

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YER ELMASINDAN İZOLE EDİLEN BİR *Clostridium* TÜRÜNÜN
İNÜLİNAZİNİN BAZI ÖZELLİKLERİ**

Neslihan ATLIHAN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2011**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YER ELMASINDAN İZOLE EDİLEN BİR *Clostridium* TÜRÜNÜN İNÜLİNAZININ BAZI ÖZELLİKLERİ

Neslihan ATLIHAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ

Bu çalışmada bölgesel marketlerden sağlanan yer elması örneklerinden inülinaz aktivitesine sahip anaerobik mezofilik bakteri izole edilmiş ve inülinaz enziminin özellikleri belirlenmiştir. İzolasyonda, karbon kaynağı olarak sadece inülin içeren besiyeri kullanılmış, bakteri tek koloni olarak izole edilmiş ve saflaştırma işlemi dört defa tekrarlanmıştır. Elde edilen izolatın biyokimyasal ve 16S ribozomal DNA analizi sonucu, *Clostridium beijerinckii* olduğu belirlenmiştir. Mikroorganizmanın optimum gelişme sıcaklığı ve pH değerinin sırasıyla 30 °C ve 5.0 olduğu belirlenmiştir. Bu sıcaklık ve pH değerinde geliştirilen izolatın aktivitesi gelişmenin 32. saatinde maksimum 1,098 U/mL olduğu anlaşılmıştır. İzolatın ürettiği inülinazın optimum sıcaklığı ve pH değerinin ise 60 °C ve 7.0 olduğu saptanmıştır. İzolatın gelişmesinin en yüksek olduğu karbon kaynaklarının laktoz, fruktoz ve sakkaroz olduğu belirlenmiş, buna karşın en yüksek inülinaz aktivitesi maltoz, ksiloz ve laktozda geliştirilen kültürlerde saptanmıştır. Enzim aktivitesi, Ag^{1+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} ve EDTA eklendiği durumda azalmış, ancak Cu^{2+} , Co^{2+} ve Mn^{2+} enzim aktivitesinde artış sağlamışlardır. İnülinazın sakkaroz ve rafinoz üzerine etki göstermediği ve inüline spesifik olduğu belirlenmiştir.

Mart 2011, 43 sayfa

Anahtar Kelimeler: İnülin, yer elması, inülinaz, *Clostridium beijerinckii*, enzim aktivitesi.

ABSTRACT

Master Thesis

SOME CHARACTERISTICS OF INULINASE OF A *Clostridium* sp. ISOLATED FROM JERUSALEM ARTICHOKE

Neslihan ATLIHAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ

In this work, an anaerobic, mesophilic bacterium with inulinase activity is isolated from Jerusalem artichoke provided from local markets, and characteristics of inulinase are determined. Isolation medium included inulin as sole carbon source, bacterium is isolated as single colony and single colony isolation is repeated four times. Isolate is identified as *Clostridium beijerinckii* as a result of biochemical and 16S ribosomal DNA analysis. Optimum growth temperature and pH are determined as, 30 °C and 5.0, respectively. The highest inulinase activity of isolate grown at this temperature and pH, is determined at 32. hour of growth as 1,098 U/mL. Optimum temperature and pH of inulinase are determined as 60 °C and 7.0, respectively. It is found that, isolate shows better growth on medium including lactose, fructose and sucrose as carbon source, on the contrary the highest inulinase activity is determined with cultures grown on the medium including maltose, xylose and lactose. Enzyme activity is decreased with Ag^{1+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} and EDTA, but Cu^{2+} , Co^{2+} and Mn^{2+} increased enzyme activity. It is found that, inulinase has no activity on sucrose and raffinose, it is spesific for inulin.

March 2011, 43 pages

Key Words: Inulin, Jerusalem artichoke, inülinase, *Clostridium beijerinckii*, enzyme activity.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, bana araştırma ve kendimi geliştirme olanağı sağlayan, çalışmam süresince yakın ilgi ve önerileriyle bana yol gösterip beni yönlendiren danışmanım Sayın Prof. Dr. Sedat DÖNMEZ (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü)'e, çalışmalarım boyunca benden yardımını ve desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Ayşe AVCI (Sakarya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü)'ya ve beni her zaman destekleyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Neslihan ATLIHAN

Ankara, Mart 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1 İnülin	3
2.2 İnülinin Fizikokimyasal Özellikleri	6
2.3 İnülin Kaynakları	7
2.3.1 Yer elması	8
2.4 İnülinazlar	10
2.4.1 İnülinazların sınıflandırılması	10
2.4.2 İnülinaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar	11
2.4.3 İnülinaz üretimi için kullanılan substratlar	16
2.4.4 İnülinazların kullanım alanları	17
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1 Materyal	19
3.1.1 İzole edilen mikroorganizmaların kaynağı	19
3.2 Besiyeri Ve Çözeltiler	19
3.2.1 Mikroorganizmaların izolasyonu ve gelişiminde kullanılan besiyeri	19
3.2.2 Tampon çözeltiler	20
3.3 Mikroorganizmanın İzolasyonu Ve Muhafazası	21
3.4 Mikroorganizma Gelişmesinin İzlenmesi	21
3.5 İnülinaz Aktivitesinin Belirlenmesi	22

3.6 Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Çeşitli Faktörlerin Etkisi	23
3.6.1 Optimum gelişme sıcaklığı ve pH değerinin belirlenmesi	23
3.6.2 Farklı karbon kaynaklarında çoğalma ve enzim aktivitesinin belirlenmesi	23
3.7 İnülinaz Aktivitesi Üzerine Çeşitli Faktörlerin Etkisinin Belirlenmesi	23
3.7.1 Sıcaklığın etkisi	23
3.7.1.1 Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi	24
3.7.1.2 Enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi	24
3.7.2 Optimum pH değerinin belirlenmesi	24
3.7.3 Metal iyonları ve inhibitörlerin etkisi	24
3.8 Enzimin Hücre İçi Veya Hücre Dışı Olup Olmadığının Belirlenmesi	25
3.9 Protein Tayini	25
3.10 İnülinazın Farklı Şekerler Üzerine Aktivitesinin Belirlenmesi	26
3.11 İzolatın Moleküler Tanımlanması	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	27
4.1 Mikroorganizmaların İzolasyonu	27
4.2 Mikroorganizma Gelişmesinin İzlenmesi	27
4.3 Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Çeşitli Faktörlerin Etkisi	29
4.3.1 Optimum gelişme sıcaklığı ve pH değerinin belirlenmesi	29
4.3.2 Farklı karbon kaynaklarında çoğalma ve enzim aktivitesinin belirlenmesi	29
4.4 İnülinaz Aktivitesi Üzerine Çeşitli Faktörlerin Etkisinin Belirlenmesi	30
4.4.1 Sıcaklığın etkisi	30
4.4.2 pH değerinin etkisi	32
4.4.3 Bazı metal iyonları ve inhibitörlerin enzim aktivitesine etkisi	32
4.5 Enzimin Hücre İçi Veya Hücre Dışı Olup Olmadığının Belirlenmesi	33
4.6 Protein Tayini	34
4.7 İnülinazın Farklı Şekerler Üzerine Aktivitesinin Belirlenmesi	34

4.8 İzole Edilen Mikroorganizmanın Karakterizasyonu	34
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇ	39
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	43

KISALTMALAR DİZİNİ

F	Fruktozil birimi
G	Glikozil birimi
PD	Polimerizasyon derecesi
I	İnülinaz aktivitesi
S	İnvertaz aktivitesi
DNS	3,5-Dinitrosalisilik asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
C.	Clostridium
B.	Bacillus
A.	Aspergillus

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 İnülinin kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.2 İnülinaz spesifikliğin yapısı.....	11
Şekil 4.1 YE 2A kültürünün gelişme eğrisi. Geliştirme besiyerinde optik yoğunluk ve pH değerlerinin zamana göre değişimi	28
Şekil 4.2 YE 2A kültürünün geliştirme besiyerinde inülinaz aktivitesinin zamana göre değişimi	28
Şekil 4.3 Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	31
Şekil 4.4 Su banyosunda bekleme süresine karşılık enzim aktivitesindeki değişim.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 İnsanlar tarafından tüketilen bazı bitkilerin inülin içerikleri.....	5
Çizelge 2.2 Hindiba inülininin fizikokimyasal ve teknolojik özellikleri.....	8
Çizelge 2.3 Yer elmasının inülin içeriği ve verimi.....	9
Çizelge 4.1 Farklı karbon kaynakları içeren besiyerlerinde mikroorganizma çoğalması ve inülinaz aktivitesi.....	30
Çizelge 4.2 Enzim aktivitesi üzerine çeşitli metallerin ve inhibitörlerin etkisi.....	33
Çizelge 4.3 Sitoplazma ve çoğalma ortamında enzim aktivitesi.....	34

1. GİRİŞ

Fruktoz, tatlı doğal şeker ve sakkarozun alternatif bir tatlandırıcısıdır. Sakkarozun diyabet, şişmanlık ve damar tıkanıklığına yol açtığı bildirilmiş, fruktozun ise, insanlarda inorganik demirden daha çabuk emilen, demir-fruktoz şelat kompleksi oluşturarak, demirin absorpsiyonunu artırdığı belirtilmiştir (Ertan ve Ekinci 2002). Ayrıca; fruktanlar ve/veya fruktoz etanol, aseton-bütanol, 2,3 bütandiol, sorbitol vb., hidroksi-metil furfural (HMF) ve levulinik asit üretimi gibi endüstriyel fermantasyon prosesleri için potansiyel hammadde olarak önerilmiştir (D'Egidio vd. 1998). Günümüzde endüstriyel fruktozun, mısır nişastasından elde edildiği, bu işlemin nişastanın hidrolizini, glikozun fruktoza izomerizasyonunu ve son olarak fruktozun ayrılmasını içerdiği bildirilmiştir.

Fruktoz, doğrudan yüksek oranda fruktan üreten bitkilerden daha kolay ve ekonomik olarak üretilmektedir. Günümüzde, hindiba (*Cichorium intybus*) köklerinden ekstraksiyonla fruktoz üretiminin sadece kuzey ve orta Avrupa ülkelerinde (Belçika, Hollanda, Fransa) uygulandığı bildirilmiştir (D'Egidio vd. 1998).

İnülin, β -2,1 glikozit bağlı glikoz üniteleri içeren fruktoz zincirlerinden oluşan doğal bir polisakkarittir ve yer elması, hindiba, yıldız çiçeği gibi bitkilerin kök veya yumrularında bulunan bir depo karbonhidratıdır. Son zamanlarda, inülin kaynaklarının fruktoz şurubu, etanol ve diğer kimyasalların üretiminde yenilenebilir hammadde olarak dikkat çektiği belirtilmiştir (Ertan ve Ekinci 2002).

İnülinin fruktoz üretimi için uygulanan kimyasal hidroliz yönteminin; enzimatik hidroliz ile karşılaştırıldığında (a) yüksek maliyet, (b) kontrolsüz hidroliz ve (c) difruktoz anhidrit gibi yan ürünlerin oluşması nedeniyle tercih edilmediği bildirilmiştir (D'Egidio vd. 1998). Bazı bitki, küf ve mayalardan elde edilen fruktofuranosidazların enzimatik hidroliz ile, daha etkin ve ekonomik olarak fruktoz elde edilebildiği

açıklanmıştır ancak bakteriyel inülinazlar ile yapılan çalışma sayısı azdır (Pandey vd. 1999).

Bu çalışmada yer elmasından inülinaz aktivitesine sahip anaerobik bakteri izolasyonu ve elde edilecek izolatın inülinazının bazı özellikleri araştırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 İnülin

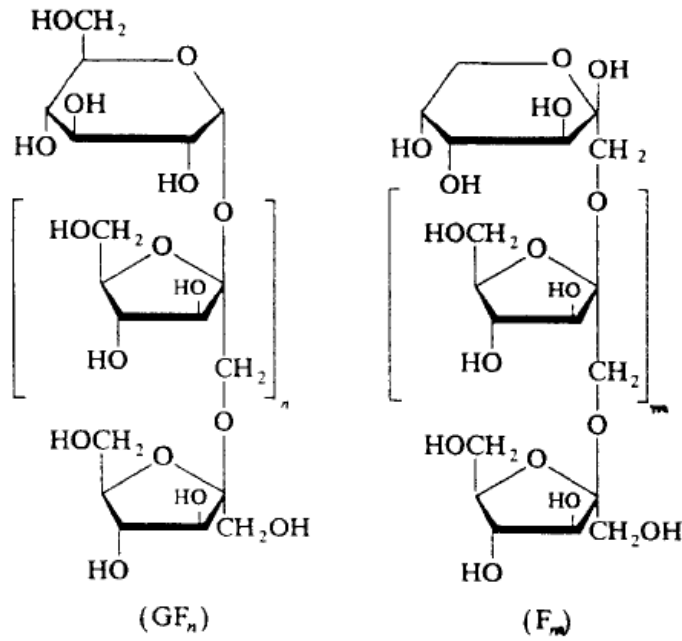
İnülin, birçok bitkide bulunan depo polisakkaritidir. Bazı sebze, meyve ve hububatta doğal olarak bulunduğundan, günlük diyetimizde de bulunmaktadır. İnülin ilk olarak 1804 yılında Alman bilim adamı Rose tarafından *İnula helenium* (andızotu)'dan izole edilmiş, ancak inülin adını ilk olarak Thompson 1808'de kullanmıştır (Franck 2006). Alman bitki fizyolojisti Julius Sachs (1864), fruktan üzerinde birçok araştırma yapmış; yıldız çiçeği, yer elması ve andızotunun yumru köklerinden etanol ile çöktürerek saf inülin kristallerini elde etmiştir.

