

## İnülinaz Üretimi İçin Fermantasyon Parametrelerinin İstatistiksel Yaklaşımla Optimizasyonu

Sercan ÖZBEK YAZICI<sup>1\*</sup>, Selmihan ŞAHİN<sup>2</sup>

**ÖZET:** Çalışmanın amacı katı faz fermantasyonunda yeni bir fungus izolatu olan *Rhizopus oryzae* HBF351'dan aktivitesi yüksek ve düşük maliyetli inülinaz üretiminin gerçekleştirilmesidir. Bunun için ilk olarak yüksek enzim üretimini destekleyen en iyi substratın belirlenmesi ve fermantasyon ortamını etkileyen bazı parametrelerin istatistiksel bir yaklaşımla optimize edilmesi hedeflenmiştir. Maksimum enzim üretimini destekleyen en iyi ortamı bulmak için 5 farklı substrat (buğday kepeği, yulaf kepeği, soğan kabuğu, elma posası ve marul kökü tozu) araştırılmıştır. İnülinaz üretimi için bazı fermantasyon koşullarını (başlangıç pH (4-7), inkübasyon sıcaklığı (25°C-45°C), başlangıç nem seviyesi (%50-100) ve inkübasyon süresi (3-7 gün)) optimize etmek amacıyla Box-Behnken tasarımı (BBD) kullanılmıştır. Çalışmada buğday kepeğinin enzim aktivitesini destekleyen en iyi substrat olduğu bulunmuştur. pH, inkübasyon sıcaklığı, nem seviyesi ve inkübasyon süresinin enzim üretimi üzerinde oldukça etkili parametreler olduğu gösterilmiştir (p<0.0001). Çalışmada modelin uygunluğu R<sup>2</sup> (regresyon katsayısı) (0.99) kullanılarak değerlendirilmiştir ve deneysel ve tahmin edilen sonuçlar arasındaki iyi korelasyon elde edilmiştir. Maksimum inülinaz aktivitesini (385.1 IU gds<sup>-1</sup>) sağlayan optimum koşullar pH 5.18, 33.4 °C, % 72.1 nem seviyesi ve 4.7 gün olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, bu çalışma *Rhizopus oryzae*'den inülinaz üretmek için uygun maliyetli bir yöntem sunmaktadır. Ayrıca, yüksek enzim aktivitesi elde edilen inülinazı, fruktoz şurubu ve diğer endüstriyel alanlarda kullanım için güçlü bir potansiyel aday yapmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** İnülinaz, Box-Behnken Tasarımı, Katı Faz Fermantasyonu, Optimizasyon

### Optimization of Fermentation Parameters for Inulinase Production by Statistical Approach

**ABSTRACT:** The aim of the study was to carry out high-activity and low-cost inulinase production from *Rhizopus oryzae* HBF351, a new fungal strain, in solid phase fermentation. For this, it was firstly aimed to determine the best substrate that supports high enzyme production and to optimize some parameters that affect the fermentation condition by a statistical approach. Five different substrates (wheat bran, oat bran, onion peel, apple pulp and lettuce root powder) were investigated to find the best substrat supporting maximum enzyme productions. Box–Behnken design (BBD) was employed to optimize fermentation conditions (initial pH (4-7), incubation temperature (25°C-45°C), initial moisture level (50-100%) and incubation time(3-7 days)) for the production of inulinase. In the study, wheat bran was the best substrate that supports enzyme activity. pH, incubation temperature, moisture level and incubation time have been shown to be highly effective parameters on enzyme production (p <0.0001). In the study, the fitness of the model was evaluated using R<sup>2</sup> (regression coefficient) (0.99) and a good correlation were obtained between experimental and predicted results. Optimum conditions providing maximum inulinase activity (385.1 IU gds<sup>-1</sup>) were found as pH 5.18, 33.4 °C, 72.1 % moisture level and 4.7 days. As a result, this study provides a cost-effective method to produce inulinase from *Rhizopus oryzae*. Also, it can be suggested that the produced inulinase has strong potential for usage in the production of fructose syrup and other industrial areas due to its high activity.

**Keywords:** Box-Behnken Design, Inulinase, Optimization, Solid Phase Fermentation

<sup>1</sup>Sercan ÖZBEK YAZICI (Orcid ID:0000-0003-3406-4291), Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Burdur, Türkiye

<sup>2</sup>Selmihan ŞAHİN (Orcid ID: 0000-0003-0486-3949), Süleyman Demirel, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Isparta, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Sercan ÖZBEK YAZICI, e-mail: sozbekyazici@hotmail.com

## GİRİŞ

İnülin, sükroz birimi ile sonlandırılmış  $\beta$  (2→1) fruktosil-fruktoz birimleri içeren bir fruktandır (Rawat ve ark., 2017). Yer elması, hindiba, pırasa, sarımsak ve dulavratotu gibi birçok bitkinin kök ve yumrularında bulunur ve ayrıca nişastadan sonra bitkilerde bulunan en yaygın ikinci polisakkarittir (Rodrigues ve ark., 2017; Singh ve Singh, 2017). İnülin açısından zengin bitkiler son zamanlarda, fruktoz şurubu, etanol fermantasyonu ve inulooligosakkarit üretimi için yenilenebilir bir hammadde olarak önem kazanmıştır (Karatop ve Sanal, 2013; El Atı ve ark., 2014; Ilgın ve ark., 2019).

İnülinazlar (EC 3.2.1.80 ve 3.2.1.7), karbonhidratları hidrolize eden önemli bir enzim grubudur. Hidrolitik etkilerine göre endo ve ekzoinülinaz olarak iki ana gruba ayrılırlar. Ekzoinülinazlar, inülinin terminal fruktoz birimine etki ederek % 95'in üzerinde D-fruktoz içeriğine sahip yüksek fruktoz şurupları üretirken, endoinülinazlar oligofruktoz şurupları üretmek için  $\beta$ -2,1 glikozidik inülin bağlarının hidrolizini gerçekleştirir (Singh ve Singh, 2017). İnülinazlar endüstriyel olarak önemli enzimlerdir ve yüksek fruktoz şuruplarının yanı sıra etanol, inülin oligosakkaritler, pullulan, sorbitol, glukonik asit, laktik asit ve sitrik asit üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Ilgın ve ark., 2019). Özellikle fruktoz, inülinin asit hidrolizi veya nişastanın enzimatik hidrolizi ile de üretilebilir, ancak her iki yöntem de pahalıdır ve fruktoz verimi % 45'tir (Singh ve Singh, 2017).

Bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan inülinaz elde edilebilmektedir. Bitkilerden ve hayvanlardan inülinaz verimi çok azdır ve endüstriyel uygulamalar için kullanılamaz. Mikroorganizmalardan inülinaz üretimi, kontrollü koşullar altında kolay ve yüksek ürün verimi sağlanması bitki ve hayvan kaynaklarına göre daha avantajlıdır. Son yıllarda, inülinaz üretimi için güçlü mikrobiyal kaynaklar bulmak için çalışmalar yapılmaktadır (Singh ve Chauhan, 2018). *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* ve *Kluyveromyces* gibi mikroorganizmaların önemli inülinaz üreticileri olduğu bildirilmiştir (Mohamed ve ark., 2015). Bununla birlikte, son zamanlarda termostabilite, düşük maliyetli substratlarda büyüme ve hem ekso- hem de endoinülinazların sinerjistik etkisi gibi avantajları yüzünden fungal izolatlar diğer mikrobiyal kaynaklara göre daha fazla dikkat çekmektedir (Singh ve Chauhan, 2018).

Şimdiye kadar, inülinazlar sıvı ve katı hal fermantasyonu ile mikroorganizmalar tarafından üretilmiştir (Mohamed ve ark., 2015). Katı faz fermantasyonunda enzim üretimi, daha yüksek hacimsel üretkenlik, daha az su kullanımı ve kontaminasyon ve atık su üretiminin daha kolay kontrolü gibi avantajlarının yanında hammaddelerin ucuz substratlar olarak kullanılabilmesi nedeniyle daha fazla dikkat çekmektedir (Krishna, 2005; Kalaiyarasi ve ark., 2017). Ayrıca, katı faz fermantasyonunda prosesinin doğal çevreyi taklit ettiği ve üretim için mikroorganizmaları desteklediği düşünülmektedir (Singh ve Bajaj, 2016). Doğal tarım ürünleri, tarımsal endüstriyel atıklar ve yan ürünler katı faz fermantasyonunda yaygın olarak kullanılan substratlardır. Doğada, protein, polisakkaritler ve lignin gibi ana organik malzemeler polimeriktir ve mikroorganizmalar tarafından bir enerji kaynağı olarak kullanılabilir. Katı faz fermantasyonundaki katı substratlar, mikroorganizmanın genel beslenme gereksinimlerinden daha zengin ve daha kompleks gıda kaynakları sağlar (Pandey ve ark., 1999). İnülinazların üretimi için de buğday kepeği, yer elması, şeker kamışı melası, dahlia yumru ekstresi, karahindiba kökleri, muz kabuğu, pirinç kabuğu, enginar yaprakları, soya kepeği, soğan kabuğu ve sarımsak kabuğu gibi düşük maliyetli substratlar kullanılarak başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Germec ve Turhan, 2019).

Enzim üretiminin artırılması için fermantasyon ortamının seçimi kadar ortamın optimizasyonu da önemli diğer faktördür. Katı faz fermantasyon ortamında enzimlerin mikrobiyal üretimi, uygun bir substratın seçiminin yanı sıra, ortamın sıcaklığı, pH, nem seviyesi ve inkübasyon süresi gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (Krishna 2005). Fermantasyon ortamını optimize etmek için farklı stratejiler

vardır; bunlar arasında bir kerede bir faktörün (one-factor-at-a-time/OFAT) değiştirilmesi olarak bilinen geleneksel yaklaşım ve deney tasarımı olarak bilinen istatistiksel yaklaşım bulunmaktadır. Geleneksel yaklaşımda sadece bir faktörün değiştirilirken diğer bir faktör sabit tutulur. Bu yöntem faktörler arasındaki etkileşimleri inceleyemez (Abou-Taleb ve Galal, 2018). Bununla birlikte, istatistiksel yaklaşım ise optimizasyonda enzim üretimini etkileyen çeşitli faktörleri ve bunların fermantasyon sürecinde aralarındaki etkileşimlerini minimum sayıda deneyle değerlendirilmesini sağlar (Germec ve ark., 2020).

Enzimin dünya pazarındaki payı yaklaşık yılda bir milyar dolardır. Enzimlerin endüstrideki artan önemine paralel olarak, bu alandaki patentlerin ve araştırmaların miktarı artmıştır. Endüstriyel kullanım alanlarına sahip enzimler için maliyet önemli husustur ve bu nedenle uygun bir katı substratın seçilmesi, etkili katı faz fermantasyon süreçlerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca fermantasyon parametreleri enzimin üretkenliğini ve dolayısıyla üretim maliyetini önemli ölçüde etkileyebilir. Bu nedenle, çalışmanın amacı katı faz fermantasyonunda yeni bir fungus izolatu olan *Rhizopus oryzae* HBF351'dan aktivitesi yüksek ve düşük maliyetli inülinaz üretiminin gerçekleştirilmesidir. Bunun için ilk olarak yüksek enzim üretimini destekleyen en iyi substratın belirlenmesi ve fermantasyon ortamını etkileyen bazı faktörlerin istatistiksel bir yaklaşımla optimize edilmesi hedeflenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Inulin Alfa Aesar'dan, 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır. Deneylede kullanılan diğer kimyasal reaktifler analitik saflıktadır.

Buğday kepeği, yulaf kepeği, marul kökü, elma ve soğan kabuğu yerel bir marketten satın alınmıştır.

### Mikroorganizma

*Rhizopus oryzae* HBF351 izolatu topraktan izole edilmiştir. Fungus izolatu Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tanımlanmıştır. *Rhizopus oryzae* HBF351, inokulum hazırlamak için 4 gün boyunca 40°C'de PDA (Potato Dextrose Agar) üzerinde geliştirilmiştir. İnkübasyondan sonra kültürler 4°C'de saklanmış ve kültürler her hafta taze besi ortamına ekim yapılarak yeniden hazırlanmıştır.

