



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



***Zymomonas mobilis* LEVANSUKRAZİNİN ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KRİSTALİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Güler SÖZGEN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

Zymomonas mobilis LEVANSUKRAZİNİN
ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
KRİSTALİZASYONU

Güler SÖZGEN

Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Burcu KAPLAN TÜRKÖZ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Gıda Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

İzmir
2019

Güler SÖZGEN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Zymomonas mobilis* Levansukrazının Üretimi, Saflaştırılması ve Kristalizasyonu” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 28/03/2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Dr. Öğr. Üyesi Burcu KAPLAN TÜRKÖZ

Raportör Üye : Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR

Üye : Prof. Dr. Zehra SAYERS

İmza

.....
.....
.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Zymomonas mobilis* Levansukrazının Üretimi, Saflaştırılması ve Kristalizasyonu” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

28/03/2019



Güler SÖZGEN

ÖZET***Zymomonas mobilis* LEVANSUKRAZININ ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KRİSTALİZASYONU**

SÖZGEN, Güler

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Burcu KAPLAN TÜRKÖZ

Mart 2019, 96 sayfa

Levansukrazlar (E.C.2.4.1.10), sakkarozu substrat olarak kullanarak fruktoz polimerlerinin oluşumunu katalizleyen ve yüksek hidroliz aktiviteleri nedeniyle GH68 glikozit hidrolaz enzim ailesinde yer alan enzimlerdir. Bu tezde *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 levansukrazının üretimi, saflaştırılması ve üç boyutlu yapının elde edilmesi için kristalizasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

Hücre dışı bir enzim olan *Z. mobilis* levansukrazı 159.01 g/L başlangıç substrat konsantrasyonunda, 30.3 °C sıcaklıkta ve pH 4.91'de statik fermantasyon ile üretilmiştir.

Saflaştırma için ilk önce ve fermantasyon ortamından hücreler santrifüj yoluyla ayrılmıştır. Levansukrazı içeren üstfaz liyofilize edilerek hacim azaltılması gerçekleştirilmiş ve farklı tamponlar (sitrat fosfat, fosfat, hepes) ve farklı pH'lara (5.4, 7.0, 8.0, 7.4) karşı diyaliz edilmiştir. İleri saflaştırma için iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak levansukraz enzimi saflaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en iyi saflık ve homojenlik 100 mM Hapes pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT tamponu ile elde edilmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi ile enzim dimerik ve monomerik formlarda birbirinden ayrı olarak elde edilmiştir.

Safılaştırmanın farklı aşamalarında elde edilen proteinler ile hem sallanan hem de oturan damla yöntemleri ile birçok farklı kristalizasyon koşulu denenmiştir. Yapılan 744 farklı deneme sonrasında levansukraz kristalleri elde edilememiştir.

Z. mobilis levansukrazın levan üretme aktivitesi araştırılmıştır. Levan üretme aktivitesi zimogram analizi ile belirlendikten sonra levan üretimi için farklı sıcaklık ve süreler denenmiş ve denemeler arasında en iyi inkübasyon süresi ve sıcaklığı 24 saat ve 25 ° C olarak bulunmuştur. Levan üretim miktarına etki eden faktörler incelenmiş ve artan NaCl konsantrasyonunda levan üretiminde azalma olduğu görölmüştür. Ayrıca 10 mM EDTA ve MgCl₂ varlığında enzimin levan üretim aktivitesinde azalma olduğu bulunmuştur. Denemeler sonucunda *Z. mobilis* levansukrazı ile 62.42 ±0.28 g/L levan üretimi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Zymomonas mobilis*, levansukraz, levan, safılaştırma, kristalizasyon, protein yapı-işlev ilişkisi

ABSTRACT**PRODUCTION, PURIFICATION AND CRYSTALLISATION OF
Zymomonas mobilis LEVANSUCRASE**

SÖZGEN, Güler

Msc. in Food Engineering

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Burcu KAPLAN TÜRKÖZ

March 2019, 96 pages

Levansucrases [E.C.2.4.1.10] are β -D fructosyltransferase enzymes which catalyze the formation of fructose polymers using sucrose as substrate and are also classified in glycoside hydrolase (GH) family 68 due to their high hydrolysis activity. In this thesis, production, purification and crystallization of levansucrase by *Z. mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 was investigated.

Extracellular levansucrase of *Z. mobilis* was produced by static culture fermentation at an initial substrate concentration of 159.01 g / L, a temperature of 30.3 ° C and a pH of 4.91.

At the first step of purification cells were separated by centrifugation. The enzyme containing supernatants were lyophilized and dialyzed against different buffers (citrate phosphate, phosphate, hepes) with different pH values (5.4, 7.0, 8.0, 7.4). Levansucrase was further purified by ion exchange and gel filtration chromatography. The highest purity and homogeneity were obtained in buffer 100 mM Hepses pH 7.4, 150 mM NaCl and 1 mM DTT. The monomeric and dimeric form of levansucrase were separated by gel filtration.

The crystallization conditions were investigated using both hanging drop and sitting drop techniques with the proteins obtained at different stages of purification. After 744 trials levansucrase crystals could not be obtained.

Levan production activity of levansucrase was investigated. Levan production activity of levansucrase was shown by zymogram analysis and after that levansucrase's incubation time and temperature for levan production were found as 24 h and 25°C. Effects of ionic strength and different metal ions on levan production activity of *Z. mobilis* levansucrase were also investigated. Levan production decreased in the presence of increasing concentration of NaCl, in the presence of 10 mM EDTA significantly and also decreased in the presence of 10 mM MgCl₂. As a result, 62.42 ±0.28 g/L levan was produced.

Keywords: *Zymomonas mobilis*, levansucrase, levan, purification, crystallization, protein structure-function relationship

ÖNSÖZ

Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında gerçekleştirilen “*Zymomonas mobilis* Levansukrazının Üretimi, Saflaştırılması ve Kristalizasyonu” başlıklı tez çalışması başarı ile tamamlanmıştır.

Bu tez çalışmasını gerçekleştirmemdeki ilk amacım laboratuvarında nasıl çalışılması, sonuçların nasıl alınması ve nasıl raporlandırılması gerektiğini kavramaktı. Ana amacım ise lisansımı tamamladığım bölümde ve ülkemizde sınırlı yerlerde çalışılan kristalizasyon/kristalografi konularına giriş yapabilmek, elde ettiğim verileri ulusal ve uluslararası platformlarda sunmak ve bu verilerden yayınlar yapabilmektir.

Bu tez sırasında, Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde bulunan cihazlara nasıl erişileceği, nasıl kullanılacağı ve karşılaşılan sorunlar karşısında neler yapılabileceğini öğrendim. Protein saflaştırma, kristalizasyon/kristalografi gibi öğrenmesi ve uygulaması uzun süreçler isteyen konularda çalışmalar yaptım. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçları çoğunluğu uluslararası olan kongre, çalıştay gibi platformda sunup, konu hakkında derin bilgiye sahip olan kişiler ile bilgi alışverişi fırsatı buldum. En heyecan verici olanı Nobel ödüllü Sayın Ada E. Yonath ile tanışma fırsatı bulmuş olmamdı.

Yaptığım bu tez sayesinde Almanya Hamburg’da bulunan EMBL bünyesindeki SPC laboratuvarında staj yapma ve kristalografi için hayati olan ve dünyada sınırlı yerlerde bulunan sinkrotron içerisinde çalıştım, X-ışını ile veri toplama konularında bilgi ve deneyim kazandım, ayrıca yurtdışında bir laboratuvarında işleyişin nasıl ilerlediğini de görme fırsatı buldum.

