

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTININ İNÜLİNAZ ENZİMİ ÜRETİMİNDE
KARBON KAYNAĞI OLARAK KULLANIMI**

Merve İLGİN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ARALIK 2017

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTININ İNÜLİNAZ ENZİMİ ÜRETİMİNDE
KARBON KAYNAĞI OLARAK KULLANIMI**

Merve İLGİN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ARALIK 2017

ANTALYA

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

**KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTININ İNÜLİNAZ ENZİMİ ÜRETİMİNDE
KARBON KAYNAĞI OLARAK KULLANIMI**

Merve ILGIN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
(BAP) tarafından FYL-2017-2957 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ARALIK 2017

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTININ İNÜLİNAZ ENZİMİ ÜRETİMİNDE
KARBON KAYNAĞI OLARAK KULLANIMI

Merve ILGIN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 27.12.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İrfan TURHAN (Danışman)



Prof.Dr. Mehmet İNAN



Yrd. Doç. Dr. Hatice Reyhan ÖZİYCI



ÖZET

KEÇİBOYNUZU EKSTRAKTININ İNÜLINAZ ENZİMİ ÜRETİMİNDE KARBON KAYNAĞI OLARAK KULLANIMI

Merve ILGIN

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İrfan TURHAN

Aralık 2017, 84 sayfa

İnülin, yapısında glukoz ve fruktoz içeren bitki kaynaklı polisakkaritten biridir. Enzimler canlı hücreler tarafından oluşturulan ve kimyasal reaksiyonları spesifik olarak katalizleme yeteneğine sahip protein yapıdaki maddelerdir. İnülinazlar ise inüline spesifik olan ve onu hidrolize eden enzimlerdir. Bazı mikroorganizmalarda bulunan inülinazlar, inülin üzerindeki etki şekline göre endo-inülinaz ve ekzo-inülinaz olarak ayrılmaktadır. *Aspergillus niger* tarafından üretilen inülinazlar, inülini ekzo tipi hidrolize etmektedir. İnülinazlar gıda endüstrisi ve diğer alanlarda kullanımı ile önemli bir paya sahiptir. Keçiboynuzu meyvesi ülkemizde genellikle Akdeniz kıyı şeridinde doğal alanlarda yetişmektedir. Pek çok endüstri alanında yaygın olarak kullanılmakta olan şeker içeriği yüksek bu meyve biyoteknolojik açıdan substrat olarak kullanıma da oldukça uygundur. Bu projede, inülinaz enzimi üretiminde alternatif bir karbon kaynağı olarak keçiboynuzu meyvesi ekstraktının kullanım potansiyeli araştırılmıştır.

Bu çalışmada daha önce inülinaz enzimi üretiminde hiç kullanılmamış olan keçiboynuzu meyvesi ekstraktı karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Keçiboynuzu ekstraktının içerisine ayrı ayrı ve farklı oranlarda eklenen 7 farklı besiyeri bileşeni ile 12 farklı besiyerinin Plackett-Burman ile formülasyonu yapılmış, fermentasyonları gerçekleştirilmiş ve maksimum inülinaz aktivitesi için optimum besiyeri bileşiminin 5°Bx keçiboynuzu ekstraktı ve buna %1 maya ekstraktı ilavesi olduğu saptanmıştır. Sonrasında Cevap Yüzey Metodu (CYM) ile optimum fermentasyon çalışma koşulları 250 rpm çalkalama hızı, %2.3 inokülasyon miktarı ve 135 mL medya hacmi olarak belirlenmiştir. CYM ile önerilen fermentasyonlar sonucu maksimum aktivite 1646.05 U/mL olmuştur. Design Expert ile optimize edilen fermentasyon koşullarında gerçekleştirilen doğrulama denemeleri sonucunda maksimum enzim aktivitesi olan 1560.17 U/mL değerine ulaşılmıştır. Fermentasyonla elde edilen enzim preparatı ultrafiltrasyon ile 10, 30, 50 kDa ayırma sınırındaki filtrelerden geçirilerek kısmi saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. UF işlemi sonucunda 50 kDa retentat kısmında 6133.72 U/mL inülinaz saptanırken, 30 kDa'da 6278.69 U/mL, 10 kDa'da ise 6343.26 U/mL inülinaz aktivitesi elde edilmiştir. Böylece UF işlemi ile yaklaşık 4.5 kat enzim aktivitesi artışı sağlanmıştır. Sonuçlar keçiboynuzu ekstraktının inülinaz enzimi üretiminde iyi bir karbon kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca bu tez çalışması ile hammaddeden ürüne kadar bütünlük içeren bir enzim üretim modeli oluşturulmuştur.

ANAHTAR KELİMELEER: İnülinaz, *Aspergillus niger*, saflaştırma, keçiboyunuz, cevap yüzey metodu

JÜRİ: Doç. Dr. İrfan TURHAN
Prof. Dr. Mehmet İNAN
Yrd. Doç. Dr. Hatice Reyhan ÖZİYCI



ABSTRACT

USE OF CAROB EXTRACT AS CARBON RESOURCES IN THE PRODUCTION OF INULINASE ENZYME

Merve ILGIN

MSc Thesis in Food Engineering
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Irfan TURHAN
Aralık 2017, 84 pages

Inulin is one of the plant-derived polysaccharides containing glucose and fructose in its structure. Enzymes are protein-based substances that are formed by living cells and have the ability to specifically catalyze chemical reactions. Inulinases are inulin-specific enzymes that hydrolyze inulin. The inulinases found in some microorganisms are classified as endo-inulinase and exo-inulinase according to the breakdown of inulin. Inulinases are produced by *Aspergillus niger*, are exocrine type of inulin hydrolases. Inulinases have a significant share in the food industry and its use in other areas. Carob fruit grows in Turkey in natural areas of the Mediterranean coastline. The sugar content, of the fruit which is widely used in many industrial fields, is highly suitable for usage as a substrate in biotechnology. In this project, the potential use of carob fruit extract as an alternative carbon source in inulinase enzyme production has been investigated.

In this study, carob bean extract, which was any used in the production of inulinase enzyme, was used as a carbon source. 12 different media were formulated with Plackett-Burman and fermentations were carried out with 7 different variables added separately at different ratios to the carob extract. Optimum nutrient composition determined for maximum inulinase activity was 5° Bx carob extract with 1% yeast extract. Subsequently, optimum fermentation operating conditions with CYM (Response Surface Method) were determined as 250 rpm agitation speed, 2.3% inoculation amount and 135 mL media volume. The maximum activity of the fermentations recommended with CYM was 1646.05 U / mL. As a result of validation experiments performed under the optimized fermentation conditions with Design Expert program, 1560.17 U / mL was the maximum enzyme activity reached. Partial purification with enzyme preparatory ultrafiltration obtained by fermentation was carried out through filters with a separation limit of 10, 30, 50 kDa. As a result of the UF treatment, 6133.72 U / mL inulinase was detected in the 50 kDa retentate, 6278.69 U / mL in 30 kDa and 6343.26 U / mL inulinase activity in 10 kDa. Thus, the enzyme activity was increased about 4.5 times by the UF process. The results have shown that the carob extract can be used as a good carbon source for the production of inulinase enzyme. In addition, was to be reached in this study an enzyme production model integrity from raw material to product.

KEYWORDS: *Aspergillus niger*, Inulinase, locust, purification, response surface method

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr.Irfan TURHAN
Prof. Dr. Mehmet İNAN
Assoc. Prof. Dr. Hatice Reyhan ÖZİYCI



ÖNSÖZ

İnsan nüfusunun her geçen gün arttığı dünyamızda her türlü tarımsal ürün ve atığın etkin bir şekilde kullanımında biyoteknoloji alanında gerçekleştirilmiş gelişmeler önemli bir yer tutmaktadır. Bu alanda gelişmiş ülkeler ile birlikte yeni teknolojik çalışmalar gündeme gelmektedir. Bu çalışmaların ortaya koyduğu sonuç, gıda atıklarının ve şekerce zengin ancak değerlendirilme olanakları kısıtlı olan tarım ürünlerinin katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde kullanılabilirliğinin sağlanmış olmasıdır. Bu durum hem gıda atıklarının imha problemini çözmekte hem de tarımda önemi düşük olan ürünlerin yeni alanlarda değerlendirilmesini sağlayarak ülke ekonomilerine katkı sağlamaktadır.

Bu kapsamda biyoteknolojik yollarla üretilen ürünlerden birisi de İnülinaz enzimidir. İnülinaz, ilaç ve gıda sanayiinde, inülooligosakkarit, glukonik asit, düşük kalorili tatlandırıcılardan fruktooligosakkarit üretimi gibi önemli endüstriyel işlemlerde kullanımı yaygın olan bir enzimdir. Böylesine fazla kullanım alanı olan bir enzimin biyoteknolojik yöntemlerle üretiliyor olması ürünün yılın her zamanı teminini mümkün kılmaktadır.

Bu çalışma kapsamında değerlendirme olanakları kısıtlı olan keçiboyunu meyvesi ekstraktından yüksek şeker içeriği nedeniyle, *Aspergillus niger* mikroorganizması kullanılarak inülinaz enzimi üretme hedeflenmiştir. Enzimin optimum besiyeri ortamında optimum çalışma koşulları altında üretimi gerçekleştirilmiş, ardından enzim kısmi olarak saflaştırılmıştır. Tüm fermentasyonlar ve ultrafiltrasyon denemeleri sonucunda elde edilen verilerle kinetik parametreler ve saflaştırma katsayıları belirlenerek inülinaz için en uygun üretim şartları ortaya konulmuştur.

Fermentasyonla enzimin üretiminden, kısmi saflaştırılmasına kadarki basamakları bünyesinde barındıran bu tez çalışmasının özellikle ülkemizde ve dünyada farklı enzimlerin üretimine de ışık tutacağı düşünülmektedir. Böylelikle gıda ve diğer endüstrilerde kullanılan enzimlerin daha fazlasının ülkemizde üretilmeye başlanması ile hem akademik ve bilimsel anlamda çalışan birçok insana faydalı olacak, hem yeni iş imkânları ortaya çıkacak hem de katma değeri yüksek ürünler sayesinde ülke ekonomisi güçlenecek ve dışa bağımlılığımız biraz daha azalacaktır.

Bana bu konuyu çalışma fırsatı veren, yüksek lisans eğitimim boyunca bana olan güvenini ve inancını bir an bile kaybetmeyip, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren çok kıymetli danışman hocam Doç. Dr. İrfan TURHAN'a (Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi) teşekkür ederim.

Hem bilgi ve tecrübeleri hem de manevi destekleri ile her konuda yanımda olan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Yrd. Doç. Dr. Ercan YATMAZ'a (Akdeniz Üniversitesi Göynük Meslek Yüksekokulu) teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca aynı laboratuvar ortamını paylaştığım kıymetli çalışma arkadaşlarım Fadime DEMİREL, Kübra TARHAN, Ercan KARAHALİL, Nour Bean BADER, Hilal Nur GÜRLER, Selime Benemir ERKAN VE Ali ÖZCAN'a ve bu zorlu süreçte destekleriyle yanımda olan başta Handan BAŞÜNAL GÜLMEZ'e, Ferhan BALCI TORUN, Uzman Dr. İhsan Burak ÇAM, Emrah EROĞLU'na ve yine her türlü

desteklerini veren aynı odayı paylaştığımız lisansüstü öğrenci arkadaşlarıma, hocalarıma ve çalışmaya materyal desteği sağlayan Yenigün A.Ş. yetkililerine teşekkür ederim.

Projeye verdikleri destekten dolayı Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Son olarak, eğitim hayatım boyunca olduğu gibi, yüksek lisans çalışmalarım süresince de koşulsuzca yanımda duran aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
AKADEMİK BEYAN	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	3
2.1. Keçiboynuzu (<i>Ceratonia siliqua</i> L.), Meyvesi, Bileşimi ve Kullanım Alanları.....	3
2.2. Fermentasyon Mikrobiyolojisi	5
2.3. Mikroorganizmaların Gelişmeleri İçin Gerekli Maddeler.....	6
2.4. Enzim Üretimi	6
2.5. İnülin (β -(2-1) fruktozil-fruktoz).....	7
2.5.1. İnülinin fizikokimyasal özellikleri	10
2.6. İnvertaz.....	11
2.7. İnülinaz.....	12
2.7.1. İnülinaz üreten mikroorganizmalar	15
2.7.2. <i>A. niger</i> 'in endüstriyel kullanımı.....	20
2.8. Deneysel Tasarımda Kullanılan Metotlar	21
2.8.1. Full faktöriyel dizayn	21
2.8.2. Plackett-Burman dizayn	21
2.8.3. Taguchi dizayn	22
2.8.4. Cevap yüzey metodu (CYM).....	22
2.8.4.1. Central composite dizayn (CCD).....	23
2.8.4.2. Box-Behnken dizaynı (BBD).....	23
2.9. Ultrafiltrasyon (UF).....	24
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. Materyal	25

3.1.1. Keçiboynuzu meyvesi.....	25
3.1.2. Fermentasyon için gerekli ekstraktın eldesi	25
3.1.3. Fermentasyonda kullanılan mikroorganizma	25
3.2. Metot	26
3.2.1. İnülinaz enzimi üretimi için uygulanan deneme deseni	26
3.2.2. Başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşiminin optimizasyonu.....	27
3.2.3. Cevap yüzey metodu (CYM).....	29
3.2.4. İnülinaz fermentasyonu	29
3.2.5. Toplam şeker analizi.....	30
3.2.6. İnülinaz ve invertaz-tip aktivite analizi	31
3.2.7. Protein analizi	32
3.2.8. UF (Kısmi konsantrasyon)	33
3.2.9. Biyokütle analizi.....	34
3.2.10. pH	34
3.2.11. Kinetik parametreler	34
3.2.12. İstatistiksel analiz	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	36
4.1. Keçiboynuzu Ekstraktının Başlangıç Şeker İçeriği Ve Besiyeri Bileşimi Optimizasyonu	36
4.1.1. PB dizayn ile etkili parametrelerin belirlenmesi	46
4.1.2. Başlangıç şeker içeriği ve optimum besiyeri bileşimi ile doğrulama fermentasyonu	50
4.2. Kontrol Fermentasyonu (Zenginleştirilmemiş Besiyeri).....	55
4.3. CYM İle Optimum Fermentasyon Koşullarının Belirlenmesi	56
4.3.1. Karıştırma hızının inülinaz üretimine etkisi	58
4.3.2. İnokülasyon oranının inülinaz üretimine etkisi	58
4.3.3. Medya hacminin inülinaz üretimine etkisi	59
4.4. CYM İle Optimum Koşulların Belirlenmesi	60
4.5. CYM Optimum Koşullarda Doğrulama Denemesi	63
4.6. UF.....	66
5. SONUÇ	69
6. KAYNAKLAR	70

7. EKLER.....	80
ÖZGEÇMİŞ	85



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Keçiboynuzu Ekstraktının İnülinaz Enzimi Üretiminde Karbon Kaynağı Olarak Kullanımı” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

28.12.2017

Merve ILGIN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Derece
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
sa	Saat
dk	Dakika
cm	Santimetre
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
rpm	Devir/dakika
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
N	Normal
M	Molar
mM	Milimolar
mm	Milimetre
nm	Nanometre
a/h	Ağırlık/hacim

Kısaltmalar

PB	Plackett Burman Yöntemi
PBD	Plackett Burman Dizayn
DNSA	Dinitrosalisilik asit
RSM	Response surface method (cevap yüzey metodu)
CYM	Cevap yüzey metodu
ŞKO	Şeker Kullanım Oranı
ΔS	Şeker tüketimi
P	Enzim üretimi
Q_S	Makimum tüketim hızı
Q_P	Maksimum üretim hızı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnülin yapısı.	9
Şekil 2.2. İnülinin Fiziksel Olarak Görünümü.....	11
Şekil 2.3. Ekzo ve endo-inülinazın fonksiyonu.	13
Şekil 2.4. (a) Ekzo-inülinaz ikincil yapı elemanları şerit gösterimi (Nitrojenaz kompleksi α (gri, yeşil) ve β (pembe, sarı) zincirler, nitrojenaz demir proteini (mor, mavı, kırmızı, altın) (b) Aktivite alanındaki fruktoz molekülü ile ekzo-inülinaz yüzeyinin temsili.	15
Şekil 3.1. Parçalanmış keçiyoynuzu meyvesi.	25
Şekil 3.2. <i>Aspergillus niger</i> A42 küfünün petride geliştirilmiş olan görüntüsü.	26
Şekil 3.3. İnülinaz fermentasyonlarına ait bazı denemelerin çalkalamalı inkübatör görüntüleri.	30
Şekil 3.4. Optimum koşullarda üretilen inülinaz içeren fermente solüsyonda kısmi saflaştırma düzeneği.	33
Şekil 4.1. PB 1 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.	38
Şekil 4.2. PB 2 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.	39
Şekil 4.3. PB 3 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.	39
Şekil 4.4. PB 4 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.	40
Şekil 4.5. PB 5 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.	41
Şekil 4.6. PB 6 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.	41
Şekil 4.7. PB 7 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.	42
Şekil 4.8. PB 8 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.	42
Şekil 4.9. PB 9 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.	43
Şekil 4.10. PB 10 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği. ..	44
Şekil 4.11. PB 11 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği. ..	44
Şekil 4.12. PB 12 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği. ..	45
Şekil 4.13. Etkilerin Normal Grafiği (PBD).	47
Şekil 4.14. Etkilerin Pareto Grafiği (PBD).	48
Şekil 4.15. İnülinaz İçin Ana Etkilerin Grafiği.	49

Şekil 4.16. <i>A.niger</i> ile gerçekleştirilen optimum başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi ile fermentasyon denemeleri sonucunda elde edilen şeker tüketimi-enzim aktivitesi grafiği.	50
Şekil 4.17. Optimum başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi doğrulama fermentasyonları sonucunda inülinaz ve invertaz-tip aktivite değişimine karşılık I/S oranlarının değişim grafiği.	52
Şekil 4.18. Optimum başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi doğrulama fermentasyonları sonucunda şeker tüketimine karşılık inülinaz ve invertaz-tip aktivite miktarlarının değişim grafiği.	53
Şekil 4.19. <i>A.niger</i> ile gerçekleştirilen kontrol fermentasyonu denemeleri sonucuna karşılık gelen şeker tüketimi-enzim aktivitesi grafiği.....	55
Şekil 4.20. <i>Aspergillus niger</i> ile üretilen inülinaz miktarına karşılık inokülasyon oranı ve çalkalama hızının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği.	62
Şekil 4.21. <i>Aspergillus niger</i> ile üretilen inülinaz miktarına karşılık medya hacmi ve çalkalama hızının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği.	62
Şekil 4.22. <i>Aspergillus niger</i> ile üretilen inülinaz miktarına karşılık medya hacmi ve inokülasyon oranının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği.....	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Keçiboynuzu meyvesinin ülkeler bazında üretim alanı, üretim miktarı ve verim değerleri.	3
Çizelge 2.2. İnülin İçeren Bazı Bitkiler.	9
Çizelge 2.3. İnülinaz ve invertaz-tip aktivitesi arasında ki ilişki.	14
Çizelge 2.4. İnülinaz Üreten Mikroorganizmalar ve İnülinaz Aktiviteleri.	16
Çizelge 3.1. PBD’de kullanılan düşük ve yüksek seviyedeki değişkenlerin kodları ve konsantrasyonları.	27
Çizelge 3.2. PBD ile fermentasyon ortamının optimizasyonunda kullanılan fermentasyon koşulları.	27
Çizelge 3.3. Placket-Burman tasarımında kullanılan değişken parametreler.	28
Çizelge 3.4. CYM metodu ile belirlenen fermentasyon koşulları istatistik denemeleri.	29
Çizelge 4.1. PBD istatistik yöntemiyle belirlenen fermentasyonların analiz sonuçları..	37
Çizelge 4.2. PB 1 numaralı besiyeri bileşimi.	38
Çizelge 4.3. PB 2 numaralı besiyeri bileşimi.	39
Çizelge 4.4. PB 3 numaralı besiyeri bileşimi.	39
Çizelge 4.5. PB 4 numaralı besiyeri bileşimi.	40
Çizelge 4.6. PB 5 numaralı besiyeri bileşimi.	40
Çizelge 4.7. PB 6 numaralı besiyeri bileşimi.	41
Çizelge 4.8. PB 7 numaralı besiyeri bileşimi.	42
Çizelge 4.9. PB 8 numaralı besiyeri bileşimi.	42
Çizelge 4.10. PB 9 numaralı besiyeri bileşimi.	43
Çizelge 4.11. PB 10 numaralı besiyeri bileşimi.	43
Çizelge 4.12. PB 11 numaralı besiyeri bileşimi.	44
Çizelge 4.13. PB 12 numaralı besiyeri bileşimi.	45
Çizelge 4.14. PBD fermentasyon denemeleri kinetik parametreleri.	45
Çizelge 4.15. İnülinaz için tahmini etkiler ve katsayılar.	46
Çizelge 4.16. Model denklemdeki üretim oranının varyans analizi.	47
Çizelge 4.17. Optimum başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi doğrulama denemesi analiz sonuçları.	51

Çizelge 4.18. Optimum başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi doğrulama denemesi kinetik parametreler.	51
Çizelge 4.19. Kontrol Fermentasyonu Denemesi Kinetik Parametreler.....	56
Çizelge 4.20. CYM için değişken olan ve sabitlenen fermentasyon koşulları.	56
Çizelge 4.21. CYM fermentasyon sonuçları.....	57
Çizelge 4.22. CYM fermentasyon denemeleri kinetik parametre sonuçları.....	59
Çizelge 4.23. CYM fermentasyon sonuçlarının varyans ve regresyon analizi tablosu. .	60
Çizelge 4.24. CYM fermentasyon alt-üst sınırları ve Design Expert tarafından sunulan optimum koşullar ve enzim hedefi.	61
Çizelge 4.25. Design Expert istatistiksel yazılım sonucu belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonların analiz sonuçları.....	63
Çizelge 4.26. Design Expert istatistiksel yazılım sonucu belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik parametreleri.....	64
Çizelge 4.27. UF için gerçekleştirilmiş olan fermentasyon koşulları.	66
Çizelge 4.28. Ultrafiltrasyon öncesi ve sonrası inülinaz enzimi.....	67

1. GİRİŞ

Biyoteknolojinin ve fermentasyonun temel kavramları; fermentasyon için hammaddeler, mikroorganizmaların sınıflandırılması ve mikrobiyal büyüme şeklinde sıralanabilir. Fermentasyon yoluyla, gıda ve gıda bileşenleri üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Bu amaçla aerobik ve anaerobik sistemler kullanılmaktadır. Biyoteknolojik çalışmalar sonucunda fermentasyon yoluyla; enzimler, ekmek mayası, turşu ve zeytin, endüstriyel enzimler, tatlandırıcılar, vitaminler, alkollü içecekler, yüksek fruktoz mısır şurubu (HFCS), organik asit ve aminoasit üretimi gibi katma değeri yüksek ürünler üretilmektedir (Ertugay ve Certel 1995).

Hayvan tüketimi ve insan beslenmesi için üretilen tarımsal ürünlerin endüstriyel olarak işlenmesi, yüksek miktarlarda tarıma dayalı endüstri kalıntılarına neden olmaktadır. Bu kalıntıların çoğu başta hayvan diyetlerinin formülasyonunda kullanılmak üzere değerlendirilmektedir. Ayrıca bu kalıntılar, kalite kontrol açısından daha fazla ilgi görmekte ve tarımsal endüstri alt ürünleri olarak da düşünülmektedir (Graminha vd. 2008).

Enzim gibi katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde kullanılan yan ürünler ve tarımsal kalıntıların yanı sıra yeni karbon kaynaklarının araştırılması, yenilenebilir ürünlerin başarıyla geliştirilmesi için gerekli ve sürdürülebilir bir strateji haline gelmiştir. Bu karbon kaynaklarının ekonomik ve enerji sürdürülebilirlik, tedarik güvenilirliği ve çevre dostu olması gibi avantajlarından dolayı fosil kaynaklardan elde edilen ürünlerle rekabet halinde olduğu görülebilir (Lima-Costa vd. 2012).

Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre, tarımsal-endüstriyel atıklar etanol, proteinler ve birçok mikrobiyal enzimin üretimi için karbon, hidrojen ve oksijen kaynağı olarak kullanılmıştır. Mikrobiyal enzimlerin uygulamaları; yiyecek ve içecek imalatı, biyokütle dönüşümü ve atık işleme alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda biyoyakıt talebinin artmasıyla, bitki biyokütlesinin fermente edilebilir şekerlere biyolojik olarak dönüştürülmesinde; selülozlar, ksilanazlar, pektinazlar ve inülinazlar gibi geniş bir mikrobiyal enzim aralığından yararlanmaktadır (Huitron vd. 2007).

Şeker içerikli malzemeler (şeker kamışı, şeker pancarı, tatlı sorgum, keçiboynuzu vb.), hidrolize edilebilir polisakaritler (nişasta gibi) ve lignoselülozik maddeler de dahil olmak üzere katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde birçok hammadde türü karbon kaynağı olarak kullanılabilir. Yüksek karbonhidrat içerikli tarımsal ürünlerden birisi de keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) meyvesidir. Keçiboynuzu, kuraklığa direncin yüksek olduğu topraklarda yetişen, Akdeniz bölgesine ve Güneybatı Asya'ya özgü, yaprak dökmeyen bir çalı veya ağaçtır. Çok az bakım gerektirir ve çekirdek ve meyve eti geniş bir ürün yelpazesi üretmek için kullanılır. Keçiboynuzu meyvesi tüketim olgunluğuna ulaştığında %90-91 kuru madde ve %62-67 toplam suda çözünür kuru madde içermektedir. Çözünür kuru maddenin önemli bir kısmını sakkaroz (%34-42), fruktoz (%10-12) ve glukoz (%7-10) oluşturmaktadır (Karkacier ve Artık 1995). Ham selüloz ve toplam mineral madde miktarı sırasıyla %4.6-6.2 ve %2.23-2.42 arasında değişmekte ve mineral maddeler arasında en yüksek miktarı potasyum oluşturmaktadır. Yüksek şeker ihtiva ediyor olması da hem ucuz hem de kolay elde edilebilen bu meyvenin katma değeri yüksek olan etanol (Sánchez vd. 2010; Turhan vd. 2010), laktik asit (Bulut vd. 2004),

mannitol (Carvalho vd. 2011), yoğurt (Çelik 2010), sitrik asit (Lingappa vd. 2007) ve biyokontrol ajanı (fungus: *Pantoea agglomerans* PBC-1) (Manso vd. 2010) üretiminde başarılı şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, keçiboynuzu meyvesi çözünmez posa ve polifenol açısından zengindir ve bu nedenle insan sağlığına olumlu etkileri olduğu düşünülmektedir (Fırıncıahmetoğlu 2013). Sadece bir orman ağacı olarak kabul edilen ve diğer ekonomik faydaları ihmal edilen keçiboynuzu, son yıllarda çeşitli uygulamalar ile dikkat çekmeye başlamıştır (Turhan vd. 2010). Meyve etinden elde edilen ürünlerin piyasa değerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu nedenle meyvenin etli kısmının kullanım alanlarının genişletilmesi bu meyvenin piyasa değerini artırmakla birlikte üreticinin de bu bitkiye daha fazla değer vermesini sağlayacaktır (Turhan ve Karhan 2004).

Mikrobiyal inülinazlar, son zamanlarda oldukça dikkat çeken endüstriyel enzimlerden birisidir. İnülinazlar mantar, maya ve bakteri de dâhil olmak üzere bir çok mikroorganizma tarafından üretilir. Bununla birlikte, *Aspergillus sp.* (ipliksi mantarlar) ve *Kluyveromyces sp.* (diploid maya) türleri ticari uygulamalar için tercih edilen mikroorganizma tipleridir (Pandey vd. 1999).

Bu çalışmada keçiboynuzu ekstraktının inülinaz enzimi üretiminde substrat olarak kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Bu amaçla; keçiboynuzu ekstraktının *A.niger* mikroorganizması tarafından daha iyi kullanılmasını sağlamak için başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi Plackett-Burman dizaynı kullanılarak optimize edilmiştir. Besiyeri bileşimi optimize edildikten sonra *A.niger*'den inülinaz üretiminin fermentasyon şartları CYM ile optimize edilmiştir. Bu amaçla çalkalama, inokülasyon oranı ve besiyeri hacmi (oksijen transferi açısından önemli) etken parametreler olarak kullanılmıştır. CYM sonuçlarına göre elde edilen optimum koşullarda doğrulama denemeleri gerçekleştirilmiştir. Doğrulama denemeleri sonucunda elde edilen enzimi içeren besiyeri 3 farklı (10, 30, 50 kDa) ayırma sınırına sahip (cut-off value) ultrafiltrasyon (UF) ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Tüm fermentasyon ve UF denemeleri sonucunda elde edilen verilerle kinetik parametreler ve saflaştırma katsayıları belirlenerek inülinaz için en uygun üretim şartları ortaya konulmuştur.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

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

Keçiboynuzu ağaçları (*Ceratonia siliqua* L.), Akdeniz ülkelerinin fakir ve kireçli topraklarında çoğunlukla yumuşak ve kuru yerlerde yetişen çok yıllık baklagil ağaçlarıdır (Lima-Costa vd. 2012). Uzun ömürlü boyu 10 metreye kadar uzayabilen maki türü bir ağaçtır. Yaprakları, karşılıklı dizilmiş halde olup boyları 10-20 cm uzunluğunda ve damla uçludur. Çiçekleri 6-12 cm uzunluğunda, açık yeşilimsi kırmızı, küçük ve çok sayıdadır. Ağacın meyveleri ise 15- 20 cm kadar olabilmekte ve ilk zamanlar yeşil ancak olgunlaştığında kahverengileşmektedir (Fırıncıahmetoğlu 2013). Son yıllara ait verilere göre, dünya genelindeki keçiboynuzu üretimi yıllık yaklaşık 400.000 ton/yıl olup, bunun 50.000 tonu Portekiz'in güneyindeki Algarve'de üretilmektedir (Lima-Costa vd. 2012) ve bu bölge dünya ticari keçiboynuzu arzının yaklaşık yarısını karşılamaktadır (Santos vd. 2005). Dünya keçiboynuzu üretimi yıllık yaklaşık 315.000 ton olup, ana keçiboynuzu meyvesi üreticileri ve ihracatçıları İspanya (% 42), İtalya (% 16), Portekiz (% 10), Fas (% 8), Yunanistan (% 6.5), Kıbrıs (% 5.5) ve Türkiye (% 4.8)'dir (Santos vd. 2005). Bazı ülkelerde yetişen keçiboynuzu meyvesinin üretim alanı ve miktarı ile verim değerleri sırasıyla Çizelge 2.1'de verilmiştir (FAO 2017).

Çizelge 2.1. Keçiboynuzu meyvesinin ülkeler bazında üretim alanı, üretim miktarı ve verim değerleri.

		Yıl				
	Ülke	2010	2011	2012	2013	2014
Üretim Alanı (hektar)	Kıbrıs	1.286	1.791	1.709	1.147	1.629
	Yunanistan	3.942	3.716	3.509	3.318	3.143
	İsrail	1.450	1.550	1.500	1.500	1.500
	İtalya	10.823	9.183	5.672	5.768	5.769
	Fas	9.700	9.750	10.302	10.533	10.481
	Portekiz	9.534	9.800	9.480	9.467	9.439
	İspanya	46.243	43.883	43.647	43.695	36.731
	Tunus	409	414	413	418	416
	Türkiye	2.570	2.910	630	512	631
Üretim (Ton)	Kıbrıs	10.560	12.725	9.123	6.178	11.034
	Yunanistan	14.156	13.952	13.747	13.542	13.337
	İsrail	193	202	204	211	206
	İtalya	25.337	44.749	30.841	9.445	31.486
	Fas	20.000	20.500	21.519	22.024	21.941
	Portekiz	21.597	23.000	21.966	21.841	21.736
	İspanya	56.286	38.380	45.414	38.882	35.731
	Tunus	860	860	855	870	869
	Türkiye	14.172	13.972	14.218	14.261	13.985
Verim (hektogram/hektar)	Kıbrıs	82.115	71.050	53.382	53.862	67.735
	Yunanistan	35.911	37.544	39.176	40.809	42.442
	İsrail	1.331	1.349	1.357	1.365	1.372
	İtalya	23.410	48.730	54.374	16.375	54.578
	Fas	20.619	21.026	20.889	20.910	20.934
	Portekiz	22.653	23.469	23.171	23.072	23.029
	İspanya	12.172	8.746	10.405	8.899	9.728
	Tunus	21.018	20.773	20.702	20.839	20.923
	Türkiye	55.144	48.014	225.683	278.535	221.632

Çizelge 2.1'e göre ülkemiz, keçiboynuzu üretiminde ve üretim alanında beşinci sırada bulunmaktadır. İspanya, keçiboynuzu üretiminde en fazla üretim alanına sahip olmanın yanı sıra üretim miktarı açısından da en yüksek rakamlara sahip ülke konumundadır. Buna bağlı olarak dünya çapında en fazla üretim, 2014 yılında gerçekleştirilmiştir.

Keçiboynuzu ağacı, kuraklığa dayanıklıdır, az bakım gerektirir. Keçiboynuzu "meyve eti" ve "çekirdek" olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Meyve eti kısmı su ile ekstrakte edilerek konsantre üretiminde ve tohum kısmı ise "locust bean gum" veya "keçiboynuzu çekirdeği zımkı" üretiminde kullanılmaktadır. Bu zımk maddesi galaktomannan içecek ve yiyecek, tekstil ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır (Roukas 1999). Ayrıca, yüksek enerjili stok yemi ve gıda endüstrisi için bir kakao ikame maddesi ve şurup olarak kullanılabilir. Keçiboynuzu, yüksek tanen içeriğinden dolayı anti-diyare ürünüdür. Yüksek karbonhidrat (% 30'dan fazla), protein (% 3), düşük yağ (% 0.6) (Santos vd. 2005) seviyelerinin yanı sıra, %10-15 nem, %1-2 pektin, %7 selüloz, %5 hemiselüloz, %20 fenolik bileşikler ve %1-3 kül oranına sahiptir (Roukas 1999). Bunların yanı sıra meyvede en fazla bulunan amino asitler sırasıyla aspartik asit (18.25 g/100 g kuru ağırlık-KA), alanin (10.55 g/100 g KA), glutamik asit (9.65 g/100 g KA), lösin (9.30 g/100 g KA) ve valinden (9.05 g/100 g KA); fenolik asitler ise sırasıyla benzoik asit türevleri (3276.8 µg/g KA) ve sinamik asit türevlerinden (4.5 µg/g KA) oluşmaktadır. Keçiboynuzun başlıca mineral içeriğini potasyum (970 mg/100 g KA), kalsiyum (300 mg/100 g KA), fosfor (71 mg/100 g KA) ve magnezyum (60 mg/100 g KA) oluştururken iz elementler ise demir (1.88 mg/100 g KA), mangan (1.29 mg/100 g KA), bakır (0.85 mg/100 g KA) ve çinkodan (0.75 mg/100 g KA) oluşmaktadır (Yatmaz 2012). Keçiboynuzu meyve ağırlığının % 10'unu çekirdek temsil ederken, % 90'ını pulp temsil eder (Lima-Costa vd. 2012). Keçiboynuzu meyvesi, çözünmez posa ve polifenollerce zengin bir besindir ve bu özelliği ile insan sağlığına pek çok yararlı etkisi vardır. Polifenoller esmerleşme enziminin substratıdır ve içeceklerin aroma ve tadından sorumludur. Ülkemizde son yıllarda, üretilen kavrulmuş keçiboynuzu parçaları, yaygın olarak özellikle fırıncılık ürünlerinde, pasta ve şekerleme ürünlerinde ve düşük enerjili çerezlik ürünlerde çikolata yerine veya meyve öğütülerek un haline getirilmekte kakao alternatifi bir ürün olarak kullanılmaktadır (Fırıncıahmetoğlu 2013). Ayrıca dondurma, çorba, peynir, meyveli turta ve konserve et yapımında da yer almaktadır (Yatmaz 2012). Şeker içeriğinin yüksek olması da keçiboynuzu meyvesini enzim gibi katma değeri yüksek bir ürün elde etmede alternatif bir karbon kaynağı yapmaktadır.