İnülin, hem ilginç besinsel hem de önemli teknolojik özellikleri olan bir bileşiktir. Gıda formülasyonlarında, inülinin geniş bir uygulaması vardır ve gıdalarda organoleptik özellikleri önemli ölçüde geliştirmektedir. Özellikle, gıdalarda köpük ve emülsiyonların stabilitesini artırırken, suda jel formunda kullanıldığında, yağ benzeri davranış göstermektedir. Sonuç olarak gıdalarda inülin yağ ve karbonhidrat ikamesi olarak kullanılmakta ve besinsel yararlar sağlamakta, tat ve tekstürde de değişiklik oluşturmaktadır. Bu nedenle inülinin, dengeli ve iyi bir tada sahip gıdaların üretiminde yeni fırsatlar vaat eden anahtar bir bileşen olduğu bildirilmiştir (Franck ve De Leenheer 2005). Bunun yanında inülin, biyoteknolojik yöntemlerle yüksek fruktozlu şurup üretimi için, göreceli olarak daha ucuz ve bol bir substrattır. Ayrıca, etanol ve aseton-bütanol fermentasyonu için substrat, medikal endüstrisinde ve besin olarak kullanılabilen önemli oligosakkaritlerinde kaynağıdır (Drent vd. 1990).

İnülin kullanıldığı her ülkede yasal olarak, gıda veya gıda bileşeni olarak değerlendirilmekte, bu nedenle, AB veya Codex Alimentarius tarafından hazırlanan gıda katkı maddesi pozitif listelerinde yer almamaktadır. ABD'de 1992 yılında eksperler komitesi tarafından genel olarak güvenli GRAS (generally recognized as safe) kabul edildiği ve inülin isminin yasal olarak kabul edildiği açıklanmıştır (Franck 2006). Avrupa ülkelerinde ise diyet lifi olarak sınıflandırılmış ve Codex

Alimentarius'un diyet lifi tanımına uyduğu açıklanmıştır (Codex Guidelines on Nutrition Labelling CAC/GL 2-1985, Rev. 1-1993) (Franck 2006).

Kimyasal olarak inülin β -(2-1) fruktozil-fruktoz bağları içeren farklı büyüklüklerde karbonhidratlardır. Bazen bir terminal glikoz ünitesi içerebilmekte ve GF_n veya F_n olarak isimlendirilmektedir (F fruktozil birimi ve G glikozil birimi), (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 İnülinin kimyasal yapısı (Franck, 2006)

İnülinin polimerizasyon derecesi (PD); kaynağı, hava koşulları, bitkinin fizyolojik yaşı gibi etkenlere bağlı olarak değişmekle birlikte, göreceli olarak düşüktür ($PD < 200$). Standart hindiba inülininde polimerizasyon derecesi yaklaşık 2-60 arasındadır. Bu da inülinin, oligomerlerin ve polimerlerin bir karışımı olduğunu göstermektedir. Ancak, bakteriyel inülinin maksimum polimerizasyon derecesinin 10.000-100.000 arasında olduğu belirtilmiştir (Roberfroid 2005). Bazı bitkilerdeki inülin içerikleri çizelgede 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 İnsanlar tarafından tüketilen bazı bitkilerin inülin içerikleri (Franck ve De Leenheer, 2005)

Bitki	Yenilen kısım	Kuru madde içeriği (%)	İnülin içeriği (% Kuru Maddede)
Soğan	Soğan	6-12	2-6
Yer elması	Yumru kök	19-25	14-19
Hindiba	Kök	20-25	15-20
Pırasa	Soğan	15-20*	3-10
Sarımsak	Soğan	40-45*	9-16
Enginar	Yaprakları göbeği	14-16	3-10
Muz	Meyve	24-26	0.3-0.7*
Arpa	Hububat	NA	0.51.5*
Çavdar	Hububat	88-90*	0.1-1
Karahindiba	Yapraklar	50-55	12-15
Dulavratotu	Kök	21-25	3.5-4.0
Camas	Soğan	31-50	12-22
Murnong	Kök	25-28	8-13
Yacon	Kök	13-31	3-19
Tekesakalı	Kök	20-22	4-11

NA, Bilgi yok. *Tahmini değer.

Kaynağı ne olursa olsun doğal inülinin, her zaman glikoz, fruktoz, sakkaroz ve bazı küçük oligosakkaritler içerdiği belirtilmiştir. Burada kullanılan doğal terimi, inülinin taze köklerden ekstrakte edildiğini, bitkinin kendi inülinaz aktivitesi ve asit hidrolizinin engellendiğini ifade ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, inülin bileşiminde doğal olarak bulunan küçük oligosakkaritlerin ve monosakkaritlerin giderilmesi ve ayırma işlemlerinin uygulanmadığı da belirtilmiştir. Bu açıdan, yer elması, hindiba veya yıldız çiçeğinden kimyasal yöntemlerle alınan inülinin doğal olarak kabul edilemediği belirtilmiştir. Çünkü bu ürünlerin ekstrakte edildiği bitkilerin tipik inülinlerinden küçük oligosakkaritlerin ve monosakkaritlerin ayrılması sonucu polimerizasyon derecesi

yaklaşık 27-29 arasındadır (her üç ürün içinde) ve polimerizasyon derecesi 10'dan düşük olan zincirleri içermedikleri açıklanmıştır (Franck ve De Leenheer 2005).

Yakın zamanlara kadar bitkisel kaynaklı inülinin, doğrusal yapıda bir molekül olduğu düşünülmüş, ancak yapılan çalışmalarda doğal hindiba inülininin küçük PD'li dallanmalara sahip olduğu (% 12) anlaşılmış ve bu durumun yıldız çiçeği inülini için de geçerli olduğu saptanmıştır (Franck 2006). Bununla birlikte, bakteri inülininde dallanma oranının % 15 olduğu belirtilmiştir (Roberfroid 2005).

Yapısal veya polimerik açıdan inülinin; dairesel merdivenin basamakları gibi polioksietilen bir iskelete tutunmuş fruktoz moleküllerinden oluştuğu belirtilmiştir (Roberfroid 2005). Her bir monomeri 0.24 nm olan altıgenimsi (hegzagonal) altı katlı eksen boyunca kristalize olduğu, ayrıca, hidrat ve yarı hidrat olarak iki farklı kristal alomorfunun bulunduğu saptanmış, iki birim arasındaki farkın su içeriğindeki değişimle korelasyon gösteriyor olabileceği belirtilmiştir (Franck 2006).

2.2 İnülinin Fizikokimyasal Özellikleri

Hindiba inülini kimyasal olarak beyaz, kokusuz ve yüksek saflıkta toz halde bulunabilen, tatsız, kokusuz ve ağızda tat bırakmayan bir bileşiktir. Standart hindiba inülininin çok az tatlı (sakkarozla karşılaştırıldığında % 10 tatlı), bununla birlikte uzun zincirli inülinin tatlı olmadığı belirtilmiştir. İnülinin, ürün yapısına ve ağız tadına katkıda bulunarak ana bileşen gibi davrandığı belirtilmiştir. Genellikle, aspartam ve asesülfam K gibi yapay tatlandırıcılarla birlikte kullanılarak, bunların bıraktığı tadın inülinle azaltıldığı, ayrıca iyi bir ağız tadı sağlandığı belirlenmiş; bu tür kombinasyonların önemli kalitede tatlılık sinerjisi sergilediği bildirilmiştir (Franck 2006).

Hindiba inülininin suda çözünürlüğünün oda sıcaklığında ortalama olarak % 10 kadar olduğu ve bu konsantrasyonda sulu sistemlerde çökelti oluşturmadan kullanılabildiği

bildirilmiştir. İnülin çözeltilerinin hazırlanması için ılık su (50-100 °C) önerildiği, hindiba inülininin viskozitesinin düşük olduğu (% 5'lik çözelti için 10 °C'de 1.65 mPas) ve suyun donma ve kaynama noktası üzerinde çok küçük bir etkiye sahip olduğu açıklanmıştır (Franck 2006).

2.3 İnülin Kaynakları

İnülinin, bitkisel kaynaklardan sağlandığı ve doğada çiçekli bitkilerin % 15'inin önemli miktarda inülin kaynağı olduğu belirtilmiştir. İnsan diyetinde kullanılan inülin içeren bitkilerin Lilliaceae (soğan, Asparagus, sarımsak) ve Compositae (yer elması, hindiba, yakon) ailelerine dahil olduğu açıklanmıştır. Yüksek inülin içerikleri nedeniyle hindiba, yıldız çiçeği ve yer elmasının endüstriyel inülin üretiminde kullanıldığı bildirilmiştir (Franck ve De Leenheer 2005).

İnülinin, küf mantarlarında bulunup bulunmadığı henüz tam olarak belirlenmemiş ancak, küf sporlarının sakkarozlu ortamda çoğalarak inülin benzeri moleküller oluşturduğu, bununla beraber sakkarozun gerçek bir küf karbonhidratı olmadığı için sakkaroz:sakkaroz fruktoziltransferaz enzimi ile inülin sentezi için yeterli başlangıç materyali olduğu açıklanmıştır (Franck ve De Leenheer 2005). *Aspergillus sydowi*'nin moleküler ağırlığı bitki inülininden daha yüksek olan bir inülin sentezlediği belirtilmiş; bununla birlikte; *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Myrothecium* veya *Trichoderma* cinslerinde fruktan belirlenmemiştir (Roberfroid 2005).

Bakteriler arasında fruktan üreten cinsler daha yaygındır. Bakteriyel fruktanların levan tipi tanımına uyduğu ve *Pseudomonaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Actinomycetes* ve *Bacillaceae* cinslerinde bulunduğu açıklanmıştır (Franck ve De Leenheer 2005). Bazı *Streptococcus* mutantlarının inülin benzeri bileşikler üreten bakteriler olduğu ve oluşan inülinin doğrusal olup olmadığının saptanamadığı açıklanmıştır (Franck ve De Leenheer 2005).

Çizelge 2.2 Hindiba inülininin fizikokimyasal ve teknolojik özellikleri (Roberfroid 2005, Franck 2006)

Özellik	İnülin (PD 2-60)	Uzun zincirli inülin (PD 10-60)
Ortalama PD	12	25
Kuru madde (%)	95	95
İnülin içeriği (%KM)	92	99.5
Şeker içeriği (%KM)	8	<0,5
pH (%10'luk çözelti)	5-7	5-7
Kül (% KM)	<0,2	<0,2
Ağır metal (%KM)	<0,2	<0,2
Renk	Beyaz	Beyaz
Tat	Nötral	Nötral
Sakkarozaya göre tatlılık (%)	10	Yok
Suda çözünürlük (% 25 °C'de)	12	2.5
Suda vizkozite (%5, 10°C'de, mPa)	1,6	2.4
Isıl direnç	İyi	İyi
Asit direnci	Zayıf	İyi
Gıda uygulamaları	Yağ ikamesi Jelleştirme ajanı	Yağ ikamesi Jelleştirme ajanı

2.3.1 Yer elması

Yer elmasının (*Helianthus tuberosus* L.) Kuzey Amerika'nın orta bölgelerinde doğal olarak yetiştiği, Fransız kaşif Champlain tarafından 1600'lü yılların başlarında Fransa'ya götürüldüğü ve burada 1600'lerin ortasından itibaren insan gıdası ve hayvan yemi olarak kullanıldığı açıklanmıştır (Kıllı vd. 2005). Günümüzde ise, insan ve hayvan beslenmesinde, alkol ve yüksek fruktoz şurubu üretiminde kullanılan önemli bir bitki konumuna geldiği, Fransa'da yer elmasının uzun yıllardır şarap ve bira yapımında

kullanıldığı; ayrıca alkol ve bütanol üretiminde kullanıldığı ancak yer elmasından etanol üretiminin ekonomik olmadığı bildirilmiştir (Cosgrove vd. 2005).