Bütün bu nedenlerden dolayı gerçekleştirdiğim bu tez çalışmasının başarı ile sonuçlandığı ve bana çokça katkısı olduğunu düşünmekteyim.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT..... | ix |
| ÖNSÖZ | xi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xvii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xxi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xxii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1 Levansukraz Enzimleri | 3 |
| 2.1.1 Levansukrazların Ürettikleri Ürünler..... | 12 |
| 2.1.1.1 Fruktooligosakkaritler (FOS)..... | 12 |
| 2.1.1.2 Levan..... | 15 |
| 2.1.2 <i>Zymomonas mobilis</i> Levansukrazın Yapısının Modellemesi | 17 |
| 2.2 Kromatografik Saflaştırma Yöntemleri | 18 |
| 2.2.1 İyon değişim kromatografisi | 21 |
| 2.2.2. Jel filtrasyon kromatografisi | 22 |
| 2.3 Kristalizasyon | 23 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 2.3.1 Tarihten Kristalizasyona Bakış | 23 |
| 2.3.2 Kristalizasyon için Temel Adımlar | 26 |
| 2.3.3 Teknikleri | 27 |
| 2.3.3.1 Batch Kristalizasyon | 27 |
| 2.3.3.2 Sıvı-Sıvı Difüzyonu | 27 |
| 2.3.3.3 Buhar Difüzyonu | 28 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 30 |
| 3.1 Gereç | 30 |
| 3.1.1 Mikroorganizma ve Kültür Koşulları | 30 |
| 3.1.2 Üretim ortamı | 30 |
| 3.2 Yöntemler | 31 |
| 3.2.1 Fermantasyon ve Levansukraz Üretimi | 31 |
| 3.2.2 Hücre Yoğunluğu (OD) | 31 |
| 3.2.3 Üst Faz Bulanıklık Değeri | 31 |
| 3.2.4 Levansukraz Enzim Aktivite Tayini | 32 |
| 3.2.5 Protein tayini | 33 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 3.2.6 A280 değeri..... | 34 |
| 3.2.7 Ön İşlem ve Liyofilizasyon..... | 34 |
| 3.2.8 Amonyum Sülfat Çöktürme..... | 35 |
| 3.2.9 Diyaliz..... | 35 |
| 3.2.10 İyon Değişim Kromatografisi..... | 36 |
| 3.2.11 Jel Filtrasyon Kromatografisi..... | 36 |
| 3.2.12 Elektroforez..... | 37 |
| 3.2.13 Kristalizasyon..... | 38 |
| 3.2.14 Kısıtlı Proteoliz..... | 38 |
| 3.2.15 Ham levansukraz ile levan üretimi..... | 39 |
| 3.2.16 pH ölçümü..... | 40 |
| 3.2.17 Yapısal modelleme ve modellerin grafik gösterimi..... | 40 |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA..... | 42 |
| 4.1 Levansukrazın Üretimi..... | 42 |
| 4.2 Levansukrazın Saflaştırılması..... | 43 |
| 4.2.1 Amonyum Sülfat Çöktürme..... | 43 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 4.2.2 Levansukraz Enziminin Tampon 1 Kullanılarak Saflaştırılması | 46 |
| 4.2.3 Levansukraz Enziminin Tampon 2 Kullanılarak Saflaştırılması | 47 |
| 4.2.4 Levansukraz Enziminin Tampon 3 Kullanılarak Saflaştırılması | 49 |
| 4.2.5 Levansukraz Enziminin Tampon 4 Kullanılarak Saflaştırılması | 50 |
| 4.2.6 Levansukrazın Depolama Koşullarının İncelenmesi | 55 |
| 4.2.7 Saflaştırma Özeti..... | 57 |
| 4.3 Levansukraz Kristalizasyon Denemeleri | 61 |
| 4.3.1 Levansukrazın Kısıtlı Proteolizi..... | 64 |
| 4.4 Ham Levansukraz ile Levan Üretimi | 71 |
| 4.4.1 Levansukrazın Elde Edilmesi..... | 71 |
| 4.4.2 Levan Üretim Süresi ve Sıcaklığı | 71 |
| 4.4.3 Levan Üretimine İyonik Yük, EDTA ve Metal İyon Etkisi..... | 73 |
| 4.4.4 Ham Levansukraz ile Levan Üretim Verimi..... | 75 |
| 5. SONUÇ | 76 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ | 78 |
| TEŞEKKÜR..... | 93 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---------------|--------------|
| ÖZGEÇMİŞ..... | 95 |
| EKLER..... | 97 |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Şekil 2.1 Levansukraz enziminin görev aldığı tepkimelerle, bu tepkimelerdeki alıcı ve verici moleküller..... | 3 |
| Şekil 2.2 Erwinia amylovora (sarı) ve Bacillus subtilis (mavi) levansukrazının yapısal hizalamasının karton gösterimi..... | 6 |
| Şekil 2.3 B. subtilis, Z. mobilis ve E. amylovora levansukrazların çoklu dizi hizalaması..... | 7 |
| Şekil 2.4 B. subtilis , Z. mobilis ve E. amylovora levansukrazların filogenetik ağaç analizi..... | 8 |
| Şekil 2.5 B. subtilis ve G. diazotrophicus levansukrazlarının aktif bölge amino asit koordinasyonları..... | 9 |
| Şekil 2.6 Sakkaroz substratından fruktosiltransferaz (FTaz) enzimleri kullanılarak fruktooligosakkarit sentezi..... | 14 |
| Şekil 2.7 Doğal fruktoz polimeri olan levanın kimyasal yapısı..... | 16 |
| Şekil 2.8 Z. mobilis levansukrazın üç boyutlu yapı modelleme sonucu..... | 18 |
| Şekil 2.9 Rezolüsyon değerinin ölçümü..... | 20 |
| Şekil 2.10 Protein kristalizasyonu faz diyagramı gösterimi..... | 27 |
| Şekil 2.11 Protein kristalizasyonunda (a) sallanan damla (b) silikonize camdamla gösterimi..... | 28 |
| Şekil 2.12 Protein kristalizasyonunda oturan damla gösterimi..... | 29 |
| Şekil 3.1 İndirgen şeker tayininde kullanılan DNS yöntemi için örnek glukoz standart eğri grafiği..... | 33 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Şekil 3.2 Protein tayininde kullanılan Bradford yöntemi için örnek BSA standart grafiği. | 34 |
| Şekil 3.3 Superdex-200 jel filtrasyon kolon kalibrasyon eğrisi. | 37 |
| Şekil 3.4 Ticari levan ile oluşturulan levan standart grafiği. | 40 |
| Şekil 4.1 Z. mobilis fermantasyon sonrası üst fazın %12 SDS PAGE jelde incelenmesi L: Protein ladder, 1: 4 kat seyreltilmiş örnek. Levansukraz bandı yıldız ile işaretlenmiştir. | 42 |
| Şekil 4.2 Saflaştırma Stratejisi Şeması. | 43 |
| Şekil 4.3 Z. mobilis levansukrazın amonyum sülfat çöktürme sonrası %12 SDS-PAGE ile incelenmesi. | 44 |
| Şekil 4.4 Levansukraz 22 mM sitrat-fosfat pH 5.4 tamponda anyon değişim saflaştırma sonucu, amonyum sülfat çöktürme DEAE, 1mL kolon. | 45 |
| Şekil 4.5 Levansukraz anyon değişim saflaştırma sonucu, tampon 22 mM sitrat-fosfat pH 5.4, HiTrap Q HP 5 mL. | 47 |
| Şekil 4.6 Levansukraz anyon değişim saflaştırma sonucu, tampon 100 mM potasyum fosfat pH 7.0, HiTrap Q HP 5 mL. | 48 |
| Şekil 4.7 Levansukraz anyon değişim saflaştırma sonucu, tampon 100 mM potasyum fosfat pH 8.0, HiTrap Q HP 5 mL. | 50 |
| Şekil 4.8 Levansukraz anyon değişim saflaştırma sonucu, tampon 100 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM DTT, HiTrap Q HP 5 mL. | 51 |
| Şekil 4.9 Levansukraz jel filtrasyon saflaştırma sonucu, tampon 100 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM DTT, Superdex 200 kolon akış hızı 0.3 mL/dak. | 52 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Şekil 4.10 Levansukraz jel filtrasyon saflaştırma sonucu, tampon 100 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl ,10 mM DTT..... | 54 |
| Şekil 4.11 Levansukraz jel filtrasyon saflaştırma sonucu, tampon 100 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl ,10 mM DTT..... | 55 |
| Şekil 4.12 Depolama koşullarının belirlenmesi için hazırlanan örneklerle yürütülen %12 SDS-Page jel..... | 56 |
| Şekil 4.13 Levansukraz UV bölge absorpsiyon spektrası..... | 56 |
| Şekil 4.14 Levansukraz ile konsantrasyon taraması. | 59 |
| Şekil 4.15 (a) Mosquito-LCP (ttplabtech) kristal robotu. (b) Oturan damla plaka görseli..... | 61 |
| Şekil 4.16 (a) Laboratuvarda kullanılan Euromex Nexius Zoom stereo mikroskobu. (b) Oturan damla plaka görseli. | 63 |
| Şekil 4.17 Tripsin proteolizi sonrası örneklerin sds-page ile incelenmesi..... | 64 |
| Şekil 4.18 Lsc yapı modeli üzerinde tripsin proteolizi tahmini..... | 65 |
| Şekil 4.19 Farklı ligandlar varlığında tripsin proteolizi sonrası örneklerin %12 SDS-PAGE ile incelenmesi. | 68 |
| Şekil 4.20 Çinko ve diğer metal iyonları içeren kristalizasyon plakası. | 69 |
| Şekil 4.21 Levansukraz kristalizasyon damlaları 0. ve 3. gün mikroskop görüntüleri. Damla ve rezervuar içerikleri verilmiştir. | 70 |
| Şekil 4.22 Santrifugasyon ve filtrasyonla elde edilen ham levansukrazın 25 °C'de levan üretimi. | 71 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

