

Aspergillus wentii' DEN İNÜLİNAZ ENZİMİNİN
ELDE EDİLMESİ
Rumeysa KARATOP
Yüksek Lisans Tezi
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Filiz SANAL
2012, EDİRNE

T.C

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aspergillus wentii' DEN İNÜLİNAZ ENZİMİN
ELDE EDİLMESİ

RUMEYSA KARATOP

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Filiz SANAL

EDİRNE, 2012


TRAKYA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aspergillus wentii' DEN İNÜLİNAZ ENZİMİN
ELDE EDİLMESİ

Rumeysa KARATOP

Yüksek Lisans Tezi
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 5/7/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Figen İNCEOĞLU



Doç. Dr. Hülya YAĞAR



Yrd. Doç. Dr. Filiz SANAL

EDİRNE, 2012

Yüksek Lisans Tezi
***Aspergillus wentii*'Den İNÜLİNAZ ENZİMİN ELDE EDİLMESİ**
T. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada *Aspergillus wentii*'den inülinaz enziminin üretilmesi, üretim şartlarının inülinaz aktivitesi üzerine etkileri ve enzimin bazı biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

A.wentii'den inülinaz enziminin üretim şartlarının inülinaz aktivitesine olan etkileri araştırıldığında, üretim süresi 3.gün, üretim sıcaklığının 25 °C, başlangıç pH'sı 6.0 olduğu saptanmıştır.

Üretim ortamına eklenen karbon ve azot kaynaklarının inülinaz sentezine etkisi araştırıldığında, en yüksek aktivite % 3.0 yer elması içeren ortamda görüldü. (NH₄)₂HPO₄ (% 1) kullanılan üretim ortamı diğer azot kaynaklarından daha iyi bir kaynak olduğu bulundu.

Enzimin optimum çalışma koşulları incelendiğinde; inkübasyon pH'sı 6.0, inkübasyon sıcaklığı 35 °C olarak bulundu.

A.wentii'den elde edilen inülinaz enziminin pH ve termal kararlılığı araştırıldığında, enzimin pH 3.0-6.0 aralığında kararlı olduğu ve aktivitesini 50 °C'ye kadar 20 dakika süre ile koruduğu gözlemlendi.

A.wentii inülinazının kinetik değerleri araştırıldığında K_m değeri yaklaşık 0,1/10³ µM, V_{max} değeri ise 6.134 U/ml olarak bulunmuştur.

Yıl : 2012

Sayfa sayısı : 68

Anahtar Kelimeler : İnülinaz, *Aspergillus wentii*, üretim, kinetik, termal kararlılık

Master Thesis

INULINASE ENZYME TO BE OBTAINED from *Aspergillus wentii*

Trakya University Institute of Naturel Sciences

Biology Department

ABSTRACT

This study was undertaken to obtain production of *Aspergillus wentii* inulinase to determine, the effect of production conditions on inulinase activity and its some biochemical properties.

When the effect of production conditions on the inulinase activity were examined, the enzyme activity have demonstrated that was maximum when the production time was third days, at a temperature 25 °C, with the initial pH 6.0.

When the effect of the C and N resources added to the medium on synthesis of inulinase it was discovered that the highest activity occurs in the medium containing 3.0 % *Jerusalem artichoke* extract. (NH₄)₂HPO₄ (% 1) were found to be better nitrogen sources that using other for ones for *Aspergillus wentii*.

When the optimum working conditions of the enzyme was studied, it was found that pH of incubation is 6.0 and the temperature of the incubation is 35 °C.

When the pH and termal determination of *A. wentii* inulinase studied it was observed that the pH of enzyme is stable between 3.0-6.0 and it kept out its activity at 50 °C for 20 min.

When the kinetic working conditions of the enzyme was studied, it was found that the Km is 0.1/10³ μM and Vmax 6.134 U/ml

Year : 2012

Number of Pages : 68

Key Word : Inulinase, *Aspergillus wentii*, production, kinetic, thermal stability

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesinde, öneri ve yardımlarını esirgemeyen değerli tez hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Filiz SANAL'a

Çalışmalarım sırasında yardım ve desteğini esirgemeyen sayın hocalarım Doç. Dr. Hülya YAĞAR ve Figen İNCEOĞLU'na

Tez çalışmam sırasında Biyoloji bölümü imkan ve olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı değerli hocam Prof.Dr. Ahmet ASAN'a

Grafiklerin çizim ve düzenlemelerinde yardımcı olan değerli arkadaşım Mustafa KARAÖZ'e

Tez çalışmamda her türlü desteklerini ve yakın ilgilerini eksik etmeyen, sevgili aileme ve arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İnülin ve Oligosakkaritler.....	4
2.1.1 Araştırmada kullanılan doğal inülin kaynakları.....	13
2.1.1.1 . Yer Elması.....	13
2.1.1.2. Sarımsak.....	14
2.1.1.3. Soğan.....	14
2.2. Enzimler.....	16
2.2.1. İnülinazlar (2-1, β -D-fruktonohidrolaz) E.C.3.2.1.7.....	16
2.3. <i>Aspergillus wentii</i>	20
3. MATERYAL VE METOD.....	24
3.1. Kullanılan Mikroorganizma.....	24
3.2. Kullanılan Ortamlar.....	24
3.3. İnülinaz Üretimi ve Eldesi.....	26
3.4. İnülinaz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	26
3.6. Üretim Koşullarının <i>A. wentii</i> İnülinaz Aktivitesine Etkisi.....	29
3.6.1 Üretim süresinin inülinaz aktivitesine etkisi.....	29
3.6.2. Üretim sıcaklığının inülinaz aktivitesine etkisi.....	29
3.6.3 Üretim ortamının başlangıç pH'sının inülinaz aktivitesine etkisi.....	30
3.6.4. Farklı karbon kaynaklarının inülinaz aktivitesine etkisi.....	30
3.6.5 Azot kaynaklarının inülinaz aktivitesine etkisi.....	30
3.7. <i>A.wentii</i> İnülinazının Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	31

3.7.1.	İnkübasyon pH'nın inülinaz aktivitesine etkisi.....	31
3.7.2.	İnkübasyon sıcaklığının inülinaz aktivitesine etkisi.....	31
3.7.3.	Subsrat konsantrasyonunun inülinaz aktivitesine etkisi.....	31
3.7.4.	<i>A.wentii</i> inülinazının K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanması.....	32
3.7.5.	İnülinaz enziminin pH kararlılığının araştırılması.....	32
3.7.6.	İnülinaz enziminin termal kararlılığının araştırılması.....	32
3.8.	Yerelması Tüberleri, Soğan ve Sarımsak ile Hazırlanan Sıvı Üretim Ortamlarında İnülinaz Aktivitesi Ölçümü.....	32
3.8.1.	Sıvı üretim ortamlarının hazırlanması.....	33
4.	BULGULAR.....	34
4.1.	Üretim Koşullarının <i>A. wentii</i> İnülinaz Aktivitesine Etkisi.....	34
4.1.1.	Üretim süresinin inülinaz aktivitesine etkisi.....	34
4.1.2.	Üretim ortamının başlangıç pH'nın inülinaz aktivitesine etkisi.....	35
3.5.3	Üretim sıcaklığının inülinaz aktivitesine etkisi.....	36
4.1.4.	Farklı karbon kaynaklarının inülinaz aktivitesine etkisi.....	37
4.1.5.	Azot kaynaklarının inülinaz aktivitesine etkisi.....	37
4.2.	<i>A. wentii</i> Kaba İnülinaz Enziminin Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	39
4.2.1.	İnkübasyon pH'nın inülinaz aktivitesine etkisi.....	39
4.2.2	İnkübasyon sıcaklığının inülinaz aktivitesine etkisi.....	40
4.2.3.	İnkübasyon süresinin inülinaz aktivitesine etkisi.....	40
4.2.4.	Subsrat konsantrasyonunun inülinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	42
4.2.5.	İnülinaz enziminin pH kararlılığının araştırılması.....	44
4.2.6.	İnülinaz enziminin termal kararlılığının araştırılması.....	45
4.3.	Yerelması Tüberleri, Soğan ve Sarımsak Kullanılarak Hazırlanan Sıvı Üretim Ortamlarında İnülinaz Aktivitesi Ölçümü.....	45
5.	TARTIŞMA.....	46
6.	KAYNAKLAR.....	56

ŞEKİL LİSTESİ**Sayfa No**

Şekil 2.1 İnülinin kimyasal formülü.....	6
Şekil.2.2. İnülinin fiziksel olarak görünümü.....	8
Şekil.2.3.Yerelması.....	13
Şekil 2.4. Mikrobiyal endo ve ekzo-inülinaz enzimlerinin inülinin üzerinde Aktivasyon fonksiyonları.....	17
Şekil.2.5. <i>A.wentii</i>	23
Şekil. 3.1. Fruktoz standart grafiği	28
Şekil. 4.1. Üretim süresinin inülinaz aktivitesine etkisi.....	34
Şekil. 4.2. Üretim ortamı başlangıç pH'sının inülinaz aktivitesine etkisi.....	35
Şekil. 4.3 Üretim sıcaklığının inülinaz aktivitesine etkisi.....	36
Şekil. 4.4 İnkübasyon pH'ının inülinaz aktivitesine etkisi.....	39
Şekil. 4.5 İnkübasyon sıcaklığının inülinaz aktivitesine etkisi.....	40
Şekil. 4.6 İnkübasyon süresinin inülinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	41
Şekil. 4.7 Substrat konsantrasyonunun inülinaz aktivitesi üzerine etkisi.....	42
Şekil. 4.8 Lineweaver Burk grafiği.....	43
Şekil. 4.9 İnülinaz enziminin pH kararlılığının araştırılması.....	44
Şekil. 4.10 İnülinaz enziminin termal kararlılığının araştırılması.....	45

ÇİZELGE LİSTESİ**Sayfa No**

Çizelge 2.1. Çeşitli bitkisel kaynaklardaki inülin içeriği.....	7
Çizelge.2.2. Fruktooligosakkaritlerin fizyolojik önemi ve sağlık üzerine etkileri.....	12
Çizelge.3.1. Karbon kaynaklarının inülinaz aktivitesine etkisi.....	37
Çizelge. 3.2. Azot kaynaklarının inülinaz aktivitesine etkisi.....	38
Çizelge. 3.3. Farklı üretim ortamları kullanılarak inülinaz aktivitesinin ölçümü.....	45

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Enzimler canlı organizmada oluşan tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan bu reaksiyonları koordine eden protein ana yapısında spesifik biyokatalizörlerdir (Önal S, 2007). Çok defa hücre dışında etkinliğini korurlar. Solunumun, büyümenin, kas kasılmasının, sinirlerdeki iletimin, fotosentezin, azot bağlamasının, deaminasyonun ve sindirim işlemlerinin temelini oluştururlar (Karademir vd., 2002).

Willy Kühne 1878 yılında, biyolojik reaksiyonları hızlandıran biyokatalizörler için “hücrede bulunan” anlamına gelen enzim deyimini ilk defa kullanmıştır (Telefoncu vd., 2000)

Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarda kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir (Kıran vd., 2006).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Kıran Ö, 2006).

Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için endüstriyel enzimlerin üretiminde mikroorganizma kullanımını artmıştır (Kango ve Jain, 2011).

Günümüzde endüstri doğal polisakkaritleri büyük ölçüde kullanmakta ve endüstride kullanılabilir yeni polisakkarit kaynakları aramaktadır. Bu nedenle son yıllarda dikkatler fermantasyon ile ekstrasellüler polisakkarit üretimine doğru yönelmiştir. Şeker endüstrisi düşük maliyetli alternatif tatlandırıcılar olarak kullanılan yoğun fruktoz şuruplarının rekabeti ile karşı karşıyadır (Ekinci F, 2002).

Fruktoz şurubu tamamen doğal ortamda mısır nişastasının glukoza dönüştürülmesi, sonrada bu glukozun enzimatik izomerasyonu ile elde edilen bir monosakkarit şekerdir. Fruktoz şuruplarının tatlılığı invert şeker şurubuna benzer derecededir. Fruktoz şurupları nemi çekme özellikleri ile ürünlerin kurumasını önlerler. Lezzet geliştirici bir özelliğe sahip olmaları nedeni ile aromalı gıdalarda rahatlıkla kullanılabilirler (Artık vd., 2011).

Fruktoz şurubunun osmotik basıncının yüksek olması ile mikrobiyal açıdan dayanıklılık sağlanmaktadır (Artık vd., 2011). Fruktoz, nişastanın alfa amilaz, amiloglukozidaz ve glukoz izomeraz enzimlerini içeren bir metotla nişastadan üretilebilir, üretimin sonucunda ürünlerin % 8'ini oligosakkarit, %45'ini fruktoz, %5'ini glukoz oluşturur (Sharma ve Gill, 2007) fakat fruktoz şurubu üretiminin sonunda fruktoz verimi % 45 dir (Gupta vd., 1997).

Bu metot fruktoz şurubu elde edilmesinde kullanılması için oldukça pahalı ve ekonomik olmayan bir metottur (Gill vd., 2004).

İnülinin enzimatik hidrolizinden fruktoz üretimi son yıllarda dikkate değer ilgi gösterilen ve umut vaat eden bir prosestir çünkü geleneksel yöntemlere dayalı glukoz izomerasyonundan daha fazla fruktoz konsantrasyonu kazandırmaktadır (Ricca vd., 2010).

İnülinin inülinaza bağlı hidrolizi ile % 95 fruktoz üretimi olur (Sguarezi vd., 2009).

İnülinaz üreten pek çok maya, sukroz, rafinoz ve inülinde bulunan terminal β -(2,1) ve β -(2,6) fruktofranozitik bağları hızla saf fruktoza parçalar. Bununla birlikte üretilen bu enzimlerin endüstriyel olarak uygulanması, uygun maliyet ve büyük miktarda eldesi ile mümkündür (Lima vd., 2009).

Fruktoz şurubu dışında etanol, inünooligosakkarit, glikonik asit, sorbitol, pullunal ve asetobütanol üretiminde ve önemli amaçlarda mikrobiyal inülinazlar kullanılır (Lima vd., 2009).

Fruktoz şurubu hazırlanmasında tercih edilen enzimler mayalar ve filamentli funguslar tarafından üretilmektedir, bu nedenle inülinli ortamda yetişen mikroorganizmalar tarafından üretilen inülinazlar araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Gupta vd., 1997).

Buhar difüzyonunu içeren tekrarlarla saf inülin eldesi meşakkatli ve maliyetli olmasından dolayı işlenmemiş inülin kullanımı proseslerin maliyetini düşürmek açısından etkili bir yoldur (Vogel M, 1993).

Çalışmamızda ham inülin kaynağı olarak soğan(*Allium cepa*), sarımsak(*Allium sativum*) ve yer elması (*Helianthus tuberosus* L.) kullanılmıştır.

Günümüzde mikrobiyal inülinazların kullanım avantajları göz önüne alınarak inülinaz üretimin ve özelliklerinin belirlenmesi yönünde yapılan çalışmalar hızla artmaktadır.

Bu nedenle, bu çalışmada tarama medyumunda üretilerek inülinaz sentezlediği belirlenen *A. wentii* inülinaz kaynağı olarak kullanılmış ve üretim şartlarının optimizasyonu ve enzimin bazı biyokimyasal özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu sayede inülinaz üretimi ile ilgili çalışmalara daha önce inülinaz sentezlediği bilinmeyen *A. wentii* inülinazı hakkında katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

2.GENEL BİLGİLER

2.1. İnülin ve Oligosakkaritler

Karbonhidratlar, birden fazla hidroksil (-OH) grubu içeren alkollerin aldehit ya da keton türevleri veya bu türevlerin hidrolizi ile oluşan bileşiklerdir .

Karbonhidratlar, genellikle üç büyük sınıfa ayrılarak incelenirler:

- Monosakkaritler
- Disakkaritler
- Polisakkaritler

Monosakkaritler, bir veya daha fazla hidroksil gruplu ya aldehit ya da keton yapısında en basit karbonhidratlardır. Reaktif gruplarına göre; aldozlar(aldehit grubu içerenler), ketozlar(keton grubu içerenler) ve karbon zincirinin uzunluğuna göre; triozlar, tetrozlar, pentozlar, heksozlar, heptozlar diye sınıflandırılırlar. Doğada ve organizmada en yaygın bulunan monosakkaritler; trioz, pentoz ve heksozlardır. Heksozlardan en fazla bulunanları da glukoz, fruktoz, galaktoz ve mannozdur. Kan şekeri deyince, bir aldoheksoz olan glukoz anlaşılır .

Disakkaritler, iki monosakkaritin bir su kaybederek glukozidik bağla kovalent olarak bağlanması sonucu oluşmuş bileşiklerdir. En yaygın disakkaritler; maltoz, laktoz ve sukroz'dur .

Polisakkaritler, pek çok sayıda monosakkarit veya monosakkarit türevi molekülün art arda O-glukozid bağları vasıtasıyla bağlanması suretiyle oluşmuş molekül yapısındaki karbonhidratlardır. Polisakkaritler, zincirleri boyunca tekrarlayan monosakkarit ünitelerinin benzerliği, bu üniteleri bağlayan bağların tipi ve dallanma derecesi bakımından farklıdır (Altınışik M, 2010).

Polisakkaritler bitkilerin hücre duvarlarında (selüloz) bulunur ve yengeç/karides gibi canlıların kabuklarında bulunduğundan dolayı önemli ekonomik materyaller olarak tanımlanırlar. Ek olarak, polisakkaritler yapılarında bulunan büyük miktarda kiral merkezlerden dolayı önemli materyallerdir (Iwaza ve Hasegawa, 2012).

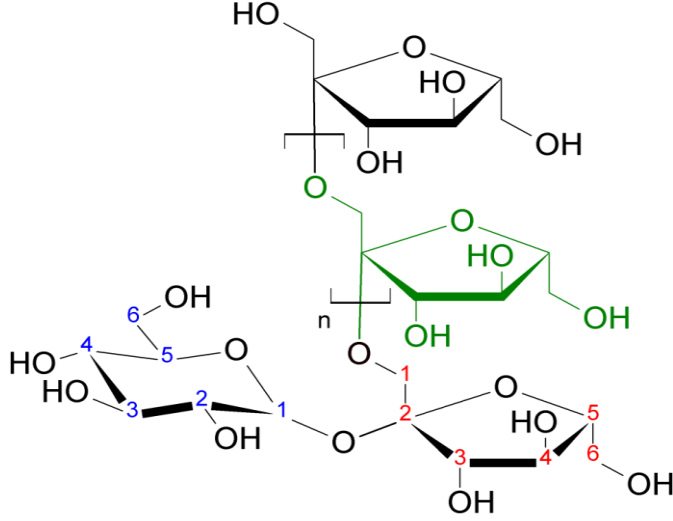
Polisakkaritler içinde yer alan inülin, bitkisel kaynaklarda bulunan bir depo maddesidir ve yenilenebilir karbonhidrat kaynakları için bulunan en belirgin adaydır (Vijayaraghavan vd., 2009).