## METOT

### Katı faz fermantasyonu ortamının hazırlanması ve substrat seçimi

Buğday kepeği, yulaf kepeği, dahil 5 farklı organik substrat yerel pazardan temin edilmiştir. SSF için enzim üretimine yardımcı olan potansiyel bir substrat seçmek için, substratlar enzimi üretmek üzere ayrı ayrı incelenmiştir. Elma posası ve marul kökü fırında 50°C'de kurutulmuştur. Daha sonra ince bir toz haline getirilmiş ve substrat olarak kullanılmıştır.

Bu enzimlerin üretimi, 3 gr substrat içeren 100 mL'lik erlenlerde yapılmıştır. Hazırlanan besiyeri ortamı 121 °C' de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir. PDA besiyerlerinin her birine 5 mL steril distile su eklenerek spor süspansiyonu hazırlanmıştır. Spor süspansiyonları mililitrede  $1 \times 10^6$  spor içerecek şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan spor süspansiyonu ile fermantasyon ortamına ekim yapılarak enzim üretimleri gerçekleştirilmiştir.

En iyi enzim üretiminin sağlandığı substratın belirlenmesi için besiyeri, % 75 nem içeriği Na-asetat tampon (pH 5) ile ayarlanarak oda sıcaklığında 5 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, fermantasyon ortamı 20 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüjlenerek hücreler

uzaklaştırılmış ve daha sonraki çalışmalar için süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışmada inülinaz maksimum aktivite verdiği substrat ile çalışmaya devam edilmiştir.

### Enzim Üretimi ve İstatistiksel Optimizasyon

Bu çalışmada, Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi inülinaz üretimi üzerine bazı fermantasyon parametrelerinin etkisinin belirlenmesi ve maksimum inülinaz aktivitesi ve spesifik aktivitesi sağlayan parametrelerinin kombinasyonun belirlenmesi için kullanılmıştır. BBD ile 4 farklı faktörün -1, 0 ve +1 seviyelerinde yanıt yüzey tasarımı oluşturulmuş ve araştırılan her bir faktörün seviyeleri ve kodlanmış değerleri Çizelge 1’de verilmiştir. İnülinaz üretimi için önemli fermantasyon parametlerinden olan başlangıç pH, inkübasyon sıcaklığı, başlangıç nem seviyesi ve inkübasyon süresi bağımsız değişkenler olarak belirlenirken inülinaz aktivitesi bağımlı değişkendir. Bu tasarıma göre, deneysel tasarım yönteminde toplam 29 deney oluşturulmuş ve tekrarlanabilirliğini test etmek için merkez noktası beş kez tekrarlanmıştır. Tüm deneyler üç tekerrür halinde gerçekleştirilmiştir. Deneysel tasarımın gerçekleştirilmesi, katsayıların belirlenmesi, veri analizi ve grafiklerin çizilmesi için Design-Expert V7 deneme sürümü kullanılmıştır. Modele ait eşitlik aşağıdaki gibidir:

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_4D + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 + \beta_{44}D^2 + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{14}AD + \beta_{23}BC + \beta_{24}BD + \beta_{34}CD \quad (1)$$

Eşitlikte Y tahmin edilen yanıt yüzey fonksiyonu (aktivite),  $\beta_0$  bütün bağımsız değişkenlerin etkilerinin sıfır olması durumunda Y’nin aldığı değeri, A, B, C ve D bağımsız değişkenleri göstermektedir;  $\beta_1, \beta_2, \beta_3$  ve  $\beta_4$  doğrusal katsayılar ve  $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$  ve  $\beta_{44}$  ikinci dereceden katsayılar.

İnülinaz üretiminin deney sonuçlarını analiz etmek için ANOVA kullanılmıştır. Modelin elde edilen deneysel veriler ile uygunluğunun değerlendirilmesi amacıyla % 95 güven aralığında F-testi ve uyumsuzluk (Lack of fit) testi uygulanmıştır. Parametrelerin optimizasyon deneylerinden sonra, istatistiksel model tarafından öngörülen optimum fermantasyon koşulların doğrulanması için deneyler yapılmıştır.

**Çizelge 1.** Box-Behnken tasarım ile test edilen faktörlerin düzeyleri

Sembol	Bağımsız değişkenler	Unit	Derecelerin kodlanmamış değerleri		
			-1	0	+1
A	pH		4	5.5	7
B	İnkübasyon sıcaklığı	°C	25	35	45
C	Nem seviyesi	%	50	75	100
D	İnkübasyon süresi	gün	3	5	7

### Enzim ekstraksiyonu ve analizi

Kültür ortamında bulunan enzimi ekstrakte etmek için SSF besiyeri ortamına 10 ml tampon (100 mM Na asetat tamponu, pH 5.0) eklenmiştir. Ortamın 20 dk çalkalanarak bekletildikten sonra filtre edilmiş ve oda sıcaklığında 8000 rpm’de 10 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant enzim aktivite tayini için kullanılmıştır.

İnülinaz aktivitesi, DNS metodu kullanılarak belirlenmiştir (Miller 1959). Çalışmada substrat olarak inülin kullanılmıştır. Enzim analizi için 100 µl enzim çözeltilisi ve 900 µl % 0.5 inulin (100 mM Na asetat tamponu, pH 5.0) karışımı 50°C’de 15 dakika inkübe edilmiştir. Test tüplerine 1.5 ml DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) ilave edildikten sonra karışım 100 °C’de 10 dakika su banyosunda bekletilmiştir. Kontrol tüpleri şekerlerin enzimatik olmayan salınımını kontrol etmek için

hazırlanmıştır; sırasıyla 100 µl numune + 1.5 ml DNS reaktifi + 900 ul substrat olacak şekilde hazırlanmıştır. Kör, enzim çözeltisi yerine tampon kullanılarak hazırlanmıştır. Kontrol örneği ile kör, ilk inkübasyona dâhil edilmemiştir. Absorbans ölçümleri 540 nm'de gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesinin belirlenmesi için ortamda bulunan serbest şeker elimine edilmesi gerekmektedir. Bunun için, kontrol tüpünün absorbans değeri, enzimatik reaksiyonun gerçekleştirildiği test tüplerinin absorbans değerinden çıkartılmıştır böylece enzim tarafından salınan indirgen şekerlerin absorbans değeri hesaplanmıştır (İlgin ve ark., 2019). Elde edilen bu değer fruktoz standart eğrisi kullanılarak enzim aktivitesi belirlenmiştir. Bir ünite inülinaz, dakikada 1 µmol fruktoz salınımını katalize eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim aktivitesi, U/gds (gram kuru substrat) olarak ifade edilmiştir.