Gelecekte hayvansal yem ihtiyacı kaçınılmaz olarak artacaktır. Cezayir, yılda 3800 ton ile toplam 4.1×10^6 ABD doları tutarında keçiboynuzu ithalatı yapıyor. Dolayısıyla, yenilenebilir hammaddeler kullanarak yerel protein kaynaklarının geliştirilmesine acil bir ihtiyaç bulunmaktadır. Cezayir keçiboynuzu ağacı için büyük bir tarıma sahiptir. Keçiboynuzu meyvesi büyük miktarlarda şeker içerir ve mantar gelişimi için iyi bir substrattır ve bu da protein vb. ürünlerin üretimi için onları cazip hale getirmektedir. Hayvansal yem olarak ham keçiboynuzu tohumlarının kullanımı, yüksek tanen (meyveye has buruk tat) içeriğinin büyüme üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmasından dolayı sınırlıdır. Bununla birlikte, tanenler *Aspergillus niger* dâhil olmak üzere bazı mantarlarla parçalanabilir (Smail vd. 1995).

Ekonomik açıdan rekabet edilebilirliği artırmak için, döngüsel düzeyde keçiyoynuzu meyvelerinin protein, enzim vb. kıymetli ürünlere biyolojik olarak dönüştürülmesi gerekmektedir.

2.2. Fermentasyon Mikrobiyolojisi

Fermente gıdaların üretimi, en eski gıda işleme teknolojilerinden birisidir. Medeniyetin başlangıcından bu yana, süt, et ve sebzelerin fermentasyonu için çeşitli yöntemler tanımlanmıştır. Mikrobiyolojinin bir bilim olarak 1850'lerden itibaren yaygın olarak günlük hayatta kullanımı, fermentasyonun biyolojik temelini ilk kez anlaşılmasıyla ortaya çıkmıştır. Böylelikle, bakteri, maya ve küflerin fermente gıdalar üretimindeki temel rolü anlaşılmış ve sonuç olarak daha kontrollü ve etkili fermentasyonlar elde edilmiştir. Gıda substratlarının fermentasyonunun asıl amacı bir koruma etkisi elde etmektir. Gıdaların fermentasyon yoluyla muhafaza edilmesi, genellikle asit, alkol ve karbon dioksit olan nihai ürünler üretmek için karbonhidratların ve ilgili türevlerin yükseltgenilmesi prensibine bağlıdır. Bu nihai ürünler, gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmalarının büyümesini kontrol eder ve oksidasyon sadece kısmen olduğundan dolayı, gıda tüketicisi açısından besleyici fayda sağlayacak yeterli enerji potansiyelini korur (Caplice ve Fitzgerald 1999).

En genel kimyasal tanımını kullanacak olursak, 'fermentasyon' terimi, anaerobik bir işlemi tanımlamak için kullanılır. Ancak, terimin genel anlamı hem aerobik hem de anaerobik karbonhidrat parçalanma süreçlerini kapsamaktadır (Caplice ve Fitzgerald 1999).

Fermentasyon tekniği yüzyıllardır kullanılmakta olan bir teknik olup kullanım amaçları şu şekilde sıralanabilmektedir; (Ertugay ve Certel 1995; Smith 2004)

- ✚ Yeni ürün üretiminde mikroorganizmaların kullanılması,
- ✚ Tek hücre proteini olarak mikroorganizmalar tarafından üretilen enzim, vitamin ve antibiyotiklerin üretilmesi,
- ✚ Enerji eldesi,
- ✚ Bazı kimyasal maddelerin fermentasyon sırasında biyosentezi ve transformasyonu,
- ✚ Atıkların mikroorganizmalar aracılığıyla arıtılması ve değerlendirilmesi.

Mikroorganizmaları kullanarak metabolit üretme veya hücre gelişimi için kullanılacak olan fermentasyon ortamı uygun yapıda ve miktardaki tüm bileşikleri içermelidir. Laboratuvarda mikroorganizmalar kullanılarak yapılan üretimlerde genellikle saf kimyasallar kullanılırken, ekonomik nedenlerden dolayı endüstriyel fermentasyonlarda ise farklı kompozisyonlardaki gıda atık maddeleri kullanılmaktadır (Brock vd. 1991). Bu amaçla saf kimyasalların yanı sıra keçiyoynuzu ekstraktı (Turhan vd. 2010), şeker kamışı melası (Ghorbani vd. 2011), buğday samanı, pirinç kavuzu, çay atığı, mısır koçanı, arpa samanı, pirinç samanı ve fındık kabuğu gibi çeşitli tarımsal atıkların hidrolizatı (Menon ve Rao 2012) gibi kompleks karbon kaynakları ile beraber endüstriyel üretim esnasında açığa çıkan peynir altı suyu ve zeytin kara suyu gibi yan ürünler de kullanılabilmektedir. Saf kimyasalların yerine yan ürünlerin kullanılması ile

üretileen ürünün maliyetini azaltılmakta ve çevreye atık olarak bırakılan ürünlerin değerdendirilmesi sağlanmaktadır.

2.3. Mikroorganizmaların Gelişmeleri İçin Gerekli Maddeler

Mikroorganizmaların gelişebilmesi için gerekli olan maddelerin tümü besin olarak adlandırılmaktadır ve gelişebilmeleri için tüm besin öğelerinin ortamda bulunması gerekmektedir. Mikroorganizmalarla gerçekleştirilen laboratuvar çalışmalarında kültür ortamında kullanılan kimyasallar oldukça saf iken, endüstriyel ortamlarda ekonomik olması nedeniyle daha kompleks bileşikleri içeren maliyeti düşük substratlar kullanılmaktadır. Bu yüzden de bu tip ortamlarda mikroorganizma gelişiminin ve fermentasyon ortamının kontrol altında tutulabilmesi için kültür ortamına kritik mineral ve elementlerden katkı yapılmalı, ön denemeler yapılarak biyolojik uyumluluk sağlanmalı ve ortamda ürünün oluşabilmesi için her türlü işlem gözden geçirilmelidir (Tunail 2009).

Besiyeri formülasyonu majör ve minör elementleri içermekte; majör elementler genel olarak karbon ve azot kaynakları olurken minör elementleri mineraller oluşturmaktadır. Günümüz fermentasyon çalışmalarında karbon kaynağı olarak saf glukoz ve sakkaroz özellikle maliyetlerinin yüksek olmasından dolayı çok nadiren tercih edilmektedir. Buna karşılık ise; şeker pancarı ve şeker kamışı yan ürünü olan melas, kâğıt hamuru endüstrisinden elde edilen atık sülfite likörü, lignoselülozik materyaller, peynir altı suyu, azot kaynağı olarak da mısır nişastası ekstraksiyonunun yan ürünü olan mısır maserasyon sıvısı, maya ekstraktı ve pepton kullanılabilir. Karbon ve azot kaynaklarının yanı sıra besiyeri formülasyonuna su, mineraller, vitaminler ve gelişim faktörleri, uyarıcılar ve inhibitörler eklenmektedirler. Fermentasyon da son ürünün maliyetinin düşürölme çalışmalarında en önemli basamak besiyeri içeriğinde ucuz kaynaklardan faydalanmaktır. Hem maliyeti düşük olup hem de ortamdan uzaklaştırılması, atılması, yok edilmesi hedeflenen materyaller katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülebilmektedir. Bu tez çalışmasında da inülinaz enzimi üretiminde karbon kaynağı olarak maliyeti son derece düşük olan ve ölkemizde de bol miktarda bulunan keçiboynuzu meyvesi kullanılmıştır (Waites vd. 2015).

2.4. Enzim Üretimi

Enzimler canlı hücreler tarafından oluşturulan ve kimyasal reaksiyonları spesifik olarak katalizleme yeteneğine sahip olan protein yapıdaki maddelerdir. Bu maddeler, gıda, ilaç ve kimya endüstrisinde, dericilik, boya ve temizlik maddeleri üretimi gibi konularda, biyoloji ve biyoteknoloji bilim dallarında, tıp, tarım ve veterinerlik alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Saldamlı 1998). Ayrıca enzimlerin kimyasal katalizörlere kıyasla sıcaklık, pH ve basınç gibi özellikler bakımından nispeten ılımlı sayılabilecek ortam koşullarında işlev görebilmelerini sağlayan bazı avantajlarının bulunduğu bilinmektedir. Çoğu enzim üreticisi litre başına gram cinsinden enzim titrelerine sahip sıvı kültür fermentasyon (Submerged fermentation, SmF) teknikleri kullanarak enzimler üretilmektedir. Bununla birlikte, literatürde giderek artan sayıdaki araştırma makalesinde pazarlama ve geliştirme alanlarında gösterildiğı gibi, esas olarak küf kökenli olmak üzere çok çeşitli enzimler üretmek için katı hal fermentasyon (Solid state fermentation, SSF) tekniklerinin kullanılmasına da önemli bir ilgi vardır. SSF prosesleri için, aynı suş ve

fermentasyon sıvısını karşılaştırırken enzim titrelerinin SmF'den yüksek olduğu sıklıkla atıf yapılır (Viniegra-González vd. 2003). BBC Araştırma Merkezi tarafından yapılan çalışmada endüstriyel enzimlerin dünyadaki market hacmi 2010 yılında 3.3 milyar dolar, 2015 yılında 4.4 milyar olmuştur. Bu rakamın 2018 yılında ise 5.8 milyar dolara çıkacağı tahmin edilmektedir. Bu marketten en büyük payı %40 ile Amerika Birleşik Devletleri alırken Batı Avrupa, Japonya, Kanada ve Çin de önemli miktarlarda üretime sahiptir. Endüstriyel olarak dünya marketindeki enzimler; teknik, gıda ve içeceklerde kullanım ve diğer kullanım alanları (hayvan yemi vb.) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu market hacminin %31'ini gıda, %6'sını yem ve geriye kalan %63'ünü ise deterjan, deri ve biyoenerji endüstrisi gibi teknik amaçlarla kullanılan enzimler kapsamaktadır. Üretilen bu enzimler arasında en büyük pay ise yığın enzim (bulk enzyme) adı verilen üretime aittir. Tüm enzimler arasında da inülinazlar gıda endüstrisi ve diğer alanlarda kullanımı ile önemli bir paya sahiptir.

Mikrobiyal enzimler genel olarak üç önemli alana sınıflandırılabilir:

1. Yararlı bileşiklerin sentezlenmesinde kullanılabilenler,
2. Önemli biyo-dönüşüm reaksiyonlarını gerçekleştirenler,
3. Polimerleri monomerler haline hidrolize edebilenler (Dinarvand vd. 2017).

Gıda işlemede kullanılan mikrobiyal enzimler sadece arzu edilen bir enzim aktivitesi olarak değil aynı zamanda enzimin diğer metabolitlerini (koruyucular ve dengeleyiciler) de içeren enzim preparatları olarak satılmaktadır. Eklenen malzemeler gıda endüstrisinde kullanılabilir nitelikte olmalı ve uygulanabilir düzenleyici standartlara uygun olmalıdır. Üretim suşunun güvenliği, enzim güvenliğini, özellikle de üretim suşunun toksijenik potansiyelini değerlendirmede birincil husus olmaktadır. Özellikle gıda enzimi üretiminde güvenli kullanım öyküsü olan patojen olmayan, toksik-olmayan doğal mikrobiyal suşlar kullanılmakta yada geleneksel klasik ya da rDNA suşu kullanılarak genetik modifikasyon yoluyla gelişmiş suşları türetilir (Pariza ve Johnson 2001).

Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimler genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin nedenleri; yan ürün oluşturmalarının az olması, aktivitelerinin yüksek olması, daha ekonomik ve stabil olmaları, yüksek oranlarda ve saflıkta üretilibilmeleridir (Coskun 2010).

2.5. İnülin (β -(2-1) fruktozil-fruktoz)

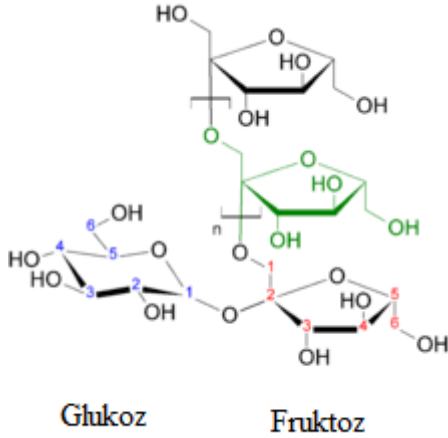
Besleyici etkilerinin yanı sıra vücuda alındığında sağlık üzerine olumlu etki gösteren besinlere “fonksiyonel besin” denir. İnülin, bitkisel kaynaklardan sağlanır ve doğada çiçekli bitkilerin %15'i önemli miktarda inülin kaynağıdır. İnsan diyetinde kullanılan inülin içeren bitkilerin Liliaceae (soğan, Asparagus, sarımsak) ve Compositae (yer elması, hindiba, yakon) ailelerine dâhil olduğu açıklanmıştır. İnülin ilk olarak 1804 yılında Alman bilim adamı Rose tarafından *Inula helenium* (andızotu)'dan izole edilmiş, ancak inülin adını ilk olarak Thompson 1808'de kullanmıştır (Atlıhan 2011). İnulin, yiyecek, içecek ve ilaç endüstrisinde kullanılan fruktoz ve fruktooligosakkaritlerin üretimi için ucuz ve bol miktarda bulunan bir materyaldir (Mohamed vd. 2015).

İnülin başta diyet ürünleri olmak üzere birçok besinde, yağ ikamesi olarak kullanılabilir. Genelde 0.25 g inülin, 1 gram yağ yerine geçer. Yağ yerine inülin kullanılan besinlerin bir porsiyonunda yaklaşık 2-6g inülin vardır. Oligofruktozlar, diyet dondurma, diyet çikolata ve düşük kalorili keklerin yapımında kullanılabilir. Şeker gibi tat vermekte ve düşük kalori içeriği ile de gıda sanayisinde kullanılabilirliği her geçen gün artmaktadır. Bugün Japonya’da 500, Avrupa’da ise 200’den fazla besinin bileşiminde, inülin veya oligofruktoz bulunmaktadır (Yabancı 2010). Oligofruktoz ya da oligofruktoz olarak da adlandırılan fruktooligosakkaritler (FOS), glikozidik bağlar ile bağlanmış 2-10 monosakkarit içeren bir fruktoz oligosakkaridi olarak bilinmektedir. İnülin ve oligofruktoz arasındaki en önemli fark ise zincir uzunluğudur. İnülinin zincir uzunluğu daha fazla olduğu için çözünürlüğü oligofruktoza göre daha zordur. Oligofruktozlar glukoz şurubu (şeker) ile benzer tada sahiptir. Glukoz ve fruktozdan oluşan bir disakkarit olan sukroza göre çözünürlüğü daha yüksek olup tatlılığı sakkarozun %30-50 si kadardır (Sarı 2014). Fruktoz sakkarozu alternatif doğal bir tatlandırıcı şekerdir. Sakkaroz diyabet, şişmanlık ve damar tıkanıklığı gibi birçok sağlık problemine yol açarken, fruktoz ise, insanlarda inorganik demirden daha çabuk emilen, demir-fruktoz şelat kompleksi oluşturarak, demirin absorpsiyonunu artırdığı belirtilmiştir. Günümüzde endüstriyel fruktoz, mısır nişastasından elde edilmektedir (Atlıhan 2011).

Fruktoz, inulinin asit hidroliziyle elde edilebilir. Fakat, inulinin asit hidrolizi fruktoz üretimi için uygun bir yöntem değildir. Çünkü bu yöntem, tatlılaşma kapasitesine sahip olmayan, ayrıca istenmeyen renklere neden olan difruktoz anhidritlerin oluşumuna sebep olabilmektedir. Dolayısıyla, fruktoz veya FOS’u inülininden elde etmek için daha verimli bir sonuç elde edilmesini sağlayan mikrobiyal inulinazların kullanılması yaygınlaşmıştır (Mohamed vd. 2015). Fruktoz, GRAS (The Generally Recognized as Safe, Genel Olarak Güvenli Kabul Edilir) statüsünde olan bir tatlandırıcı olup ve ağızda acı bir tat bırakmaz. Oligofruktozlar genellikle 2-8 fruktoz ünitesin oluşurken, fruktoz kaynağı olan inülin ise 2-60 fruktoz ünitesinden oluşmakta ve son zinciri her zaman glukoz ile sonlanmaktadır (Sarı 2014).

İnülin ve hidrolizatları; sitrik asit, biyoetanol, ultra yüksek fruktoz şurubu, 2,3-butandiol, laktik asit, mannitol, sorbitol gibi katma değeri yüksek birçok ürünün üretiminde kullanılan önemli mikrobiyal biyoteknoloji materyalidir. Ticari inülin genellikle şeker yerine tatlandırıcı maddesi olarak kullanılır ve son zamanlarda inülin kaynaklı ilaçlar kolon kanseri tedavisinde kullanılmak için geliştirilmektedir (Karatop 2012).

İnülin, β -2,1 glikozit bağlı glukoz üniteleri içeren fruktoz zincirlerinden oluşan doğal bir polisakkarittir (Şekil 2.1) (Vijayaraghavan vd. 2009) ve yer elması, hindiba, yıldız çiçeği (Atlıhan 2011), pırasa, soğan, sarımsak, muz, buğday, çavdar, karahindiba, kudüs enginarı gibi bitkilerin kök veya yumrularında bulunan bir depo karbonhidratıdır (Vijayaraghavan vd. 2009). Son zamanlarda, inülin kaynaklarının fruktoz şurubu, etanol ve diğer kimyasalların üretiminde yenilenebilir hammadde kaynağı olarak dikkat çektiği belirtilmiştir (Atlıhan 2011).



Şekil 2.1. İnülin yapısı.

İnülin, 10 farklı familyaya ait 1200 yerli ot içeren dünya genelinde 36.000'den fazla bitkide doğal olarak üretilmektedir (Sharma vd. 2006). İnülin, sakkaroz olarak veya inülin şurubu olarak hindiba köklerinden üretilmektedir (Altunbaş 2013). Bu, % 95 oranında fruktoz üretilebilen tek adımlı bir yöntemdir (Singh vd. 2006). Papatyagil ve buğdaygil familyasından birçok bitkide bulunmaktadır. İnülin yoğun olarak, yıldızçiçeği, yer elması ve hindibanın toprak altında kalan köklerinde görülmektedir (Altunbaş 2013). Bu üretim için diğer alternatif ürünler özellikle Güney Avrupa ülkelerindeki kudüs enginarıdır. Kudüs enginarının büyüme evresi boyunca fruktoz polimerleri, çiçeklenmenin geç dönemine kadar saplarda biriktirilir ve sonra yumrulara aktarılır ve depolanır. Kudüs enginarının yanı sıra, buğdayda da inülin içeriği üzerine kapsamlı çalışmalar yapılmıştır (D'egidio vd. 1998). İnülin içeren bazı bitkiler Çizelge 2.2'de verilmiştir (Altunbaş 2013).

Çizelge 2.2. İnülin İçeren Bazı Bitkiler.

Kaynak	Bitkisel kısım	İnülin içeriği (% kuru maddede)
Soğan	Balb	2-6
Yer elması	Yumru kök	14-19
Yıldızçiçeği	Yumru kök	9-12.5
Hindiba	Kök	15-20
Pırasa	Balb	3-10
Sarımsak	Balb	9-16
Enginar	Yaprakların ana kısmı	3-10
Muz	Meyve	0.3-0.7
Çavdar	Tahıl	0.5-1
Arpa	Tahıl	0.5-1.5
Karahindiba	Yapraklar	12-15
Dulavrat otu	Kök	3.5-4
Kamas	Balb	12-22
Murneng	Kök	8-13
Yakon	Kök	3-19
Tekesakalı çiçeği	Kök	4-11

Endüstriyel ölçekte inülin üretimi için ana kaynaklar; hindiba, yer elması ve yıldız çiçeği bitkileridir. İnülinin dünya pazarında üretimi 350.000 ton olduğu söylenmekte ve bunun büyük çoğunluğunu da Belçika, Fransa, Hollanda ve Şili'nin oluşturduğu bildirilmektedir. Fermentasyonlarda karbon kaynağı olarak saf inülin kullanılmasının enzim aktivitesini, saf olmayan inülin kullanıldığında ki enzim aktivitesine göre 1.6 kat arttırdığı bilinmektedir (Sarı 2014).

Kaynağı ne olursa olsun doğal inülin, her zaman glukoz, fruktoz, sakkaroz ve bazı küçük oligosakkaritleri içermektedir. Bu maddeye doğal inülin denilmesinin sebebi; inülinin, bitkinin taze köklerinden ekstrakte edildiğini ifade etmektedir ve bu sırada da bitkinin kendi inülinaz aktivitesi ve asit hidrolizi göz ardı edilmektedir. Yapısal veya polimerik açıdan inülin; dairesel bir merdivenin basamakları gibi polioksietilen bir iskelete tutunmuş fruktoz moleküllerinden oluşur (Atlıhan 2011). İnülin gibi bitkisel fruktanlar birçok Avrupa ülkesinde doğal katkı maddesi olarak kabul edilirken, Amerika'da da zararsız olarak nitelendirilmektedir (Karatop 2012).

2.5.1. İnülinin fizikokimyasal özellikleri

İnülin, bir uç sakkaroz molekülüne bağlı β - (2,1) fruktoz kalıntılarının doğrusal zincirlerinden oluşan bitkilerde yaygın bir polifruktandır. Bu depolama polimeri, Asteraceae ve Compositae familyalarının çeşitli bitkilerindeki yer altı organlarında birikmektedir (Gill vd. 2003). İnülin, nişastaya benzer bir polisakkarittir; Yeni hindiba içindeki konsantrasyonu 100 g hammadde başına yaklaşık 13-23 g'dir (Wilson vd. 2004). Günümüzde inülin, yüksek kaliteli ve tatlı ürünlerin üretimini sağlayan gıda endüstrisinin önemli bir maddesi haline gelmiştir. Jelleşme özelliği sayesinde, süt ürünlerinde, et ürünlerinde, soslarda ve çorbalarda % 100'e kadar yağ yerini alabilir, böylece yüksek kaliteli diyet gıdalarının üretimine olanak sağlar. İnülin tabletler de diyet lifi veya şeker yerine kullanılabilir (Loginova vd. 2010). İnülin ve oligofruktozun, besleyici özelliklerinin yanısıra önemli teknolojik avantajlar sunan fonksiyonel gıda bileşenleri de vardır. Pek çok sebze ve meyvede bulunurlar ve hindiba köklerinden endüstriyel olarak elde edilebilirler (Franck 2002). Hindiba inülin üretiminde yaygın kullanılan bir gıda katkı maddesidir. Hindiba köklerinden inülin üretim koşulları 70-80°C sıcaklıkta yaklaşık 1.5 saat süren ekstraksiyon işlemi ile üretilir (Zhu vd. 2015). Zengin fruktoz şurupları elde etmek için nispeten ucuz ve bol miktarda substrat olarak kullanılan inülin; önemli bir endüstriyel ilgi alanına sahiptir (Nagem vd. 2004). Fruktoz şurubu diyabetik hastalarda yararlı etkilere sahiptir; çocuklarda demir emilimini artırır, yüksek tatlandırıcı kapasiteye sahiptir, bu nedenle obez kişilerin diyetlerinde kullanılabilir, postmenopozal kadınlarda kalsiyum emilimini uyarır, kalın ve ince bağırsakta Bifenobakterilerin büyümesini uyarır, kolon kanserini önler ve yağ benzeri doku nedeniyle diyet lifi olarak kullanılır (Gill vd. 2003). Yüksek fruktoz içerikli bu şuruplar 80-100°C'de inülinin asit hidroliziyle elde edilir. Bununla birlikte, bu koşullar altında fruktoz kolayca ayrışır ve difruktoz anhidritleri gibi renkli ürünlerde meydana gelir (Nagem vd. 2004). İnülin (Şekil 2.2), sakkaritlerin sindirimini yavaşlatır, kan şekeri seviyesini dengede tutar. Beyaz, tatsız bir madde olup soğuk suda az çözünürken, sıcak tuzlu su içerisinde iyi çözünebilmektedir. Asitlerle hızla hidrolize olan inülin prebiyotik özelliği nedeniyle gıda sanayinde çok yaygın bir kullanıma sahiptir (Fırıncıahmetoğlu 2013). İnülin ve diğer polifruktozitler ağırlıklı olarak yüksek fruktozlu şuruplar, gıdalar ve etanol üretimi yanı sıra gıda dışı sanayi için de kullanılır (Meijer vd. 1993).



Şekil 2.2. İnülinin Fiziksel Olarak Görünümü

İnülinin molekül ağırlığı zincir uzunluğundaki değişiklikler nedeniyle $\pm 3500-5500$ arasında değişir (Pandey vd. 1999) ve polimerleşme derecesi <200 olup bu değer bitkinin türüne, iklim durumuna ve olgunluk düzeyine göre değişiklik göstermektedir (Altunbaş 2013). Geleneksel olarak fruktoz, nişastanın çoklu enzimatik hidroliziyle ya da sakkaroz ve nişastadan asit hidroliziyle elde edilen glikozun izomerleştirilmesi ile elde edilir. Çeşitli yan etkileri ve daha az verim nedeniyle bu yöntemler tercih edilmez. İnulinaz kullanarak hidroliz, yüksek fruktoz şurubu üretimi için cazip bir alternatiftir (Singh vd. 2006).

İnülinaz ve invertaz enzimleri, hem inülinin hem de sakkarozun hidrolizini katalize edebilme yeteneğine sahiptir. Ancak inülinaz, invertaza göre daha yüksek bir özgülük değerine sahiptir. Bu enzimler geçmiş yıllarda bitkilerden izole edilerek kullanılmaktaydı ve bu yüzden de yüksek verim elde edilememekteydi. Yapılan çalışmalar mikrobiyal enzimlerin daha yüksek miktarda inülin hidrolize edebildiğini göstermiştir. Mikrobiyal inülinaz ve invertaz enzim kullanımı geniş bir endüstriyel uygulama potansiyeline sahiptir (Dinarvand vd. 2017). Son yıllarda bakteriler (*Clostridium* sp., *Xanthomonas* sp., *Bifidobacterium* sp., *Geobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Thermotoga* sp., *Pseudomonas* sp.), maya (*Kluyveromyces* sp.) ve filamentli mantarlar (*Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp.), inülinaz üretimi için geniş bir yelpazede kullanılmıştır (Dinarvand vd. 2012a).

2.6. Invertaz

Invertaz (β -D-fructofuranosit fruktohidrolaz, E.C. 3.2.1.26) gıda endüstrisinde kullanılan önemli ticari enzimlerden biridir ve biyokatalizörler olarak tanımlanan ilk proteinlerden bir tanesidir (Shaheen vd. 2008). Sakkarozun glukoz ve fruktoza ayrıştırılmasını katalize eder (Rubio ve Maldonado 1995). Sakkaroz hidrolizi ya $75-80^{\circ}\text{C}$ 'de hidroklorik asit ile ya da $35-45^{\circ}\text{C}$ 'de invertaz enzimi ile gerçekleştirilir. Enerji ekonomisi, çevresel güvenlik ve yan ürünlerin az oluşumu gibi bilinen avantajlar açısından enzimatik prosesler tercih edilmektedir (Ahmed 2008). Invertaz ile elde edilen hidrolize şeker karışımı, asit hidrolizi ile elde edilen renkli ürünlerin aksine renksiz olma avantajına sahiptir (Shaheen vd. 2008). Genellikle enzimatik invert şeker tamamen sağlıklı bir tatlandırıcıdır. Invertaz, sıvı veya yumuşak şekerleme üretiminde, şeker pekmezinin etanole fermentasyonunda, buzağı yemi hazırlanmasında ve ayrıca bal arıları için tersine şeker üretiminde kullanılmaktadır (Ahmed 2008). Ayrıca günümüzde, farklı kaynaklardan gelen invertaz; arı besleme, çerezler, organik asitlerin üretimi, çikolata

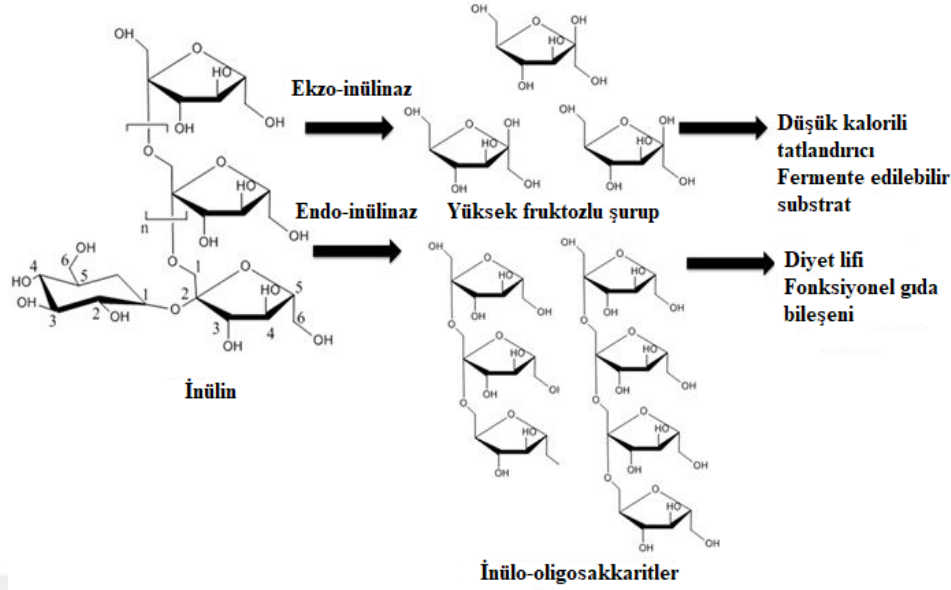
üretimi ve alkol üretimi (*Saccharomyces cerevisie*) gibi pek çok farklı endüstriyel uygulamaya sahip fruktoz şurubunun sentezi için de kullanılmaktadır (Shaheen vd. 2008). İnvert şeker üretiminde genellikle serbest ya da hareketsiz hücreler kullanılmaktadır. Hareketsizleştirilmiş hücreler, biyotransformasyon, biyosensörler, etanol üretimi, fenolün parçalanması gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (Ahmed 2008). Mayalardan ve *Neurospora* sp. türlerinden üretimi geniş aralıklarla incelenmiştir. İnvertaz enzimi glikoproteindir ve mannoz karbonhidrat parçasının ana bileşenidir (Rubio ve Maldonado 1995). İnvertaz, sakkarozu hidrolize edebilirken fruktozu inülinde parçalayamaz (Kaur vd. 1992).

2.7. İnülinaz

Bitkilerde nişastadan sonra en yaygın olarak bulunan polisakkaritlerden biri fruktanlardır. İnülin β -(2-1)-D-fruktozil-fruktoz yapısı içeren, sakkaroz birimiyle sonlanmış bir fruktandır. (Altunbaş 2013). İnülinin asit hidrolizi veya nişastanın enzimatik hidrolizi ve modifikasyonu ile fruktoz elde edilebilir. Ancak inülinin suda iyi çözünmemesi nedeni ile yüksek sıcaklık derecelerinde (80-100°C) asitle hidrolizi yapıldığında difruktoz anhidrid gibi istenmeyen ürünler ve renk meydana gelmekte ayrıca verim de düşük olmaktadır. İnülinaz (2-1- β -D-fruktan fruktanohidrolaz, EC 3.2.1.7) fruktoz zincirinin indirgeyici olmayan ucundan fruktozu serbest bırakan bir enzim türüdür. İnülinaz ile inülinin enzimsel hidrolizinden sonra % 90-95 fruktoz ve % 5-10 glukoz elde edilir. Dolayısıyla inulinaz, nişastanın enzimatik hidrolizi ile fruktoz üretiminde bulunan α -amilaz, amiloglukosidaz ve glikoz izomerazın kullanımını içeren üç aşamalı üretim prosedürünün yerini alabilir (Kaur vd. 1992). İnülinazlar, inulin gibi fruktanların (2,1) bağlarını parçalayan enzimlerdir. İnülinaz, etki tarzlarına bağlı olarak endo- ve ekzo-inulinazlar olarak sınıflandırılır. Genellikle uyarılabilir ve ekzo-aktif edici enzimlerdir (Gill vd. 2003). İki mekanizma kullanarak hareket ederler (Abdulameer vd. 2015):

1. Ekzo-inulinazlar (EC 3.2.1.80; β -2-1-D-fruktan fruktohidrolaz) sakkarozu hidrolize edebilirler ve inülin hidrolizini polimer yapıdaki uç fruktozil ünitelerindeki (D-fruktoz) glikozidik bağları kırarak parçalarlar (Vijayaraghavan vd. 2009),
2. Endo-inulinazlar (EC 3.2.1.7; β -2-1-D-fruktan fruktanohidrolaz) inülin içindeki iç bağlantıları hidrolize ederek reaksiyon ürünleri olan inulo-oligosakkaritlerin ortaya çıkmasını sağlar (Abdulameer vd. 2015).

İnülin, mikrobiyal endo ve ekzo-inülinaz tarafından etkilenir. Ekzo-inülinazın fonksiyonu makromolekülden fruktoz salgılamak iken, endo-inülinaz inülo-oligosakkaritleri üretmektedir (Jiang vd. 2017).



Şekil 2.3. Ekzo ve endo-inülinazın fonksiyonu.

Ekzo-inülinaz fruktoz şurubu üretmek için kullanılırken, endo-inülinaz ise fruktooligosakkaritleri elde etmek için kullanılmaktadır (Singh ve Chauhan 2017). Endo-inülinazlar birçok mikroorganizmadan izole edilebildiği halde inülooligosakkaritlerin endüstriyel üretiminde genellikle ekzo-inülinazlar kullanılmaktadır. İnülinazlar ve ekzo-inülinazlar (EI) ile enzimatik hidroliz, istenmeyen yan ürünlerden arındırılmış fruktoz üretmek için alternatif bir yaklaşım sunar. İnülinazların başarılı biyoteknolojik uygulamaları bu enzimlere olan önem artmıştır (Nagem vd. 2004). Yüksek fruktozlu şurup üretimi ve fruktooligosakkaritler, inulinazların iki önemli uygulamasıdır (Singh ve Chauhan 2017). Elde edilen bu fruktoz şurubu, çocuklarda demir absorpsiyonu artırma, menopozdaki kadınlarda kalsiyum emilimini iyileştirme, yüksek alkollü kişilerin kanından etanolün alınmasını artırma (alkolik madde) ve bağırsak florasında *Bifidobacteria* gibi yararlı mikroorganizmaların popülasyonunun artırılması için prebiyotik olarak kullanılmasını destekler (Dinarvand vd. 2012b). İnülinazın diğer önemli uygulamaları, etanol, inülo-oligosakkaritler, glukonik asit, sorbitol, pullulan, aseton-bütanol (Singh vd. 2006) tek hücreli yağ, laktik asit, sitrik asit, tekila vb. üretiminde kullanılmasıdır (Singh ve Chauhan 2017). İnülinaz üretimi, ortam bileşimi ve fermentasyon için kullanılan organizmanın tipinden etkilenir. Bir enzimin ticari olarak üretilmesi için, yüksek verimli mikroorganizma, ucuz hammadde ve ölçeklendirme fizibilitesi gibi faktörler düşünülür (Singh vd. 2006). İnülinaz üretimi için glukoz, fruktoz, laktoz vb. saf substratlar kullanılmış ancak inülin (ham veya saf) en iyi enerji kaynağı olarak düşünülmüştür (Singh ve Chauhan 2017).

İnülinazın birçok mikrobiyal preparatı, inülinaz aktivitesiyle birlikte dikkate değer bir invertaz-tip aktivitesine sahiptir. bu preparatların katalitik aktivitesi, enzim aktivitesinin inülin ve sakkaroz oranını temsil eden I/S oranı cinsinden tanımlanmaktadır. I/S oranı inülin ve sakkaroz için her bir enzimin afinitesinde farklılıklar yansıtabilen yararlı bir kriterdir. Bu oran, invertaz-tip (sakkaroz (S)) ile inülinaz (inülin (I)) aktivitesi arasındaki ilişkiyi göstermektedir (Çizelge 2.3) (Jain vd. 2012). Çeşitli karbon kaynakları ile yetiştirilen *A. niger*'in fermentasyon sonucu I/S oranlarında büyük bir fark

görülmüştür. Literatürde bu oranın 0.02-7.9 aralığında olduğu bildirilmiştir. I/S oranı enzimlerin karakterizasyonu için kullanılan, son derece yüksek spesifik bir aktiviteye sahip orandır (Jain vd. 2012).

Çizelge 2.3. İnülinaz ve invertaz-tip aktivitesi arasında ki ilişki.