Şekil 4.23 Ham levansukraz ile zimogram analizi ve levan üretimi.....72

Şekil 4.24 25 °C'de 24 saat boyunca gerçekleştirilen levan reaksiyonlarının farklı NaCl konsantrasyonlarında 400 nm absorbans değeri.73

Şekil 4.25 25 °C'de 24 saat boyunca gerçekleştirilen levan reaksiyonlarının farklı EDTA konsantrasyonlarında 400 nm absorbans değeri.74

Şekil 4.26 25 °C'de 24 saat boyunca gerçekleştirilen levan reaksiyonlarının farklı metal iyonları varlığında 400 nm absorbans değeri.74

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Çizelge 2.1 Levansukraz enzimini sentezleyen mikroorganizmalar..... | 5 |
| Çizelge 2.2 Kromatografi mekanizmaları için sabit ve hareketli fazlar. | 19 |
| Çizelge 2.3 Kristalografi alanında Nobel ödülü alan bilim insanları..... | 24 |
| Çizelge 2.4 Protein veri bankasında bulunan makromoleküller ve elde edilme yöntemlerinin analizi..... | 25 |
| Çizelge 3.1 Stok besiyeri bileşimi..... | 30 |
| Çizelge 3.2 Aşı ve üretim ortamlarının bileşimi. | 30 |
| Çizelge 4.1 Depolama analizleri için hazırlanan örneklerin protein miktarları. | 57 |
| Çizelge 4.2 Verilen örneklerin protein miktarlarının A280 ve Bradford yöntemi ile karşılaştırılması. | 58 |
| Çizelge 4.3 Verilen aşamalardaki protein miktarları. | 59 |
| Çizelge 4.4 Verilen aşamalardaki ortalama aktivite miktarları..... | 60 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| Simgeler | Açıklama |
|-----------------|------------------------|
| g | gram |
| kDa | kilo Dalton |
| L | Litre |
| mg | miligram |
| mL | militre |
| mM | milimol |
| nm | nanometre |
| °C | Santigrat |
| rpm | revolutions per minute |
| v/v | hacimce yüzde |
| µg | mikrogram |
| µL | mikrolitre |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

| Simgeler | Açıklama |
|---|---|
| BSA | Sığır serum albümin |
| DNS | di-nitro salisilik asit |
| DTT | dithiothreitol |
| FOS | Fruktooligosakkarit |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Amonyum Sülfat |
| K_2HPO_4 | Potasyum fosfat dibazik |
| KH_2PO_4 | Potasyum dihidrojen fosfat |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Magnezyum sülfat heptahidrat |
| NaCl | Sodyum klorit |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| SDS-PAGE elektroforezi | Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel |

1. GİRİŞ

Levansukrazlar (E.C.2.4.1.10), GH68 glikozit hidrolaz enzim ve fruktosil transferaz ailesinde yer alan ve polimerizasyon, hidroliz, transfruktalizasyon reaksiyonlarında görev alan enzimlerdir (Chambert et al., 1974). Fruktosil alıcı moleküle bağlı olarak levan ya da fruktooligosakkarit (FOS) gibi ürünleri oluşturabilmektedirler (Yanase et al., 1992). Enzimin kökenine bağlı olarak oluşan ürünlerin de farklı olduğu ve Gram pozitif kaynaklardan elde edilen levansukrazların levan polimeri sentezlerken (Chambert et al., 1974; Homann et al., 2007), Gram negatif kaynaklardan elde edilen levansukrazların oligosakkarit ürettikleri belirtilmiştir (Caputi et al., 2013; Hernandez et al., 1995; Visnapuu et al., 2015). Bunlardan farklı olarak *Zymomonas mobilis* levansukrazları farklı başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık gibi değişkenler altında hem levan hem de FOS üretme yeteneğine sahiptirler (Santos-Moriano et al., 2015).

Zymomonas mobilis Gram negatif, fakültatif anaerobik ve çubuk şekilli bir bakteridir (Rogers, et al., 1982). İlk olarak şeker içeriği zengin olan şeker kamışı ve agav sapı gibi bitkilerden izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Sahm, et al., 2006). *Z. mobilis* sakkaroz içeren fermantasyon ortamlarında levansukraz üretir ve hücre dışına salgılar (Borsari et al., 2006).

Levan fruktoz birimlerinin $\beta(2\rightarrow6)$ glikozit bağları ile bağlanmasıyla oluşan bir fruktoz polimeridir (Arvidson et al., 2006). Gıda, kozmetik, ilaç gibi birbirinden farklı endüstrilerde kullanılan; ticari üretimi 1930'lu yıllarda ABD'de başlayan doğal bir polimerdir (Ergene ve Avcı, 2016; Srikanth et al., 2014). Prebiyotik özelliğe sahiptir, anti-irritan, antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri de bulunmaktadır (Ki-Hyo et al., 2003; Öner et al., 2016). Biyobozunur ambalaj malzemesi olarak da kullanılabilir (Vijayendra and Shamala, 2014). FOS'lar sakkaroz göre 3 kat daha az tatlı olan ve doğal olarak gıdalarda bulunan şeker polimerleridir (Daudé et al., 2012). pH 4.0-7.0 gibi geniş pH aralığında depolanabildikleri için gıda katkı maddesi olarak kullanım potansiyelleri bulunmaktadır (Ganaie et al., 2014).

GH 68 glikozit hidrolaz enzim ailesi içerisinde yer alan levansukraz enzimlerinden *Bacillus subtilis* (pdb:1OYG) (Meng and Fütterer, 2003), *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4 (pdb:1W18) (Martínez-Fleites et al., 2005), *Bacillus megaterium* (Strube et al., 2011), *Erwinia amylovora* (pdb: 4D47) (Wuerges et al., 2015) ve *Erwinia tasmaniensis* (pdb: 6FRW) (Polsinelli et al., 2019) levansukrazlarının üç boyutlu atomik yapıları çözülmüştür. *B. subtilis* bakterisinden elde edilen levansukraz tercihen levan üretirken, *G.diazotrophicus* levansukrazı ise tercihen FOS sentezlemektedir. *Z. mobilis* levansukrazı bu iki levansukrazdan farklı olarak her iki fruktanı da yüksek verimde üretebilmektedir. *Z. mobilis* levansukrazının bu ürün özgülüğünü incelemek için çalışmalar yapılmış ancak saflaştırılıp üç boyutlu atomik yapısı çözümediği için farklılığın sebebi moleküler düzeyde anlaşılamamıştır.

Z. mobilis levansukrazının saflaştırılması ile ilgili yapılan pek çok çalışma vardır ancak yüksek saflık ve konsantrasyonda saflaştırma gerçekleştirilemediği için rekombinant üretim ile saflaştırma yöntemleri denenmiştir. Rekombinant olarak *Escherichia coli* hücrelerinde üretilen *Z. mobilis* levansukrazının sitoplazmik olarak üretildiği ve hücre dışına salgılanmadığı görülmüştür (Goldman et al., 2008; Yanase et al., 1998). Yine yapılan farklı bir çalışmada inklüzyon cisimciklerinde toplandığı bildirilmiştir (Sunitha et al., 2000).