Inülinin kelime anlamı *Inula helanium*'dan gelmektedir (Roberfoid M.B., 2011) Inülin β -(2,1, frukto-franozitik) bağlarla bağlanmış terminal glukoz üniteli doğrusal bir fruktoz polimeridir (Gill vd., 2006). Ek olarak, nadir bulunan altı kıvrımlı spiral bir yapısı vardır (Iwaza ve Hasegawa, 2012). Inülinin oda sıcaklığında çözünürlüğü sınırlıdır (Gill vd., 2006).

Soğuk suda çok az, fakat sıcak su içerisinde tuzla eriyebilir. İnulin, iyot çözeltisi ile mavi renk oluşturmaz. Beyaz, amorf bir tozdur ve asitlerle hızla hidroliz olur (Artık vd., 2011).

Oligofruktozların polimerizasyonu incelendiğinde genellikle 2 - 8 fruktoz ünitesi arasında çeşitlilik gösterdikleri belirlenmiştir fakat inülin 2 ile 60 fruktoz ünitesinden oluşmaktadır ve her zaman son zincir glukozla bitmektedir (Debski vd., 2011). Moleküler ağırlığı n'ye bağlıdır (Niness K.R., 1999).

Yapılan araştırmalar sonunda inülin için 1.5-1.7 kcal/g enerji değeri saptanmıştır (Roberfoid M., 2011).



Şekil 2.1. İnülinin kimyasal formülü (Niness K.R., 1999)

İnülinin yıllık üretimi tahmini 350.000 tondur. Üretiminde önde gelen ülkelere Belçika, Fransa, Hollanda ve Çin örnek olarak verilebilir (Kango ve Jain, 2011).

İnülin bitkiler tarafından enerji kaynağı olarak kullanılır ve genellikle bitkilerin kök kısımlarında bulunur. İnülin sentezleyen ve depolayan bitkilerin çoğunda nişasta gibi diğer depo maddeleri depolanmaz (Roberfroid M, 1993).

İnülin 36.000 bitki türünde bulunur (Öztürk H, 2008). Bunlara örnek olarak; pırasa, kudüs enginarı, kuşkonmaz, soğan, sarımsak, muz, buğday çavdarı, karahindiba, yıldız çiçekleri türleri ve *Asteracea* (Kango N, 2008), *Compositae* ve *Liliaceae* (Naidoo K, 2009) familyaları örnek olarak verilebilir (Vijayaraghavan vd., 2009).

Çizelge 2.1. Çeşitli bitkisel kaynaklardaki inülin içeriği (Crow D, 2005, Aşan ve Özcan, 2006)

İnülin		(g/100g)
Bitkisel Kaynaklar	Oran	Ortalama Değer
Soğan		
Çiğ	1.1-7.5	4.3
Pişmiş	0.8-5.3	3.0
Yerelması (yumru)	16.0-20.0	18.0
Hindiba(kök)	35.7-47.6	41.6
Kuşkonmaz		
Çiğ	2.0-3.0	2.5
Haşlanmış	1.4-2.0	1.7
Pırasa (çiğ)	3.0-10.0	6.5
Sarımsak		
Çiğ	9.0-16.0	12.5
Kurutulmuş		20.3-36.1
28.2		
Enginar (yaprak)	2.0-6.8	4.4
Muz		
Çiğ	0.3-0.7	0.5
Konserve	0.1-0.3	0.2
Buğday		
Kepek (çiğ)	1.0-4.0	2.5
Un (pişmiş)	0.2-0.6	0.4
Pirinç (pişmiş)	0.5-0.9	0.7
Arpa		
Çiğ	0.5-1.0	0.8
Pişmiş	0.1-0.2	0.2

Bitki kök ve tüberlerinde yaklaşık 68-86 % oranında bulunan inülin, bitki yaş ağırlığının % 50 sini oluşturmaktadır (Treichel vd., 2009).



Şekil.2.2. İnülinin fiziksel olarak görünümü(<http://tr.wikipedia.org/wiki/inülin>)

Önceleri inülinin saf olarak endüstriyel anlamda elde edilmesi ekonomik sayılmazdı ve insanların beslenmesinde gıda bileşeni olarak kullanılması uygun değildi. İlk olarak 1920'den sonra Almanya'da endüstriyel anlamda üretimi yapılmıştır (Aşan ve Özcan., 2006).

Son yıllarda inülinin kimyasal modifikasyonlarıyla oluşturulan yararlı besinsel maddeler ile inülinin yapısal özelliklerine duyulan merak gittikçe artmıştır (Ren vd. , 2011).

İnülin ve hidrolatları; sitrik asit, bioetanol, ultra yüksek fruktoz şurubu, 2,3-butandiol, laktik asit, mannitol, sorbitol üretiminde kullanılan önemli mikrobiyal biyoteknoloji materyalidir. Ticari inülin genellikle şeker yerine tatlandırıcı maddesi olarak kullanılır (Bruhwylers vd., 2009, Yu vd., 2011) ve son zamanlarda inülin kaynaklı ilaçlar kolon kanseri tedavisinde kullanılmak için geliştirilmektedir (Iwaza ve Hasegawa . , 2012).

İnülin tip bitkisel fruktanlar birçok Avrupa ülkesinde doğal katkı maddeleri, Amerikada ise zararsız kabul edilmiştir (Gülmez ve Güven, 2002).

İnülin ve inülin içeren materyallerin etanol üretiminde diğer kullanılan maddelere göre birçok avantajları vardır (Wang vd., 2011). İnülin ayrıca gıda ve besin endüstrisinde oldukça sık kullanılan tek hücre proteini üretiminde kullanılır(Cui vd., 2011). İnülin ve fruktooligosakkaritlerin prebiyotik olarak kullanımları oldukça yaygındır (Tamura vd., 2006, Yoshikawa vd., 2006).

Sindirilemeyen oligosakkaritler, inülinde zenginleştirilen oligofruktanlar yada fermente olabilen diyet liflerinin diyetlerde kullanımı oldukça yaygın bir alışkanlıktır (Ito vd., 2011).

Fruktooligosakkaritler ve inülin gastrointestinal enzimler ile hidroliz edilemezler (Wada vd., 2005, Aravind vd., 2012). Bunun yerine kolona doğru ilerler, oradaki laktobasillerce metabolize edilirler ve anaerobik fermentasyon sırasında kısa zincirli yağ asitlerinin üretimi için enerji sağlarlar (Jenkins vd., 1999).

İnülin bifidobakteriler ve laktobasillerce tercih edilen bir substrattır (Prata vd., 2010) ve bağırsakta sağlık koruyucu etkiye sahip bu bakterilerin gelişimini teşvik eder. Bifidobakteriler ve Laktobasiller konakçının iyi bir gastrointestinal fonksiyonu için indikatör organizmalar olarak bilinirler. Bu mikroorganizmalar inülin ve oligofruktozu fermente ederek kısa zincirli yağ asitleri ve laktat oluştururlar. Böylece patojenik mikroorganizmaların gelişimini sınırlayacak asidik bir ortam meydana getirirler. Bunun sonucunda prebiyotikler sindirim sistemindeki yararlı mikroorganizmaların (doğal probiyotiklerin) gelişimini teşvik ederek *Escherichia coli* ve *Salmonella* gibi patojenik mikroorganizmaların kolonizasyonunu azaltırlar.

Ayrıca, bu mikroorganizmalar vitamin, özellikle de B vitamini sentezlerler, sindirim ve emilime yardımcı olurlar ve bağışıklık sistemini uyarırlar (Kolida vd., 2002, Santos ve Maugeri, 2007).İnsan sağlığı açısından kolonik mikroflora oldukça önemlidir (Spizzirri vd., 2011).

Kosinski vd.,(1992) yaptığı çalışmada oligofruktozun tavukların bağırsağındaki *Salmonella* kolonizasyonuna etkisini araştırmış ve β -(2,1) fruktan ilaveli yemlerle beslenmiş tavuklarda *Salmonella* kolonizasyonunun azaldığını bildirmiştir(Roberfroid M.B., 2000). İnülin gibi sindirilmeyen karbonhidratların kolonik fermentasyonu ile oluşan kısa zincirli karboksilik asitin özellikle kalsiyum (Ca^{+2}) ve magnezyum (Mg^{+2}) gibi minerallerin bağırsakta emilimini artırdığını bildirmiştir (Markosyan vd., 2007, Roberfroid M.B., 2000). Ayrıca inülin çocuklarda demir absorpsiyonunu artırır(Mazutti vd., 2010).

İnülinazlar ilaç ve besin endüstrisinde önemli malzemeler olan inülin den frukto-oligosakkaritler üreten β - fruktan fruktohidrolazdır (Gill vd., 2006).

Fruktooligosakkaritlerden olan fruktoz; meyve ve balda bulunan ve tatlılık oranı sakkarozaya göre 173 olan bir monosakkarittir. Mono ve disakkaritler içinde en tatlı olanıdır (Artık vd., 2011) . Suda çok kolay çözünür. Polarize ışığı sola çevirir (-90°). Bu özelliği nedeniyle levüloz olarak da adlandırılmaktadır. Organizmada, karaciğer ve bağırsaklarda glukozaya çevrilerek kullanılır. İndirgendir. Glukozla aynı osazonu oluşturur (Basım P, 2009).

Fruktozun ince bağırsakta emilimi kolaylaştırılmış difüzyonla gerçekleşir. Bu nedenle emilimi daha yavaştır. Fruktoz karaciğerde hızla glukozaya ve glikojene çevrilebilir veya glikoliz mekanizması ile yıkılarak asetil Co A'lara dönüştürülür. Bu esnada glukozdan farklı olarak hücre içine taşınabilmesi için insüline ve yıkılması için fosfofruktokinaz enzimine ihtiyaç duymaz bu nedenle diyabet gibi dokuların glikolitik enerjiye ihtiyaç duydukları durumlarda fruktoz, kan şekerini yükseltmeksizin ve insüline gerek duymaksızın yakılarak kullanılabilirler.

Diyabette fosfofruktokinaz glikojen sentetaz ve glikokinaz enzim seviyeleri düşüktür ve indüklenebilmeleri için insüline ihtiyaç duyarlar bu nedenle fruktoz içeren gıdaların özellikle diyabetlilerde kullanımı son yıllarda büyük önem kazanmıştır (Artık vd., 2011).

Kolon ve gastrointestinal bölgelerdeki organların aktivitesi ayarlanması gibi sağlıkta çok çeşitli rolleri tanımlanır ve sendrom risklerinin azaltılmasında rol oynarlar. (Roberfroid M.B, 2011) Ayrıca lipit metabolizmasının kontrolünde rol oynarlar (Nguyen vd., 2011).

Ek olarak psikolojik ve immünolojik fonksiyonlarda da önemli rol oynarlar. Birçok hayvan çalışmalarında inülin tipi fruktanların lipit metabolizmasında etkili oldukları gözlemlenmiştir (Alexiou ve Franck, 2008)

Fruktooligosakkaritler kolesterol, fosfolipit ve trigliserit seviyesinin azaltılmasında önemli rol oynarlar (Sangeetha vd., 2004). Böylece kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde yararlı etkileri vardır (Wada vd., 2005).

Fruktooligosakkaritlerin fizyolojik önemi ve sağlık üzerine etkilerini **Çizelge 2.2'**de toplu olarak verilmiştir.

Çizelge.2.2. Fruktooligosakkaritlerin fizyolojik önemi ve sağlık üzerine etkileri(Roberfroid M.B., 2011)

Fizyolojik etki	Sağlık üzerine olan etkisi
Kolon bakterilerinin karbonhidrat metabolizmalarını düzenleyerek bakteri sayısında, kısa zincirli yağ asitlerinde ve gazlarda artışa sebep olur.	Kısa zincirli yağ asitleri bağırsak epitelinin enerji kaynağı olurken farklılaşmada kontrol altına alınır, ancak gaz birikimi problem olabilir ve lakzatif etki de meydana gelir.
Kalın bağırsakta bifidobakterilerin ve laktik asit bakterilerinin selektif üremesini sağlar.	Bu bakteriler de patojen tutunmasına karşı direnç oluştururlar.
Ağız florası tarafından hidrolize edilmezler.	Diş çürümesini önlerler.
Glisemik değildirler.	Dişabetik hastalar özellikle kullanabilirler.
İmmun fonksiyonları spesifik olmayan yolla arttırılırlar.	Enfeksiyonlara karşı direnç gelişmesine katkıda bulunurlar.
Karsinojen metabolizmasını bozarlar.	Antikarsinojenik etki gösterirler.
Karaciğerden çok düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolleri ve serum trigliseritlerinin sentezi azaltır.	Koroner kalp hastalıklarına karşı etkili olurlar.

2.1.1. Araştırmada Kullanılan Doğal İnülin Kaynakları

2.1.1.1. Yerelması

Yerelması (*Helianthus tuberosus* L.), insan ve hayvan beslenmesinde, alkol ve fruktoz şekeri üretiminde kullanılan önemli bir bitkidir (Akça ve Karslı., 2009). Yumruları %75-80 oranında inülin formunda karbonhidrat içeren, ekolojik koşullarda yüksek adaptasyon yeteneğine sahip ve streslere dirençli bir bitkidir(Swanton C.J., 1986). *H. tuberosus* sıcak iklimlerin serin bölgelerinde yetişir ve yumruları Avrupa, Kuzey Amerika ve bazı kültür ortamlarını içeren yaygın bir yetişme alanı vardır (Takeuchi ve Nagashima, 2011). Ayrıca *H. tuberosus* biyodizel üretiminde de kullanılmaktadır (Zhao vd., 2011).



Şekil.2.3. Yerelması (*Helianthus tuberosus* L.)(<http://tr.mydearbody.com/sifali-bitkiler/yer-elmasi.html>)

2.1.1.2 Sarımsak

Vatanının Orta ve Batı Asya stepleri olduğu söylenen sarımsağın(*Allium sativum*) çok eski kültür bitkileri arasında yeri vardır. Eski zamanlardan beri sarımsak çeşni veya baharat olarak kullanılmaktadır (Doaa vd., 2011).

Sarımsak 25-100 cm yükseklikte, yeşilimsi beyaz veya pembe çiçekli, otsu kök, gövde, yaprak, diş ve çiçek kısımlarından meydana gelen bir kültür bitkisidir. Tıbbi önemi büyük olan bu bitki; keskin kokulu, iştah açıcı özelliği ve yakıcı lezzeti nedeniyle, başta etliler olmak üzere pek çok yiyecekler içerisinde yer alır ve bunlara çeşni verir. Kalori değeri 140 olan sarımsağın 100 gramında 63.8 gr su, 28.2 gr karbonhidrat, 5.3 gr protein, 0.2 gr yağ, 1.1 gr selüloz vardır.

Sarımsak 200'den fazla kimyasal bileşik içermekte olup bunların en önemlilerinden bazıları kükürt ihtiva eden bileşiklerden (allicin, alliin ve ajoene) oluşan uçucu yağlar ve enzimler (alinaz, peroksidaz ve mirasinaz), karbonhidratlar (sakkaroz, glukoz), mineraller, aminoasitler, A, B1, B2, Niasin ve C vitaminidir. Keskin kokusunu veren allil sülfid, kükürtlü ve eterli yağlardan oluşmuştur . Bu bileşik kükürtlü bir amino asit olan alliin'in alliinaz ile parçalanarak allicin'i vermesi, allicin'in de, su buharı veya su karşısında, alil disülfür'e dönüşmesi sonucu meydana gelir. Sarımsağa özel koku ve lezzeti veren taşıdığı kükürtlü uçucu yağdır (Özçelik vd., 2007).

Sarımsak inülin depolayan bir bitkidir ve inülinaz üretiminde kullanılmaktadır (Doaa vd., 2011).

2.1.1.1.3 Soğan

Soğan(*Allium cepa*) 60-100 cm. yükseklikte soğanlı ve otsu bir bitkidir. Yapraklar boru biçiminde, içi boş, mavimsi yeşil renktedir. Bileşiminde karbonhidratlar, yağ, organik asitler, vitaminler(A, B, C) ve alliin türevleri bulunur. Soğanın iştah açıcı ve suyunun balla karıştırılıp görme azlığına karşı kullanıldığından bahsedilmiştir. Fazla yenmesi baş ağrıtır ve diüretiktir (Kıran Ö, 2006).

Soğan çeşitleri, iklim şartları farklı geniş bir bölgeye adapte olamamıştır. Gün uzunluğu ve sıcaklık, soğan yetiştirmeyi tehdit eden iki önemli unsurdur ve ikisi de aynı derecede önemlidir (Apan H, 1971).

Çalışmalarda kullanılan tüm bitkisel kaynaklarda fruktan içermesine rağmen inülinaz aktivitelerine bakıldığında farklılıklar gözlemlenmektedir. Bu farklılıklara; türlerdeki fruktan bileşenlerinin farklı olması, molekül ağırlığının ve buna ek olarak polimerlerin konsantrasyonlarının ve sayılarının farklı olması sayılabilir. Tüm bu sebepler aktivitelerin farklı olmasına sebep olabilir.

İnülin içeren bitkilerdeki inülin yapıları birbirinden farklılıklar göstermektedir. Bu sebepten dolayı inülin içeren bitkilerde inülinaz aktivitesi farklılıklar göstermektedir. Sarımsak yapısal özelliklerinden dolayı yüksek inülinaz aktivitesi için uygun bir substrattır. Soğan ve sarımsak benzer tip fruktanlar olmalarına rağmen sarımsaktaki inülinin polimer uzunluğu daha geniştir ve polimerizasyon derecesi 50'dir; soğanın polimerizasyon derecesi ise 5'dir (Doaa vd., 2011).

2.2. Enzimler

2.2.1. İnülinazlar(2-1, β -D-fruktonohidrolaz) E.C.3.2.1.7

İnülinazlar sukroz parçaları ile biten(β -2,1) bağlarıyla bağlanmış fruktoz dizilerinden oluşan bitkisel depo polimeri olan inülin ve inülin serilerinin hidrolizini katalizleyen hidrolazlar arasında sınıflandırılan glukozidaz hidrolaz ailesinin bir üyesidir (Kim vd., 2008).

İnülinazlar, inülin ve levan tip oligofruktozitler, stokiyoz, rafinoz ve sukroz da bulunan β -2,1 ve β -2,6 fruktofranozid bağlarını kırar (Uhm ve Byun, 1987, Goosen vd., 2009).