Karbon Kaynağı	İnülinaz (U/mL)	İnvertaz-tip (U/mL)	I/S
Fruktoz	8.67 ± 1.069	353.91 ± 0.927	0.024
Glukoz	4.80 ± 0.313	227.63 ± 0.819	0.021
Sükroz	9.67 ± 0.344	432.17 ± 1.023	0.022
İnülin	17.86 ± 0.769	880.09 ± 1.291	0.020
Yıldız çiçeği	25.30 ± 1.384	945.95 ± 1.198	0.027

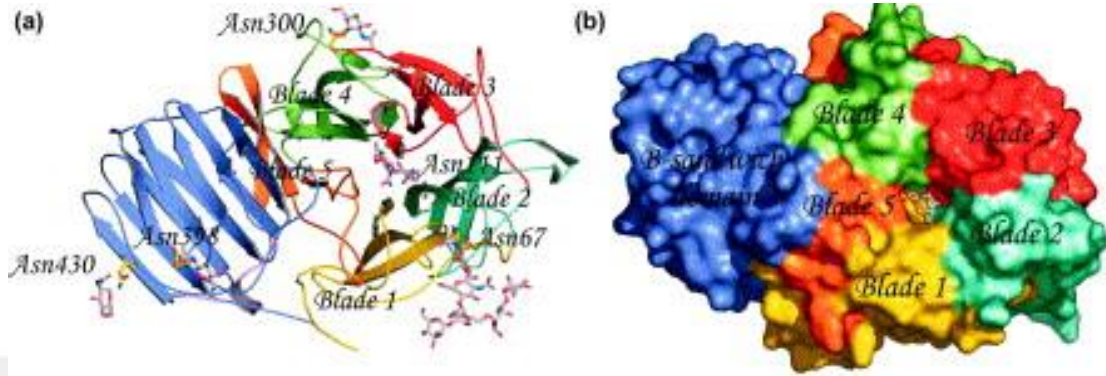
İnülinaz ve invertaz-tip aktiviteleri, Nelson'un metodu kullanılarak inülin ve sakkaroz serbest indirgeyici şekerlerin ölçülmesi ile analiz edilir (Sarı 2014).

I/S oranı = inülinaz aktivitesi/invertaz-tip aktivitesi'dir. I/S oranı, enzimin inülinaz mı yoksa invertaz mı olduğunu anlamamıza yardımcı olur. Eğer bu değer, 10^{-2} 'den büyükse enzim inülinaz doğasındadır. Eğer bu oran 10^{-4} 'ten küçük ise enzim invertaz doğasındadır (Ettalibi ve Baratti 1987). Dolayısıyla, I/S oranını belirleme ile enzimin inülinaz mı yoksa invertaz mı olduğunu anlamaktayız. Eğer S/I oranı 50'den düşük ise enzimin inülinaz doğasında, eğer bu oran 50'den büyük ise enzim invertaz doğasındadır (Kalil vd. 2001; Vandamme ve Derycke 1983).

İnülinaz ve invertaz hem inülin hem de sakkarozun hidrolizini katalize eder fakat inülinaz enzimi, inülin için, invertazdan daha yüksek bir özgülüğe sahiptir. Bu enzimler başlangıçta bitkilerden izole edilmiştir ancak zor bir işlem olmasından dolayı yüksek verim sağlanamamıştır. Ayrıca enzim bazlı teknolojilerde maliyetli metotların uygulanması sebebiyle enzim üretimi ekonomik olmamaktadır. Bitki enzimlerinin aksine, mikrobiyal enzimler ise inülini hidrolize etmede yüksek aktivite gösterirler. Mikrobiyal inülinaz ve invertaz, endüstriyel ve eczacılık uygulamalarında geniş bir potansiyele sahiptir (Dinarvand vd. 2017).

İnülinazlar çeşitli küf türlerinden üretilir (Abdulameer vd. 2015). Küflerin tercih edilme sebepleri; düşük maliyetli substrat üzerinde geliştiriliyor olması ve fungal enzimlerin yüksek sıcaklık ve düşük pH değerlerinde daha kararlı oluşudur (Singh ve Chauhan 2017). *Penicillium*, *Kluyveromyces* ve *Aspergillus* tarafından üretilen inülinazlar, bu sınıfta en yoğun olarak incelenen fungal enzimlerdir (Nagem vd. 2004). *Aspergillus* cinsi en önemli ipliksi mantar cinslerinden biridir. *Aspergillus* türleri fermentasyon endüstrisinde kullanılır, ancak çeşitli bitki ve gıda ikincil çürümelerinden sorumludurlar. *Aspergillus niger*, bitki lignoselülozunun parçalanmasına ilave edilen çok çeşitli hidrolitik ve oksidatif enzimlere sahip olan bir küf türüdür. Biyoteknoloji endüstrisinde *A. niger*'den elde edilen bu enzimler çok önemlidir. Endüstriyel amaçlar için enzim üreten bir yöntem olan fermentasyon ile *A. niger*'den inülinaz üretimi yapılabilir. Fermentasyon, enzimleri üretmek için bakteri ve maya gibi mikroorganizmaların kullanılmasını içerir. Enzimleri üretmek için kullanılan iki fermentasyon yöntemi vardır. Bunlar sıvı kültür fermentasyon (SmF) ve katı kültür fermentasyondur (SSF). Biyoteknoloji çalışmalarında SSF'den lipaz, inülinaz, proteaz

gibi birçok enzimin üretimi önem kazanmıştır. *A. niger*'den SSF ile üretilen inülinazın temel avantajlarından bazıları; düşük maliyetli atık kullanımı, düşük enerji gereksinimi, düşük atık su üretimi, ürün stabilitesi ve düşük üretim maliyetleridir (Abdulameer vd. 2015). Ekzo-inülinazın temsili 3 boyutlu yapısı ve aktif bölgeleri Şekil 2.4'te gösterilmiştir (Nagem vd. 2004).



Şekil 2.4. (a) Ekzo-inülinaz ikincil yapı elemanları şerit gösterimi (Nitrojenaz kompleksi α (gri, yeşil) ve β (pembe, sarı) zincirler, nitrojenaz demir proteini (mor, mavı, kırmızı, altın) **(b)** Aktivite alanındaki fruktoz molekülü ile ekzo-inülinaz yüzeyinin temsili.

2.7.1. İnülinaz üreten mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar, yüksek enzim veriminin yanı sıra son ürüne kolay ulaşılabilirliği ile ticari üretim için en iyi kaynaklardır (Chi vd. 2009). Mikrobiyal inülinazlar, son yıllarda oldukça dikkat çeken endüstriyel enzimler sınıfında yer almaktadırlar. İnülinazlar mantar, maya ve bakteri de dâhil olmak üzere bir dizi mikroorganizma tarafından üretilmektedirler. *Aspergillus* sp. (filamentous fungus) ve *Kluyveromyces* sp. (diploid maya) türleri ticari uygulamalar için tercih edilen önemli seçenekler arasındadır. Fermentasyon tekniği olarak ise SmF yaygın olarak kullanılmaktayken, SSF teknolojisi de geliştirilmeye çalışılmaktadır (Pandey vd. 1999).

Günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda yüksek seviyede inülinaz üretebilen mikroorganizmaların *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Bacillus* spp, *Clostridium* spp, *Pseudomonas* spp, *Arthrobacter* spp, *Staphylococcus* spp, *Xanthomonas* spp, *Kluyveromyces* spp, *Cryptococcus* spp, *Pichia* spp, *Sporotrichum* spp ve *Candida* spp suşları olduğu görülmektedir. Ayrıca maya suşlarının mantar ve bakteri suşlarına göre daha fazla inülinaz üretebileceği de yapılan çalışmalarca ortaya konmuştur. Mayalar arasında, *Pichia* sp., *Kluyveromyces fragilis*, *Cryptococcus aureus* ve *Kluyveromyces marxianus*'un iki suşunun, ticari olarak enzim üretme potansiyeline sahip olduğu kabul edilmiştir (Chi vd. 2009). İnülin içeren bazı mikroorganizmalara ait fermentasyon teknikleri ve bu mikroorganizmaların gösterdikleri inülinaz aktiviteleri Çizelge 2.4'de verilmiştir (Chi vd. 2009).

Çizelge 2.4. İnülinaz Üreten Mikroorganizmalar ve İnülinaz Aktiviteleri.

İnülinaz	Üretici Mikroorganizma	Fermentasyon Tekniği	İnülinaz Aktivitesi	Referans
Ekzo-	<i>Aspergillus niger</i> A42	SmF	54 U/mL	(Öngen-Baysal vd. 1994)
Ekzo-	<i>Aspergillus niger</i> AUP19	SmF	176 U/mL	(Kumar vd. 2005a)
Ekzo-	<i>A. niger</i> NK-126	SmF	55 U/mL	(Kango 2008)
Ekzo-	<i>A. niger</i> 13/36	SmF	80 U/mL	(Skowronek ve Fiedurek 2004b)
Ekzo-	<i>C. aureus</i> G7a	SSF	420.9±1.3 U/g kuru zemin	(Sheng vd. 2008)
Ekzo-	<i>P. guilliermondii</i>	SmF	61.5±0.4 U/mL	(Gong vd. 2007)
Ekzo-	Mutant M-30 of <i>P. Guilliermondii</i>	SmF	127.7±0.6 U/mL	(Yue vd. 2008)
Ekzo-	Mutant M-30 of <i>P. Guilliermondii</i>	SSF	455.9±1.2 U/g kuru substrat	(Guo vd. 2009)
Ekzo-	<i>K. marxianus</i> (A1 ve A2)	SmF	< 32 U/mL	(Cruz-Guerrero vd. 2006)
Ekzo-	<i>K. marxianus</i> ATCC 16045	SmF	121 U/mL	(Silva-Santisteban ve Maugeri Filho 2005)
Ekzo-	<i>Kluyveromyces</i> sp. Y-85	SmF	59.5 U/mL	(Wei vd. 1998)
Ekzo-	<i>K. marxianus</i> YS-1	SmF	55.4 U/mL	(Singh vd. 2007)
Ekzo-	<i>K. marxianus</i> var. <i>Bulgaricus</i>	Continuous cultivation (sürekli ekim)	107 U/mL	(Kushi vd. 2000)
Ekzo-	<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	SSF	391.9 U/g kuru fermente küspe	(Bender vd. 2006)
Ekzo-	<i>K. marxianus</i> NRRL Y-7571	SmF	8.87 U/g saat başına kuru sustrat	(Mazutti vd. 2006)
Ekzo-	<i>Kluyveromyces</i> S120	SSF	409.8 U/g başlangıçtaki kuru substrat	(Xiong vd. 2007)
Endo-	<i>Penicillium</i> sp. TN-88	SmF	9.9 U/mL	(Nakamura vd. 1997)
Ekzo-	<i>C. aureus</i> G7a	SmF	85.0±1.1 U/mL	(Sheng vd. 2007)
Ekzo-	<i>Streptomyces</i> sp. GNDU 1	SmF	0.552 U/mL	(Gill vd. 2006)
Ekzo-	<i>Staphylococcus</i> sp	SSF	107.6 U/g kuru fermente substrat	(Selvakumar ve Pandey 1999)

İnülinaz enzimi ile ilgili literatürde birçok çalışma yapılmıştır. %1 yer elması bulunan medya içeriğinde %0.23 NH_4NO_3 , %0.37 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, %0.1 KH_2PO_4 , %0.05 MgSO_4 ve %0.15 maya ekstraktı kullanılıp başlangıç besiyeri pH değeri 5'e ayarlanmıştır. 50 ml medya/250 ml flask 28°C sıcaklık ve 200 rpm çalkalama hızında *Aspergillus niger* A42 ile 5 gün boyunca fermentasyona bırakılmış ve 120. saatte enzim aktivite değeri 50 U/mL, 192. saatte ise 54 U/mL olarak bulunmuştur (Öngen-Baysal vd. 1994).

Food Research Department-UAC'den temin edilen toprak ve bitkilerden izole edilmiş 21 farklı mantar suşu ve Chemical Engineering Department-CUCEI'den temin edilen 6 farklı termofilik ve thermotolerant küf, inülinaz enziminde kullanılmıştır. 10 g/L inülin, 7.65 g/L NaNO_3 g/L, 3.04 KH_2PO_4 g/L, 1.52 MgSO_4 g/L ve 1.52 g/L KCl bulunan medya içeriğinden kültür ortamı 30 ml/250 ml flask, 37°C'de ve 200 rpm çalkalama hızında 96 saat fermentasyona bırakılmış ve inülinaz aktiviteleri minimum 1.52 U/mL (*Penicillium citrinum* ESS), maksimum 4.90 U/mL olarak bulunmuştur (*A. fumigatus*) (Flores-Gallegos vd. 2015).

Ekstraselüler inülinaz üretimi için tek karbon kaynağı olarak inülin içeren sentetik ortamda farklı toprak numunelerinden 50 suş izole edilmiştir. Bunlardan 5 izolat (AUP4, AUP9, AUP18, AUP19 ve AUP20) yüksek inülinaz aktivitesi göstermiş ve maksimum enzim aktivitesi veren *Aspergillus niger* AUP19 suşu ayrıntılı taksonomik ve optimizasyon çalışmaları için seçilmiştir. İnülinaz üretimi için çeşitli fiziksel ve kimyasal parametreler (farklı inkübasyon süreleri, kullanılan farklı mantar suşları, farklı karbon kaynakları kullanımı (maltoz, galaktoz), çeşitli inorganik azot kullanımı ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$), farklı organik azot kaynakları (sodyum nitrat, mısır maserasyon sıvısı ve pepton)) optimize edilmiştir. Sonuç olarak; inkübasyon süresi 72 saat, inülin konsantrasyonu %5 (w/v), sıcaklık 28°C, başlangıç besiyeri pH değeri 6.5, inokülasyon oranı %10 (v/v) ve çalkalama hızı 220 rpm olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında inülinazın maksimum üretkenliği 176 U/mL olarak tespit edilmiştir (Kumar vd. 2005a).

Aspergillus niger ATCC 20611 kullanılarak en yüksek ekstraselüler inulinaz aktivitesi (3199 U/mL) %25 (w/v) sakkaroz, %0.5 (w/v) et ekstraktı, %1.5 (w/v) NaNO_3 ve 2.5 mM (v/v) Zn^{2+} varlığında elde edilmiştir. Elde edilen medya için fermentasyon koşulları 6.5 başlangıç pH, 35°C sıcaklıkta, % 10 (v/v) spor süspansiyonu ve 100 devir/dakika karıştırma hızı olarak belirlenmiştir (Dinarvand vd. 2012a).

Aspergillus tarafından, inülinaz üretimini optimize etmek için simpleks yöntemi kullanılmıştır. 50 g/L sakkaroz, 20 g/L yeast extract, 20 g/L NaNO_3 , 5 g/L K_2HPO_4 , 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren medya 100 ml medya/500 ml flask oranında hazırlanmış ve %2 *Aspergillus niger* 13/36 inokülasyon yapılmıştır. Fermentasyon 30°C'de 220 rpm'de 4 gün sürdürülmüş ve ekstraselüler enzim aktivitesi yaklaşık 80 U/mL elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar 'Her Defada Tek Etken' metodu sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Buna göre Simpleks yöntemi 1.6 kat daha üstün çıkmıştır. Bu yöntemin en büyük avantajı, optimum faktör düzeylerinin sadece 12 tekrarlayıcı adımda belirlenmiş olmasıdır (Skowronek ve Fiedurek 2004b).

Bir başka çalışmada ise; inülinaz enzimi için kültür ortamı; %1 w/v kurutulmuş enginar tozu, 0.023% NH_4NO_3 , 0.037% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% MgSO_4 , 0.15% yeast ekstraktı içermektedir. 150 mL medya/500 mL flask oranında konulan besiyerinin başlangıç pH değeri 5 olarak ayarlanmış ve fermentasyon 28°C sıcaklıkta ve 200 rpm çalkalama hızında 120 saat süreyle gerçekleştirilmiş. *A. niger* A42 ve *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 suşlarının karışık kültürü kullanılarak gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda 43.7 U/mL inülinaz elde edilmiş (Öngen vd. 1996).

A. niger ATCC 20611 suşu ile % 10 (w/v) sakkaroz, %2.5 (w/v) maya ekstraktı, %2 (w/v) NaNO_3 , 1.5 mM (v/v) Zn^{+2} , 1% (v/v) Triton X-100 içeren besiyeri ortamının başlangıç pH değeri 6'ya ayarlanmış, 50 ml medya/250 ml'lik erlenmayerlere aktarılmıştır. %6 (v/v) mikroorganizma inokülasyonu yapıldıktan sonra 30°C sıcaklık, 150 rpm çalkalama hızında 96 saat fermentasyona bırakılmıştır. Çalışmada deney tasarımı için Cevap Yüzey Metodu kullanılmış ve metot Design Expert (Versiyon 6.06, Stat-Ease Inc. Minneapolis, ABD) istatistik programı ile belirlenmiştir. Sonuç olarak; maksimum hücre içi ve hücre dışı inulinaz 2801 U/mL ve 3949 U/mL, hücre içi ve hücre dışı invertaz-tip aktivitesi 2193 U/mL ve 4954 U/mL ve biyokütle 77.7 mg/mg olarak bulunmuştur (Dinarvand vd. 2017).

Ayçiçeği rizosferinden izole edilen *Aspergillus niveus* 4128 URM inülinaz enzimi üretiminde yeni bir kaynak olarak gösterilmiştir. 10, 15 ve 20g/L konsantrasyonlarda inülin substratı içeren kültür ortamında (2.3 g/L NH_4NO_3 , 3.7 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L MgSO_4 , 1.5 g/L maya ekstraktı) üretimi gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon şartları pH 5, 50 ml/250 ml medya hacmi/erlen hacmi, 280 rpm çalkalama hızı, 28 °C sıcaklık ve 96 saat olarak uygulanmıştır. Maksimum enzim aktivitesi 20 g/L inülin içeren ortamda elde edilmiştir. Enzim, amonyum sülfat çökeltmesi, ardından iyon yüklemesi (DE-32) ve jel filtrasyon (Sephadex) kromatografisi kullanılarak kısmen saflaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, ham özütten elde edilen inülinazın optimum pH değerinin 4.0 ve 4.8 aralığında ve sıcaklığının 45°C olduğunu göstermiştir. Enzim 53.63% verim ile 34.65 kat saflaştırılmıştır. Sonuç olarak da, *A. niveus* 4128 URM mikroorganizmasının gıda endüstrisinde inülinaz üretiminde kullanılabilir olduğu saptanmıştır (Souza-Motta vd. 2005).

Streptomyces sp. GNDU 1, pH 7.5, sıcaklık 46°C ve %1 inülin varlığında 24 saat fermentasyon sonucunda yüksek seviyelerde hücre dışı inülinaz (0.552 IU/mL) üretmiştir. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 60°C ve 5.5 olarak tespit edilmiştir. Maya ekstraktının inülinaz üretimi için en uygun azot kaynağı olduğu bulunmuşken, amonyum iyonunun enzimatik üretim için önemsiz olduğu saptanmıştır. Bu çalışma ile de inülinaz üretiminde *Streptomyces* sp. GNDU 1'in potansiyel bir aday olduğu sonucuna varılmıştır (Gill vd. 2003).

Deniz yüzeyinden izole edilen deniz mayası suşunun ortamda fazla inülinaz salgıladığı fark edilince gerekli araştırmalar neticesinde bu maya *Pichia guilliermondii* suşu olarak tanımlanmıştır. Fermentasyon koşullarının; pH: 8, 28 °C sıcaklık, 170 rpm çalkalama hızı olduğu ve besiyeri formülasyonunda %4 (w/v) inülin, %0,5 (w/v) maya özütü ile birlikte 48 saat süren fermentasyon sonucunda 60 U/mL'den fazla inülinaza ulaşılmıştır (Gong vd. 2007).

Karbon kaynağı olarak sakkaroz kullanılan ve *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 suşu tarafından gerçekleştirilen çalışmada; havalandırma (0.5-2 vvm), çalkalama (50-550 rpm) ve türbin çarkların (disk türbin, eğimli bıçak) farklı kombinasyonlarda karıştırıldığı reaktörde bu parametrelerin enzim üretimine etkisi araştırılmıştır. Havalandırma oranı enzim üretiminde daha az önemli görülürken, karıştırma hızında ki artış hücre ölümlerine sebep olduğundan dolayı enzim aktivitesini düşürmüştür. Pervane tipinin de aktiviteye etkisinin önemi bu çalışmada vurgulanmıştır. 450 rpm çalkalamada disk pervanesi ve 1.0 vvm havalandırma sonucu 121 UI/mL inülinaz elde edilirken aynı çalışma koşullarında pervane tipi eğimli bıçak olarak değiştirildiğinde 176 UI/mL aktivite elde edilmiştir (Silva-Santisteban ve Filho 2005).

Deniz mayası *Pichia guilliermondii*'den inülinaz üretici hücreleri ayırmak için UV ışığı ve LiCl kullanılmış ve mutant M-30 suşu elde edilmiştir. Fermentasyon koşullarının optimizasyonu için RSM metodu kullanılmış ve sıvı fermentasyon ortamında M-30 suşu ile inülinaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiştir. Maksimum inülinaz üretimi için; 20 g/L inülin, 5.0 g/L maya özütü ve 20 g/L NaCl bulunan besiyeri ortamı, pH 6.5 ve 28°C sıcaklık koşullarında fermentasyona bırakılmıştır. Mutant M-30 suşunun optimize edilmiş koşullarda sıvı kültüründe maksimum inülinaz aktivitesi 127.7 U/mL olarak kaydedilmiştir (Yu vd. 2009).

2.8. *Aspergillus niger*

A. niger, biyoteknoloji alanında kullanılan en önemli mikroorganizmalardan biridir ve son yıllarda araştırma ve endüstriyel kullanımı konusu olmuştur. Zaten çok uzun yıllardır hücre dışı enzimler sitrik asit üretmek (1919) için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, 1960'lardan beri, *A. niger*, meyve işleme, fırınlama ve nişasta ve gıda endüstrisinde iyi bilinen çeşitli enzimlerin kaynağı haline geldi. Son yıllarda yapılan yoğun araştırmalar bir dizi yeni süreç ve ürünle sonuçlandı. Sitrik asit ve birçok *A. niger* enzimi U.S. FDA (Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından GRAS (The Generally Recognized as Safe, Genel Olarak Güvenli Kabul Edilir) olarak kabul edilir. Glukonik ve fumarik asitler *A. niger* ile üretilmiştir ancak ekonomik öneme sahip değildirler. Ayrıca, *A. niger*, biyotransformasyonlar ve atık işleme için kullanılmaktadır (Vijayaraghavan vd. 2009). Ayrıca, bu mikroorganizma son yirmi yıldır biyotransformasyon ve atık işleme alanında ki çalışmalarda da önem arz etmektedir. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization, Gıda ve Tarım Örgütü/ World Healthy Organization, Dünya Sağlık Örgütü) defalarca gözden geçirmiş ve *A. niger*'in kendisi ve ondan üretilen enzim preparatlarının günlük kullanıma uygun olduğu kabul edilmiştir (Schuster vd. 2002b). Eski isimlerle önceden tarihlendirilmiş olan *A. niger* ismi, ekonomik ve bilgi edinme nedenlerinden ötürü korunmuştur ve taksonomik görüş birliği vardır. *A. niger*'e, diğer ipliksi mantarlar gibi, spor tozu oluşumunu önlemek için dikkatle muamele edilmelidir. Bununla birlikte, diğer filamentli mantarlarla karşılaştırıldığında, alerji veya mikopatoloji ile ilgili özel bir sorun ortaya çıkmamaktadır. Bu kısıtlamalarla, *A. niger*'in güvenli bir üretim organizması olduğu sonucuna varılmıştır. Birçok siyah *Aspergillus* türü dünyanın dört bir yanından izole edilmiştir. *A. niger*, organik madde üzerinde aerobik olarak büyüyen filamentli bir mantardır. Doğada, toprakta ve çöpte, kompostta ve çürüyen bitki materyalinde bulunur. *A. niger*, 6-47°C geniş sıcaklık aralığında, 35-37°C'de nispeten yüksek bir sıcaklık optimumu ile büyüebilir. Büyüme

için su aktivite limiti 0.88'dir bu da diğer *Aspergillus* türlerine kıyasla nispeten yüksektir. *A. niger*, son derece geniş bir pH aralığında büyüyebilir (Vijayaraghavan vd. 2009). *A. niger*'in toksik etkisinin olmadığı ve gıda endüstrisinde kullanılabileceği yapılan araştırmalar sonunda ortaya çıkmıştır (Atlıhan 2011).

2.7.2. *A. niger*'in endüstriyel kullanımı

A. niger, 1919'da sitrik asit fermentasyonu ile ilk kez üretildikten sonra, endüstriyel olarak kullanılan bir organizma haline gelmiştir. Sitrik asit, çeşitli sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır ve satış hacmiyle, glukonik asit gibi diğer metabolitleri aşmaktadır (Roukas 1999). Gıda ve içecek endüstrilerinde sitrik asit, başlıca asitleştirici maddedir. Alkolsüz içecekler, meyve suları, tatlılar, reçel, jöle, şekerleme ve şarap gibi gıdalarda kullanılır. İlaç endüstrisinde, kanda depolanan demir sitrata karşı koruyucu bir demir ve sitrik asit kaynağı olarak kullanılır. Kozmetik ve hijyen endüstrisinde, tampon olarak, pH ayarı için ve anti-oksidan olarak kullanılır. Ayrıca, deterjan içeriklerinde, cilt tabaklamasında, elektroliz gibi endüstriyel uygulamalarda ve nötr veya düşük pH aralığında tutma ajanı aktivitesinin gerekli olduğu diğer uygulamalar için de kullanılır. Sitrik asit neredeyse sadece *A. niger* ve *A. wentii* fermentasyonu ile üretilir, çünkü bu organizmalar ekonomik olarak uygundur ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumu en düşük seviyededir. FDA *A. niger*'i sitrik asit kaynağı olarak belirlemiştir (Schuster vd. 2002a).

Selüloz ve hemiselüloz gibi birkaç ilave enzim, karıştırılmış tank proseslerinde siyah *Aspergillus* suşları kullanılarak üretilmiştir. Birçok ürünü üretmek için en zengin karbonhidratlardan biri olan nişasta; glukoz, maltoz ve düşük molekül ağırlıklı dekstrin içeren şekerlere hidrolize edilmelidir. Bir heteropolisakkarit olan pektin, ticari olarak önemli meyve ve sebzelerin başlıca bileşenidir. *A. niger* yardımıyla indirgeyici pektinden üretilen pektin esterazları, endo- ve ekzo-poligalakturonidazları ve pektin liyazları içeren çeşitli enzimler; şarap ve meyve suyu üretiminde, preslenmeden önce meyve suyu viskozitesini düşürmek ve berraklaşmayı artırmak için kullanılırlar (Grassin ve Fauquembergue 2009). Hamur karıştırılırken *A. niger*'den elde edilen hemiselülazın ortama ilavesi hem hamurun hacmini artırır hem de hamura daha iyi kıvrıntı yapısı verir. ABD'de ki FDA, gıda kullanımı için çok sayıda enzimi kabul etmiştir. 1960'lı yılların başlarında, FDA, *A. niger*'den alınan α -amilaz, selüloz, amiloglukozidaz, katalaz, glukoz oksidaz ve pektinazın "genel olarak kabul edilebileceğini" kabul eden bildirileri yayınladı. Patojenik ve toksikojen olmayan suşlar, mevcut iyi üretim uygulamalarının üretiminde kullanılması koşuluyla "güvenli" (GRAS) olarak tanımlanmaktadır. Godfrey ve Reichelt (1982), bu enzimlere ek olarak *A. niger*'den β -galaktosidaz ve proteaz için GRAS statüsünü talep etmişlerdir (Godfrey ve Reichelt 1982). *A. niger*'den alınan karbohidraz ve selüloz, aynı zamanda, FDA tarafından istiridye ve karides işlenmesinde yardımcı olarak ikincil doğrudan gıda katkı maddesi olarak da onaylanmıştır (Schuster vd. 2002a). Sonuç olarak, *A. niger* grubu, fermentasyon endüstrisinde güvenli kullanımı uzun bir geçmişe sahip *Aspergillus* türlerinden oluşur. Bu türlerin hiçbir zaman insanda herhangi bir hastalığın başlıca nedeni olduğu tespit edilmemiştir. Böylece, *A. niger*'in iyi üretim uygulamaları kurallarına uyulması kaydıyla endüstriyel kullanım için güvenli bir üretim organizması olduğu sonucuna varılmıştır (Vijayaraghavan vd. 2009).

2.8. Deneysel Tasarımda Kullanılan Metotlar

Deneysel tasarım, istenen sonuçları elde etmek için belirli faktörlerin seçildiği bir ardışık analizler biçimidir. Bağımlı faktöre çeşitli bağımsız faktörlerin etkilerinin belirlenmesinde de kullanılabilir. Biyomühendislik çalışmaları, bilimsel açıdan çok farklı alanlar içerir ve her çalışma alanı birçok farklı faktör tarafından etkilenir ve yönetilir. Önemli faktörleri kısaca analiz etmek ve optimizasyon için deneysel bir tasarım seçmek, söz konusu herhangi bir biyo-işlemin tasarımı için çok etkili bir araçtır. Bu amaçla deneysel tasarımda bazı dizayn metotları kullanılmaktadır (Keskin Gündoğdu vd. 2016).

2.8.1. Full faktöriyel dizayn

İstatistikte, her faktörün birbiriyle farklı seviyelerde etkileşime girdiği iki veya daha fazla faktörden oluşan bir tasarımıdır. Full faktöriyel dizayn, faktörlerin yanıt değişkenleri üzerindeki etkisini ve bunun yanı sıra aralarındaki etkileşimi inceler. Bu dizayn metoduyla aynı anda farklı seviyelerde birçok faktörün etkisini incelemek pratiktir. Ortaya çıkan tasarım, farklı faktörlerin etkileşimlerini tanımlayabilen çeşitli seviyelerde farklı değişkenlerin bir birleşimidir. Tam faktöriyel tasarımda ana amaç, her terimin etkisini ve bu terimler arasındaki etkileşimi bir model kullanarak belirlemektir (Keskin Gündoğdu vd. 2016).

2.8.2. Plackett-Burman dizayn

PB tasarımları, Plackett ve Burman tarafından geliştirilen iki seviyeli fraksiyonel faktöriyel tasarımlardır; bu tasarım türü önemli avantajları nedeniyle, biyomühendislik sistemlerinde önemli faktörleri belirlemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bir PB tasarımının çalışma sayısı, 4'ün katına ayarlanır (örneğin, 12, 16, 20 veya 24). Plackett-Burman istatistiksel tasarımı, biyolojik materyallerin kararlı yapıları olmadığı ve çevre tarafından kolayca etkilenebildiği için özellikle biyoproselerin etkin parametrelerini belirlemek için yaygın olarak kullanılır (Keskin Gündoğdu vd. 2016).

Plackett-Burman deneysel tasarımı, sistem hakkında genellikle kesin bilgi mevcut olmadığı durumlarda deney aşamasının başında en önemli faktörleri tanımlamak için kullanılır. 1946 yılında istatistikçiler Robin L. Plackett ve J. Burman tarafından geliştirilen aktif faktörlerin mümkün olduğunca az deneme ile belirlenmesinde etkin bir tarama yöntemidir. Plackett-Burman tasarımı;

- Tarama yapmada,
- Yüksek mertebeden etkileşimleri ihmal etmek mümkün olduğunda,
- İki aşamalı çok faktörlü deneylerde,
- 4'ten fazla faktör olduğunda,
- Büyük ana etkileri ekonomik olarak saptamak için kullanılır.

Dezavantajları ise; bir faktörün etkisinin başka bir faktöre bağlı olup olmadığını doğrulamazlar ve yapabileceğiniz en küçük tasarımı çalıştırırsanız, bu etkilerin tam olarak ne olduğunu öğrenmek için yeterli verinin toplandığını takip etmez (Anonim 2017).

2.8.3. Taguchi dizayn

Temel amacı, kullanıcı dostu bir deneysel tasarım elde etmek olan ve Japonya’da Taguchi tarafından, "Taguchi Yöntemleri" olarak adlandırılan çeşitli bilimsel alanlarda deneysel tasarımda kullanılan bir dizayn metodudur. Bu yöntem, bir tepki üzerinde birçok faktörün etkisi iki veya daha fazla düzeyde incelenirken deney sayısını azaltmayı hedeflemektedir. Taguchi yöntemi, faktör tasarımı gibi tüm kombinasyonları test etmek yerine kombinasyon çiftlerini kullanır ve değişkenlerin sayısı 3 ile 50 arasında olduğunda etkin bir şekilde kullanılabilir. Taguchi yöntemlerinde, iki, üç ve çok seviyeli faktör analizinden yararlanılır (Keskin Gündoğdu vd. 2016).

2.8.4. Cevap yüzey metodu (CYM)

Fermentasyon koşullarının optimizasyonu, fermentasyon sırasında optimum mikrobiyal büyüme ve yüksek enzim verimini elde etmek için son derece önemlidir. Geleneksel optimizasyon yöntemleri, bağımsız değişkenlerden birinin değiştirilerek diğerlerinin belirli seviyelerde sabitlenmesini kapsar. Bu tekli tarama tekniği basittir, ancak faktörler arasında muhtemel etkileşimleri göz ardı ettiği için genellikle optimizasyon çalışmalarında başarısız olur. Başlangıçta, CYM deneysel yanıtları modellemek üzere geliştirilmiştir. Ancak daha sonra sayısal deneylerin modellenmesi yapılmıştır. CYM, çok değişkenli sistemler için en uygun çalışma koşullarını belirlemede etkili bir deneysel stratejidir. Yapılacak çalışmaların tasarımı, modellenmesi, deneysel faktörler arasındaki ilişkileri değerlendirmek ve optimum koşulları belirlemek için biyolojik işlemlerin optimizasyonunda başarılı bir şekilde kullanılan ve istatistiksel tekniklerden oluşan bir koleksiyondur.

CYM’nin faydaları;

- ✚ Çok sayıda parametrenin ve bunların etkileşimlerinin değerlendirilmesi için gerekli deneysel denemelerin sayısını azaltmaktır.
- ✚ CYM metodu, her faktörün bireysel etkisini ölçmek ve olası etkileşimlerini araştırmak için aynı anda birden fazla faktörü incelemeyi mümkün kılar.
- ✚ Diğer yöntemlere kıyasla çok daha az zahmetli ve zaman alıcı olabilir.
- ✚ Ortaya çıkan verilerin analiz edilmesinde karmaşık hesaplamalara gerek kalmamaktadır.
- ✚ Faktörler arasında bağlantı aramak mümkündür ve en uygun koşullar bulunup, yanıtlar tahmin edilebilir (Dinarvand vd. 2017; Lee vd. 2006).

CYM, ürünün optimizasyonunda nasıl kullanıldığını ve bunun bazı uygulamalarını kapsar. Bu yöntem bilimi, duyuşal değerlendirme alanı içinde yararlı bir istatistik sistem haline gelmiştir. CYM’de cevap yüzeyleri grafiksel olarak temsil edilir. Çok değişkenli denklemleri belirlemek ve çözmek için uygun deneysel tasarımlardan elde edilen niceliksel verileri kullanır. (Giovanni 1983).

2.8.4.1. Central composite dizayn (CCD)

Bir CCD, deneysel bölgenin çevresinde dış noktalar ve bir merkez nokta kullanan beş seviyeli fraksiyonel faktöriyel tasarım olarak tanımlanmaktadır. Bu merkez nokta, kuadratik polinomlara uymak için dönebilirlik veya ortogonalite gibi birkaç özelliğe sahip olmalıdır. CCD, karşılaştırılabilir sonuçlar verirken daha az deney yapmasını gerektirdiği için tam faktöriyel, üç boyutlu tasarıma göre önemli bir alternatiftir. Bu nedenle CCD, ikinci dereceden modeller için en çok kabul gören deneysel tasarımıdır. Bu metot ile CCD ve faktörler arasında karşılık gelen etkileşimleri daha az deney kullanarak daha kolay ortaya çıkarmak mümkündür. Buna ek olarak, istatistiksel yaklaşımların kullanılması bireysel faktörlerin önemini ve her bir faktörün cevaba olan etkisini ortaya koyabilmektedir (Keskin Gündoğdu vd. 2016).

