundan bu beklenen bir sonuçtur. Yapılan analizler de bu sonucu desteklemiştir.

Retentatlarda ise protein ve enzim aktivitesi tespit edilmiş olup toplam protein ve enzim aktivitesi değerleri sırasıyla 38,38 mg protein (10 kDa), 35,91 mg protein (30 kDa), 99132,81 U (10 kDa) ve 97642,61 U (30 kDa) olarak hesaplanmıştır. 10 ve 30 kDa uygulamaları için saflaştırma katsayısı değerleri ise sırasıyla 1,19 ve 1,25 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak 10 veya 30 kDa ultrafiltrasyon proseslerinin üretilen ham enzim preparatından istenilen hacimde konsantre enzim preparatı üretiminde istatistiksel olarak önemli sonuçlar verdiği ve bulk enzim üretiminde kullanılabileceği belirlenmiştir ($p < 0,05$).

4.11. Enzimin Optimum Çalışma pH'sının Belirlenmesi

β -mannanaz enziminin optimum çalışma pH veya pH'larının belirlenmesi amacıyla pH 3,0-9,0 aralığında hazırlanan %0,5'lik keçiyoynuzu ekstraktı ile aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Denemeler sonucu elde edilen sonuçlar bağıl olarak değerlendirilmiş ve Şekil 4.27'de verilmiştir.



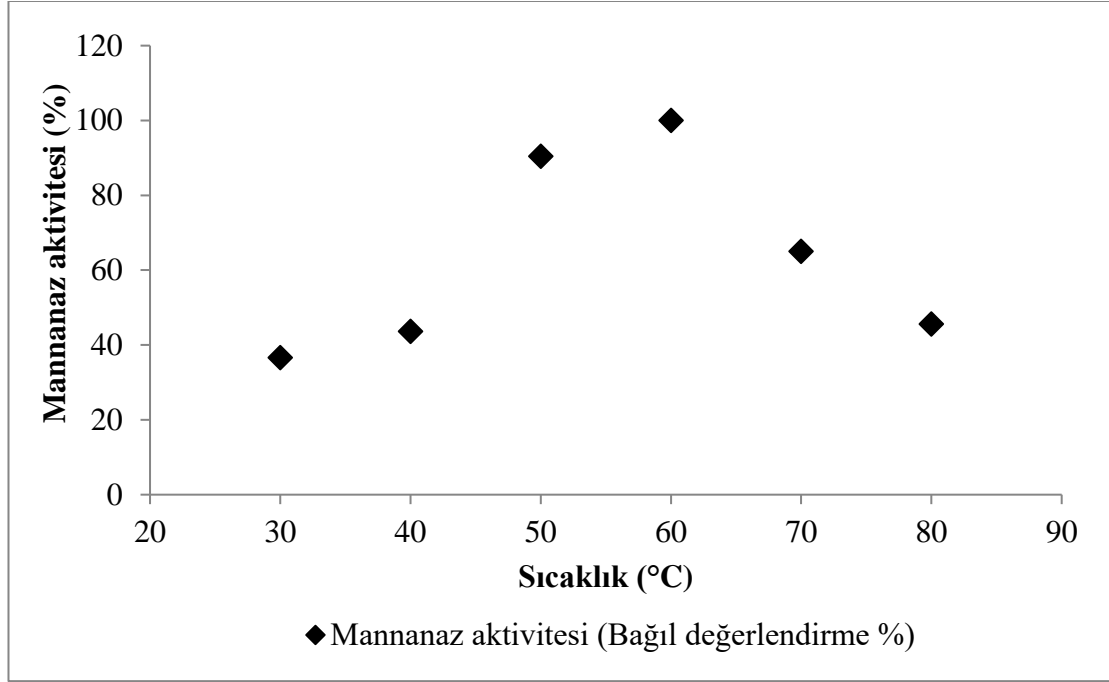
Şekil 4.27. Farklı pH'larda β -mannanaz enzimi aktivite değişimi

Şekil 4.27 incelendiğinde asidik ve bazik uç değerlerde enzimin düşük seviyede aktivite gösterdiği görülmektedir. Bazik pH'lar enzimi daha olumsuz etkilemiş ve en düşük enzim aktivitesi değeri pH 9'da elde edilmiştir. Nötr pH değerlerinde de enzim aktivite değerleri %100 seviyelerinde gerçekleşmezken istatistiksel olarak pH 5,0-6,0 aralığında enzimin en yüksek düzeyde aktivite gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,05$). Enzimin pH 3,5 seviyelerinde ise %50 düzeyinde aktivite gösterdiği görülmektedir. Grafikten de görüldüğü üzere β -mannanaz enziminin pH 3,5-7,0 aralığında %50 ve üstü randımanla çalıştığını söylemek mümkündür. Enzimin bu kadar geniş pH aralığında yüksek düzeyde aktivite gösteriyor olması oldukça önemlidir. Öyle ki çok farklı alanlarda kullanıma sahip olan β -mannanaz enziminin her kullanım sahasında optimum düzeylerde

pH ile karşılaşması mümkün değildir. Bu geniş pH aralığındaki etki spektrumu enzimin neden bu kadar çok kullanım alanı olduğunu da açıklamaktadır.

4.12. Enzimin Optimum Çalışma Sıcaklığının Belirlenmesi

β -mannanaz enziminin optimum çalışma sıcaklık veya sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla enzim aktivitesi analizi farklı sıcaklıklarda uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar bağıl olarak değerlendirilmiş ve en yüksek aktivitenin ölçüldüğü deneme %100 olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.28).

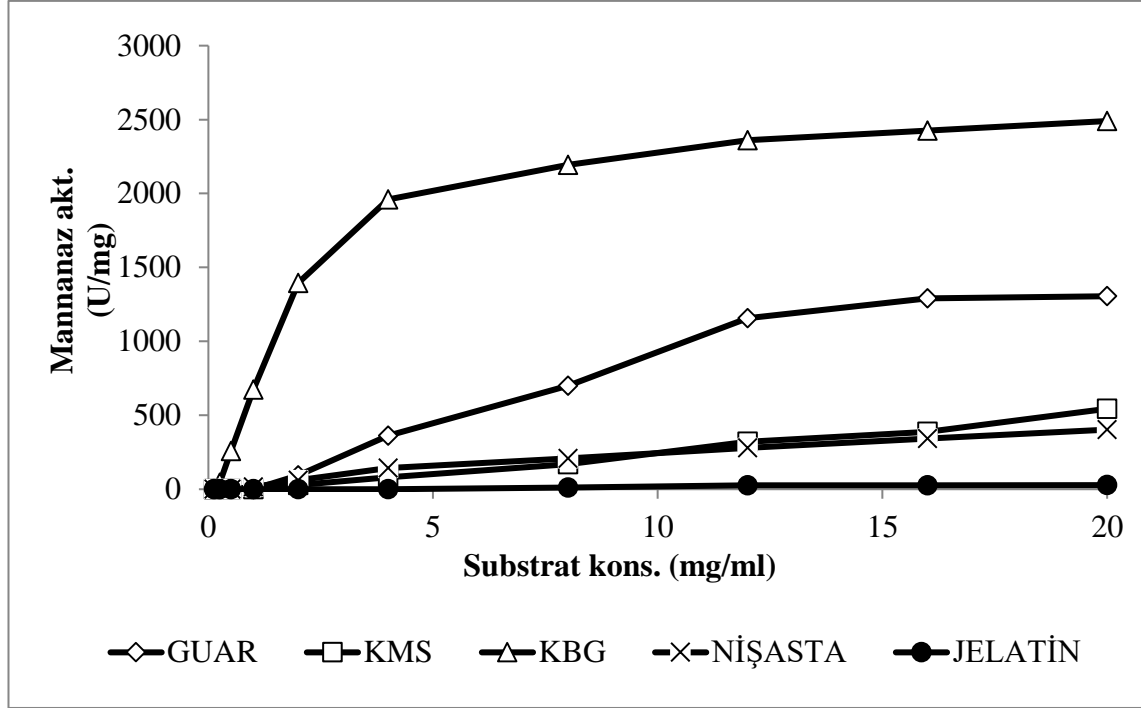


Şekil 4.28. Farklı sıcaklıklarda β -mannanaz enzimi aktivite değişimi

β -mannanaz enziminin etkin olarak çalıştığı sıcaklık değeri 60°C olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklığın üzerinde enzim aktivitesi değeri hızla %60 düzeylerine düşerken, 50°C'de enzim etkinliği %90 seviyelerindedir. Ancak sıcaklık 40°C'ye düşürüldüğünde aktivite değeri de hızla %40 seviyelerine düşmektedir. Sonuçlara göre enzimin geniş bir sıcaklık değeri aralığında çalışmış ancak istatistiksel olarak en yüksek aktivite değerleri 50-60°C aralığında gerçekleşmiştir ($p < 0,05$). Geniş pH aralığındaki etki spektrumunun yanı sıra enzimin geniş bir sıcaklık aralığında da en az %40 düzeyinde çalışıyor olması farklı alanlarda rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir.

4.13. Enzimin Substrat Spesifikliğinin ve Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

β -mannanaz enziminin substrat spesifikliği ve enzim çalışma hızının belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 16 ve 20 mg/ml) guar gam, karboksimetilselüloz (KMS), keçiyoynuzu gamı (KBG), nişasta ve jelatin hazırlanarak enzim aktivitesi analizi substrat olarak kullanılmıştır. Elde edilen aktivite değerleri U/mg olarak hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4.29'da verilmiştir.