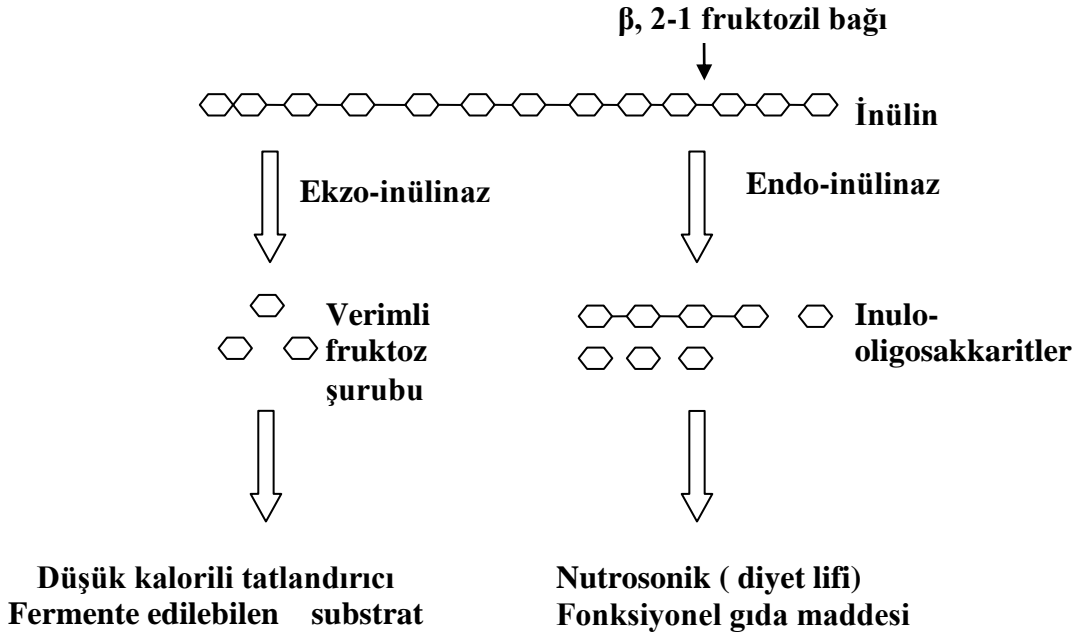
İnülinazlar ve fruktofranozil hidrolazlar; birçok bitki, bakteri, küf ve mayalarda bulunan çok çeşitli tür tarafından üretilmektedir(Kango ve Jain., 2011). İnülinaz üreten türlere *Pichia guilliermondii* (Zhang vd., 2009), *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir*, *Debaryomyces cantarelli*, *Staphylococcus* sp, *Yarrowia lipolytica* (Li vd., 2012), *Xanthomonas* sp, *Pseudomonas* sp ve *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin çoğu örnek olarak verilebilir (Makino vd., 2009).

Fruktandan fruktoz ayırabilme yeteneği olan inülinazlar ilk olarak 1951 yılında *Helianthus tuberosus* bitkisinin yumrularında keşfedilmiştir (Kochhar vd., 1999).

İnülinazlar ilk olarak bitkilerden izole edildiği halde yeterli miktarda ve kalitede bitkisel kaynaklı inülinaz üretmek oldukça zordur (Kumar vd., 2005). Fungal, bakteriyel ve bitkisel kaynaklara göre mayalardan inülinaz üretimi daha fazla miktarda yapılabilmektedir (Zhang vd., 2012). Son yıllarda inülinaz üretiminde solid-state fermantasyon yöntemi kullanılmaktadır (Xiong vd , 2007), bu yöntem de kullanılan substrat miktarının maliyeti oldukça ucuzdur ve bu yöntem ile inülinaz üretimi yüksek verimle gerçekleştirilmektedir (Mazutti vd., 2009).

Mikrobiyal inülinazlar inülin üzerinde gösterdikleri etki şekillerine göre, ekzo ve endo-inülinazlar biçiminde sınıflandırılırlar. Endoinülinazlar (2,1- β -D-fruktan fruktohidrolaz; E.C 3.2.1.7) inülin için spesifiktir ve içsel β -2,1-fruktofranozitik bağları hidroliz eder ve ürün olarak genellikle inülotetroz, inülotrioz ve inülopentoz oluşur. Ekzo-inülinazlar (β -D-fruktanfruktohidrolaz; E.C 3.2.1.80) inülinin indirgenmiş olmayan sonundan terminal fruktoz ünitelerini art arda böler ve ayrıca rafinoz ve sukrozu hidrolize eder (Chen vd., 2009).

Endoinülinazlar birçok mikroorganizmadan izole edilebildiği halde inülooligosakkaritlerin endüstriyel üretiminde genellikle ekzo-inülinazlar kullanılmaktadır (Kang vd., 1998).



Şekil 2.4. Mikrobiyal endo ve ekzo-inülinaz enzimlerinin inülinin üzerindeki fonksiyonları (Kango ve Jain, 2011).

Fruktozil-hidrolik enzimlerin çoğu geniş substrat spesifikliğine sahiptir. Enzimlerin sınıflandırılmasında hangi türden olduğunun belirlenmesi, inülinin sukroza göre parçalanma oranının (S/I oran) yüksek veya düşük olup olmadığına göre yapılır (Kango ve Jain., 2011).

İnvertazlar inülin gibi yüksek molekül ağırlıklı substratlarda düşük aktivite gösterirler. İnülinaz ve invertaz arasında farklılıkları açıklamada S/I oranı yardımcı olur. Düşük S/I oranı (inülinle yüksek aktivite) inülinazları belirlemede kullanılır. Enzim aktivitesinin belirlenmesinde S/I oranı oldukça önemlidir (Vijayaraghavan vd., 2009).

Hazırlanmış mikrobiyal kaynaklı çoğu inülinaz; inülinaz aktivitesine eşlik eden invertaz aktivitesinde sahiptir. Bunlarda katabolik aktivite I/S oranı ile tanımlanır (Kango ve Jain., 2011).

Araştırmalardan çıkarılan sonuçlara göre çeşitli mikrobiyal inülinazların I/S oranı 0.002 ve 7.9 arasında bir değer almaktadır (Moriyama vd., 2002).

Mikroorganizmalarda inülinaz üretimi kontrolü katabolik represyona bağlıdır (Mughal vd., 2009).

Çoğu fungal inülinazlar; 4.0-6.0 pH aralığında optimum aktivite gösterirler (Kango ve Jain, 2011).

İnülinazlar, endüstride kullanılan en önemli enzimlerden biridir (Danial vd., 2010). İnülinazlar inülooligosakkarit, etanol(Skowronek ve Fiedurek, 2005), aseton, bütanol, pullulan, glukonik asit ve sorbitol üretiminde kullanılır (Mazutti vd., 2009). İnülinaz kullanımı ile fruktoz şurubu üretimi tek basamakta ve yüksek verimde gerçekleşir (Skowronek ve Fiedurek, 2003).

Sıcaklık ve pH enzimin aktivitesi için çok önemlidir. Optimum şartların belirlenmesi enzimin yüksek verimde çalışması için iyi araştırılmalıdır. Yüksek sıcaklık ve düşük pH kontaminasyon riskini azaltır, bazı substratların vizkozitesini artırır. Fruktoz şurubu üretiminde renklenmeyi ortadan kaldırır(Mazutti vd., 2010). Birçok inülinaz yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini kısa sürede kaybeder. Bakteri, maya ve küflerden elde edilen inülinaz enzimlerinden çok az miktarı 60 °C de optimum olarak aktivite gösterir (Singh ve Gill, 2006). Bu sebepten termostabil inülinazların izolasyonu ve karakterizasyonuna duyulan ilgi gittikçe artmaktadır.

Mikroorganizmalardan elde edilen endüstriyel proseslerin ortam şartlarının zorluğundan dolayı termostabil inülinazların endüstriyel ve biyoteknolojik proseslerde kullanım alanları çok geniştir (Haki ve Rakskit., 2002).

İnülinaz üretiminde şeker kamışı melası mısır çözeltisi kullanılabilir (Roberfroid M.B., 2011).

Endüstriyel atıkların ucuz fiyatlı olduklarından dolayı inülinaz üretiminde kullanımı oldukça iyi bir alternatiftir, diğer taraftan endüstriyel tarımsal atıklardan oluşan karışımlar oldukça kompleks bir yapıdadır ve ağır metaller (demir, çinko, kalsiyum, magnezyum, manganez) içerdiğinden dolayı inülinaz üretimini inhibe edebilir.

Kobalt elementi ise *Penicillium* sp. türlerindeki inülinazlar için aktivatör olarak görev yapmaktadır (Nakamura vd., 1997).

2.3. *Aspergillus wentii*

Bilindiği gibi mantarlar, hücre yapıları, beslenme tipleri ve sindirim şekilleri göz önüne alınarak, Robert Whittaker tarafından 1969 yılında yapılan sınıflandırmaya göre, Plantae, Animalia, Protista ve Monera'dan ayrı bir alem olarak kabul edilmektedir.

Mantarlar ökaryotik mikroorganizmalar olup canlıların beşinci alemini oluşturmaktadırlar. Mantarların sitoplazma zarı yapısal olarak insan sitoplazma zarına benzemekte olup sporları ile çevreye yayılmaktadırlar. Klorofil içermemeleri ile yüksek bitkilerden ayrılmaktadırlar. Mantarlarda mitoz ile gerçekleşen eşeysiz veya mayoz ile gerçekleşen eşeyli üreme görülmektedir. Üremeleri esnasında ve vejetatif gelişmenin yanı sıra dış ortama dayanıklı eşeysiz ve eşeyli sporları aynı anda oluşturabilmektedirler. Küf mantarları filamantöz yapı oluştururken, mayaların çoğu filamantöz yapı oluşturmazlar. Mantarlar, hücre duvar yapıları ile hayvan hücrelerinden, hücre duvar yapısında bulunan kitin ile de bakteri ve yüksek bitkilerden ayrılmaktadırlar.

Mantarlar, morfolojik yapılarına göre küf ve maya olmak üzere iki grupta incelenir. Bazı mantarlar ise doğal ortamlarda küf, insan vücut ısısında (37 °C) maya şeklindedir. Isıya bağlı olarak yapı değiştiren bu mantarlara dimorfik mantarlar denir (Direkel Ş., 2010).

A.wentii'nin sistematik sınıflandırılması

Alem : *Mycetae*(mantarlar)
 Divizyon: *Mycota*
 Altdivizyon-2: *Eumycota*(Hücre duvarı olan mantarlar)
 Sınıf : *Deuteromycotina*(*Deuteromycetes*, *fungi imperfecti*)
 Familya: *Maniliaceae*
 Cins: *Aspergillus*
 Tür: *Aspergillus wentii*
 (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003)

Aspergillus'lar yeryüzünde her yerde yaygın olarak bulunan hifli mantarlardır (Yücel A, 2008). *Aspergillus* cinsi *Deuteromycota* daki hifomisetler arasında *Maniliaceae* ailesinde sınıflandırılırlar. Eşeyli (telemorf) şekilleri

Ascomycota' da *Euratales* takımında *Euratum*, *Emericella*, *Neaortaria* ve diğer cinsler yer almaktadır (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003). *Ascomycota* 45.000 tür içerir (Sümer S., 2006).

Aspergillus genusu 180'den fazla tür içerir. Bu türler arasında insanda enfeksiyona yol açan türler *A.fumigatus*, *A.niger*, *A.flavus*, *A.terreus*, sayılabilir (Uztan vd, 2008). *Aspergillus*lar dünyada yaygın olarak her türlü atmosferde bulunan bitki, hayvan ve insanda parazit yaşayan, meyve, sebze, depolanan maddeler, ekme, peynir, reçel, jelatinli maddeler, et ve deri eşyalarda saprofit yaşayarak küflenme bozulma ve üreme yaratan ekonomik ve sağlık yönünden önemli mantarlardır.(Sümer S, 2006) *Aspergillus* türlerinin üreme hızı da yüksektir. Havada en yüksek yoğunlukta bulunan mantarlardandır (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).

Aspergillus cinsi tıbbi bakımdan da önemlidir. Bazı türleri ozmofoliktir (Asan ve Ekmekçi, 2004). Bazı türleri kullanılarak organik asit alkol ve antibiyotik üretilir (Gomi ve Machida, 2010). *Aspergillus* türlerinin birçoğu sekonder metabolit içerir. Bunların bazıları insan sağlığı için zararlı olabilir ve bitki, hayvanlar için patojenik olabilir (Sümer S., 2006). *A. wentii* özellikle bitkilerin fidelerinde bodur kalmaya ve gücünde azalmaya neden olur (Hasan H.A.H., 1998).

A.wentii toksigenik, genellikle toprakta yaşayan çürümüş bitkilerde ve nemli yüzeylerde yaşayan bir türdür. *A. wentii* birçok toksik metabolit üretir bunlara örnek olarak aflotoksin, emodin ve okratoksin verilebilir; bunlara ek olarak kojik asit, 1-amino-2-siklopentankarboksilik asit, asit, 3-nitroproponik asit ve wentilactone A ve B gibi sekonder metabolitler üretir (Yıldırım K, 2010). Afrotoksin birçok hayvan türünde hastalıklara yol açtığı ve ayrıca nekrozlar meydana getirdiği gösterilmiştir (Aydın N., 2003).

Koloni rengi ve yapısı: Konidiyalar çok çeşitli şekillerde görünür, zeytin kahvesi üzerinde grimsi yeşil renkte; yoğun miselyumlu, beyaz ya da sınırları sarı renkte; bazı formlarında pembemsi büyük halka kitleleri vardır.

Mikroskopik özellikleri: Konidial kafaları, saçılmış genelde yaşlandıkça yarılmalara oluşur; sapları 200-1200 (3000)* 10-12 (16) mm, sıkça kavisli, genellikle renksiz, düz duvarlı yada altında keseleri olan hafifçe siğilli; keseler küresel şekilde uzamakta, 30-80mm genişliğinde; yüzey kabarcıklı örtü ile kaplı; konidiyalar geniş elipsodyial küre şeklinde (3.5) 4-5 mm, yüzey pürüzlü yada çok kabarık şekildedir.

Ayırt edici özellikleri: *A. wentii* conidiyaları zeytin kahvesi renginde olmaktadır ve miselleri beyaz yoğunluklu yeşilimsi ve mat görünümlüdür. 37 °C'de yaşamazlar (Klich M.A., 2002)

Habitat: Tropikal ve subtropikal topraklar temel yayılım alanlarıdır. Genellikle 26-35 °C arası sıcaklıklarda yaşadıkları tespit edilmiştir. Bitki çöpleri ve tohumları üzerinde yaşarlar. Asyada besin fermentasyonunda kullanılırlar (Domsch ve Gams, 1980, Samson vd ., 2000).



Şekil.2.5. *A.wentii* 'nin Pda'daki 7 günlük görüntüsü

BÖLÜM 3

MATERYAL METOD

3.1. Kullanılan Mikroorganizma

Bu çalışmada kullanılan *A. wentii* Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edildi. PDA da 25 °C'de 5-7 gün süre ile üretilerek elde edilen stok kültürleri daha sonraki deney aşamalarında kullanmak üzere + 4 °C saklandı. Stok kültürler ayda bir pasaj edilerek yenilendi.

3.2. Kullanılan Ortamlar

Derycke ve Wandamme (1984)'ın kullandığı, karbon kaynağı olarak sadece inülin içeren tarama medyumunu, inülin yerine yer elması tozu kullanılarak yeniden düzenlendi ve *A. wentii*'nin inülinaz üretimi belirlenmek için kullanıldı (Derycke ve Wandamme, 1984).

Tarama Ortamının İçindekiler

Yer Elması Ekstraktı.....	% 1
KH ₂ PO ₄	% 0.1
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	% 0.05
KCl.....	% 0.15
FeSO ₄ 7H ₂ O.....	% 0.05
NH ₄ H ₂ PO ₄	% 0.01
Agar.....	% 0.2
NaNO ₃	% 0.05

İnilünaz Üretim Ortamı

Yer Elması Ekstraktı.....	% 1
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	% 0.05
Yeast Ekstrat.....	% 0.15
KH ₂ PO ₄	% 0.1
NH ₄ NO ₃	% 0.023

Hazırlanan üretim ortamları 115 °C de 30 dakika süre ile otoklavda steril edildi.

Yerelması Ekstraktının Hazırlanması

Taze yerelmaları yıkandı, daha sonra robotton çekilerek parçalandı. Parçalanan yerelmaları 80 °C'lik fırında kurutuldu. Kurutulan yerelmaları değirmende öğütülerek toz haline getirildi.

3.3. İnülinaz Üretimi ve Eldesi

250 ml erlenlerde içerisinde 50 ml olacak şekilde hazırlanan steril üretim ortamlarına stoktaki kültürlerden ekim yapıldı. Ekim yapılan ortamlar, değişen deney koşullarına göre farklı sıcaklık ve farklı sürelerde 100 rpm çalkalama hızına sahip su banyolarında üretime bırakıldı.

Üreme sonrası besiyerinde üreyen miçeller süzülerek toplandı ve miçel ağırlığı 80 °C'lik fırınlarda kurutularak kuru ağırlık cinsinden ölçüldü. Süzüntü kaba enzim kaynağı olarak kullanıldı.

3.4. İnülinaz Aktivitesinin Ölçülmesi

İnülinaz aktivitesi reaksiyon sonucunda açığa çıkan ürün miktarının hesaplanması ile ölçüldü. Aktivite ölçümleri 3,5-dinitrosalisilikasit(DNS) yöntemi ile gerçekleştirildi.

Reaksiyon için enzim kaynağı olarak elde edilen süzüntü kullanıldı. Substrat olarak 0,1 M pH: 5,5 Sodyum-asetat tamponu ile hazırlanmış % 0.1'lik inülin süspansiyonu kullanıldı.

Aktivite ölçümlerinde reaksiyon sonucu açığa çıkan ürünün(redüktör şekerin) 3,5-dinitrosalisilikasit ile oluşturduğu rengin soğutulduktan sonra 550 nm'de spektrofotometrik olarak okunması ile gerçekleştirildi. Aktivite ölçümlerinde kullanılmak üzere kör, kontrol ve örnek tüpleri oluşturuldu.

Kör Tüpün İçeriği: 1 ml Sodyum-asetat tamponu (pH: 5), 3 ml DNS

Kontrol Tüpün İçeriği: 1 ml Na- Asetat tamponu(pH: 5), 0.1ml enzim, 3 ml DNS

Örnek Tüpün İçeriği: 1 ml % 0.1 inülin çözeltisi, 0.1ml enzim, 3 ml DNS

Kör, kontrol ve örnek tüpleri içerisine DNS inkübasyon süresi bitiminde eklendi. Yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan kör, kontrol ve örnek tüpleri 35 °C de su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitiminde öncelikle örnek tüplerindeki reaksiyonu durdurmak için her bir örnek tüpüne 3 ml DNS eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra kör ve kontrol tüplerine de 3 ml DNS ilave edildikten sonra tüpler 10 dakika kaynatıldı.

Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ortamdaki fruktoz miktarı 550 nm dalga boyunda spektrofotometrede kör tüpüne karşı okundu.

Örnek tüplerinin verdiği absorbans değerinden kontrol tüplerin absorbans değeri çıkarıldı ve enzim tarafından reaksiyon sonucu açığa çıkarılmış redüktör şeker miktarı bulundu.