2.8.4.2. Box-Behnken dizaynı (BBD)

Box ve Behnken tarafından 1980 yılında ortaya konan Box-Behnken deneme deseni ise ikinci dereceden cevap yüzeylerinde model oluşturmak için etkili bir yöntemdir. Modelde yer alacak faktörlerin en az üç düzeyli olması gerekir ve metot dengeli tamamlanmamış blok denemelerinin üzerine kurulur. Box-Behnken deneme düzeninde faktörlerden birinin değeri merkez değerinde sabitlenirken diğer faktörlerin tüm düzeylerinin kombinasyonları uygulanır. Örneğin 3 faktörlü deneme deseni oluşturulacaksa öncelikle A faktörünün düzeyi sabitlenmiş, B ve C faktörlerinin tüm düzeylerinin kombinasyonlara ve daha sonra aynı işlemler sırasıyla B ve C faktörlerinin düzeyleri merkezde sabitlenerek uygulanmaktadır. Düzen matrisinin en son sütunlarında ise merkez nokta değerleri yer almaktadır (Kul 2004).

Bu metodun en büyük avantajlarından birisi de örnek ve tekerrür sayısını azaltmasıdır. BBD, daha az zaman alıcı ve CCD'ye göre ekonomik bir alternatif sunmaktadır çünkü faktör seviyeleri daha azdır ve aşırı yüksek veya düşük seviyeleri içermez. Faktöriyel tasarımda 4 faktörlü 3 parametrelili bir deneme deseni oluşturulduğunda 81 deneme (tekerrürü ile birlikte 162 deneme) gerçekleştirilmesi gerekirken Box-Behnken cevap yüzey metodunda 4 faktörlü 3 parametrelili bir deneme deseni için merkez noktası 3 defa tekrarlandığında 27 deneme (tekerrürü ile birlikte 54 deneme) yapılması tavsiye edilmektedir. Box-Behnken deneme deseninin kullanılması ile daha az deneme ile çalışma gerçekleştirilebildiğinden hem zaman açısından hem de maliyet açısından kâr elde edilmektedir.

Box-Behnken deneme deseninde sonuçların değerlendirilmesinde regresyon analizi ve varyans analizinden yararlanılmaktadır. Ayrıca sonuçların sabit bağımlı değişkenlere karşı grafik edilmesi sonucunda kontur plot (contour plot) grafiği elde edilir ve bu grafikler sonuçların değerlendirilmesini kolaylaştırır (Myers vd. 2016). Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan doğruluk parametrelerinden birisi model sistemin gerçek cevaba uygun olup olmadığıdır. Bu duruma uyum eksikliğinden (lack of fit) kaynaklanan hatanın önemsiz olmadığına bakılarak karar verilmektedir. Bunun yanı sıra R^2 değeri ve ayarlanmış R^2 değerleri karşılaştırılmakta, değerlerin birbirine ve 1'e yakın olması çalışmanın da modele uygunluğunun derecesini göstermektedir.

Bu çalışma kapsamında besiyerinin ilk defa inülinaz enzim üretiminde kullanılacak olması nedeniyle Plackett-Burman yöntemi ile besiyeri bileşiminin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ise CYM ile fermentasyon şartları optimize edilmiştir.

2.9. Ultrafiltrasyon (UF)

Fermentasyon yoluyla üretilen ürünlerin ayrılması ve saflaştırılması ile ilgili birçok yöntem kombine olarak uygulanmaktadır. Bu amaçla, üretilen ürünün ekstraselüler veya intraselüler olmasına bağlı olarak hücre parçalama, flokülasyon ve santrifüj gibi yöntemler ilk aşamalarda kullanılmaktadır. Biyoteknolojik yollarla üretilen enzimler, fermentasyon ortamından adsorpsiyon kromatografisi veya afinite kromatografisi gibi yöntemlerle ayrılmakta ve saflaştırılmaktadır. Ancak bu metotlar oldukça pahalı ekipman ve sarf malzeme gerektirmektedir. Ayrıca bu yöntemler çok fazla toksik kimyasal madde uygulanmasını gerektiren ara kademeler de içermektedir. Dolayısıyla bugüne kadar bilinen enzim saflaştırma yöntemleri ile ürün saflaştırmak, maliyeti aşırı derecede artırdığı için mümkün görünmemektedir. Enzimlerin fermentasyon ortamından ayrıştırılmasında ultrafiltrasyon yöntemi de kullanılabilir. Ultrafiltrasyon 1-200 kDa molekül ağırlığındaki partiküllerin geçişine izin veren, gözenek boyutu 10-2-10-1 µm arasında olan ve 1-10 bar uygulama basıncına sahip bir membran ayırma yöntemidir (Baker 2004; Rosenberg 1995). Meyve suyu berraklaştırılmasında da kullanılan ultrafiltrasyon membranları, kullanılan ayırma sınırına göre mikroorganizmalar, proteinler ve enzimleri de tutabilmektedir. Fermentasyon ortamından alınan enzim içeren sıvıların ultrafiltrasyonla kısmi saflaştırılması yapılabilmektedir. Bu şekilde üretilen enzimler yüksek saflıkta olmayıp “yığın enzim” olarak adlandırılmaktadır.

İnülinaz enziminin saflaştırılmasında yüksek maliyetli bir yöntem olan afinite kromatografisi ve iyon değiştirme tekniklerinin kullanılması ülkemiz dışında yapılmış çalışmalar sonucunda patent altına alınmıştır. Bu teknikler son derece pahalı yöntemleri kapsadığı için, dünya piyasasında inülinaz enzim preparatları çok yüksek fiyatla satılmaktadır. Örneğin; üretildiği karbon kaynağı itibarıyla fermentasyonda kullanılan saf şekerler veya doğal kaynakların kilogram fiyatı 4-5 TL olurken bunlardan üretilen inülinaz enziminin 250 miligram'ı 600 Euro olarak fiyatlandırılmaktadır.

Bu çalışmada keçiyoynuzu ekstraktının inülinaz enzimi üretiminde substrat olarak kullanım potansiyeli incelenmiştir. Bu amaçla; keçiyoynuzu ekstraktının *A.niger* mikroorganizması tarafından daha iyi kullanılmasını sağlamak için başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi Plackett-Burman dizaynı ile belirlenmiştir. Besiyeri bileşimi optimize edildikten sonra *A.niger*'den inülinaz üretiminin fermentasyon şartları Cevap Yüzey Metodu (CYM) ile optimize edilmiştir. Elde edilen enzimi içeren besiyeri 3 farklı (10, 30, 50 kDa) ayırma sınırına sahip UF ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Tüm fermentasyon ve UF denemeleri sonucunda elde edilen verilerle kinetik parametreler ve saflaştırma katsayıları belirlenerek inülinaz için en uygun üretim şartları ortaya koyulmuştur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Keçiboynuzu meyvesi

Proje kapsamında kullanılacak kırılmış ve çekirdeği çıkarılmış keçiboynuzu meyvesi (Şekil 3.1), Antalya’da keçiboynuzu meyvesini ve işlenmiş ürünlerini ihraç eden Yenigün Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş.’den sağlanmıştır. Bu amaçla tedarik edilen keçiboynuzu meyvesi analiz anına kadar +4°C’lik soğuk depolarda saklanmıştır.



Şekil 3.1. Parçalanmış keçiboynuzu meyvesi.

3.1.2. Fermentasyon için gerekli ekstraktın eldesi

Keçiboynuzu meyvesinden inülinaz enzimi üretiminde, fermentasyonlarda kullanılacak ekstraktın üretimi için 5-7 mm kalınlığındaki keçiboynuzu parçaları 1:4 meyve:su oranında 80°C’de 2 saat süre ekstraksiyona bırakılmıştır (Turhan vd. 2010). Elde edilen ekstrakt kaba filtrasyon yoluyla katı partiküllerinden arındırılmıştır. Ekstraktın toplam şeker konsantrasyonu deiyonize su ile seyreltilerek 50 g/L’ye ayarlanmıştır. Tüm fermentasyon denemelerindeki ekstraktlar taze olarak hazırlanmış ve bekletilmeden sterilize edilerek kullanılmıştır.

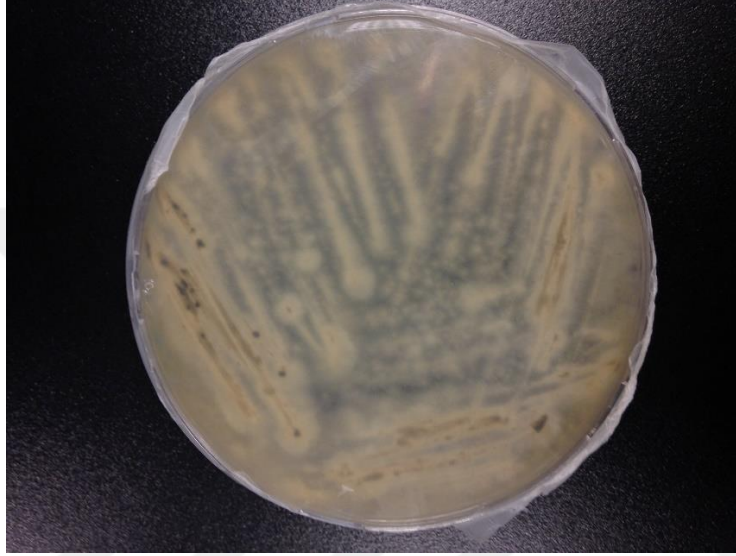
3.1.3. Fermentasyonda kullanılan mikroorganizma

Bu çalışmada inülinaz enziminin üretiminde *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) küfü kullanılmıştır. Bu mikroorganizma Amerikan Tip Kültür Koleksiyonun’dan (ATCC) satın alınmıştır.

Kültürler, malt ekstrakt agar (48g/L) üzerinde 4 gün boyunca 30°C’de gelişime bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kültürler +4°C’de depolanmış ve canlılığın korunabilmesi için iki haftada bir (15 gün) yenilenmiştir. Uzun süreli muhafaza için stok kültürler, %20’lik gliserol içerisinde -80°C’de muhafaza edilmiştir.

Fermentasyondan hemen önce gelişimi tamamlanmış olan petrilerden inokülasyona hazır solüsyon hazırlanmıştır. Bunun için %0.001'lik 100 mL Tween-80 çözeltisi hazırlanmış ve otoklavlanmıştır. Sonrasında steril şartlar altında 10 mL (×2) Tween-80 çözeltisi petri üzerine dökülüp gezdirildikten sonra şişe içine geri alınmıştır. Tüm fermentasyonlara inokülasyonlar bu şekilde hazırlanan solüsyondan yapılmıştır (Öngen-Baysal ve Sukan 1996).

Not: Her fermentasyon öncesinde mikroorganizmaya yenileme işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. *Aspergillus niger* A42 küfünün petride geliştirilmiş olan görüntüsü.

3.2. Metot

3.2.1. İnülinaz enzimi üretimi için uygulanan deneme deseni

- *A.niger*'den inülinaz enzimin üretimine yönelik başlangıç şeker içeriğinin ve besiyeri kompozisyonunun PBD ile optimizasyonu.
- *A.niger*'den inülinazının üretim koşullarının (karıştırma hızı (100-175-250 rpm), inokülasyon oranı (%1-%2-%3 v/v) ve besiyeri hacmi (50-100-150 mL/250 mL), oksijen transferi açısından önemli) CYM ile optimize edilmesi.
- CYM sonuçlarına göre belirlenen optimum koşullarda doğrulama denemelerinin gerçekleştirilmesi.
- Doğrulama denemeleri sonucunda inülinaz enzimini içeren fermentasyon ortamının 3 farklı (10, 30, 50 kDA) ayırma sınırına sahip UF membranı ile kısmi olarak saflaştırılması.
- Tüm fermentasyonlar ve ultrafiltrasyon denemeleri sonucunda elde edilen verilerle kinetik parametrelerin ve saflaştırma katsayılarının belirlenmesi.

3.2.2. Başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşiminin optimizasyonu

Bu çalışmada öncelikle başlangıç şeker içeriğinin belirlenmesinin ardından PBD ile optimum besiyeri formülasyonu belirlenmiştir. PBD’de kullanılan değişken parametrelerin seviyeleri için literatür çalışmalarından alınan minimum ve maksimum değer aralıkları Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. PBD’de kullanılan düşük ve yüksek seviyedeki değişkenlerin kodları ve konsantrasyonları.

Besiyeri Bileşimi (%)	Kod	Düşük seviye (-)	Yüksek seviye (+)	Referans
(NH ₄) ₂ HPO ₄	A	0.1	0.6	(Öngen-Baysal vd. 1994)
MgSO ₄ .7H ₂ O	B	0.01	0.1	(Öngen-Baysal vd. 1994)
KH ₂ PO ₄	C	0.01	0.2	(Öngen-Baysal vd. 1994)
NH ₄ NO ₃	D	0.1	0.5	(Öngen-Baysal vd. 1994)
Maya ekstraktı	E	0.1	1	(Öngen-Baysal vd. 1994)
Pepton	F	0.1	1	(Dinarvand vd. 2012b)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	G	0.014	0.072	(Dinarvand vd. 2012a)
Keçiboynuzu eks. (°Bx)	H	1	5	-

PBD ile fermentasyon besiyerinin optimizasyonunda kullanılan fermentasyon koşulları (sıcaklık, çalkalama hızı, pH, besiyeri hacmi ve inokülasyon oranı) Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. PBD ile fermentasyon ortamının optimizasyonunda kullanılan fermentasyon koşulları.

Sıcaklık	30°C	(Öngen-Baysal vd. 1994)
Çalkalama hızı	200 rpm	(Öngen-Baysal vd. 1994)
pH	5	(Öngen-Baysal vd. 1994)
Medya hacmi	100 mL	(Öngen-Baysal vd. 1994)
İnokülasyon oranı	%2	(Öngen-Baysal vd. 1994)

Fermentasyon ortamında kullanılan düşük ve yüksek seviyedeki bileşiklerin konsantrasyonuna göre PBD tarafından oluşturulan besiyeri kompozisyonlar Çizelge 3.3’te gösterilmiştir

Çizelge 3.3. Placket-Burman tasarımında kullanılan değişken parametreler.

Deneme Numarası	A (g/L)	B (g/L)	C (g/L)	D (g/L)	E (g/L)	F (g/L)	G (g/L)	H (°Bx)
1	0.1	0.1	0.01	0.1	0.1	1	0.072	5
2	0.6	0.01	0.2	0.1	0.1	0.1	0.072	5
3	0.6	0.1	0.01	0.5	0.1	0.1	0.014	1
4	0.1	0.1	0.2	0.1	1	0.1	0.014	5
5	0.6	0.01	0.2	0.5	0.1	1	0.014	5
6	0.6	0.1	0.01	0.5	1	0.1	0.072	5
7	0.6	0.1	0.2	0.1	1	1	0.014	1
8	0.1	0.1	0.2	0.5	0.1	1	0.072	1
9	0.1	0.01	0.2	0.5	1	0.1	0.072	1
10	0.1	0.01	0.01	0.5	1	1	0.014	5
11	0.6	0.01	0.01	0.1	1	1	0.072	1
12	0.1	0.01	0.01	0.1	0.1	0.1	0.014	1

3.2.3. Cevap yüzey metodu (CYM)

Keçiboynuzu meyvesi ekstraktından inülinaz enzimini üretmek için, üretim koşullarının optimizasyonunda CYM istatistiksel metodundan yararlanılmıştır. Minitab İstatistiksel Yazılımı (Version 13.3; Minitab Inc., State College, PA, USA) kullanılarak CYM için seçilen parametreler; çalkalama (100, 175, 250 rpm), inokülasyon oranı (%1, 2, 3) ve havalandırma (50, 100, 150 ml) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. CYM metodu ile belirlenen fermentasyon koşulları istatistik denemeleri.

Deneme Numarası	Çalkalama Hızı (rpm)	İnokülasyon Oranı (%)	Medya Hacmi (ekstrakt/250 mL)
1	250	3	100
2	175	1	50
3	100	2	50
4	175	2	100
5	175	2	100
6	175	3	50
7	100	3	100
8	175	3	150
9	250	2	150
10	250	1	100
11	100	2	150
12	175	1	150
13	250	2	50
14	175	2	100
15	100	1	100

3.2.4. İnülinaz fermentasyonu

PBD'den elde edilen sonuçlara göre °Bx değeri ayarlanmış olan keçiboynuzu ekstraktı 250 ml'lik erlenlere istatistik programının önerdiği deneme parametrelerine göre (50-100-150 ml ekstrakt/erlen hacmi) aktarılıp besiyerlerinin başlangıç pH değerleri 4 N HCl ve 4 N NaOH ile 5'e ayarlanmıştır. Besiyeri optimizasyonunda belirlenen içeriğe uygun olarak besiyeri hazırlanmıştır. Ardından 121.1°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. CYM'nin önerdiği koşullara göre inokülasyon (%1-2-3) yapıldıktan sonra yine CYM'nin önerdiği koşullara göre karıştırma hızı (100-175-250 rpm) ayarlanmış olup fermentasyonlar başlatılmıştır. Fermentasyonlar 15 gün süresince devam etmiş olup her 24 saatte bir aseptik koşullar altında erlenlerden 1 mL örnek alınıp analiz anına kadar +4°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.3. İnülinaz fermentasyonlarına ait bazı denemelerin çalkalamalı inkübatör görüntüleri.

3.2.5. Toplam şeker analizi

Alınan tüm fermentasyon örneklerinin şeker analizi, 3,5-dinitrosalisilik asit (DNSA) metoduna göre yapılmıştır (Miller 1959). DNSA metodu ile şeker analizinde kullanılan DNSA çözeltisi; 10 g/L NaOH, 10 g/L 3,5-dinitrosalisilik asit ve 0.5 g/L sodyum sülfidin önce saf suda çözündürülüp ardından 1 L'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Ayrıca potasyum sodyum tartarat çözeltisi ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) de litreye 400 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılıp saf suda çözündürüldükten sonra ve üzeri 1 L'ye tamamlanmıştır.

Toplam şeker analizinde 2 tekerrürlü olarak çalışılmış ve 50 μL örnek üzerine 1.95 mL saf su eklenip ardından 40 μL 12 M HCl asit ile karıştırıldıktan sonra 90°C'lik su banyosunda 10 dk bekletilerek örneğin hidrolize edilmesi sağlanmıştır. Hidroliz işlemi için tüplerin doğru sıcaklıkta olduğundan emin olunmuştur. Bu amaçla içinde saf su bulunan bir tüp ve termometre kontrol amaçlı kullanılmış ve termometre sıcaklığı 90°C'ye geldiğinde süre başlatılmıştır. Daha sonra hidrolizatlar üzerine 100 μL 5 N KOH ilave edilip karıştırılmıştır. Her bir tüpün içerisinden 640 μL sıvı, pipet yardımıyla geri çekilip atılmış ve kalan her bir karışıma 1.5 mL DNSA çözeltisi eklenmiş, aynı anda da 1.5 mL saf su üzerine 1,5 mL DNSA eklenerek körler de hazırlanmıştır. 90°C'lik su banyosunda tekrar 10 dk bekletilen solüsyonlara renk stabilizasyonunu sağlaması için 500 μL %40'lık potasyum sodyum tartarat eklendikten sonra solüsyonlar soğutulmuş ve 575 nm dalga boyunda spektrofotometrede (ThermoScientific Evolution, Şangay, Çin)

okutularak standart glukoz çözeltisi ile hazırlanmış kurveden (EK-1) örneklerin şeker miktarı hesaplanmıştır.

3.2.6. İnülinaz ve invertaz-tip aktivite analizi

Fermentasyon ortamından alınan örneklerde inülinaz ve invertaz-tip aktivite değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla, enzim aktivite değerlerinin belirlenmesinde DNSA metodu kullanılmıştır (Miller 1959). Enzim analizini gerçekleştirmek için substrat olarak 0.1 M Na-asetat tamponunda (pH 4,8) %2'lik (w/v) inülin ve sakkaroz çözeltisi hazırlanmıştır. 900 µL substrat çözeltisi, 0.1 M Na-asetat tamponu (pH 4.8) ile seyreltilmiş (10-2000 kat) enzim solüsyonunun 100 µL'si ile test tüpünde karıştırılmıştır. Su banyosunda 60°C'de 10 dk inkübasyondan (1. inkübasyon) sonra 1.5 mL DNS çözeltisi test tüplerine eklenmiştir. Bununla beraber kontrol örneği ile kör (blank) hazırlanmıştır. Kontrol örneği, sırasıyla test tüpünün içerisine önce 100 µL enzim solüsyonu, sonra 1.5 mL DNSA çözeltisi, daha sonra da 900 µL substrat (inülin veya sukroz çözeltisi) eklenerek hazırlanmıştır. Kör (blank) ise test tüpünün içerisine 100 µL deiyonize su, 900 µL substrat ve 1.5 mL DNSA çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır. Kontrol örneği ile kör (blank), 1. inkübasyona dâhil edilmemiştir. Kontrol örneğinin hazırlanmasının nedeni, enzim tarafından salınmayan veya örnekten gelen indirgen şekerlerin absorbans değerini ölçmektir ($Abs_{kontrol}$). Kontrol örneği ile birlikte kör (blank) ve enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği tüpler hemen 100°C'de 10 dk inkübasyona (2. inkübasyon) bırakılmıştır. 2. inkübasyonun nedeni, enzimatik reaksiyonu durdurmak ve enzim tarafından salınan indirgen şekerlerin konsantrasyonuna bağlı olarak renk değişimini sağlamaktır. Elde edilen örnekler, köre karşı 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülerek renk değişimine bağlı olarak hem kontrol örneği için ($Abs_{kontrol}$) hem de enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği örnekler için ($Abs_{örnek}$) absorbans değerleri elde edilmiştir. Enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği test tüplerinde hem örnekten gelen hem de enzimatik reaksiyonun sonucunda oluşan indirgen şekerler bulunmaktadır. Dolayısıyla, kontrol örneğinin kullanılmasıyla ölçülen absorbans değeri ($Abs_{kontrol}$) daha sonra enzimatik reaksiyonun gerçekleştirildiği test tüplerinden elde edilen absorbans değerinden ($Abs_{örnek}$) çıkartılmıştır [$Abs_{örnek} - Abs_{kontrol}$]. Böylece enzim tarafından salınan indirgen şekerlerin absorbans değeri hesaplanmıştır. Bu değer [$Abs_{örnek} - Abs_{kontrol}$], fruktoz standart kurvesinden yararlanılarak enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Enzim analizinde kullanmak için hazırlanan fruktoz standart kurvesi EK-2'de verilmiş olup oluşturulan denklem 3.1 bağıntısında ki gibidir.

$$y = 3.8983 \times [Abs_{örnek} - Abs_{kontrol}] - 0.0156 \quad (3.1)$$

Burada,

y = fruktoz konsantrasyonu (µmol/mL)

[$Abs_{örnek} - Abs_{kontrol}$] = kontrol örneği ile enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği örneğin 540 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri arasındaki fark.

İnülinaz ve invertaz-tip aktivitenin U/mL cinsinden hesaplanması aşağıda verilen 3.2 bağıntısıyla gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/mL)} = \frac{y \times R_v \times D_f}{t} \quad (3.2)$$

Burada,

y = fruktoz konsantrasyonu (μmol/mL)

$$R_v = \frac{\text{Test tüpünün toplam hacmi (mL)}}{\text{Enzim solüsyonunun hacmi (mL)}}$$

Df = dilüsyon faktörü veya seyreltme katsayısı

t = reaksiyon süresi (dk)

İnülinaz ve invertaz-tip aktivitenin U/mg cinsinden hesaplanması aşağıda verilen 3.3 bağıntısıyla gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/mg)} = \frac{\text{Enzim aktivitesi (U/mL)}}{\text{Protein miktarı (mg/mL)}} \quad (3.3)$$

İnülinaz aktivite (U/mL) değerinin invertaz-tip aktivite (U/mL) değerine bölünmesiyle I/S oranları her fermentasyon için ayrı hesaplanmıştır.

3.2.7. Protein analizi

Fermentasyon sonunda maksimum inülinaz aktivitesine sahip örneklerde ve UF ile kısmi saflaştırma sonunda elde edilen örneklerde toplam protein analizi yapılmıştır. Bu amaçla Thermo Scientific Coomassie (Bradford) kiti kullanılmıştır. Öncelikle 30 μL örnek test tüpüne alınıp üzerine 1.5 mL Protein Assay kit ilavesi yapılmıştır sonra karıştırılmış ve oda sıcaklığında (25°C) 10 dk bekletilmiştir. Süre tamamlandıktan sonra örnekler 595 nm’de okutulmuştur (Bradford 1976). Kör olarak içerisinde protein bulunmayan deiyonize su kullanılmıştır. Analiz, 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Standart kurvenin çizdirilmesi için albümin standart ampülleri (2 mg/mL) kullanılmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.5’de ki oranlar kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. Protein standart kurvesini oluşturmak için albümin ampüllerinden hazırlanan standartlar.

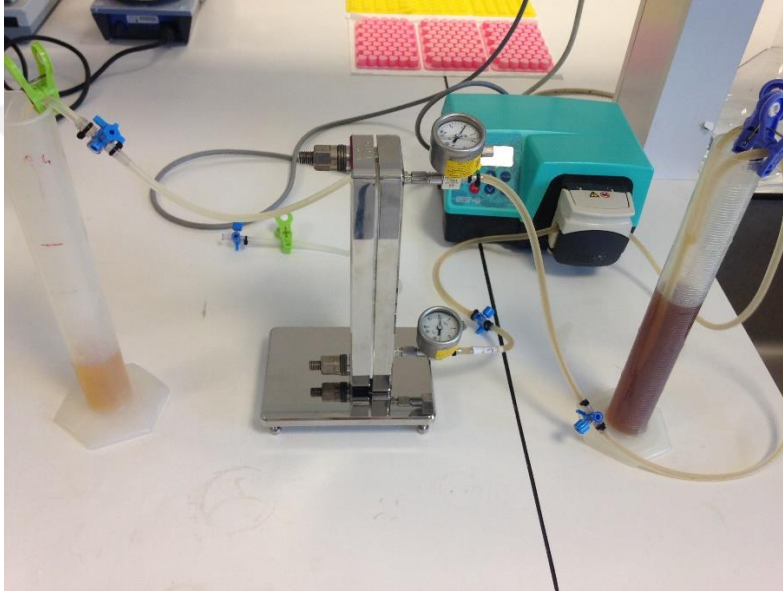
Konsantrasyon	Seyreltme oranı
2 mg/mL	30 μL standart
1.5 mg/mL	22.5 μL standart + 7.5 μL saf su
1 mg/mL	15 μL standart + 15 μL saf su
0.5 mg/mL	7.5 μL standart + 22.5 μL saf su
0 mg/mL	30 μL saf su

595 nm’de okutulan standartların kurvesi denklem yardımıyla çizdirilmiş ve örneklerin toplam protein miktarı μg/mL olarak hesaplanmıştır. Spesifik aktivite değerleri (U/mg) protein analizi sonucunda belirlenmiştir. Standart kurve, her

fermentasyon sonrası protein analizi öncesinde yeniden oluşturulmuş ve her seferinde yeni protein formülü kullanılmıştır.

3.2.8. UF (Kısmi konsantrasyon)

Tüm denemelerin tamamlandıktan ve optimum üretim şartlarının belirlendikten sonra daha yüksek aktivitede enzim elde etmek amacıyla kısmi saflaştırma (konsantrasyon) işlemleri için UF denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 10 kDa, 30 kDa ve 50 kDa ayırma sınırına sahip olan ultrafiltre kartuşları kullanılmıştır. Optimum şartlarda üretilmiş olan son üründen kısmi konsantre ürünlerin elde edilmesi amacıyla Şekil 3.4’de görülen laboratuvar tipi Sartocoon Slice 200 model (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) cihazı kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Optimum koşullarda üretilen inülinaz içeren fermente solüsyonda kısmi saflaştırma düzeneği.

Buradaki temel amaç UF işlemi sonucunda permeat ve retentatta gerçekleştirilecek enzim aktivitesi ve toplam protein analizleri sonucunda safsızlıkları minimize ederek spesifik enzim aktivitesi değerlerinin hesaplanmasıdır. Aynı zamanda elde edilen veriler ışığında kısmi saflaştırmaya ait katsayı belirlenerek UF işleminin inülinaz enzimi için kısmi konsantrasyon işlemlerinde kullanılabilirliği de belirlenmiştir. Bu amaçla üç farklı ayırma sınırına sahip UF membranları kullanılmıştır. 50 kDa'luk ilk UF işleminden sonra permeat diğer filtrelerden geçirilmiştir. UF membranlarından enzim içeren sıvı preperat geçirilmeden önce membranlarda stok solüsyonun uzaklaştırılması ve UF işleminden önce membran yüzeyinin ıslatılması için 2000 mL saf su çalışma basıncı (2 bar) değerlerinde sistemden geçirilmiştir. 1500 mL su geçirildikten sonra UF öncesi UF membranlarından dakikada geçebilen permeat (saf su) miktarı UF öncesi akış hacmi (mL/dk) olarak kayıt edilmiştir. Bu değer ultrafiltrasyonda kullanılan membranların filtrasyon sonrası temizleme işlemlerinden sonra etkin bir şekilde temizlenip temizlenemediğinin kontrol edilmesinde kullanılmıştır. Akış hacmi alındıktan sonra kalan saf su da UF membranından geçirilmiştir. Bu şekilde membran muhafazasında kullanılmış olan etil alkol tamamen uzaklaştırılmış ve UF membaları ultrafiltrasyona

hazır hale getirilmiştir. 200 ml başlangıç hacminde enzim içeren preperat kullanılmış ve ultrafiltrasyona 180 ml permeat ve 20 ml retentat kalıncaya kadar devam edilmiştir. Böylece hacmen %90 permeat ve %10 retentat oranlarında bir UF gerçekleştirilmiştir. Tüm bu işlemler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş olup her permeat ve retentat için enzim ve toplam protein analizleri gerçekleştirilerek permeatlar ve retentatlar için toplam spesifik aktivite belirlendikten sonra saflaştırma katsayıları denklem 3.4'e göre hesaplanarak UF işleminin kısmi konsantrasyon için kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

İnülinaz ve invertaz-tip aktivite için saflaştırma katsayısı hesabı:

$$\text{Saflaştırma katsayısı} = \frac{A}{B} \quad (3.4)$$

Burada,

A: UF öncesi inülinaz (U/mg) veya invertaz-tip (U/mg) aktivitesi

B: UF sonrası inülinaz (U/mg) veya invertaz-tip (U/mg) aktivitesi

UF prosesi tamamlandıktan sonra öncelikle sistemden 1000 mL deiyonize su geçirilmiştir, daha sonra da 50°C'ye ısıtılmış 1 N NaOH çözeltisi kapalı sistemden 1 saat boyunca sirkülasyonu sağlanmıştır. 1 saatin sonunda bazik çözelti permeat vanası açılarak sistemden uzaklaştırılmıştır. Ardından bazik çözeltiyi tamamen uzaklaştırmak için sistemden 1000 mL deiyonize su geçirilmiştir. En sonra da sistemden 500 mL %20'lik etanol:su karışımı geçirilerek ultrafiltre membranın tamamen temizlenmesi sağlanmıştır. Proses tamamlandıktan sonra temizlenen ultrafiltre membran %20'lik etanol:su karışımında +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.9. Biyokütle analizi

Her fermentasyon sona erdikten sonra toplam biyokütle analizi yapılmıştır. Bu amaçla 65°C'de kurutulduktan sonra darası alınmış petri+filtre kâğıdı kullanılmıştır. Analiz kapsamında her erlen filtre kâğıdından süzildükten sonra petri üzerinde etüvde 24 saat boyunca (65°C) kurutulmuştur. Desikatörde soğutulduktan sonra sabit tartıma gelene kadar her 24 saatte bir tartım alınmıştır (Öztürk 2008) (EK-4).

3.2.10. pH

Fermentasyon tamamlandığında ve biyokütlesi süzülündüğünde her bir erlenden elde edilen fermentasyon sıvılarının pH değeri kaydedilmiştir (Metler-Toledo AG, 8603 Schwerzenbach, Switzerland). pH ölçümünden önce pH metre, pH'ı 4.01 ve 7.0 olan kalibrasyon sıvıları ile kalibre edilmiştir (Cemeroğlu 2010).

3.2.11. Kinetik parametreler

Çalkalamalı inkübatördeki fermentasyonlardan alınan örneklerde şeker, protein, inülinaz ve invertaz-tip aktivite analizleri yapıldıktan sonra elde edilen veriler doğrultusunda;

- ✓ Şeker tüketimi: ΔS (g/L) = $S_0 - S_{\min}$
- ✓ Enzim üretimi: P (U/mL) = $P_{\max}$
- ✓ Maksimum tüketim hızı (Q_S , g/L/h) = $(-ds/dt)_{\max}$
- ✓ Maksimum üretim hızı (Q_P , U/mL/gün) = $(dp/dt)_{\max}$
- ✓ Şeker tüketim oranı (%) = $((S_0 - S_{\min})/S_0) \times 100$
- ✓

gibi kinetik parametreler hesaplanmıştır (Shuler ve Kargi 2002).

3.2.12. İstatistiksel analiz

Başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşim optimizasyonunun istatistiksel analizinde Minitab istatistiksel yazılımı (Minitab 17. Statistical Software, State College, PA, USA) kullanılmıştır. Fermentasyon koşullarının optimizasyonunda ise istatistiksel analizde Design Expert istatistiksel yazılımı (Version 10.0.0; Minneapolis, MN) kullanılmıştır. Program tarafından oluşturulan modelin deneysel verileri hangi ölçüde karşıladığı varyans analizi (ANOVA) istatistiksel önemi kullanılarak belirlenmiştir ($P=0.05$). Tüm parametrelerin değerleri, iki tekerrürün ortalaması olarak verilmiştir ve tablolarda ki değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Keçiboynuzu Ekstraktının Başlangıç Şeker İçeriği Ve Besiyeri Bileşimi Optimizasyonu

Fermentasyonlarda kullanılacak olan keçiboynuzu ekstraktının başlangıç şeker içeriği (briks değeri) ve besiyeri içeriğinin formülasyonu, PBD metodu ile optimize edilmiştir. PBD metodu ile belirlenen $2 \times 12 = 24$ (paralelli) fermentasyon; başlangıç için literatürde en çok uygulanan şartlar dikkate alınarak belirlenmiştir. Bu şartlar Çizelge 3.2’de verilmiş olan, 30°C sıcaklık, 200 rpm çalkalama hızı, pH 5, 100 mL medya hacmi ve %2 inokülasyon oranından oluşmaktadır. Başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi optimizasyonu için gerçekleştirilen fermentasyon denemelerinde ortamdaki şeker *Aspergillus niger* tarafından kullanılmıştır. Fermentasyon ortamındaki şekerin tamamının hemen hemen bütün denemelerde tükendiği tespit edilmiş ve sonuçlar PBD metoduna göre belirlenen her bir fermentasyon için ayrı ayrı Çizelge 4.1’de verilmiştir.

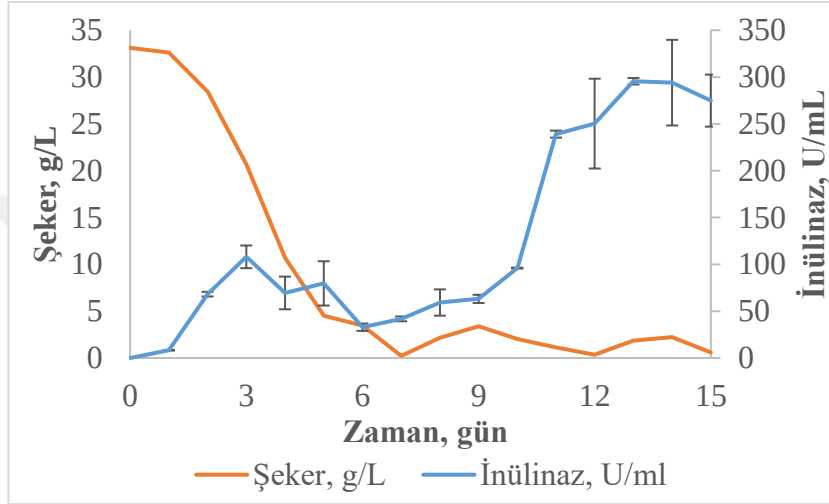
Çizelge 4.1. PBD istatistik yöntemiyle belirlenen fermentasyonların analiz sonuçları.