Şekil 4.29. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan substratlarda enzimin aktivite değişimi

Substratlara göre en yüksek aktivite değerleri sırasıyla 1305,15 U/mg (20 mg/ml guar gam), 544,14 U/mg (20 mg/ml KMS), 2490,07 U/mg (20 mg/ml KBG), 403,01 U/mg (20 mg/ml nişasta) ve 21,84 U/mg (20 mg/ml jelatin) olarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlara karşılık elde edilen aktivite değerleri kullanılarak K_m (Michaelis Menten sabiti) ve V_{max} (Maksimum enzim hızı) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. Farklı substratlara ait V_{max} ve K_m değerleri

Substrat	V_{max} (U/mg)*	K_m ($\mu\text{mol/ml}$)	R^2
Guar	1768 ^b ±180,70	10,31 ^{ab} ±2,82	0,93
KMS	929,80 ^c ±137,10	24,01 ^a ±6,82	0,95
KBG	2719 ^a ±76,47	2,26 ^b ±0,29	0,97
Nişasta	536,40 ^d ±30,48	11,06 ^{ab} ±1,64	0,98
Jelatin	44,67 ^e ±11,96	15,88 ^{ab} ±9,59	0,77

* İstatistiksel fark önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

K_m değeri, reaksiyon hızının yarı maksimum olduğu andaki substrat konsantrasyonu olup substratın enzime bağlanma afinitesinin (ilgisinin) bir ölçüsü sayılır. K_m değeri küçük ise yüksek bir afinite vardır, yani V_{max} 'a daha çabuk ulaşılır.

Sonuçlar incelendiğinde en düşük K_m ve dolayısıyla en yüksek hız keçiyoynuzu gamının substrat olarak kullanıldığı denemede elde edilmiştir. K_m ve V_{max} sırasıyla 2,26±0,29 $\mu\text{mol/ml}$ ve 2719±76,47 U/mg olarak hesaplanmıştır. Keçiyoynuzu gamını sırasıyla guar gam, karboksimetilselüloz, nişasta ve jelatin takip etmiştir. Şekil 4.29 incelendiğinde de daha düşük K_m değerlerinde V_{max} 'a daha çabuk ulaşıldığı

görülmektedir. Sonuç olarak yapısında mannanları barındıran gamlarda (keçiyoynuzu ve guar gam) enzim hızı istatistiksel olarak önemli ve daha yüksek olurken farklı yapılardaki karbonhidratlara enzim etki ediyor olsa da hız düşmektedir ($p<0,05$).

4.14. Farklı Reaktiflerin Enzim Aktivitesine Etkisi

Enzimin farklı iyonlar varlığında aktivitesinde gerçekleşebilecek değişimlerin belirlenmesi amacıyla 1 mM hazırlanan metal iyonları (K^+ , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Li^+ , Mn^{2+} , Ag^+) ve metal şelat ajanı (EDTA) ile enzimin optimum çalışma sıcaklığında ve pH solüsyonunda 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından enzim aktivitesi analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Farklı reaktifler ve enzim aktivitesi değişimi

Örnek	β -mannanaz aktivitesi (Bağıl değerlendirme %)*
Kontrol	100,00 ^d
K^+	79,73 ^g
Sr^{2+}	82,49 ^g
Ca^{2+}	97,72 ^d
Ni^{2+}	92,96 ^e
Fe^{3+}	114,85 ^{ab}
Ba^{2+}	115,70 ^{ab}
Cu^{2+}	114,09 ^{ab}
Co^{2+}	116,94 ^a
Na^+	112,85 ^b
Zn^{2+}	93,72 ^e
Li^+	92,87 ^e
Mn^{2+}	106,95 ^c
Ag^+	89,72 ^f
EDTA	82,87 ^g

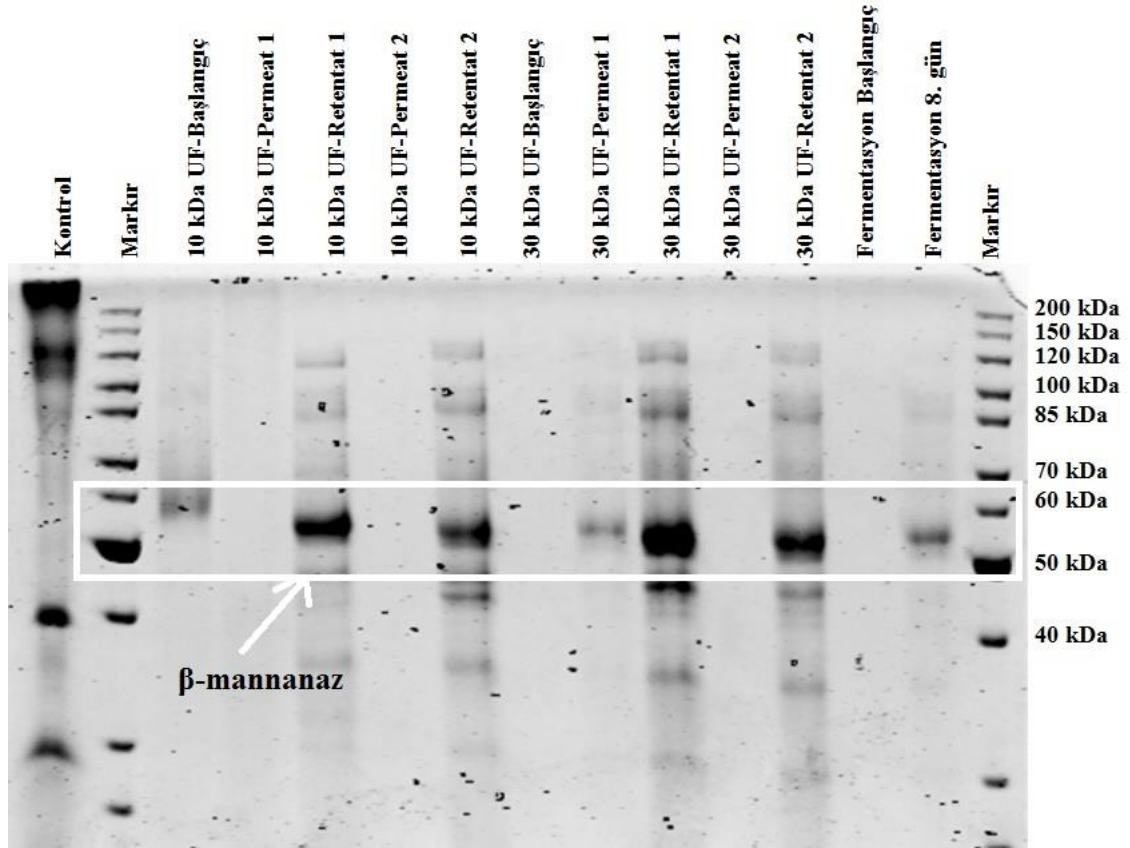
*İstatistiksel fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Farklı mineral iyonlarının enzim üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli ve her reaktifin enzim aktivitesine etkisi farklı olmuştur ($p<0,05$). Öyle ki K^+ , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Li^+ , Ag^+) ve EDTA enzim aktivitesini azaltırken; Fe^{3+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Na^+ ve Mn^{2+} enzim aktivitesini artırmıştır. İstatistiksel olarak en yüksek artış Co^{2+} varlığında %16,94 olarak gerçekleşmişken en yüksek düşüş K^+ varlığında %20,27 olarak gerçekleşmiştir ($p<0,05$). Denenen reaktiflerin tamamında düşüşler olsa da enzimin aktivite göstermiş olması yine enzimin farklı şart ve koşullarda çalışabileceğini göstermiştir.

4.15. Fermentasyon ve Ultrafiltrasyon Örneklerinde SDS-PAGE Sonuçları

En yüksek enzim aktivitesinin elde edildiği fermentasyon ve bazı ultrafiltrasyon örnekleri kullanılarak SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz enzimin

moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla yapılmış olup alınan görüntü Şekil 4.30'da verilmiştir.

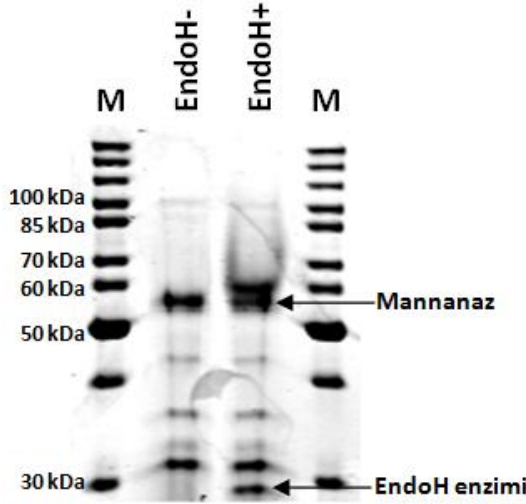


Şekil 4.30. SDS-PAGE analiz sonuçları

SDS-PAGE analiz sonuçları incelendiğinde rekombinant *Aspergillus sojae* tarafından üretilen β -mannanaz enziminin moleküler büyüklüğünün 50-60 kDa aralığında olduğu ve ultrafiltrasyon işlemleri sonucunda enzimin başarıyla konsantre edildiği açıkça görülmektedir. Öyle ki ultrafiltrasyon permeat örneklerinde herhangi bir bant yani enzim varlığı tespit edilememiştir. Dolayısıyla da ultrafiltrasyon işleminin bulk enzim üretiminde başarıyla kullanılabilirdiği görülmüştür.

4.16. β -mannanazın De-glikozilasyonu

Üretilen β -mannanaz enziminin ortamdaki diğer karbonhidratlarla olan etkileşimini belirlemek amacıyla de-glikozilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla amonyum sülfat ile çöktürülen (%60) ve diyaliz edilen örnekler kullanılmıştır. Glikozilasyon analizi için glikoproteinlere bağlanan mannan ünitelerini kopararak uzaklaştıran ve spesifik bir enzim olan EndoH enzimi kullanılmıştır. Protein bandında EndoH uygulaması sonrası herhangi bir değişimin olup olmadığı SDS-PAGE analizi ile görüntülenmiştir. Elde edilen SDS-PAGE görüntüsü Şekil 4.31'de verilmiştir.



Şekil 4.31. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası örneğin EndoH enzimi ile muamelesini gösteren SDS-PAGE görüntüsü. M, Markır; EndoH-, muamele edilmemiş örnek; EndoH+, muamele edilmiş örnek.