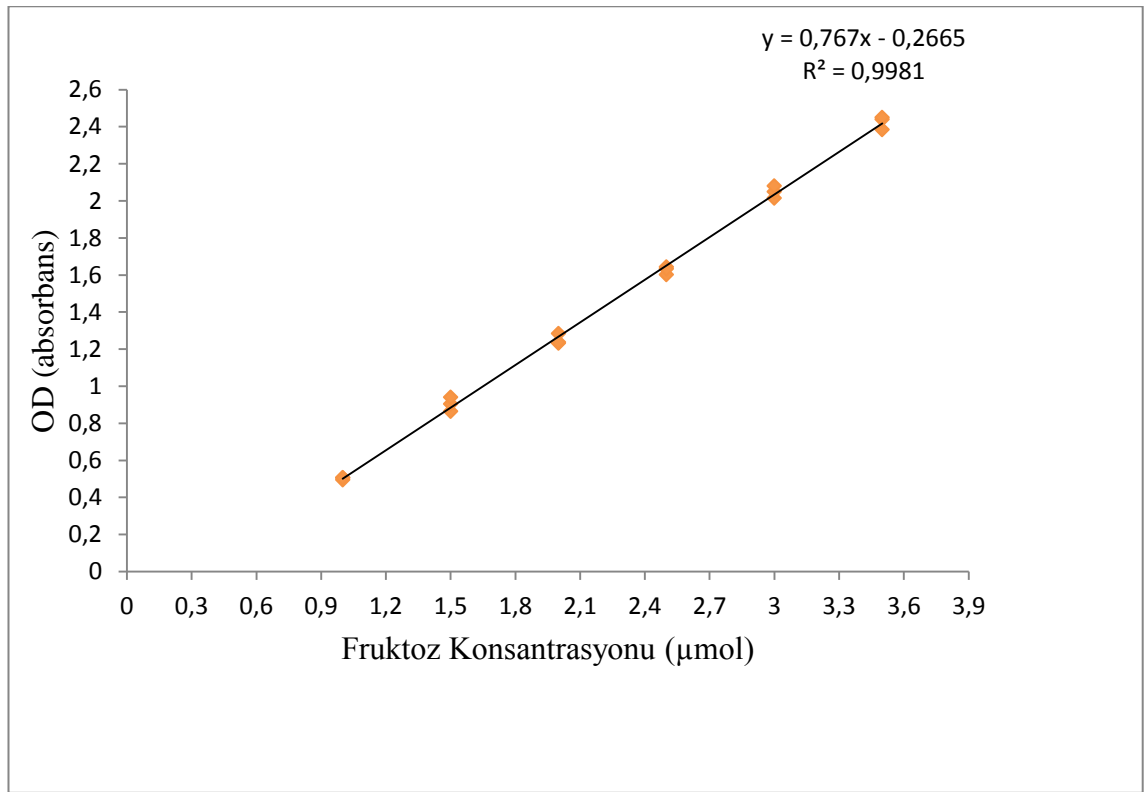
Hazırlanmış olan fruktoz standart eğrisinden açığa çıkan fruktoz miktarı mikromol cinsinden hesaplandı. Bir ünite inülinaz aktivitesi 1 dakikada 1 μ mol fruktozu açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı (Telefoncu vd., 2000).

3.5. Fruktoz Standart Grafiğinin Hesaplanması

Enzim aktivitesinin U/ml cinsinden hesaplanmasında kullanılacak olan fruktoz standart grafiği çizimi için öncelikle 0.018 gram fruktoz üzerine 10ml. Sodyum asetat tampon eklendi ve stok çözeltisi olarak kullanıldı.

Grafik çizimi için kullanılacak 6 tane nokta aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

- 1.0 μ mol: 0.1 ml Stok çözeltisi + 0.9 ml tampon
- 1.5 μ mol: 0.15 ml Stok çözeltisi + 0.85 ml tampon
- 2.0 μ mol: 0.2 ml Stok çözeltisi + 0.8ml tampon
- 2.5 μ mol: 0.25 ml Stok çözeltisi + 0.75ml tampon
- 3.0 μ mol: 0.30 ml Stok çözeltisi + 0.7 ml tampon
- 3.5 μ mol: 0.35 ml Stok çözeltisi + 0.65 ml Tampon



Şekil 3.1. Fruktoz standart grafiği

3.6. Üretim Koşullarının *A. wentii* İnülinaz Aktivitesine Etkisi

Çalışmanın bu bölümünde enzimin en yüksek aktivite gösterdiği üretim koşullarının belirlenmesi amaçlandı.

İnülinaz aktivitesine etkisi olabileceği düşünülen üretim süresi, üretim sıcaklığı, üretim pH'ı, üretim ortamındaki farklı azot ve karbon kaynakları etkileri çalışıldı.

3.6.1 Üretim Süresinin İnülinaz Aktivitesine Etkisi

Üretim süresinin enzim aktivitesi ile ilgisini araştırmak için *A. wentii*'nin üremesi farklı üretim sürelerinde (1, 2, 3, 4, 5 gün) 30 °C'de çalkalamalı ortamda pH'sı 5.5 olan üretim ortamlarında gerçekleştirildi.

Bu sürenin sonunda 3.3'de belirtildiği gibi kaba enzim elde edildi, enzim aktiviteleri her günün sonunda ölçülerek üretim süresi ile enzim aktivitesi arasındaki ilişki değerlendirildi.

3.6.2. Üretim Sıcaklığının İnülinaz Aktivitesine Etkisi

A. wentii'nin üretimi 25, 27, 30, 35 °C' lik çalkalamalı su banyosunda pH'ı 5.5 olan üretim ortamlarına 72 saat süre ile gerçekleştirildi. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen üretimin sonunda fungus'un enzim aktivitelerinin ölçülmesi ile üretim sıcaklığının enzim aktivitesine etkisi belirlendi.

3.6.3. Üretim Ortamının Başlangıç pH'sının İnülinaz Aktivitesine Etkisi

Üretim ortamının başlangıç pH'nın inülinaz aktivitesine etkisini belirlemek için, değişen pH dereceleri değiştirilen (4.0 5.0 6.0 7.0) üretim ortamlarına ekim yapıldı ve 30 °C'da çalkalamalı (100 rpm) su banyosunda 72 saat üretime bırakıldı. Enzim aktiviteleri ölçülerek üretim pH' ı ile enzim aktivitesi arasındaki ilişki belirlendi.

3.6.4. Farklı Karbon Kaynaklarının İnülinaz Aktivitesine Etkisi

A. *wentii* inülinaz aktivitesine çeşitli karbon kaynaklarının etkisini araştırmak amacı ile %1 oranında inülin, sukroz, glukoz, fruktoz, nişasta, maltoz, pektin ve selüloz kaynakları içeren üretim ortamları hazırlandı. Üretim sonucu farklı karbon kaynakları ile enzim aktivitesi arasındaki ilişki belirlendi.

3.6.5. Azot Kaynaklarının İnülinaz Aktivitesine Etkisi

Azot kaynaklarının inülinaz aktivitesi ile olan ilişkisini araştırmak için % 3 yer elması içeren üretim ortamlarına %1 (NH₄)₂HPO₄, % 0.5 (NH₄)₂HPO₄, %1 (NH₄)₂H₂PO₄, % 0.5 (NH₄)₂H₂PO₄, % 1 NH₄NO₃, % 0.5 NH₄NO₃, % 1 NH₄Cl, % 0.5 NH₄Cl, % 1 pepton, % 0.5 pepton, %1 kazein, % 0.5 kazein, %1 yeast ekstrakt, % 0.5 yeast ekstrakt, % 1 NaNO₃, % 0.5 NaNO₃, eklenerek hazırlanan besiyerlerine ekim yapıldı ve 30 °C'de 72 saat süre ile üretime bırakılarak üretim sonucunda aktivite ölçümü yapıldı.

3.7. *A.wentii* İnülinazının Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu bölümünde kaba inülinaz enziminin bazı biyokimyasal özellikleri araştırıldı. Bu amaçla öncelikle; inkübasyon pH'nın, sıcaklığın, substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi araştırıldı. Daha sonraki çalışmalarda ayrıca kaba enzimin pH ve termal kararlılığı çalışıldı.

3.7.1. İnkübasyon pH'nın İnülinaz Aktivitesine Etkisi

A.wentii kaba inülinaz enziminin optimum pH değerini bulmak için enzim substrat karışımı pH' ları 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, olacak şekilde(asetat tamponu pH 3-5, Fosfat tamponu pH 6-7, Borat tamponu pH 8) hazırlandı. Her bir örnekteki inülinaz aktivitesi U/ml cinsinden ölçülerek optimum pH değeri belirlendi. İnkübasyon 35 °C de 10 dakika olarak gerçekleştirildi.

3.7.2. İnkübasyon Sıcaklığının İnülinaz Aktivitesine Etkisi

Farklı inkübasyon sıcaklıklarının aktiviteye etkisinin araştırılması için enzim substrat karışımı 25, 30, 35 ve 40 °C'lik su banyolarında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi 10 dakika, üretim ortamı pH'ı 6.0 olarak ayarlandı. İnkübasyon sonrası aktivite değerleri U/ml cinsinden hesaplandı.

3.7.3. Substrat Konsantrasyonunun İnülinaz Aktivitesine Etkisi

Farklı konsantrasyonlara sahip (% 0.1- % 0.7) substrat çözeltileri hazırlandı. Enzim aktivitesi U/ml cinsinden ölçülerek en uygun substrat konsantrasyonu saptandı. Reaksiyon pH 6 ve 35 °C'de gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi 10 dakika olarak uygulandı.

3.7.4. *A. wentii* İnülinazının K_m ve V_{max} Değerlerinin Hesaplanması

Enzimin inülin için K_m değerinin bulunması amacı ile artan konsantrasyonlarda substrat çözeltisi hazırlandı. Her bir konsantrasyon için enzim aktivitesi ölçüldü. $1/[S]$ ve $1/V$ değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak *A. wentii* inülinazının inülin için K_m ve V_{max} değerleri bulundu.

3.7.5. İnülinaz Enziminin pH Kararlılığının Araştırılması

0.1 ml kaba enzim üzerine farklı pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)'larda hazırlanan tampondan 0.1 ml eklenip karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 1 ml pH 6.0'da hazırlanmış substrat çözeltisinden eklenip 35 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı, daha sonra enzim aktivitesi U/ml cinsinden ölçüldü.

3.7.6. İnülinaz Enziminin Termal Kararlılığının Araştırılması

Kaba enzimin artan sıcaklıklarda aktivitesinin ne kadarını koruduğunun belirlenmesi için farklı sıcaklıklarda (30, 40, 50, 60, 70, 80 °C) ayarlanmış etüvlerde enzim 20 dk süre ile inkübe edildi. Bu sürenin sonunda farklı sıcaklıklarda inkübe edilmiş enzimler kullanılarak inkübasyon sonrası aktivite ölçümü yapıldı.

3.8. Yerelması Tüberleri, Soğan ve Sarımsak Kullanılarak Hazırlanan Sıvı Üretim Ortamlarında İnülinaz Aktivitesi Ölçümü

Aşağıdaki oranlarla hazırlanmış petrilere dökülen katı üretim ortamlarına *A. wentii* nokta ekimi yapılmıştır. Koloninin belirli bir boya ulaşması için 1 hafta 25 °C'deki etüvlerde bekletilmiştir. Belirli boya ulaşan kolonilerden halka şeklinde kesim yapıp hazırlanan sıvı üretim ortamlarına eklenmiştir.

Üretim ortamı

Yer Elması Ekstrası	% 3
KH ₂ PO ₄	% 0.1
MgSO ₄ .7H ₂ O	% 0.05
KCl	% 0.15
FeSO ₄ 7H ₂ O	% 0.05
NH ₄ H ₂ PO ₄	% 0.01
Agar	% 0.2
NaNO ₃	% 0.05

3.8.1. Sıvı Üretim Ortamlarının Hazırlanması

Sıvı üretim ortamlarında karbon kaynağı olarak yer elması tüberleri, soğan ve sarımsak kullanıldı. Her bir bitki için farklı üretim ortamı hazırlandı. 50 gr, taze yer elması ve 200 ml distile su ile robot kullanılarak ezildi. Partüküllerin çökmesi beklendi. Daha sonra tülbent kullanılarak süzüldü.

Soğan ve sarımsak için de aynı yöntem kullanıldı ve süzüntü elde edildi. Elde edilen filtratların 50 ml'ne % 2'lik yeast ekstrakt azot kaynağı olarak konuldu. % 0.05 MgSO₄7H₂O, % 0.1 KH₂PO₄ eklenerek daha sonra üretim ortamları 20 dk 121 °C'de steril edildi.

İnülinaz aktivitesinin ölçümü **Bölüm 3.4**'de belirtildiği gibi yapılmıştır.

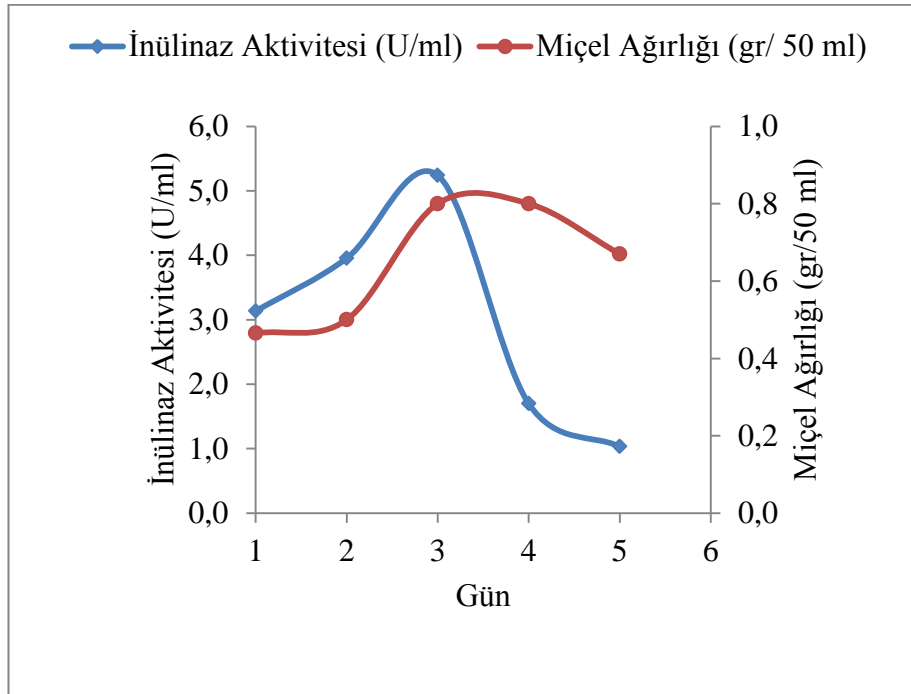
BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1 Üretim Koşullarının *A. wentii* İnülinaz Aktivitesine Etkisi

4.1.1. Üretim Süresinin İnülinaz Aktivitesine Etkisi

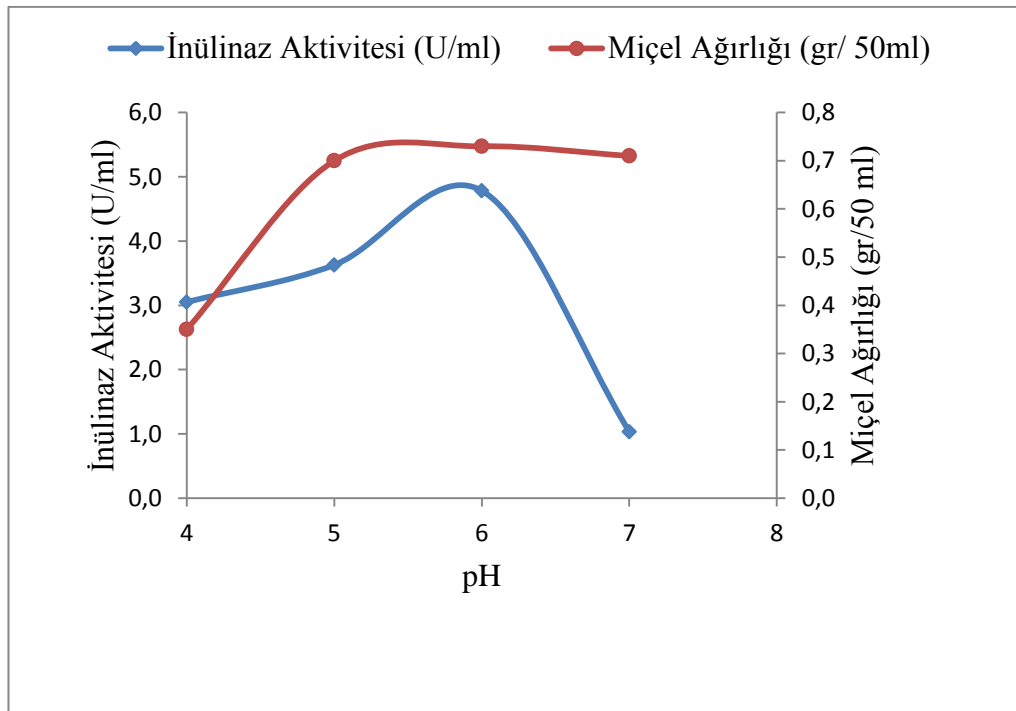
30 °C'de çalkalamalı etüvde üretime bırakılan besiyerlerinde üremenin 3. gününde maksimum inülinaz aktivitesi 5,23 U/ml ölçüldü. Üretim süresi artırıldığında miçel ağırlığında belirgin bir değişiklik olmazken, inülinaz aktivitesinde düşüş gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Üretim süresinin inülinaz aktivitesine etkisi

4.1.2. Üretim ortamının başlangıç pH'ının inülinaz aktivitesine etkisi

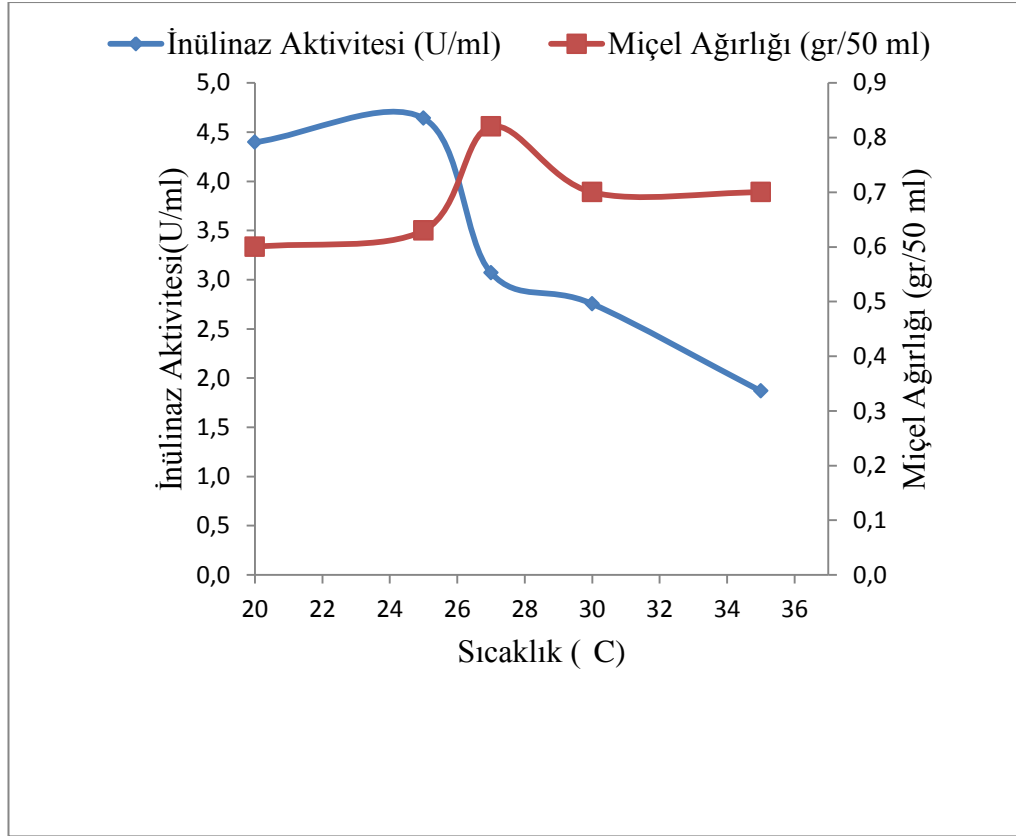
Değişen pH değerleri (4.0, 5.0, 6.0, 7.0) ile hazırlanmış üretim ortamları 25 °C' de çalkalamalı olarak üretim yapıldı. Üretim süresinin üçüncü gününde miçel ağırlığı ve inülinaz aktiviteleri ölçüldü. Maksimum aktivite 4.78 U/ml pH 6.0'ya ayarlanmış ortamda gözlemlendi(Şekil4.2).



