

DERLEME /REVIEW

İNULİNAZ ENZİMİNİN ÖNEMİ

Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM¹

ÖZ

İnulin β -(2→1) bağlarıyla bağlı polifruktoz zinciri ile uçtaki fruktoza α -(2→1) bağıyla bağlı glukozdan oluşan bir polifruktandır. Ticari anlamda inulinler, hindiba, yerelması ve enginarından sağlanmaktadır. İnulin, prebiyotik olarak yem sanayinde ve gıda sanayi ve endüstriyel fermentasyonda substrat olarak kullanılmaktadır. Prebiyotik olarak inulin, özellikle kanatlı hayvanlarda, gastrointestinal sistem ve bağışıklık sistemine olumlu etkide bulunmaktadır. Ayrıca, inuline olan büyük ilgi, zengin fruktoz şurubu elde etmede nispeten ucuz ve çok bulunabilen bir substrat olmasından kaynaklanmaktadır. İnulinazlar inulini hidrolize eden enzimlerdir. İnulinazlar, bitki dokularınca ve funguslar, mayalar ve bakteriler gibi çeşitli mikroorganizmalarca sentezlenmektedir. Mikrobiyal ve bitkisel inulinazlar, inulini, fruktoz ya da diğer oligosakkaritlere hidrolize ederler. Ekzoınulinazlar (β -D-fructopyranoside fructohydrolase, EC 3.2.1.80) uçtaki β -(2→1)-fructofuranosidic bağları parçalarken, endoınulinazlar (β -D-fructan fructanohydrolase, EC 3.2.1.7) inulinin içteki bağlarını hidrolize ederek ana reaksiyon ürünleri olan inulo-oligosakkaritlerin ortaya çıkmasını sağlar. Endo ve ekzoınulinaz üreten çeşitli mikroorganizmalar izole edilmiş olup mikrobiyolojik ve moleküler çalışmalar ile bu enzimleri kodlayan bazı genlerin nükleotid sıraları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : İnulin, İnulinaz, Fruktoz.

IMPORTANCE OF INULINASE ENZYME

ABSTRACT

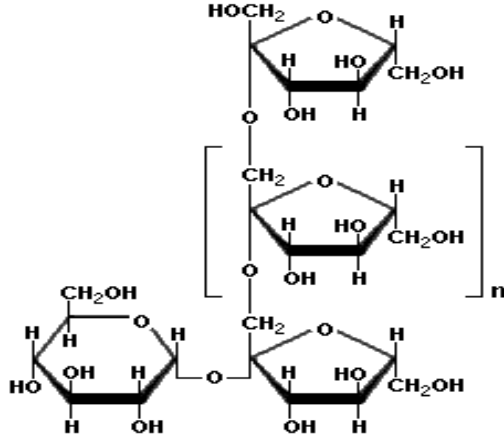
Inulin is a polyfructan consisting of a linear β -(2→1)-linked polyfructose chain with a terminal glucose residue linked to fructose by an α -(2→1) bond. Commercially available inulins are obtained mainly from chicory, Jerusalem artichoke and dahlia. Inulin is used in feed industry as a prebiotic and in the food industry and industrial fermentations as a substrat. Functioning as a prebiotic, especially in poultry, inulin has been associated with enhancing the gastrointestinal system and immune system. Moreover, inulin is of great interest because it is a relatively inexpensive and abundant substrate for the production of rich fructose syrups. Inulinase is an enzyme and hydrolyze inulin. Inulinases have been secreted from plant tissues and various microorganisms such as fungi, yeasts and bacteria. Microbial and plant inulinases hydrolyse inulin into fructose and other oligosaccharides. Exoinulinases (β -D-fructopyranoside fructohydrolase, EC 3.2.1.80) hydrolyze the terminal β -(2→1)-fructofuranosidic bonds, whereas endoinulinases (β -D-fructan fructanohydrolase, EC 3.2.1.7) hydrolyze the internal linkages in inulin to release inuli-oligosaccharides as the main reaction products. Various microorganisms and plants secreting endo and exoinulinases have been isolated and nucleotide sequences of some genes coding these enzymes have been determined with microbiological and molecular studies.

Keywords: Inulin, Inulinase, Fructose.

¹ Aksaray Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü-Aksaray.
E-mail: meltemozusaglam@gmail.com

1. GİRİŞ

İnulin, düz zincirli β -(2→1) bağlarıyla bağlı fruktoz molekülleri (n~35) ile uçta sükroz molekülünden oluşan oldukça yaygın bir polifruktandır (Edelman ve Jefford, 1964) (Şekil 1).