EndoH uygulaması negatif ve pozitif uygulama olarak yürütülmüş ve negatif uygulamaya pozitif uygulamadan farklı sadece EndoH enzimi ilave edilmemiştir. Uygulamadan beklenen sonuç, protein glikozile olmuş ise protein bandının kontrol örneğine göre daha düşük moleküler ağırlıkta (kDa) görülmesi iken, Şekil 4.31’de de görüldüğü gibi EndoH enziminin protein üzerine herhangi bir etkisi olmamıştır. Bunun anlamı, proteinde herhangi bir glikozilasyon olmamakta ya da SDS-PAGE’de fark edilmeyecek kadar az glikozile olmaktadır. EndoH uygulamasında çıkan ve yaklaşık 28 kDa ağırlığındaki protein bandı EndoH enzimini göstermektedir. Ayrıca, EndoH uygulanan örnekte, β -mannanaz protein bandının üzerinde ve çok yakın bir bant görülmüştür. Bu protein bandının, β -mannanaz proteininden daha büyük moleküler ağırlığa sahip (>60 kDa) ve SDS-PAGE ile görüntülenemeyen glikozile olmuş diğer proteinler olduğu ve uygulama sonrası moleküler ağırlığının düşmesi sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir.

4.17. Dondurarak Kurutma

Elde edilen enzim solüsyonlarının ticari toz enzim preparatı olarak üretilebilirliğinin belirlenmesi amacıyla dondurarak kurutucuda liyofilize hale getirilmiştir. Bu amaçla örnekler sırasıyla 200 mM sakkaroz (S); 200 mM sakkaroz+%1 BSA (Bovine Serum Albümin) (S+BSA); 200 mM sakkaroz+%0,5 jelatin (S+J); 200 mM sakkaroz+%1 PEG (Polietilen glikol) (S+PEG) olmak üzere dört farklı formülasyon kullanılmıştır. Burada amaç liyofilize enzim preparatı oluşturmak olup elde edilen toz enzim preparatları Şekil 4.32’de gösterilmiştir.



Şekil 4.32. Liyofilizasyon örnekleri (Soldan sağa sırasıyla, kontrol, Sakkaroz, Jelatin, BSA, PEG)

Keçiyoynuzu substratından fermentasyon sonrası elde edilen besiyerinin 10 kDa ayırma sınırında ultrafiltre edilmesi ile farklı solüsyonlarının hazırlanıp liyofilizasyonu sonucu üretilen örneklerin β -mannanaz enzim değerleri Çizelge 4.21'de verilmiştir.

Çizelge 4.21. Keçiyoynuzu ekstrasından elde edilen besiyerinin farklı solüsyonlarda hazırlanan ultrafiltre edilmiş örneklerinin liyofilizasyonu

Uygulanan işlem	β -mannanaz aktivitesi (U/ml)*
UF-10 kDa (Retentat)	997,20 ^c ±12,14
Liyofilizasyon-Enzim	1091,02 ^a ±10,24
Liyofilizasyon(E+S)	1016,62 ^{bc} ±9,78
Liyofilizasyon (E+S+Jelatin)	990,73 ^c ±9,75
Liyofilizasyon(E+S+BSA)	955,34 ^d ±6,58
Liyofilizasyon(E+S+PEG)	1047,69 ^b ±9,45

*İstatistiksel fark önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

10 kDa ayırma sınırında ultrafiltre edilen enzim solüsyonu ayrı ayrı sakkaroz, sakkaroz+jelatin, sakkaroz+BSA ve sakkaroz+PEG içinde muhafaza edilerek liyofilize edilmiş ve enzim değerleri sırasıyla 1016,62 U/ml, 990,73 U/ml, 955,34 U/ml ve 1047,69 U/ml olarak belirlenmiştir. Bunların yanında ultrafiltre edilen örnek doğrudan hiçbir şekilde katkı yapılmadan liyofilize edilmiş, elde edilen liyofilize enzimin aktivitesi 1091,02 U/ml olarak bulunmuştur.

Sonuçlar, ultrafiltre edilen örneğin farklı formülasyonlarının hazırlanması ile β -mannanaz liyofilize enzim preparatı üretimi üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermiştir ($p<0,05$). Farklı formülasyon hazırlanması sonucu elde edilen liyofilize enzim değerlerinde düşüş belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan ve doğrudan katkı yapılmadan liyofilize edilen örneğin enzim değeri bazı uygulamalara göre daha yüksek olmuştur ve söz konusu fark istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ($p<0,05$). Tüm bu veriler ışığında ise dondurarak kurutma işleminin toz β -mannanaz enzim preparatı üretiminde farklı ajanlar kullanılarak veya kullanılmadan üretilebileceği belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında rekombinant *Aspergillus sojae* kullanılarak β -mannanaz enzimi üretiminde mikropartiküllerin kullanılabilirliği araştırılmıştır. Literatürde β -mannanaz enzimi üretiminde mikropartikül kullanımına dair bir araştırma olmadığından sonuçlar öncelikle β -mannanaz enzimi üretiminin yapıldığı benzer araştırmalarla karşılaştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan mikroorganizmalar ve üretilen enzimin aktivitesini gösteren sonuçlar Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. β -mannanaz üretim sonuçlarının karşılaştırılması

Mikroorganizma	β -mannanaz aktivitesi	Referans
<i>Aspergillus niger</i>	90 nkat/ml	Ademark vd 1998
<i>Aspergillus awamori</i>	50 U	Kurakake vd 2001
<i>Bacillus licheniformis</i>	198,2 U/ml	Feng vd 2003
<i>Pichia pastoris</i>	39,7 U/ml	Huang vd 2007
<i>Pichia pastoris</i>	366 U/mg	Chen vd 2007
<i>Aspergillus sojae</i>	482 U/ml	Ozturk vd 2010
<i>Pichia pastoris</i>	430,9 U/mg	Zhao vd 2011
<i>Aspergillus niger</i>	1067,5 U/mg	Wu vd 2011
<i>Paenibacillus cookii</i>	635,4 U/mg	Yin vd 2012
Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i>	568,72 U/ml	Bu çalışma; 5 g/L magnezyum silikat erlenmayer denemesi
Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i>	643,16 U/ml	Bu çalışma; 3 g/L magnezyum silikat yarı-kesikli beslemeli biyoreaktör denemesi
Rekombinant <i>Aspergillus sojae</i>	2718,89 U/mg	Bu çalışma; 30 kDa Retentat örneği

Çizelge 5.1 incelendiğinde ham enzim ekstraktlarında (U/ml) en yüksek β -mannanaz enzimi aktivitesi değerlerinin 568,72 U/ml ve 643,16 U/ml değerleriyle bu tez çalışması kapsamında elde edildiği görülmektedir. Enzim üretimlerinde Çizelgeden de görüleceği üzere en çok kullanılan mikroorganizmalar *Pichia* ve *Aspergillus* grubu üyeleridir. *Aspergillus* grubuna ait küflerin sıvı besiyerinde geliştirilmesinde en önemli sorunlarının başında yüksek misel/pellet gelişimi geldiğinden fermentasyon ortamının kontrol altında tutulması ve dolayısıyla da istenilen düzeyde üretimlerin gerçekleşmesi zorlaşmaktadır. Rekombinant *Aspergillus sojae*’nin geliştirilmesi ve kontrolü kapsamında gerçekleştirilen denemelerin tamamında hücre çapı değerlerinin 1000 μ m’nin altına düştüğü ve hücre gelişiminin kontrol altına alınarak enzim üretimlerinin arttırıldığı belirlenmiştir.

Küflerle gerçekleştirilen enzim üretiminde mikropartikül kullanılarak gerçekleştirilen benzer çalışmalardan birinde *Caldariomyces fumago* kullanılarak klorperoksidaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla alüminyum oksit ve magnezyum silikatın farklı konsantrasyonları denenmiş ve 10-12 günlük fermentasyon sonunda 1000 U/ml aktivite elde etmişlerdir (Kaup vd 2008). *Aspergillus niger* ile fruktofuranosidaz ve glukoamilaz üretiminde ise 25 g/L titanyum silikon oksit (TiSiO₄) kullanımının hücre

çapı değerlerini 1,7µm'den 0,3µm'ye düşürdüğü buna karşın fruktofuranosidaz ve glukoamilaz üretimlerini 3,7 ve 9,5 kat arttırdığını belirlemişlerdir (Driouch vd 2012).

Bir başka çalışmada ise alüminyum oksit ve magnezyum silikat mikropartiküllerinin hücre çaplarını düşürerek üretimleri artırdığı ancak alüminyum oksitin daha yüksek konsantrasyonda kullanılması gerektiğini belirlemişlerdir (Driouch vd 2010). *Aspergillus ficuum* kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada ise alüminyum oksit ve magnezyum silikat kullanılarak erlenmayer (Coban vd 2015a) ve yarı-kesikli beslemeli ve sürekli (Coban vd 2015b) fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. Erlenmayer fermentasyonlarında 15 g/L alüminyum oksit veya magnezyum silikat kullanıldığında hücre çapı değerinin 800µm'den sırasıyla 500µm ve 200µm'ye düşerken enzim aktivitesi değerinin 1,02 U/ml'den sırasıyla 2,01 U/ml ve 2,93 U/ml'ye çıktığını ortaya koymuşlardır (Coban vd 2015a). Gerçekleştirilen sürekli fermentasyon denemeleri sonucunda ise üretim oranı değerinin 0,293 U/ml/sa'den 0,621 U/ml/sa'e yükseldiğini belirlemişlerdir (Coban vd 2015b).

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar göstermektedir ki rekombinant *Aspergillus sojae* ile β-mannanaz enzimi üretiminde alüminyum oksit ve magnezyum silikat mikropartikülleri kullanılarak hücre gelişimi kontrol altına alınabilmekte ve enzim üretimi de arttırılmaktadır. Küflerle üretilen her türlü ürünün ölçek büyütme aşamasında yaşanan hücre kontrolü sorunu uygun konsantrasyonda ve partikül büyüklüğünde mikropartikül kullanılarak aşılabilmekte ve ürün üretim değerleri artmaktadır. Bu mikropartiküllerden alüminyum oksit ve magnezyum silikat rekombinant *Aspergillus sojae*'den β-mannanaz enzimi üretiminde de başarıyla kullanılmış ve sonuçlar küflerle gerçekleştirilecek benzer üretimlerde de kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında keçiyoynuzu ekstraktına mikropartiküller (alüminyum oksit ve magnezyum silikat) ayrı ayrı ve farklı oranlarda eklenerek rekombinant *Aspergillus sojae* ile β -mannanaz üretimleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla çalkalamalı inkübatör ve yarı-kesikli beslemeli biyoreaktör denemeleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen enzim solüsyonunun kısmi konsantrasyonu ve ticari enzim preparatı üretiminde santrifüj, ultrafiltrasyon ve dondurarak kurutma işlemlerinin kullanılabilirliği tespit edildikten sonra enzimin optimum çalışma şartları ve spesifik özellikleri belirlenmiştir.