Şekil 4.2. Üretim ortamı başlangıç pH'ının inülinaz aktivitesine etkisi

3.5.3 Üretim Sıcaklığının İnülinaz Aktivitesine Etkisi

A. wentii'nin üretimi 20, 25, 27, 30 ve 35 °C lik çalkalamalı su banyosunda (100 rpm) ve pH'6.0 olacak şekilde ayarlanmış olan üretim ortamlarında 72 saat süre ile üretime bırakılan kültürlerin 72 saat sonra enzim aktivitesi ve miçel ağırlığı ölçüldü. En yüksek enzim aktivitesi 25 °C derecede saptandı. Yüksek sıcaklıklarda enzim aktivitesinde düşüş gözlemlendi 35 °C'de aktivite 1,86 U/ml'ye düştüğü gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil.4.3. Üretim sıcaklığının inülinaz aktivitesine etkisi

4.1.4. Farklı Karbon Kaynaklarının İnülinaz Aktivitesine Etkisi

Üretim ortamındaki farklı karbon kaynaklarının inülinaz aktivitesine etkisi araştırıldığında en yüksek aktivite% 3 lük yer elması içeren besiyerinde gözlemlendi. Daha sonra % 1'lik yer elmalı ortam da ve üçüncü olarak %1'lik inülinli ortamda aktivite en yüksek ölçüldü.

Çizelge 3.1. Farklı karbon kaynaklarının inülinaz aktivitesine etkisi

Karbon Kaynakları (% 1)	Aktivite (U/ml)	Miçel Ağırlığı (gr/50 ml)
Pektin	0.729	0,32
Sukroz	0.844	0,13
Maltoz	0.923	0,12
Nişasta	0.876	0,30
Selüloz	0.899	0,51
Glukoz	0.855	0,25
İnülin	1.089	0,28
%1 yer elması	1,101	0,31
%3 yer elması	1.340	0.38

4.1.5. Azot Kaynaklarının İnülinaz Aktivitesine Etkisi

Üretim ortamındaki farklı azot kaynaklarının inülinaz aktivitesine etkisi araştırıldığında en yüksek aktivite% 1' lik kazein içeren besiyerinde gözlemlendi. İnorganik kaynaklardan ise % 1'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren ortamda en yüksek aktivite ölçüldü.

Çizelge 3.2. Farklı azot kaynaklarının inülünaz aktivitesine olan etkisi

Azot Kaynakları (Organik)		Aktivite(U/ml)	Miçel Ağırlık(gr/50 ml)
Pepton	% 0.5	0.252	0.85
Pepton	% 1	0.529	1.08
Maya	% 0.5	0.305	0.83
Maya	% 1	0.661	0.90
Kazein	% 0.5	1.306	1.0
Kazein	% 1	1.724	1.29
Normal*		1.182	1.07

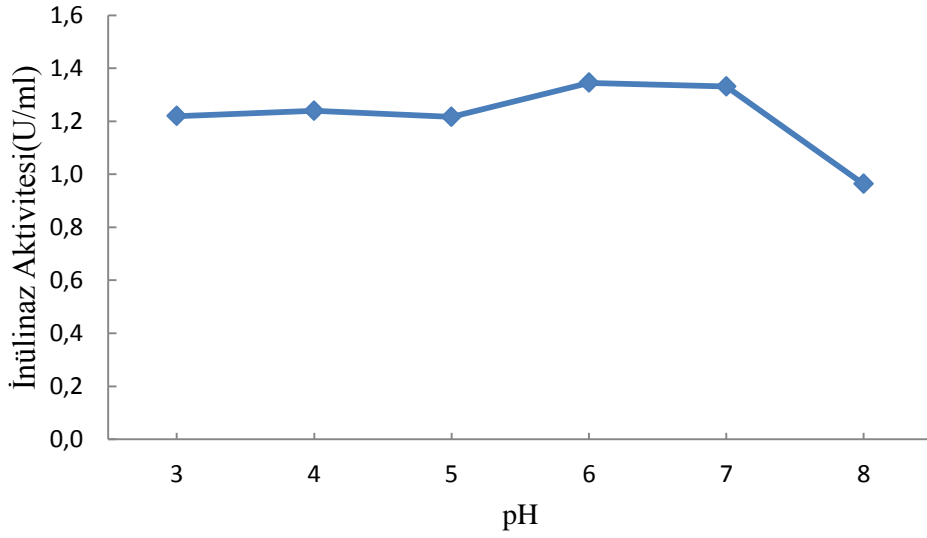
Azot Kaynakları (İnorganik)		Aktivite (U/ml)	Miçel Ağırlık (gr/50 ml)
NH ₄ H ₂ PO ₄	%0.5	0.996	0.82
NH ₄ H ₂ PO ₄	%1	1.793	0.86
NH ₄ NO ₃	%0.5	1.432	0.82
NH ₄ NO ₃	%1	1.448	0.84
NH ₄ CL	%0.5	1.247	0.80
NH ₄ CL	%1	1.448	0.97
NaNO ₃	%0.5	0.746	0.99
NaNO ₃	%1	1.059	0.99
(NH ₄) ₂ HPO ₄	%0.5	1.338	0.91
(NH ₄) ₂ HPO ₄	%1	2.249	1.15
(NH ₄) ₂ SO ₄	%0.5	1.692	0.94
(NH ₄) ₂ SO ₄	%1	3.456	0.88
Normal*		1.182	1.07

*Normal tüplerde kontrol besiyerleri 0.4m M NH₄H₂PO₄ ve 0.2 mM NH₄NO₃ içermektedir.

4.2. *A.wentii* Kaba İnülinaz Enziminin Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

4.2.1. İnkübasyon pH' nın İnülinaz Aktivitesine Etkisi

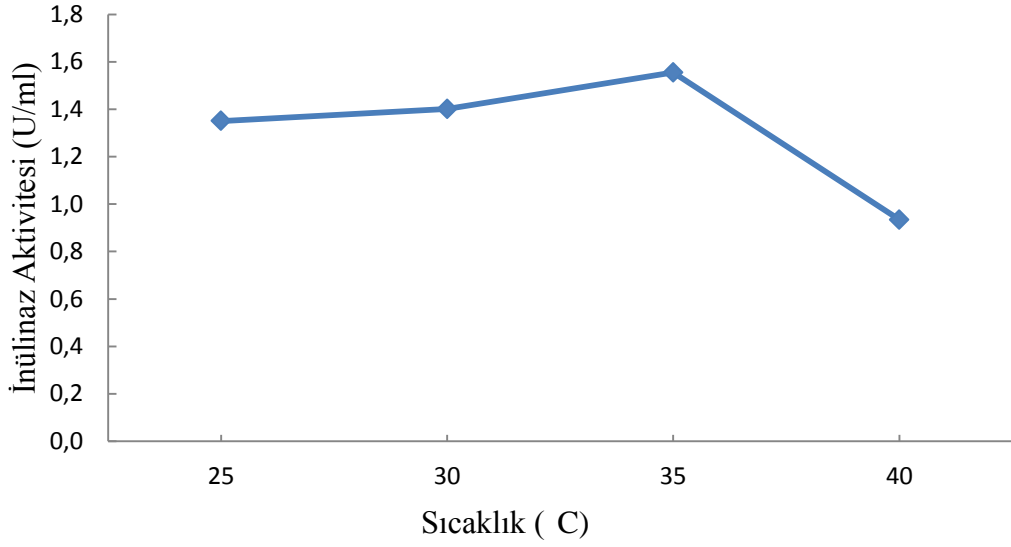
A. wentii' nin kaba inülinaz enziminin en iyi çalıştığı pH değeri saptamak için yapılan bu çalışmada, inülinaz aktivitesinin (1.345 U/ ml) en yüksek olduğu pH değeri 6.0 olarak bulunmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. İnkübasyon pH'nın inülinaz aktivitesine etkisi

4.2.2. İnkübasyon Sıcaklığının İnülinaz Aktivitesine Etkisi

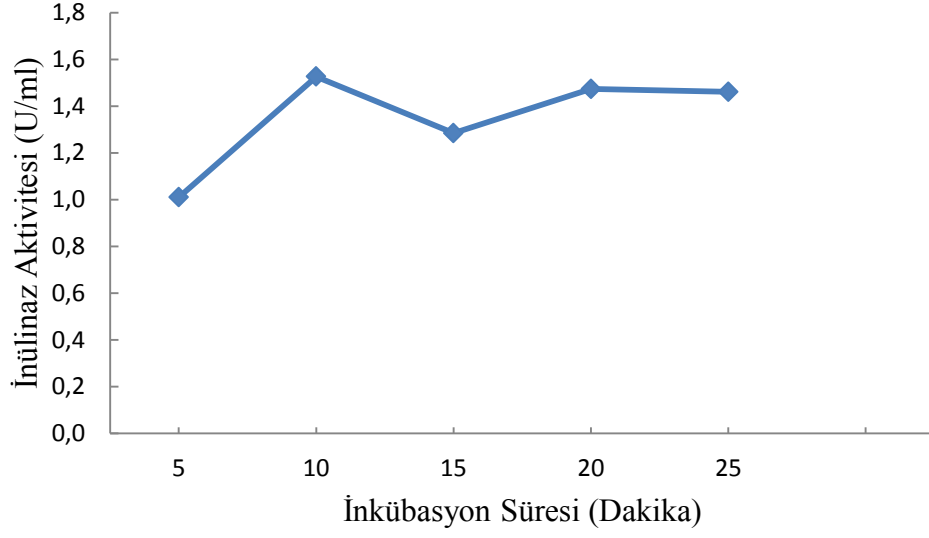
Bu çalışmada inkübasyon sıcaklığının inülinaz aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Farklı sıcaklıklarda (25-40 °C) inkübasyon sonrası aktivite değerleri ölçülmüştür. İnülinaz aktivitesinin en yüksek olduğu (1.555 U/ml) inkübasyon sıcaklığı 35 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. İnkübasyon sıcaklığının inülinaz aktivitesine etkisi

4.2.3. İnkübasyon Süresinin İnülinaz Aktivitesine Etkisi

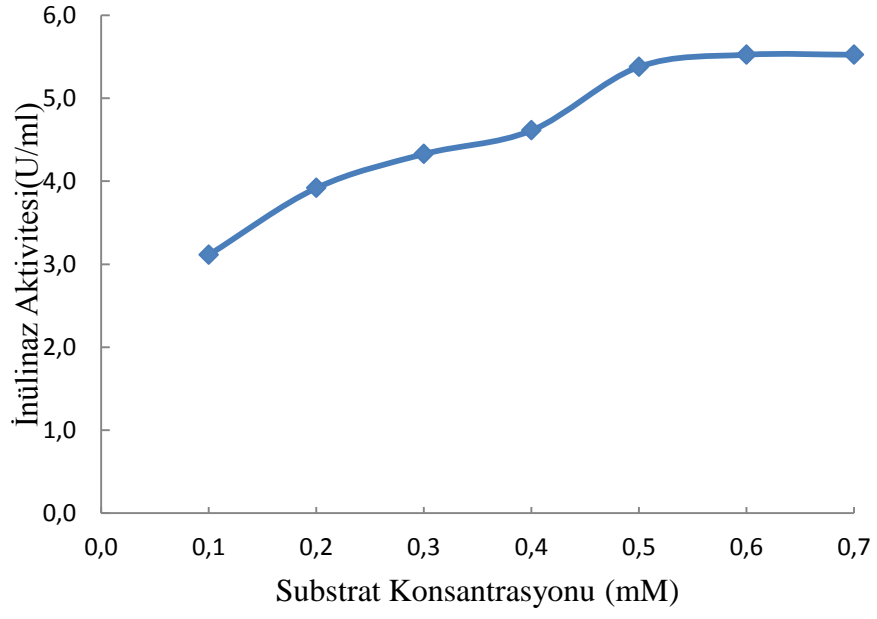
A. wentii inülinazı için en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi amacı ile farklı sürelerde inkübasyona bırakılıp daha sonra enzim aktivitesi ölçülmüştür. En yüksek enzim aktivitesi (1.526 U/ml) 10 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. İnkübasyon süresinin inülinaz aktivitesine etkisi

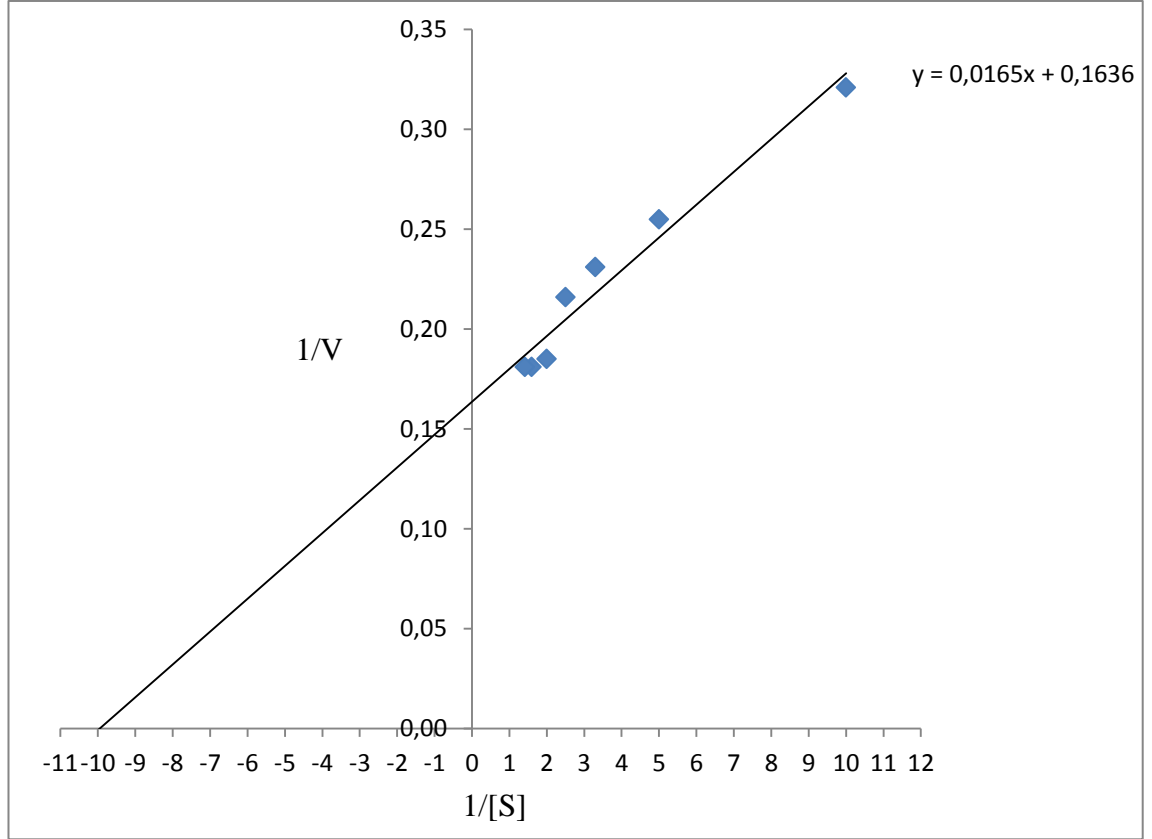
4.2.4. Substrat Konsantrasyonunun İnülinaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

A.wentii inülinazı için en uygun substrat konsantrasyonunu belirlemek için enzim substrat karışımındaki inülin konsantrasyonu 0.1-0.7 mM aralığında artan miktarlarda hazırlandı. İnülinaz aktivitesinin 0.6 mM'lık substrat konsantrasyonuna kadar arttığı, daha yüksek konsantrasyonlarda ise sabit kaldığı gözlemlendi (**Şekil 4.7**).