### Protein miktarının belirlenmesi

Kantitatif protein miktarı, Bradford yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır (Bradford, 1976).

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Mikroorganizma ve substrat seçimi katı faz fermantasyonunda enzim üretimini etkileyen en önemli faktörlerdir (Soccol ve ark., 2017). Karbon bileşikleri, mikroorganizmalar için enerji kaynaklarıdır (Trivedi ve ark., 2012). Katı faz fermantasyonunda substrat olarak çeşitli organik kaynaklar kullanarak inülinaz üretiminin gerçekleştirildiği çalışmalar vardır (Çizelge 2). İnülin (saf veya ham) inülinaz üretimi için en güçlü substrat ve indükleyici olarak rapor edilmiştir (Singh ve Chauhan, 2017). Bununla birlikte saf inülinin yüksek maliyeti nedeniyle, mikrobiyal inülinaz üretimi için ham ve ucuz substratlar alternatif inülin kaynakları olarak tercih edilmektedir (Trivedi ve ark., 2012).

#### Çizelge 2. Farklı substratlar kullanılarak elde edilen inülinaz aktiviteleri

Substrate	Inulinase activity (U/gds)
Buğday kepeği	167.13±1.45
Yulaf kepeği	91.17±2.13
Soğan kabuğu	11.36±0.98
Marul kökü	9.16±1.67
Elma posası	13.75±1.34

Bu çalışmada, ilk olarak enzim üretimini en iyi destekleyen substrat belirlenmiştir. Bunun için *Rhizopus oryzae* HBF351'den enzim üretimi; buğday kepeği, yulaf kepeği, soğan kabuğu, elma posası ve marul kökü tozu dahil olmak üzere 5 farklı düşük maliyetli substratlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Substratlar arasında buğday kepeği ve yulaf kepeği ile iyi bir verim elde edilmiştir. Bununla birlikte diğer kaynakların (soğan kabuğu, elma posası ve marul kökü) inülinaz üretimi için zayıf indükleyiciler olduğu bulunmuştur (Çizelge 2). Benzer şekilde başka bir çalışmada buğday kepeğinin en yüksek inülinaz üretimini desteklediği bildirilmiştir (Onilude ve ark., 2012). Trivedi ve ark. (2012) ayrıca buğday kepeğinin inülinaz üretimi için sükroz, fruktoz, glikoz ve şeker kamışı posasından daha etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Buğday (*Triticum* sp.) dünyanın en çok üretilen ve en değerli tarım ürünleridir. Bununla birlikte, kepek, buğday tanesinin buğdayın yaklaşık % 15'ini oluşturmaktadır (Germec ve ark., 2019) ve inülin içeriği % 1-4 arasında değişmektedir. Ayrıca mikroorganizmaların büyümeleri için gerekli besin öğelerine sahiptir. İnülinazın yanı sıra, buğday kepeğinin ksilanaz, selülazlar gibi birçok enzimin üretimi için de iyi bir karbon kaynağı olduğu gösterilmiştir (Trivedi ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda da buğday kepeğinin inülinaz üretimi için

iyi bir substrat olduğu doğrulanmıştır. Bu yüzden enzim üretimi optimizasyon çalışmalarında katı faz fermantasyonu için substrat olarak buğday kepeği kullanılmıştır.

**Çizelge 3.** Farklı substrat ve mikroorganizma kullanarak katı faz fermantasyonu ile inülinaz üretimi bulguları

Mikroorganizma	Substrat	Maksimum aktivite	Kaynak
<i>Aspergillus niger</i>	Muz kabuğu	200 IU gds <sup>-1</sup>	Narayanan ve ark. (2013)
	Pirinç kepeği	137.2 IU gds <sup>-1</sup>	
<i>Aspergillus versicolor</i>	Portakal kabuğu (rind)	1.917 IU gds <sup>-1</sup>	Abd El Aty ve ark. (2014)
<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	Pirinç kabuğu (husk)	420.9 IU gds <sup>-1</sup>	Sheng ve ark. (2009)
	Buğday kepeği		
<i>Xanthomonas campestris</i> pv phaseoli	Sarımsak kabuğu	117 IU gds <sup>-1</sup>	Ayyachamy ve ark. (2007)
	Soğan kabuğu	101 IU gds <sup>-1</sup>	
<i>Mucor circinelloides</i>	Elma posası	411.3 IU gds <sup>-1</sup>	Singh ve ark., 2020
<i>Kluyveromyces</i> S120	Buğday kepeği	409.8 IU gds <sup>-1</sup>	Xiong ve ark. (2007)
<i>Kluyveromyces</i> marxianusNRRL Y-7571	Şeker Kamışı Posası	391.9 IU gds <sup>-1</sup>	Mazutti ve ark. (2006)
<i>Penicillium oxalicum</i>	Mısır kepeği	77.95 IU gds <sup>-1</sup>	Singh ve ark. (2018)

Birçok mikroorganizmanın inülinaz ürettiği gösterilmiştir, bunların arasında ipliksi funguslar, maya ve bakteriler bulunmaktadır. Özellikle *Aspergillus* ve *Penicillium* sınıfı en yaygın üreticilerdir (Flores-Gallegos ve ark., 2018). Bununla birlikte *Rhizopus* izolatlarında inülinaz üretimi için de iyi bir aday olduğu bildirilmiştir (Mohamed ve ark., 2015; Karam ve ark., 2018). Çalışmamızda inülinaz üretimi için *Rhizopus oryzae* HBF351 izolatı kullanılmıştır.

Enzimler birçok endüstriyel alanda kullanıma sahip olduğu için ticari önemi öneme sahiptir, bu nedenle düşük maliyetli substratlar kullanarak fermantasyon şartlarının optimize edilmesi enzim üretimini arttırmak ve maliyeti azaltmak için gereklidir. Ortam ve fermantasyon koşullarının kombinasyonu, katı faz fermantasyonunda enzim verimini önemli ölçüde değiştiren bir faktördür (Govarathanan ve ark., 2014). Enzim üretimi çalışmalarında fermantasyon ortamının optimizasyonu için istatistiksel tasarım teknikleri başarıyla kullanılmıştır (Trivedi ve ark., 2012; Singh ve ark., 2018; Singh ve ark., 2020).