Erlenmayer denemelerinde alüminyum oksit ve magnezyum silikatın farklı konsantrasyonlarının (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20 ve 25 g/L) enzim aktivitesine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Erlenmayer denemelerinde en yüksek enzim aktivitesi değeri 568,72 U/ml olarak 5 g/L magnezyum silikat konsantrasyonunda elde edilmiştir. Mikropartikül konsantrasyonları arttıkça ise hücre çapı değerleri düşmüştür.

Erlenmayer denemeleri sonucunda enzim aktivitesi ve üretim oranı değerleri göz önüne alınarak biyoreaktör denemelerinde kullanılacak mikropartikül konsantrasyonları alüminyum oksit için 1 g/L, 10 g/L ve 15 g/L; magnezyum silikat için 1 g/L, 3 g/L ve 5 g/L olarak belirlenmiştir.

Yarı-kesikli beslemeli biyoreaktör denemeleri sonucunda da mikropartikül konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Biyoreaktör kontrol fermentasyonunda enzim aktivitesi değeri 92,86 U/ml iken en yüksek β -mannanaz aktivitesi ve β -mannanaz üretim oranı değerleri sırasıyla 643,16 U/ml ve 89,91 U/ml/gün olarak 3 g/L magnezyum silikat kullanılan yarı-kesikli beslemeli biyoreaktör fermentasyonu sonucunda elde edilmiştir.

Erlenmayer denemelerinde mikropartikül konsantrasyonu arttıkça genel olarak hücre çaplarının düştüğü belirlenmiştir. Yarı-kesikli biyoreaktör denemelerinde ise magnezyum silikatın artan konsantrasyonlarında hücre çapı değerleri düşerken alüminyum oksitin artan konsantrasyonlarında hücre çapı değerleri artmıştır.

3 g/L magnezyum silikat varlığında gerçekleştirilen biyoreaktör denemeleri sonucunda pH kontrolünün istatistiksel olarak önemli olduğu ve β -mannanaz aktivitesinin arttırmadığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca havalandırma oranının da istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

Sonuç olarak en yüksek β -mannanaz aktivitesi değerine (643,16 U/ml) 3 g/L magnezyum silikat varlığında 400 d/d, 30°C, 1 l/d, pH kontrolsüz ve 9 gün olarak gerçekleştirilen yarı-kesikli beslemeli biyoreaktör denemesi sonucunda ulaşılmıştır.

Bulk enzim elde edilmesinde santrifüj işleminin istatistiksel olarak önemli olmadığı ancak ultrafiltrasyon işleminin önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). 10 ve 30 kDa uygulamalarında retentatlar için saflaştırma katsayısı değerleri sırasıyla 1,19 ve 1,25 olarak belirlenmiştir. Ayrıca dondurarak kurutma işleminde farklı solüsyonlar kullanımının istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

β -mannanaz enziminin optimum çalışma pH ve sıcaklığının belirlenmesi amacıyla pH 3,0-9,0 ve 30-80 °C sıcaklık aralığında denemeler yapılmıştır. pH 5,0-6,0 ve 50-60 °C aralığında β -mannanaz enzimi %90 ve üzeri aktivite göstermiştir. Bu aralıkların dışında yer alan daha düşük ve yüksek değerlerde ise enzim aktivitesinde düşüşler olmuştur.

β -mannanaz enziminin substrat spesifikliğinin ve enzim çalışma hızının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen denemelerde substrat değişiminin enzim hızına etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Enzimin substrat spesifikliğı ise sırasıyla keçiboynuzu gamı, guar gam, KMS, nişasta ve jelatin olarak belirlenmiştir.

Farklı mineral iyonlarının enzim üzerine etkisi de belirlenmiştir. İyon varlığının enzim aktivitesine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu ($p<0,05$) ve K^+ , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Li^+ , Ag^+) ve EDTA enzim aktivitesini azaltırken; Fe^{3+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Na^+ ve Mn^{2+} enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Denenen reaktiflerin tamamında enzimin düşüşler olsa da aktivite göstermiş olması yine enzimin farklı şart ve koşullarda çalışabileceğini göstermiştir.

Ayrıca SDS-PAGE analizi ile enzimin moleküler ağırlığının 50-60 kDa aralığında olduğu ve de-glikozilasyon analizi ile de proteinde herhangi bir glikozilasyon olmadığı ya da SDS-PAGE'de fark edilmeyecek kadar az glikozile olduğu belirlenmiştir.

7. KAYNAKLAR

- ADEMARK, P., VARGA, A., MEDVE, J., HARJUNPAA, 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: 199-210.
- AYAZ, F. A., TORUN, H., AYAZ, S., CORREIA, P. J., ALAIZ, M., SANZ, C., GRÚZ, J. and STRNAD, M. 2007. Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): Sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *Journal of Food Quality*, 30: 1040-1055.
- BARAK, S., and MUDGIL, D. 2014. Locust bean gum: Processing, properties and food applications-A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 66: 74-80.
- BATTLE, I., and TOUS, J. 1997. Carob tree *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetics and Crob Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Via delle Sette Chiese 142 00145, Rome, Italy, 92 p.
- BINER, B., GUBBUK, H., KARHAN, M., AKSU, M. and PEKMEZCI, M. 2007. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry*, 100: 1453-1455.
- CARVALHEIRO, F., MONIZ, P., DUARTE, L.C., ESTEVES, M.P., and GÍRIO, M. 2011. Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38: 221-227.
- CARVALHO, M., ROCA, C., and REIS, M.A.M. 2014. Carob pod water extracts as feedstock for succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* 130Z. *Bioresource Technology*, 170: 491-498.
- CHAUHAN, P.S., PURI, N., SHARMA, P., and GUPTA, N. 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93: 1817-1830.
- CHEN, X., CAO, Y., DING, Y., LU, W., and LI, D. 2007. Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphures* β -mannanase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 128: 452-461.
- CHRISTGAU, S., KAUPPINEN, S., VIND, J., KOFOD, L.V., and DALBØGE, H. 1994. Expression cloning, purification and characterization of a beta-1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus*. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 33 (5): 917-925.
- COBAN, H.B., DEMIRCI, A., and TURHAN, I. 2015a. Microparticle-enhanced *Aspergillus ficuum* phytase production and evaluation of fungal morphology in

- submerged fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (6): 1075-80.
- COBAN, H.B., DEMIRCI, A., and TURHAN, I. 2015B. Enhanced *Aspergillus ficuum* phytase production in fed-batch and continuous fermentations in the presence of talcum microparticles. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (8): 1431-1436.
- DRIOUCH, H., SOMMER, B., and WITTMAN, C. 2010. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnology and Bioengineering*, 105: 1058-1068.
- DRIOUCH, H., HÄNSCH, R., WUCHERPFENNING, T., KRULL, R., and WITTMAN C. 2012. Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: Targeted morphology engineering using titanium silikon oksite microparticle. *Biotechnology and Bioengineering*, 109: 462-471.
- DURUKSU, G., OZTURK, B., BIELY, P., BAKIR, U., and OGEL, Z.B. 2009. Cloning, expression and characterization of Endo- β -1,4-mannanase from *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus sojae* and *Pichia pastoris*. *Biotechnology progress*, 25: 271-276.
- DÜZGÜNEŞ, O., KESİCİ, T., KAVUNCU, O. ve GÜRBÜZ, F. 1987. Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistiksel Metotlar II). *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, Yayın No: 1021, Ankara, 381 s.
- EL BATAL, H., HASIB, A., OUTMANE, A., DEHBI, F., JAOUAD, A., and BOULLI A. 2011. Sugar composition and yield of syrup production from the pulp of Moroccan carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Arabian Journal of Chemistry*, Article in press, doi: 10.1016/j.arabjc.2011.10.012.
- ERTUGAY, Z. ve CERTEL, M. 1995. Biyoteknoloji 1, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders Notu Yayın No: 135, Erzurum, 178 s.
- FAO 2015. Food and Agricultural Organization of The United Nations Statistics Division. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Erişim tarihi: 7 Aralık 2015.
- 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: 282-289.
- FREITAS, C., PARREIRA, T.M., ROSEIRO, J., REIS, A., and DA SILVA, T.L. 2014. Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. *Bioresource Technology*, 158: 355-359.

- GERMEC, M., TURHAN, I., KARHAN, M., and DEMIRCI, A. 2015. Ethanol production via repeated-batch fermentation from carob pod extract by using *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactor. *Fuel*, 161: 304-311.
- GHORBANI, F., YOUNESI, H., SARI, A.E., and NAJAFPOUR, G. 2011. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*, 36: 503-509.
- GONCIARZ, J., KOWALSKA, A., and BIZUKOJC, M. 2016. Application of microparticle-enhanced cultivation to increase the Access of oxygen to *Aspergillus terreus* ATCC 20542 mycelium and intensify lovastatin biosynthesis in batch and continuous fed-batch stirred tank bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 109: 178-188.
- HAIDER, M.M. 2014. Citric acid production from carob pod extract by *Aspergillus niger*. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9 (3): 112-116.
- HUANG, S.P., WANG, C.L., ZHANG, G.M., and MA, L.X. 2007. Construction of a double functional recombinant strain of *Pichia pastoris* co-expressing phytase and mannanase and the enzymatic analyses. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 47 (2): 280-284.
- KATROLIA, P., ZHOU, P., ZHANG, P., YAN, Q., LI, Y., JIANG, Z., and XU, H. 2012. High level expression of a novel β -mannanase from *Chaetomium* sp. exhibiting efficient mannan hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 87: 480-490.
- KAUP, B.A., EHRICH, K., PESCHECK, M., and SCHRADER, J. 2008. Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: Increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example. *Biotechnology and Bioengineering*, 99: 491-498.
- KURAKAKE, M. and KOMAKI, T. 2001. Production of β -Mannanase and β -Mannosidase from *Aspergillus awamori* K4 and Their Properties. *Current Microbiology*, 42: 377-380.
- LIMA-COSTA, M.E., TAVARES, C., RAPOSO, S., RODRIGUES, B., and PEINADO, J.M. 2012. Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39: 789-797.
- LINGAPPA, K., PRAMOD, T., and ALI, S.I., 2007. Influence of pH on citric acid production by *Aspergillus niger* under submerged fermentation in carob pod extract. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 66 (8): 618-620.
- MACRIS, B.J. 1975. Citric acid from purified carob sugars. *Biotechnology and Bioengineering*, 17 (9): 1373-1374.
- MACRIS, B.J., and KOKKE, R. 1977. Kinetics of growth and chemical composition of *Fusarium moniliforma* cultivated on carob aqueous extract for microbial protein