Türkiye’de yer elmasının başta Orta Anadolu ve Ege bölgeleri olmak üzere, birçok yöreye yayıldığı, ancak taze tüketime yönelik olarak çok küçük alanlarda yetiştirildiği bildirilmiştir (Kıllı vd. 2005). Bunun, bitkinin sanayide değerlendirilmesiyle ilgili yeterli çalışma bulunmamasından kaynakladığı belirtilmiştir.

Yer elmasının, yüksek sıcaklıklara ve stres koşullarına dayanıklı olan bir bitki olduğu belirtilmiştir. Yer elmasının çeşitli stres koşullarına böyle bir direnç ve adaptasyonunun fruktan metabolizmasına bağlanabildiği açıklanmıştır (D’Egidioa vd. 1998).

Yer elmasında çiçeklenme öncesi, fotosentez ürünü şekerin % 70-80’inin sapta ve geri kalan % 20-30’unun yumru köklerde depolandığı bildirilmiştir. Sadece çiçeklenme sonrası rezervlerin saplarda biriktiği, bu nedenle sapın geçici bir depo organı olduğu, daha sonra bu rezervlerin yumru köklere taşındığı belirtilmiştir. Yer değiştirme süresi boyunca (30-40 gün) suda çözünebilen karbonhidratların toplam miktarının her bitki için sabit olduğu, ılıman sıcaklıklarda fotosentez ürününün yaşlı yapraklardan yumru köklere taşındığı ve karbonhidrat miktarında küçük bir artış olduğu açıklanmıştır (D’Egidioa vd. 1998). Yer elması inülininin; sadece % 20’sinin polimerizasyon derecesinin 10’dan yüksek olduğu, % 6’sının polimerizasyon derecesinin ise 40’dan yüksek olduğu belirtilmiştir (Roberfroid 2005). Çizelge 2.3’te yer elmasının inülin verimi verilmiştir.

Çizelge 2.3 Yer elmasının inülin içeriği ve verimi (Franck 2006)

Yumru kökler (ton/ha)	35-60
KM (%)	19-25
İnülin (%)	14-18
İnülin (ton/ha)	4.5-8.5
Ortalama PD	6-10
KM: Kuru Madde PD: Polimerizasyon Derecesi	

2.4 İnülinazlar

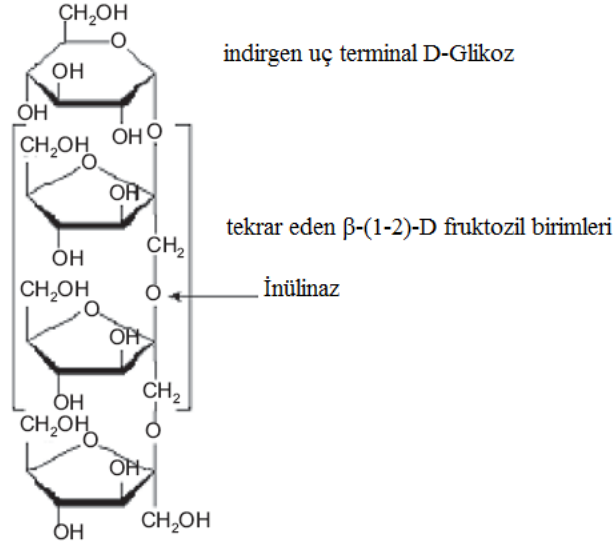
İnülinazlar (2,1- β -D-fruktan fruktanohidrolaz) [EC 3.2.1.7], inülini hidrolize eden enzimlerdir. Bu enzimlerin genellikle indüktif ve ekzo enzimler oldukları, inülinazların inülini polimerdeki uç glikozidik bağları hidrolizle kırarak D-fruktoz oluşturdukları, bu nedenle, inülinazların ticari inülin hidrolizinde önemli rol oynadıkları belirtilmiştir (Pandey vd. 1999). Yapılan yeni bir derlemede ise, mikrobiyel inülinazların endüstriyel enzimlerin önemli bir sınıfı oldukları belirtilmiştir (Pandey vd. 1999).

2.4.1 İnülinazların sınıflandırılması

Birçok mikrobiyel inülinaz preparatının, inülinaz aktivitesi (I) yanında belirgin bir invertaz aktivitesi (S) de gösterdiği, bunların katalitik aktivitelerinin I/S veya S/I oranlarıyla tanımlandığı bildirilmiştir. Bitkisel inülinazların, sakkarozu etkili değilken inülin üzerine etkili olduğu öte yandan, bazı mikroorganizmalarda bulunan inülinazların inülin üzerine etki şekline göre, endo-inülinaz ve ekzo-inülinaz olarak iki gruba ayrıldığı belirtilmiştir (Ertan ve Ekinci 2002).

Maya inülinazlarının sakkarozu, inülini ve levan tipi fruktanları ekzo tarzı hidrolize edebildiği belirtilmiştir (Vijayaraghavan vd. 2009). Ekzo-inülinazların (β -D-fruktan fruktohidrolaz, EC 3.2.1.80) sakkarozu hidrolize edebildikleri ve inülin hidrolizini polimer yapıdaki terminal fruktozil ünitelerindeki (D-fruktoz) glikozidik bağları kırarak parçaladıkları, endo-inülinazların (2,1- β -D-fruktan fruktohidrolaz, EC 3.2.1.7) ise inülini oligosakkariler oluşturacak şekilde molekülün ortasından kırarak parçaladıkları açıklanmıştır. β -D-fruktofuranosidazlar, daha ileri olarak levan, inülin ve disakkarit sakkarozu hidrolize edebilme yeteneklerine göre, sükrallar ve invertazlar olarak sınıflandırılabilirler ve *Bacillus subtilis*'in yukarıda özellikleri belirlenen tüm enzimleri üretebilme yeteneğinde olduğu açıklanmıştır (Vijayaraghavan vd. 2009). *Aspergillus alternata* ve *Aspergillus niger* inülinazlarının, inülini ekzo tipi hidrolize ettiği, *Trichoderma harzianum* inülinazının reaksiyonun başında fruktooligomerler

oluşturduğu, bu inülinazın endo tipi reaksiyon gösterdiği açıklanmıştır (Ertan ve Ekinci 2002).



Şekil 2.2 İnülinaz spesifikliğin yapısı (Vijayaraghavan vd. 2009)

İnüline özgü bir enzim olan inülinazlar veya inülazların, yer elması saplarından izole edildiği açıklanmıştır (Vijayaraghavan vd. 2009). Ayrıca, *Bacillus subtilis*, *Actinomyces viscosus* ATCC 15987, *Streptococcus* sp. mutantlarının, *Kluyveromyces fragilis*, *Chrysosporium pannorum* ve *Penicillium* sp. inülin hidrolize eden inülinazlar üretebildikleri gösterilmiştir. *Aspergillus niger*'den elde edilen β -fruktofuranosidazların ve *Aspergillus niger* P-II inülinazının inülin ve sakkaroz üzerinde etkili olduğu ancak levana etkili olmadığı kanıtlanmıştır. *Arthrobacter ureafaciens* inülinaz II'nin levan ve inülini parçaladığı, ancak sakkarozu hidrolize etmediği bildirilmiştir (Vijayaraghavan vd. 2009).

2.4.2 İnülinaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar

Günümüzde çok sayıda küf, maya ve bakteri türü inülinaz üretiminde kullanılmaktadır. Küfler arasında *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficuum*, *Chrysosporium pannorum* ve *Penicillium purpurogenum*'un en iyi kaynakları olduğu belirtilmiştir

(Sirisansaneeyakull vd. 2006). Mayalardan ise *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir*, *Debaryomyces cantarellii* ve *Pichia polymorpha*'ın inülinaz üretiminde kullanıldıkları bildirilmiştir. Mayalar, genellikle sadece ekzo-inülinaz üretirken, çoğu küflerin ise hem endo- hem de ekzo-inülinaz ürettikleri belirtilmiştir (Sirisansaneeyakull vd. 2006).

İnülinaz üretici küf mantarları arasında, *Aspergillus* sp. (filamentli küfler)'e dahil olan küf suşları ve *Kluyveromyces* sp. (diploid mayalar)'e dahil olan maya suşlarının tercih edilen mikroorganizmalar oldukları bildirilmiştir (Pandey vd. 1999). *Aspergillus fumigatus* hücre dışı termostabil inülinazı kısmen saflaştırmanın ardından farklı desteklerde tutularak immobilize edilmiştir (Gill vd. 2005). Serbest ve çeşitli destekler üzerine immobilize edilmiş enzimin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin 5.5 ve 60 °C olduğu belirlenmiştir. İmmobilizasyonla enzimin ısıl direncinin belirgin şekilde geliştiği ve immobilize enzimin 60 °C de 48 saat inkübasyon sonrası aktivitesinin yaklaşık % 70 ini koruduğu belirlenmiştir (Gill vd. 2005).

Yapılan bir çalışmada, *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 suşundan, üç farklı ekzo-inülinaz ve iki farklı endo-inülinaz izole edilmiştir (Chen vd. 2009). Bu inülinazların 50 °C'nin altındaki sıcaklıklarda stabil oldukları ve optimum sıcaklıklarının 45 °C olduğu belirlenmiştir. Enzimlerin pH 4-8 arasında stabil oldukları, optimum pH değerinin ekzo-inülinaz için 4.5, endo-inülinaz için 5.0 olduğu belirtilmiştir. İnülinaz aktivitesinin, Ag^+ ile tamamen inhibe olurken, Fe^{2+} ve Al^{3+} ile kuvvetle inhibe edildiği; buna karşın K^+ , Ca^{2+} , Li^{2+} , EDTA ve ürenin enzim aktivitesi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Chen vd. 2009).

Sharma ve Gill (2006), *Streptomyces* sp. den ekzo-inülinaz izole etmişler ve enzimin optimum sıcaklık ve pH değerini sırasıyla 70 °C ve 6.0 olarak saptamışlardır. Enzimin $NaNO_3$, EDTA ve $HgCl_2$ dışında tüm metal tuzlarını tolere edilebildiği ve bu tuzların inülinaz aktivitesini olumsuz yönde etkilemediği belirtilmiştir. Enzimin inüline afinitesinin sakkaroz ve rafinoza oranla daha yüksek olduğu da belirlenmiştir.

Yer elması yumrularından, iki yeni inülinaz üreten mikroorganizma izole edilmiş ve bunlar, *Aspergillus niger* TISTR 3570 ve *Candida guilliermondii* TISTR 5844 olarak tanımlanmıştır (Sirisansaneeyakul 2006). Her iki mikroorganizmanın ürettiği inülinazın endüstriyel boyutta inülin hidrolizi için uygun olduğu; *A. niger* TISTR 3570 inülinazının hem endo- hem de ekzo-inülinaz aktivitesi gösterdiği, buna karşın maya inülinazının temel olarak ekzo-inülinaz olduğu belirlenmiştir. Küf ve maya inülinazlarının, aktivitelerinin 5:1 olacak şekilde karıştırılmasıyla inülinin fruktoza hidrolizinde daha etkili olduğu; enzim karışımıyla maya ve küfün inülinazlarından daha iyi bir endo- ve ekzo-inülinaz aktivitesi kombinasyonu elde edildiği belirtilmiştir.

Selvakumar ve Pandey (1999), *Staphylococcus* sp. RRL1 ve *Kluyveromyces marxianus* ATCC 52466'nın karbon kaynağı olarak sadece inülin içeren ortamda çoğaltıldığında hücre dışı inülinaz ürettiklerini saptamışlardır. *Staphylococcus* sp. optimum enzim aktivitesi için besiyeri pH, sıcaklık değerleri ile karıştırma ve inokülüm oranlarının sırasıyla; 6.5, 37 °C, 150 ve % 4 olduğu; *Kluyveromyces marxianus* ATCC 52466 için ise pH, sıcaklık, karıştırma ve inokülüm değerlerinin sırasıyla; 6.0, 30 °C, 150 rpm ve % 4 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca enzim verimlerinin, *Staphylococcus* sp. için 615 U/L ve *K. marxianus* için 470 U/L olduğu belirlenmiştir.

Inülinazların, *Acetobacter* sp., *Achromobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp. ve *Cladosporium* sp. gibi farklı bakteriler tarafından da üretildiğine ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (Pandey vd. 1999). *Vernonia herbacea* (Vell rusby)'nin saçak köklerinden izole edilen bir *Bacillus subtilis* suşundan izole edilen invertazın, inülinaz aktivitesi de gösterdiği, invertaz/inülinaz oranının 0.62 olduğu ve bu enzimin ekzo-inülinaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Vijayaraghavan vd. 2009). Hindiba köklerinden izole edilen bir *Arthrobacter* sp. E.M. 278 suşundan hücre dışı inülinaz elde edilmiş ve enzimin polifrukthan veya sakkarozca zengin kök ekstraktlarından fruktoz üretimi için uygun özellikte olduğu açıklanmıştır (Pandey vd. 1999).