Şekil 4.7. Substrat konsantrasyonunun inülinaz aktivitesi üzerine etkisi

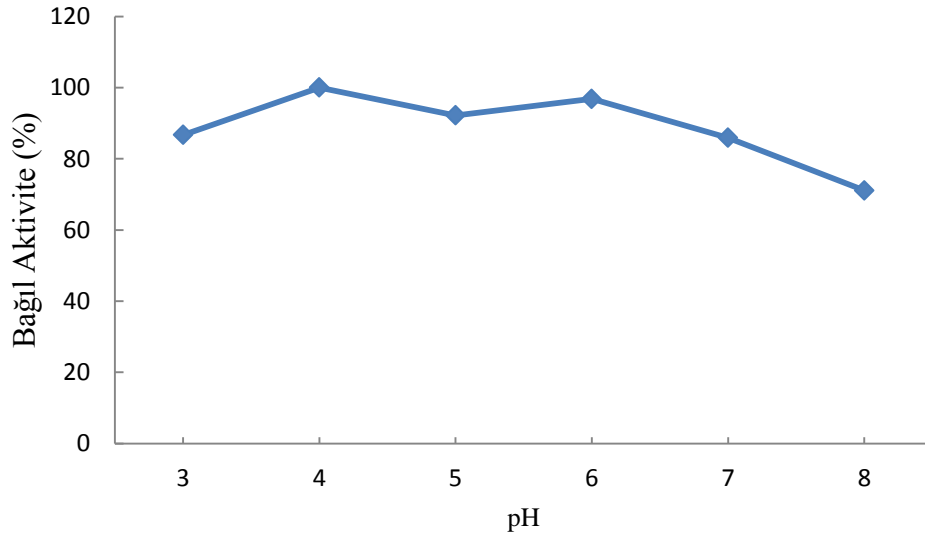
A.wentii inülinazı için Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m değeri yaklaşık 1×10^{-4} M, V_{max} değeri ise 6,134 mmol/ml/dk olarak hesaplandı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Lineweaver Burk Grafiği

4.2.5. İnülinaz enziminin pH kararlılığının araştırılması

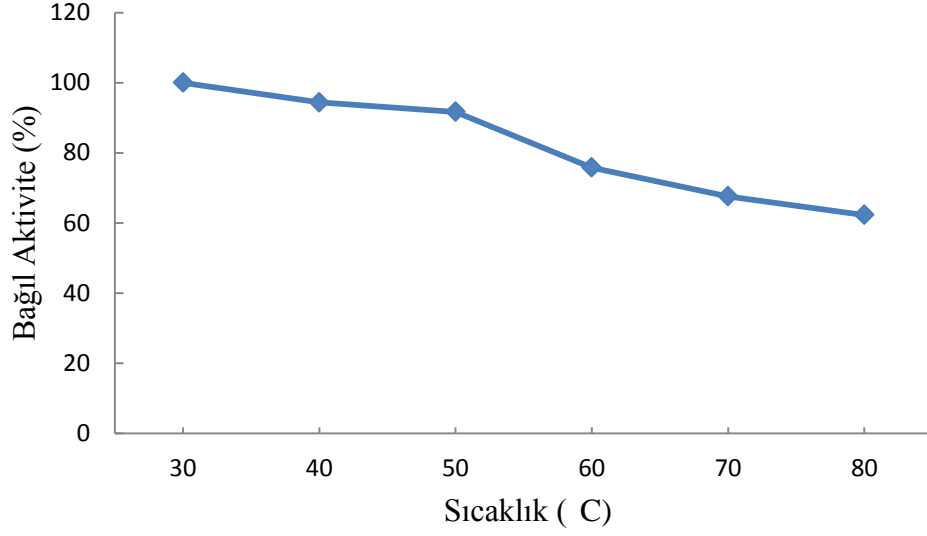
Farklı pH'da 20 dakika bekletilmiş enzim aktivitesi ölçüldüğünde pH 3-6 aralığında aktivitesini (% 96.8) koruduğu 7-8 pH aralığında ise azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.9. İnülinaz enziminin pH kararlılığının araştırılması

4.2.6. İnülinaz Enziminin Termal Kararlılığının Araştırılması

Elde edilen kaba inülinaz enziminin termal kararlılığını araştırmak üzere yapılan deneylerin sonucunda 50 °C dereceye kadar enzimin aktivitesinde gözlenen kayıp azdır, 50 °C'den sonra enzim aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir. 80 °C'de enzim aktivitesinin % 62.3'nü korumaktadır.



Şekil 4.10. İnülinaz enziminin termal kararlılığının araştırılması

4.3. Yerelması Tüberleri, Soğan ve Sarımsak Kullanılarak Hazırlanan Sıvı Üretim Ortamlarında İnülinaz Aktivitesi Ölçümü

Çizelge 3.4. Yerelması tüberleri, soğan ve sarımsak kullanılarak hazırlanan sıvı üretim ortamlarında inülinaz aktiviteleri ölçümü

Yer elması ile hazırlanan üretim ortamı	0.895 U/ml
Soğan ile hazırlanan üretim ortamı	0.713 U/ml
Sarımsak ile hazırlanan üretim ortamı	0.998 U/ml
Yer elması tozu ile hazırlanan üretim ortamı	3.456 U/ml

En yüksek aktivite yer elması tozu ile hazırlanan üretim ortamında daha sonra ise sarımsak ile hazırlanan üretim ortamında gözlenmiştir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Bu çalışmada *A.wentii*' den inülinaz enzimi üretimi ve enzimin bazı biyokimyasal özellikleri belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda öncelikle Derycke ve Vandamme,(1984)'dan modifiye edilerek kullanılan ve karbon kaynağı olarak yer elması ekstratı içeren tarama medyumunda *A.wentii* fungusunun üretimi yapılmıştır. Daha sonra sıvı besiyerinde üretim gerçekleştirilmiş ve enzim aktivitesini etkileyen parametreler araştırılmıştır.

Ayrıca *A.wentii*'den inülinaz üretiminde kullanılan Kango N (2008)'dan modifiye edilmiş soğan ve sarımsak ve yer elması taze ekstraktları kullanılarak farklı bir üretim ortamında da enzimin aktivitesi ölçümü yapılmıştır.

Çalışmanın ikinci kısmında *A.wentii* inülinazının bazı biyokimyasal özellikleri belirlenmesi amaçlanmıştır.

Inülinaz enzimi birçok endüstride ilaç ve gıda sanayiinde yaygın kullanımı olan bir enzimdir.

Endüstriyel üretim ortamının çalışma şartları göz önüne alınacak olursa üretimlerin özellikle yüksek sıcaklıklarda gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bu yüzden yüksek sıcaklıklarda çalışan termal stabilitesi yüksek olan enzimler daha fazla tercih edilmektedir.

Inülinaz enzimi ile fruktoz şurubu üretimi özellikle endüstriyel ölçekte kullanılan alternatif bir metottur. Üretim ortamı özelliklerine baktığımızda düşük sıcaklıklarda kontaminasyon riski ve düşük pH'larda ise istenmeyen reaksiyonların meydana gelme riskinin azaldığı gözlemlenmiştir. Mikrobiyal inülinazların çoğu yüksek sıcaklıklarda da stabildir. Enzimlerin çalıştığı optimum koşulları belirlemek reaksiyon verimini arttırmak için oldukça önemlidir.

Bu sebeplerden dolayı inülinaz enziminin üretimi ve aktivitesi için gerekli optimum sıcaklık, optimum pH, termal ve pH kararlılığı araştırılmıştır.

Üretim süresinin inülinaz aktivitesi üzerine etkisi araştırıldığında, maksimum inülinaz aktivitesi 72 saatte 5.23 U/ml olarak saptanmıştır (**Şekil.4.1**). İncelenen çalışmalar arasında ; *Aspergillus niger* AUP19 (Kumar vd., 2005), *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 (Makino vd., 2009), *K.marxianus* (Bernardoo vd., 2005), *Pichia guilliermondii* (Gao vd., 2007), *Cryptococcus aureus* (Gao vd., 2007), *Debaryomyces hansenii* (Gao vd., 2007), *Yarrowia lipolytica* (Gao vd., 2007), *Bacillus smithi* T7 (Gao vd., 2008), *A.niger* MTCC 1344 (Kumar vd., 2011) mikroorganizmalarının da maksimum aktivitelerini 72 saat sonucunda gösterdiği belirlenmiştir.

Aspergillus türleri göze çarpan inülinaz üreticileridir. *Aspergillus* türleri ile yapılan çalışmalara bakıldığında üretim süresi *Aspergillus parasiticus*(Ertan vd., 2002)'ta 24 saat, *Aspergillus niger* (Zhang vd., 2004)'de 120 saat, *Aspergillus ficuum* JNSP 5-06 (Jing vd., 2003)' da 120 saat, *A. oryzae* (Kochhar vd., 1999), *A. aureus*, *A. fischeri*, *A. flavus*, *A.nidulans* (Cruz vd., 1998), *A.candidus*, *A. chevalieri* (Baysal vd., 1994) türlerinde ise üretim süresi 9 gün olarak belirtilmiştir. *A.candidus*' da ise (Baysal vd., 1994) 6 gün olarak bildirilmiştir.

Genellikle aynı cinsteki mikroorganizmaların üretim süresi birbirine yakın olduğu, diğerlerinin ise türden türe farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Örneğin *Rhizoctonia solani* (Ertan vd., 2003) için 96 saat, *Cryptococcus aureus* (Sheng vd., 2007) için 42 saat, *Streptomyces* sp. GNDU-1 (Gill vd., 2003) için 24 saat olarak belirlenmiştir.

Genel olarak inülinaz üreten mikroorganizmalara baktığımızda üretime bırakılan inkübasyon sürelerinin bakteri türlerinde maya ve küflere nazaran daha kısa süre- olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin *Xanthomonas* sp. (Park ve Yun, 2001) için 22 saat, *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* (Naidoo vd., 2009) için 18 saat olarak belirtilmiştir.

Üretim ortamı pH'sının *A.wentii* inülinaz aktivitesine olan etkisi araştırıldığı çalışmada, 25 °C'de 72 saat çalkalamalı su banyosunda üretim yapıldığında araştırılan pH'lar içinde en yüksek pH'sı 6.0 olan ortamda maksimum aktivite göstermiştir (4.78 U/ml)(**Şekil.4.2**).

Farklı fungus türlerinin üretim ortamının pH'ları arasında kıyaslama yapılacak olursa; küf türleri içinde *A. niger* SL 09 (Ge ve Zhang, 2005)' de, *T. viride* (Ertan vd., 2003) ve bir tür maya olan *K.marxianus* ATCC 52466 (Selvakumar vd., 1999) türlerindeki maksimum aktivite pH'6 da ölçülmüştür.

İnülinaz üreten türlerin optimum pH'larına baktığımızda çok geniş pH aralığında maksimum aktivite gösterdikleri gözlemlenmiştir. Örneğin *K.marxianus* (Bernardoo vd., 2005) için asidik bir pH olan 3.5'da maksimum aktivite ölçümü yapılmıştır. Bakteri türleri için ise genelde daha yüksek pH'larda maksimum aktivite ölçülmüştür. Örneğin *Streptomyces* sp. GNDU-1 (Gill vd., 2003) için maksimum aktivite pH 7.5'da gözlemlenmiştir.

Aspergillus tubingensis CR16 (Trivedi vd., 2012) için optimum pH 5.0 olarak gözlemlenmiştir.

Diğer bir bakteri türü *B. smithi* 17 'nin (Gao vd., 2008) ise maksimum aktivite gösterdiği pH 7.0 olarak belirlenmiştir. Diğer benzer çalışmalarda ise *C. aureus* (Sheng vd., 2007) pH 5.0'de, *K.bulgaricus* (Vranesic vd., 2002) için pH 6.8 de, *R. solani* (Ertan. F, 2003) için pH 4.0'de maksimum aktivite ölçümü yapılmıştır.

Üretim ortamının sıcaklığının inülinaz aktivitesine olan etkisini araştırmak için çeşitli sıcaklıklarda inülinaz aktivitesi ölçümü yapılmıştır. En yüksek aktivite 25 °C'de ölçülmüştür (4.65 U/ml)(Şekil.4.3.).

Çeşitli fungus türlerinde inülinaz aktivitesinin üretim sıcaklığı ile olan ilişkisi araştırıldığında genellikle 28-30 °C arasında maksimum aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Örneğin, *A. niger* AUP19 (Kumar vd., 2005), *K. marxianus* (Selvakumar vd., 1999), *P. guilliermondii* (Gao vd., 2007) ve *C. aureus* (Gao vd., 2007) türleri için optimum sıcaklık 28 °C'dir.

A.niger S1 09 (Ge ve Zhang ., 2005), *A. parasiticus* (Ertan vd., 2002) ve *K. Marxianus* (Bernardoo vd., 2005) ,*A. ficuum* (Chen vd., 2009), *K. marxianus* NRRL Y-7581 (Sguarezi vd., 2009) türlerinde ise maksimum aktivite 30 °C'de gözlemlenmiştir. *T. viride* (Ertan vd., 2002) ile yapılan üretim sonucu maksimum aktivite 25 °C'de ölçülmüştür.

Bakteri türlerinde ise maksimum aktivite daha yüksek sıcaklıklarda gözlemlenmiştir. *Streptomyces* sp. GNDU (Chi vd., 2009) için 46 °C, *B. smithi* T7 (Gao vd., 2008) için 50 °C'de maksimum aktivite ölçümü yapılmıştır. Termofilik topraklardan izole edilen *B. stearothermophilus* KP1289 (Zherebtsov vd., 2002)'da maksimum aktivite 69 °C'de ölçülmüştür. *Thermotoga maritima* (Liebl vd., 1998) bakterisinin ürettiği inülinaz enzimi için optimum sıcaklık 90 °C'dir.

Bazı maya türlerinin de yüksek sıcaklıklarda maksimum aktivite gösterdikleri gözlemlenmiştir. Örneğin, *K. fragilis* (Kim vd., 1982) için 45 °C, *Basidiyomicota* cinsinden inülinaz üretimi gözlenen ilk tür olan *Panaeolus papillonaceus* (Mukherjee ve Sengupta., 1987)'da maksimum aktivite ölçümü 60-65 °C'de görülmüştür.

Araştırılan diğer bir parametre ise üretim ortamında kullanılan karbon kaynağının inülinaz aktivitesine olan etkisidir. %1'lik inülin varlığında 1.089 U/ml olarak maksimum inülinaz aktivitesi ölçülmüştür. İnülin yerine kullanılan diğer karbon kaynaklarında (fruktoz, nişasta, maltoz, pektin, selüloz, glukoz, sukroz) aktivitenin daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Selüloz ve pektin içeren ortamda miçel ağırlığında artış gözlemlenmiş ama aktivite atışı olmamıştır. Karbon kaynağı olarak % 1'lik yerelması ekstratı kullanıldığında ise 1.101 U/ml'lik aktivite elde edilmiştir. Üretim ortamında bulunan yerelması miktarını artırıldığında inülinaz aktivitesinde de artış gözlemlenmiştir.

Glukoz, früktoz ve sukrozun tek başlarına ya da inülinle kombine kullanımları sonucu inülinaz yapımının baskılanması ortaya çıkmaktadır (Vandamme ve Derycke, 1984, Allais vd., 1987). Serbest şekerlerin düşük yoğunlukta olduğu ortamlar yada yavaş metabolizma olan polisakkaritlerin yüksek olduğu ortamlar inülinaz üretimini destekler (Derycke ve Vandamme, 1984) fakat serbest şekerlerin düşük konsantrasyonlarının (0.1%) görüldüğü ortamlarda organizmalarının hızlı büyümesinin uyarıcı etkisi inülinaz sentezini destekler.

Nitekim mantarlardaki inülinaz sentezi serbest şekerlerin kullanım hızı tarafından kontrol edilen katabolik represyona bağlıdır (Viswanathan ve Kulkarni, 1995).

Karbon kaynağı olarak çeşitli bitki yumruları, artıkları, posası ve melası kullanılması ve bunların inülinaz aktivitesine olan etkisi birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir.

Kango N,(2008), inülinaz üretim ortamında karbon kaynağı olarak kara hindiba bitkisinin köklerinin kullanarak elde edilen ekstraktı kullanmıştır. Ertan vd., (2002) ise yerelması tozunu kullanmışlardır.

Mazutti vd., (2010) karbon kaynağı olarak şekerkamışı melasını ortamlarına eklemişlerdir. Yine Singh ve Gill, (2006) karbon kaynağı olarak geven bitkisinin köklerini kullanmışlardır.

Buhar difüzyonunu içeren tekrarlarla saf inülin eldesi meşakatli ve maliyetli olmasından dolayı işlenmemiş inülin kullanımı proseslerin maliyetini düşürmek açısından etkili bir yoldur (Vogel M, 1993). Çalışmamızda da görüldüğü gibi karbon kaynağı olarak yerelması ekstraktı, inülin yerine kullanılabilir alternatif bir yoldur.

Karbon kaynaklarının inülinaz aktivitesi üzerine olan etkisinin araştırıldığı diğer çalışmalarda da genellikle maksimum aktivite inülin içeren ortamda gerçekleşmiştir. Örneğin; Gao vd., 2008, Selvakumar vd., 1999, Gill vd., 2003, Sheng vd., 2007, Gong vd., 2007 araştırmacıları karbon kaynağı olarak inülini kullandıkları ortamda maksimum inülinaz aktivitesi gözlemlemişlerdir.

Küfler tarafından üretilen inülinaz için sukroz ve inülin diğer karbon kaynaklarına göre daha çok tercih edilen substratlardır (Kango vd., 2011). Örneğin; Bernardoo vd., (2005) *K.marxianus*' dan elde ettikleri inülinaz enzimi aktivitesi 176 U/ml'dir ve karbon kaynağı olarak sukrozu kullanmışlardır.

Üretim ortamına eklenen azot kaynaklarının *A.wentii* inülinazına olan etkileri araştırıldığında; kontrol değeri 1.182 U/ml olarak ölçülmüştür. Kontrol grubunun üretim ortamı içeriği 0.4 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ve 0.2 mM NH_4NO_3 'dan oluşmaktadır. Azot kaynakları içinde maksimum aktivite $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%1)'lik ortamda ölçülmüştür(3,456 U/ml). En düşük aktiviteler pepton (%0.5) (0,252 U/ml) ve yeast ekstrakt (%0.5)(0,305 U/ml) içeren ortamlarda gözlenmiştir. NH_4Cl (%0.5) içeren ortamda inülinaz aktivitesinde artış oranı oldukça düşük olarak gözlenirken (1,247 U/ml) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (% 0.5) içeren ortamdaki inülinaz aktivitesi kontrol grubundan düşük olarak hesaplanmıştır (0.996 U/ml).

Diğer araştırmacıların çalışmalarına baktığımızda; Kumar vd.,(2005) en yüksek aktiviteyi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren ortamda gözlemlenmiştir. Chen vd., (2009) *A.ficuum* JNSP-06 inülinazında maksimum aktiviteyi % 2 yeast ekstrakt ve 0.5 %'lik $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ içeren ortamda elde etmişlerdir. Kumar vd., (2011) ise azot kaynağı olarak en uygun % 0.5 et ekstrat ve % 0.2 NaNO_3 içeren ortamda belirlemişlerdir.

Skowronek ve Fiedurek, (2003) ise azot kaynağı olarak maya eksratı, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ içeren karışımda en yüksek aktiviteyi elde etmişlerdir. Naidoo vd., (2009). Ayychamy vd., (2007) ise azot kaynağı olarak % 2 maya eksratı, 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ve 0.2 % $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ içeren üretim ortamında maksimum aktivite ölçümü yapılmıştır.

Bu durum her bir fungal türün inülinazının optimum üretimi için spesifik bir azot kaynağını tercih ettiğini göstermektedir (Kochhar vd., 1999).

Özet olarak çalışmanın birinci bölümünde *A. wentii*'den kaba inülinaz üretiminde, üretim süresinin 72 saat, inülinaz üretimi için en uygun substratın % 3'lük yerelması eksratı ve üretim ortamı pH'sı 6.0 ve üretim ortamının sıcaklığı 25 °C olarak bulunmuştur. Ortama eklenen azot kaynaklarından maksimum aktivite ölçümü $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (% 1)'lik ortamda ölçülmüştür (3,456 U/ml).

A.wentii'den elde edilen kaba inülinaz enziminin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmalarda optimum inkübasyon pH'sı 6.0 olarak bulunmuştur (Şekil 4.4.).

Farklı araştırmacılar tarafından yapılan deneylere baktığımızda; Zhang vd., (2009) *P. guilliermondii*' den elde ettikleri ve daha sonraki basamakta saflaştırılmış inülinaz enziminin optimum inkübasyon pH'sını 6.0 olarak bulmuşlardır.