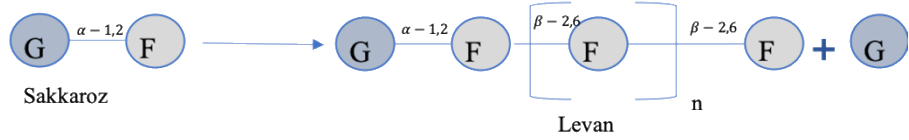
Bu tez çalışmasında Gram negatif fakültatif anaerobik bir bakteri olan *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 suşu kullanılarak hücre dışı levansukraz enziminin üretimi, saflaştırılması ve kristalizasyonu üzerine çalışılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında levansukraz enzimi hücre dışında üretilmiştir. Daha sonra ise saflaştırma için izlenmesi gereken yol araştırılmış, saflaştırma koşulları farklı tamponlar, pH değerleri ve kromatografik yöntemler denenerek incelenmiştir. Çalışma sonucunda *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 levansukraz enzimi için optimum saflaştırma koşulu bulunmuştur. Saf enzimin eldesinin ardından kristalizasyon koşulları farklı çözeltiler ile plakalar oluşturularak incelenmiş ve kristalizasyon koşulları üzerine denemeler gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Levansukraz Enzimleri

Levansukrazlar (E.C.2.4.1.10), fruktosil transferaz ve glikozit hidrolaz enzim ailesinde yer alırlar ve polimerizasyon, hidroliz ve transfruktalizasyon olmak üzere üç reaksiyon katalizlerler. Polimerizasyon reaksiyonunda sakkaroz verici molekül olarak görev almakta ve küçük levan birimleri de alıcı molekül olarak davranarak uzun zincirli levan polimeri sentezlenmektedir (Chambert et al., 1974). Enzim hidroliz reaksiyonu ile fermantasyon ortamında bulunan sakkarozun $\alpha(2\rightarrow1)$ bağlarının parçalanmasını katalizler ve sakkaroz, glukoz ve fruktoza dönüşür (Santos-Moriano et al., 2015). Transfruktosilasyon reaksiyonu ile de sakkaroz ve serbest glukoz gibi alıcı moleküllere fruktozil gruplarının transferi gerçekleşmektedir (Belghith et al., 2012). Şekil 2.1’de levansukrazın görev aldığı tepkimeler gösterilmiştir.

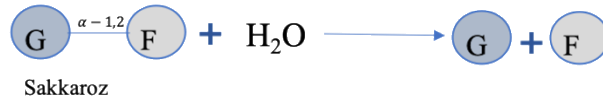
1. Polimerizasyon



2. Transfruktosilasyon



3. Hidroliz



Şekil 2.1 Levansukraz enziminin görev aldığı tepkimelerle, bu tepkimelerdeki alıcı ve verici moleküller

(Li et al., 2015).

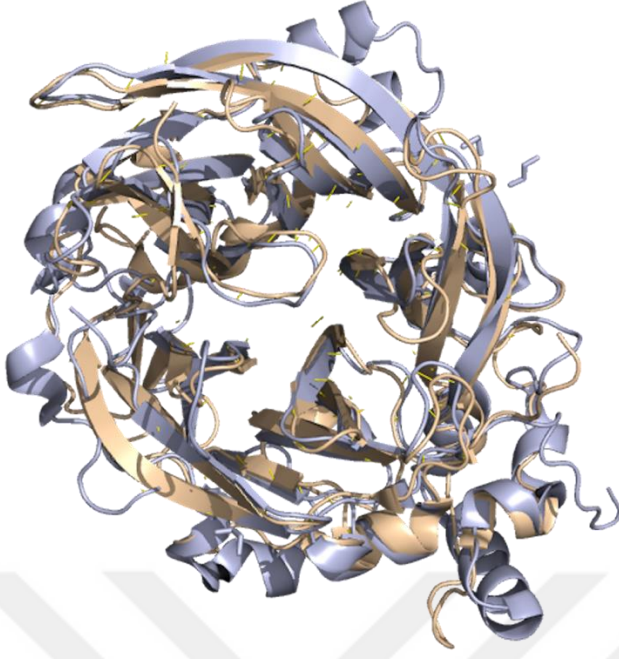
Enzimin mikrobiyal kökenine bağlı olarak oluşan ürünlerin farklı olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar genellikle Gram pozitif (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Streptococcus salivarius* vb.) bakterilerden üretilen levansukraz enziminin uzun zincirli levan polimeri sentezlerken (Chambert et al., 1974; Homann et al., 2007), Gram negatif bakteri kökenli olanların genellikle oligosakkarit ürettiklerini göstermiştir (Caputi et al., 2013; Hernandez et al., 1995; Visnapuu et al., 2015).

Levansukraz enziminin üreticisi olarak *Bacillus subtilis* (Beine et al., 2008), *Erwinia amylovora* (Caputi et al., 2013), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Martínez-Fleites et al., 2005), *Lactobacillus reuteri* 121 (Biedendieck et al., 2007) , *Pseudomonas syringae* (Visnapuu et al., 2011)ve *Zymomonas mobilis* (Bekers et al., 2002) gibi birçok mikroorganizma kullanılmaktadır. Levansukraz enzimini üreten bazı mikroorganizmalar çizelge 2.1’de verilmiştir. *Bacillus subtilis* (Chambert et al., 1974), *Acetobacter diazotrophicus* (Hernandez et al., 1995), *Erwinia amylovora* (Caputi et al., 2013), *Pseudomonas syringaepathovar* (Hettwer et al., 1995) ve *Zymomonas mobilis* (Erdal et al., 2017) levansukrazları karakterize edilmiştir.

Çizelge 2.1 Levansukraz enzimini sentezleyen mikroorganizmalar.

| Mikroorganizma | Referans |
|--|---------------------------------|
| <i>Acetobacter diazotrophicus</i> | (Hernandez et al., 1995) |
| <i>Acetobacter xylinum</i> NCI 1005 | (Tajima et al., 2000) |
| <i>Actinomyces viscosus</i> | (Pabst, 1977) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | (Beine et al., 2008) |
| <i>Bacillus megaterium</i> | (Korneli et al., 2013) |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | (Tian et al., 2011) |
| <i>Bacillus methylotrophicus</i> SK 21.002 | (Zhang et al., 2014) |
| <i>Bacillus licheniformis</i> RN – 01 | (Nakapong et al., 2013) |
| <i>Erwinia amylovora</i> | (Caputi et al., 2013) |
| <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> | (Martínez-Fleites et al., 2005) |
| <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 | (Inthanavong et al., 2013) |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> 121 | (Biedendieck et al., 2007) |
| <i>Leuconostoc mesenteroids</i> B-512 FMC | (Kang et al., 2005) |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | (Visnapuu et al., 2011) |
| <i>Pseudomonas syringaepathovar</i> | (Hettwer et al., 1995) |
| <i>Pantoea agglomerans</i> (= <i>Erwinia herbicola</i>) | (Hettwer et al., 1995) |
| <i>Streptococcus salivarius</i> (SS2). | (Simms et al., 1990) |
| <i>Zymomonas mobilis</i> | (Bekers et al., 2002) |

GH68 enzim ailesi içinden ilk üç boyutlu kristal yapısı çözülen bakteriyel levansukraz (SacB) *Bacillus subtilis* (pdb:1OYG) levansukrazıdır (Meng and Fütterer, 2003). Daha sonra *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4 (pdb:1W18) levansukrazı (LdsA) (Martínez-Fleites et al., 2005), *Bacillus megaterium* (pdb:3OM2) levansukrazı (Strube et al., 2011), *Erwinia amylovora* (pdb: 4D47) levansukrazının (Wuerges et al., 2015) üç boyutlu atomik yapıları çözülmüştür. Levansukrazların beş bıçaklı beta pervane (five-bladed- β -propeller) yapısına sahip olduğu görülmüştür (Şekil 2.2). Pervane motifinde proteinlerin N ve C uçları birbirleri ile hidrojen bağı yaparak kapanır. Levansukrazların yapılarında ise iki uç düzensiz bir zincir ile birleşmekte ve protein yapısının esnek olmasını sağlamaktadır. Bu kapanma sayesinde merkezde açık bir baca oluşmakta ve enzimin substratı bu açıklık sayesinde aktif bölgeye ulaşabilmektedir. Yapının çözülmesi ile aktif bölgedeki eksi yüklü derin cebin sakkaroz bağlayabilen bir bölge olduğu ve boşluğun üst kısmına glukoz, alt kısmına fruktoz moleküllerinin bağlandığı görülmüştür (Meng and Fütterer, 2003).