Şekil 1. İnulinin yapısı (Anonim, 2007a)

Prebiyotik olarak sınıflandırılan inulinler incebağırsakta sindirilmeyenler. Prebiyotikler; sınırlı sayıdaki kolonik bakterilerin aktivitesini selektif olarak artıran ve böylece konakçının sağlığını geliştirerek konakçıya olumlu etkide bulunan sindirilmeyen gıda maddeleridir (Gibson ve Roberfroid, 1995). Bunun yerine kolona doğru ilerler, oradaki bakterilerce metabolize edilirler ve anaerobik fermentasyon sırasında kısa zincirli yağ asitlerinin üretimi için enerji sağlarlar (Jenkins vd., 1999). Özellikle kanatlılar gibi tek mideli hayvanlar için önemli olan inulinler, *Bifidobakteriler*ce tercih edilen bir substrattır (Niness, 1999) ve bağırsakta sağlık koruyucu etkiye sahip *Bifidobakterilerin* gelişimini teşvik ederler.

İnulin, yerelması (%15-20), yıldız çiçeği, hindiba (%13-20), karahindiba (%8-15), soğan (%2-6), sarımsak (%9-16), pırasa (%3-10), muz (%0.3-0.7), enginar (%2-7) ve kuşkonmaz (%10-15) gibi bitkilerde bulunmaktadır (Niness, 1999; Mitchell ve Mitchell, 1995; Smits ve Herman, 1998; Silver ve Brinks, 2000; Heyer vd., 1998; van Loo ve Hermans, 2000; Crow, 2005a, b).

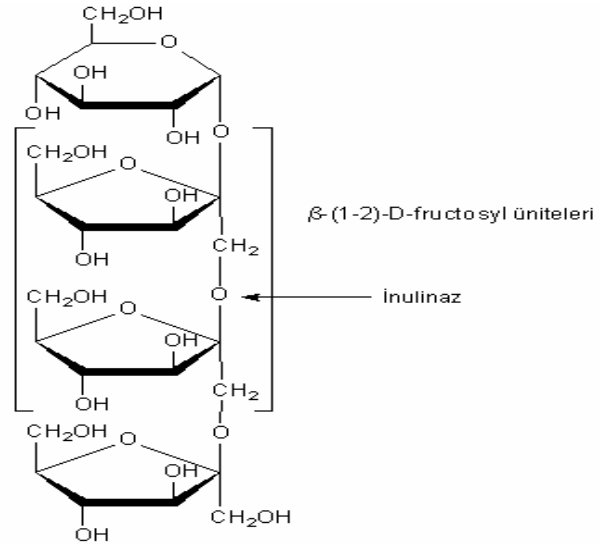
Bu bitkilerdeki polifruktan endüstride hammadde olarak değerlendirilmektedir. İnulinin endüstride kullanımını açısından başlıca iki önemi vardır: inulinin enzimatik hidrolizi (ekzoinulinaz ve endoinulinaz) ile saf fruktoz şurubunun üretilmesi (Vandamme ve Derycke, 1983) veya inulinin direkt olarak fermentasyonu ile etanol yada aseton-bütanol

gibi çeşitli ürünler elde edilmesidir (Marchal vd., 1985; Margaritis ve Bajpai, 1982).

Ticari anlamda inulinler hindiba, yerelması ve enginar da saptanmıştır. Bu bitkiler arasında hindiba, yüksek oranda inulin içermesi ve sürekli olarak verim vermesi nedenleri ile endüstriyel olarak inulin ve hidrolizatlarının üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (De Leenheer ve Hoebregs, 1994).

2. İNULİNAZ ENZİMİNİN ÖNEMİ

İnulinaz, β -fruktan zincirindeki β -(2→1) bağlarını parçalayarak fruktoz ve glukoz oluşturan enzimdir (Bacon ve Edelman, 1951; Vandamme ve Derycke, 1983). Şekil 2'de inulinaz enziminin etki mekanizması görülmektedir.



Şekil 2. İnulinaz enziminin etki mekanizması (Anonim, 2007b)

İnulinaz enzimi, funguslar (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Fusarium*) (Pavlova vd., 1991; Gupta vd., 1998; Pessoni vd., 1999), maya (*Kluyveromyces*) (Gupta vd., 1994) ve bakteriler (*Flavobacterium multivorum*, *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter* sp., *Bacillus polymyxa*, *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium thermosuccinogenes*) (Allais vd., 1986; Vullo vd., 1991; Sakurai vd., 1997; Kwon vd., 2003, Tsujimoto vd., 2003) gibi çeşitli mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Bu mikroorganizmalar tarafından üretilen inulinazlar maksimum aktivite gösterdikleri pH optimumları 3.5-8.5 arasında yer alırken genelde sıcaklık optimumları 28-34°C'dir. Ancak bazı suşların sıcaklık optimumlarının 40-50°C arasında bulunduğu bildirilmektedir (Gern vd., 2001).