Inülinaz üretimi için, termofil bakteri suşlarının kullanılmasının avantajlı olduğu, toprak örneklerinden çeşitli oranlarda (73-282 U/L) enzim üreten *Bacillus* sp. türü dört

termofilik suşun izole edildiği açıklanmış, bu izolatların inülinaz aktivitesinin olduğu ve bu aktivitenin çoğunun (% 76-100 oranında) hücre dışında bulunduğu belirlenmiştir (Allais vd. 1987).

Pandey vd. (1999) yaptıkları çalışmalarda, mezofilik ve termofilik aralıkta, inülinaz aktivitesi gösteren dokuz bakteri suşu izole etmişler ve bunlardan *Bacillus circulans*'ın 45 °C'de ve çalkalamalı koşulda enzim ürettiği açıklanmıştır. Mezofilik aralıkta bulunan diğer sekiz suştan üçünün *Staphylococcus* sp. olduğu ve bu çalışmada ilk olarak bir *Staphylococcus* sp.'nin inülinaz oluşturduğunun belirlendiği bildirilmiştir. Bir çalışmada ise 45 °C'de çoğalan bir *Pseudomonas* sp.'nin, çok aktif inülinaz oluşturduğu saptanmıştır (Pandey vd. 1999). Diğer bir çalışmada ise, *Bacillus subtilis* 430 A suşu 45 °C'de fermentörde geliştirildiğinde en iyi inülinaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Vullo vd. 1991). Bu suşun enzimlerinin çoğunun (toplam enzimin % 70'i) kültür ortamına salındığı, bu nedenle hücre dışı olduğu ve % 9'unun hücre kısmından elde edildiği bildirilmiştir.

Termostabil ekzo-inülinaz üretebilen termofilik bir *Bacillus* sp. gelişen hücreleri formaldehitte aktive edilmiş polisülfon membranlara immobilize edilmiştir (Uzunova vd. 2002). Bu koşullarda kültürün ellinci döngüden sonra bile başlangıç aktivitesinin % 60-90'nı koruduğu belirlenmiştir.

Farklı kaynaklardan inülinaz aktivitesi olan bazı anaerobik *Clostridium* sp. suşları izole edilmiştir. Bunlardan *Clostridium acetobutylicum* suşlarının β -fruktofuranosidaz aktiviteleri araştırılmış ve her ikisi de inülini (inülinaz aktivitesi) ve sakkarozu (invertaz aktivitesi) hidrolize eden hücre içi ve hücre dışı β -fruktofuranosidaz ürettiği belirlenmiştir (Looten vd. 1987). Hücre dışı preparatta inülinaz aktivitesinin invertaz aktivitesinden daha yüksek bulunduğu hücre preparatı için ise tam tersi durumun geçerli olduğu bildirilmiştir.

Efstathiou vd. (1986), şeker pancarı ekstraktı, yıldız çiçeği ekilmiş toprak ve yer elmasından izole edilen bazı *Clostridium acetobutylicum* suşlarının inülini kullanabildiklerini belirlemişlerdir. Bunlardan, ABKn8 suşunun spesifik aktivitesinin 3.03 U/(mg protein) olan enzim ürettiği bildirilmiştir. Bu çalışmada enzim aktivitesinin çoğunun süperatantta bulunduğu; inülinazın, inülinle indüklendiği; ksiloz, fruktoz veya sakkarozla indüklenmediği ve glikozla baskılandığı belirlenmiştir. Elde edilen inülinaz inülin, sakkaroz ve rafinoza karşı etkili, fakat melezitoza karşı etkili olmadığı da belirlenmiştir.

Pandey vd. (1999) yıldız çiçeği yumrularından, hücre içi inülinaz üreten bir *Clostridium thermoautotrophicum* T1 izole etmişlerdir. Bu suşun, gelişme için optimum sıcaklık ve substrat spektrumu gibi pek çok açıdan diğerlerinden farklı olduğu belirlenmiş, başka bir çalışmada ise, bir şeker fabrikasından alınan şeker pancarı ekstraktı, yer elması etrafındaki toprak, taze inek dışkısı ve bir botanik parkı tropik havuz tortusundan *Clostridium thermosuccinogenes* olarak tanımlanan dört termofilik *Clostridium* suşu izole edilmiştir (Drent vd. 1991). Bu suşların inülin içeren bir ortamda 40-65 °C’de gelişebildikleri, optimum çoğalma sıcaklığının ise 58 °C olduğu belirlenmiştir. Tüm suşların farklı şekerleri fermente edebildikleri, fruktoz, glikoz ve inülinde daha çok format, asetat, etanol, laktat, H₂ ve suksinat oluşturdıkları belirlenmiştir. İnülinaz sentezinin mikroorganizma gelişmesi ile paralel olduğu ve enzimin çoğunlukla hücreye bağlı olduğu açıklanmıştır. Buna karşın, başka bir suşun (*Clostridium acetobutylicum* IFP 912), invertaz aktivitesinden daha yüksek hücre dışı inülinaz aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (Pandey vd. 1999). Allais vd. (1986) farklı toprak örneklerinden 32 bakteri suşu izole etmişler ve bunların 20 tanesini *Favobacterium multivorum* olarak tanımlamışlardır. Tüm suşların, hücre içi enzimi logaritmik gelişme fazının sonlarında ürettikleri belirtilmiştir. Sharma ve Gill (2007), *Streptomyces* sp. ALKC 4’ün, hücresiz ekstraktından, ekzo etkili ve termostabil bir inülinazı saflaştırmışlardır. Saf enzimin sıcaklık ve pH optimumunun, sırasıyla 70 °C ve 6.0 olduğu; bu enzimin, inülinde fruktoz üretimi için uygun olduğu belirtilmiştir.

2.4.3 İnülinaz üretiminde kullanılan substratlar

İnülinaz üretimi için en sık kullanılan substratın inülin olduğu, bununla birlikte farklı mikroorganizmalarla enzim üretimi için çeşitli substratların kullanıldığı bildirilmiştir (Vijayaraghavan vd. 2009). Bunlar arasında saf maddeler, inülin içeren materyaller ve karışık substratların da yer aldığı belirtilmiştir. Saf substratlar arasında (çoğunlukla karbonhidratlar), inülinin ve sakkarozun karbon kaynağı olarak tercih edildiği belirtilmektedir. Kullanılan suşun sadece inülinaz aktivitesine sahip olması durumunda inülinin en iyi substrat olduğu; ancak mikroorganizmanın inülinazın yanı sıra invertaz aktivitesi de gösterdiği durumda enzim üretimi için en iyi kaynağın sakkaroz olduğu açıklanmıştır (Pandey vd. 1999).

Compositae ve *Gramineae* cinsine ait bitkilerden bazılarının kök ve yumrularının veya bunların izolatlarının inülinaz üretiminde kullanılabildiği; yıldız çiçeği (*Dahlia pinnata*), yer elması (*Helianthus tuberosus*), hindiba (*Cichorium intybus*) ve *Saussurea lapa* köklerinin bu amaçla yaygın olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Pandey vd. 1999). İnülinaz üretiminde, inüline göre daha ucuz olan, yer elması veya hindiba kökleri ile maltoz karışımı kullanan bir yöntemin geliştirildiği de bildirilmiştir.

Mazutti vd. (2008), melas, mısır koçanı hidrolizatı ve maya ekstraktı gibi tarım endüstrisi atıklarını substrat olarak kullanmış ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571'in inülinaz üretimini araştırmışlardır. Makino vd. (2009), tarım endüstrisi atıklarından *Kluyveromyces* suşları ile inülinaz üretimini araştırmışlar, başlangıç olarak, 10 suşun yapay ortamda test edildiği ve tarım endüstrisi atıkları ve maya ekstraktı içeren ortamda daha iyi gelişme gösterdiği belirtilmiştir. Optimize koşullarda, elde edilen maksimum inülinaz aktivitesi *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587 ve *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 suşları için sırası ile 735 ± 26 ve 722 ± 54 U m/L olarak saptanmış ve buna bağlı olarak inülinaz üretimi için tarım endüstrisi atıklarının uygun olduğu bildirilmiştir. Mazutti vd. (2010), *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 ile substrat olarak tarımsal atıkları kullanarak katı faz ve daldırma fermentasyon yöntemi ile inülinaz üretimini araştırmışlardır. Daldırma yöntemi ile elde edilen enzimin

aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 4.5 ve 55 °C; katı fermentasyonla üretilen enzim için optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla, 5.0 ve 55 °C olduğu bildirilmiş, her iki enziminde yüksek termal stabilite gösterdiği belirtilmiştir.

2.4.4 İnülinazların kullanım alanları

İnülinin enzimatik hidrolizi sonucu az miktarda glikoz içeren fruktoz olduğu saptanmıştır (Vijayaraghavan vd. 2009). İnülinazla inülin hidrolizi ultra yüksek fruktoz şurubu üretiminde ve etanol veya aseton-butanol üretiminde önemli olduğu belirtilmiştir. İnülinin fruktoza kimyasal yolla hidrolizinin istenmeyen renk değişimleri, tat ve aromadaki değişiklikler gibi bazı dezavantajlarının olduğu, ayrıca yaklaşık olarak % 5 oranında da hiç tatlandırıcı özelliği bulunmayan difuktoz anhidritin üretilmesine neden olduğu bildirilmiştir (Pandey vd. 1999). İnülinde veya inülince zengin materyallerden fruktoz şurubu üretiminin inülinaz uygulamalarının en önemli alanlarından biri olduğu belirtilmiştir. Nişastanın fruktoza dönüştürülmesi için α -amilaz, glikoamilaz ve glikoz izomeraz enzimlerinin gerektiği ve elde edilen ürünün yaklaşık % 45 fruktoz içerdiği, bununla birlikte inülinde fruktoz üretiminin tek aşamalı bir işlem olduğu ve bu yöntemle inülinin % 95 gibi yüksek bir verimle fruktoza hidrolize olduğu bildirilmiştir.

Wenling vd. (1999), *Kluyveromyces* sp. Y-85 inülinazını kısmen saflaştırmış ve iyonik polistiren boncuklara adsorbsiyon ve çapraz bağlama yöntemleriyle immobilize etmişlerdir. Yer elması sapından elde edilen % 4.5 fruktan çözeltisinden, immobilize inülinaz ile, 1 saatte 234.9 g indirgen şeker/L maksimum hacimsel verimlilikle % 75 fruktan hidrolizi elde edildiği bildirilmiştir. Hidroliz ürününün % 85 D-fruktoz ve D-glikoz içeren bir karışım olduğu, biyoreaktörün yarı ömrünün ise 32 gün olduğu saptanmıştır.

Yu vd. (2010), rekombinant inülinaz üreten bir *Saccharomyces cerevisiae* ile yer elması inülininden glikoz içermeyen fruktoz şurubu üretimi olasılığını araştırmışlardır. Bu

çalışmada; *Saccharomyces cerevisiae* suşunun fruktoz kullanımının hekzokinaz genlerinin bozulmasıyla engellendiği, inülinaz geninin *Kluyveromyces cicerisporus*'tan alınarak aktarıldığı belirtilmiştir. Rekombinant *Saccharomyces cerevisiae*'nın hücre dışı inülinaz aktivitesinin 96 saat inkübasyon sonucu 31 U/mL'ye ulaştığı; mayanın sadece yer elması yumruları içeren besiyerinde geliştirildiği durumda 24 saat sonra % 0.1 (ağ/h) glikoz içeren fermantasyon ortamında fruktoz veriminin % 9.2 (ağ/h)'ye ulaştığı bildirilmiştir.

Inülinazların etanol üretimi için de kullanılabildikleri; prosesin, genellikle saf inülinaz veya inülinaz üreten bir mikroorganizma ile etanol üreten bir diğer mikroorganizma ile birlikte kullanıldığı ve eş zamanlı fruktoz üretimi ve fermantasyonu işlemlerini içerdiği bildirilmiştir (Pandey vd. 1999). Chang vd. (2008) yer elması suyunun inülinazla muamelesinin ardından *Saccharomyces cerevisiae* ile etanol üretimi ve her iki işlemin bir arada uygulanması ile etanol üretimini araştırmışlardır. En yüksek etanol üretiminin, hidroliz ve fermantasyon işleminin bir arada yürütülerek, 18 ve 24 saatte, 103 ve 179 g/L yer elması suyu ile, 50 g/L ve 82 g/L etanol elde edildiği bildirilmiştir. Yu vd. (2008), inülinaz oluşturan *Kluyveromyces cicerisporus* Y179 suşu ile yer elmasından etanol üretimini araştırmışlardır. Karbonhidratların etanole dönüşüm oranının teorik verimin % 86.9'sı kadar olduğu, fermantasyon sırasında toplam şekerin % 93.6'sının kullanıldığı ve fermantasyon ortamında % 12.3 etanol (v/v) elde edildiği bildirilmiştir. Tuesombat vd. (2007), yer elması inülininin asit ve enzimatik hidrolizi sonrası *Saccharomyces cerevisiae* ile etanol üretimini araştırmışlar, yer elması suyunun teorik verimin yaklaşık % 88'ine ulaşarak etanol üretimi gerçekleştirmişlerdir. Yer elmasının yüksek inülin içeriği yanında, etanol üreten mikroorganizmaların gelişimi ve etanol üretimi için elzem olan mineralleri de içerdiği bildirilmiştir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 İzole Edilen Mikroorganizmaların Kaynağı

Bu çalışmada kullanılan yer elması örnekleri yerel marketlerden sağlanmıştır.