No	İnülinaz (max), U/mL	İnvertaz-tip (max), U/mL	I/S Oranı	Protein (mg/mL)	İnülinaz, U/mg	İnvertaz-tip, U/mg	Biyokütle, g/L	pH
1	315.88±33.73	16.57±1.65	19.26±3.96	0.14±0.01	2242.31±363.70	116.93±5.15	16.00±0.28	5.90±0.01
2	111.91±18.50	15.40±1.65	7.24±0.42	0.04±0.01	2825.50±347.49	392.08±70.89	13.50±1.27	4.72±0.15
3	157.17±47.59	16.52±5.58	10.61±6.47	0.05±0.01	3128.91±172.02	301.37±20.97	4.10±0.14	5.90±0.01
4	1125.63±308.04	235.65±39.97	4.73±0.50	0.19±0.08	5969.38±898.69	1278.35±326.01	14.40±1.27	5.69±0.03
5	610.33±314.24	197.59±131.28	3.29±0.59	0.21±0.01	2932.84±1650.82	953.44±674.39	14.50±2.40	5.83±0.08
6	990.77±418.13	320.44±150.1	3.13±0.17	0.25±0.02	3847.81±1304.80	1241.77±482.45	14.40±0.28	5.52±0.10
7	365.88±85.21	131.32±45.83	2.85±0.34	0.13±0.01	2905.98±905.82	1047.94±445.04	8.70±2.40	5.88±0.09
8	325.41±195.57	125.91±100.89	2.89±0.76	0.09±0.02	3538.04±1371.55	1333.31±826.30	785±1.77	6.17±0.30
9	245.50±111.77	103.50±18.61	2.31±0.66	0.06±0.03	4008.78±399.97	1834.24±699.91	6.65±1.34	5.89±0.30
10	1267.97±106.74	909.76±46.17	1.39±0.05	0.23±0.19	7630.25±560.91	5549.86±4210.16	16.50±2.55	5.49±0.30
11	516.74±2.04	276.05±55.34	1.91±0.39	0.18±0.02	2880.84±383.43	1518.65±109.66	6.55±1.06	6.07±0.11
12	152.84±30.91	76.01±14.89	2.01±0.01	0.09±0.02	1746.71±126.47	869.53±68.63	3.50±0.28	6.58±0.11

15 gün boyunca çalkalamalı inkübatörlerde takip edilen iki paralelli fermentasyonlara Çizelge 4.1’de ifade edilen analizler uygulanmıştır. PB ile sunulan her bir besiyeri bileşimi formülasyonu ve gerçekleştirilen fermentasyonlar neticesinde mikroorganizma şeker tüketimi- enzim üretimi grafikleri aşağıda ayrı ayrı verilmiştir.

Çizelge 4.2. PB 1 numaralı besiyeri bileşimi.

°Bx	(NH ₄) ₂ HPO ₄	MgSO ₄ 7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	NH ₄ NO ₃	Maya ekstaktı	Pepton	ZnSO ₄ 7H ₂ O
5	0.1	0.1	0.01	0.1	0.1	1	0.072

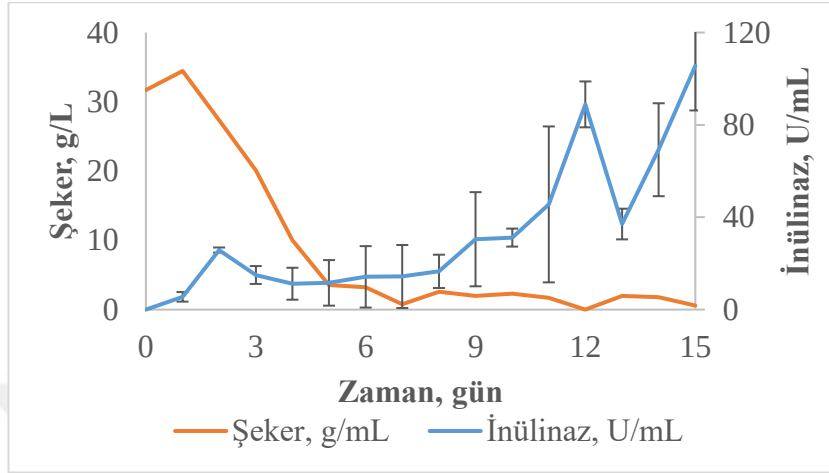


Şekil 4.1. PB 1 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.

1.numaralı besiyeri bileşimine ait fermentasyonlardan, en yüksek 315.88 ± 33.73 U/mL inülinaz aktivitesine ulaşılmıştır. Aynı örneklerle invertaz-tip aktivite analizi yapılmış ve aktivite değeri 16.57 ± 1.65 U/mL olarak belirlenmiştir. Protein miktarı 0.14 ± 0.01 mg/mL olarak bulunmuştur. I/S oranı 19.26 ± 3.96 bulunurken, biyokütle miktarı 16.00 ± 0.28 g/L olmuştur. Fermentasyon sonunda pH değeri 5’den 5.90 ± 0.01 ’e yükselmiştir.

Çizelge 4.3. PB 2 numaralı besiyeri bileşimi.

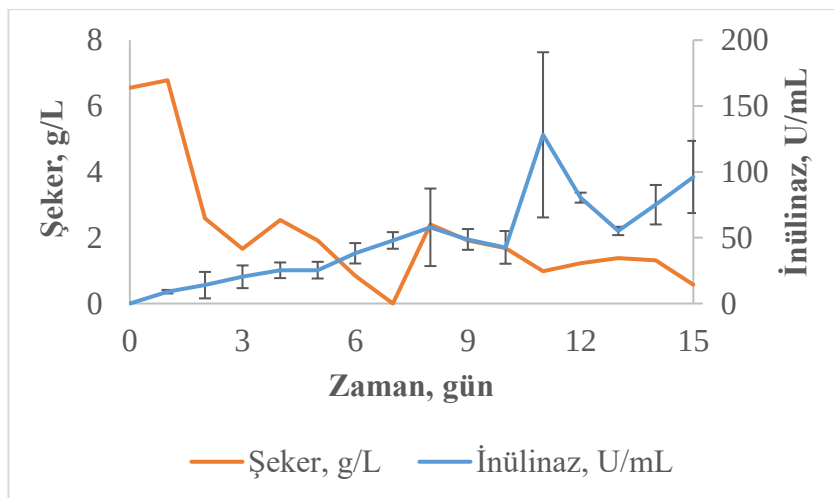
°Bx	(NH ₄) ₂ HPO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	NH ₄ NO ₃	Maya ekstaktı	Pepton	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
5	0.6	0.01	0.2	0.1	0.1	0.1	0.072

**Şekil 4.2.** PB 2 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.

2.numaralı besiyeri için fermentasyonda inülinaz aktivitesi 111.91 ± 18.50 U/mL olarak bulunmuştur. İnvertaz-tip aktivitesi 15.40 ± 1.65 U/mL olurken I/S oranı 7.24 ± 0.42 olarak belirlenmiştir. Protein miktarı 0.04 ± 0.01 mg/mL olurken, biyokütle miktarı 13.50 ± 1.27 g/L olarak belirlenmiştir. pH değeri 5'den 4.72 ± 0.15 'e düşmüştür.

Çizelge 4.4. PB 3 numaralı besiyeri bileşimi.

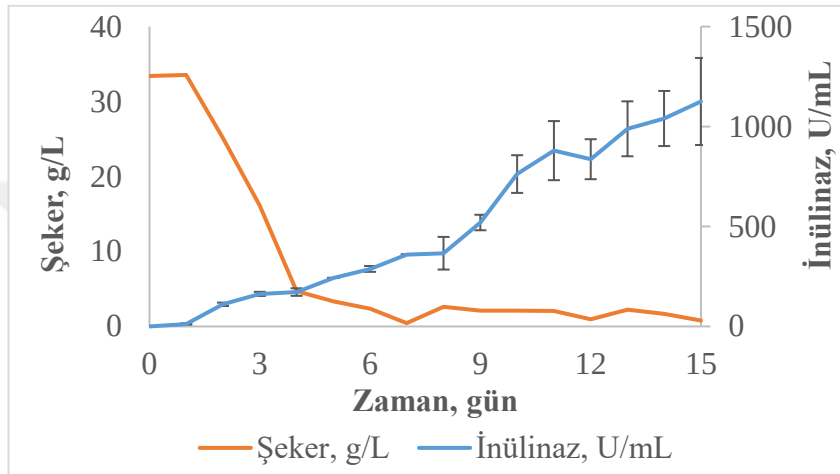
°Bx	(NH ₄) ₂ HPO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	NH ₄ NO ₃	Maya ekstaktı	Pepton	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
1	0.6	0.1	0.01	0.5	0.1	0.1	0.014

**Şekil 4.3.** PB 3 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.

3.numaralı besiyerine ait denemede, inülinaz aktivitesi 157.17 ± 47.59 U/mL olurken invertaz-tip aktivitesi 16.52 ± 5.58 U/mL olarak belirlenmiştir. Bu fermentasyonda I/S oranı 10.61 ± 6.47 olarak tespit edilmiştir. Protein miktarı 0.05 ± 0.01 mg/mL olarak bulunmuştur. Biyokütle miktarı 4.10 ± 0.14 g/L olup fermentasyon sonunda pH değeri 5'den 5.90 ± 0.01 'e artmıştır.

Çizelge 4.5. PB 4 numaralı besiyeri bileşimi.

°Bx	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KH_2PO_4	NH_4NO_3	Maya ekstaktı	Pepton	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
5	0.1	0.1	0.2	0.1	1	0.1	0.014

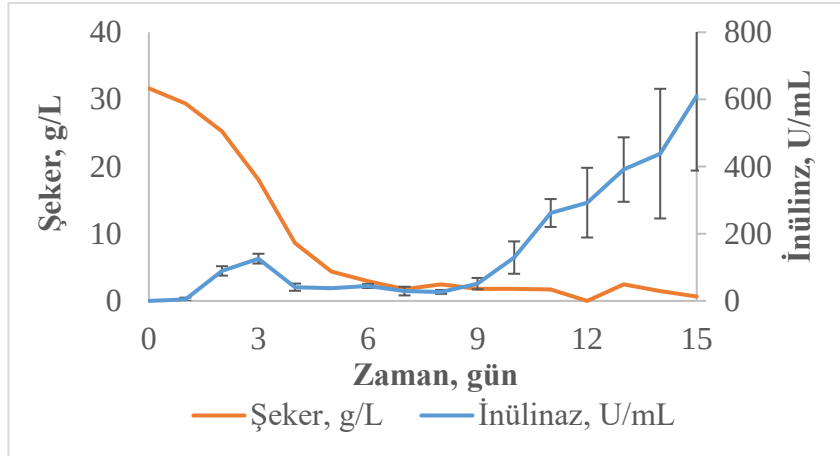


Şekil 4.4. PB 4 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.

4.numaralı besiyerine ait fermentasyonda inülinaz aktivitesi 1125.63 ± 308.04 U/mL olarak belirlenmiştir. İnvertaz-tip aktivitesi 235.65 ± 39.97 U/mL olurken I/S oranı 4.73 ± 0.50 olarak bulunmuştur. Protein miktarı 0.19 ± 0.08 mg/mL olarak bulunmuştur. Biyokütle miktarı 14.40 ± 1.27 g/L olup son pH değeri 5'den 5.69 ± 0.03 'e artış göstermiştir.

Çizelge 4.6. PB 5 numaralı besiyeri bileşimi.

°Bx	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KH_2PO_4	NH_4NO_3	Maya ekstaktı	Pepton	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
5	0.6	0.01	0.2	0.5	0.1	1	0.014

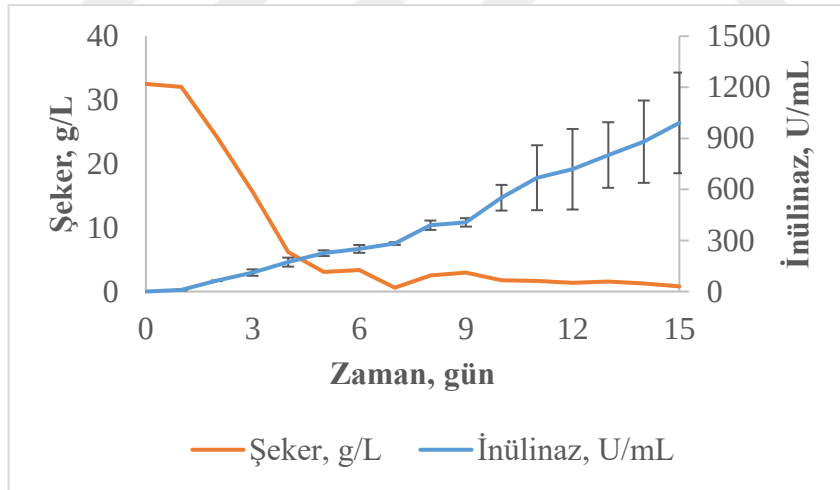


Şekil 4.5. PB 5 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.

5.numaralı besiyerine ait fermentasyonda inülinaz aktivitesi 610.33 ± 314.24 U/mL olarak bulunmuştur. İnvertaz-tip aktivitesi 197.59 ± 131.28 U/mL olurken I/S oranı 3.29 ± 0.59 olarak gösterilmiştir. Protein miktarı 0.21 ± 0.01 olurken biyokütle miktarı 14.50 ± 2.40 g/L olmuştur. Fermentasyon sonunda pH değeri 5'den 5.83 ± 0.08 'e artmıştır.

Çizelge 4.7. PB 6 numaralı besiyeri bileşimi.

°Bx	(NH ₄) ₂ HPO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	NH ₄ NO ₃	Maya ekstaktı	Pepton	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
5	0.6	0.1	0.01	0.5	1	0.1	0.072

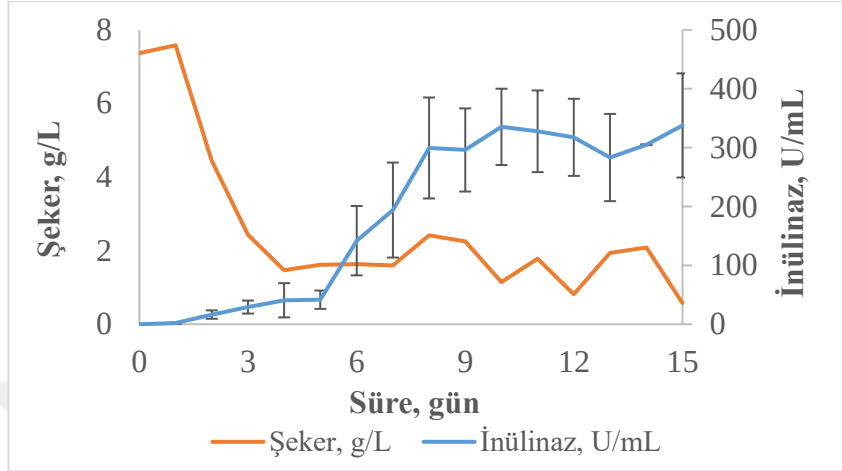


Şekil 4.6. PB 6 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.

6.numaralı besiyerindeki fermentasyonda inülinaz aktivitesi değeri 990.77 ± 418.13 U/mL olarak bulunmuştur. İnvertaz-tip aktivitesi 320.44 ± 150.51 U/mL olurken I/S oranı 3.13 ± 0.17 olarak belirlenmiştir. Protein miktarı 0.25 ± 0.02 mg/mL olarak bulunmuştur. Biyokütle miktarı 14.40 ± 0.28 g/L olup son pH değeri 5'den 5.52 ± 0.10 'a artış göstermiştir.

Çizelge 4.8. PB 7 numaralı besiyeri bileşimi.

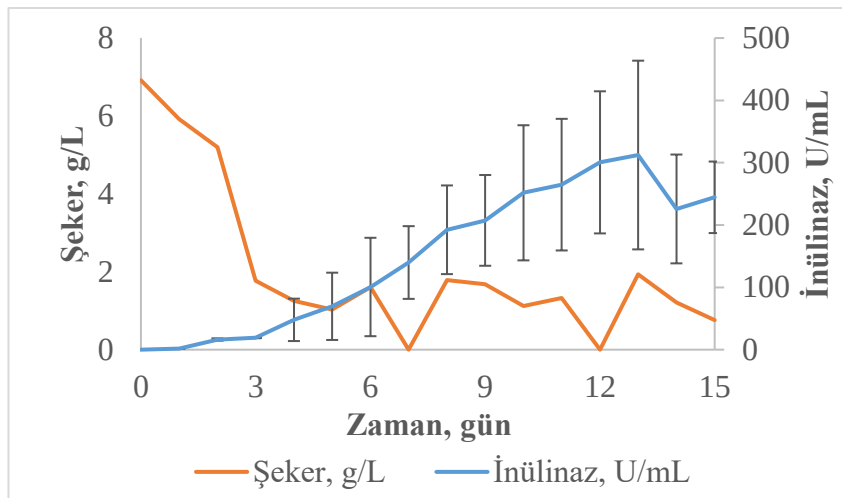
°Bx	(NH ₄) ₂ HPO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	NH ₄ NO ₃	Maya ekstaktı	Pepton	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
1	0.6	0.1	0.2	0.1	1	1	0.014

**Şekil 4.7.** PB 7 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.

7.numaralı besiyeri bileşiminde gerçekleştirilen fermentasyonda, inülinaz aktivitesi 365.88 ± 85.21 U/mL olarak bulunmuştur. Örneklerin invertaz-tip aktivitesi 131.32 ± 45.83 U/mL olarak bulunurken I/S oranı 2.85 ± 0.34 olarak belirlenmiştir. Protein miktarı 0.13 ± 0.01 mg/mL olarak bulunmuştur. Biyokütle miktarı 8.70 ± 2.40 g/L olup son pH değeri 5'den 5.88 ± 0.09 'a artış göstermiştir.

Çizelge 4.9. PB 8 numaralı besiyeri bileşimi.

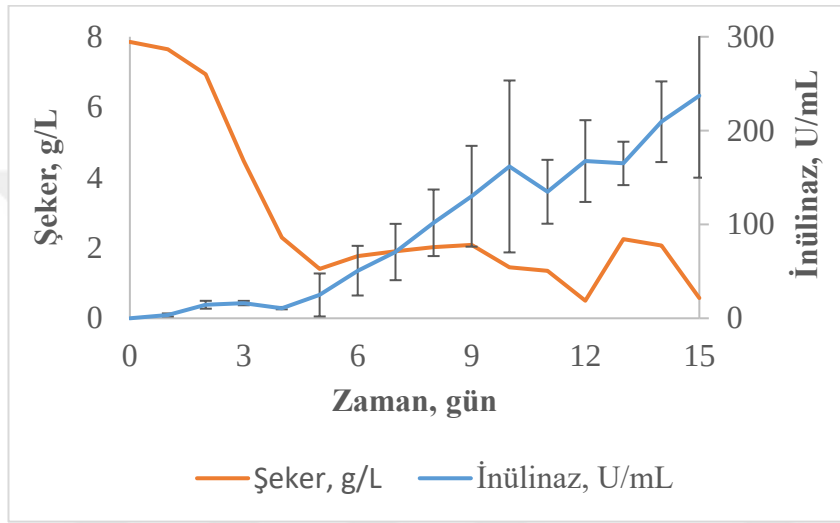
°Bx	(NH ₄) ₂ HPO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	NH ₄ NO ₃	Maya ekstaktı	Pepton	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
1	0.1	0.1	0.2	0.5	0.1	1	0.072

**Şekil 4.8.** PB 8 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.

8.numaralı besiyerinde gerçekleştirilen fermentasyonda inülinaz aktivitesi 244.49 ± 81.14 U/mL olarak belirlenmiştir. İnvertaz-tip aktivitesi 125.91 ± 100.8 U/mL olurken I/S oranı 2.89 ± 0.76 olarak belirlenmiştir. Örneklerde protein miktarı 0.09 ± 0.02 mg/mL olarak bulunmuştur. Biyokütle miktarı 7.85 ± 1.77 g/L olup fermentasyon sonunda pH değeri 5'den 6.17 ± 0.30 'a artış göstermiştir.

Çizelge 4.10. PB 9 numaralı besiyeri bileşimi.

°Bx	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KH_2PO_4	NH_4NO_3	Maya ekstaktı	Pepton	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1	0.1	0.01	0.2	0.5	1	0.1	0.072

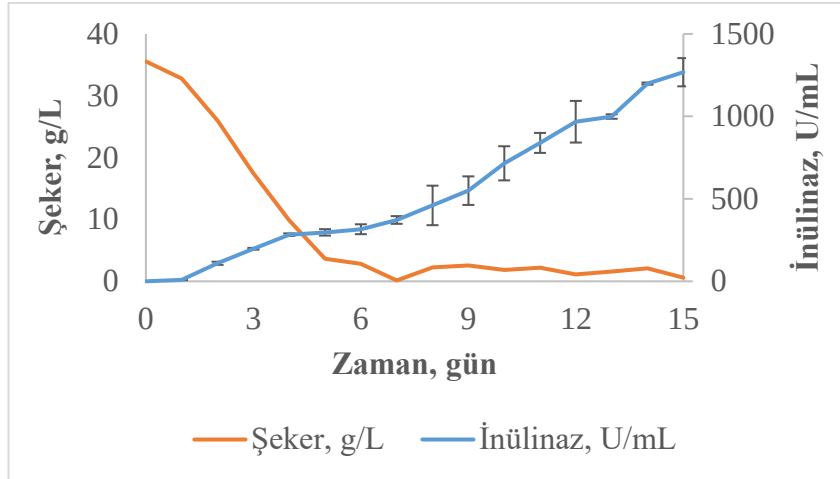


Şekil 4.9. PB 9 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.

9.numaralı besiyerinde, inülinaz aktivitesi 245.50 ± 111.77 U/mL olurken invertaz-tip aktivitesi 103.50 ± 18.61 U/mL'dir. Örneklerin I/S oranı 2.31 ± 0.66 olarak belirlenmiştir. Protein miktarı 0.06 ± 0.03 mg/mL olarak bulunmuştur. Biyokütle miktarı 6.65 ± 1.34 g/L olup fermentasyon sonunda pH değeri 5'den 5.89 ± 0.30 'a artmıştır.

Çizelge 4.11. PB 10 numaralı besiyeri bileşimi.

°Bx	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KH_2PO_4	NH_4NO_3	Maya ekstaktı	Pepton	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
5	0.1	0.01	0.01	0.5	1	1	0.014

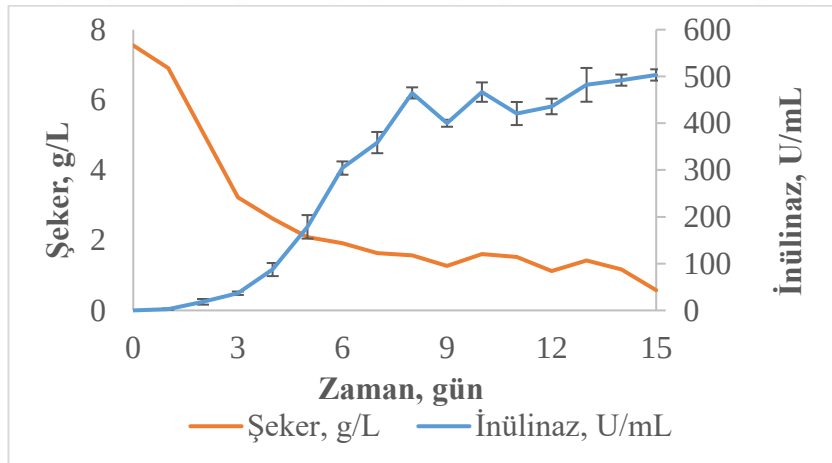


Şekil 4.10. PB 10 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.

10.numaralı besiyerinde inülinaz aktivitesi 1267.97 ± 106.74 U/mL olarak tespit edilmiştir. İnvertaz-tip aktivitesi 909.76 ± 46.17 U/mL olurken I/S oranı 1.39 ± 0.05 olarak belirlenmiştir. Protein miktarı 0.23 ± 0.19 mg/mL olarak bulunmuştur. Biyokütle miktarı 16.50 ± 2.55 g/L olup son pH değeri 5'den 5.49 ± 0.30 'a yükselmiştir.

Çizelge 4.12. PB 11 numaralı besiyeri bileşimi.

°Bx	(NH ₄) ₂ HPO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	NH ₄ NO ₃	Maya ekstaktı	Pepton	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
1	0.6	0.01	0.01	0.1	1	1	0.072

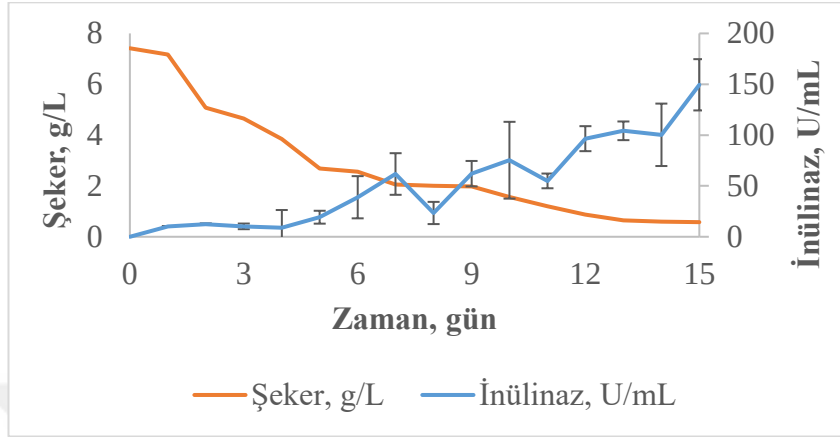


Şekil 4.11. PB 11 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.

11.numaralı besiyeri bileşiminde inülinaz aktivitesi 516.74 ± 2.04 U/mL olmuştur. İnvertaz-tip aktivitesi 276.05 ± 55.34 U/mL olurken I/S oran 1.91 ± 0.39 olarak bulunmuştur. Örneklerin protein miktarı 0.18 ± 0.02 mg/mL, biyokütle miktarı ise 6.55 ± 1.06 g/L olmuştur. Fermentasyon örneklerinin son pH değeri 5'den 6.07 ± 0.11 'e artmıştır.

Çizelge 4.13. PB 12 numaralı besiyeri bileşimi.

°Bx	(NH ₄) ₂ HPO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	NH ₄ NO ₃	Maya ekstaktı	Pepton	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
1	0.1	0.01	0.01	0.1	0.1	0.1	0.014



Şekil 4.12. PB 12 numaralı besiyeri bileşimi şeker tüketimi-inülinaz üretimi grafiği.

12.numaralı besiyerinde inülinaz aktivitesi 152.84 ± 30.91 U/mL olurken invertaz-tip aktivitesi 76.01 ± 14.89 U/mL olarak belirlenmiştir. Örneklerin I/S oranı 2.01 ± 0.01 olmuştur. Protein miktarı 0.09 ± 0.02 mg/mL olarak bulunmuştur. Biyokütle miktarı 3.50 ± 0.28 g/L olup son pH değeri 5'den 6.58 ± 0.11 'e artmıştır.

PBD metoduna göre *Aspergillus niger* ile gerçekleştirilen fermentasyon denemeleri süresince elde edilen sonuçlardan hesaplanan kinetik parametreler Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. PBD fermentasyon denemeleri kinetik parametreleri.

No	Maksimum tüketim hızı (Q _s), g/L/gün	Maksimum üretim hızı (Q _p), g/L/gün	Şeker tüketimi (ΔS), g/L	Enzim üretimi (P), U/mL	Şeker tüketim oranı, %
1	5.45 ^f	143.07 ^c	32.89 ^d	295.51 ^h	99.3 ^c
2	6.79 ^a	69.34 ⁱ	34.44 ^c	105.62 ^l	100.00 ^a
3	0.88 ^k	85.47 ^g	7.10 ^l	128.11 ^k	100.00 ^a
4	6.05 ^b	183.03 ^a	35.06 ^b	1236.73 ^b	98.69 ^d
5	5.48 ^e	125.44 ^d	32.77 ^e	610.33 ^d	100.00 ^a
6	5.69 ^d	172.24 ^b	32.50 ^f	990.77 ^c	98.1 ^e
7	1.04 ⁱ	82.51 ^h	7.73 ⁱ	337.69 ^f	100.00 ^a
8	0.95 ^j	65.27 ^j	7.61 ^k	312.30 ^g	100.00 ^a
9	1.48 ^h	36.08 ^l	9.33 ^g	237.18 ⁱ	100.00 ^a
10	5.96 ^c	91.12 ^e	35.61 ^a	1257.93 ^a	99.62 ^b
11	1.78 ^g	89.38 ^f	8.40 ^h	503.24 ^e	100.00 ^a
12	1.04 ⁱ	49.19 ^k	7.69 ^j	149.47 ^j	100.00 ^a

Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel olarak fark önemlidir ($P < 0.05$).

Çizelge 4.14'te ki veriler ışığında, maksimum tüketim hızı 6.79 g/L/gün ile 2 numaralı fermentasyon da görülürken maksimum üretim hızı 183.03 g/L/gün ile 4 numaralı fermentasyonda gözlenmiştir. 10 numaralı fermentasyon maksimum inülinaz aktivitesi gösterirken (1257.93 U/mL) şekerin de %99.62'sini tüketmiştir. Maksimum aktivitenin görüldüğü fermentasyonda da 5°Bx keçiyoynuzu ekstraktı ve %1 maya ekstraktı olduğu dikkat çekmektedir. Buradan elde edilen inülinaz aktivitesi (U/mL) sonuçları istatistiki değerlendirmeye alınmıştır.

4.1.1. PB dizayn ile etkili parametrelerin belirlenmesi

Elde edilen analiz sonuçları Minitab İstatistiksel Yazılımı kullanılarak değerlendirilmiş, değerlendirme esnasında da "Full Quadratic" Plackett-Burman metodu kullanılmıştır. Model de kullanılan değişkenler °Bx, (NH₄)₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄, NH₄NO₃, maya ekstraktı, pepton ve ZnSO₄.7H₂O olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.15'te inülinaz için kullanılan besiyeri bileşimine ait istatistiksel etkiler ve katsayılar bulunmaktadır.

Çizelge 4.15. İnülinaz için tahmini etkiler ve katsayılar.

Terim	Etki	Katsayı	SH kat.	T	P
Sabit		513.5	48.6	10.57	0.000*
°Bx	439.2	219.6	48.6	4.52	0.000*
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-117.4	-58.7	48.6	-1.21	0.246
MgSO ₄ .7H ₂ O	66.4	33.3	48.6	0.68	0.504
KH ₂ PO ₄	-106.8	-53.4	48.6	-1.10	0.289
NH ₄ NO ₃	164.0	82.0	48.6	1.69	0.112
Maya ekstraktı	477.2	238.6	48.6	4.91	0.000*
Pepton	99.1	49.5	48.6	1.02	0.324
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-191.6	-95.8	48.6	-1.97	0.067

SH kat.: Standart hata katsayıları; R^2 : 0.787,

P: Olasılık; * $P < 0.05$

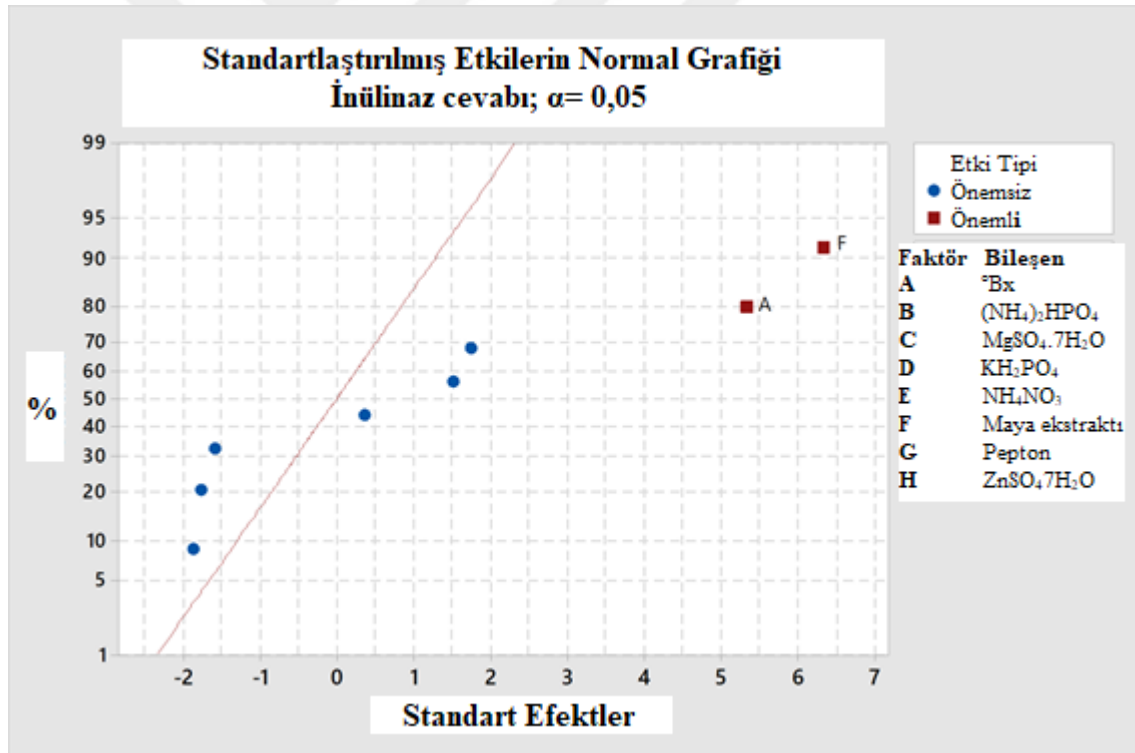
A.niger ile gerçekleştirilen inülinaz enzimi fermentasyonlarında üretim oranına ait modelin R^2 değeri 0.787 olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre üretim oranı için elde edilen model, fermentasyon sonuçlarının %78.7'sini tam olarak temsil etmektedir (Çizelge 4.15). P (Probability; Olasılık) değeri istatistiksel anlamlılığın varlığının ve varsa da var olan farklılığın kanıtının düzeyinin belirlenmesi amacı ile kullanılan bir değerdir (Kul 2014). Bunun yanı sıra PB tasarımı ve her bir terimin varyans analizi incelenmiş, *A.niger* ile gerçekleştirilen inülinaz enzimi fermentasyonlarının üretim oranları için sonuçların regresyon katsayıları ve varyans analizi Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.16. Model denklemdeki üretim oranının varyans analizi.

Kaynak	SD	Düz. KT	Düz. KO	F	P
Model	8	3141703	392713	10.38	0.000*
Hata	15	665478	44365		
Uyum eksikliği	3	385177	128392	3.31	0.057 [‡]
Saf hata	12	465023	38752		
Toplam hata	23	3991903			

SD: Serbestlik derecesi, Düz. KT: Düzeltilmiş kareler toplamı,
Düz. KO: Düzeltilmiş kareler ortalaması, * $P < 0.05$, [‡] $P > 0.05$

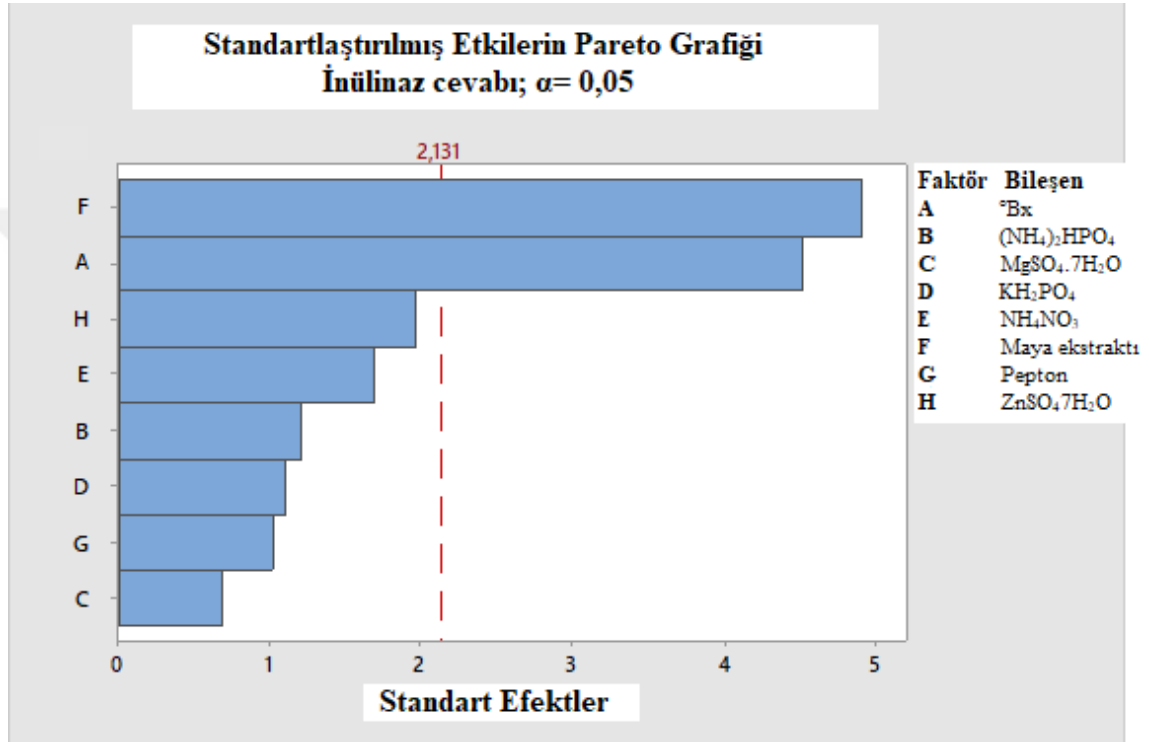
Çizelge 4.16 incelendiğinde enzim üretimi PB dizayn metoduna göre modelin istatistiksel değeri önemli olduğu için ($P < 0.05$) varyans analizi sonucuna göre model önemli ve uyumludur. Aynı şekilde PB dizaynına göre uyum eksikliği (Lack-of-fit) değeri de istatistiki olarak önemsiz çıkmıştır ($P > 0.05$) (Arockiasamy vd. 2008). Tarama tasarımlarının birincil hedefi, hayati önem taşıyan birkaç faktörü veya cevabı etkileyen kilit değişkenleri belirlemektir. Etkilerin Normal Grafiği (Şekil 4.13), bu faktörlerin belirlenmesine yardımcı olan önemli grafik olarak bilinmektedir.