Mikrobiyal ve bitkisel inulinazlar, inulini, fruktoz ya da diğer oligosakkaritlere hidrolize ederler (Ohta vd., 1993). İnulinaz enzimi ilk olarak bitkilerden izole edilmiştir (Allais vd., 1987). Ekzoinulinazlar (β -D-fructopyranoside fructohydrolase, EC 3.2.1.80) uçtaki β -(2→1)-fructofuranosidic bağları parçalarlarken, endoinulinazlar (β -D-fructan fructanohydrolase, EC 3.2.1.7) inulinin içindeki bağlarını hidrolize ederek ana reaksiyon ürünü olan inulo-oligosakkaritlerin ortaya çıkmasını sağlar (Uhm vd., 1999; Baumgarner ve Praznik, 1995). İnulinin, ekzoinulinazlar veya ekzoinulinaz ve endoinulinazlarla hidrolizi sonucunda fruktoz şurubu elde edilir (Byun ve Nahm, 1978; Kierstan, 1980; Zittan, 1981; Kim vd., 1982; Vandamme ve Derycke, 1983). Fruktoz GRAS (Generally Recognized As Safe) grubuna giren bir tatlandırıcıdır. Fruktoz, sükrözden 1.5 kat daha fazla tatlı olup sükrözden daha ucuzdur. Bu nedenlerden dolayı birçok gıdada özellikle içeceklerde sükröz yerine tercih edilmektedir (Hanover ve White, 1993). Ayrıca sükröz yerine kullanılabilen güvenilir alternatif tatlandırıcı olan fruktoz, diyabetik hastalar üzerinde yararlı etkileri sahip olup çocuklarda da demir emilimini artırmaktadır. Düşük kalorili bir tatlandırıcı olmakla birlikte yüksek oranda çözünür, düşük viskoziteye ve yüksek tatlandırma kapasitesine sahiptir (Pandey vd., 1999).

Çoğu mikrobiyal inulinazlar ekzoinulinazlar olup bunlar *Aspergillus ficuum* (Ettalibi ve Baratti, 1987), *Penicillium janczemskii* (Pessoni vd., 1999), *Chrysosporium pannorum* (Xiao, 1989) gibi funguslardan izole edilmişlerdir. Hindiba (Van den Ende, 2000), maya (Burne ve Penders, 1992) ve bakterilerden (Kwon vd., 2003) elde edilen ekzoinulinazların nükleotid ve amino asit sırası belirlenmiştir. Endoinulinazı kodlayan genler de çeşitli funguslar (*Penicillium purpurogenum* (Onodera vd., 1996), *Aspergillus niger* (Ohta vd., 1998), *Aspergillus ficuum* (Uhm vd., 1998)) ve bakterilerden (*Arthrobacter* sp. S37 (Kang ve Kim, 1999)) klonlanmıştır.

İnulinin asit hidrolizi (organik veya mineral asitler) ya da nişastanın enzimatik hidrolizi ve modifikasyonu ile fruktoz elde edilebilir (Beglou ve Golubev, 2004; Kim ve Hamdy, 1986). Ancak inulinin suda iyi çözünmemesi nedeni ile yüksek sıcaklık derecelerinde (80-100°C) asitle hidrolizi yapılmakta ve bunun sonucunda da difruktoz anhidrid gibi istenmeyen ürünler ve renk meydana gelmekte ve verim de düşük olmaktadır (Matsumoto ve Yamazaki, 1986). Ayrıca nişastanın enzimatik hidrolizi ile fruktoz üretiminde ise üç enzim aşaması (alfa-amilaz, glu-

koamilaz, gluukoizomeraz) bulunmaktadır (Vandamme ve Derycke, 1983). Ancak her iki yöntemde oldukça pahalı olup sadece %45 fruktoz elde edilebilmektedir. Mikrobiyal inulinazların kullanımı ile tek aşamalı bir inulin hidrolizi sonucunda %95 saf fruktoz elde edilebilmektedir (Gill vd., 2006). Ancak inulinden endüstriyel anlamda fruktoz üretiminde iki temel sorun vardır. Birincisi; inulin soğuk suda çözünmez olup oda sıcaklığında sınırlı olarak, 55°C'lik suda ise sadece %5 oranında çözünmesidir (Tsujimoto vd., 2003). Diğeri ise oda sıcaklığında mikrobiyal bir kontaminasyonun olma olasılığıdır. Bu nedenlerden dolayı inulinden fruktoz üretimi yüksek oranda hidrolizasyonunun gerçekleştiği 60°C'de yapılmaktadır. Bildirilen inulinazların çoğu bu sıcaklıkta birkaç saat içerisinde aktivitelerini kaybetmektedirler. Ancak yüksek oranda hidrolizasyon sağlamak için inulinin çözünürlüğünün fazla olduğu yüksek sıcaklıkların kullanılması gerekmektedir (Vandamme ve Derycke, 1983; Allais vd., 1987; Drent vd., 1991). Bu sebepten dolayı termostabil inulinazların izolasyonu ve karakterizasyonu endüstride önem taşımaktadır. Termostabil ve ekstraselüler inulinaz üreten bir *Aspergillus fumigatus* suşu (Sharma vd., 1998; Kaur vd., 1999), *Clostridium thermosuccinogenes* (Drent vd., 1991) ile *Bacillus* suşları izole edilmiştir (Allais vd., 1987).