3.2 Besiyeri ve Çözeltiler

3.2.1 Mikroorganizmaların izolasyonu ve gelişiminde kullanılan besiyeri

İnülinaz üreten mikroorganizmaları izole etmek için karbon kaynağı olarak sadece inülin içeren besiyeri kullanılmıştır. Besiyerinin bileşimi (1 L saf su için); 5 g maya özütü (yeast extract); 5 g pepton; 3 g KH_2PO_4 ; 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 mL mineral tuz çözeltisi; 1 mL resazurin; 2 g inülin içermektedir. Katı besiyeri için aynı bileşime % 1 oranında agar eklenmiştir. Besiyerinin pH değerleri 1 N NaOH ve 1 N HCl ile istenilen değere ayarlanmıştır. İzolasyon besiyerinin pH değeri 7.0'a ayarlanmıştır.

Mineral tuz çözeltisinin bileşimi (1 L saf su için); 12.800 g nitrilotriasetik asit; 0.200 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 0.100 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 0.170 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0.100 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0.100 g ZnCl_2 ; 0.020 g CuCl_2 ; 0.10 g H_3BO_3 ; 0.010 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0.026 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 1.000 g NaCl; 0.020 g $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 'dan oluşmaktadır. Öncelikle nitriloasetik asit çözündürülmüş ve pH KOH ile 5.5'e ayarlanmıştır (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Medium 144, http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium144.pdf).

Besiyerleri sterilizasyon öncesi, N_2 atmosferi altında Hungate tüplerine (Bellco Inc.) 7'şer mL dağıtılmış ve tüpler N_2 atmosferi altında kapatıldıktan sonra otoklavda (ALP

Co., Ltd., Model; CL-40M) 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. İnülin, parçalanmasının önlenmesi için 110 °C’de 30 dakika sterilize edilmiş ve besiyerine aseptik koşullarda ilave edilmiştir.

3.2.2 Tampon çözeltiler

Bu çalışmada, enzimin optimum pH değerlerinin saptanmasında kullanılan tampon çözeltilerin bileşimi aşağıda verilmiştir.

- Asetat tampon: 11.55 mL asetik asidin 1000 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanan 0.2 M asetik asit çözeltisi ile 27.2g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ’ın 1000 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanan 0.2 M sodyum asetat çözeltisinin belirli oranlarda karıştırılmasıyla hazırlanmış, pH 4.0 ve 5.0 için bu çözeltilerin karışım oranları Walpole (1914)’e göre belirlenmiştir.

- Na-P tampon: Bu tampon, 10 mM ve pH 6.0, 6.5, 7.0 ve 7.5 olacak şekilde, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ belirli miktarlarda karıştırılarak hazırlanmıştır (<http://home.fuse.net/clymer/buffers/phos2.html>).

- Tris-HCl tampon: 0.2 M tris (hidroksimetil) aminometan çözeltisiyle 0.2 M HCl’nin belirli oranlarda karıştırılarak pH değeri 8.0 ve 9.0 olan tampon çözeltiler hazırlanmıştır.

- Glisin-NaOH tampon: Bu tampon ise 15.01 g glisinin 1000 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanan 0.2 M glisin çözeltisiyle 0.2 M NaOH’in Sorensen (1909)’a göre pH 10.0 ve 11.0 sağlayacak oranlarda karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

3.3 Mikroorganizmanın İzolasyonu ve Muhafazası

Yer elması kabukları 100 mL serum fizyolojik içinde 1 saat bekletilmiş ve bu şekilde hazırlanan örnekler steril besiyerine % 10 (h/h) oranında aşılansmış ve 35 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir. Ayrıca, aynı besiyerine yer elması kabuğu alınarak aynı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kültürler taze besiyerine alınmış, tek koloni izolasyonu için kültürler aynı bileşimdeki katı besiyerine aşılansmış ve anaerobik koşulda geliştirilmişlerdir. Saflaştırma için sıvı besiyerinde geliştirme ve tek koloni izolasyonu 4 kez tekrarlanmış, gelişen kültürler aynı besiyeri içerisinde +4 °C’de saklanmıştır.

3.4 Mikroorganizma Gelişmesinin İzlenmesi

Mikroorganizma gelişmesi 660 nm ışıktaki absorbans ve pH değerlerinin ölçülmesiyle izlenmiştir (Drent vd. 1991). Elde edilen izolat, 33 °C’de 48 saat inkübe edildikten sonra bu taze kültürlerden 100 mL’lik serum şişelerindeki 50 mL’lik besiyerine % 10 (h/h) oranında inoküle edilmiş, 33 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince serum şişesindeki kültürlerden belirli zaman aralıklarında örneklerde, 660 nm ışıktaki optik yoğunluk değerleri spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208) taze besiyerine karşı ölçülmüştür. Örneklerin pH değerleri ise ATC pHmetre (EDT Instrument, GP 353) ile belirlenmiştir. Ölçümlerden elde edilen 660 nm’deki optik yoğunluk ve pH değerlerinin zamana karşı grafiğı çizilerek mikroorganizmanın gelişme eğrisi oluşturulmuştur.

Mikroorganizma gelişmesi sırasında belirli aralıklarla Ependorf tüplerine alınan 1.0 mL’ lik örnekler, 10000 rpm’de (Heraeus Sepatech, Biofuge 15) 10 dakika santrifüjlenerek berrak bir süpernatant elde edilmiş ve bu örneklerde inülinaz aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların zamana karşı grafiğı çizilerek mikroorganizma gelişmesi sırasında inülinaz aktivitesindeki değışim bu yolla belirlenmiştir.

3.5 İnülinaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İnülinaz aktivitesi, enzim etkisi sonucu oluşan indirgen şeker miktarının DNS yöntemi ile belirlenerek saptanmıştır (Kato vd. 1999).

Kullanılan çözeltiler;

DNS (3,5-Dinitrosalisilik asit) çözeltisi (1 L için): 10 g DNS (Sigma D-1510), 10 g NaOH, 1.6 g fenol, 10 mL % 10'luk sodyum sülfid. % 10'luk sodyum sülfid kullanmadan hemen önce çözeltiye eklenmiştir.

Rochelle Tuzu: 400 g Na K tartarat 1 L saf suda çözündürülerek hazırlanmıştır.

İzolatin inülinaz aktivitesinin belirlenmesinde, 0.1 mL süpernatant bir deney tüpüne alınmış ve üzerine 0.9 mL % 2 inülin içeren 10 mM pH 7.0 sodyum fosfat tampon çözeltisi ekledikten sonra 50 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda enzim aktivitesinin durdurulması için deney tüpleri kaynar su banyosunda bekletilmiştir. İndirgen şeker miktarının belirlenmesi için 1 mL örnek üzerine 2 mL DNS çözeltisi eklenerek 90 °C'de 15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tüplere 1 mL Rochelle tuzu eklenip soğutulmuş ve 5 mL saf su ilave edildikten sonra spektrofotometrede 575 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçülmüştür. Sonuçlar, 0.1-1 mg/L konsantrasyon aralığında fruktoz çözeltileri ile hazırlanan kurve yardımıyla mg/L fruktoz olarak hesaplanmıştır.

1 U (ünite) inülinaz aktivitesi; optimal koşullar altında, 1 dakikada 1µmol fruktoz oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.6 Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Çeşitli Faktörlerin Etkisinin Belirlenmesi

3.6.1 Optimum gelişme sıcaklığı ve pH değerinin belirlenmesi

Elde edilen izolatın optimum sıcaklık ve pH değerlerini belirlemek için izolat; pH değeri 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 olan besiyerlerine % 10 (h/h) oranında inoküle edilerek oda sıcaklığı (~24 °C), 30, 33, 35, 37 ve 40 °C’de inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda mikroorganizma gelişmesi ve inülinaz aktivitesi belirlenmiştir.

3.6.2 Farklı karbon kaynaklarında çoğalma ve enzim aktivitesinin belirlenmesi

Mikroorganizma gelişimi ve inülinaz aktivitesi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisini belirleme çalışmasında, bakteri izolatı besiyerinde karbon kaynağı olarak kullanılan inülin yerine % 2 oranında arabinoz, fruktoz, sakkaroz, rafinoz, meliobiyo, galaktoz, glikoz, ksiloz, laktoz, maltoz ve nişasta içeren steril geliştirme besiyerlerine inoküle edilmiş ve 33 °C’de 48 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası kültürlerden alınan örneklerde mikroorganizma gelişmesi ve inülinaz aktivitesi belirlenmiştir.

3.7 İnülinaz Aktivitesi Üzerine Çeşitli Faktörlerin Etkisinin Belirlenmesi

3.7.1 Sıcaklığın etkisi

100 mL’lik serum şişelerinde hazırlanmış 50’şer mL besiyerleri bakteri izolatları ile % 10 oranında inoküle edilip 30 °C’de yeterli süre inkübe edilmesiyle elde edilen taze kültürlerden alınan örnekler 10000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenerek elde edilen kaba enzim sıvıları sıcaklık optimumunun ve termal stabilitenin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmıştır.

3.7.1.1 Optimum sıcaklık değerin belirlenmesi

Mikroorganizmanın gelişme ortamında oluşturduğu inülinazın optimum sıcaklık değerleri 30-90 °C arası sıcaklıklarda enzim aktivitesi ölçülerek saptanmıştır.

3.7.1.2 Enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi

Inülinazın ısı stabilitesi, daha önceki bölümde belirtildiği gibi hazırlanan kaba enzim sıvılarının 60 °C ve 70 °C'deki sıcak su banyosunda 1 saat inkübe edilmesi sırasında belirli zaman aralıklarında (her 15 dakikada bir) örnek alınması ve bu örneklerin aktivitelerinin ölçülmesi ile belirlenmiştir.

3.7.2 Optimum pH değerin belirlenmesi

Inülinazın optimum pH değerlerini belirlemek için 10 mM pH 4.0 ve 5.0 için asetat tamponu; pH 6.0, 6.5, 7.0 ve 7.5 için sodyum fosfat tamponu; pH 8.0 ve 9.0 için tris-HCl tamponu ve pH 10.0; 11.0 için glisin-NaOH tamponu olmak üzere 4 farklı tampon çözelti ile hazırlanmış % 2 inülin çözeltisi substrat olarak kullanılmış ve optimum sıcaklık değerlerinde enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

3.7.3 Metal iyonları ve inhibitörlerin enzim aktivitesine etkisi

Farklı metal iyonlarının inülinaz aktivitesi üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla Ag^{1+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarını içeren çözeltiler kullanılmıştır. Son konsantrasyonları 0.1 mM olacak şekilde, 0.5 mL 20 mM metal çözeltisi ve 0.5 mL enzim çözeltisi, enzimin optimum aktivite sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Metal çözeltisi yerine 0.5 mL saf su içeren kaba enzim sıvısına aynı işlemler uygulanarak tanık olarak kullanılmıştır. Ayrıca EDTA'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi yukarıda anlatıldığı gibi belirlenmiştir.

3.8 Enzimin Hücre İçi veya Hücre Dışı Olup Olmadığının Belirlenmesi

Bakteri izolatının ürettiği enzimin hücredeki yerinin belirlenmesi için 1 mL kültür sıvısı 10000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmış ve örnek üzerine 1 mL 10 mM pH 7.0 olan sodyum fosfat tamponu ilave edilmiş ve tekrar 10000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmış ve kalan çökelti üzerine 1 mL 10 mM pH 7.0 olan sodyum fosfat tamponu ilave edilerek sonikatörde (Sonics Vibrocell) hücre duvarı parçalanmıştır. Bu şekilde hazırlanan hücre içi enzim örneğinde inülinaz aktivitesi belirlenmiştir (Vullo vd. 1991).

3.9 Protein Tayini

Örneklerde protein miktarı saptanmıştır. Protein tayini Lowry’ye göre yapılmıştır (Lowry vd. 1951).

Kullanılan çözeltiler:

Lowry A: % 2 Na_2CO_3 ve 0.1 M NaOH

Lowry B: % 1 CuSO_4

Lowry C: % 2 sodyum potasyum tartarat ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

Lowry stok çözeltisi: 49 ml Lowry A, 0.5 ml Lowry B, 0.5 ml Lowry C’den oluşmaktadır.

Folin ciocalteu çözeltisi: 2N Folin - Ciocalteu reaktantı (Sigma, F-9252) kullanımdan hemen önce demineralize su ile 1:1 oranında seyreltilmiştir.