**Şekil 4.13.** Etkilerin Normal Grafiği (PBD).

Etkilerin normal olasılık grafiğinde, çizgiye yakın olmayan noktalar, gözlenen varyasyonun çok üzerinde ölçülen değerleri ölçer ve genellikle önemli etkileri sinyalleştirir. Önemli etkiler daha büyük ve genellikle önemsiz etkilere kıyasla donatılmış çizgiden daha ileri seviyededir. Önemli olmayan etkiler daha küçük ve sıfıra ortalanmış olma eğilimindedir. Şekil 4.13’de A ve F değişkenlerinin değeri Normal Score değeri 0

noktasının üzerinde olduğu için faktörlerinin ana etkileri 0.05 düzeyinde istatistiksel olarak önemlidir ve bunların enzim üretimi üzerinde pozitif etkisi vardır. Diğer değişkenlerin ise enzim aktivitesi üzerinde önemli etkisi yoktur. Bu noktalar, önemsiz etkiler açısından farklı renk ve şekillere sahiptir.

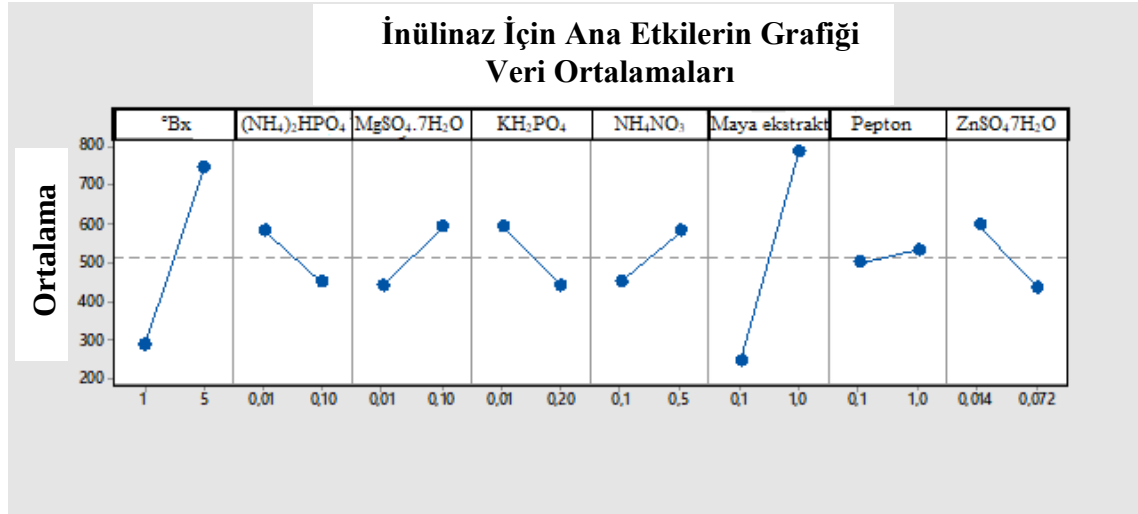
Pareto grafiği (Şekil 4.14), en büyük etkiden en küçük etkiye kadar standart etkilerin mutlak değerlerini gösterir. Standardize edilmiş etkiler, etkinin 0 olduğu boş hipotezi test eden t-istatistikleridir. Grafik, hangi etkilerin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirten bir referans çizgisini de göstermektedir.



Şekil 4.14. Etkilerin Pareto Grafiği (PBD).

Etkilerin büyüklüğünü ve önemini belirlemek için Pareto grafiği kullanılır. Pareto grafiğinde, referans çizgisini aşan çubuklar istatistiksel açıdan önemlidir. Şekil 4.14'te ki grafikte, A ve F faktörlerini temsil eden °Bx ve maya ekstraktı çubukları 2.131 olarak sistemin belirlediği referans çizgisinden geçerler. Bu faktörler, mevcut model koşullarıyla 0.05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlıdır.

Bir veya daha fazla faktör için seviye ortalamaları arasındaki farkları incelemek için ana etkiler kullanılır. Bir faktörün farklı seviyeleri yanıtı farklı biçimde etkilediğinde temel bir etki söz konusudur (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. İnülinaz İçin Ana Etkilerin Grafiği.

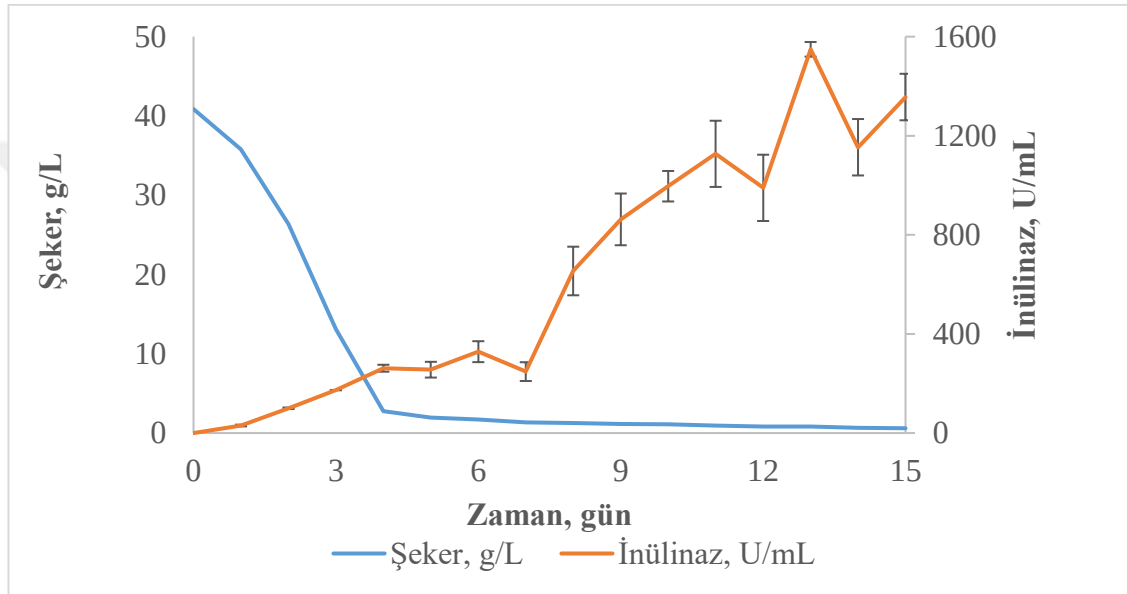
PB dizaynında çizgi yatay olduğunda (x eksenine paralel) ana etki yoktur. Faktörün her seviyesi, yanıtı aynı şekilde etkiler ve tepki ortalaması, tüm faktör düzeylerinde aynıdır. Çizgi yatay olmadığında ana etki vardır. Faktörün farklı seviyeleri, yanıtı farklı biçimde etkiler. Çizginin eğimi ne kadar yüksekse, ana etkinin büyüklüğü o kadar artar. Şekil 4.15'te de görüldüğü gibi en fazla eğime sahip olan faktör °Bx ve maya ekstraktı olmuştur ve her ikisinin de maksimum değerlerinde aktivitenin arttığı açıkça görülmüştür. Çizelge 4.15'te de görüldüğü gibi besiyeri bileşimine pozitif etki yapan bileşenler; °Bx, MgSO₄.7H₂O, NH₄NO₃, maya ekstraktı ve pepton iken negatif etki yapanlar; (NH₄)₂HPO₄, KH₂PO₄ ve ZnSO₄.7H₂O'dur. Model üzerine negatif etki yapanlar hiç değerlendirilmezken pozitif etki yapanlar arasında da $P < 0.05$ olan bileşenler dikkate alınmıştır.

Sonuç olarak; Çizelge 4.1 incelendiğinde en yüksek inülinaz aktivitesi değeri 1267.97±106.74 U/mL olarak 10 numaralı besiyeri bileşimine sahip denemeden elde edilmiştir. Bu denemeleri 1125.63±308.04 U/mL ve 990.77±418.13 U/mL inülinaz aktivitesi sonuçlarıyla 4. ve 6. denemelerde ki fermentasyonlar izlemiştir. En yüksek aktivite değerlerinin gözlendiği bu 3 deneme de °Bx değerinin 5, maya ekstraktı içeriğinin %1 olması dikkat çekmektedir. Diğer 9 deneme sonucuna göre büyük oranda aktivite farkı olan bu 3 deneme önemli kabul edilmiştir. Başlangıç şeker içeriği ve optimum besiyeri bileşimi için gerçekleştirilen denemelerin sonuçları PBD metoduna kaydedilmiş ve bu 8 etkenin (°Bx, (NH₄)₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄, NH₄NO₃, maya ekstraktı, pepton, ZnSO₄.7H₂O) maksimum inülinaz aktivitesine etkisi incelenmiştir. PBD istatistiksel deneysel tarama yöntemi sonuçları, *Aspergillus niger* kullanılarak üretilen inülinaz enzimi için önemli etkenlerin °Bx (keçiyoynuzu ekstraksiyonu konsantrasyonu) ve maya ekstraktı olduğunu göstermiştir. Bu aşamadan sonraki gerçekleştirilen tüm fermentasyon denemelerinde; başlangıç şeker içeriği 5°Bx olarak kullanılmıştır. Besiyeri bileşiminde ise diğer 7 etkenin içinde yalnızca maya ekstraktının etkisi istatistiksel olarak ($P < 0.05$) önemli çıkmıştır. Maya ekstraktı ise ortama %1 oranında eklenmiştir. Dolayısıyla maksimum inülinaz aktivitesi hedef alındığından dolayı optimum besiyeri içeriğinde yalnızca %1 oranında maya ekstraktı kullanılacakken, başlangıç şeker içeriği

de 5°Bx olarak seçilmiştir. Ardından belirlenen koşullarda doğrulama denemesi gerçekleştirilmiştir.

4.1.2. Başlangıç şeker içeriği ve optimum besiyeri bileşimi ile doğrulama fermentasyonu

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucuna göre; 5 Bx° keçiboynuzu ekstraktı ve %1 maya ekstraktı erlenlerde hazırlanıp (2 tekerrürlü olarak) steril edilmiş ve Çizelge 3.2’de belirtilen çalışma koşullarında fermentasyona bırakılıp doğrulaması yapılmıştır. Doğrulama denemesi sonuçlarına bağlı olarak şeker tüketimine bağlı inülinaz aktivitesi değerlerine ilişkin grafik Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.16. *A.niger* ile gerçekleştirilen optimum başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi ile fermentasyon denemeleri sonucunda elde edilen şeker tüketimi-enzim aktivitesi grafiği.

Şekil 4.16’da görüldüğü gibi fermentasyon ortamından şeker yaklaşık olarak 4 gün içerisinde büyük oranda tükenmektedir. Fakat enzim aktivitesi doğrusal bir artış göstererek 13.günde 1548.84±41.81 U/mL olarak maksimum değerine ulaşmış olup fermentasyon 15 günde tamamlanmıştır. Doğrulama denemesine ait analiz sonuçları Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.17. Optimum başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi doğrulama denemesi analiz sonuçları.

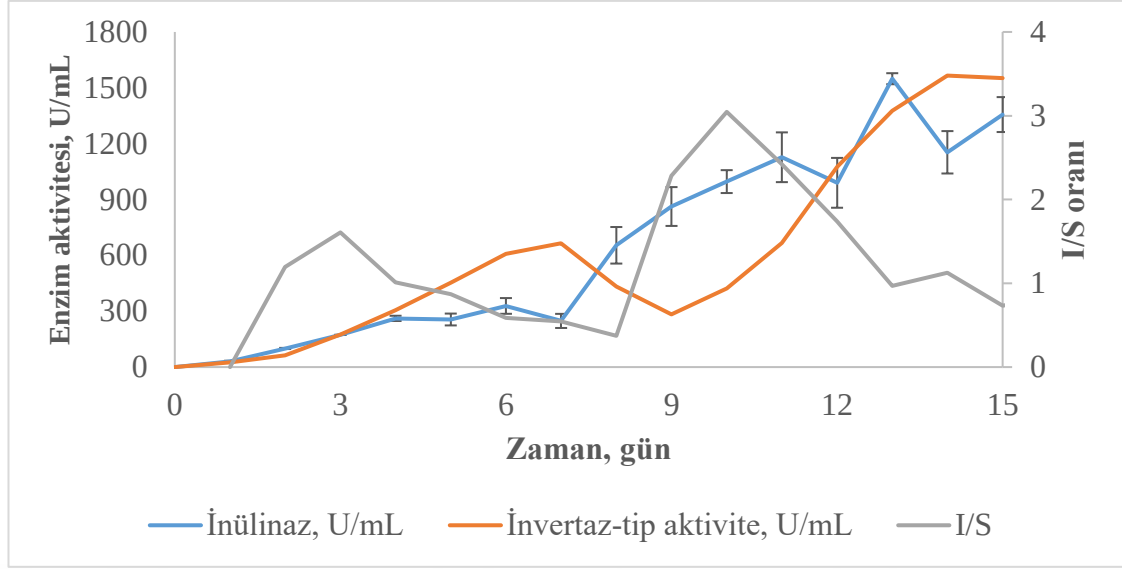
Gün	İnülinaz, U/mL	İnvertaz-tip, U/mL	I/S Oranı	Protein, mg/mL	İnülinaz, U/mg	İnvertaz-tip, U/mg
0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.62±0.84	0.00±0.00	0.00±0.00
1	30.46±4.92	25.73±1.65	1.19±0.35	0.02±0.01	1714.61±933.40	1330.62±717.94
2	100.04±4.24	62.42±3.38	1.61±0.18	0.03±0.01	3264.75±658.16	2010.88±350.06
3	173.16±0.22	174.03±32.35	1.01±0.19	0.04±0.00	4252.10±206.52	4245.91±493.37
4	261.67±19.78	305.63±43.28	0.87±0.21	0.04±0.00	7109.64±243.16	8364.62±1668.56
5	255.70±44.95	453.05±83.90	0.59±0.25	0.05±0.01	5399.60±180.22	10200.43±4759.29
6	328.48±59.79	607.99±25.84	0.54±0.16	0.03±0.01	9890.70±2776.92	17910.36±1880.29
7	247.98±53.55	665.15±10.61	0.37±0.11	0.06±0.00	4035.46±660.22	10945.83±665.86
8	654.13±138.78	433.29±402.18	2.28±1.67	0.08±0.01	8119.94±2467.14	5607.95±5620.86
9	862.42±147.58	283.75±73.19	3.05±0.05	0.12±0.01	7352.92±912.92	2417.86±463.63
10	996.26±86.98	421.75±70.64	2.42±0.70	0.18±0.08	6147.85±1549.99	2785.71±1707.79
11	1126.97±188.95	666.27±92.48	1.74±0.64	0.15±0.02	7256.38±531.22	4400.79±1194.77
12	989.68±189.17	1076.51±235.68	0.97±0.46	0.25±0.00	4005.71±741.76	4366.51±993.19
13	1548.84±41.81	1377.17±79.73	1.13±0.11	0.28±0.03	6135.69±316.80	5001.63±754.53
14	1153.60±161.00	1565.65±147.61	0.73±0.08	0.32±0.05	3571.76±124.95	4885.23±267.35
15	1356.24±132.66	1552.86±66.67	0.87±0.08	0.29±0.06	4629.13±161.14	5348.11±773.18

Optimum başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi doğrulama denemesine ait kinetik parametreler Çizelge 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Optimum başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi doğrulama denemesi kinetik parametreler.

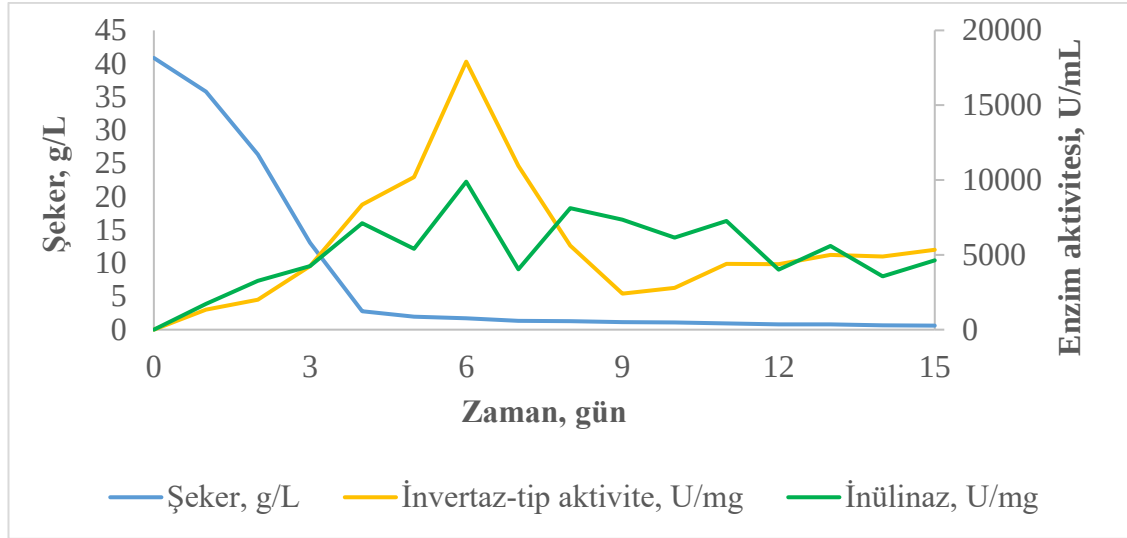
Kinetik Parametreler	Değer
Maksimum tüketim hızı (QS), g/L/gün	9.89
Maksimum üretim hızı (QP), U/mL/gün	559.16
Şeker tüketimi (ΔS), g/L	40.26
Enzim üretimi (P), U/mL	1548.84
Şeker tüketim oranı, %	98.52
Biyokütle, g/L	12.3
pH	6.34

Doğrulama denemesinden önce gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucu en yüksek inülinaz aktivitesi 1267.97 U/mL (Çizelge 4.1) olarak belirlenmiştir. Doğrulama denemesi ile birlikte *A.niger* ile üretilen inülinaz enzim aktivitesi 1548.84 U/mL çıkmıştır. Böylece enzim aktivitesinde artış sağlanmış ve optimizasyon işleminin başarısı gösterilmiştir. Fermentasyon sonunda ortamda ki toplam biyokütle 12.3 g/L olurken son pH değeri 6.34 olarak kayıt edilmiştir. Ayrıca maksimum inülinaz enzim aktivitesi için invertaz-tip aktivitesi 1377.17 U/ml olarak belirlenmiştir. Bu enzim değerleri için I/S oranı ise 1.13 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.17. Optimum başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi doğrulama fermentasyonları sonucunda inülinaz ve invertaz-tip aktivite değişimine karşılık I/S oranlarının değişim grafiği.

Optimum besiyerinde inülinaz enziminin yanısıra invertaz-tip aktiviteleri de belirlenmiştir. Bunlara bağlı olarak da I/S oranının nasıl değiştiği belirlenmiştir (Şekil 4.17). I/S oranları, fermentasyon boyunca 0.37-3.05 arasında değişmiştir. Ayrıca, I/S oranları genel itibariyle fermentasyonun 1. gününden 10. gününe kadar dalgalanmalar gösterip 10. gün de maksimum değeri gösterdiği anlaşılmış olup 10. günden sonra I/S oranlarında nispeten bir azalış söz konusu olmuştur. I/S oranlarının fermentasyonun başlangıcından 10. gününe kadar yüksek seyretmesinin nedeninin, enzimin substrat spesifikliği ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak, I/S oranına ait değerler 10^{-2} 'den büyük olduğu için üretilen enzimin inülinaz doğasında olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.18. Optimum başlangıç şeker içeriği ve besiyeri bileşimi doğrulama fermentasyonları sonucunda şeker tüketimine karşılık inülinaz ve invertaz-tip aktivite miktarlarının değişim grafiği.

Fermentasyon boyunca alınan örneklerde protein miktarı analizi yapılmış olup ham enzim solüsyonlarının spesifik aktiviteleri invertaz-tip (U/mg) ve inülinaz (U/mg) aktivite değerleri Şekil 4.18’de verilen grafikte gösterilmiştir. Çizelge 4.17’ye göre fermentasyon ortamındaki protein miktarının, fermentasyonun 1. gününden fermentasyonun 6. gününe kadar azaldığı belirlenmiş olup bunun besiyerinde azot kaynağı olarak kullanılan maya ekstraktının içerdiği proteinlerin ve/veya aminoasitlerin mikroorganizma tarafından metabolize edildiği düşünülmüştür. Bunun yanı sıra enzim üretiminin devam ettiği dolayısıyla fermentasyon ortamında protein seviyesinin de artmakta olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, fermentasyon ortamındaki azot kaynaklarının tamamen tüketilmiş olduğu fermentasyonun 6. gününden anlaşılmaktadır. Çünkü bu günden sonra fermentasyon ortamındaki protein seviyesinin fermentasyonun sonuna kadar arttığı tespit edilmiştir. Minimum protein miktarı fermentasyonun 6. gününde 0.03 ± 0.01 mg/mL olarak belirlenmiş olup maksimum protein miktarı da fermentasyonun 14. gününde 0.32 ± 0.05 mg/mL olarak tespit edilmiştir. İnülinaz ve invertaz-tip aktivite değerlerinin U/mL cinsinden aktivite değerlerinin protein miktarına bölünmesiyle U/mg cinsinden inülinaz ve invertaz-tip aktivite değerleri hesaplanmış olup fermentasyon boyunca değişimi Şekil 4.18’de gösterilmiştir. Maksimum inülinaz (U/mg) ve invertaz-tip (U/mg) aktiviteleri sırasıyla 6.gün değerleri olan 9890.70 ± 2776.92 U/mg ve 17910.36 ± 1880.29 U/mg olarak belirlenmiştir.

Tüm gerçekleştirilen fermentasyonlar sonucunda °Bx ve maya ekstaktı istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Bu basamaktan sonra ki her fermentasyon için başlangıç şeker içeriği 5, maya ekstraktı oranı ise %1 olacak şekilde devam edilmiştir. 5°Bx başlangıç şeker içeriği, %1 maya ekstraktı ile hazırlanan besiyeri formülasyonu ve 30°C sıcaklık, 200 rpm çalkalama hızı, başlangıç pH değeri 5, %2 inokülasyon ve 150 mL medya hacmi ile gerçekleştirilen fermentasyon sonunda 1548.84 U/mL maksimum inülinaz aktivitesine ulaşılmıştır.

Litaratürde inülinaz üretimi için besiyeri bileşimi ile ilgili bazı optimizasyon çalışmaları bulunmaktadır. Gerçekleştirilen bir çalışmada Skowronek ve Fiedurek (2004a) *Aspergillus niger* 13/36 soyu ile inülinaz üretiminde başlangıç şeker içeriğini belirlemek için karbon kaynağı %0.5-8 aralığında sakkaroz kullanmışlardır ve maksimum inülinaz aktivitesine %1.5 sakkaroz, %0.2 NaNO₃, %0.025 MgSO₄·7H₂O, %0.5 K₂HPO₄ ve %2 maya ekstraktı varlığında 49.3 U/mL olarak ulaşmışlardır. Yine aynı çalışmada besiyeri formülasyonu çalışması yapmışlar (maya özütü, sakkaroz, NaNO₃, K₂HPO₄ ve MgSO₄·7H₂O konsantrasyonu) ve %3.94 maya özütü, %6.66 sakkaroz, %0.73 NaNO₃, %0.52 K₂HPO₄ ve %0.03 MgSO₄·7H₂O ile oluşturulan besiyeri bileşiminden 79.8 U/mL inülinaz aktivitesi elde etmişlerdir.

Benzer bir çalışmada, Kalil vd. (2001) *A. niger*'den inulinaz üretimini etkileyen proses parametrelerinin etkilerini incelemişlerdir. Sakkaroz, maya özütü, pepton ve K₂HPO₄'ün inülinaz üretiminde ki etkileri üzerine çalışmışlardır. *K. marxianus* ile 30°C sıcaklık ve 150 rpm çalkalama hızında en yüksek inülinaz aktivitesine (127 U/mL); 14 g/L sakkaroz, 10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton ve 1g/L K₂HPO₄ ve pH 3.5 koşullarında ulaşmışlardır. Ayrıca bu çalışmada bizim çalışmamıza paralel olarak maya özütünün ve ekstra pepton konsantrasyonlarındaki bir artışın, enzimatik aktivitedeki bir artış ile korelasyonlu olduğu gösterilirken, sakkaroz konsantrasyonunda bir artış inülinaz üretiminde bir düşüşe yol açtığı kanısına varmışlardır. K₂HPO₄'ün etkisi çok düşük olduğu için enzim aktivitesinde ki etkisini önemsiz olarak kabul etmişlerdir.

Singh vd. (2007) inülinaz fermentasyonunda, çeşitli karbon kaynaklarının (% 1, w/v) tek tek veya inülin (% 0.1 ve % 0.5 w/v) ile kombinasyonundaki etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla pH 6.5 olan bazik bir ortamda (50 mL) fermentasyon gerçekleştirilmiş ve 30°C'de çalkalayarak (100 rpm) 60 saat süreyle inkübe etmişlerdir. Çeşitli karbon kaynaklarından enzim üretim sırası, inülin> sakkaroz> fruktoz> glukoz> laktoz> maltoz> nişasta şeklinde olmuştur. İnülin, *K. marxianus* YS-1'den inülinaz üretimi için en iyi karbon kaynağı olarak tespit edilmiştir. İnülinaz üretimi için optimum inülin konsantrasyonunu belirlemek için, ortamda farklı konsantrasyonları (% 0.5-2.5 w/v) kullanılmış. Maksimum enzim üretimi, %1.5 (w/v) inülin konsantrasyonunda 5.1 IU / mL olarak bulunmuştur. Çeşitli azot kaynaklarının etkisi altındaki inülinaz üretim sırası et ekstraktı> sığır ekstraktı> pepton> maya ekstraktı> amonyum klorür> amonyum sülfat> mısır likörü> amonyum nitrat> sodyum nitrat> üre şeklinde olmuştur. Maksimum inülinaz üretimi (6.5 IU / ml) et ekstraktı (%2) ile elde edilmiştir. Metal iyonlarının inülinaz aktivitesine etkisi araştırılmış ve Mg⁺², Cu⁺², Zn⁺², Co⁺², K⁺¹, BO₃⁻³, MoO₄⁻² inülinaz üretimine etki yapmazken sadece Mn⁺² (0.1mM) ve Ca⁺² (0.5 mM) inülinaz üretimini arttırmıştır. Çeşitli karbon, a9zot ve mineral kaynaklarının inülinaz üretiminde optimizasyonu çalışılmış fakat inülin ile çok düşük aktivite değerlerine ulaşmışlardır.

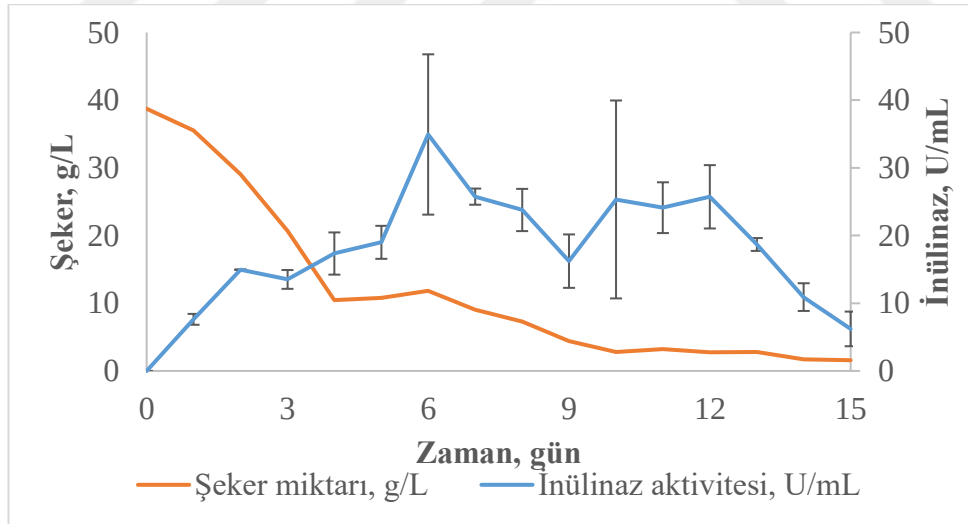
Jing vd. (2003)'nin *A. ficuum* JNSP5-06 ile yaptığı çalışmada karbon kaynağı olarak inülin kullanmışlardır. %2 inülin, %2 pepton, %1.2 (NH₄)H₂PO₄, %0.5 NaCl, %0.05 MgSO₄·7H₂O bulunan medya ortamında pH 5.5'e ayarlanarak geliştirilmiştir ve 11.02 U/mL maksimum aktivite değerine ulaşmışlardır. Bu şartlarda I/S oranı 1.14 olarak belirlenmiştir. Daha sonra inülinaz üretimine farklı azot kaynaklarının etkisi çalışılmıştır. Organik azot kaynakları (%2 pepton, maya ekstraktı, mısır maserasyon sıvısı ve üre) ve inorganik azot kaynakları ((NH₄)H₂PO₄, NH₄Cl ve (NH₄)₂ SO₄) arasından maksimum inülinaz değerine; organik kaynaklardan maya ekstraktı (%2) ile ulaşılmış (21.54 U/mL)

ve I/S oranı 1.26 olarak belirlenmiştir. İnorganik kaynaklardan ise $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (%2) ile 11.02 U/mL aktivite elde etmişlerdir. Fermentasyonları 30°C sıcaklıkta 6 gün takip etmişlerdir.

Bir diğer çalışmada Gill vd. (2003) *Streptomyces* sp. GNDU 1 suşu ile inülinaz üretimi için; 3 g/L NaNO_3 , 1 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L KCl, 0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L inülin ve 15 g/L agar medya ortamı hazırlanmıştır. pH 7 değerinde, 200 rpm çalkalama hızında, 50 mL/250 mL medya hacminde 24 saat takip edilmiş olan fermentasyonlarda farklı azot kaynaklarının aktiviteye etkisi araştırılmış ve %1 inülin varlığında maksimum inülinaz (0.550 IU/mL) maya ekstraktı ile elde edilmiştir. Son olarak da farklı karbon kaynaklarının etkisini araştırmışlar ve maksimum inülinazı (0.552 IU/mL) %1 inülin ile elde etmişlerdir. Bu çalışmada da maya ekstraktının önemi ortaya çıkmıştır.

4.2. Kontrol Fermentasyonu (Zenginleştirilmemiş Besiyeri)

Besiyeri bileşiminin inülinaz enzimi üretimine etkisini tespit edebilmek amacıyla öncelikle çalkalamalı inkübatörde keçiyoynuzu besiyeri kullanılarak kesikli fermentasyonlar gerçekleştirilmiştir. 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilen kontrol fermentasyonları; içeriğinde maya ekstraktı bulunmayan 5 °Bx keçiyoynuzu ekstraktı ile 30°C sıcaklık, 200 d/d, pH 5, 100 mL medya hacmi ve %2 inokülasyon koşullarında 15 günde gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda en yüksek enzim aktivitesi 6.günde 34.94 ± 16.75 U/mL olarak belirlenmiştir. Fermentasyon süresince şeker tüketimine bağlı enzim üretimi grafiği Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. *A.niger* ile gerçekleştirilen kontrol fermentasyonu denemeleri sonucuna karşılık gelen şeker tüketimi-enzim aktivitesi grafiği

Çalkalamalı inkübatör kontrol fermentasyonunda şeker kullanımına paralel olarak enzim üretiminin de başarıyla gerçekleştiği Şekil 4.19'da görülmektedir. Birinci günde 7.63 ± 1.14 U/mL olan enzim aktivitesi altıncı gününde maksimum seviyeye ulaşmış ardından dalgalanma göstererek on beşinci gün sonunda 6.21 ± 3.62 U/mL değerine düşmüştür. Kontrol fermentasyonuna ait kinetik parametreler Çizelge 4.19'da gösterilmiştir

Çizelge 4.19. Kontrol Fermentasyonu Denemesi Kinetik Parametreler.

Kinetik Parametreler	Değer
Maksimum tüketim hızı (QS), g/L/gün	8.36
Maksimum üretim hızı (QP), U/mL/gün	15.93
Şeker tüketimi (S), g/L	37.15
Enzim üretimi (P), U/mL	34.94
Şeker tüketim oranı, %	95.90

Aspergillus niger A42 tarafından ortamda ki şekerin %95.90'ı kullanılmış ve 15.93 U/mL/gün maksimum üretim hızıyla 34.94 U/mL inülinaz enzimi üretimi gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak besiyeri bileşimi zenginleştirmesi olmadan gerçekleştirilen çalkalamalı inkübatör kontrol fermentasyonu denemelerinde *Aspergillus niger* şekerin tamamını etkin olarak kullanmış ve ancak yüksek aktivite değerlerine sahip inülinaz enzimi üretimi gerçekleştirilememiştir. Azot kaynağının ortamda bulunmaması düşük enzim aktivitesine neden olmuştur.

4.3. CYM İle Optimum Fermentasyon Koşullarının Belirlenmesi

İnülinaz enzimi üretimi için optimum fermentasyon koşullarını belirlemeye yönelik Design Expert istatistiksel yazılımı Box-Behnken Cevap Yüzey modelinde tarafından belirlenen 15 fermentasyon paralelli olarak, Çizelge 4.20'de verilen koşullara göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla inülinaz üretimi üzerine karıştırma hızı, inokülasyon oranı ve medya hacminin etkileri incelenmiştir.

Çizelge 4.20. CYM için değişken olan ve sabitlenen fermentasyon koşulları.

Sabitlenen değerler		Değişken parametreler (CYM için)	
pH	5	Karıştırma (rpm)	100-175-250
Sıcaklık (C°)	30	İnokülasyon oranı (%)	1-2-3
Karıştırma (rpm)	200	Medya hacmi (mL)	50-100-150
Maya ekstraktı (%)	1		
Şeker (Bx°)	5		

Cevap yüzey metodunun oluşturduğu şartlarda fermentasyon işlemleri iki tekerrürlü olarak (toplam 30 fermentasyon) gerçekleştirildikten sonra maksimum inülinaz miktarı (U/mL) bağlı olarak optimum fermentasyon şartları belirlenmiştir.

Fermentasyon boyunca alınan örneklere yapılan analizlerin sonuçları Çizelge 4.21'de verilmiştir.

Çizelge 4.21. CYM fermentasyon sonuçları.