3. İNULİNAZ ENZİMİ ÜZERİNE YAPILAN MİKROBİYOLOJİK VE MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

Allais vd. (1986), topraktan karbon ve enerji kaynağı olarak inulini kullanan 32 bakteri suşu izole etmişlerdir. Bunlardan 20 suşu *Flavobacterium multivorum* olarak tespit etmişlerdir. Tüm bakterilerin inulin ve sükröz üzerine etkili olan β -fruktosidaz (inulinaz) aktivitesine sahip olduğunu ve bu bakterilerce üretilen enzimin inulinden fruktoz şurubu hazırlamada bir potansiyel oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Sakuraki vd. (1997), *Arthrobacter* sp. H65-7'den, ekstraselüler inulin fruktotransferazı (depolymerizing) (inulinaz II) (EC 2.4.1.93) kodlayan geni (*ift* geni) *E. coli*'de klonlayarak eksprese etmişlerdir. DNA sekans çalışmaları sonucunda; genin 1.314 bp'den oluşan tek bir açık okuma dizisi içerdiği ve bunun da 32 amino asitlik sinyal peptidi kodladığı ve olgun proteinin 405 amino asitten oluştuğunu bildirmişlerdir. Enzim, *Arthrobacter globiformis* S14-3'ün inulin fruktotransferazı (EC 2.4.1.200) ile %49.8 oranında homoloji göstermiştir. *E. coli* hücrelerinde *ift* geni *lac* promotorunun kontrolü altında aktif olarak enzim ürettiği tespit etmişlerdir.

Kato vd. (1999), inulin varlığında ekstraselüler inulinaz üreten ve topraktan izole edilmiş termofilik *Bacillus stearothermophilus* KP1289 (41-69°C'ler arasında gelişmekte) suşundan inulinaz II'yi saflaştırmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığını 54.000 Da olarak belirlemişlerdir. Enzimin, 30-75°C ve pH 4.5-8.6 arasında aktif olduğunu, sıcaklık optimumunun 60°C ve pH optimumunun ise 6.1 olduğunu bildirmişlerdir. Enzim, 69°C'de, pH 7.0'da ve 10 dakikada aktivitesinin %50'sini kaybetmektedir. İnulinaz II, termofilik-termostabil β-D-fructan fructohidrolaze (ekzoinulinaz, EC 3.2.1.80) olarak sınıflandırılmıştır.

Regina ve Furlan (2001), literatürlerde bildirilen ve endoinulinaz üreten 16 fungal suş ve yıldız çiçeği (dahlia) yetiştirilen topraklardan izole edilmiş 3 bakteri suşu endo-inulinaz üretimi için test etmişlerdir. İzole edilen dört suş (bir fungus ve üç bakteri) substrat kullanımını, hücre gelişimi ve endo-inulinaz üretimi açısından değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda üç bakteri suşunun endo-inulinaz ürettiği ve bunların arasından da *Paenibacillus* sp. CDB 003 suşunun endo-inulinaz üretimi için en uygun olduğu tespit etmişlerdir.

Uzunova vd. (2001), inulinaz enzimi üreten termofilik *Bacillus* sp. 11 suşunu izole etmişler ve bu bakterinin enzim üretimi ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Bakteri üremeye başladıktan kısa bir süre (4.25 saat) sonra bu bakterice üretilen inulinaz ve invertaz enzimlerinin aktiviteleri bu enzimleri üreten diğer aerobik ve anaerobik termofilik bakteri ve mayalarla kıyaslandığında benzer veya daha yüksek bulunmuştur. Ekzoinulinaz grubunda yer alan bu enzim inulin, sükröz ve rafinozu hidrolize edebilmektedir. Enzim pH 5.5-7.5 aralığında ve 65°C'nin üzerinde kullanılabilir durumda olduğunu bildirmişlerdir. İnulin substrat olarak kullanıldığında 65°C'de 60 dakika inkübasyon sonrasında inulinaz ve invertaz aktivitelerini %92-98 korumuşlardır.