1 mL Lowry stok çözeltisine, 100 μL örnek eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve sonrasında 100 μL Folin Ciocalteu reaktantı ilave edilerek tekrar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 595 nm’ de optik yoğunluk ölçülmüştür. Protein standart kurvesi, 0.01- 0.1 mg/mL arasında BSA (Bovine Serum Albumin)

içeren çözeltilerle hazırlanmış ve protein miktarı bu kurve yardımıyla mg/mL protein olarak hesaplanmıştır.

3.10 İnülinazın Farklı Şekerler Üzerine Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzimin inülin üzerine olan aktivitesinin belirlenmesindeki gibi hazırlanan örneklerin rafinoz ve sakkaroz üzerine aktiviteleri DNS yöntemiyle belirlenmiştir.

3.11 İzolatın Moleküler Tanımlanması

İzole edilen mikroorganizma taze besiyerine inoküle edilmiş ve 18 saatlik inkübasyon sonrası DNA'sı izole edilmiştir (Nucleospin Tissue, Macherey- Nagel). İzole edilen 16S ribozomal DNA dizini Refgen Biyoteknoloji tarafından analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

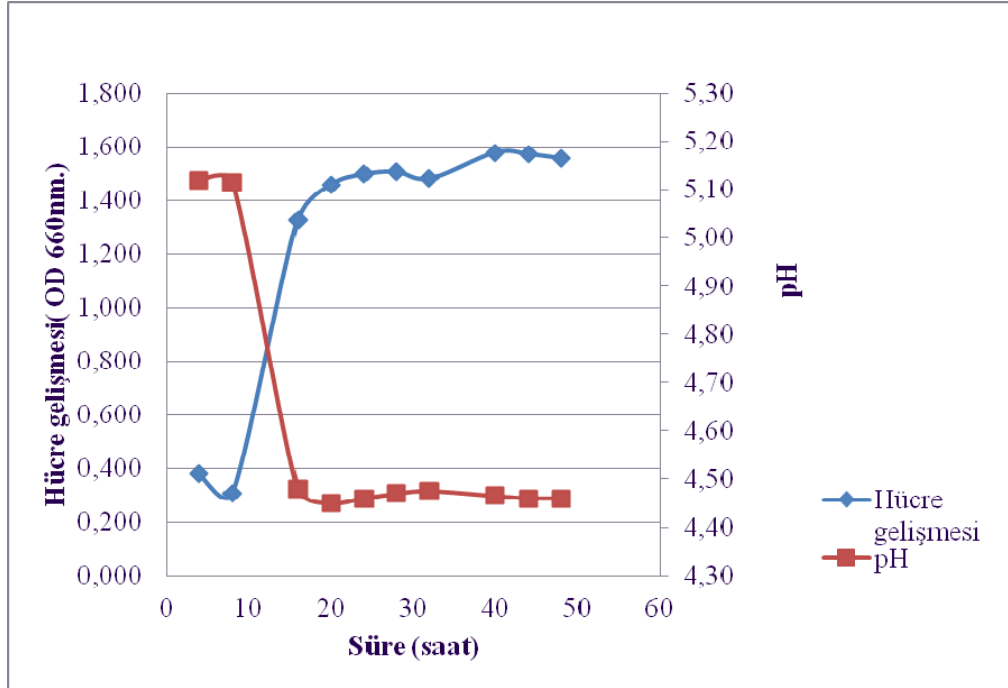
4.1 Mikroorganizmaların İzolasyonu

İnülinaz aktivitesi olan bakterilerin izolasyonu için, karbon ve enerji kaynağı olarak sadece inülin içeren besiyerinde geliştirilen kültürlerde tek koloni izolasyonu yapılmıştır. Sıvı besiyeri ve tek koloni izolasyonu 4 kez tekrar edildikten sonra kültürün saf olduğu kabul edilmiştir. Bakterinin inülinaz aktivitesine sahip olduğunun doğrulanması amacıyla saf kültürde inülinaz aktivitesi saptanmıştır. İzolatın inülinaz aktivitesinin olduğu belirlendikten sonra diğer çalışmalar yapılmış ve izolat YE 2A olarak kodlanmıştır.

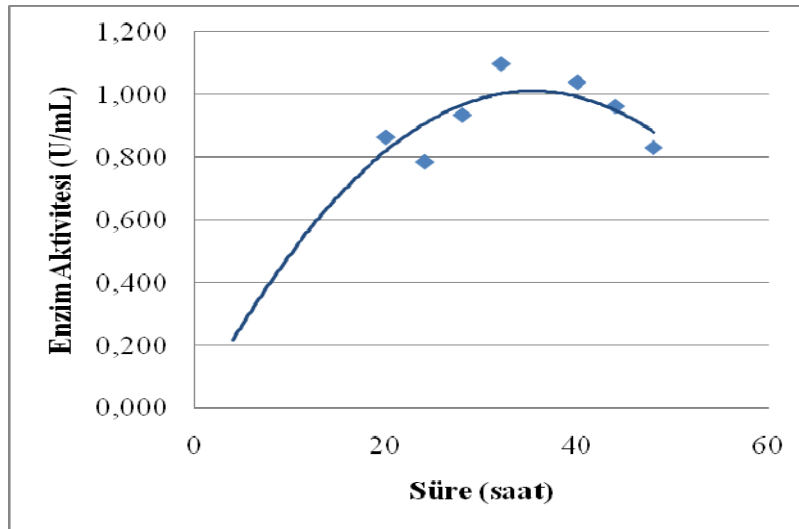
4.2 Mikroorganizma Gelişmesinin İzlenmesi

Mikroorganizma gelişmesi çoğalan örneklerde besiyerinde 660 nm’de optik yoğunluk ve pH ölçümü ile izlenmiştir. Optimum gelişme sıcaklığı ve pH değerinin belirlenmesi çalışmalarından elde edilen sonuçlarda bakterinin optimum inülinaz aktivitesi gösterdiği pH ve sıcaklık sırasıyla 5.0 ve 30 °C olarak belirlenmiştir. Ölçümlerden elde edilen optik yoğunluk ve pH değerlerinin zamana karşı grafiği çizilerek oluşturulan mikroorganizmanın gelişme eğrisi şekil 4.1’de verilmiştir, şekil 4.1’de görüldüğü gibi YE2A izolatı gelişmesini yaklaşık 30 saatte tamamlamıştır. İlk 20 saatte izolat hızla gelişmiş, daha sonra gelişme durağan faza girmiştir. Gelişme sırasında besiyerinin pH değeri ilk 16 saatte 5.12’den 4.5’in altına gerilemiş ve gelişmenin sonuna kadar bu düzeyde kalmıştır.

Mikroorganizma gelişmesi sırasında inülinaz aktivitesindeki değişim grafiği şekil 4.2’de verilmiştir. Şekilden de anlaşılacağı gibi gelişmenin 32. saatinde en yüksek inülinaz aktivitesi saptanmış gelişme ilerlerken inülinaz aktivitesi giderek azalmıştır.



Şekil 4.1 YE 2A kültürünün gelişme eğrisi. Geliştirme besiyerinde optik yoğunluk ve pH değerlerinin zamana göre değişimi



Şekil 4.2 YE 2A kültürünün geliştirme besiyerinde inülinaz aktivitesinin zamana göre değişimi

4.3 Mikroorganizma Gelişimi Üzerine Çeşitli Faktörlerin Etkisi

4.3.1 Optimum gelişme sıcaklığı ve pH değerinin belirlenmesi

Bu amaçla sterilizasyon öncesi pH değeri 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 olan besiyerleri aktif bakteri kültürü ile aşılanmış ve 30, 33, 35, 37 ve 40 ° C’de geliştirilen kültürlerde mikroorganizma gelişmesi ve inülinaz aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre mikroorganizmanın en yüksek inülinaz aktivitesi gösterdiği sıcaklığın 30 °C ve pH’nın 5.0 olduğu anlaşılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda, mikroorganizma saptanan bu değerlerdeki besiyerinde çoğaltılmıştır.

4.3.2 Farklı karbon kaynaklarında çoğalma ve enzim aktivitesinin belirlenmesi

Farklı karbon kaynaklarının çoğalma ve inülinaz aktivitesine etkisi belirlenmiş ve sonuçlar çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1’den de anlaşılabacağı gibi mikroorganizma, laktoz, fruktoz ve sakkaroz içeren ortamda diğerlerine göre daha iyi gelişmektedir. Buna karşın, en yüksek inülinaz aktivitesi besiyerinde maltoz, ksiloz ve laktoz içeren koşullarda saptanmıştır. Nişasta içeren besiyerinde geliştirilen kültürde ise hem mikroorganizma çoğalması hem de inülinaz aktivitesi en düşük değerde bulunmuştur.

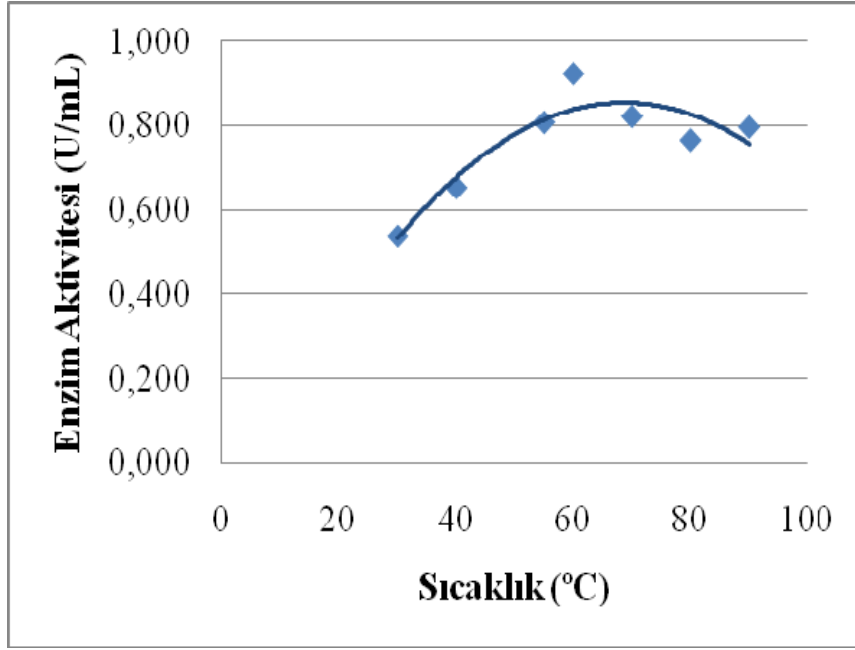
Çizelge 4.1 Farklı karbon kaynakları içeren besiyerlerinde mikroorganizma çoğalması ve inülinaz aktivitesi

Karbon Kaynağı	Hücre Gelişmesi (OD 660 nm)	İnülinaz Aktivitesi (U/mL)
Fruktoz	0,815	0,835
Glikoz	0,785	0,666
Sakkaroz	0,806	0,725
Laktoz	0,832	1,614
Ksiloz	0,726	1,879
Rafinoz	0,683	0,846
Galaktoz	0,593	1,256
Maltoz	0,570	2,136
Meliobiyoz	0,684	0,784
Arabinoz	0,343	0,956
Niştasta	0,298	0,398

4.4 İnülinaz Aktivitesi Üzerine Çeşitli Faktörlerin Etkisinin Belirlenmesi

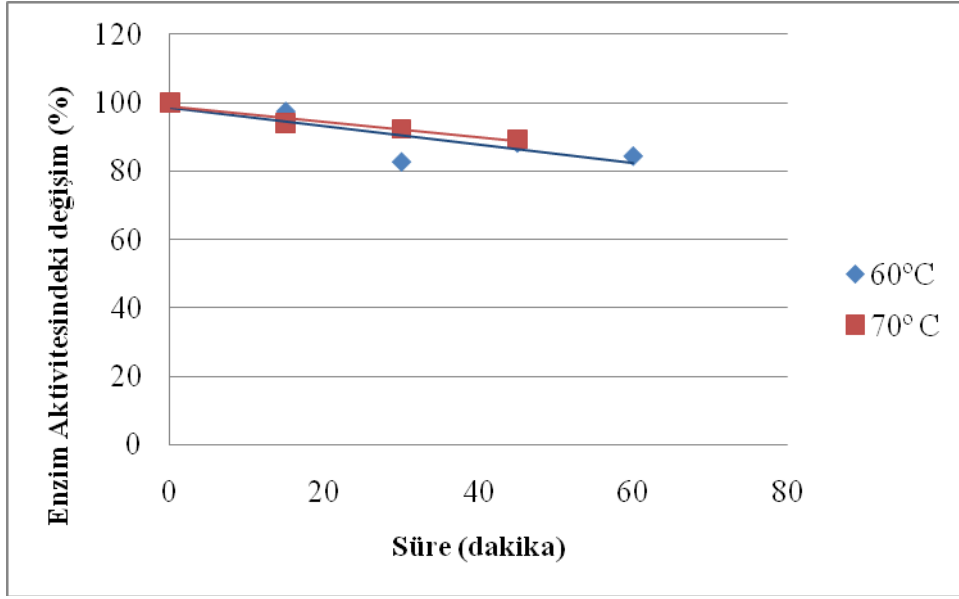
4.4.1 Sıcaklığın etkisi

İnülinazın optimum sıcaklık değeri 30-90 °C arası sıcaklıklarda enzim aktiviteleri ölçülerek saptanmış ve sonuçlar şekil 4.2’de verilmiştir. Buna göre enzimin optimum aktivite sıcaklığın 60 °C olduğu belirlenmiştir. Bu sıcaklıktan daha yüksek sıcaklıklarda enzim aktivitesi giderek azalmıştır.