Deneme Numarası	Karıştırma hızı (rpm)	İnokülasyon oranı (%)	Medya hacmi (ml/250 mL)	İnülinaz, U/mL	İnvertaz-tip, U/mL	I/S oranı	Protein, mg/mL	İnülinaz, U/mg	İnvertaz-tip, U/mL	Biyokütle, g/L	pH
1	250	3	100	1308.00±207.26	934.86±341.12	1.46±0.31	0.18±0.25	7331.72±387.82	5124.40±822.94	10.75±1.34	7.11±0.01
2	175	1	50	432.71±28.94	228.05±111.64	2.19±1.20	0.33±0.19	1816.62±1300.33	1166.36±1232.01	6.70±0.71	6.72±0.06
3	100	2	50	199.54±137.07	124.62±127.66	2.18±1.14	0.28±0.02	725.85±2.72	384.17±198.79	13.30±0.42	6.27±0.87
4	175	2	100	1034.95±96.06	770.40±117.85	1.31±0.02	0.13±0.03	8211.28±2185.81	6144.37±1991.75	15.90±1.27	6.51±0.34
5	175	2	100	1458.89±41.00	1073.00±11.37	1.36±0.05	0.07±0.02	24135.93±11702.35	17594.81±7924.35	12.80±1.98	6.80±0.04
6	175	3	50	841.76±197.81	569.03±49.10	1.41±0.14	0.18±0.09	4635.07±1514.93	3111.29±563.31	7.80±0.85	6.65±0.14
7	100	3	100	338.78±20.16	174.69±25.84	1.95±0.17	0.22±0.01	1699.13±792.14	891.92±484.98	13.40±0.28	6.46±0.69
8	175	3	150	727.59±101.75	555.88±77.01	1.31±0.00	0.07±0.00	11168.99±3662.15	8531.99±2786.88	16.70±0.52	6.16±0.25
9	250	2	150	1646.05±0.00	1420.20±0.00	1.16±0.00	0.34±0.11	4829.03±0.01	4166.45±0.00	15.40±0.00	6.10±0.00
10	250	1	100	994.79±158.16	563.55±127.14	1.78±0.12	0.26±0.01	4287.52±2361.50	2460.96±1494.51	12.80±0.85	7.17±0.26
11	100	2	150	320.51±166.94	403.84±146.27	0.77±0.13	0.10±0.01	3186.77±1803.40	3998.64±1643.79	20.24±3.06	3.76±0.63
12	175	1	150	626.41±130.25	466.70±37.73	1.33±0.17	0.09±0.17	7152.86±786.61	5363.10±98.21	18.37±0.85	5.88±0.06
13	250	2	50	197.71±4.65	25.22±11.89	8.87±4.37	0.24±0.02	1137.17±813.40	171.55±176.14	14.50±2.97	6.11±0.83
14	175	2	100	1290.46±43.93	1187.76±44.45	1.09±0.08	0.29±0.02	4482.12±216.46	4137.57±494.47	14.13±1.24	6.89±0.08
15	100	1	100	253.09±1.93	0.16±27.91	3.75±3.21	0.18±0.00	1433.10±165.88	1066.80±25.35	13.60±0.00	5.91±0.06

4.3.1. Karıştırma hızının inülinaz üretimine etkisi

Kesikli fermentasyon yöntemiyle keçiyoynuzu ekstraktından inülinaz üretimlerinin gerçekleştiği fermentasyon denemelerinde karıştırma hızının etkisini belirlemek amacıyla Box-Behnken cevap yüzey metodunda 100 rpm, 175 rpm ve 250 rpm değerleri incelenmiştir. Bu karıştırma hızlarında diğer parametrelerle birlikte (inokülasyon oranı ve medya hacmi) CYM'nin önerdiği 4 tane 100 rpm, 7 tane 175 rpm ve 4 tane 250 rpm çalkalama hızlarında 15 farklı fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.21'den de anlaşılabacağı gibi genel olarak karıştırma hızı arttıkça enzim aktivitesinde bir artış görülmüştür. Bu da karıştırma hızının inülinaz üretiminde istatistiksel olarak önemli bir parametre olduğunu göstermektedir ($P<0.05$).

Fermentasyon sonucu hesaplanan maksimum inülinaz miktarına karıştırma hızının etkisi değerlendirildiğinde 100 rpm, 175 rpm ve 250 rpm karıştırma hızları için maksimum inülinaz miktarları sırasıyla 338.78 ± 20.16 U/mL, 1458.89 ± 41.00 U/mL ve 1308.00 ± 207.26 U/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). Karıştırma, fermentasyon ortamının homojenliğinin sağlanması ve mikroorganizmaların besinlere daha rahat ulaşabilmesini sağlamak amacıyla yapılmaktadır. Bundan dolayı, karıştırmanın fermentasyon sonucu elde edilen ürün miktarına, verim değerine ve maksimum üretim hızına etki etmesi beklenmektedir. Daha yüksek karıştırma hızlarında düşük enzim aktivitesi *A.niger* hücreleri ve enzim yapısı üzerindeki kayma geriliminin etkisine bağlanabilir (Singh vd. 2007).

4.3.2. İnokülasyon oranının inülinaz üretimine etkisi

Fermentasyon yöntemiyle keçiyoynuzu ekstraktından inülinaz üretimlerinin gerçekleştiği fermentasyon denemelerinde inokülasyon oranının etkisini belirlemek amacıyla Box-Behnken cevap yüzey metodunda değerleri %1, %2 ve %3 incelenmiştir. Bu inokülasyon oranlarında diğer parametrelerle birlikte (karıştırma hızı ve medya hacmi) CYM'nun önerdiği 4 tane %1, 7 tane %2 ve 4 tane %3 inokülasyon oranlarında 15 farklı fermentasyon gerçekleştirilmiştir.

Fermentasyon sonunda yapılan analizler neticesinde inokülasyon oranının inülinaz aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında %1, %2 ve %3 inokülasyon oranlarında elde edilen maksimum inülinaz aktivite değerleri sırasıyla 994.79 ± 158.16 U/mL, 1458.89 ± 41.00 U/mL ve 1308.00 ± 207.26 U/mL olarak bulunmuştur (Şekil 4.20 ve Şekil 4.22). Elde edilen analiz sonuçları doğrultusunda inülinaz üretimi açısından inokülasyon oranının istatistiksel olarak önemli olduğu ($P<0.05$) belirlenmiştir. Regresyon analizi incelendiğinde B^2 değerinin istatistiksel olarak önemli olması nedeniyle inokülasyon oranı da önemli kabul edilmiştir. İnokülasyon, fermentasyon ortamına mikroorganizma ilavesi işlemidir ve dolayısıyla uygun miktarda eklendiği takdirde maksimum ürün eldesi sağlanabilir. *A.niger*, düşük inokülüm konsantrasyonunda enzim üretmek için gerekli miktarda substratı kullanmak için yeterli olmayabilir. Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda inokülümün viskozitesi, *A.niger*'de muazzam büyümeye bağlı olarak besiyeri dengesizliğine yol açarak, fermentasyon ortamının viskozitesini artırabilir.

4.3.3. Medya hacminin inülinaz üretimine etkisi

Inülinaz üretimlerinin gerçekleştiği fermentasyon denemelerinde medya hacminin (mL/250 mL) etkisini belirlemek amacıyla Box-Behnken cevap yüzey metodunda 50 mL, 100 mL ve 150 mL hacimleri incelenmiştir. Bu inokülasyon oranlarında diğer parametrelerle birlikte (karıştırma hızı ve medya hacmi) CYM'nun önerdiği 4 tane %1, 7 tane %2 ve 4 tane %3 inokülasyon oranlarında 15 farklı fermentasyon gerçekleştirilmiştir. Fermentasyonlar sonucu yapılan analizler ile birlikte medya hacminin inülinaz aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında 50 mL, 100 mL ve 150 mL medya hacmi ile elde edilen maksimum inülinaz aktivite değerleri sırasıyla 841.76±197.81 U/mL, 1458.89±41.00 U/mL ve 1222.80±598.58 U/mL olarak bulunmuştur (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22). Elde edilen analiz sonuçları doğrultusunda inülinaz üretimi açısından medya hacminin önemli olduğu ($P<0.05$) saptanmıştır.

Maksimum inülinaz aktivitesi 1458.89±41.00 U/mL ile deneme numarası 5 olan fermentasyon koşullarında elde edilirken, 1 numaralı fermentasyonda 1308.00±207.26 U/mL, 14 numaralı fermentasyonda 1290.46±43.93 U/mL, 9 numaralı fermentasyonda ise 1646.05±0.00 U/mL inülinaz elde edilmiştir (Çizelge 4.22). Elde edilen sonuçlar Design Expert istatistik yazılımı kullanılarak değerlendirilmeye alınmıştır ve neticesinde optimum fermentasyon koşulları (çalkalama, inokülasyon oranı ve medya hacmi için) belirlenmiştir.

CYM sonuçlarına göre inülinaz üretimine çalkalama hızı, inokülasyon miktarı ve medya hacminin etkisi analizler sonucunda belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına ilişkin kinetik parametrelerin sonuçları Çizelge 4.22'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.22. CYM fermentasyon denemeleri kinetik parametre sonuçları.

Deneme Numarası	Maksimum tüketim hızı (Qs), g/L/gün	Maksimum üretim hızı (Qp), g/L/gün	Şeker tüketimi (ΔS), g/L	Enzim üretimi (P), U/mL	Şeker tüketim oranı, %
1	13.58 ^f	255.56 ^e	37.98 ⁱ	1308.00 ^c	98.59 ^e
2	17.04 ^c	209.19 ^f	40.54 ^e	432.71 ^j	98.46 ⁱ
3	10.3 ^j	99.48 ^l	35.46 ⁿ	199.54 ⁿ	98.73 ^b
4	12.11 ^h	354.09 ^c	40.85 ^b	1004.37 ^e	98.54 ^g
5	10.24 ⁱ	1095.37 ^a	40.17 ^f	1458.89 ^b	98.52 ^h
6	17.21 ^b	188.29 ^h	40.77 ^c	807.68 ^g	98.61 ^d
7	13.53 ^g	91.83 ⁿ	36.83 ^j	338.78 ^k	98.58 ^f
8	8.32 ^k	163.66 ^j	40.56 ^d	726.91 ^h	98.67 ^c
9	15.74 ^d	542.25 ^b	41.95 ^a	1646.95 ^a	98.93 ^a
10	8.08 ^l	188.75 ^g	35.38 ^o	994.79 ^f	98.36 ^l
11	5.74 ^o	96.00 ^m	36.01 ^m	320.51 ^l	97.66 ^o
12	7.69 ^m	169.7 ⁱ	39.93 ^g	626.41 ⁱ	98.18 ⁿ
13	20.36 ^a	110.05 ^k	36.65 ^k	197.71 ^o	98.42 ^j
14	14.07 ^e	276.83 ^d	38.22 ^h	1290.46 ^d	98.33 ^m
15	7.07 ⁿ	78.14 ^o	36.53 ^f	225.2 ^m	98.37 ^k

Aynı sütundaki farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistiksel olarak fark önemlidir ($P<0.05$).

Çizelge 4.22'ye göre, maksimum enzim üretim hızı 1095.37 U/mL olarak 5 numaralı fermentasyon sonucunda elde edilmiştir. En yüksek şeker tüketimi 41.95 g/L olan 9 numaralı fermentasyonda 1646.95 U/mL maksimum enzim üretimi gerçekleşmiş ve şekerin %98.93'ü *Aspergillus niger* tarafından kullanılmıştır.

4.4. CYM İle Optimum Koşulların Belirlenmesi

Çizelge 4.23'de CYM denemelerinin model tarafından belirlenen regresyon eşitlikleri gösterilmektedir. Fermente edilebilir şeker miktarları için model denklem ve regresyon eşitlikleri aşağıdaki gibidir.

$$\text{Fermente edilebilir şeker} = +1251.24 + 379.33A + 109.30B + 210.28C + 56.88AB + 331.84AC + 68.62BC - 292.52A^2 - 235.05B^2 - 367.76C^2$$

Burada;

A: Çalkalama hızı

B: İnokülasyon oranı

C: Medya hacmi

CYM ile önerilmiş olan tekerrürlü 15 fermentasyonun analiz sonuçları (inülinaz (U/mL)) Design Expert istatistik yazılımının kuadratik modeline göre ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçların varyans ve regresyon analiz tablosu Çizelge 4.23'te verilmiştir.

Çizelge 4.23. CYM fermentasyon sonuçlarının varyans ve regresyon analizi tablosu.

Koşullar	Karelerin toplamı	Katsayılar	F değeri	P değeri
Model	5.976×10^6	1251.24	8.00	0.0001*
Çalkalama hızı (A)	2.302×10^6	379.33	40.08	0.0001*
İnokülasyon oranı (B)	1.911×10^5	109.30	3.33	0.0869
Medya hacmi (C)	7.075×10^5	210.28	12.32	0.0029*
AB	25881.54	56.88	0.45	0.5116
AC	8.809×10^5	331.84	15.34	0.0012*
AD	702.91	6.63	0.012	0.9133
BC	37668.26	-68.62	0.66	0.4299
BD	23825.47	38.59	0.41	0.5287
CD	1670.56	-10.22	0.029	0.8667
A ²	6.319×10^5	-292.52	11.00	0.0044*
B ²	4.080×10^5	-235.05	7.10	0.0169*
C ²	9.988×10^5	-367.76	17.39	0.0007*
Kalan	9.190×10^5			
Uyum eksikliği	6.915×10^5		1.01	0.5489 ^s
Saf hata	2.275×10^5			
Toplam	6.895×10^6			

$R^2 = 0.8667$ ve * $P < 0.05$, ^s $P > 0.05$

Modelin F değerinin 8.00 olması modelin anlamlı ve uyumlu olduğunu ifade eder. P değerlerinde 0.05'ten küçük olan değerlerin model için önemli olduklarını gösterir. Bu durumda A, B, C, AC, A², B², C² model için önemli olmaktadır. Uyum eksikliği F değerinin 1.01 olması saf hataya göre uyum eksikliğinin anlamlı olmadığını ifade eder. Uyum eksikliğinin önemsiz çıkması istenilen bir durumdur (P=0.5489>0.05).

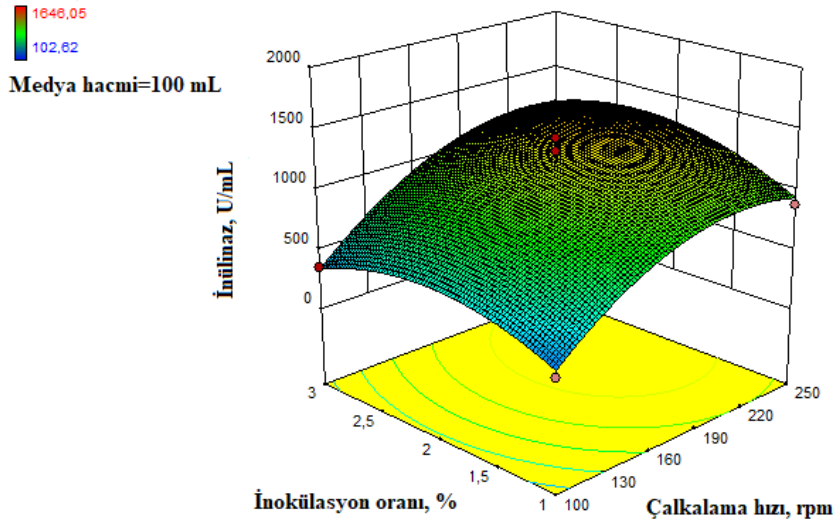
CYM fermentasyon örneklerine yapılan analiz sonuçları; maksimum inülinaz aktivitesi olacak şekilde Design Expert istatistiksel yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme neticesinde Çizelge 4.24'te görüldüğü gibi maksimum inülinaz aktivitesi için optimum fermentasyon koşulları; 250 rpm çalkalama hızı, %2.3 inokülasyon oranı ve 135 mL medya hacmi belirlenmiştir. Gerçekleştirilecek fermentasyonların neticesinde de tahmin edilen (programın önerdiği) maksimum inülinaz aktivitesi değeri 1591.03 U/mL olmuştur.

Çizelge 4.24. CYM fermentasyon alt-üst sınırları ve Design Expert tarafından sunulan optimum koşullar ve enzim hedefi.

Parametre	Alt sınır	Üst sınır	Optimum nokta
Çalkalama hızı (rpm)	100	250	250
İnokülasyon oranı (%)	1	3	2.3
Medya hacmi (mL/250 mL)	50	150	135
İnülinaz (U/mL)	102.62	1646.05	1591.03

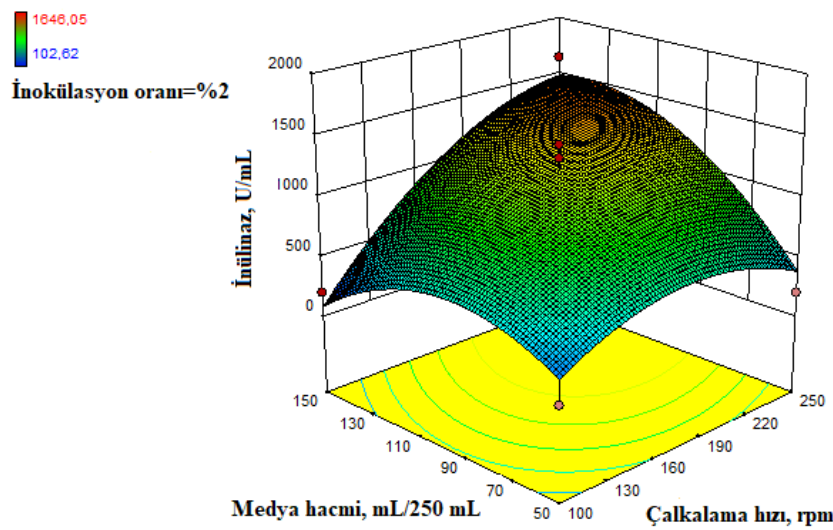
Cevap yüzey metodunu daha rahat görmek için sabit bağımlı değişkenin doğruları X1, X2 ekseninde çizilir ve bu grafiğe kontur plot (contour plot) adı verilir. Kontur plot bir ya da daha fazla ölçülebilen değişkenle girdi değişkenleri arasındaki regresyon modelinin deneysel olarak tanımlanması ve bu modele göre bağımsız değişkenin maksimum ve minimum seviyeleri arasında bağımlı değişkenin cevap yüzey incelenmesine dayanır.

Merkez noktada medya hacmi (100 mL) için inokülasyon oranının ve karıştırma hızının etkisi incelendiğinde (Şekil 4.20) karıştırma hızı ve inokülasyon oranı arttıkça inülinaz miktarının arttığı belirlenmiştir. Çizelge 4.23'te de çalkalama hızının ve inokülasyon oranının istatistiki olarak önemli çıkması ($P<0.05$) bu durumu desteklemektedir.



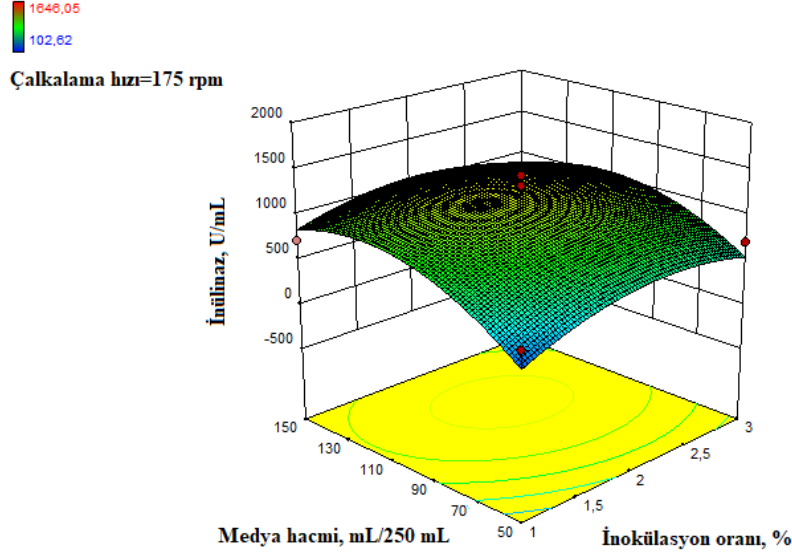
Şekil 4.20. *Aspergillus niger* ile üretilen inülinaz miktarına karşılık inokülasyon oranı ve çalkalama hızının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği.

Merkez noktada inokülasyon oranı (%2) için medya hacmi ve karıştırma hızının etkisi incelendiğinde (Şekil 4.21) karıştırma hızı ve medya hacmi arttıkça inülinaz miktarının arttığı belirlenmiştir. Çizelge 4.23'te de çalkalama hızının ve inokülasyon oranının istatistiki olarak önemli çıkması ($P<0.05$) bu durumu desteklemektedir.



Şekil 4.21. *Aspergillus niger* ile üretilen inülinaz miktarına karşılık medya hacmi ve çalkalama hızının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği.

Merkez noktada çalkalama hızı (175 rpm) için medya hacmi ve inokülasyon oranının etkisi incelendiğinde (Şekil 4.22) medya hacmi arttıkça inülinaz miktarının arttığı, inokülasyon oranı ise %2.5 a kadar arttırıp sonra azaltmıştır. Çizelge 4.23'te de çalkalama hızının ve inokülasyon oranının istatistiki olarak önemli çıkması ($P<0.05$) bu durumu desteklemektedir.



Şekil 4.22. *Aspergillus niger* ile üretilen inülinaz miktarına karşılık medya hacmi ve inokülasyon oranının ilişkisini veren cevap yüzey grafiği.

4.5. CYM Optimum Koşullarda Doğrulama Denemesi

Çizelge 4.24'te verilmiş olan optimum koşullar altında doğrulama denemesi gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon süresince analiz sonuçları Çizelge 4.25'te verilmiştir.

Çizelge 4.25. Design Expert istatistiksel yazılım sonucu belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonların analiz sonuçları.

Zaman, Day	İnülinaz, U/mL	İnvertaz-tip, U/mL	I/S oranı	Protein mg/mL	İnülinaz, U/mg	İnvertaz-tip, U/mg
0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.05±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00
1	15.18±6.24	8.60±5.69	1.95±0.56	0.02±0.01	732.01±554.31	434.39±409.77
2	106.42±16.54	36.45±3.58	2.91±0.17	0.03±0.01	3393.89±1252.81	1155.19±363.83
3	156.42±26.26	81.21±9.41	1.92±0.10	0.05±0.02	3517.67±640.47	1843.08±430.33
4	261.77±61.47	117.83±12.54	2.21±0.29	0.04±0.01	5791.01±719.90	2625.61±15.06
5	347.92±16.88	181.27±20.67	1.93±0.13	0.07±0.00	4889.51±483.16	2551.67±418.45
6	443.97±76.29	294.56±44.86	1.50±0.03	0.07±0.00	6594.46±1063.59	4375.77±620.15
7	58.50±8.92	385.27±30.63	1.52±0.10	0.08±0.00	7229.43±174.37	4758.50±420.44
8	642.83±35.83	560.96±11.03	1.15±0.04	0.10±0.00	6373.00±219.02	5563.54±9.70
9	821.86±46.52	602.58±79.39	1.37±0.10	0.12±0.02	7091.86±607.18	5171.86±52.86
10	1007.95±92.69	77.05±52.03	1.30±0.03	0.19±0.02	5205.95±14.39	4002.60±110.39
11	1135.2±129.63	974.21±111.81	1.17±0.00	0.21±0.01	5384.87±468.22	4618.65±404.59
12	1261.88±77.73	1186.45±194.33	1.07±0.11	0.25±0.00	5087.80±335.50	4784.73±804.24
13	1356.27±88.69	999.94±52.41	1.36±0.02	0.28±0.02	4772.01±28.29	3519.63±24.91
14	1465.03±144.23	1032.85±25.08	1.42±0.11	0.30±0.02	4905.06±122.79	3467.56±170.84
15	1560.17±130.76	1198.36±34.63	1.30±0.07	0.35±0.02	4471.60±56.81	3441.35±145.55

Optimum koşullarda (5°Bx keçiyoynuzu ekstraktı, %1 maya ekstraktı, 5 pH, 30°C sıcaklık, 250 rpm çalkalama, %2.3 inokülasyon ve 135 mL/250 mL medya hacmi) gerçekleştirilen fermentasyon denemesinde en yüksek inülinaz aktivitesi değeri Çizelge 4.24'te de görüldüğü gibi 15.gün sonunda 1560.17±130.76 U/mL olarak belirlenmiştir. Sonuçlara ait hesaplanmış kinetik parametreler Çizelge 4.25'te verilmiştir.

Çizelge 4.26. Design Expert istatistiksel yazılım sonucu belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen fermentasyonların kinetik parametreleri.

Kinetik Parametreler	Değer
Maksimum tüketim hızı (QS), g/L/gün	13.44
Maksimum üretim hızı (QP), U/mL/gün	186.09
Şeker tüketimi (S), g/L	38.42
Enzim üretimi (P), U/mL	1560.17
Şeker tüketim oranı, %	98.41
Biyokütle, g/L	18.25
pH	6.45

Çizelge 4.26'ya göre, maksimum enzim üretim hızı 186.09 U/mL/gün olurken, inülinaz üretimi 1560.17 U/mL bulunmuştur. Şekerin %98.41'inin tüketildiği fermentasyon denemelerinde toplam biyokütle 18.25 g/L bulunmuş pH değeri ise 5'den 6.45'e yükselmiştir. Bu enzim aktivitesi değeri, literatürde inülinaz enzimi üretimiyle ilgili birçok çalışmada elde edilmiş olan aktivite değerinden yüksek bulunmuştur ve literatür verileri aşağıda verilmiştir.

Silva-Santisteban ve Maugeri Filho (2005)'nin yapmış oldukları çalışmada, karbon kaynağı olarak sakkaroz kullanılan ve *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 ile inülinaz üretimi gerçekleştirilmiştir. 1. Faktöriyel tasarımda, maksimum inülinaz aktivitesine (101 UI/mL) 200 rpm çalkalama hızı ve 1.5 vvm havalandırma ile ulaşılmış, 2.faktöriyel tasarımda ise maksimum inülinaz aktivitesi değerine (101 UI/mL) 250 rpm çalkalama hızı ve 2 vvm havalandırma sonucu elde edilmiştir. Her iki tasarımda da sonucun aynı çıkmasına etken parametrenin çalkalama hızı olduğuna vurgu yapılmıştır.

Başka bir çalışmada Singh vd. (2007) *K. marxianus* YS-1'den inülinaz üretimi için fermentasyon koşullarının optimizasyonunda, karbon kaynağı olarak inülin kullanmışlardır. İnülinaz üretimi % 1.5 (w/v) inülin, %2 et ekstraktı, 0.1 mM Mn⁺² ve 0.5 mM Ca⁺² ile elde edilen besiyeri bileşiminde, pH 6.5 olan ortamda (50 mL) gerçekleştirilmiş ve 30 ° C'de çalkalayarak (100 rpm) 60 saat süreyle inkübe edilmiştir. Yapılan fermentasyon denemeleri sonunda maksimum inülinaz aktivitesine (30.8 IU/mL) %5 mikroorganizma inokülasyonu, 150 rpm çalkalama hızı, 72 saat inkübasyon süresi ile ulaşılmışlardır.

Aspergillus niger AUP19 ile inülinaz üretimi çalışmasında Kumar vd. (2005b), 0.5 g/L (NH₄)₂SO₄, 3 g/L KH₂PO₄, 1.5 g/L NaNO₃, 0.01 g/L MgSO₄.7H₂O ve 3 g/L inülin besiyeri ortamı, pH değeri 7, 28°C sıcaklık ve 220 rpm çalkalama hızında fermentasyon koşullarının optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiş. Maksimum inülinaz aktiviteleri 72 saat sonunda, %5 inülin varlığında 149 U/mL, galaktoz ile 133 U/mL, inorganik azot kaynağı olarak (NH₄)H₂PO₄ ile 87 U/mL, organik azot kaynağı olarak mısır şurubu ile 81

U/mL, % 10 inokülasyon ile 76 U/mL, 28°C ve 6.5 pH ile, 1:20 medya hacminde 76 U/mL. Tüm optimizasyon denemeleri sonucunda ise maksimum 176 U/mL inülinaz elde edilmiştir.

Mazutti vd. (2006)'nin yapmış oldukları çalışmada, *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 ile 100 mL/500 mL medya ortamı için; 20 g/L sakkaroz, 5 g/L maya ekstraktı, 5 g/L KH₂PO₄, 1.5 g/L NH₄Cl, 1.15 g/L KCl, ve 0.65 g/L MgSO₄.7H₂O içeren ortam hazırlamışlardır. Hazırlanan medya ortamına daha önceden hazırlanan sıvı kültürden 10'ar mL inokülasyon yapıp 30°C'de 150 rpm'de 24 saat inkübe edilmiştir. Şeker kamışı küspesinin karbon kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada deney tasarımı tarafından belirlenen konsantrasyonlarda mısır şurubu ilavesi yapmışlardır. Önceden hazırlanan 3 mL süspansiyon inoküle edilmiş ve 72 saat fermentasyona bırakılmıştır. İnülinaz üretiminde ek konsantrasyon ve inkübasyon sıcaklığının etkisine çalışmışlardır ve araştırılan faktörlerin dağılımı; sıcaklık 30.4, 32, 36, 40 ve 41.6 °C, mısır şurubu % 13, 15, 20, 25 ve 27.1 şeklinde oluşturmuşlardır. Maksimum inülinaz aktivitesi (391.9 U/g) 36°C sıcaklık ve %20 mısır şurubu ilavesinde elde etmişlerdir.

Bir diğer çalışmada Mazutti vd. (2007), mısır atık likörünün (CSL) ve soya fasulyesi küspesinin konsantrasyonunu, küspenin parçacık boyutunu ve inokülasyon miktarını belirlemek için faktör tasarımı kullanarak şeker kamışı küspesinin katı hal fermentasyonu ile inülinaz üretimi gerçekleştirmişlerdir. *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 24, 48, 72 ve 96 saat fermentasyona bırakılmış maksimum aktivite 96.saatte elde edilmiştir. En yüksek aktivite için pH 5 ve sıcaklık 55°C olarak seçilmiştir. Mısır atık likörünün %20 (w/w), soya fasülyesi küspesinin %5 (w/w), 4 mL inokülasyon ve 6/32 partikül boyutu ile maksimum inülinaz aktivitesine (250 U/gds (gram kuru substrat)) ulaşılabilirliği tespit etmişlerdir.

Aspergillus niger van Teighem ile inülinaz üretimi fermentasyon koşullarının optimizasyonu isimle çalışmada ise Poorna ve Kulkarni (1995); optimum inokülasyon miktarı, sıcaklık, pH, farklı karbon kaynaklarının etkisi araştırılmıştır. %1, 2, 5 ve 10 inokülasyon miktarları; 50 mL/250 mL medya hacmi, 150 rpm çalkalama, 30°C sıcaklıkta 96 saatlik fermentasyona bırakılmıştır. 72 saatin sonunda %5 inokülasyon oranı maksimum aktiviteyi göstermiştir (60 /mL). Sıcaklığın etkisini araştırmak için %5 inokülasyon ile 30-45°C aralığı denenmiş ve 72 saatlik fermentasyon sonucu optimum değer 30°C olduğu saptanmıştır. pH değerleri olarak 3, 4, 5, 5.4, 6 ve 6,8 çalışılmış ve maksimum aktivitenin (yaklaşık 80 U/mL) pH 5.4'de verdiği görülmüştür. %2 inülin varlığında, %5 spor süspansiyonu ile aşıl原因 farklı ortamlarda 50 mL medya hacmi, 96 saat boyunca bir döner çalkalayıcıda (150 rpm) 30° C'de inkübe edilmiştir. Ortamda fruktoz, inülin, sakkaroz, mısır şurubu, maya özütü, amonyum sülfat, sodyum nitrat ve 0.5 mL iz element bulunan deneme en yüksek inulinaz üretimi (120 U/mL) % 2 mikroorganizma inokülasyonu ve pH 6 ile mümkün olmuştur. Aktivite de 1.5 katlık bir artış görülmüştür.

Bir diğer çalışmada Gill vd. (2003) *Streptomyces* sp. GNDU 1 suşu ile inülinaz üretimi için; 3 g/L NaNO₃, 1 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L MgSO₄.7H₂O, 0.5 g/L KCl, 0.01 g/L FeSO₄.7H₂O, 10 g/L inülin ve 15 g/L agar medya ortamı hazırlanmıştır. pH 7 değerinde, 200 rpm çalkalama hızında, 50 mL/250 mL medya hacminde 24 saat takip edilmiş olan

fermentasyonlarda optimum sıcaklık değeri 33-53°C aralığında olmuştur. Maksimum inülinaz aktivitesine (0.250 IU/mL) 46°C’de ulaşmışlardır.

Fermentasyon koşullarının yaklaşık olarak bu tez çalışması ile aynı değerde olmasına rağmen aktivitelerin literatür çalışmalarında düşük olmasının sebebinin kullanılmış olan karbon kaynağı keçiyoynuzu ekstraktı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

4.6. UF

Optimum koşullarda inülinaz üretimi gerçekleştirilerek doğrulama yapıldıktan sonra elde edilen enzim içeren sıvı, hücrelerden ayrılarak kısmi saflaştırılmak üzere ultrafiltrasyon işlemine tabi tutulmuştur.

Bu aşamaya kadar yapılmış olan başlangıç şeker içeriği, besiyeri bileşimi ve fermentasyon çalışma koşullarının optimizasyonları sonucu ulaşılmış olan ve Çizelge 4.27’de de verilmiş olan koşullarda UF işlemi için yeterli olacak miktarlarda fermentasyonlar tekrar gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.27. UF için gerçekleştirilmiş olan fermentasyon koşulları.

Sıcaklık (°C)	°Bx	Maya ekstraktı (%)	pH	Çalkalama (rpm)	İnokülasyon (%)	Medya hacmi (ml)
30	5	1	5	250	2.3	135

Fermentasyonlar sonucunda filtre kağıdı yardımıyla süzölmüş fermente sıvıdan, daha konsantre enzim solüsyonu elde etmek amacıyla laboratuvar tipi Sartocoon Slice 200 model (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) UF cihazı ile UF işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 50 kDa, 30 kDa ve 10 kDa'luk ayırma sınırlarına sahip filtreler seçilmiştir. Ultrafiltrasyon işlemi sonrası permeat ve retentat toplanmıştır. Alınan örneklerde toplam protein ve inülinaz ve invertaz-tip enzim aktivitesi analizleri yapılarak saflaştırma katsayısı hesaplanmıştır.

Çizelge 4.28. Ultrafiltrasyon öncesi ve sonrası inülinaz enzimi.

	Hacim, mL	İnülinaz, U/mL	İnvertaz- tip, U/mL	I/S oranı	Toplam inülinaz aktivitesi, U	Toplam invertaz- tip aktivitesi, U	Toplam protein, mg	İnülinaz, U/mg	İnvertaz-tip, U/mg	İnülinaz saflaştırma katsayısı	İnvertaz-tip saflaştırma katsayısı
UF öncesi	200.00	1489.15 ^d	1430.67 ^d	1,04 ^b	297829.44 ^a	286134.54 ^a	42.54 ^a	7000.79 ^d	6725.88 ^d	1.00 ^d	1.00 ^d
50 kDa Permeat	180.00	188.09 ^e	50.67 ^e	3,71 ^a	33856.12 ^e	9121.41 ^e	8.17 ^c	4143.08 ^e	1116.22 ^e	0.59 ^e	0.17 ^e
50 kDa Retentat	20.00	6133.72 ^c	6923.13 ^c	0,89 ^c	122674.46 ^d	138462.57 ^d	15.04 ^d	8158.99 ^b	9209.05 ^b	1.17 ^b	1.37 ^b
30 kDa Permeat	180.00	0.00 ^f	0.00 ^f	-	0.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^f
30 kDa Retentat	20.00	6278.69 ^b	7622.39 ^b	0,82 ^d	125573.82 ^b	152447.72 ^b	15.12 ^b	8304.08 ^a	10081.23 ^a	1.19 ^a	1.50 ^a
10 kDa Permeat	180.00	0.00 ^f	0.00 ^f	-	0.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^f
10 kDa Retentat	20.00	6343.26 ^a	7750.30 ^a	0,82 ^d	126865.13 ^a	155005.98 ^a	17.22 ^a	7366.35 ^c	9000.33 ^c	1.05 ^c	1.34 ^c

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05)

10 ve 30 kDa membranların permeat kısmından alınan örneklerde inülinaz ve invertaz-tip aktivite ve protein aktivitesi tespit edilememişken 50 kDa membranın permeat kısmından alınan örnekte 188.09 U/mL enzim aktivitesine ulaşılmıştır. Retentatlarda ise protein ve enzim aktivitesi tespit edilmiş olup 10, 30, 50 kDa membranın retentat kısmından alınan örneklerde inülinaz aktivitesi sırasıyla 6343.26 U/mL, 6278.69 U/mL ve 6133.72 U/mL olarak gözlenmiştir. Aynı örneklerin invertaz-tip aktiviteleri ise sırasıyla 7750.30 U/mL, 7622.39 U/mL ve 6923.13 U/mL'dir. Toplam protein değerleri ise sırasıyla 15.04 mg protein (50 kDa), 15,12 mg protein (30 kDa), 17,22 mg protein (10 kDa) olarak hesaplanmıştır. Mantar türlerinden elde edilen inülinazın moleküler ağırlığı 50 kDa'dan büyük olduğundan (Chi vd. 2009) kısmi saflaştırma işlemi başarılı olmuştur. Yapılan analizler de bu sonucu desteklemiştir. 50, 30 ve 10 kDa uygulamaları için saflaştırma katsayısı değerleri ise sırasıyla inülinaz için 1.17, 1.19 ve 1.05; invertaz-tip için ise 1.37, 1.50 ve 1.34 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak 10 veya 30 kDa ultrafiltrasyon proseslerinin üretilen ham enzim preparatından istenilen hacimde konsantre enzim preparatı üretiminde yüksek sonuçlar verdiği ve bulk enzim üretiminde kullanılabileceği belirlenmiştir.