Sharma vd. (2002), hindiba yetiştirilen topraktan ekstraselüler inulinaz üreten *Penicillium purpurogenum*'u izole etmişlerdir. İzole ettikleri bakteriyi UV ve NTG (3-nitro, 5-methyl guanidine) ile mutasyona uğratmışlardır. Mutasyondan sonra inulinaz aktivitesinin 2.5 kat arttığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak iki mutajenik madde ile muameleden sonra seçilen tüm mutantlarda inulinaz aktivitesinin arttığını gözlemişlerdir.

Kwon vd. (2003), *Bacillus polymyxa* MGL21 suşundan ekzoinulinazı kodlayan geni (*inu*) klonlamış ve DNA baz sırasını belirlemiştir.

lerdir. Gen, 1.455 nükleotidden oluşmuş olup 485 amino asitlik bir proteini kodlar. *Inu* genini *E. coli*'de eksprese etmişler ve ekzoinulinaz enzimi saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzim inulinin yanısıra sükröz, levan, rafinozu hidrolize etmektedir. İnulinazın sıcaklık optimumu 35°C olup pH optimumu 7.0'dır. Enzim, inulin'den fruktoz üretiminde kullanılmaktadır.

Tsujimoto vd. (2003), termofilik *Geobacillus stearothermophilus* (*Bacillus stearothermophilus*) KP1289'dan ekzoinulinaz (EC 3.2.1.80) genini (*inuA*) klonlamışlardır. *InuA* geni 1.482 bp'den oluşmakta ve 493 amino asiti kodlamaktadır. Gen (*inuA*) *E. coli* HB101'de eksprese edilmiş ve saflaştırılan ekzoinulinaz enziminin moleküler ağırlığını SDS jelde 54.000 Da olarak belirlemişlerdir. Enzim 30-75°C'lerde aktif olup sıcaklık optimumu 60°C'dir.

Gill vd. (2006), *Aspergillus fumigatus*'un ekstraselüler ekstraktında termostabil inulinaz aktivitesi belirlemişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığı 60°C olup enzim, inulin yokluğunda amonyum sülfat ile 72 saatlik inkübasyon sonrası maksimum aktivitesinin yaklaşık %70'ini korumaktadır. Araştırmacılar *A. fumigatus* inulinazının iki izoformunu saflaştırıp termostabiliteyi üzerine çalışmalar yapmışlardır. İnulin varlığında izoform II diğerine göre daha termostabil bulunmuş, enzim 3 saat 60°C'de inkübe edildiğinde %54 aktivitesini korumuştur. *A. fumigatus*'un ürettiği inulinaz, yüksek termostabilitesi nedeni ile ticari olarak fruktoz üretiminde önemli bir potansiyel oluşturmaktadır.

Gong vd. (2006), deniz alginin yüzeyinden izole ettikleri bir fungusun besi yerine yüksek miktarda inulinaz salgıladığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar identifikasyon ve moleküler çalışmalar sonucunda bu fungusun *Pichia guilliermondii* olduğunu tespit etmişlerdir. İnulinaz üretimi için optimum koşulları, 4.0% (w/v) inulin ve 0.5% (w/v) yeast extract içeren besi yeri ve pH 8.0, 28°C ve 170 rpm olarak belirlemişlerdir. Bu suş, optimum koşullar altında 48 saatlik fermentasyon sonucunda 60 U ml⁻¹'den fazla inulinaz enzimi üretmiştir. Hidrolizden sonra büyük miktarda monosakkarit ve iz miktarda oligosakkarit belirlemişlerdir. Bunun sonucunda araştırmacılar bu inulinazın yüksek inulinaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Sharma ve Gill (2007), *Streptomyces* sp.'den amonyum sülfat çöktürmesi ile ekstraselüler ekzoinulinazı saflaştırmışlardır.

Safılaştırılan enzim jel elektroforezinde 45 kDa'luk moleküler ağırlığa sahip tek bir bant oluşturmuştur. Enzimin sıcak optimumu 70°C olup pH optimumu ise 6.0'dır. Araştırmacılar, gliserol ve manitolün, enzim aktivitesi üzerine koruyucu bir etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Sükroz ve rafinozla kıyaslandığında safılaştırılan enzimin inulin için daha düşük K_m (1.63 mM) ve daha yüksek V_{max} (450 mM) değerlerine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuçlar dahilinde araştırmacılar, yüksek sıcaklıkta stabilitesini koruyan safılaştırdıkları inulinazın, yüksek fruktoz şurubunun endüstriyel enzimatik üretiminde ve diğer büyük miktarlardaki biyoteknolojik işlemlerde potansiyel oluşturabileceğini bildirmişlerdir.