Fakat *Bacillus polymyxa* MGL21 dan elde edilen ekzo-inülinaz ise optimum pH'ı 7 olarak gözlemlenmiştir. Genellikle bakterilerden elde edilen ekzo-inülinazlar maya ve mantarlara göre inkübasyon pH'sı daha yüksek olarak not edilmiştir. Fakat Tsujimoto vd., (2003) bakteriden elde ettikleri ekzo-inülinaz için optimumum inkübasyon pH'sını yaklaşık 6.0 olarak bulmuşlardır.

*Penicillium sp.*TN-88 den elde edilen endoinülinaz için uygun inkübasyon pH'sının araştırıldığı bir çalışmada maksimum aktivite ölçümü pH 5.2'de gözlemlenmiştir (Nakamura vd., 1997). *Artrobacter sp.* S37 den elde edilen endo inülinaz için ise inkübasyon pH'sı optimum 7.5 olarak not edilmiştir (Kang vd., 1998).

Bu verilere dayanarak bakterilerden elde edilen endo inülinazların mantarlardan elde edilen endo inülinazlara göre daha yüksek pH'da inkübasyon sonucu maksimum aktivite gözlemlenmiştir (Chi vd., 2009). Fakat *Pseudomonas* sp.'den elde edilen diğer bir endoinülinaz için ise optimum inkübasyon pH'sı 5.5 olarak bildirilmiştir (Kim vd., 2008).

Maya ve mantarlardan saflaştırılan inülinaz enziminin optimum pH aralığı 4.5-6.0 olarak gözlenmiştir (Sheng vd., 2008, Selvakumar ve Pandey, 1999; Ge ve Zhang, 2005, Singh ve Gill., 2006).

İnkübasyon sıcaklığının inülinaz aktivitesi ile ilişkisinin incelendiği araştırmada maksimum aktivitenin 35 °C'de olduğu gözlenmiştir. Zhang vd., (2009) ise *P. guilliermondii*'ni inülinazın optimum inkübasyon sıcaklığını 60 °C olarak gözlenmişlerdir.

Diğer araştırmacıların yaptıkları çalışmalara baktığımızda; *P. guilliermondii*'den elde edilen inülinaz için en yüksek aktivitenin ölçüldüğü inkübasyon sıcaklığının ise 60 °C olduğu not edilmiştir (Sheng vd., 2008). Toprak mikroorganizmalarından elde edilen inülinazları genellikle 50 °C'nin altında maksimum aktivite göstermektedirler. Genellikle optimum sıcaklık 30 -55 °C arasında bir değer olmaktadır (Chi vd., 2009).

Mantar ve bakterilerden elde edilen endo-inülinazlar genellikle 50-55 °C'de maksimum aktivite göstermişlerdir (Nakamura vd., 1997, Kang vd., 1998, Kim vd., 2008).

Literatürde enzimin katalitik etkinliğinin bir ölçüsü olarak V_{max} / K_m değeri kullanılmıştır. V_{max}/K_m değerinin endüstriyel uygulamalarda en etkili enzimin seçimi için kullanışlı bir parametre olduğunu rapor etmişlerdir (Ortega vd., 2004).

Yapılan deneyler sonucu inülinaz aktivitesi optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla K_m değeri $0,1 / 10^{-3}$ M ve V_{max} değeri ise 6,09 U/ mmol/ml/dk olarak belirlenmiştir.

Bir enzim için K_m maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonunu gösterir. K_m değeri enzimin substrata olan ilgisini ifade eder ve bu değer ne kadar küçükse enzimin substrata ilgisi o kadar yüksektir.

Metabolizmada düşük K_m 'e sahip (yüksek affinitedeki) enzimler büyük önem taşır.

Düşük K_m değerleri 10^{-6} M olarak verilir. Veya hatta daha da küçük $10^{-7}, 10^{-8}$ M olabilir. Düşük affinitedeki yüksek K_m 'e sahip enzimler ise metabolizma için az önemlidir. Bu K_m değerleri $1/100 \text{ M} > 10^{-2}$ veya 10^{-1} M olarak verilir.

Bu konu ile ilgili diğer çalışmalara baktığımızda; Arand vd., (2002) *A. awamori* K_m değerini 0,003 mM olarak bulmuşlardır. Mutanda vd., (2009) ise *A. ficuum* ile yaptıkları araştırmalarda K_m 4.75 mM V_{max} değerini $833.3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bulmuşlardır. Wanker vd., (1995) *Bacillus subtilis* ile yaptıkları araştırmalarda K_m değerini 6.8 mM V_{max} değerini ise 2.17 nmol s^{-1} olarak bulmuşlardır.

İnülinaz enziminin pH kararlılığını araştırmak üzere farklı pH değerlerinde inülinaz enzimini oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve aktivite ölçümü yapıldığında 4-6 pH aralığında aktivite kaybı azdır (Aktivite kaybı: % 7,8), aktivitesini % 92.2 oranında koruduğu, pH 7'den sonra aktivitede düşüş olduğu gözlenmiştir (Aktivite kaybı: % 14.9).

Zhang vd., (2009) *P. guilliermondii*' den elde ettikleri inülinaz enzimin pH kararlılığını araştırmak için 4-9 pH aralıklarında 2 saat inkübasyon sonrası aktivite ölçümü yaptıklarında, pH 6-7 aralığında aktivitesinin %95.1 'ini koruduğu ve 7'den yüksek pH değerlerinde ise önemli miktarda aktivite kaybının olduğu belirtmişlerdir.

Treichel vd., (2009) *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 ile yaptıkları çalışmada inülinaz enziminin pH kararlılığını araştırmak için farklı pH aralıklarında 50°C 'de farklı sürelerde enzimi bekletip aktivite ölçümü yaptıklarında pH 4.4'de 82 saat sonrasında aktivite ölçümü yaptıklarında 31.7 % kayıp olduğunu gözlemlemişlerdir.

pH 4.0 ise aktivitede %35.2 kayıp olduğu not edilmiştir. Mikrobiyal inülinazların enzimatik reaksiyonlarında pH stabilitesi araştırıldığında genellikle enzimin 3.5-6.5 arasında aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir (Zittan L., 1981). Cazetta vd., (2005) *K. marxianus* ile yaptıkları araştırmada optimum pH'ı 4.0 olarak not etmişler ve bu pH' üzerindeki reaksiyonlarda aktivite kaybının arttığı ve 10.5 pH ' da ise enzim aktivitesi bulunmadığını belirtmişlerdir.

Yüksek sıcaklıkların inülinaz aktivitesine olan etkisini araştırmak üzere farklı sıcaklıklarda (30-80 °C) 20 dakika bekletilip daha sonra inülinaz aktivitesi ölçümü yapıldığında *A.wenti* inülinazı 80 °C'de aktivitesini % 62.3 korumaktadır.

Konu ile ilgili diğer çalışmalara baktığımızda ; Lima vd., (2009)' nın *K.marxianus* CCMB 322 ile yaptığı çalışmada 80 °C'de enzim aktivitesini tamamen kaybetmiştir.

Saflaştırılmış enzim ile yapılan çalışmalarda ; Sharma ve Gill., (2007) *Streptomyces* sp.türünün ürettiği inülinaz enzimini araştırmalarında kullanmışlar ve *Streptomyces* sp. inülinazının 70 °C'de 6 saat bekletilip aktivite ölçümü yaptıklarında inülinaz aktivitesinde önemli bir kayıp görülmemiştir. 12 saat sonucunda ise %75 aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir. 80 °C'de ise inülinaz aktivitesinin hızla azaldığı not edilmiştir (50 %). *Scytalidium acidophilum* (Kim vd., 1994)' dan üretilen inülinaz enziminin iyi bir termostabil enzim olduğu belirtilmiştir ve enzim 60 °C'de 6 saatin sonunda aktivitesinin % 95'i korumuştur.

Kumar vd., (2011) *A.niger* ile yaptıkları çalışmalarında farklı sıcaklıklarda (20-80 °C) saflaştırılmış inülinaz enzimini 30 dakika bekletip aktivite ölçümü yaptıklarında maksimum aktivitenin 60 °C'de olduğunu gözlemlemişlerdir ve 80 °C'de aktivitenin yaklaşık %60 oranında korunduğunu not etmişlerdir.

Chen vd., (2009)'nın *A.ficum*'dan elde edilen saflaştırılmış inülinazın termostabilitesini belirlemek için farklı sıcaklıklarda (40-90 °C) bir saat bekletip daha sonra kalan aktiviteyi belirlemek için ölçüm yaptıklarında 50 °C'de %80 aktivitesini koruduğu ve 60 °C'de ise aktivitesinde % 60 azalma olduğu gözlemlenmiş fakat 80 °C'de 1 saat inkübasyon sonucu aktivitesinin tamamını yitirdiği tespit edilmiştir.

Deniz funguslarından olan *C.aureus* G7'den saflaştırılan inülinaz enziminin 65 °C'de inkübasyona bırakıldığında oldukça stabil olduğu gözlemlenmiştir (Sheng vd., 2008).

Sonuç olarak inülinaz enzimi endüstriyel amaçlarda kullanılabilen bir enzim kaynağıdır. İnülinaz enziminin kullanımı ile ortaya çıkan reaksiyon ürünleri gıda sanayiinden çeşitli amaçlarda kullanılabilmektedir ayrıca substrat olarak kullanılan maddeler atık maddelerin değerlendirilmesi için önemli bir yoldur. Çalışmamızda daha önce araştırılmamış olan *A. wentii* inülinazının çeşitli özellikleri belirlenmiştir. Yaptığımız araştırmalar ve deney sonuçları enzim saflaştırılması gibi ilerleyen çalışmalar için basamak oluşturmaktadır. *A.wentii* inülinazı tarımsal ürünlerden saf fruktoz hazırlanmasında yeni ve değerlendirilebilir bir kaynak olabilir.

6. Kaynaklar

- Abacı Ö., Hakiki Uztan A.**, “*A.fumigatus*’un Virulans faktörleri”, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 06, 01, 17-20, (2008).
- Akça İ., Karşlı M.A.**, “Yerelması Hasılına Katılan Melas ve Formik Asit Katkısının Silaj Kalitesi ve Sindirilebilirliği Üzerine Etkileri”, Y.Ü.Vet.Fak., (2009)
- Alexiou H., Franck A.** 2008 “Prebiotic inulin-type fructans: nutritional benefits beyond dietary fibre source, 33, 227–233
- Allais J.J., Hoyos-Lopez and Baratti J.C.**, “Characterization and Properties of an Inulinase from a Thermophilic Bacteria”, Carbohydr. Polym. 7, 277-290, (1987)
- Altınışık M.**, “Karbonhidrat Metabolizması Bozukluklarına Biyokimyasal Yaklaşım” , Adnan Menderes Üni. Tıp Fak. Der., 11, 1, 051-059, (2010)
- Apan H.**, “Soğanın Çevre İstekleri”, Atatürk Üni., Cilt 3, sayı 1, sayfa 169-171,(1971)
- Arand M., Golubev A.M., Neto J.R.B, Polikarpov I., Wattiez R and Korneeva O.S.**, “Purification, characterization, Gene Cloning and Preliminary X-ray Data of the Exo-Inulinase from *Aspergillus awamori*”, Biochemical Journal, 362, 131-135, (2002)
- Aravind N., Sissons M.J., Fellows C.M., Blazek J. and Gilbert E.P.**, “Effect of İnulin Soluble Dietry Fibre Addition on Technological, Sensory and Structural Properties of Durum Wheat Spaghetti”, Food Chemistry, 132, 993-1002, (2012)
- Artık N., Mert İ. and Bayındırlı L.**, “Karbonhidratlar, Mısır Şekeri ve Gıda Endüstrisinde Kullanımı”, 978-605-89273-2-2, 44-61,(2011).
- Asan A., Ekmekçi S.**, “Topraktan İzole Edilen Bazı *Aspergillus* Türlerinin Kolonial ve Morfolojik Özelliklerine Katkılar”, On Lab On- line Mikrobiyoloji Dergisi, 02, 01, 12-15, (2004).
- Aşan M., Özcan N.**, “Kanatlı Beslemede İnülinin Prebiyotik Olarak Önemi, Hayvansal Üretim”, 47(2), 49-50, (2006).
- Aydın N.**, 21 ANKEM Klinikler ve Tıp Bilimleri Kongresine Sunu, s.2, (2003).
- Ayyachamy M., Khelawan K., Pillay D. and Permaul Singh S.**, “Production of Inulinase by *Xantahomonas camprestris* pv Phaseoli Using Onion (*Allium cepa*) and garlic(*Allium sativum*) Peels in Solid State Cultivation”, Letters in Applied Microbiology, 45, 439-444, (2007).

Bailey J.S., “Control of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry production”. A. summary of work at Russel Resarch Center. *Poult. Sci.*, 72: 1169-1173, (1991).

Baysal G., Sukan Ş.S. and Vassilev N., “Production and Properties of Inulinase from *Aspergillus niger*”, *Biotechnology letters*, 16, 3, 275-280, (1994)

Basım P., “Fruktoz-stearatın T-butanol:DMSO çözücü karışımı ve iyonik sıvılarda lipaz katalizli sentezi”, (2009).

Bernardoo O., Yopez S. and Francisco M.F., 2005. “Agitation, Aeration and Shear Stress as Key Factors in Inulinase Production by *Kluyveromyces marxianus*”, *Enzyme Microb.Technol.*, 36:717–724, (2005)

Bruhwyler J., Carreer F., Demanet E. and Jacobs H., “Digestive Tolerance of Inulin-Type Fructans: a Double-blind, Placebo-controlled, Cross-over, Dose-ranging, Randomized Study in Healthy Volunteers”, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(2), 165-175, (2009)

Cazetta ML., Martins PMM., Monti R and Contiero J, “Yacon extract as substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *Bulgaricus*”, *J Food Eng.*, 66:301-305, (2005).

Chen H.Q., Chen X.M., Li Y., Wang J., Jin Z.Y., Xu X.M., Zhao J.W., Chen T.X. and Xie Z.J., “Purification and characterisation of exo- and endo-inülinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06”, *Food Chemistry*, 115, 1206-1212, (2009).

Chi Z., Chi Z., Zhang T., Liu G. and Yue L., “ Inülinase-expressing microorganisms and applications of inülinases”, *Microbiol Biotechnol*, 82, 211-220, (2009).

Crow D., “Inulin-A comprehensive Scientific Review.http://members.shaw.ca/duncancrow/inulin_review.html, (2005).

Cruz V.D., Belote J.G., Belline M.Z. and Cruz R., “Production and action pattern of inulinase from *Aspergillus niger*-245: hydrolysis of inulin from several sources”, *Revista de Microbiol*, 29:301–306, (1998).

Cui W., Wang Q., Zhang F., Zhang S.C., Chi Z.M. and Madzak C., “Direct conversion of inülin into single cell protein by the *Yarrowia lipolytica* carrying inulinase gene”, *Process Biochemistry*, 46, 1442-1448, (2011).

Danial E.N., Elnashar M.M.M. and Awad G.E.A., “Immobilized Inulinase on grafted Alginate Beads Prepared by the One-Step and the two-steps Methods”, *Ind. Eng. Chem.*, 49, 3120-3125, (2010).

Debski B., Kuryl T., Gralak M.A., Pierzynowska L. and Drywien M., “Effect of inülin and oligofruktose enrichment of the siet on rats suffering thiamine deficiency”, *Animal Physiology and Animal Nutriön*, 95, 335-342, (2011).

Derycke D.G., Vandamme E.J., “Production and properties of *A. niger* inulinase, J. Chem. Technol. Biotechnol., 34 , 45-51, (1984).

Direkel Ş, “ Klinik Örneklerde küf Mantarlarının Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması ve Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi”, s.5, (2010).

Doaa A. R. Mahmoud, El-Sayed M. E. Mahdy, Wafaa Gh. Shousha, Hala W. Refaat and Ahmed F. Abdel-Fattah., 2011. “Raw Garlic as a New Substrate for Inulinase Production in Comparison to Dry Garlic”, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(10): 453-462, 2011

Domsch K.H., Gams W.A., “Compendium of soil Fungi”, London Acedemic Press, (1980).

Ekinci F., “*A. Alternata* İnülinazının Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, sayfa no:2. (2002).

Ertan, F., Aktac, T., Kabolu A.C., Ekinci F. and Bakar E., “Determination of optimum cultivation conditions on the production of inulinase from *Rhizoctonia solani*”, *Pak. J. Biol. Sci.*, 6:1386–1388, (2003).

Ertan F., Ekinci F. and Aktac T., “Production of inulinases from *Penicillium spinulosum*, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and *Trichoderma viride*”, *Pak. J. Biol.Sci.*, 6:1332–1335, (2002).

Gao L., Chi Z., Sheng J., Wang L., Li J. and Gong F., “Inulinase-producing Marine Yeasts: Evaluation of their Diversity and Hydrolysis by Their Crude Enzymes”, Springer Science & Business Media, 54, 722-729, (2007).

Gao W., Bao Y., Liu Y., Zhang X., Wang J. and An L., “Characterization of thermo-stable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* Y7”, *Appl. Biochem.Biotechnol.*, 157:498–506, (2008).

Ge X.Y., Zhang W.G., “Effects of octadecanoylsucrose derivatives on the production of inulinase by *Apergillus niger* SL-09” , *Word Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21:1633-1638, (2005).

Gill P.K., Sharma A.D., Harchand R.K. and Singh P., “Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain”, *Biores.Technol.*, 87:359–362, (2003).

Gill K.P., Manhas K.R. and Singh P., “Hydrolysis of İnülin by Immobilized Thermostable Extracellular Exoinulinase from *Aspergillus fumigatus*”, *Journal of Food Engineering* , 76, 369-375, (2006).

Gill P.K., Manhas R.K. and Singh P., “Comparative analysis of thermostability of extracellular inulinase activity from *Aspergillus fumigatus* with commercially available (Novozyme) inulinase”, *Bioresource Technology*, 97, 355-358, (2006).

Gomi K., Machida M., “*Aspergillus*”, sayfa no:1, (2010).

Goosen C., Maarel J.M.J.E.C.V.D., Dijkhuizen L., “Exo-inulinase of *Aspergillus niger* N402: A hydrolytic enzyme with significant transfructosylating activity”, *Biocatalysis and Biotransformation*, 26(1-2), 49-58, (2009).

Gupta A.K., Gill A. and Kaur N., “A HgCl₂ insensitive and thermally stable inulinase from *Aspergillus oryzae*”, *Phytochemistry*, 0031-9422 (97)00854-6, (1997).

Gülmez M., Güven A., “Fonksiyonel Gıdalar ve Sağlıkla İlişkisi”, *Kafkas Üni. Vet. Med. J.*, 8(1):83-89, (2002).

Haki G.D., Rakshit S.K., “Developments in industrially important thermostable enzymes”, *Bioresource Technology*, 88, 1, 17-34, (2002).

Hasan H.A.H., “Studies on Toxicogenic Fungi in Roasted Foodstuff and Halotolerant Activity of Emodin Producing *Aspergillus wentii*”, *Folia Microbiol.*, 43 (4), 383-391, (1998).