Şekil 2.2 *Erwinia amylovora* (sarı, pdb: 4D47) ve *Bacillus subtilis* (mavi, pdb: 1OYG) levansukrazının yapısal hizalamasının karton gösterimi.

```

BsLsc      MNIKKFAKQATVLTFTTALLAGGATQAFAKETNQPKYKETYGISHITRHDMLQIPEQQKN 60
ZmLsc      -----MLNKA-----GIAEPSLWTRADAMKVHTDDPT 27
EaLsc      -----MSD-----YNYKPTLWTRADALKVHEDDPT 25
           .                               : * * * : : : .

BsLsc      EKYQVPEFDSSTIKNISSAKGLDVWDSWPLQNADGTVANYHGYHIVFALAGDPKNAD--- 117
ZmLsc      ATMPTIDYD----FPVMTDKYWWDTWPLRDINGQVVSFQGWSVIFALVADRTK---- 77
EaLsc      TTQPVIDIA----FPVMSEEVFIWDTMPLRDFDGEIISVNGWCIIFTLTADRNTDNPQF 80
           . . :                               : * * : * * : * * : * * : * * . .

BsLsc      -----DTSIYMFYQKVGETSIDSWKNAGRVPKDSKFDANDSILKDQ 159
ZmLsc      -----YGWHNRNDGARIGYFYSRGG----SNWIFGGHLLKDG-----ANPR 114
EaLsc      QDENGYDITRDWEDRHGRARICYWYSRTG----KDWIFGGRVMAEG-----VAPT 127
           : * : * : * . * . * : : : .

BsLsc      TQEWSSGATFTSDG--KIRLFYTD FSGKHGKQTLTTAQNVSASDSSLNINGVEDYKSI 217
ZmLsc      SWEWSGCTIMAPGTANSVEVFFTSVNDTPSE--SVAQCKGYIYADKSLVWDFGDKVTDL 173
EaLsc      TREWAGTPILLNDRG--DIDLYYTCVTP--G--ATI AKVRGKIVTSDQSVSLEGFQQVTSL 182
           : * * : * . . : : : * . . : : : * : : * * : * * : * * . . .

BsLsc      FDGDGKTYQNVQQFIDEGNYSSGDNHTLRDPHYV--EDKGHKYLVFEANTGTEDGYQEE 275
ZmLsc      FQADGLYYADYAE-----NNFWD FRDPHFV INPEDGKTYALFEGNVAMERGTVAVG 224
EaLsc      FSADGTIYQTEEQ-----NAFWNFRDPSPFIDRNDGKLYMLFEGNVAGPRGSHEIT 233
           * . * * * : . : * * * . . : : * : * * * . . *

BsLsc      SLFNKAYYGKSTSFRRQESQKLLQSDKKRTAELANGALGMIE--LNDDYTLKVKMKPLIAS 334
ZmLsc      E---EEIGPVPP-----KTETPDGARYCAAAIGIAQALNEARTEWKLPLPVTA 270
EaLsc      Q---AEMGNVPP-----GYEDVGGAKYQAGCVGLAVAKDLSGSEWQLPLP LITA 279
           . * : * . . : * : : : * * : :

BsLsc      NTVTDEIERANVFKMNGKWLFTT SRGSKMTIDGITSNDIYMLGYVS--NSLTGPYKPLNK 393
ZmLsc      FGVNDQTERPHVVFQNGLYLFTT SHHSTYA--DGLSGPD--GVYGFVSENGIFGYPYELNG 328
EaLsc      VGVNDQTERPHFVFQDGKYLF T SHKYTFA--DNLTGPD--GVYGFVSD--KLTGPYTPMNS 336
           * . * : * * . . : * * * * * . . : * : : * . : * * * : * * * : *

BsLsc      TGLVLKMDLDPNDVTFYSHFAVPQAKGNVIVTSYMTNRGFYA---DKQSTFAPSFL 449
ZmLsc      SGLVLGNPSS--QPYQAYSHYVMTNGLV----TSFIDTIPSSDPNVRYGGTLPAPTIKL 381
EaLsc      SGLVLGNPSS--QPFQTYSHYVMPNGLV----TSFIDSVPWKG--KDYRIGGTEAPT VKI 388
           : * * * . . : : * * : : . . * * : . . * * * : :

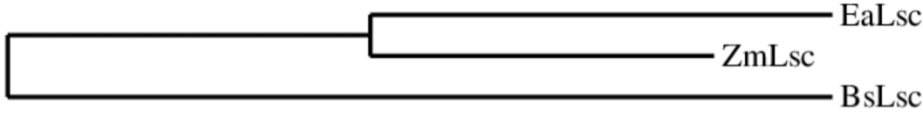
BsLsc      NIKGKTSVVKDSILEQGQLTVNK----- 473
ZmLsc      ELVGHRSFVTEVK--GYGYIPQIEWLAEDSSNSAAALS LNK 423
EaLsc      LLKGRSFI VDSF--DYGYIPAMKDITLK----- 415
           : * : : . . . * :

```

Şekil 2.3 *B. subtilis*, *Z. mobilis* ve *E. amylovora* levansukrazların çoklu dizi hizalaması.

BsLsc: *Bacillus subtilis* ZmLsc: *Zymomonas mobilis* ve EaLsc: *Erwinia amylovora* levansukrazlarıdır. Korunmuş bölgeler kutular ile gösterilmiştir. Hizalama Clustal Omega ile yapılmıştır.

Levansukraz dizileri filogenetik olarak incelendiğinde *Z. mobilis* ve *E. amylovora* levansukrazlarının evrimsel olarak birbirlerine *B. subtilis* levansukrazına göre daha yakın oldukları görülmektedir (Şekil 2.4).

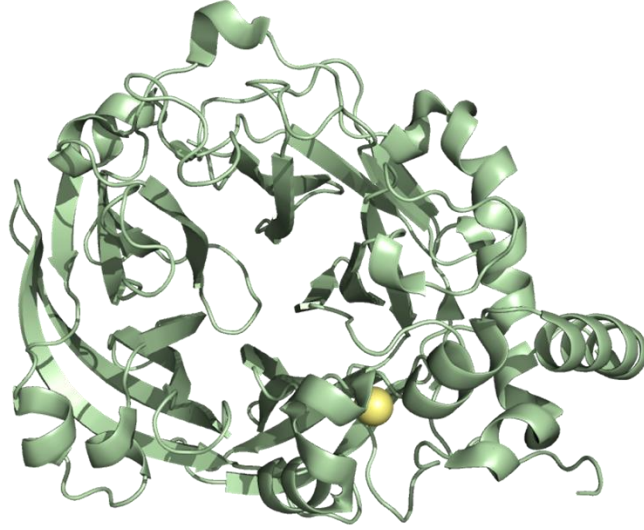


Şekil 2.4 *B. subtilis*, *Z. mobilis* ve *E. amylovora* levansukrazların filogenetik ağaç analizi.

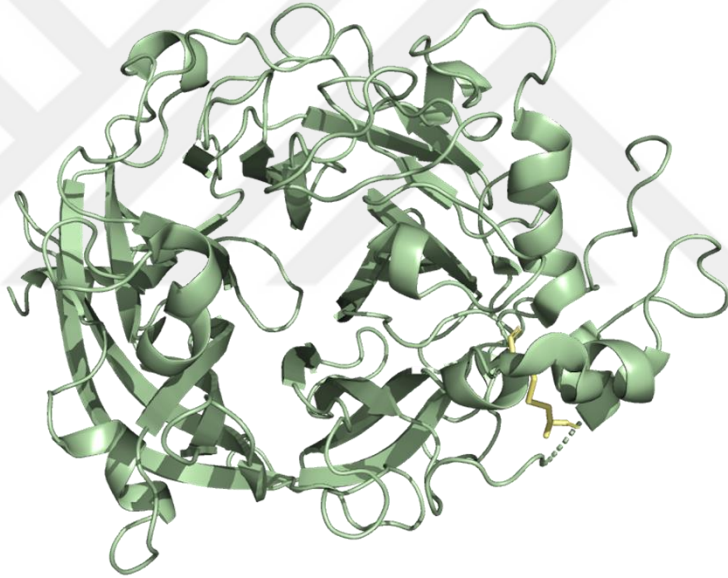
BsLsc: *Bacillus subtilis* ZmLsc: *Zymomonas mobilis* ve EaLsc: *Erwinia amylovora* levansukrazlarıdır. Korunmuş bölgeler kutular ile gösterilmiştir. Hizalama Clustal Omega ile yapılmıştır.

Farklı mikroorganizmaların ürettiği levansukrazların amino asit dizisi benzerliği yüksektir ve 5 korunmuş bölge öne çıkmaktadır. Bu bölgelerden ikisi, RDP ve DE/QXER, aktif bölge amino asitlerini içermektedir. Aktif bölge amino asitleri korunmuş olmasına rağmen, enzimlerin ürün tercihleri, aktif oldukları optimum koşullar gibi kinetik özellikleri birbirlerinden farklıdır.

Yapısı çözülen *B. subtilis* ve *G. diazotrophicus* levansukraz yapılarında aktif bölge amino asitlerinin aynı olduğu ancak koordinasyon atomlarının farklı olduğu görülmektedir. *B. Subtilis*'te kalsiyum, *G. diazotrophicus*'da ise disülfid bağları koordinasyon sağlamaktadır (Şekil 2.5). Bu iki levansukrazdan *B. subtilis* kökenli olan levan üretirken, *G. diazotrophicus* kökenli olan ise tercihen FOS sentezlemektedir. *Z. mobilis* levansukrazın bu iki enzimden en önemli farkı her iki fruktanı da yüksek verimde üretebilmesidir ve protein yapısının çözülmesi bu ikili aktivitenin sebebinin moleküler düzeyde anlaşılmasına yardımcı olacaktır.