Goosen vd. (2008), *Aspergillus niger* N402'den safılaştırdıkları ekzo-inulinaz enziminin (AngInuE; *E. coli*'de ekspres edilmiş) sükroz:inulin hidroliz oranının bir tipik ekzo-inulinaz karakteristiği olan 2.3 olduğunu bildirmişlerdir. Enzim aynı zamanda sükroz konsantrasyonunu artıran önemli transfruktosilata aktivitesine sahiptir. AngInuE proteinin moleküler ağırlığı 57 kDa olup monomerik bir aktiviteye sahiptir. Araştırmacılar, bulgularının sonucunda, *E. coli*'den safılaştırdıkları AngInuE enziminin, geniş bir ekzo-inulinaz spesifitesine sahip ve sükroz üzerine önemli transfruktosilata aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir.

Sheng vd. (2008), deniz mayası olan *Cryptococcus aureus* G7a'nın hücre kültürü süpernatantındaki ekstraselüler inulinazı safılaştırmışlardır. Safılaştırılan enzimin, moleküler büyüklüğünü 60 kDa, pH ve sıcaklık optimumlarını ise sırasıyla 5.0 ve 50°C olarak belirlemişlerdir. Enzim, Ca^{+2} , K^+ , Na^+ , Fe^{+2} ve Zn^{+2} ile aktive olmakta, Mg^{+2} , Hg^{+2} ve Ag^+ ile de aktivitesi düşmektedir. Safılaştırılan inulinaz ile inulinin hidrolizi sonucunda büyük miktarda monosakkarit saptanmış bu da enzimin yüksek ekzo-inulinaz aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir.

4. SONUÇ

Özellikle kanatlılar gibi tek mideli hayvanlarda prebiyotik olarak kullanılan inulin, geçtiğimiz birkaç yıl içerisinde, sadece ekzo-inulinaz veya endo-inulinaz ile birlikte enzimatik olarak ultra saf fruktoz şurubu üretiminde sanayide de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İnulinaz enzimleri izole edilen çeşitli bakteri ve funguslardan elde edilmelerinin yanı sıra günümüzde genetik çalışmalar sonucunda re-

kombinant mikroorganizmalardan da inulinazların üretimi yapılmaktadır.

KAYNAKLAR

- Allais, J.J., Kammoun, S., Blanc, P., Girard, C. ve Baratti, J.C. (1986). Isolation and characterization of bacterial strains with inulinase activity. *Appl. Environ. Microbiol* 52(5), 1086-1090.
- Allais, J.J. ve Lopez, G.H., Kammoun, S. and Baratti, J.C. (1987). Isolation and characterization of thermophilic bacterial strains with inulinase activity. *Appl. Environ. Microbiol* 53(5), 942-945.
- Anonim (2007a). Carbohydrates-Chemical Structure (www.scientificpsychic.com/fitness/inulin.gif) (27.07.2007).
- Anonim (2007b). Enzymes for Carbohydrate Analysis and Digestion (http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/19500/inulinase_inulin.gif) (27.07.2007).
- Bacon, J.S.D. ve Edelman, J. (1951). The carbohydrates of the Jerusalem artichoke and other compositae. *Biochem. J* 48, 114-126.
- Baumgartner, S. ve Praznik, W. (1995). Purification of exo- and endo-inulinase from crude inulinase extract for the analysis of fructans. *Int. J. Biol. Macromol* 17, 247-250.
- Beglov, S. Ju ve Golubev, V.N. (2004). Method for producing glucose-fructose syrup. Russian Patent R U2224026.
- Burne, R.A. ve Penders, J.E. (1992). Characterization of the *Streptococcus mutans* GS-5 fruA gene encoding exo-beta-D-fructosidase. *Infect. Immun.* 60, 4621-4632.
- Byun, S.M. ve Nahm, B.H. (1978). Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis. *J. Food Sci* 43, 1871-1873.
- Crow, D. (2005a). Inulin-A comprehensive Scientific Review. (http://members.shaw.ca/duncancrow/inulin_review.html) (09.11.2005).
- Crow, D. (2005b). Inulin References: Reversing Bowel Dysbiosis. (<http://members.shaw.ca/>)