Çalışmada, BBD maksimum inülinaz üretimi sağlanan optimum parametre seviyelerini tanımlamak ve bu parametreler ile enzim aktiviteleri arasındaki ilişkileri anlamak için kullanılmıştır. Çalışmada, inkübasyon süresi, sıcaklık, nem ve pH inülinaz üretiminin istatistiksel optimizasyonu için bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. BBD planı ile elde edilen deneysel enzim aktivite ve tahminlenen enzim aktiviteleri Çizelge 4'de verilmiştir. Ayrıca optimizasyonda kullanılacak en uygun modeli bulmak için farklı istatistiksel modeller, yani doğrusal, 2F1, kuadratik ve kübik modeller analiz edilmiştir ve modellerin istatistiksel verileri Çizelge 5'te özetlenmiştir. Model denklemlerin istatistiksel önemi, varyans analizi (ANOVA) ile hesaplanmıştır ve istatistiksel anlamlılıkları ve deneysel hata etkileri % 95 güven aralığında tespit edilmiştir. Çalışmada kuadratik model uygun bir model olarak program tarafından önerilmiştir. İnülinaz üretimi için daha yüksek F değeri (1861.46) ve p değerinin 0.05'ten küçük olması, modelin önemini doğrulamaktadır.

Model yeterliliğini gösteren diğer önemli bir faktörde uyum eksikliği (Lack of fit) değeridir. Bir modelin uyum eksikliği değerinin anlamsız olması (p>0.05) hatanın önemsiz olduğu ve yanıtların regresyon eşitliği ile açıklanabildiğini göstermektedir. Bu bağlamda modelin yeterliliği açısından uyum eksikliğinin istatistiki olarak önemli olmaması yani 0.05'ten büyük olması gerekmektedir.

## İnülinaz Üretimi İçin Fermantasyon Parametrelerinin İstatistiksel Yaklaşımla Optimizasyonu

Çalışmamızda elde edilen veriler sonucu uyum eksikliği değeri anlamsız olarak bulunmuştur ( $p>0.05$ ) ve modelin yeterliliği doğrulanmıştır.

**Çizelge 4.** İnülinaz üretiminin optimizasyonu için Box-Behnken tasarımı ile deneysel ve tahminlenen inülinaz aktiviteleri

No	pH	Inkübasyon sıcaklığı (°C)	Nem seviyesi (%)	Inkübasyon süresi (Days)	Deneysel aktivite (IU gds <sup>-1</sup> )	Tahminlenen aktivite (IU gds <sup>-1</sup> )
1	5.5	45	75	3	40.69	39.31
2	5.5	35	75	5	374.1	377.80
3	7	35	100	5	107.12	110.88
4	4	35	50	5	230.57	221.63
5	5.5	25	75	3	135.63	138.18
6	5.5	35	100	7	106.5	108.06
7	5.5	35	75	5	379.11	377.80
8	5.5	35	75	5	382.5	377.80
9	5.5	25	50	5	164.11	171
10	5.5	35	75	5	374.32	377.80
11	7	45	75	5	47.66	49.55
12	5.5	45	100	5	77.3	72.68
13	4	35	75	7	150.45	156.24
14	5.5	45	75	7	45.33	37.61
15	7	35	50	5	171.89	166.44
16	5.5	35	75	5	378.98	377.80
17	5.5	45	50	5	94.42	101.53
18	5.5	25	100	5	153.77	148.93
19	4	35	75	3	197.23	194.37
20	4	45	75	5	102.11	106.83
21	7	35	75	3	102.18	98.66
22	5.5	25	75	7	88.26	84.46
23	7	35	75	7	76.24	81.37
24	4	35	100	5	225.99	226.26
25	5.5	35	50	3	159.88	161.23
26	5.5	35	100	3	145.77	149.63
27	7	25	75	5	96.21	94.40
28	4	25	75	5	206.67	207.69
29	5.5	35	50	7	148.34	147.38

**Çizelge 5** İnulinaz optimizasyonuna ait modellerin istatistiksel verileri

Model	Serbestlik Derecesi (df)	İnulinaz aktivitesi		
		F-Değeri	p-Değeri	
Lineer	4	0.88	0.4891	
Kuadratik	4	1861.46	< 0.0001*	önerilen
2FI	6	0.028	0.9999	
Kübik	8	2.27	0.1668	

\* $p<0.05$  istatistiksel olarak önemli

Ayrıca, çalışmada modelin uygunluğu  $R^2$  (regresyon katsayısı), Adj-  $R^2$  (düzeltilmiş regresyon katsayısı), öngörülen çoklu belirleme katsayısı (Pre- $R^2$ ) kullanılarak değerlendirilmiştir. İnulinaz aktivitesi için Pre-  $R^2$  (0.99) ve Adj-  $R^2$  (0.99) değerleri,  $R^2$  (0.99) ile makul bir uyum içindedir. İdeal olarak Adj- $R^2$ ,  $R^2$  değerine yakın olmalıdır.  $R^2$  değerinin 1'e yakın olması modelin uygunluğunu yani deneysel ve tahminlenen değerler arasında korelasyon olduğunu göstermektedir. Bu da deneylerin çok

güvenilir olduğu anlamına gelir (Garai ve Kumar, 2013). Çalışmada elde edilen  $R^2$  değeri oldukça yüksek bulunmuştur. Bu yüksek  $R^2$  değeri deneysel sonuçlar ile seçilen model tahminlerinin oldukça uyumlu olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 6** Box–Behnken planda bağımsız değişkenlerin varyans analizi

Varyans kaynağı	Serbestlik Derecesi (df)	İnülinaz aktivitesi	
		F-Değeri	p-Değeri
Model	14	616.01	< 0.0001**
A- pH	1	575.59	< 0.0001**
B-İnkübasyon sıcaklığı	1	420.04	< 0.0001**
C- Nem seviyesi	1	51.29	< 0.0001**
D-İnkübasyon süresi	1	60.76	< 0.0001**
AB	1	20.69	0.0005**
AC	1	23.89	0.0002**
AD	1	2.86	0.1127
BC	1	0.30	0.5906
BD	1	17.84	0.0009**
CD	1	5.07	0.0409*
A <sup>2</sup>	1	1804.88	< 0.0001**
B <sup>2</sup>	1	4406.28	< 0.0001**
C <sup>2</sup>	1	1505.07	< 0.0001**
D <sup>2</sup>	1	3471.18	< 0.0001**
Uyum eksikliği (Lack of Fit)	14	3.76	0.1066