Ito H., Takemura N., Sonoyama K., Kawagishi H., Topping D.L., Conlon M.A and Morita T., “Degree of polymerization of Inulin – Type fructans differentially affects number of lactic acid bacteria, intestinal immune functions, and immunoglobulin A Secretion in the Rat Cecum”, *American Chemical Society*, 59, 5771-5778, (2011).

Ito H., Wada T., Ohguchi M., Sugiyama K., Kiriya S. and Morita T., “The Degree of Polymerization of Inulin-Like Fructans Affects Cecal Mucin and Immunoglobulin A in Rat”, *Journal of Food Science*, 73, 3, (2008).

Iwaza K., Hasegawa T., “Tosylated and azidated inulins as key substrates for further chemical modification to access inulin-based advanced materials: An inulin-based glycocluster”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 1189-1, (2012).

Jenkins D.J.A., Kendall C.W.C. and Vuksan V., “Inulin, oligofructose and intestinal function”, *J. Nutr.*, 129: 1431-1433, (1999).

Jing W., Zhengyu J., Bo J. And Xueming X., “Separation and identification of exo and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*”, *Curr. Microbiol.*, 47:109–112, (2003).

Kango N., “Production of Inulinase Using Tap Roots of Dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*”, *Journal of Food Engineering*, 85, 473-478, (2008).

Kango N, Jain S.C., “Production and properties of Microbial Inulinases: Recent Advances, Food Biotechnology”, 25:165-212, (2011).

Kang S., Chang Y.C., Oh S.J. and Kim S., “Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter sp.*”, Biotechnology Letters, 20, 10, 983-986, (1998).

Kantarcioğlu A.S., Yücel A., “*Aspergillus* Cinsi Mantarlar ve İnvaziv Aspergilloz: Mikoloji, Patogenez, Laboratuvar Tanımı, Anitifungallere Direnç ve Duyarlılık Deneyleri”, Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 34,3,140-157, (2003).

Karademir A., Akgül M. and Tutuş A., “Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1)”, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 5(1), (2002).

Kıran Eren Ö., Çömlekçioğlu U. and Dostbil N., “Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstride Kullanım Alanları”, KSÜ Fen ve Müh. Dergisi, 9(1)12, (2006).

Kıran Ö., “Kozan Yöresi Flarasındaki Tıbbi Bitkiler ve Bunların Halk Tarafından Kullanılışı”, (2006).

Kim M. K., Kim Y.H., Kim H.R., Kim B. I., Byun S.M. and Uhm T., “Thermal stability of an acidic inulinase from *Scytalidium acidophilum*”, Biotechnology Letters, 16, 965-966, (1994).

Kim K.K., Nascimento A.S., Golubev A.M., Polikarpov I., Kim C-S., Kang S. and Kim S., “Catalytic mechanism of inulinase from *Arthrobacter sp.* S37”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 371,600-605, (2008).

Kim W.Y., Byun S.M. and Uhm T.B., “Hydrolysis of inülin from *Jerusalem* artichoke by inulinase immobilized on amino ethyl cellulose”, Enzyme Microb. Technol., 4, 239-244, (1982).

Klich.M.A., “Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter”, (2002).

Kochhar A., Gupta A.K. and Kaur Narinder., “Purification and immobilisation of inülinase from *Aspergillus candidus* for producing”, Journal of the Science of Food and Agriculture, 79,549-554, (1999).

Kolida S., Tuohy K. and Gibson G.R., “Prebiotic effects of inulin and oligofructose”, British Journal of Nutrition, 87(2): 193-197, (2002).

Kosinski Michael J. , Ursula Rinas and James E. Bailey, “Proteolytic response to the expression of an abnormal -galactosidase in *Escherichia coli*” , Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 37, Number 3, 335-341, (1992).

Kozakiewicz Z., “*Aspergillus* species on stored products”, sayfa no: 161, (1989).

Kumar G.P., Kunamneni A, Prabhakar T, Ellaiah P, “Optimization of process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Aspergillus niger* AUP19”, Word Journal of Microbiology & Biotechnology, 21, 1359-1361, (2005).

Kumar V.V., Premkumar M.P., Sathyaselvabala V.K., Dineshkirupha S., Nandagopal J. and Sivanesan S., “*Aspergillus niger* exo-inulinase purification by three phase partitioning”, Eng. Life. Sci., 11, 6, 607-614, (2011).

Liebl W, Brem D. and Gotschlich A., “Analysis of the gene for β -fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga Maritima* and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*”, Microbiol. Biotechnol., 50, 55-64, (1998).

Lima D.M., Oliverira R.Q., Uetanabaro A.P.T., Neto G., Rosa A.C. and Assis A.S., “Thermostable inulinases secreted by yeast and yeast-like strains from the Brazilian semi-arid region”, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 60(S7):63-71, (2009).

Li Y., Liu G.L., Wang K., Chi Z.M. and Madzak C., “Overexpression of the endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp.S37 in *Yarrowia lipolytica* and characterization of the recombinant endo-inulinase”, Journal of Molecular Catalysis B, 74, 109-115, (2012).

Makino, Y., Treichel H., Mazutti M.A., Maugeria F. and Rodrigues M.I., “Inulinase bio-production using agroindustrial residues: screening of microorganisms and process parameters optimization”, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 84:1056–1062, (2009).

Markosyan A.A., Abelyan L.A., Adamyan M.O., Ekazhev Z.D., Akopyan Zh.I. and Abelyan V.A., “Production of Fructooligosaccharide Syrup from Sucrose in Combination With Palatinose and Trehalose”, Biochemistry and Microbiology, 43, 4, 383-389, (2007).

Mazutti M.A., Zobot G., Boni G., Skovronski A., Oliveria D., Rodrigues M.I., Treichel H. and Maugeri F., “Optimization of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor”, *J Chem Technol Biotechnol*, 85,109-114, (2009).

Mazutti M.A, Skovronski A. , Boni G., Zobot G., Luccio M., Silva M.F., Oliveira D, Filho F.M., Rodrigues M.I. and Treichel H., “Partial Characterization of Inulinases Obtained by Submerged and Solid-State Fermentation Using Agroindustrial Residues as Substrates”: A Comparative study, *Biochem Biotechnol*, 160:682-693, (2010).

Moriyama S., Akimoto S., Suetsugu H., Kawasaki N., Nakamura T. and Ohta K., “Purification and properties of an extracellular exoinulinase from *Penicillium* sp. strain TN-88 and sequence analysis of the encoding gene”, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 66, 1887-1896, (2002).

Mughal M.S., Ali S., Ashiq M. and Talish A.S., “Kinetics of an extracellular exoinulinase production from a 5-fluorocytosine resistant mutant of *Geotrichum candidum* using two-factorial design”, *Bioresource Technology*, 100, 3657-3662, (2009).

Mukherjee K. and Sengupta S., “Purification and properties of a non-specific β -fructofuranosidase(inulinase) from the mushroom *Panaelus papillonaceus*”, *Cn. J. Microbiol.*, 33, 520-524, (1987).

Mutanda T., Wilhelmi B., Whiteley., “Controlled Production of Fructose by an Exoinulinase from *Aspergillus Ficum*” *Biochem Biotechnol*, 159:65-67, (2009).

Nagem R.A.P., Rojas A.L., Golubev A.M., Korneeva O.S., Eneyskaya E.V., Kulminskaya A.A., Neustroev K.N. and Polikarpov I., “Crystal Structure of Exoinulinase from *Aspergillus awamori*:The enzyme Fold and StructuralDeterminants of Substrate Recognition”, *J. Mol. Biol.* , 344, 471-480, (2004).

Nakamura T., Shitara A., Matsuda S., Matsuo T., Suiko M. and Ohta K., Production , purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose”, *J Ferment Bioeng*, 84:313-318, (1997).

Naidoo K., Ayyachamy M., Permaul K. and Singh S., “Enhanced fructooligosaccharides and inulinase production by *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* KM 24 mutant”, *Bioproc. Biosyst. Eng.*, 32:689–695, (2009).

Niness K.R., “Inulin and oligofructose: What are they”, *J.Nutr.*, 129: 1402-1406, (1999).

Nguyen Q.D., Rezessy-Szabo J.M., Czukor B. and Hoschke A., “Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endoinulinase”, *Process Biochemistry*, 46,298-303, (2011).

Ortega N., Diego S., Mateos M.P. and Busto M.D., “Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification”, *Food Chemistry*, 88:209-217, (2004).

Özçelik S., Sümer Z., Değerli S., Ozan F. and Sökmen A., “Sarımsak (*Allium Sativum*) Özüü Skolosidal Ajan Olarak Kullanılabilir Mi?”, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31, 4, 318-321, (2007).

Önal S., “Moleküler Biyoloji”, 1170, 248, (2007).

Öztürk H., “Effects of inulin on Rumen Metabolism in Vitro”, Ankara Üniv. Vet. Fak. Der.,55,79-82, (2008).

Park J.P., Yun J.W., “Utilization of chicory roots for microbial endoinulinase production”, *Lett. Appl. Microbiol.* 33:183–187, (2001).

Pessoni R.A.B., Figueiredo R. and Braga M.R., “Extracellular inulinases from *Penicillium janczewskii* fungus isolated from rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteraceae)”, *Journal of applied Microbiology*, 87, 141-147, (1999).

Pitt J.L., Hocking and A.D., “Fungi and Food Spoilage”, Blackie Academic Professional., (1997).

Prata M.B., Mussatto S.I., Rodrigues L.R. and Teixeira J.A., “Fructooligosaccharide production by *Penicillium expansum*”, *Biotechnol Lett*, 32:837-840, (2010).

Ren J., Liu J., Dong F. and Guo Z., “Highly efficient synthesis and antioxidant activity of O-(aminoethyl) inulin”, *Carbohydrate Polymers*, 83, 1240-1244(2011).

Ricca E., Calabro V., Curcia S., Basso A. and Gardassi L Lorio., “Fructose Production by Inulinase Covalently Immobilized on Sepabeads in Batch and Fluidized Bed Bioreactor”, *Department of Engineering Modeling*, 11, 1180-1189, (2010).

Roberfroid M., 1993. “Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects”, *Food sci*, 33: 103-48, (1993).

Roberfroid, M.B., “Prebiotics and probiotics: Are they functional foods?” *Am. J. Clin. Nutr.*, 71 (Suppl.): 1682-1687., (2000).

Roberfroid M.B., “Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients” *American Society for Nutrition*, (2011).

Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. and Filtenborg O., “Introduction to Food and Air Borne Fungi”, *The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures*, (2000).

Sangeetha P.T, Ramesh M.N and Prapulla S.G., “Fructooligosaccharide production using transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202” , *Process Biochemistry* ,40,1085-1088, (2004).

Santos A.M.P., Maugeri F., “Synthesis of Fructooligosaccharides from Sucrose Using Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*” *Food Technol. Biotechnol.*, 45(2), 181-186, (2007).

Selvakumar P., Pandey A., “Isolation and Characterization of inulinase producing strains from Rhizosphere soil”, *Journal of Scientific and Industrial Research* 57, 621-624, (1999).

Sheng J., Chi Z., Li J., Gao L. and Gong F., “Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by crude inulinase” *Proc.Biochem.*, 42: 805–811, (2007).

Sheng J., Chi, Z., Gong F., Li, J., “Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 144: 111–121, (2008).

Sugatani J., Osabe M., Wada T., Yamazaki Y., Takahashi T., Ikari A. and Mwa M., “Comparison of enzymatically synthesized inulin, resistant maltodextrin and clofibrate effect on biomarkers of metabolic disease in rat fed a high-fat and high-sucrose diet”, *Eur J Nutr.*, 47:192-200, (2008).

Sharma D.A, Gill K.P., “Purification and Characterization of Heat-stable Exo-inulinase from *Streptomyces* sp” , *Journal of Food Engineering*, 79,1272-1178, (2007).

Sharma D.A, Gill K.P., Bhullar S.S. and Singh P., “Improvement in inulinase production by simultaneous action of physical and chemical mutagenesis in *Penicillium purpurogenum*”, *Word Journal of Microbiology &Biotechnology*, 21:929-932, (2005).

Singh P., Gill P.K., “Production of inulinases: Recent Advances”, *Food Technol. Biotechnol*, 44(2) 152-162, (2006).

Skowronek M., Fiedurek J., “Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production”, *Journal of Applied Microbiology*, 95, 686-692, (2003).

Skowronek M., Fiedurek J., “Inulinase biosynthesis using immobilized mycelium of *Aspergillus niger*” , *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 162-167, (2005).

Spizzirri U.G., Altimari I., Puoci F., Parisi O.I., Lemma F. and Picci N., “Carbohydrate Polymers” 84, 517-523, (2011).

Swanton C.J., “Ecological Aspects of Growth and Development of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)”, PhD Thesis, The University of Western Ontario, Canada, sn. 423., (1986).

Sümer S., “Genel Mikoloji” 232-297-304, (2006).

Takeuchi J., Nagashima T., “Preparation of dried chips from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tubers and analysis of their functional properties” *Food Chemistry*, 126, 922-92, (2011).

Tamura A., Mita Y., Shigeatsu N., Hara H. and Nishimura N., “Different effects of difructose anhydride III and inulin-type fructans on caecal microbiota in rat”, *Archives of Animal Nutrition*, 60(5), 358-364, (2006).

Treichel, H., Mazutti, M.A., Maugeri, F., Rodrigues, M.I., “Use of a sequential strategy of experimental design to optimize the inulinase production in a batch bioreactor”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 36:895–900, (2009).

Trivedi S., Divecha J., Shah A., “Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates” *Carbohydrate Polymers*, 6667-8, (2012).

Tsujimoto, Y., Watanabe, A., Nakano, K., Watanabe, K., Matsui, H., Tsuji, K., Tsukihara, T., Suzuki, Y. “Gene cloning, expression, and crystallization of a thermostable exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62:180–185, (2003).

Tzean S. S., Chen J. L., Liou G. Y., Chen C.C. and Hsu W.H., “*Aspergillus* and Related Teleomorphs from Taiwan. Hsinchu, Taiwan R.O.C.”, *Food Industry Research and Development Institute.*, (1990).

Uhm T.A, Byun S.M., “Thermal stability of the multiple charge isoforms of inulase from *A. niger*”, *Biotech-nol. Lett.* 9, 287-290, (1987).

Vandamme E.J., Derycke D.G., “Microbial inulinases: Fermentation process, properties and applications”, *Adv. Appl. Microbiol*, 29, 139-176, (1984).

Vijayaraghavan K., Yamini D., Ambika V. and Sowdamini S.N., “Trends in Inulinase Production – a review”, *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(1):67-77, (2009).

Viswanathan P., Kulkarni P.R., “Effects of polyols on heat inactivation of *Aspergillus niger* van Teighem inulinase, *Lett. Appl. Microbiol.* 21 ,282-284, (1995).

Vogel M., “A process for the production of inulin and its hydrolysis products from plant material”, In: Fuchs A ed. *Inulin and inulin-containing crops.* „*Studies in Plant Science* 3., Amsterdam, Elsevier Science Publishers. Pp. 65–75.,(1993).

Vranesic D., Kurtanek Z., Santos A.M.P. and Maugeri F., “Optimisation of inulinase production by *Kluyveromyces bulgaricus*. *Food Technol. Biotechnol.* 40, 67-73, (2002).

Wada T., Suatani J., Terada E., Ohguchi M. and Miwa M., “Physicochemical Characterization and Biological Effects of Inulin Enzymatically Synthesized from Sucrose”, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1246-1253, (2005).

Waleckx E., Diaz J.C.M., Gschaedler A., Ceccaldi B.C., Brin N., Quezada G.G., Rodriguez S.V. and Monsan P., “Use of inulinases to improve fermentable carbohydrate recovery during tequila production”, *Food Chemistry*, 124, 1533-1542, (2011).

Wang X., 1993. “Comparative aspects of carbohydrate fermentation by colonic bacteria”. Doctoral thesis, University of Cambridge, Cambridge, U.K., (1993).

Wang M.J., Zhang T., Chi Z., Liu G.L. and Chi Z.M., “18r DNA integration of the exo- inulinase gene into chromosomes of the high ethanol producing yeast *Saccharomyces* sp. W0 for direct conversion of inulin to bioethanol”, *Biomass and Bioenergy*, 35, 3032-3039, (2011).

Wanker E., Huber A., Schwab H., “Purification and Characterization of the *Bacillus subtilis* Levanase Produced in *Escherichia coli*, *Environmental Microbiology*, 1953-1958, 61, 5, (1995).

Xiong C., Jinhua W. and Dongsheng Li., “Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology”, *Biochemical Engineering Journal*, 34, 179-184, (2007).

Yıldırım K., “Microbial Hydroxylation of Some Streoids by *Aspergillus wentii* MRC 200316”, *Institute of Organic Chemistry and biochemistry*, 12, 1273-128, (2010).

Yoshikawa J., Amachi S., Shinoyama H. and Takaaki F., “Multiple β -fructofuranosidases by *Aureobasidium pullulans* DMS2404 and their roles in fructooligosaccharide production”, *FEMS Microbiol Lett*, 265, 159-163, (2006).

Yu J., Jiang J., Ji W., Li Y. and Liu., “Glucose-free fructose production from Jerusalem artichoke using a recombinant inulinase-secreting *Saccharomyces cerevisiae* strain”, *Biotechnol Lett*, 33:147-152, (2011).

Zittan L., “Enzymatic Hydrolysis of Inulin — An Alternative Way to Fructose Production”, pages 373–377, (1981).

Zhang L., Zhao C., Zhu D., Ohta Y. and Wang Y., “Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AF10 expressed in *Pichia pastoris*”, *Protein Expr. Purif.* 35:272–275, (2004).

Zhang T., Gong F., Peng Y. and Chi Z., “Optimization for high-level expression of the *Pichia guilliermondii* recombinant inulinase in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant inulinase”, *Process Biochemistry*, 44,1335-1339, (2009).

Zhang S., Yang F., Wang Q., Hua Y. and Zhao Z.K., “High-level secretory expression and characterization of the recombinant *Kluyveromyces marxianus* inulinase”, *Process Biochemistry*, 47, 151-155, (2012).

Zhao C.H., Chi Z., Zhang F., Guo F.J., Li M., Song W.B. and Chi Z.M., “Direct conversion of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke into single cell oil by co-cultures of *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a and immobilized inulinase-producing yeast cells”, *Bioresurce Technology*, 10, 1016, (2011).

Zherebtsov N.A., Shelamova S.A. and Abramova I.N., “Biosynthesis of inulinases by *Bacillus* Bacteria”, *Prikladnaya Bio. Microbiologiya*, 38, 634-638, (2002).

<http://tr.mydearbody.com/sifali-bitkiler/yer-elmasi.html>

<http://tr.wikipedia.org/wiki/in%C3%BClin>

ÖZGEÇMİŞ

03.12.1987 Edirne’de doğdum. İlköğretimi Trakya Birlik İlköğretim Okulunda, liseyi Edirne Anadolu Lisesinde, lisans eğitimimi ise Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde tamamladım. 2009’ da yüksek lisans eğitimine Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilimdalı’nda başladım. 2012’ de mezun oldum. Halen Çalışma ve İş Kurumu’nda İş ve Meslek Danışmanı olarak çalışmaktayım.