- duncancrow/inulin_probiotic.html) (20.12.2005).
- De Leenheer, L. ve Hoebregs, H. (1994). Progress in the elucidation of the composition of chicory inulin. *Starch* 46, 193-196.
- Drent, W.J., Lahpor, G.A., Wiegant, W.M. ve Gottschal, J.C. (1991). Fermentation of inulin by *Clostridium thermosuccinogenes* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from various habitats. *Appl. Environ. Microbiol* 57, 455-462.
- Edelman, J. ve Jefford, T.G. (1964). The metabolism of fructose polymers in plants. 4. Beta fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus*. L. *Biochem. J.* 93, 148-161.
- Ettalibi, B. ve Baratti, J.C. (1987). Purification properties and comparison of invertase, exo-inulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, 13-20.
- Gern, R.M.M., Furlan, S.A., Ninow, J.L. ve Jonas, R. (2001). Screening for microorganisms that produce only endo-inulinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 55(5), 632-635.
- Gibson, G.R. ve Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutri* 125, 1401-1412.
- Gill, P.K., Manhas, R.K. ve Singh, P. (2006). Comparative analysis of thermostability of extracellular inulinase activity from *Aspergillus fumigatus* with commercially available (Novozyme) inulinase. *Biore-source Technol* 97(2), 355-358.
- Gong, F., Sheng, J., Chi, Z. ve Li, J. (2006). Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 34(3), 179-185.
- Goosen, C., Van der Maarel, M.J.E.C. ve Dijkhuizen, L. (2008). Exo-inulinase of *Aspergillus niger* N402: A hydrolytic enzyme with significant transfructosylating activity. *Biocat. Biotrans* 26, 49-58.
- Gupta, A.K., Singh, D.P., Kaur, N. ve Singh, R. (1994). Production, purification and immobilisation of inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 59, 377-385.
- Gupta, A.K., Singh, D.P. ve Kaur, N. (1998). A HgCl₂ insensitive and thermally stable inulinase from *Aspergillus oryzae*. *Phytochemistry* 49(1), 55-58.
- Hanover, L. ve White, J. (1993). Manufacturing, composition, and applications of fructose. *Am. J. Clin. Nutri.* 5 (suppl.), 724S-732S.
- Heyer, A., Schroerer, B., Radosta, S., Wolff, D., Czaplá, S. ve Springer, J. (1998). Structure of the enzymatically synthesised fructan inulin. *Carbohydr. Res.* 313, 165-174.
- Jenkins, D.J.A., Kendall, C.W.C. ve Vuksan, V. (1999). Inulin, oligofructose and intestinal function. *J. Nutri.* 129, 1431-1433.
- Kang, S. ve Kim, S. (1999). Molecular cloning and sequence analysis of an endoinulinase gene from *Arthrobacter* sp.. *Biotechnol. Lett.* 21, 569-574.
- Kato, K., Toshihiro, A., Tae, K., Naoko, M., Mika, M. ve Yuzuru, S. (1999). Purification and properties of a thermostable inulinase (β -D-Fructan Fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289. *Starch* 7, 253-258.
- Kaur, A., Sharma, D., Harchand, R.K., Singh, P., Bhullar, S.S. ve Kaur, A. (1999). Production of thermostable extracellular inulinase by *Aspergillus fumigatus*. *Ind. J. Microbiol.* 39, 99-103.
- Kierstan, M. (1980). Production of fructose syrup from inulin. *Process Biochem.* May, 2-4.
- Kim, W.Y., Byun, S.M. ve Uhm, T.B. (1982). Hydrolysis of inulin from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on amino-ethylcellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 4, 239-244.
- Kim, K. and Hamdy, M.K. (1986). Acid hydrolysis of Jerusalem artichoke for ethanol fermentation. *Biotechnol. and Bioengin* 28, 138-141.
- Kwon, H.J., Jeon, S.J., You, D.J., Kim, K.H., Jeong, Y.K., Kim, Y.H., Kim, Y.M. ve Kim, B.W. (2003). Cloning and characterization of an exoinulinase from *Bacil-*