- production. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 4: 93-99.
- MADIGAN, M.T. and MARTINKO, J.M. 2006. Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall PTR, New Jersey, 989 p.
- MALGAS, S., SUSAN VAN DYK J., and PLETSCHE, B.I. 2015. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31: 1167-1175.
- MANSO, T., NUNES, C., RAPOSO, S., and LIMA-COSTA, M.E. 2010. Carob pulp as raw material for production of the biocontrol agent *P. agglomerans* PBC-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37: 1145-1155.
- MAZAHERI, D., SHOJAOSADATI, S.A., MOUSAV, S.M., HEJAZI, P., and SAHARKHIZ, S. 2012. Bioethanol production from carob pods by solid-state fermentation with *Zymomonas mobilis*. *Applied Energy*, 99: 372-378.
- MAZAHERI, D., SHOJAOSADATI, S.A., HEJAZI, P., and MOUSAVI, S.M. 2014. Bioethanol production in a packed bed solid-state fermenter: evaluation of operational factors and intermittent aeration strategies. *Annals of Microbiology*, 65 (1): 351-357.
- MENDES, A., GUERRA, P., MADEIRA, V., RUANO, F., da SILVA, T.L., and REIS, A. 2007. Study of docosaheptaenoic acid production by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 1209-1215.
- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426-428.
- MOREIRA, L.R.S., and FILHO, E.X.F. 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79: 165-178.
- MUDGIL, D., BARAK, S., and KHATKAR, B.S. 2014. Guar gum: processing, properties and food applications-A review. *Journal of Food Science and Technology*, 51 (3): 409-418.
- NAGHMOUCHI, S., KHOUJA, M. L., ROMERO, A., TOUS, J., and BOUSSAID, M. 2009. Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.) populations: Morphological variability of pods and kernel. *Scientia Horticulturae*, 121: 125-130.
- OZIYCI, H.R., TURHAN, I., TETIK, N., ARSLAN KULCAN, A., AKKOYUN, T., YATMAZ, E., GERMEC, M., and KARHAN, M. 2015. Concentration of d-

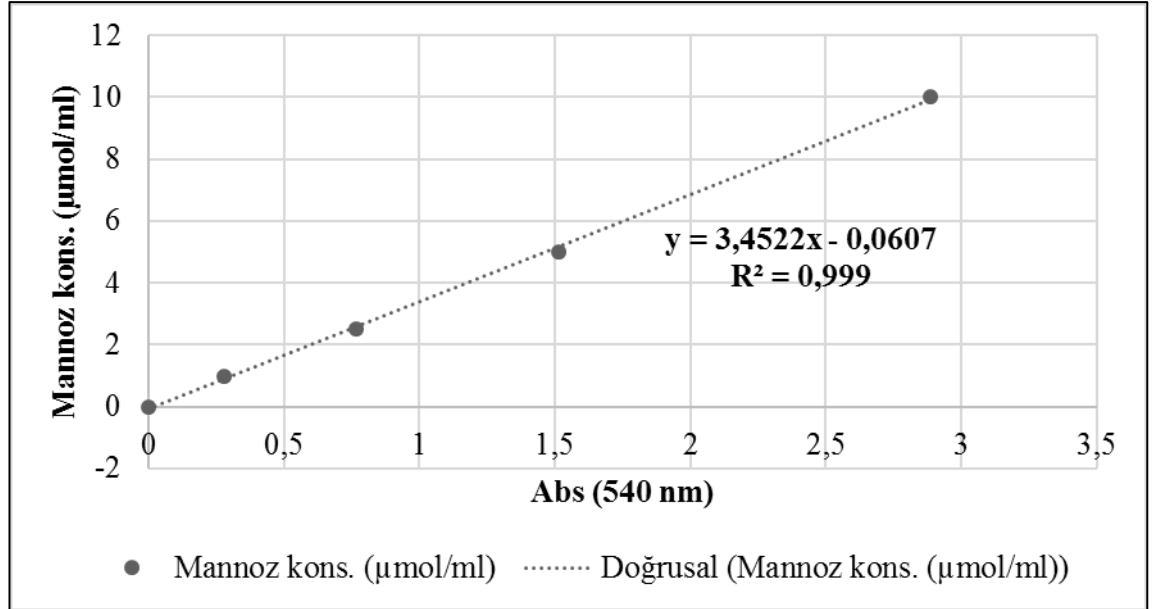
- pinitol in carob extract by using multi-stage enrichment processes. *Gıda*, 40 (3): 125-131.
- OZTURK, B., CEKMECELIOGLU, D., and OGEL, Z.B. 2010. Optimal conditions for enhanced β -mannanase production by Recombinant *Aspergillus sojae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64: 135-139.
- PRAJAPATI, V.D., JANI, G.K., MORADIYA, N.G., RANDERIA, N.P., and NAGAR, B.J. 2013. Locust bean gum: A versatile biopolymer. *Carbohydrate Polymers*, 94: 814-821.
- PUCHART, V., VRANSKA, M., and SYOBODA, P. 2004. Purification and characterization of two forms of endo- β -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus *Aspergillus fumigatus* IMI385718 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI158749). *Biochimica Et Biophysica Acta-general subject*, 1674: 239-250.
- ROUKAS, T. 1993. Ethanol production from Carob pods by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Biotechnology*, 7 (2): 159-176.
- ROUKAS, T. 1996. Continuous Ethanol Production from Nonsterilized Carob Pod Extract by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on Mineral Kissiris using a Two-Reactor System. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 59: 299-307.
- ROUKAS, T. 1998a. Carob pod: A new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 74 (1): 43-53.
- ROUKAS, T. 1998b. Citric acid production from carob pod extract by cell recycle of *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Food Biotechnology*, 12 (1-2): 91-104.
- ROUKAS, T. 2004. Ethanol production from nonsterilized carob pod extract by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 43 (3): 189-194.
- ROUKAS, T, and BILIADERIS, C.G. 1995. Evaluation of carob pod as a substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55: 27-44.
- SEKERI-PATARYAS, K.H., MITRAKOS, K.A., and GEORGI, M.K. 1973. Yields of fungal protein from carob sugars. *Economy Botany*, 27: 311-319
- SHETTY, K., PALIYATH, G., POMETTO, A., and LEVIN, R.E. 2006. Food Biotechnology Second Edition. CRC Press, Broken Sound Parkway NW, USA, 1982 p.
- SHULER, M.L. and KARGI, F. 2008. Bioprocess Engineering, Basic Concepts.. Prentice Hall PTR, New Jersey, 535 p.

- SMAIL, T., SALHI, O., and KNAPP, J.S. 1995. Solid-state fermentation of carob pods by *Aspergillus niger* for protein production: effect of particle size. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11: 171-173.
- SMITH, J. E. 2004. *Biotechnology Fourth Edition*. Cambridge University Press, Cambridge CB2 8RU, UK, 271 p.
- SRIRANGSAN, P., KAWAI, K., HAMADA-SATO, N., WATANABE, M., and SUZUKI, T. 2011. Stabilizing effects of sucrose-polymer formulations on the activities of freeze-dried enzyme mixtures of alkaline phosphatase, nucleoside phosphorylase and xanthine oxidase. *Food Chemistry*, 125: 1188-1193.
- STANBURY, P. F., WHITAKER, A. and HALL, S.J. 1995. *Principles of Fermentation Technology*. Butterworth-Heinemann Press, Burlington, MA, 351 p.
- TETIK, N., TURHAN, I., OZIYCI, H. R., GUBBUK, H., KARHAN, M., and ERCISLI, S. 2011. Physical and chemical characterization of *Ceratonia siliqua* L. Germplasm in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 129: 583-589.
- TUNAİL, N. 2009. *Mikrobiyoloji*. Pelin Ofset, Ankara, 448 s.
- TURHAN, I., BIALKA, K. L., DEMIRCI, A., and KARHAN, M. 2010a. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 101: 5290-5296.
- TURHAN, I., BIALKA, K.L., DEMIRCI, A., and KARHAN, M. 2010b. Enhanced lactic acid production from carob extract by *Lactobacillus casei* using invertase pretreatment. *Food Biotechnology*, 24 (4): 364-374.
- VAHEED, H., SHOJAOSADATI, S. A., and GALIP, H. 2011. Evaluation and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38: 101-111.
- VAN ZYL, W.H., ROSE, S.H., TROLLOPE, K., and GORGENS, J.F. 2010. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochemistry*, 45: 1203-1213.
- WANG, Y 2015. Discovery and investigation of glycoside hydrolase family 5 enzymes with potential use in biomass conversion. Doctoral Thesis in Biotechnology, School of Biotechnology Royal Institute of Technology AlbaNova University Center, SE-106 91, Stockholm, Sweden, 51 p.
- 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: 2149-2155.