Şekil 4.3 Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

İnülinazın termal stabilitesi, hazırlanan kaba enzim sıvılarının 60 °C ve 70 °C’deki sıcak su banyosunda inkübe edilmesi sırasında her 15 dakikada alınan örneklerde enzim aktivitelerinin ölçülmesi ile belirlenmiştir. Şekil 4.3’den anlaşılacağı gibi enzim 60 °C’de 1 saat inkübasyon süresinde aktivitesinin % 15’ini kaybetmiştir; benzer şekilde 70 °C’de ise 45 dakika sonra % 11’ini kaybetmiştir.



Şekil 4.4 Su banyosunda bekleme süresine karşılık enzim aktivitesindeki değişim

4.4.2 pH değerinin etkisi

İnülinazın pH optimumu, farklı pH değerlerinde 60 °C’de enzim aktivitesi ölçülerek belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre enzimin optimum çalışma pH’sı 7.0 olarak belirlenmiştir. Enzimin pH 5.0-10.0 arasında aktif olduğu belirlenmiştir. Çalışılan diğer pH değerlerinde enzim aktivite göstermemiştir.

4.4.3 Bazı metal iyonları ve inhibitörlerin enzim aktivitesine etkisi

Farklı metal iyonlarının inülinaz aktivitesi üzerine olan etkisini belirlemek için Ag^{1+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Zn^{2+} çözeltileri ile EDTA, enzim çözeltilerine ilave edilerek inülinaz aktivitesine olan etkileri belirlenmiştir. Elde edilen veriler, çizelge 4.2’de verilmiş ve çizelgeden enzim aktivitesinde, Ag^{1+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ve EDTA’nın olumsuz etkisi, Co^{2+} , Cu^{2+} ve Mn^{2+} çözeltilerinin ise olumlu etkileri olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 4.2 Enzim aktivitesi üzerine çeşitli metallerin ve inhibitörlerin etkisi

Metal	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Enzim Aktivitesindeki Değişim (%)
Ag ¹⁺	1,309	96,5
Cu ²⁺	1,589	117,1
Hg ²⁺	1,143	84,2
Zn ²⁺	1,069	78,8
Fe ²⁺	1,016	74,9
Mg ²⁺	1,120	82,5
Mn ²⁺	3,208	236,4
Co ²⁺	2,802	206,5
Al ³⁺	1,013	74,6
EDTA	0,790	58,2
Kontrol	1,357	100,0

4.5 Enzimin Hücre İçi veya Hücre Dışı Olup Olmadığının Belirlenmesi

Mikroorganizmanın ürettiği enzimin hücredeki yerinin belirlenmesi için yapılan çalışma sonucu, süpernatantta ve hücre içi sıvısında bulunan enzim örneklerinde inülinaz aktivitesi belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, çizelge 4.3’de verilmiş ve bu sonuçlara göre hem hücre dışı hem de sitoplazmada enzim aktivitesi olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 4.3 Sitoplazma ve çoğalma ortamında enzim aktivitesi

Enzimin hücredeki yeri	Enzim Aktivitesi (U/mL)
Süpernatant	1,171
Hücre İçeriği	1,106

4.6 Protein Tayini

Yapılan protein analizi sonucuna göre kültürdeki protein miktarı 3,855 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değere göre enzimin spesifik aktivitesi 0,304 U/mg olarak bulunmuştur.

4.7 İnülinazın Farklı Şekerler Üzerine Aktivitesinin Belirlenmesi

Elde edilen kaba enzim sıvısının sadece inüline aktif olduğu, sakkaroz ve rafinoz üzerine etkili olmadığı belirlenmiş, bu sonuca göre enzimin inülin için spesifik olduğu sonucuna varılmıştır.

4.8 İzole Edilen Mikroorganizmanın Karakterizasyonu

İzole edilen mikroorganizmanın 16S ribozomal DNA analizlerine göre, türü *Clostridium beijerinckii* olduğu saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, bölgesel pazardan sağlanan, yer elmalarının üzerinden, inülinaz aktivitesine sahip, anaerobik, bir mezofilik bakteri izole edilmiş ve izole edilen bakteri *Clostridium beijerinckii* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca bu bakterinin değişik koşullarda çoğalma ve inülinaz aktivitesi araştırılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen izolatın inülinaz aktivitesi gösterdiği, çoğalmanın en yoğun olduğu sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 30 °C ve 5.0 olduğu anlaşılmıştır. Bu sıcaklık ve pH değerinde geliştirilen bakterinin gelişme eğrisine (Şekil 4.1) göre bakterinin gelişimini yaklaşık 30 saatte tamamladığı, ilk 20 saatteki hızlı çoğalma sonrasında durağan faza girdiği anlaşılmıştır. Gelişmenin yaklaşık olarak ilk 20 saatinde pH'nın 5.1'den 4.5'e düştüğü ve gelişimin sonuna kadar yaklaşık bu değerde kaldığı belirlenmiştir. Gelişim sırasında inülinaz aktivitesinin gelişmenin başlangıcından itibaren en yüksek aktiviteye ulaştığı 32. saate kadar arttığı, daha sonra aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *C.acetobutylicum* ABKn8 suşunun inülinaz aktivitesinin maksimum düzeyine gelişmenin durağan fazında ulaştığı belirlenmiştir (Efsthathiou vd. 1986).

İzole edilen *Clostridium* türünün, farklı karbon kaynaklarında gelişimi ve inülinaz aktivitesi üzerindeki çalışmada, inülin yerine % 2 fruktoz, glikoz, sakkaroz, laktoz, ksiloz, rafinoz, galaktoz, maltoz, meliobiyoz, arabinoz veya nişasta kullanılan besiyerlerinde geliştirilmiştir. Bu koşullarda inkübasyon sonunda kültürlerin çoğalmaları ve inülinaz aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler çizelge 4.1'de verilmiştir, bu verilere göre en yüksek bakteri gelişiminin laktozlu besiyerinde çoğalan kültürde olduğu, ancak en yüksek inülinaz aktivitesinin maltoz içeren besiyerinde çoğalan kültürde olduğu saptanmıştır. Ayrıca galaktoz, ksiloz ve laktoz içeren besiyerinde geliştirilen bakterinin inülinaz aktivitelerinin diğer karbon kaynaklarından daha yüksek olduğu belirlenmiş, buna karşın göre nişasta, glikoz, sakaroz ve meliobiyozun inülinaz aktivitesini baskıladığı saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada, Drent vd. (1991), inülinaz aktivitesine sahip bir *Clostridium thermosuccinogenes* izole etmişler ve bu bakterinin

glikoz, fruktoz, galaktoz, maltoz, laktoz, sakkaroz, riboz, rafinoz, ksiloz, sellobiyoz, ve nişastada gelişebildiğini belirlemişlerdir, ancak bu karbon kaynaklarında geliştirilen bakterinin inülinaz aktivitesi hakkında bilgi verilmemiştir. Allais vd. (1987) ise, izole ettikleri LCB41 suşunun glikoz, fruktoz, sakkaroz ve inülinde çoğalma özelliklerinin hemen hemen aynı olduğunu belirlemişlerdir. Buna karşın, fruktoz (7 U/L), sakkaroz (21 U/L) ve glikozda (55 U/L) geliştirilen kültürlerin inülinaz aktivitesinin, inülinde (195 U/L) geliştirilen kültüre göre daha az olduğunu belirlenmişlerdir. Bu çalışmada; karışık karbon kaynakları da inülin+fruktoz (73 U/L), inülin+glikoz (137 U/L) ve inülin+sakkaroz (107 U/L) araştırılmış ve sadece fruktoz, glikoz ve sakkarozda gelişen kültürlerle göre yüksek ancak sadece inülinde geliştirilen kültürlerle göre daha düşük inülinaz aktivitesi saptanmıştır. Bazı *Clostridium acetobutylicum* inülinazlarının, inülin ile indüklenirken ksiloz, fruktoz veya sakkarozla indüklenmediği, ayrıca glikozla baskılandığı belirtilmiştir (Efsthathiou vd. 1986).

Bu çalışmada izole edilen *C.beijerinckii* inülinazının, optimum sıcaklık değerinin 60 °C olduğu belirlenmiştir. Enzimin termal stabilitesi üzerindeki çalışmalarda 60 °C 1 saat inkübe edilen kaba enzim ekstraktında, aktivitesinin % 85'ini koruduğu, 70 °C'de ise 45 dakika inkübasyon sonunda aktivitenin % 89'unu koruduğu belirlenmiştir. İzolatın inülinaz aktivitesinin optimum sıcaklığının göreceli olarak yüksek olduğu belirlenmiştir. Efsthathiou vd. (1986), *C.acetobutylicum* inülinazının 35-47 °C arasında aktif olduğunu ancak 10 dakika inkübasyon sonrası 47-55 °C arasında aktivitesini kaybettiğini belirlemişlerdir. Drent vd. (1991), *C.thermosuccinogenes* inülinazının 58 °C'de maksimum aktivite gösterdiğini, 60 °C'ye kadar enzim aktivitesinin stabil olduğunu, ancak daha yüksek sıcaklıklarda aktivitenin hızla kaybedildiğini bildirmişlerdir. Vullo vd. (1991), *Bacillus subtilis* 430 A inülinazının 50-55 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda aktivite göstermediğini, 45-50 °C'de 7 saat inkübasyon sonucunda aktivitenin % 20'sini kaybettiğini bildirmişlerdir.

Bazı küf ve maya inülinazları ile yapılan çalışmalarda ise, *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 ekzo ve endo-inülinazlarının optimum sıcaklıklarının yaklaşık 45 °C olduğu; 80 °C'de 1 saat inkübasyon sonrası enzimlerin tamamen denatüre olduğu bildirilmiştir (Chen vd.

2009). Ayrıca, 60 °C’de 1 saat inkübasyon sonunda inülinaz aktivitesinin sadece % 40’nın korunduğunu bildirmişlerdir. Sharma ve Gill (2007), *Streptomyces* sp.’nin inülinaz aktivitesinin optimum sıcaklığının 70 °C olduğunu, bu sıcaklıkta 6 saat inkübasyon sonrasında bile aktivitenin hemen hemen etkilenmediğini, 72 saat sonra aktivitenin % 20’nin korunduğunu ancak 80 °C’de 3 saat inkübasyon sonrası inülinaz aktivitesinin % 50’nin kaybedildiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada *C.beijerinckii* izolatının inülinazının optimum pH değerinin 7.0 olduğu belirlenmiştir. Daha asidik ve bazik koşullarda enzim aktivitesinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda Drent vd. (1986) *C.thermosuccinogenes* inülinazının optimum pH değerini 6.8 olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada elde edilen pH ve sıcaklık değeri *C.thermosuccinogenes* inülinazı ile yapılan çalışmalara benzer değerler göstermektedir (Drent vd. 1986). Ancak, *C.acetobutylicum* inülinazının optimum pH değerinin 4.6 olduğu bildirilmiştir (Efsthathiou vd. 1986). Chen vd. (2009), *A.ficum* JNSP5-06 ekzo- ve endo- inülinazlarının optimum pH değerlerinin sırasıyla 4.5 ve 5.0 olduğunu bildirmişlerdir. Sharma ve Gill (2007) ise bir *Streptomyces* sp. inülinazının optimum pH değerinin 6.0 olduğunu bildirmişlerdir.