- lus polymyxa*. *Biotechnol. Lett.* 25, 155-159.
- Marchal, R., Blanchet, D. ve Vandecasteele, J.P. (1985). Industrial optimization of acetone-butanol fermentation: a study of the utilization of Jerusalem artichokes. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 23, 92-98.
- Margaritis, A. ve Bajpai, P. (1982). Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus*) using *Kulyveromyces marxianus* and *Saccharomyces rosei*. *Biotechnol. Bioeng* 24, 941-953.
- Matsumoto, K. ve Yamazaki, H. (1986). Production of fructose syrups. US Patent US4613377.
- Mitchell, C.R. ve Mitchell, P.R. (1995). Instant dried dahlia inulin juice and its method for production and usage. US Patent 5, 422, 346.
- Niness, K.R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they. *J. Nutr.* 129, 1402-1406.
- Ohta, K., Hamada, S. and Nakamura, T. (1993). Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 729-733.
- Ohta, K., Akimoto, H., Matsuda, S., Toshimitsu, D. ve Nakamura, T. (1998). Molecular cloning and sequence analysis of two endoinulinase genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1731-1738.
- Onodera, S., Murakami, T., Ito, H., Mori, H., Matsui, H., Honma, M., Chiba, S. ve Shiomi, N. (1996). Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNA and gene encoding endo-inulinase from *Penicillium purpurogenum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 60, 1780-1785.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Selvakumar, P., Soccol, V.T., Krieger, N. ve Fontana, J.D. (1999). Recent developments in microbial inulinases: its production, properties and industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 81, 35-52.
- Pavlova, N.M., Narsiya, T.A., Kalunyants, K.A., Shapenko, E.F., Krimentsova, V.P., Zueva, R.V. ve Slobodkina, G.B. (1991). USSR Inventor's certificate no. 1 631 070, Byull. Izobret 12, 10-15.
- Pessoni, R.A.B., Figueredo-Ribeiro, R.C.L. ve Braga, M.R. (1999). Extracellular inulinases from *Penicillium janczemskii*, fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteracea). *J. Appl. Microbiol* 87, 141-147.
- Regina, M.M.G. ve Furlan, S.A. (2001). Screening for microorganisms that produce only endo-inulinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 632-635.
- Sakurai, H., Yokota, A. ve Tomita, F. (1997). Molecular cloning of an inulin fructotransferase (depolymerizing) gene from *Artrobacter* sp. H65-7 and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61(1), 87-92.
- Sharma, D., Kaur, A., Harchand, R.K., Singh, P., Bhullar, S.S. ve Kaur, A. (1998). Thermostability of extracellular inulinases from *Aspergillus* and *Penicillium*. *Ind. J. Microbiol* 38, 235-236.
- Sharma, A.D., Nanda, J.S., Gill, P.K., Bhullar, S.S., Prabhjeet, S. ve Dhiraj, V. (2002). Enhancement in inulinase production by mutagenesis in *Penicillium purpurogenum*. *Ind. J. Biotechnol.* 1(3), 270-274.
- Sharma, A.D. ve Gill, P.K. (2007). Purification and characterization of heat-stable exoinulinase from *Streptomyces* sp. *J. Food Engin* 79, 1172-1178.
- Sheng, J., Chi, Z., Gong, F. ve Li, J. (2008). Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 144(2), 111-121.
- Silver, B. ve Brinks, H. (2000). Novel inulin fractions, process for preparing same, and food products containing said fractions. Patent WO 00/11967.
- Smits, G. ve Hermans, J. (1998). Process for the manufacture of chicory inulin, and improved chicory inulin products, hydrolysates and derivatives. European Patent Application, EP 0930317 AI.
- Tsujimoto, Y., Watanabe, A., Nakano, K., Watanabe, K., Matsui, H., Tsuji, K., Tsukihara, T. ve Suzuki, Y. (2003). Gene cloning

ing, expression, and crystallization of a thermostable exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 180-185.

Uhm, T.B., Chae, K.-S., Lee, D.W., Kim, H.-S., Cassart, J.-R. ve Vandenhoute, J. (1998). Cloning and nucleotide sequence of the endoinulinase-encoding gene, *inu2*, from *Aspergillus ficuum*. *Biotechnol. Lett.* 20, 809-812.

Uhm, T.B., Chung, M., Lee, S.H., Gourronc, F., Housen, I., Kim, J.H., Van Beeumen, J., Have, B. ve Vandenhoute, J. (1999). Purification and characterization of *Aspergillus ficuum* endoinulinase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 146-151.

Uzunova, K., Vasileva, A., Kambourova, M., Ivanova, V., Spasova, D., Mandeva, R., Dereкова, A. ve Tonkova, A. (2001). Production and properties of a bacterial thermostable exo-inulinase. *Z. Naturforsch.* 56c, 1022-1028.

Vandamme, E.J. ve Derycke, D.G. (1983). Microbial inulinases: Fermentation process, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 29, 139-176.

Van den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J., Verhaert, P. ve Van Laere, A. (2000). Cloning and functional analysis of chicory root fructan1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall invertase ancestor mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme. *Plant J.* 24, 447-456.

Van Loo, J. and Hermans, J. (2000). Inulin products with improved nutritional properties. European Patent Application, EP 1125507 A1.

Vullo, D.L., Coto, C.E. ve Sineriz, F. (1991). Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbaceae* (Vell Rusby). *Appl. Environ. Microbiol.* 57(8), 2392-2394.

Xiao, R., Tanida, M. ve Takao, S. (1989). Purification and characteristics of two exoinulinases from *Chrysosporium pannorum*. *J. Ferment. Bioeng.* 67, 331-334.

Zittan, L. (1981). Enzymatic hydrolysis of inulin-an alternative way to fructose production. *Starch* 33, 373-377.



Meltem AŞAN

ÖZUSAĞLAM, 1976 yılında Osmaniye'nin Kadırlı ilçesinde doğdu. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü'nde yüksek lisans ve doktora eğitimini Genetik Bilim Dalı'nda

tamamladı. 2008 yılından itibaren Aksaray Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yrd.Doç.Dr. olarak görev yapmaktadır. Uzmanlık alanları içerisinde genetik, mikrobiyoloji, biyoteknoloji, rekombinant organizmalar, gen klonlama, rekombinant enzimler yer almaktadır.