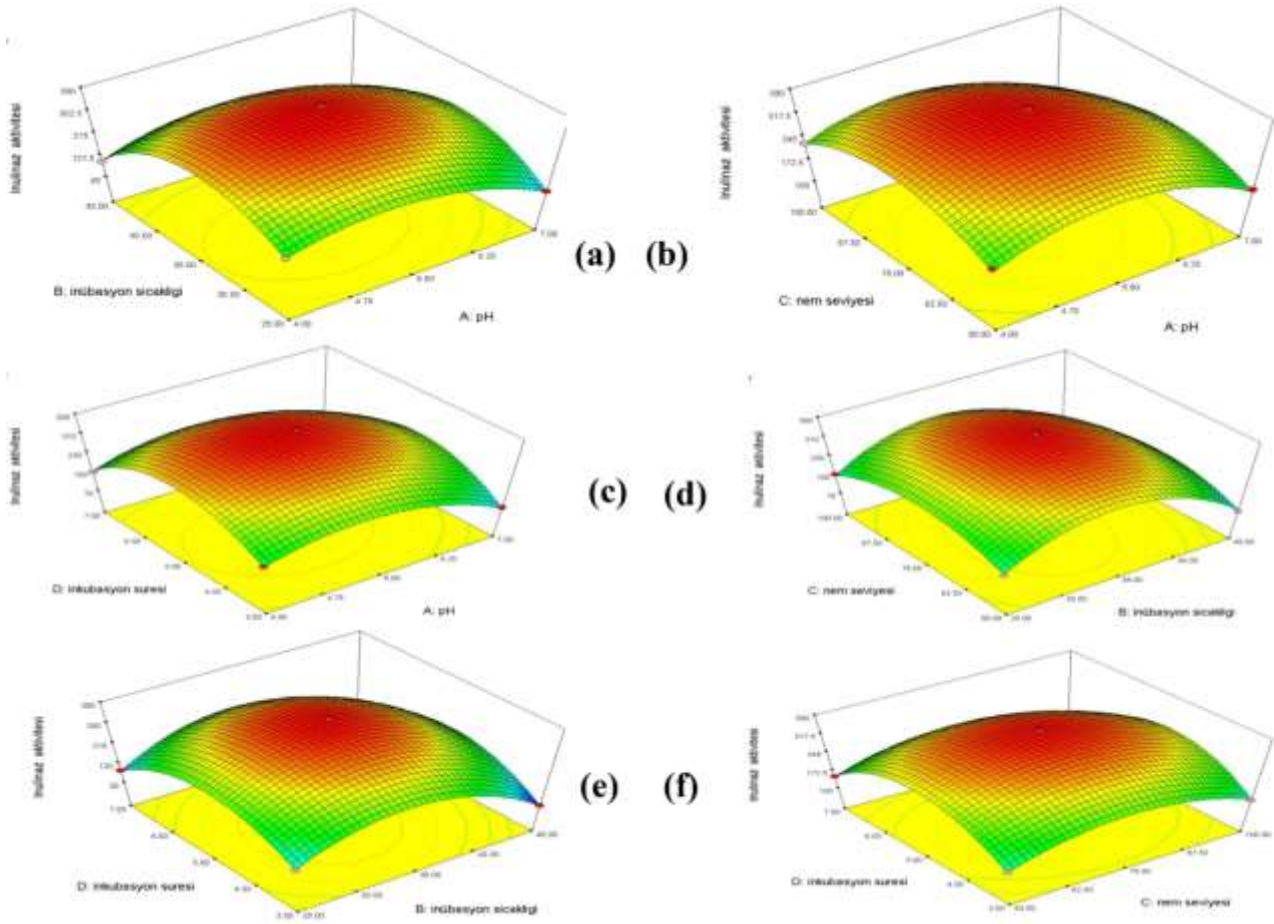
\* p<0.05, \*\*p<0.01

Çalışmada inülinaz üretiminin optimizasyonu ile ilgili kuadratik model varyans analizi sonuçları Çizelge 6'da verilmiştir. İstatistiksel analiz test edilen değişkenlerin inülinaz aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu durumda, A, B, C, D, AB, AC, BD, CD, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup>, D<sup>2</sup> model terimlerinin inülinaz aktivitesi için önemli olduğu bulunmuştur (p<0.05).

Maksimum inülinaz aktivitesi için iki değişkenin etkileşimini ve her değişkenin optimum seviyesini göstermek için üç boyutlu (3-D) yanıt yüzey grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 1). Fermantasyon ortamının sıcaklığı ve pH'ı, inülinaz üretimi için en önemli değişkenler olarak rapor edilmiştir (Dinarvand ve ark., 2017). Modelde, enzim aktivitesinin pH değişkeninden önemli ölçüde etkilendiği bulunmuştur (p < 0.0001).

Şekil 1, inülinaz üretimi için iki değişken arasındaki etkileşimleri göstermektedir. Şekil 1a, b ve c'de görüldüğü gibi, en iyi inülinaz aktivitesi, 5.5 asidik pH'da elde edilmiştir. Ayrıca, pH ve inkübasyon süresi (A\*D) arasındaki etkileşimin önemli olmadığı (p>0.05) bulunurken, inkübasyon sıcaklığı (A\*B) ve nem seviyesinin (A\*C) pH ile aralarındaki etkileşimin önemli olduğu bulunmuştur (p < 0.01). Çalışmada enzim aktivitesinin pH aralığı değerlendirildiğinde pH 4.75'in altında veya pH 6.25'in üstünde azalma görülmektedir. Elde ettiğimiz bu sonuç, fungusların çoğunun 4-6.5 asidik bir aralıkta optimum büyüme pH'larına sahip oldukları bilgisi ile uyumludur (Trivedi ve ark.2012; Singh ve Chauhan, 2017). Benzer şekilde, Trivedi ve ark. (2012), pH 6.1'in üzerindeki artışın, *Aspergillus tubingensis* CR16'dan inülinaz verimini azalttığını bulmuştur. Başka bir çalışmada ise *Aspergillus niger* ATCC 20611'den pH 6.5'te ve *Mucor circinelloides*'den pH 6.4'te maksimum inülinaz aktivitesinin elde edildiği bildirilmiştir (Dinarvand ve ark., 2017; Singh ve ark., 2020).