Inülinaz aktivitesi üzerine çeşitli metallerin etkisinin belirlendiği çalışmada elde edilen sonuçlar çizelge 4.2’de verilmiştir. Çizelgeden de anlaşılacağı gibi Ag^{1+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} ve EDTA’nın aktivitede azalmaya neden olduğu, ancak Cu^{2+} , Co^{2+} ve Mn^{2+} iyonlarının inülinaz aktivitesini stimüle ettiği saptanmıştır. Enzim aktivitesinde en fazla azalmaya Al^{3+} ’nin neden olduğu, en fazla artışı ise Mn^{2+} ’nin sağladığı belirlenmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalarda Chen vd. (2009), *A.ficum* JNSP5-06 ekzo- ve endo-inülinazlarının Ag^{1+} ile tamamen, Al^{3+} ve Fe^{2+} ile önemli ölçüde, Mn^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} ile çok az inhibe olurken, Mg^{2+} ile aktivitenin çok az arttığını belirlemişlerdir. EDTA’nın enzim aktivitesini etkilemediğini bildirmişlerdir. Sharma ve Gill (2007), *Streptomyces* sp. inülinazının Hg^{2+} ile önemli şekilde etkilendiğini, Hg^{2+} iyonunun protein yapısındaki –SH gruplarını tamamen bozduğunu ve bu iyonun enzim üzerindeki büyük etkisinin enzimin yapısında –SH grupları bulunmasına işaret ettiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, Co^{2+} ile aktivitenin olumlu etkilendiği, ancak Ag^{1+} ile

inhibe olduğu belirlenmiştir. EDTA'nın inülinazı çok güçlü inhibe ettiği, metal şelat ajanı olan EDTA'nın aktivite üzerindeki bu etkisinin enzim aktivitesi için metal gereksinimini gösterebileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada elde edilen inülinazın aktivitesinin en fazla EDTA ile inhibe olması enzimin çalışması için metal gereksinimi olduğunu göstermekte olabileceği düşünölmektedir.

Bu tez çalışmasında, araştırılan enzimin hücre içindeki yerinin belirlenmesi için süpernatantta ve hücre içeriğinde enzim aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre enzimin hem hücre içi hem de hücre dışı inülinaz aktivitelerinin birbirine benzer düzeyde olduğu belirlenmiştir. Kato vd. (1999), *B. stearothermophilus* KP 1289 suşunun költür çoğalmasının ilk 15 saati sonrasında, hücre parçalanmasının başladığını inülinaz aktivitesinin gelişme fazı süresince hücreye bağlı olduğunu bildirmiştir. Vullo vd. (1991) ise, *B. subtilis* 430 A suşunun inülinaz aktivitesinin çoğunlukla költür ortamında olduğunu, toplam aktivitenin % 70'inin süpernatantta olduğunu bildirmiştir. Diğer bir çalışmada izole edilen bir *C.acetobutylicum* suşunun toplam inülinaz aktivitesinin % 90'ının költür ortamında bulunduğu belirlenmiştir (Efsthathiou vd. 1986).

İnülinazın sakkaroz ve arabinoz üzerine aktivitesi araştırılmış ancak her ikisi üzerinde de aktivite göstermediği belirlenmiştir. Bu enzimin inülin üzerine spesifitesini göstermektedir. Araştırılan diğer mikroorganizma inülinazlarına bakıldığında inülinaz aktivitesinin yanında invertaz aktivitesinin de bulunduğu ancak bitki kökenli inülinazların inüline daha spesifik oldukları bildirilmiştir (Ertan ve Ekinci 2002). Ancak bu çalışmada izole edilen *C.beijerinckii*, inülinazının inüline spesifik olduğu saptanmıştır. Efsthathiou vd. (1986), *Clostridium acetobutylicum* inülinazının inülin, sakkaroz ve rafinoz üzerine etkili iken melezitoz üzerine aktif olmadığını bildirmişlerdir. Ancak inülinazın inülin için bilinen diğer inülinazlardan daha yüksek affiniteye sahip olduğu belirtilmiştir.

6. SONUÇ

Bu çalışma kapsamında izole edilerek, tanımlanan, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium* cinsi, zorunlu anaerobik, mezofilik, gram pozitif, çubuk şeklinde, peritriş flagellaya sahip olan, hareketli bir bakteridir. Dışkı ve topraktan izole edilen bu bakterinin oval subterminal sporlar ürettiği bildirilmiştir (Ezeji vd. 2004). Hücre morfolojisinin çoğalma sırasında değiştiği, erken logaritmik fazda iken hücrelerin uzun, filamentli ve çok hareketli oldukları, kültür duraklama fazına ulaştığında hücrelerin kısaldığı, genişlediği ve hareketinin azaldığı belirtilmiştir (Ezeji vd. 2004). *C.beijerinckii*'nin karbonhidrat içeren ortamlarda aseton, butanol ve az miktarda etanol oluşturduğu bildirilmiştir (Wilkinson ve Young 1995). Basit ve ucuz besiyerlerinde gelişebilmesi, suş dejenerasyonuna stabil olması, sürekli prosese uyum ve logaritmik gelişme fazında yukarıda belirtilen solventleri oluşturması bu bakterinin endüstriyel boyutta ABE (aseton, butanol, etanol) üretimi için uygun olması bu bakterinin avantajları arasında sayılmıştır (<http://genome.jgi-psf.org/clobe/clobe.home.html>).

Çalışmamız sonucunda inülinaz aktivitesine sahip olan *C.beijerinckii* yer elmasından izole edilmiş ve bu bakterinin ürettiği inülinazın bazı özellikleri araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre *C.beijerinckii* inülinazının inüline spesifik, optimum pH ve sıcaklık değerleri 7.0 ve 60 °C olduğu belirlenmiştir. Termofilik ve anaerobik mikroorganizmaların biyoteknolojik proseslerde faydalı oldukları bildirilmiştir (Drent vd. 1991). İnülinin düşük sıcaklıklarda çözünürlüğünün az olmasının prosesi sınırlayıcı bir faktör olduğu, yüksek sıcaklıklarda çalışan inülinazların bu açıdan daha avantajlı oldukları belirtilmiştir. Bu çalışmada elde edilen inülinazın 60 °C'de aktif olması inülin hidrolizini içeren proseslerinde avantaj sağlayabileceği; ayrıca, yer elması gibi inülin kaynaklarından ile aseton, bütanol ve etanol üretimi için bu bakterinin kullanımı olasılığının araştırma konusu olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Allais, J. J., Hoyos-Lopez, G., Kammoun, S. and Baratti, J. C. 1987. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacterial Strains with Inulinase Activity. *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 53, No. 5; pp. 942-945.
- Allais, J. J., Kammoun, S., Blanc, P., Girard, C. and Baratti, J. C. 1986. Isolation and Characterization of Bacterial Strains with Inulinase Activity. *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 52, No. 5; pp. 1086-1090.
- Chen, H. Q., Chen, X. M., Li, Y., Wang, J., Jin, Z. Y., Xu, X. M., Zhao, J. W., Chen, T. X. and Xie, Z. J. 2009. Purification and characterisation of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06. *Food Chemistry*, 115; pp. 1206–1212.
- D'Egidio, M.G., Cecchini, C., Cervigni, T., Donini, B. and Pignatelli, V. 1998. Production of fructose from cereal stems and polyannual cultures of Jerusalem artichoke. *Industrial Crops and Products*, 7; pp. 113–119.
- Drent, W. J., Lahpor, G. A., Wiegant, W. M. and Gottschal, J. C. 1991. Fermentation of Inulin by *Clostridium thermosuccinogenes* sp. nov., a Thermophilic Anaerobic Bacterium Isolated from Various Habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 57, No. 2; pp. 455-462.
- Efstathiou, I., Reysset, G. and Truffaut, N. 1986. A study of inulinase activity in the *Clostridium acetobutylicum* strain ABKn8. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25; pp. 143-149.
- Ertan, F. ve Ekinçi, F. 2002. The production of inulinases from *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* and *Trichoderma harzianum*. *Journal of Marmara for Pure and Applied Sciences*, 18; pp. 7-15.
- Ezeji, T. C., Qureshmi, N. and Bleschek, H. P. 2004. Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations. *The Chemical Record*, Volume 4, Issue 5; pp. 305-314.
- Franck, A. 2006. Inulin. *Food Polysaccharides and Their Applications*, 752, CRC Press.
- Franck, A. and De Leenheer, L. 2005. Inulin. *Biopolymers*, pp. 441-473, Wiley-VCH.
- Kato, K., Araki, T., Kitamura, T., Morita, N. and Mouri, M. 1999. Purification and Properties of a Thermostable Inulinase (β -D-Fructan Fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289. *Starch/Stärke*, 51, Nr. 7; pp. 253–258.
- Looten, P., Blanchet, D. and Vandecasteele, J. P. 1987. The fl-fructofuranosidase activities of a strain of *Clostridium acetobutylicum* grown on inulin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25; pp. 419-425.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193; pp. 265-275.
- Makino, Y., Treichel, H., Mazutti, M. A., Maugeria, F. and Rodrigues, M. I. 2009. Inulinase bio-production using agroindustrial residues: screening of microorganisms and process parameters optimization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84; pp. 1056–1062.
- Mazutti, M. A., Corazza, M. L., Filho, F. M., Rodrigues, M. I., Corazza, F. C. and Treichel, H. 2008. Inulinase production in a batch bioreactor using agroindustrial residues as the substrate: experimental data and modeling. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Volume 32, Number 1; pp. 85-95.
- Mazutti, M.A., Skrowonski, A., Boni, G., Zobot, G.L., Silva, M.F., de Oliveira, D., Di Luccio, M., Filho, F.M., Rodrigues, M.I. and Treichel, H. 2010. Partial characterization of inulinases obtained by submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates: a comparative study. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160 (3); pp. 682-93.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Selvakumar, P., Soccol, V. T., Krieger, N. and Fontana, J. D. 1999. Recent Developments in Microbial Inulinases Its Production, Properties, and Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volume 81; pp. 35-52.
- Ricca, E., Calabro, V., Curcio, S. and Iorio, G. 2009. Fructose production by chicory inulin enzymatic hydrolysis: A kinetic study and reaction mechanism. *Process Biochemistry*, 44; pp. 466–470.
- Roberfroid, M. 2005. Inulin: origin, chemistry, biochemistry, and technological properties. *Inulin type fructans: functional food ingredients*, 392, CRC Press.
- Sharma, A. D. and Gill, P. K. 2007. Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp. *Journal of Food Engineering*, 79; pp. 1172–1178.
- Sirisansaneeyakul, S., Worawuthiyanan, N., Vanichsriratana, W., Srinophakun, P. and Chisti, Y. 2007. Production of fructose from inulin using mixed inulinases from *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23; pp. 543–552.
- Sørensen, S. P. L. 1909. Enzymstudien. II: Mitteilung. Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen. *Biochemische Zeitschrift*, 21; pp. 131–304.

- Söğüt, T., Öztürk, F. ve Temiz, M. G. 2005. Güneydoğu anadolu bölgesi koşullarında yerelması (*Helianthus tuberosus* L.) üretim olanakları. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, 5-9 Eylül 2005, Antalya (Araştırma Sunusu Cilt I; s. 563-567)
- Uzunova, K., Vassileva, A., Ivanova, V., Spasova, D. and Tonkova, A. 2002. Thermostable exo-inulinase production by semicontinuous cultivation of membrane-immobilized *Bacillus* sp. 11 cells. Process Biochemistry, 37; pp. 863–868.
- Thuesombat, P., Thanonkeo, P., Laopaiboon, L., Laopaiboon, P., Yunchalard, S., Kaewkannetra, P. and Thanonkeo, S. 2007. The batch ethanol fermentation of jerusalem artichoke using *Saccharomyces cerevisiae*. KMITL Science and Technology Journal, Vol. 7, No.S2; pp. 93-96.
- Vijayaraghavan, K., Yamini, D., Ambika, V. and Sowdamini, N. S. 2009. Trends in inulinase production - a review. Critical Reviews in Biotechnology, 29:1; pp. 67- 77.
- Vullo, D. V., Coto, C. E. and Sineriz F. 1991. Characteristics of an Inulinase Produced by *Bacillus subtilis* 430A, a Strain Isolated from the Rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby). Applied And Environmental Microbiology, Vol. 57, No. 8; pp. 2392-2394.
- Walpole, G., S. 1914. Hydrogen potentials of mixtures of acetic acid and sodium acetate. Journal of Chemistry, SOC1. 05, 2501.
- Wenling, W., Huiying, W. W. L. and Shiyuan, W. 1999. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp. Y-85. Process Biochemistry, 34; pp. 643–646.
- Wilkinson, S. R. and Young, M. 1995. Physical Map of the *Clostridium beijerinckii* (Formerly *Clostridium acetobutylicum*) NCIMB 8052 Chromosome. Journal of Bacteriology, Vol. 177, No. 2; pp. 439–448.
- Yu, J., Jiang, J., Ji W., Li Y. and Liu J. 2011. Glucose-free fructose production from Jerusalem artichoke using a recombinant inulinase-secreting *Saccharomyces cerevisiae* strain. Biotechnology Letters, 33 (1); pp. 147-52.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Neslihan ATLIHAN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 1981

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Prof. Dr. Şevket Raşit Hatipoğlu Lisesi (1999)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2004)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği
Anabilim Dalı (Eylül 2008- Nisan 2011)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı İstanbul İl Müdürlüğü 2004-2007

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Müdürlüğü 2007 –