(a)



(b)

Şekil 2.5 *B. subtilis* ve *G. diazotrophicus* levansukrazlarının aktif bölge amino asit koordinasyonları.

(a) *B. subtilis* (yeşil) levansukrazı ile kalsiyum (sarı) koordinasyonu gösterimi (b) *G. diazotrophicus* (yeşil) ve di sülfit bağları (sarı) koordinasyonu gösterimi.

Z. mobilis levansukrazın bu ikili aktivitesindeki ürün özgülüğünü incelemek için amino asit mutasyonu yaklaşımı kullanılan birçok çalışma

yapılmış ve bu çalışmalar sonucu kritik amino asitler His296, Cys244, Glu117, P340 olarak bulunmuştur (Li et al., 2008; Senthikumar et al., 2003; Yanase et al., 2002). *Z. mobilis* levansukrazının üç boyutlu atomik yapısı çözülmediği için bu amino asitlerin yeri bilinmemektedir. Bakar ve Kaplan-Türköz (2017) tarafından yapılan bir çalışmada *Z. mobilis* levansukrazın yapısı biyoinformatik yöntemler kullanılarak modellenmiştir. Elde ettikleri model 3 boyutlu atomik yapısı çözülen diğer bakteriyel levansukrazlara benzer olarak derin, negatif yüklü bir merkezi cep içeren beş bıçaklı beta pervane (five-bladed- β -propeller) yapısındadır. Bu çalışmayla yüzeyde yer alan aminoasitlerin transfruktalizasyon aktivitesinde yer alırken, merkezi cepte bulunan aminoasitlerin hidroliz aktivitesinde rol oynadığı bulunmuştur. Ancak elde edilen model üzerinde aktif merkezdeki atomik detaylar görülemediğinden iki aktivitenin sebebinin moleküler düzeyde anlaşılabilmesi için 3 boyutlu yapısının deneysel yöntemler ile çözülmesi önemlidir.

Levansukraz üretiminin literatürde çoğunlukla sıvı kültür fermantasyonu yöntemi ile gerçekleştirildiği bildirilmiştir (K. S. Belghith et al., 2012). Enzim üretimi fermantasyon yoluyla gerçekleştirilirken maksimum ürün miktarının eldesi için sıcaklık, pH, fermantasyon süresi vb. parametrelerin optimize edilmesi gerekir. *Z. mobilis* NRRL B-14023 ile yapılan çalışmada 159 g/L sakkaroz içeren pH 4.91 besiyerinde 30.3 °C'de 36 saat süreyle gerçekleşen fermantasyonda maksimum levansukraz üretimi gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Erdal et al., 2017).

Z. mobilis levansukrazının kısmi saflaştırılması ilk olarak Lyness ve Doelle (1983) tarafından gerçekleştirilmiştir. Levansukraz enzimi hücre dışı bir enzim olup fermantasyon ortamına salgılanmaktadır. Yapılan bir çalışmada *Z. mobilis* Z6C hücreleri kullanılmış ve %1 sakkaroz, %10 glukoz içeren fermantasyon ortamında 30 °C'de 24 saat büyütülmüştür. pH 7.0 fosfat tampon kullanılarak amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildikten sonra elde edilen levansukraz enzimi iyon değişim ve jel filtrasyonu kromatografileri kullanılarak saflaştırılmış ve dimerik formu elde edilmiştir (Yanase et al., 1992). Karakterize edilen enzimin transfruktosilasyon aktivitesi için optimum çalışma koşulları 5 °C ve 15 °C gibi daha düşük

sıcaklıklarken 30 °C ve 40 °C sıcaklıklarda hidroliz aktivesinin olduğu bildirilmiş ve 30 °C'de 24 saat süreyle aktivitesini koruduğu gösterilmiştir. Yapılan saflaştırma sonucu elde edilen protein konsantrasyonu 1.8 mg/L olarak bulunmuştur (Yanase et al., 1992). Crittenden ve Doelle (1994) tarafından yapılan bir çalışmada *Z. mobilis* ATCC 39676 hücreleri kullanılmış ve pH 5.5 fosfat tamponu ile iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografileri kullanılarak saflaştırılmış ve elde edilen proteinin dimerik yapıda olduğu bildirilmiştir. *Z. mobilis* 113S kullanılarak yapılan bir çalışmada ise saflaştırma öncesi fermantasyon ortamında bulunan levansukraz enzimatik olarak hidroliz edilmiş ve levansukraz 3 M pH 5.0 üre içeren tampon ile saflaştırılmıştır (Vigants et al., 2003). Elde edilen enzim yüksek konsantrasyonda üre içerdiğinden gıda endüstrisinde kullanıma uygun değildir. Ayrıca bu yöntem ile saflaştırma gerçekleştirilirken levansukrazın tersiyer (üçüncül) yapısının korunduğu gösterilmemiştir. Vigants ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada *Z. mobilis* ATCC 10988 hücrelerinin sitoplazmik fraksiyonda kalan levansukrazını saflaştırmışlardır. Hücreler ultrasonikasyon yöntemiyle parçalanmış ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan protein yüksek molekül ağırlıklı agregatlar olarak elde edilmiştir. *Bacillus subtilis* levansukrazı ile yapılan bir çalışmada sitoplazmik levansukraz saflaştırılmış ve inaktif agregat olarak elde edilmiştir. Hücre dışına salgılanan levansukrazın sitoplazmik levansukrazdan farklı olarak hücre dışına salgılanma sırasında modifikasyona uğrayarak kararlı üç boyutlu yapısına katlanmasını tamamlayamadığı sonucuna varılmıştır (Gonzy-Treboul et al., 1975). Yapılan çalışmalardan sonra levansukrazın saflaştırılarak yüksek konsantrasyonda elde edilebilmesi için rekombinant üretim ile saflaştırma yöntemleri denenmiştir.

Z. mobilis ile yapılan çalışmalarda rekombinant olarak *Escherichia coli* hücrelerinde üretilip saflaştırılmasıyla levansukrazın periplazmik ya da sitoplazmik olarak üretildiği, hücre dışına salgılanmadığı bildirilmiştir (Goldman et al., 2008; Yanase et al., 1998). Yapılan bir çalışmada *Z. mobilis* ATCC10988 levansukrazı *E. coli* hücrelerinde üretilmiş ve inklüzyon cisimciklerinde toplandığı görülmüştür. Saflaştırma için denatürasyon/renatürasyon yöntemi denenmiş ancak bu işlemden sonra levansukrazın çözünür olmayan agregatlar oluşturduğu bildirilmiştir (Sunitha

et al., 2000). Aynı mikroorganizmanın levansukrazı ile yapılan başka bir çalışmada levansukraz *E. coli*'de sitoplazmik olarak çözümlenir fraksiyonda üretilmiş ve bu rekombinant protein saflaştırılmıştır. pH 7.4 fosfat tampon kullanılarak dimerik formda elde ettikleri proteinin pH azaldıkça (pH 5-6) oligomerlere dönüştüğünü ve bu oligomerlerin levan üretme aktivitesi yüksek ve fibril yapıda aktif enzim içerdiğini bildirmişlerdir. pH değeri yükseldikçe bu oligomer yapının tekrar dimerlere dönüşerek levan üretme aktivitesini kayb ettiklerini göstermişlerdir (Goldman et al., 2008). Yapılan bu çalışmalar göz önüne alındığında hücre dışı levansukraz ile sitoplazmik levansukrazın farklı biyokimyasal özellikler gösterdiği görülmektedir. Bu tez çalışması kapsamında *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 kullanılarak hücre dışı levansukraz üretilmiş, saflaştırılması, kristal eldesi ve levan üretimi denenmiştir.