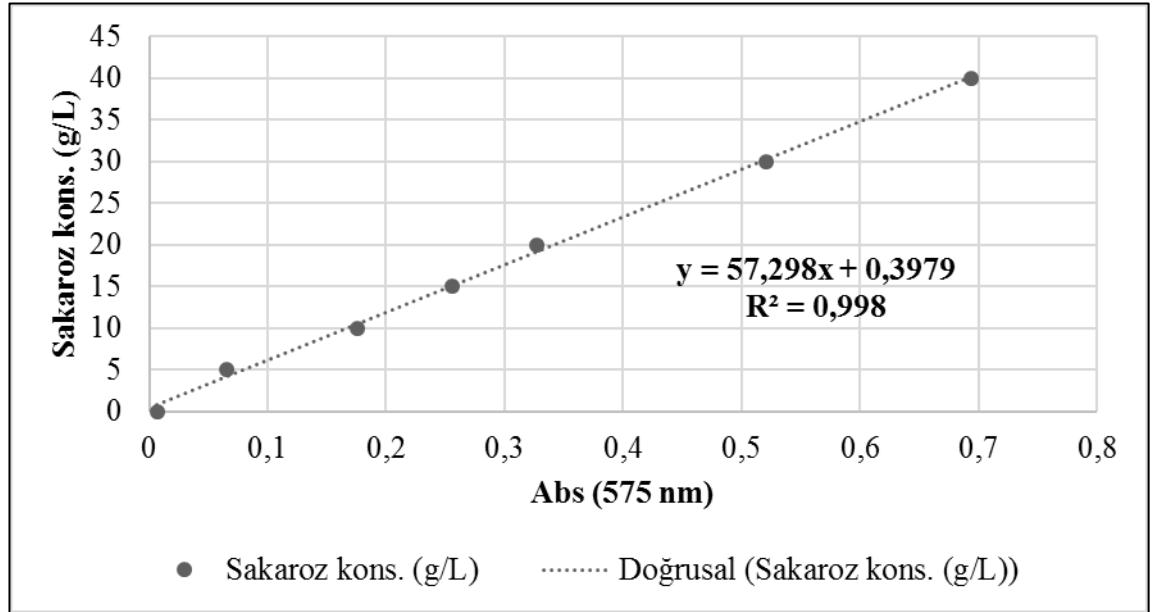
- YATMAZ, E., TURHAN, I., and KARHAN, M. 2013. Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. *Bioresource Technology*, 135: 365-371.
- YIN, L.J., TAI, H.M., and JIANG, S.T. 2012. Characterization of Mannanase from a Novel Mannanase-Producing Bacterium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 6425-6431.
- YOUSIF, A. K., and ALGHZAWI, H. M. 2000. Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry*, 69: 283-287.
- ZHAO, W., ZHENG, J., and ZHOU, H. 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: 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 -mannanase by *Pichia pastoris*. *Bioresource Technology*, 118: 257-264.