**Şekil 1.** İnülinaz aktivitesi üzerine iki değişkenin kombine etkilerine ait 3-D grafikler

Sıcaklık mikrobiyal büyümeyi, sporu ve ürün oluşumunu etkileyen önemli bir parametredir. Çalışmada, inkübasyon sıcaklığının enzim üretimi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir (Şekil 1a,d ve e). Şekil 1e’de inülinaz aktivitesinin 4. gün ile 6. gün arasında artmaktadır ayrıca 40°C’den yüksek inkübasyon sıcaklığının inülinaz aktivitesinde keskin bir azalmaya neden olduğunu görülmektedir. Bunun nedeni protein yapısının denatürasyonu olabilir (Niyonzima ve More, 2015). İnkübasyon sıcaklığı ile inkübasyon süresi arasındaki etkileşimin önemli olduğu bulunurken ( $p < 0.01$ ), inülinaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresi-nem seviyesi (B\*C) arasındaki etkileşimin önemli olmadığı ( $p > 0.05$ ) görülmektedir. Benzer şekilde *Aspergillus niger* ATCC 20611 tarafından inülinaz üretimi için optimum sıcaklığın 30°C olduğu bulunmuştur (Dinarvand ve ark., 2017). İnülinaz üretimi için çoğu fungus türünün optimal fermantasyon sıcaklığı 28-30 °C olduğu bildirilmektedir (Singh ve Chauhan, 2018).

Katı faz fermantasyonunda düşük veya yüksek nem seviyesi mikrobiyal aktiviteyi etkiler. Yüksek nem seviyesi oksijenin nüfuz etmesini önler ve substrat gözenekliliğinin azalmasına neden olur. Bununla birlikte, düşük nem seviyesi kötü mikrobiyal büyümeye neden olabilir (Pandey ve ark. 1999). Fungus büyümesi ve metabolit üretimini başlatmak için nem seviyesinin en az % 20 olması gereklidir (Singh ve ark., 2020). Şekil 1b, d ve f nem seviyesinin inülinaz aktivitesi üzerindeki etkisini göstermektedir. Çalışmamızda nem seviyesinin inülinaz üretimi için önemli faktör olduğu bulunmuştur ve optimal inülinaz aktivitesi, % 75 nem seviyesinde gözlenmiştir. Tablo 6’da görüldüğü gibi, inülinaz aktivitesi üzerine nem seviyesinin pH düzeyi (A\*C) ve inkübasyon süresi (C\*D) ile aralarındaki etkileşimin anlamlı olduğu görülmektedir ( $p < 0.05$ ). Bulgularımızla uyumlu olarak farklı fungal

kaynaklar kullanılarak gerçekleştirilen diğer çalışmalarda da katı faz fermantasyonunda inülinaz üretimi için önemli olduğu bulunmuştur (Trivedi ve ark., 2012; Narayanan ve ark., 2013; Singh ve ark., 2018; Singh ve ark., 2020).

Fermantasyon süresi ayrıca katı faz fermantasyonda inülinaz üretimi için çok önemli bir faktördür. Çalışmada inülinaz üretimi, fermantasyonun 5. gününde maksimum aktiviteye ulaşmıştır (Şekil 1c, e ve f). Fermantasyonun 6. gününden sonra enzim üretiminde azalma başlamıştır. Bu durum ortamın nem seviyesindeki değişim, proteazların salgılanması veya besin maddelerinin azalması gibi faktörlerle açıklanabilir. Ayrıca fermantasyon süresi, artan ikincil metabolitlerin birikmesi nedeniyle ortamın pH'ını etkilemesi de enzim aktivitesinde azalmaya neden olan diğer bir faktör olabilir (Singh ve ark., 2018). Deney sonuçlarına göre enzim üretiminde sürenin etki olduğu görülmektedir.

Son olarak, çalışmada inülinaz üretimi için geliştirilen istatistiksel model doğrulanmıştır. Bunun için, enzim için maksimum aktivite sağladığı öngörülen optimize koşullar, Design Expert yazılımının nokta tahmin özelliği kullanılarak elde edilmiştir. Optimal koşulların belirlenmesi için önerilen çözümler içinde çekiciliği 1'e en yakın olan (desirability~1) yazılımın birinci sırada verdiği nokta, seçilmiştir. Buna göre modelin geçerliliği test edilmiştir. Enzim için optimum koşulların pH 5.18, 33.4 °C, % 72.1 nem seviyesi ve 4.7 gün olduğu ve inülinaz aktivitesinin 383.9 IU/gds olduğu tahmin edilmiştir. Bu optimum koşulların geçerliliği deneyler yapılarak test edilmiş ve enzim aktivitesi 385.1 IU/gds olarak bulunmuştur. Bu sonuç öngörülen aktivite değeri ile oldukça uyumludur ve istatistiksel modelin geçerliliği doğrulanmıştır. Elde edilen bulgular, kullanılan istatistiksel yaklaşımın inulinaz üretimini artırmak için etkili ve güvenilir bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ayrıca diğer fungus türlerinden farklı katı substratlar kullanılarak elde edilen enzim aktiviteleri ile karşılaştırıldığında (Çizelge 3), bu çalışmada buğday kepeği kullanılarak *Rhizopus oryzae* HBF351 tarafından üretilen inülinaz aktivitesinin (383.9 IU/gds) yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

## SONUÇ

Sonuç olarak çalışma, *Rhizopus oryzae* HBF351'in potansiyel bir inulinaz üreticisi fungus olduğu gösterilmiştir. Ucuz ve kolayca temin edilebilen bir katı substrat olarak buğday kepeğinin inülinaz üretimini desteklediği bulunmuştur. Tüm çalışma sonuçları dikkate alındığında, *Rhizopus oryzae* izolatının yüksek enzim aktivitesi nedeniyle ticari inulinaz üretimi için umut verici bir aday olduğu görülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. H. Halil BIYIK hocamıza makalemize katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Abou-Taleb, KA, Galal, GF, 2018. A comparative study between one-factor-at-a-time and minimum runs resolution-IV methods for enhancing the production of polysaccharide by *Stenotrophomonas daejeonensis* and *Pseudomonas geniculate*. *Annals of Agricultural Sciences*, 63(2):173-180.
- Ayyachamy M, Khelawan K, Pillay D, Permaul K, Singh S, 2007. Production of inulinase by *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* using onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) peels in solid state cultivation. *Letters in applied microbiology*, 45(4):439-444.
- Dinarvand M, Rezaee M, 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). *Braz J Microbiol* 48(3):427-441.