2.1.1 Levansukrazların Ürettikleri Ürünler

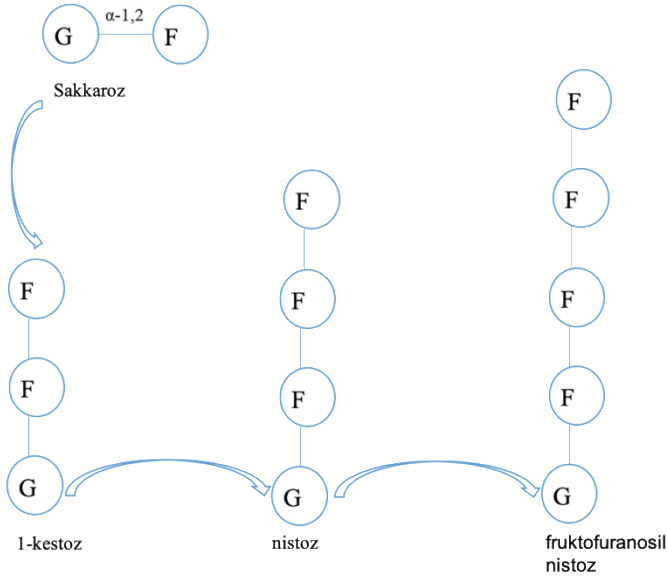
2.1.1.1 Fruktooligosakkaritler (FOS)

Dünya genelinde şeker tüketiminin olumsuz yönleri araştırılmakta ve şeker tüketimine karşı olarak tüketici davranışı gelişmektedir. Fruktooligosakkaritler (FOS) bazı gıdaların yapısında bulunan ve sakkarozaya göre 3 kat daha az tatlı olan şeker polimerleridir (Daudé et al., 2012). Bu özellikleri nedeniyle FOS'lar üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. FOS'lar prebiyotik şekerlerdir. Prebiyotikler kolonda bulunan sınırlı sayıdaki bakterilerin büyümesini teşvik ederek ya da aktivitesini uyararak konakçı sağlığına katkıda bulunan ve sindirilemeyen besin bileşenlerdir (Gibson, 1999; Gibson and Roberfroid, 1995). FOS'lar sindirim enzimlerine dayanıklı bileşiklerdir ve Bifidobakterler tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere parçalanabilmektedirler (Yun, 1996). Mide-bağırsak hastalıklarına karşı koruyucu oldukları ve *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* gibi mikroorganizmaları desteklerken zararlı mikroorganizmlara karşı da bağışıklık sistemine destek oldukları bildirilmiştir (Ganaie et al., 2014; Macfarlane and Macfarlane, 2011). FOS'lar FDA (Food and Drug Administration-Gıda ve İlaç Kurumu) tarafından GRAS (Generally

Recognized as Safe) sınıfında yer alan bileşikler olarak tanımlanmaktadır (FDA, 2016).

FOS'lar suda çözünür ve yapıdadırlar geniş pH aralıklarında (pH 4.0-7.0) bir yıla kadar dayanıklı olmaları gibi özellikleri ile gıda katkı maddesi olarak, dondurma, sakız, şekerleme ve diyet reçellerde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Ganaie et al., 2014; Sangeetha et al., 2005).

İnsanlar beslenmelerinde tükettikleri bazı bitkiler (soğan, kuşkonmaz, hindiba vb.) sayesinde FOS almaktadırlar ancak bitkilerin FOS içerikleri oldukça düşüktür. FOS'ların büyük miktarda üretimi bitkilerden ekstraksiyon ile ya da enzimatik sentez yöntemi ile gerçekleştirilebilmektedir. FOS'lar bazı bitkilerden elde edilebilirler ancak ekonomik ve verimlilik açısından daha uygun olduğu için endüstriyel üretim genellikle enzimatik sentez yöntemi kullanılmaktadır. Substrat olarak sakkaroz kullanılarak enzimatik sentez ile FOS üretiminde fruktosiltransferaz grubu enzimler kullanılmaktadır. *Aspergillus oryzae*, *Penicillium citrinum* ve *Aureobasidium pullulans* mikroorganizmalarından elde edilen fruktosiltransferaz (FTaz) enzimleri FOS sentezi için kullanılmaktadır (Sangeetha et al., 2005). *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. ve *Z. mobilis* gibi bazı bakterilerin ürettikleri levansukraz enzimleri de FOS üretiminde kullanılmaktadır. Levansukraz enzimleri kullanılarak kestoz (1-kestoz, 6-kestoz, neokestoz), nistoz ve fruktofuranozilnistoz gibi farklı FOS çeşitleri üretildiği bildirilmektedir (Sangeetha et al., 2005). Bu enzimler sakkaroz $\beta(2\rightarrow1)$ bağlarıyla fruktoz ekleyerek sırayla 1-kestoz, 1-nistoz ve fruktofuranosil nistoz oluşumunu katalizlemektedirler (Şekil 2.6) (Singh et al., 2016).



Şekil 2.6 Sakkaroz substratından fruktosiltransferaz (FTaz) enzimleri kullanılarak fruktooligosakkarit sentezi. (Singh, et al., 2016).

Endüstriyel üretim için genellikle enzimatik sentez yöntemi kullanılmaktadır. Levansukraz ile enzimatik FOS üretiminde verimin %50-60 civarında olduğu bildirilmiştir (Yun, 1996). *Zymomonas mobilis*'ten üretilen levansukraz ile yapılan bir çalışmada sakkaroz çözeltisinden %22-32 verimlilikte 1-kestoz, 6-kestoz, nistoz ve fruktofuronozil nistoz gibi FOSlar üretilmiş ve bunların düşük kalorili prebiyotik olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (Bekers et al., 2002). *Bacillus* sp. ile yapılan çalışmada %20 (w/v) sakkaroz ortamında levansukraz üretilmiş ve bu enzimin FOS ürettiği bildirilmiştir (K. S. Belghith et al., 2012). *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansukrazı *Pichia pastoris*'te rekombinant olarak üretilmiş ve %50 sakkarozlu ortamda %43 verimle -kestoz sentezlediği belirtilmiştir (Trujillo et al., 2001). *Zymomonas mobilis* 113 S levansukrazı ile yapılan bir çalışmada 25 °C sıcaklık ve %15 sakkaroz konsantrasyonunda enzimin FOS üretme aktivitesinin olmadığı ancak %70 sakkaroz konsantrasyonu ve 45 °C sıcaklıkta %31 verimlilik ile FOS ürettiği belirtilmiştir (Bekers et al., 2003). *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 kullanılarak yapılan bir çalışmada levansukraz enzimi üretilmiş ve bu enzim ile FOS üretimi için optimum koşullar belirlenmiştir. %60 v/v sakkaroz konsantrasyonunda 100 rpm

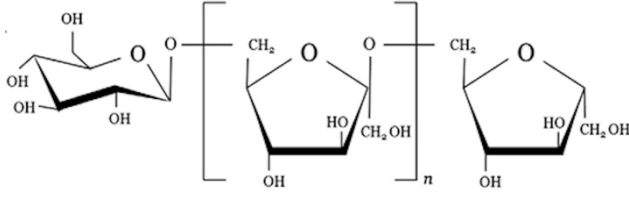
karıştırma hızında ve 45 °C sıcaklıkta 24 saat inkübasyon sonrasında FOS üretimi gerçekleştirilmiştir (Kurban, 2013).

FOS'ların gıdalara eklenmesi konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucu toz formda FOS'lar üretilmiş ve meyve sularına eklenmesiyle ürünün fizikokimyasal ya da organoleptik özelliklerinde olumsuz değişiklikler yaratmadığı bildirilmiştir (Renuka et al., 2009). FOS içeren ürünler arasında bebek mamaları, dondurma, sakız, şekerleme, diyet reçeller, kahvaltılık gevrekler ve unlu mamuller bulunmaktadır (Fonteles and Rodrigues, 2018).

2.1.1.2 Levan

Levan β -(2→6) bağları ile birbirine bağlanan fruktoz birimlerinden oluşan doğal bir polimerdir (Şekil 2.7) (Bekers et al., 2005). Levan polimeri çoğunlukla bakteriler ve bazı bitkiler tarafından sentezlenir (Bekers et al., 2002). Levan hem suda hem de yağ da çözünmektedir, kokusuzdur ve toksik değildir. Sıcaklığa dayanıklıdır ancak yüksek sıcaklığa asitlik levanın asit hidrolizi yoluyla yapısı bozulmaktadır (Bekers et al., 2005). Gıda endüstrisinde geniş kullanım alanına sahip olan levan üretimi için genellikle *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, *Lactobacillus reuteri* LB121 tercih edilmektedir (Srikanth et al., 2015). Levanın hidroliz ürünlerinden biri FOS olduğu ve *Bifidobacteria*'nın gelişmesini teşvik ettiği için prebiyotik etkisi olduğu bildirilmiştir (Huang et al., 2013). Levan gıda endüstrisinde yağ ikamesi olarak, ekmeğin raf ömrünün arttırılmasında ve biyobozunur ambalaj malzemesi olarak kullanılmaktadır (Jakob et al., 2012; Vijayendra and Gupta, 2014; Xiao et al., 2014). Ayrıca levanın anti-irritan, antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir (Ki-Hyo et al., 2003; Öner et al., 2016). Bunların dışında levan yüksek çekme ve yayma gerilimi özelliği sayesinde petrokimyasal yapıştırıcılara alternatif olmuş (Barone and Medynets, 2007), ciltte yumuşatıcı etkisi bulunduğu ve enfeksiyonu önlediği bildirilmiştir (Rairakhwada et al., 2007), ilaç endüstrisinde kapsüle edici ajan ve emülgatör olarak kullanıldığı (Dahech et al., 2011) da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Tüm bu özelliklerinden dolayı levan pek çok farklı endüstride kullanım alanı bulan bir polimerdir.