8. EKLER

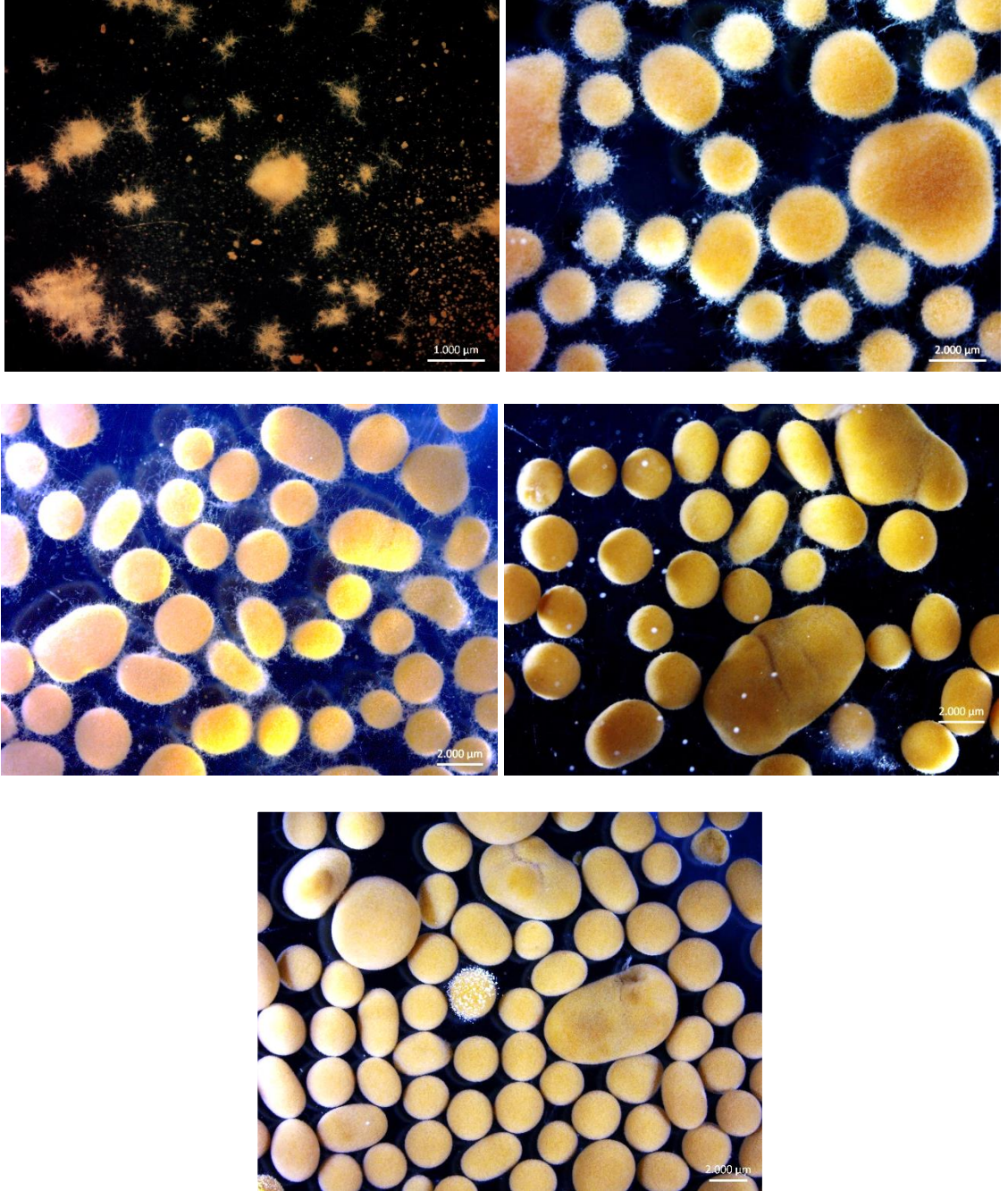
Ek-1. Mannoz standart kurvesi



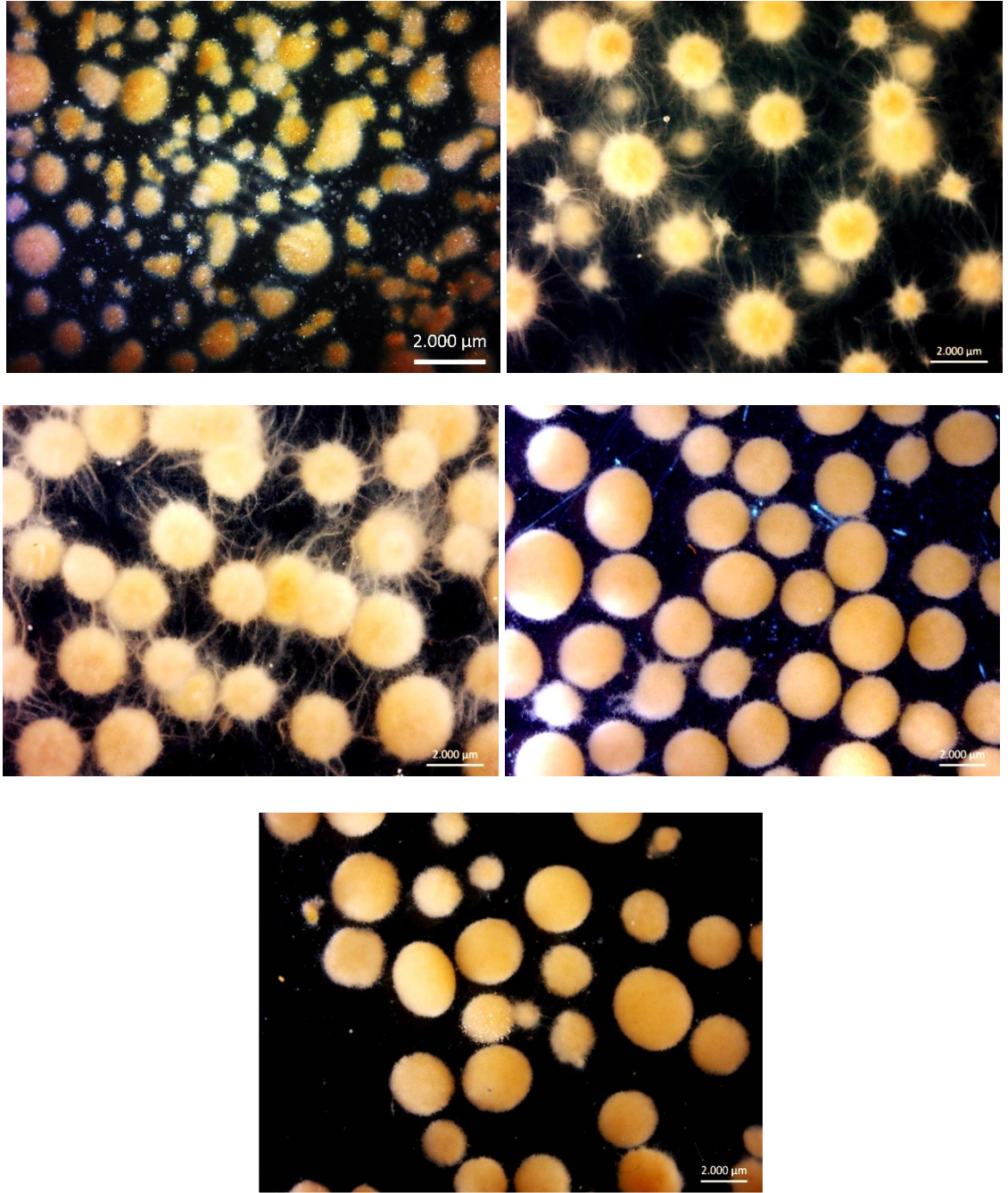
Ek-2. Sakkaroz standart kurvesi



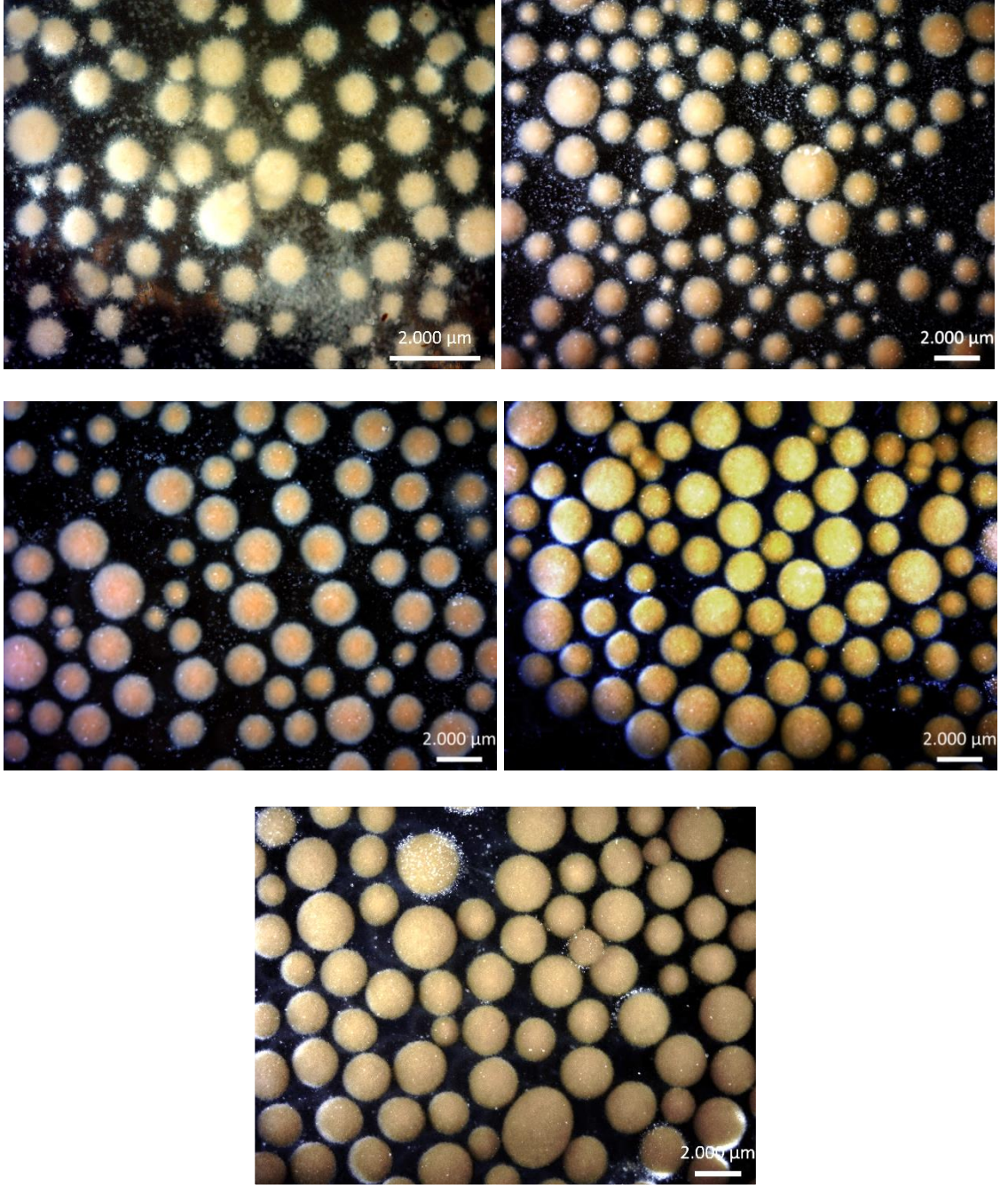
Ek 3. Biyoreaktör kontrol fermentasyonu hücre görüntüleri (Soldan sağa sırasıyla; 1, 3, 5, 7 ve 9. gün görüntüleri)



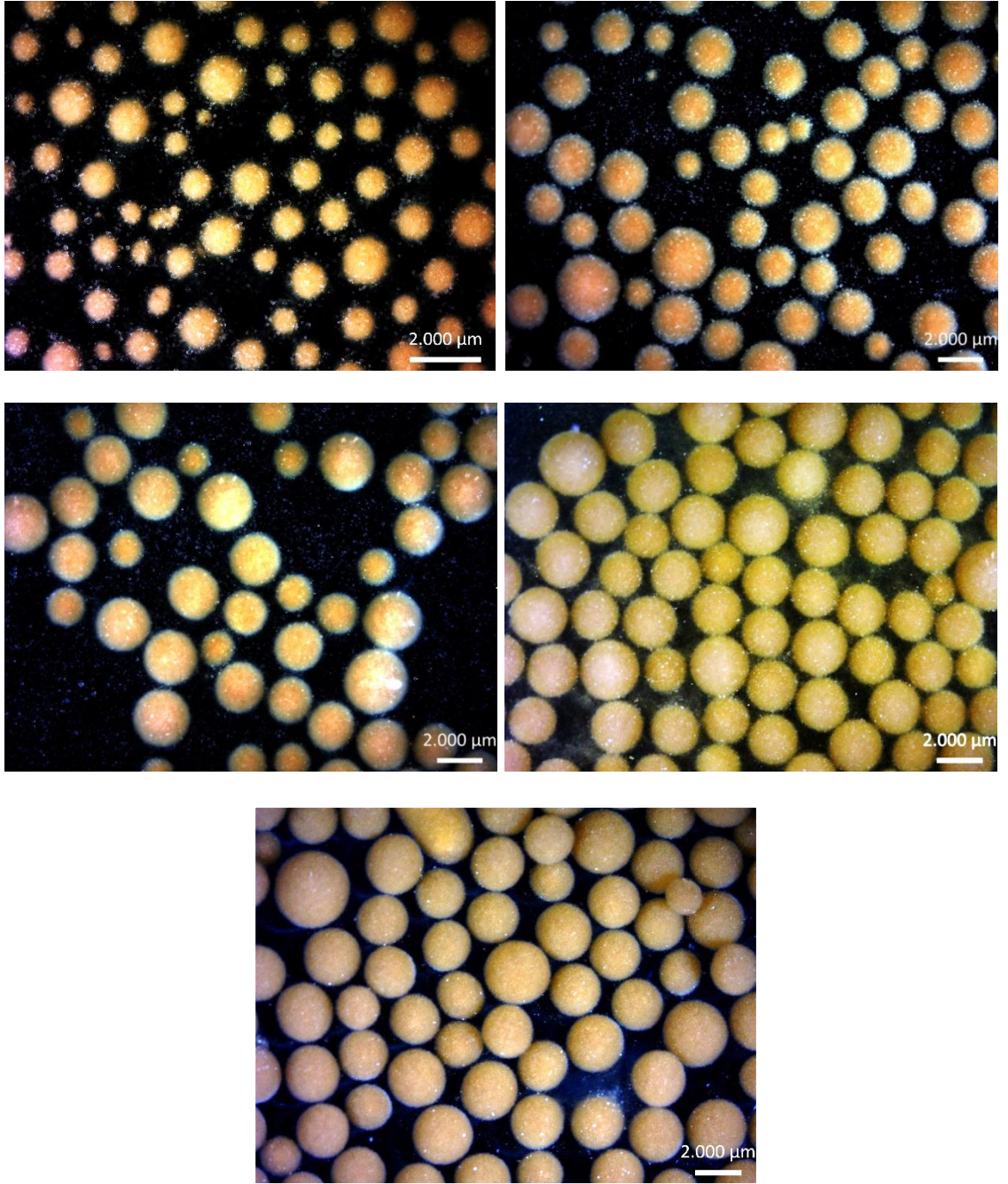
Ek 4. 1 g/L alüminyum oksit biyoreaktör fermentasyonu hücre görüntüleri (Soldan sağa sırasıyla; 1, 3, 5, 7 ve 9. gün görüntüleri)



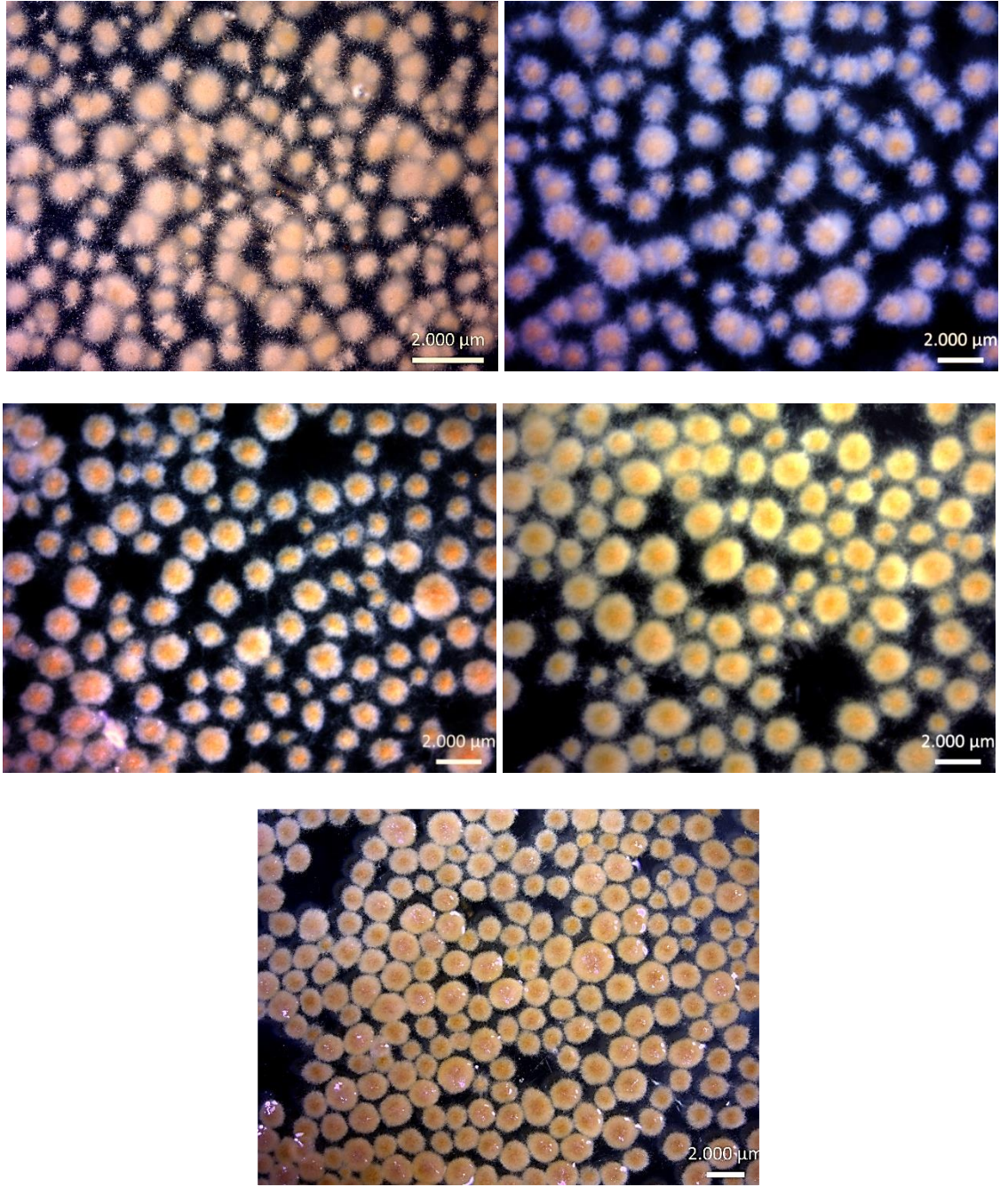
Ek 5. 10 g/L alüminyum oksit biyoreaktör fermentasyonu hücre görüntüleri (Soldan sağa sırasıyla; 1, 3, 5, 7 ve 9. gün görüntüleri)