- El Aty AAA, Wehaidy HR, Mostafa FA, 2014. Optimization of inulinase production from low cost substrates using Plackett–Burman and Taguchi methods. *Carbohydr Polym* 102:261-268.
- Flores-Gallegos AC, Veana F, González-Herrera SM, Muñiz-Márquez DB, Sáenz-Galindo A, Rodríguez-Herrera R, 2018. Fungal Inulinases: An Interesting Option for Food Sweetener Production. In *Enzymes in Food Technology* (pp. 79-101). Springer, Singapore.
- Garai D, Kumar VA, 2013. Box–Behnken design approach for the production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus*. *L Ind Crops Prod*, 44:352-363.
- Germec M, Gürler HN, Ozcan A, Erkan SB, Karahalil E, Turhan I, 2020. Medium optimization and kinetic modeling for the production of *Aspergillus niger* inulinase. *Bioproc Biosyst Eng*, 43(2):217-232.
- Germec M, Ozcan A, Turhan I, 2019. Bioconversion of wheat bran into high value-added products and modelling of fermentations. *Ind Crops Prod*, 139:e111565. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111565>.
- Germec M, Turhan I, 2019. Evaluation of carbon sources for the production of inulinase by *Aspergillus niger* A42 and its characterization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(12):1993-2005.
- Govarthanan M, Park SH, Kim JW, Lee KJ, Cho M, Kamala-Kannan S, Oh BT, 2014, Statistical optimization of alkaline protease production from brackish environment *Bacillus* sp. SKK11 by SSF using horse gram husk. *Prep Biochem Biotechnol*, 44(2):119–131.
- İlgin M, Germec M, Turhan I, 2019. Inulinase production and mathematical modeling from carob extract by using *Aspergillus niger*. *Biotechnol Prog* e2919. <https://doi.org/10.1002/btpr.2919>.
- Kalaiyarasi M, Vijayaraghavan P, Raj SRF, Vincent SGP 2017. Statistical approach for the production of protease and cellulase from *Bacillus cereus* KA3. *Bioprocess Eng* 1(4):93–103.
- Karatop R, Sanal F, 2013. A Potential Resource in Fructose Production from Inulin: *Aspergillus wentii* Inulinase. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 11:1/2: 21.
- Karam EA, Kansoh AL, Moharam ME, Hassan ME, Kansoh AL, 2018. Immobilization of Inulinase Produced by *Rhizopus oligosporus* NRRL 2549 for continuous fructose production. *J Mater Environ Sci*, 9 (8): 2315-2321.
- Krishna C, 2005. Solid-state fermentation systems—an overview. *Crit Rev Biotechnol* 25(1–2):1–30.
- Mazutti M, Bender JP, Treichel H, 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.
- Mohamed SA, Salah HA, Moharam ME, Foda MS, Fahmy AS 2015. Characterization of two thermostable inulinases from *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. *Genet Eng Biotechnol* 13(1):65-69.
- Narayanan M, Srinivasan B, Gayathiri A, Ayyadurai A, Mani A, 2013. Studies on the optimization and characterization for the biosynthesis of inulinase under solid state fermentation. *Int J ChemTech Res*, 5(1): 376–384.
- Niyonzima FN, More S, 2015. Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis. *Prep Biochem Biotechnol*, 45(3):233–258.
- Onilude AA, Fadaunsi IF, Garuba EO, 2012. Inulinase production by *Saccharomyces* sp. in solid state fermentation using wheat bran as substrate. *Annal Microbiol*, 62(2):843-848.
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P, 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr Sci*, 77(1):149–162.

- Rawat HK, Soni H, Kango N, Kumar CG, 2017. Continuous generation of fructose from *Taraxacum officinale* tap root extract and inulin by immobilized inulinase in a packed-bed reactor. *Biocatal Agric Biotechnol*, 9:134-140.
- Rodrigues CJ, Pereira RF, Fernandes P, Cabral JM, & de Carvalho CC, 2017. Cultivation-based strategies to find efficient marine biocatalysts. *Biotechnol J* 12(7): 1700036. <https://doi.org/10.1002/biot.201700036>
- Sheng J, Chi Z, Gong F, Li J, 2009. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Appl Biochem Biotechnol*, 144(2):111-121.
- Singh S, Bajaj BK, 2016. Bioprocess optimization for production of thermoalkali-stable protease from *Bacillus subtilis* K-1 under solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(7): 717-724.
- Singh RS, Chauhan K, 2017. Inulinase production from a new inulinase producer, *Penicillium oxalicum* BGPUP-4. *Biocatal Agric Biotechnol*, 9:1-10.
- Singh R, Singh R, 2017. Inulinases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 423-446. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products* <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00018-X>.
- Singh RS, Chauhan K, 2018. Production, purification, characterization and applications of fungal inulinases. *Curr Biotechnol*, 7(3):242-260.
- Singh RS, Chauhan K, Jindal A, 2018. Response surface optimization of solid state fermentation for inulinase production from *Penicillium oxalicum* using corn bran. *Journal of Food Science Ad Technology*, 55(7):2533-2540.
- Singh RS, Chauhan K, Kaur K, Pandey A, 2020. Statistical optimization of solid-state fermentation for the production of fungal inulinase from apple pomace. *Bioresource Technology Reports*, 9: 100364. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100364>.
- Socol CR, da Costa ESF, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, de Souza Vandenberghe LP, 2017. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnol Res Inn*, 1(1):52–71.
- Trivedi S, Divecha J, Shah A, 2012. Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates. *Carbohydr Poly*, 90(1): 483-490.
- Xiong C, Jinhua, W, 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.