Ayrıca, bu tez çalışması dışında *Aspergillus niger* A42 mikroorganizması kullanılarak üretilen inülinaz enzimi için SDS-PAGE analizi yapılmış ve molekül ağırlığı 45-55 kDa aralığında tespit edilmiştir. Yapılmış olan çalışmada SDS-PAGE bantında inülinaz dışında başka bant görüntüleri de kaydedilmiş ve bunların farklı proteinlere ait olduğu düşünülmüştür. Hesaplamalar sonucu elde edilen I/S oranlarında ki farklılığın sebeplerinden birinin bu olduğu kanısına varılmıştır (kaynak belirtilmemiştir).

Tüm tez çalışması boyunca gerçekleştirilen analizler neticesinde hesaplanan I/S oranları farklılık göstermiş hatta bazı fermentasyonlarda bu değer literatürde belirtilen normal seyrinden (0.02-7.9) yüksek seviyelere (19.26) çıkmıştır. İnülin (%95 fruktoz+%5 glukoz) 2-60 fruktoz biriminden oluşan bir polimerdir. Sakkaroz ise (fruktoz+glukoz) bir disakkarittir. İnülinin molekül ağırlığı daha fazladır ve inülinaz enzimi daha fazla fruktozu parçalayıp açığa çıkardığı için fermentasyonun özellikle başında daha yüksek enzim aktiviteleri göstermektedir. Dolayısıyla inülinaz aktivitesi (U/mL) artmış, I/S oranı da ona bağlı olarak artış göstermiştir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada daha önce inülinaz enzimi üretiminde hiç kullanılmamış olan keçiyoynuzu meyvesi ekstraktı karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu amaçla inülinaz üretimi için fermentasyonlarda kullanılacak olan keçiyoynuzu ekstraktının yine ilk defa başlangıç şeker içeriği ($^{\circ}\text{Bx}$ değeri) ve besiyeri içeriğinin formülasyonuna Placket-Burman dizayn istatistik yöntemiyle karar verilmiştir. Keçiyoynuzu ekstraktının içerisine ayrı ayrı ve farklı oranlarda eklenen 7 farklı değişken ile 12 farklı besiyeri formülasyonu elde edilmiş, fermentasyonları gerçekleştirilmiş ve maksimum inülinaz aktivitesi için optimum besiyeri bileşiminin 5°Bx keçiyoynuzu ekstraktı ve buna %1 maya ilavesi olduğu saptanmıştır. Sonrasında fermentasyon şartlarının RSM ile optimizasyonunda farklı çalkalama hızı, inokülasyon miktarı ve medya hacmi faktöriyel dizayn metodu ile 15 fermentasyonluk bir model haline getirilmiştir. Gerçekleştirilen fermentasyonlar neticesinde maksimum inülinaz aktivitesi için optimum fermentasyon çalışma koşulları 250 rpm çalkalama hızı, %2.3 inokülasyon miktarı ve 135 mL medya hacmi olarak belirlenmiş ve kabul edilmiş bu optimum şartların doğrulanması yapılmıştır. Fermentasyonla elde edilen enzim preparatı ultrafiltrasyon ile kısmi saflaştırma işlemi 10, 30, 50 kDa ayırma sınırındaki filtrelerden geçirilmiştir. Başlangıç örneği, permeat ve retentatlara gerekli analizleri yapılmış saflaştırma katsayıları tespit edilmiştir.

Başlangıç şeker içeriği ve besiyeri optimizasyonu işlemi için PB dizaynının önerdiği 12 fermentasyon sonucu maksimum inülinaz aktivitesi 1267.97 U/mL bulunmuş, Minitab programı ile optimize edilen koşullarda gerçekleştirilen doğrulama denemesi ile 1548.84 U/mL'ye ulaşılmıştır. CYM ile önerilen fermentasyonlar sonucu maksimum aktivite 1646.05 U/mL olmuş ve son olarak Design Expert programı ile optimize edilen fermentasyon koşullarında gerçekleştirilen doğrulama denemeleri sonucunda maksimum enzim aktivitesi olan 1560.17 U/mL değerine ulaşılmıştır. UF işlemi sonucunda 50 kDa retentat kısmında 6133.72 U/mL inülinaz saptanırken, 30 kDa'da 6278.69 U/mL, 10 kDa'da ise 6343.26 U/mL inülinaz aktivitesi elde edilmiştir. Gerçekleştirilmiş olan bu tez çalışması ile baştan sona bütünlük içeren bir enzim üretim modeli oluşturulmuştur.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde inülinaz enzimi üretiminin büyük bir kısmının küfler ile gerçekleştirildiği görülmektedir. Küflerle genellikle katı-kültür fermentasyonu gerçekleştirilmektedir. Ancak fermentasyon sonucunda yüksek inülinaz enzimi aktivitesi elde edilmesine rağmen söz konusu saflaştırma işlemlerinin zor ve pahalı teknikler olması nedeniyle çalışmaların endüstriye aktarılması güçleşmektedir. Bu tez çalışması ile inülinaz enzimi üretiminin sıvı kültür besiyerinde gerçekleştirilmiş olması nedeniyle de elde edilen fermentasyon sıvısından ürün saflaştırılması daha kolay olmuştur. Dolayısıyla yaygın bir kullanım alanına sahip inülinaz üretiminin daha kolay endüstriye aktarılabilir olacağı öngörülmüştür. Ayrıca bu tez çalışması, literatürde benzer şartlarda gerçekleştirilen fermentasyonlar içinde en yüksek seviyede üretilen enzimden daha yüksek aktivite değerlerine sahip enzim üretimini gerçekleştirmiştir. Bunun yanında keçiyoynuzu ekstraktının inülinaz enzimi üretiminde önemli bir karbon kaynağı potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Besiyeri bileşimi açısından sadece azot kaynağı ilavesinin yapıyor olması ekonomik açıdan da önemli avantajlar sağlamaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Abdulameer, Z.W., Essa, B.N.ve Aziz, G.M. 2015. Optimum condition for Inulinase production by *Aspergillus niger* usingsolid state fermentation. *Baghdad Science Journal*, 12 (2): 307-316.
- Ahmed, S.A. 2008. Invertase production by *Bacillus macerans* immobilized on calcium alginate beads. *J Appl Sci Res*, 4 (12): 1777-1781.
- Altunbaş, C. 2013. Yüksek fruktozlu şurup üretimi için Concanavalin A bağlı süper makro gözenekli kriyojellere inulinaz immobilizasyonu, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü s.
- Anonim 2017. <https://www.isixsigma.com/tools-templates/design-of-experiments-doe/when-and-how-to-use-plackett-burman-experimental-design/>. (Son erişim tarihi: 23.11.2017)
- Arockiasamy, S., Krishnan, I.P.G., Anandakrishnan, N., Seenivasan, S., Sambath, A.ve Venkatasubramani, J.P. 2008. Enhanced production of laccase from *Coriolus versicolor* NCIM 996 by nutrient optimization using response surface methodology. *Applied biochemistry and biotechnology*, 151 (2-3): 371.
- Atlıhan, N. 2011. Yer Elmasından İzole Edilen Bir *Clostridium* Türünün İnülinazinin Bazi Özellikleri.Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi.43 s.
- Baker, R.W. 2004. Overview of membrane science and technology. *Membrane Technology and Applications, Second Edition*, 1-14.
- Bender, J.P., Mazutti, M.A., De Oliveira, D., Di Luccio, M.ve Treichel, H. 2006. Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using solid state fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 132 (1-3): 951-958.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1): 248-254.
- Brock, T., Madigan, M., Martinko, J.ve Parker, J. 1991. Biology of Microorganisms. Prentice Hall. *New Jersey*, 19862.
- Bulut, S., Elibol, M.ve Ozer, D. 2004. Effect of different carbon sources on L (+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 21 (1): 33-37.
- Caplice, E.ve Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50 (1): 131-149.

- Carvalho, F., Moniz, P., Duarte, L.C., Esteves, M.P.ve Gírio, F.M. 2011. Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38 (1): 221-227.
- Cemeroğlu, B., 2010. Gıda Analizleri, Gıda Teknolojileri Derneği Yayınları, No: 34.
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G.ve Yue, L. 2009. Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82 (2): 211-220.
- Coskun, A. 2010. The Effect of Metacognitive Strategy Training on the Listening Performance of Beginner Students. *Online Submission*, 4 (1): 35-50.
- Cruz-Guerrero, A.E., Olvera, J.L., García-Garibay, M.ve Gómez-Ruiz, L. 2006. Inulinase-hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (2): 115.
- Çelik, S. 2010. Production and evaluation of set-type yogurts with carob bean molasses. *Milchwissenschaft*, 65 (4): 400-403.
- D'egidio, M., Cecchini, C., Cervigni, T., Donini, B.ve Pignatelli, V. 1998. Production of fructose from cereal stems and polyannual cultures of Jerusalem artichoke. *Industrial Crops and Products*, 7 (2): 113-119.
- Dinarvand, M., Ariff, A.B., Moeini, H., Masomian, M., Mousavi, S.S., Nahavandi, R.ve Mustafa, S. 2012a. Effect of extrinsic and intrinsic parameters on inulinase production by *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15 (4).
- Dinarvand, M., B Ariff, A., Moeini, H., Masomian, M., Mousavi, S.S., Nahavandi, R.ve Mustafa, S. 2012b. Effect of extrinsic and intrinsic parameters on inulinase production by *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15 (4): 5-5.
- Dinarvand, M., Rezaee, M.ve Foroughi, M. 2017. Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by response surface methodology (RSM). *Brazilian Journal of Microbiology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.026>.
- Ertugay, Z.ve Certel, M. 1995. Biyoteknoloji I. . Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ders Notu Yayın, Erzurum s.
- Ettalibi, M.ve Baratti, J.C. 1987. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26 (1): 13-20.

- FAO 2017. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>. (Son erişim tarihi: 01.12.2017)
- Fırınciahmetoğlu, E.S. 2013. Erişkinlerde keçiyoynuzu ununun kan lipit profiline etkisi.
- Flores-Gallegos, A.C., Contreras-Esquivel, J.C., Morlett-Chávez, J.A., Aguilar, C.N.ve Rodríguez-Herrera, R. 2015. Comparative study of fungal strains for thermostable inulinase production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (4): 421-426.
- Franck, A. 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British journal of Nutrition*, 87 (S2): S287-S291.
- Ghorbani, F., Younesi, H., Sari, A.E.ve Najafpour, G. 2011. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*, 36 (2): 503-509.
- Gill, P.K., Manhas, R.K.ve Singh, P. 2006. Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Food Engineering*, 76 (3): 369-375.
- Gill, P.K., Sharma, A.D., Harchand, R.K.ve Singh, P. 2003. Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. *Bioresource Technology*, 87 (3): 359-362.
- Giovanni, M. 1983. Response surface methodology and product optimization. *Food technology*.
- Godfrey, T.ve Reichelt, J. 1982. Industrial enzymology: the application of enzymes in industry.
- Gong, F., Sheng, J., Chi, Z.ve Li, J. 2007. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34 (3): 179-185.
- Graminha, E., Gonçalves, A., Pirota, R., Balsalobre, M., Da Silva, R.ve Gomes, E. 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 144 (1): 1-22.
- Grassin, C.ve Fauquembergue, P. 2009. Enzymes, fruit juice processing. *Encyclopedia of Bioprocess Technology*.
- Guo, N., Gong, F., Chi, Z., Sheng, J.ve Li, J. 2009. Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36 (4): 499-507.

- Huitron, C., Perez, R., Sanchez, A., Lappe, P.ve Rocha-Zavaleta, L. 2007. Agricultural waste from the tequila industry as substrate for the production of commercially important enzymes. *Journal of Environmental Biology*, 29 (1): 37.
- Jain, S.C., Jain, P.ve Kango, N. 2012. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using *Dahlia* tuber extract. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43 (1): 62-69.
- Jiang, L., Wu, Q., Xu, Q., Zhu, L.ve Huang, H. 2017. Fermentative hydrogen production from Jerusalem artichoke by *Clostridium tyrobutyricum* expressing *exo-inulinase* gene. *Scientific reports*, 7 (1): 7940.
- Jing, W., Zhengyu, J., Bo, J.ve Augustine, A. 2003. Production and separation of *exo-and endoinulinase* from *Aspergillus ficuum*. *Process Biochemistry*, 39 (1): 5-11.
- Kalil, S.J., Suzan, R., Maugeri, F.ve Rodrigues, M.I. 2001. Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design. *Applied biochemistry and biotechnology*, 94 (3): 257-264.
- Kango, N. 2008. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. *Journal of Food Engineering*, 85 (3): 473-478.
- Karatop, R. 2012. *Aspergillus wentii*'den inülinaz enzimin elde edilmesi.
- Karkacier, M.ve Artık, N. 1995. Keçiboynuzunun (*Ceratonia siliqua* L.) fiziksel özellikleri, kimyasal bileşimi ve ekstraksiyon koşulları. *Gıda Dergisi*, 20 (3).
- Kaur, N., Kaur, M., Gupta, A.K.ve Singh, R. 1992. Properties of β -fructosidases (invertases and inulinases) of *Fusarium oxysporum* grown on an aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 53 (3): 279-284.
- Keskin Gündoğdu, T., Deniz, İ., Çalışkan, G., Şahin, E.S.ve Azbar, N. 2016. Experimental design methods for bioengineering applications. *Critical reviews in biotechnology*, 36 (2): 368-388.
- Kul, S. 2004. Cevap Yüzey Yöntemleri.Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi s.
- Kul, S. 2014. İstatistik Sonuçlarının Yorumu: P Değeri Ve Güven Aralığı Nedir? *Bulletin of Pleura/Plevra Bülteni*, 8 (1).
- Kumar, G.P., Kunamneni, A., Prabhakar, E.a.ve Ellaiah, P. 2005a. Optimization of Process Parameters for the Production of Inulinase from a Newly Isolated *Aspergillus niger* AUP19. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (8): 1359-1361.

- Kumar, G.P., Kunamneni, A., Prabhakar, T.ve Ellaiah, P. 2005b. Optimization of process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Aspergillus niger* AUP19. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (8): 1359-1361.
- Kushi, R., Monti, R.ve Contiero, J. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 25 (2): 63-69.
- Lee, W., Yusof, S., Hamid, N.S.A.ve Baharin, B. 2006. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Engineering*, 73 (1): 55-63.
- Lima-Costa, M.E., Tavares, C., Raposo, S., Rodrigues, B.ve Peinado, J.M. 2012. Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39 (5): 789-797.
- Lingappa, K., Pramod, T.ve Ali, S.I. 2007. Influence of pH on citric acid production by *Aspergillus niger* under submerged fermentation in carob pod extract.
- Loginova, K., Shynkaryk, M., Lebovka, N.ve Vorobiev, E. 2010. Acceleration of soluble matter extraction from chicory with pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 96 (3): 374-379.
- Manso, T., Nunes, C., Raposo, S.ve Lima-Costa, M.E. 2010. Carob pulp as raw material for production of the biocontrol agent *P. agglomerans* PBC-1. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37 (11): 1145-1155.
- Mazutti, M., Bender, J.P., Treichel, H.ve Di Luccio, M. 2006. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (1): 56-59.
- Mazutti, M., Ceni, G., Di Luccio, M.ve Treichel, H. 2007. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess and biosystems engineering*, 30 (5): 297-304.
- Meijer, W., Mathijssen, E.ve Borm, G. 1993. Crop characteristics and inulin production of Jerusalem artichoke and chicory. *Studies in plant science*.
- Menon, V.ve Rao, M. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38 (4): 522-550.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426-428.

- Mohamed, S.A., Salah, H.A., Moharam, M.E., Foda, M.ve Fahmy, A.S. 2015. Characterization of two thermostable inulinases from *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13 (1): 65-69.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C.ve Anderson-Cook, C.M. 2016. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons s.
- Nagem, R., Rojas, A., Golubev, A., Korneeva, O., Eneyskaya, E., Kulminskaya, A., Neustroev, K.ve Polikarpov, I. 2004. Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *Journal of molecular biology*, 344 (2): 471-480.
- Nakamura, T., Shitara, A., Matsuda, S., Matsuo, T., Suiko, M.ve Ohta, K. 1997. Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose. *Journal of fermentation and bioengineering*, 84 (4): 313-318.
- Öngen-Baysal, G.ve Sukan, S.S. 1996. Production of inulinase by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 18 (12): 1431-1434.
- Öngen-Baysal, G., Sukan, Ş.S.ve Vassilev, N. 1994. Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 16 (3): 275-280.
- Öngen, G., Baysalve Sukan, S.S. 1996. Production of inulinase by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 18 (12): 1431-1434.
- Öztürk, B. 2008. Optimization Of Mannanase Production From Recombinant *Aspergillus Sojae* And Analysis Of Galactomannan Hydrolysis Yüksek Lisans, Orta Doğu Teknik Üniversitesi.105 s.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Selvakumar, P., Soccol, V.T., Krieger, N.ve Fontana, J.D. 1999. Recent developments in microbial inulinases. *Applied biochemistry and biotechnology*, 81 (1): 35-52.
- Pariza, M.W.ve Johnson, E.A. 2001. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 33 (2): 173-186.
- Poorna, V.ve Kulkarni, P. 1995. A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional factorial design. *Bioresource Technology*, 54 (3): 315-320.
- Rosenberg, M. 1995. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. *Trends in Food Science & Technology*, 6 (1): 12-19.

- Roukas, T. 1999. Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 24 (1): 54-59.
- Rubio, M.C.ve Maldonado, M.C. 1995. Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. *Current Microbiology*, 31 (2): 80-83.
- Saldamlı, İ., 1998. Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği, Ankara
- Sánchez, S., Lozano, L., Godínez, C., Juan, D., Pérez, A.ve Hernández, F. 2010. Carob pod as a feedstock for the production of bioethanol in Mediterranean areas. *Applied Energy*, 87 (11): 3417-3424.
- Santos, M., Rodrigues, A.ve Teixeira, J.A. 2005. Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 (f). *Biochemical Engineering Journal*, 25 (1): 1-6.
- Sarı, A. 2014. *Aspergillus wentii* İnülinazı'nın gen ekspresyon seviyelerine üretim şartlarının etkisi.Yüksek lisans tezi Trakya Üniversitesi, Edirne.107 s.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.ve Van Dijck, P. 2002a. On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (4-5): 426-435.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.ve van Dijck, P. 2002b. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (4): 426-435.
- Selvakumar, P.ve Pandey, A. 1999. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, 34 (8): 851-855.
- Shaheen, I., Bhatti, H.N.ve Ashraf, T. 2008. Production, purification and thermal characterisation of invertase from a newly isolated *Fusarium* sp. under solid-state fermentation. *International journal of food science & technology*, 43 (7): 1152-1158.
- Sharma, A.D., Kainth, S.ve Gill, P.K. 2006. Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp. *Journal of Food Engineering*, 77 (3): 486-491.
- Sheng, J., Chi, Z., Gong, F.ve Li, J. 2008. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 144 (2): 111-121.

- Sheng, J., Chi, Z., Li, J., Gao, L.ve Gong, F. 2007. Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *Process Biochemistry*, 42 (5): 805-811.
- Shuler, M.L.ve Kargi, F. 2002. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, Upper Saddle River: Prentice Hall.65 s.
- Silva-Santisteban, B.O.Y.ve Filho, F.M. 2005. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36 (5): 717-724.
- Silva-Santisteban, B.O.Y.ve Maugeri Filho, F. 2005. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36 (5): 717-724.
- Singh, R., Dhaliwal, R.ve Puri, M. 2006. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*. *Process Biochemistry*, 41 (7): 1703-1707.
- Singh, R., Sooch, B.S.ve Puri, M. 2007. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Bioresource Technology*, 98 (13): 2518-2525.
- Singh, R.S.ve Chauhan, K. 2017. Inulinase production from a new inulinase producer, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9 1-10.
- Skowronek, M.ve Fiedurek, J. 2004a. Optimisation of inulinase production by *Aspergillus niger* using simplex and classical method. *strain*, 13 36.
- Skowronek, M.ve Fiedurek, J. 2004b. Optimisation of Inulinase Production by *Aspergillus niger* Using Simplex and Classical Method. *Food Technol. Biotechnol*, 42 (3): 141-146.
- Smail, T., Salhi, O.ve Knapp, J. 1995. Solid-state fermentation of carob pods by *Aspergillus niger* for protein production: effect of particle size. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11 (2): 171-173.
- Smith, J.E. 2004. *Biotechnology*. Cambridge University Pres, New York s.
- Souza-Motta, C.M.d., Cavalcanti, M.A.d.Q., Porto, A.L.F., Moreira, K.A.ve Lima Filho, J.L.d. 2005. *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (3): 343-350.
- Tunail, N. 2009. *Mikrobiyoloji*. Pelin Ofset, Ankara s.
- Turhan, I.ve Karhan, M. 2004. Doğal bir ürün; Keçiboynuzu. *Dünya Gıda*, 12 76-79.

- Turhan, I., Bialka, K.L., Demirci, A.ve Karhan, M. 2010. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 101 (14): 5290-5296.
- Vandamme, E.J.ve Derycke, D.G. 1983. Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications. *Advances in applied microbiology*, 29 139-176.
- Vijayaraghavan, K., Yamini, D., Ambika, V.ve Sravya Sowdamini, N. 2009. Trends in inulinase production—a review. *Critical reviews in biotechnology*, 29 (1): 67-77.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., de Jesus Romero-Gomez, S., Diaz-Godinez, G.ve Augur, C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13 (2): 157-167.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S.ve Higton, G. 2015. Endüstriyel Mikrobiyolojiye Giriş, Ankara s.
- Wei, W., Zheng, Z., Liu, Y.ve Zhu, X. 1998. Optimizing the culture conditions for higher inulinase production by *Kluyveromyces* sp. Y-85 and scaling-up fermentation. *Journal of fermentation and bioengineering*, 86 (4): 395-399.
- Wilson, R.G., Smith, J.A.ve Yonts, C.D. 2004. Chicory root yield and carbohydrate composition is influenced by cultivar selection, planting, and harvest date. *Crop Science*, 44 (3): 748-752.
- Xiong, C., Jinhua, W.ve Dongsheng, L. 2007. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 34 (2): 179-184.
- Yabancı, N. 2010. İnülin ve Oligofruktozların İnsan Sağlığı ve Beslenmesi Üzerine Etkileri *Akademik Gıda*, 8 (1): 49-54.
- Yatmaz, E. 2012. Kalsiyum Aljinatta İmmobilize Edilmiş *Saccharomyces Cerevisiae* Hücreleri İle Keçiboynuzu Ekstraktında Etanol Üretim Şartlarının Optimizasyon.Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi s.
- Yu, X., Guo, N., Chi, Z., Gong, F., Sheng, J.ve Chi, Z. 2009. Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 43 (3): 266-271.
- Yue, L., Chi, Z., Wang, L., Liu, J., Madzak, C., Li, J.ve Wang, X. 2008. Construction of a new plasmid for surface display on cells of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Microbiological Methods*, 72 (2): 116-123.

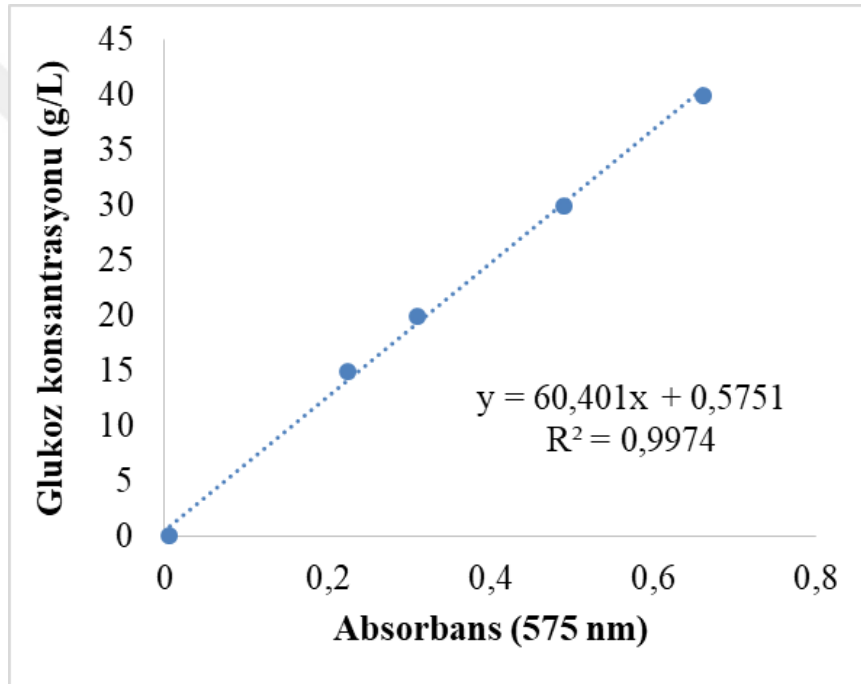
Zhu, Z., Bals, O., Grimi, N., Ding, L.ve Vorobiev, E. 2015. Better damage of chicory tissue by combined electroporation and ohmic heating for solute extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 94 248-254.



7. EKLER

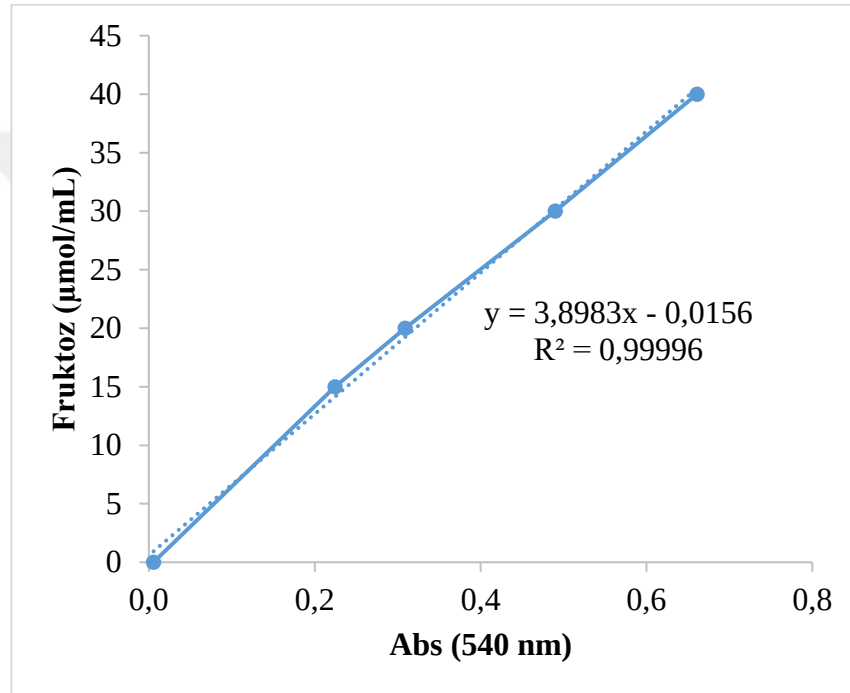
EK-1: DNSA yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen toplam indirgen şeker analizinde kullanılan glukoz standart kurvesi verileri ve şeker konsantrasyonun belirlendiği formül.

Absorbans (575 nm)	Glukoz Konsantrasyonu (g/L)
0.661	40
0.490	30
0.309	20
0.2245	15
0.0056	0

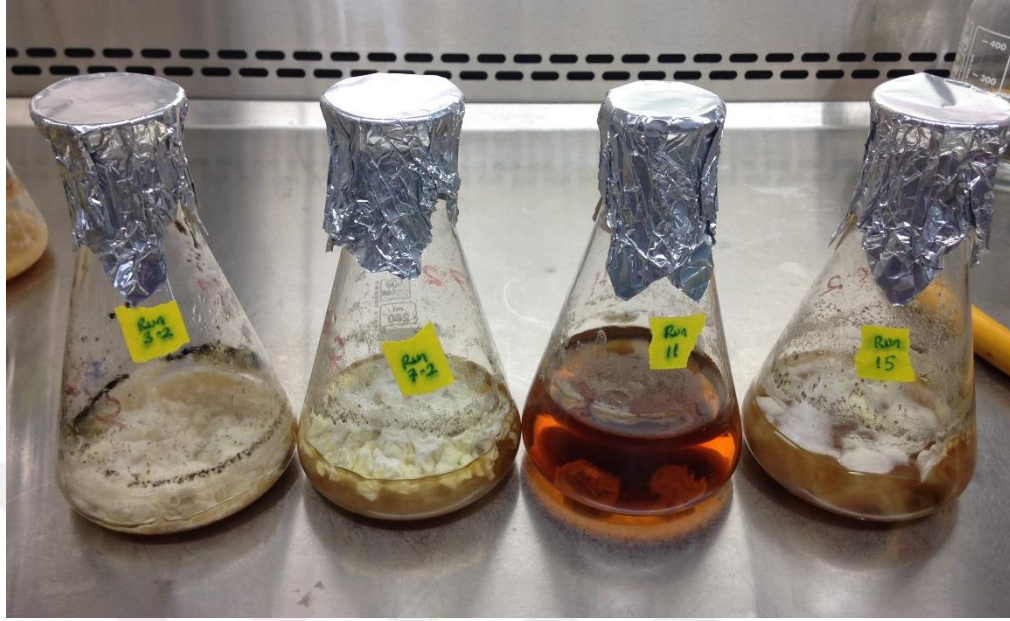


EK-2: İnülinaz analizinde kullanılan fruktoz standart kurvesi, verileri ve inülinaz miktarının hesaplandığı formül.

Absorbans (540 nm)	Fruktoz Konsantrasyonu (μmol/ml)
0.000	0
0.2598	1
0.6467	2.5
1.2888	5
1.9383	7.5
2.5600	10



EK-3: İnülinaz aktivitesinin düşük olduğu fermentasyon denemelerine ait erlen görüntüleri (10-15.gün).

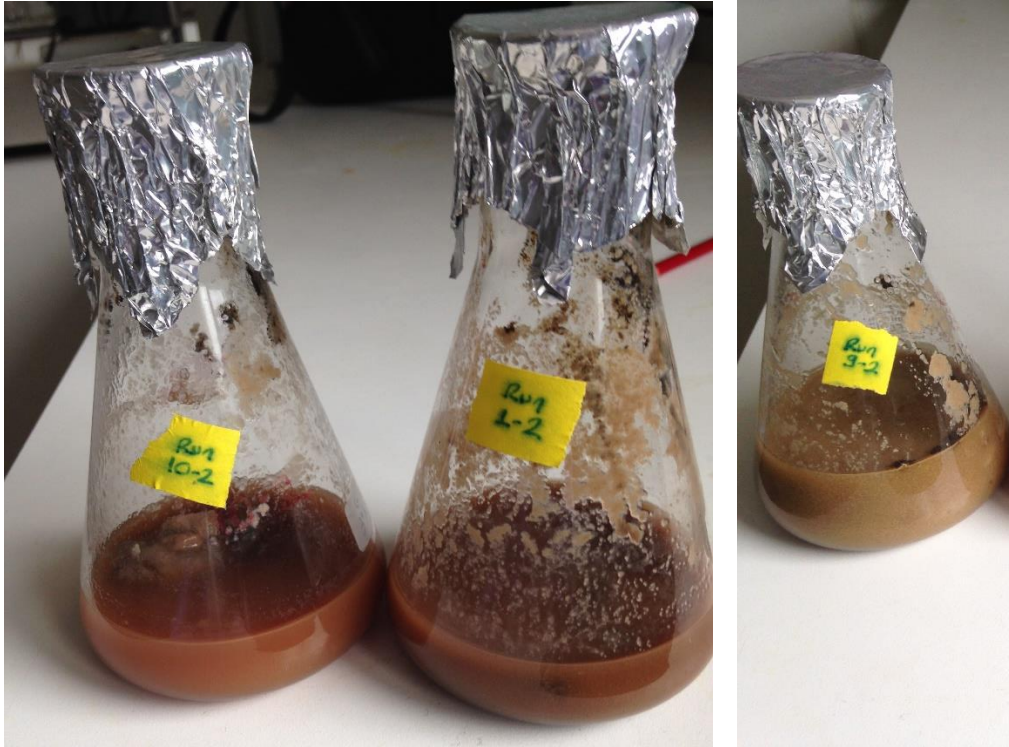


EK-4: İnülinaz aktivitesinin yüksek olduğu fermentasyon denemelerine ait erlen görüntüleri.

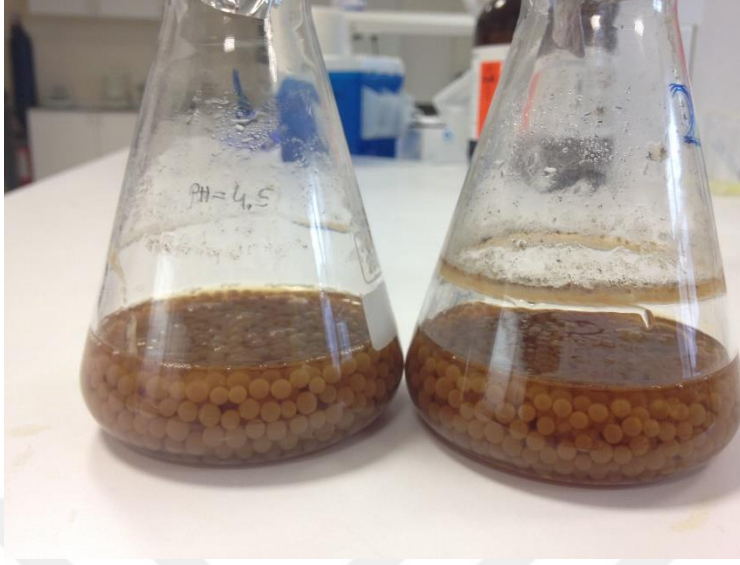
a) 10. gün görüntüleri



b) 15. gün görüntüleri



EK-5. Doğrulama denemesi *A. niger* 3.gün görüntüleri.



EK-6: Biyokütle analizi öncesi ve sonrası.



ÖZGEÇMİŞ

MERVE ILGIN

merveilgin.akd@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015-2017	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2010-2015	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

ESERLER:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Germeç M., Ilgin M., İlhan E., Turhan İ., "Optimization of acidic hydrolysis conditions of rice husk for fermentable sugar production", ENERGY SOURCES PART A-RECOVERY UTILIZATION AND ENVIRONMENTAL EFFECTS, vol.38, pp.3103-3108, 2016

Germeç M., Kartal F.K., Bilgic M., Ilgin M., İlhan E., Guldali H., et al., "Ethanol production from rice hull using Pichia stipitis and optimization of acid pretreatment and detoxification processes", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol.32, pp.872-882, 2016

Yatmaz E., Karahalil E., Germeç M., Ilgin M., Turhan İ., "Controlling filamentous fungi morphology with microparticles to enhanced beta-mannanase production", BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING, vol.39, pp.1391-1399, 2016

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Yatmaz E., Turhan İ., Germeç M., Ilgin M., Karahalil E., "Filamentous Fungus Fermentation to Produce Microbial β -Mannanase in a Stirred Tank Bioreactor by Adding Microparticle Agents", International Conference "Agriculture for Life, Life for Agriculture", Bükreş, ROMANYA, 8-10 Haziran 2017, pp.28-28

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Turhan İ., Germeç M., Ilgin M., İlhan E., "Fermente edilebilir şeker üretimi için pirinç kavuzunun asidik hidroliz koşullarının optimizasyonu (Optimization of acidic hydrolysis conditions of rice husk for fermentable sugars production) ",Türkiye 12. Gıda Kongresi, Edirne, TÜRKİYE, Ekim 2016.