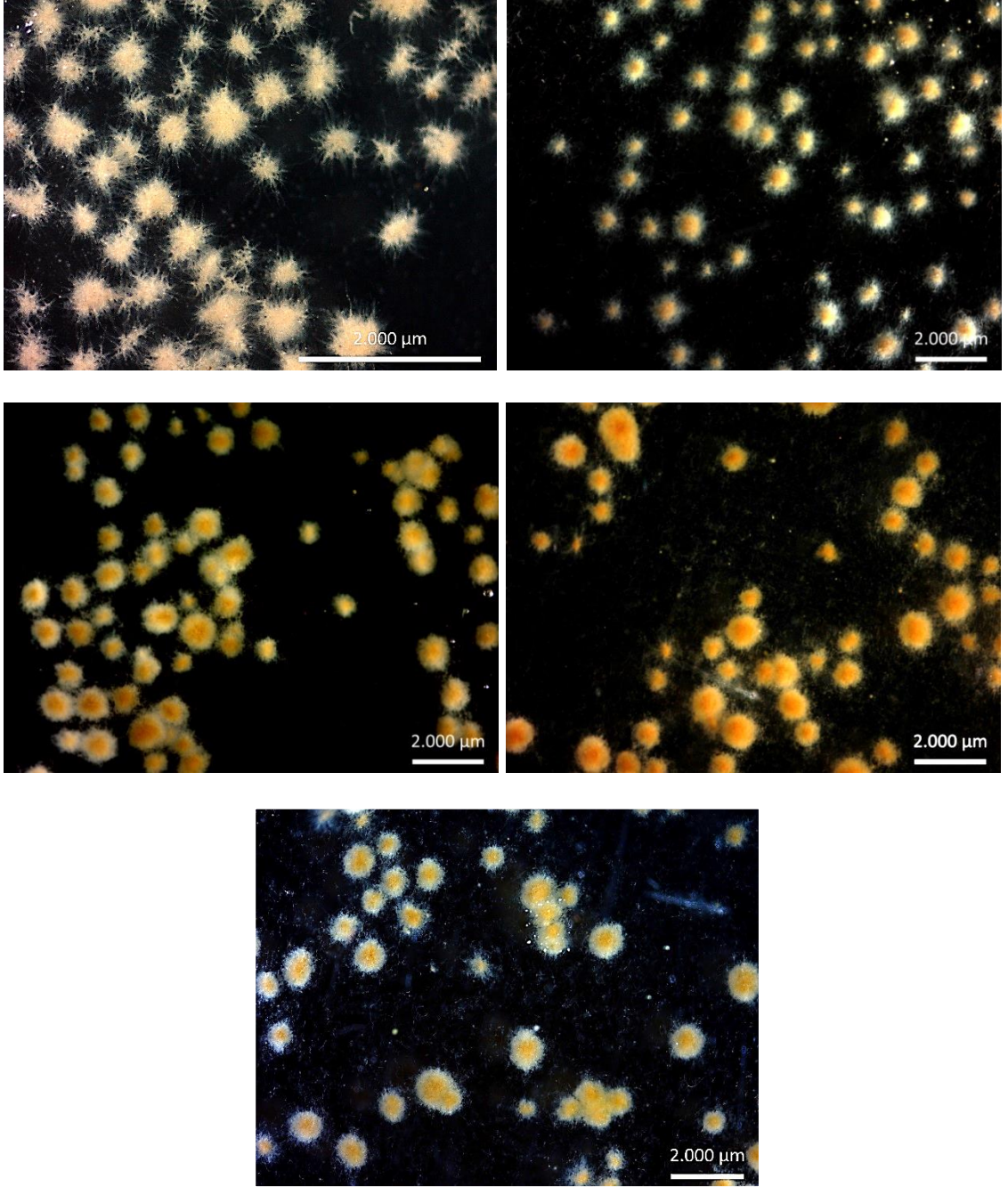
Ek 6. 15 g/L alüminyum oksit biyoreaktör fermentasyonu hücre görüntüleri (Soldan sağa sırasıyla; 1, 3, 5, 7 ve 9. gün görüntüleri)



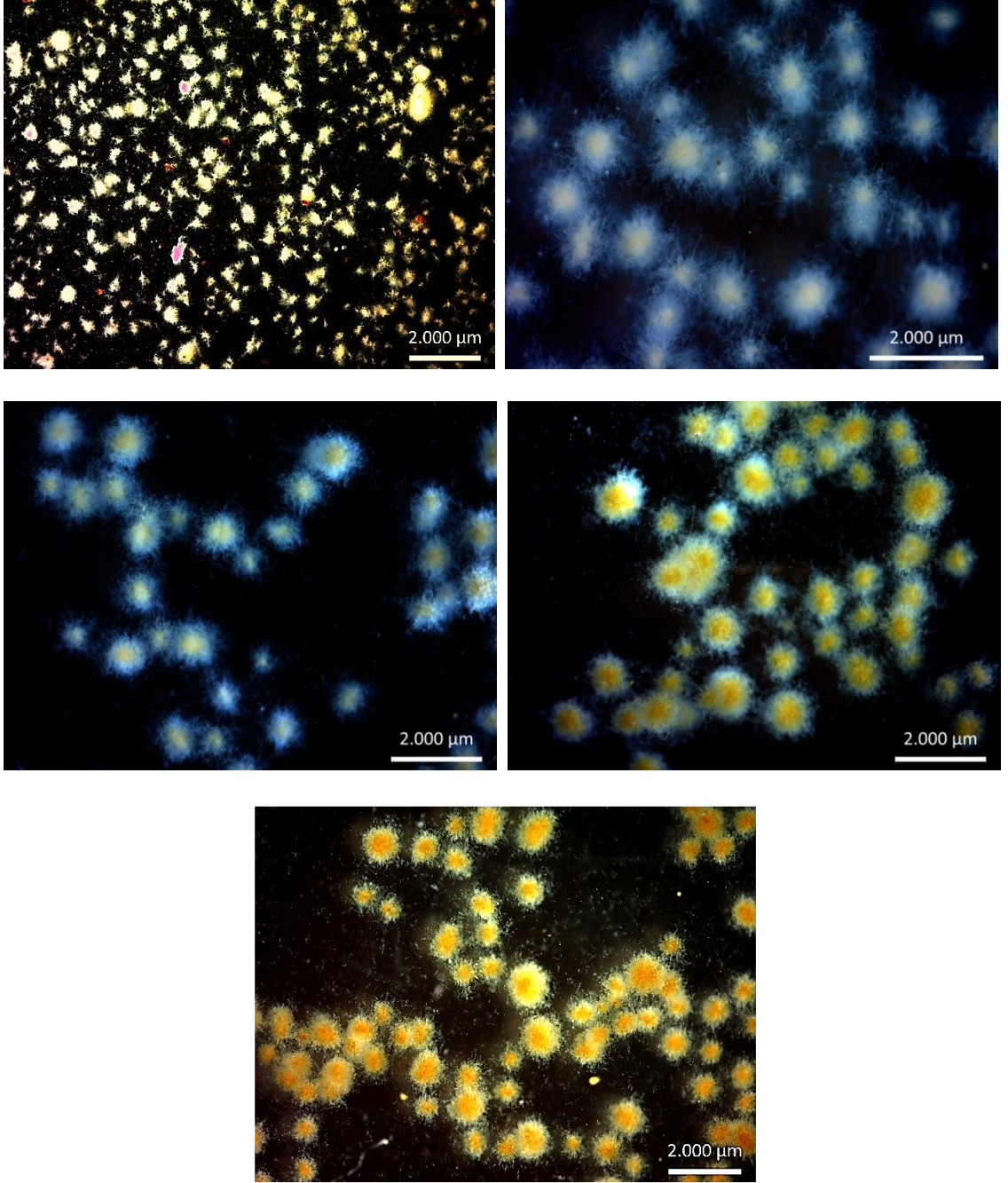
Ek 7. 1 g/L magnezyum silikat biyoreaktör fermentasyonu hücre görüntüleri (Soldan sağa sırasıyla; 1, 3, 5, 7 ve 9. gün görüntüleri)



Ek 8. 3 g/L magnezyum silikat biyoreaktör fermentasyonu hücre görüntüleri (Soldan sağa sırasıyla; 1, 3, 5, 7 ve 9. gün görüntüleri)



Ek 9. 5 g/L magnezyum silikat biyoreaktör fermentasyonu hücre görüntüleri (Soldan sağa sırasıyla; 1, 3, 5, 7 ve 9. gün görüntüleri)



ÖZGEÇMİŞ



Ercan YATMAZ 1988 yılında Gaziantep'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Mersin'de tamamladı. 2005 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2010 yılında Gıda Mühendisi olarak mezun oldu. Eylül 2010-Temmuz 2012 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimini tamamladı. 2012 yılında aynı bölümde Doktora eğitimine başladı. 2015 yılından beri Akdeniz Üniversitesi Göynük Mutfak Sanatları Meslek Yüksekokulu'nda Öğretim Görevlisi olarak görev yapmaktadır.