Şekil 2.7 Doğal fruktoz polimeri olan levanın kimyasal yapısı.

Levan bakterilerden mikrobiyal fermantasyon yoluyla üretilir ve çoğunlukla hücre dışına salgılanır. Fermantasyon yoluyla üretilen levan ile ilgili yapılmış pek çok çalışma mevcuttur. *Z. mobilis* fermantasyonu sonrasında üst fazlarda levan tespit edilmiştir. Silbir ve ark. (2014) tarafından *Z. mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 ile gerçekleştirilen çalışmada 299.1 g/L başlangıç sakkaroz konsantrasyonu, 28 °C sıcaklık ve 42.3 saat inkübasyon süresi ve başlangıç pH değeri 6.0 ile 40.2 g/L levan üretimi gerçekleştirilmiştir. *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi kullanılan bir çalışmada 200 g/L sakkaroz konsantrasyonunda, 37 °C’de pH 7.0 değerinde 21 saat inkübasyon süresi sonunda 49.4 g/L levan elde edildiği bildirilmiştir (Shih et al., 2005). İmmobilize *B. subtilis* (Natto) Takahashi kullanılmasıyla da 72 saat inkübasyon süresinde 70.6 g/L levan üretimi gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Shih et al., 2010). *Bacillus licheniformis* NS032 ile yapılan bir çalışmada 96 saat inkübasyon sonunda 47.8 g/L levan elde edildiği (Kekez et al., 2015), *Acetobacter xylinum* NCIM 2526 kullanılarak da 60 saat sonunda 13.25 g/L levan elde edildiği (Srikanth et al., 2015b) bildirilmiştir.

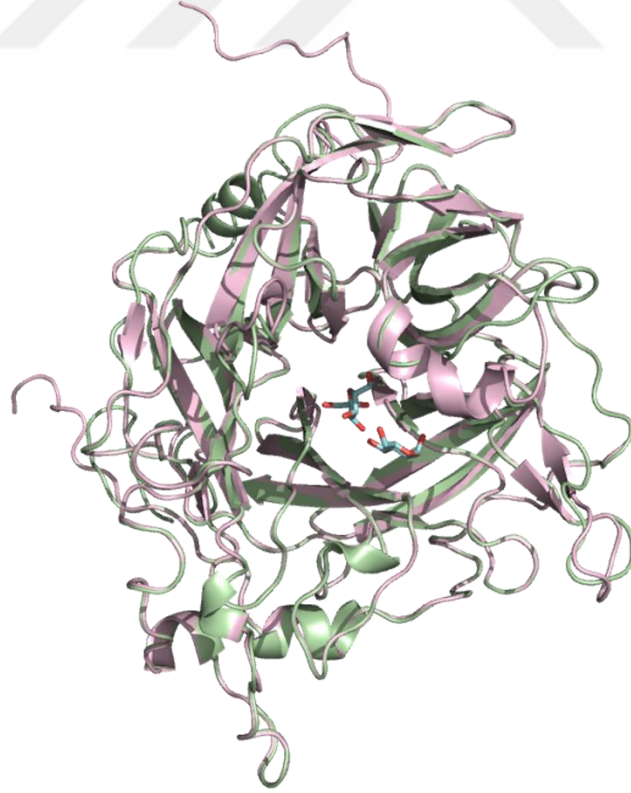
Levan üretiminde doğrudan saflaştırılmış levansukraz enzimleri de kullanılmaktadır. *B. subtilis* levansukrazı ile levan sentezinde protein konsantrasyonu artışıyla levan üretiminin de arttığı gösterilmiş ve %84 verimle levan üretimi gerçekleştirilmiştir (Abdel-Fattah et al., 2005). Enzimatik sentez yoluyla levan üretiminin düşük miktarda yan ürün oluşumu, istenilen sürede gerçekleşmesi ve kontrollü olması nedenleriyle avantajları bulunmaktadır. Sözgen ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada *Z. mobilis* NRRL

B-14023 kullanarak elde edilen ham levansukraz enzimi ile sakkarozu substrat olarak kullanarak ortalama 65.81 ± 0.29 g/L levan üretmişlerdir.

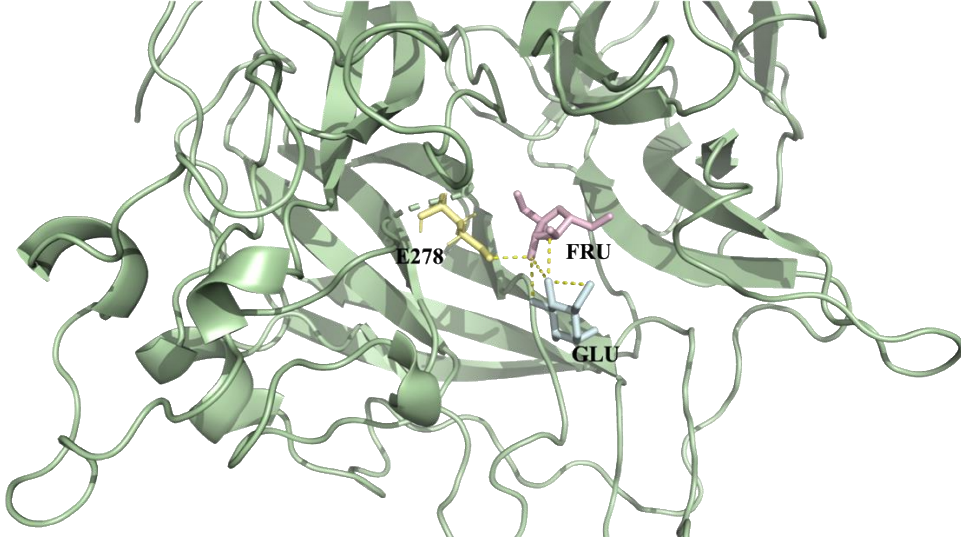
2.1.2 *Zymomonas mobilis* Levansukrazın Yapısının Modellemesi

Z. mobilis levansukrazın sahip olduğu ikili aktivite mekanizmasını anlamak önemlidir. Mekanizmanın anlaşılması için biyoinformatik yöntemlerle üç boyutlu modellemesi yapılmıştır.

Levansukrazın amino asit sekansı kullanılarak (EK-1) üç boyutlu yapısı iki farklı yöntem ile RaptorX ve I-TASSER; modellenmiştir. Modelleme sonucunda bilinen diğer levansukrazlarınkine benzer olarak derin negatif yüklü bir merkezi cep içeren beş bıçaklı pervane yapısı elde edilmiştir ve modelin merkezinde fruktoz ve glukoz bağlanan bölgeler bulunmaktadır. I-TASSER ile elde edilen modelde ligandların enzim ile etkileşimi görülmektedir (Şekil 2.8).



(a)



(b)

Şekil 2.8 *Z. mobilis* levansukrazın üç boyutlu yapı modelleme sonucu.

- (a) RaptorX(pembe) ve I-TASSER(Yeşil) ile elde edilen *Z. mobilis* levansukraz yapı modellerinin karton gösterimi. Glukoz ve fruktoz molekülleri gösterilmiştir. (b) I-TASSER ile elde edilen *Z. mobilis* levansukraz yapı modelinde glukoz, fruktoz ve E278 etkileşimi.

Elde edilen üç boyutlu modeller ile *Z. mobilis* levansukrazın literatürde bulunan diğer bakteriyel levansukrazlara benzer şekilde derin, negatif yüklü merkeze cebi bulunan beş bıçaklı pervane yapısına sahip olduğu ve merkezinde bulunan glukoz ve fruktoz bağlanma bölgeleri gösterilmiştir. Aktif bölge aminoasiti olduğu bilinen E278 yapı modelinde merkezde yer aldığı ve fruktoz molekülü ile hidrojen bağı yapabilecek bir konumda olduğu belirlenmiştir.

2.2 Kromatografik Saflaştırma Yöntemleri

Kromatografi elde edilen karışım içerisindeki bileşenlerin birbirinden ayrılarak özelliklerinin incelenip tanınmasını ve bu yol ile de nicel ve nitel analizlerinin yapılmasını sağlayan laboratuvar ve endüstriyel ölçekli ayırma işlemlerinin genel adıdır. Kelime kökeni Yunanca’da renk olan “chroma” ve yazmak anlamına gelen “grafein” sözcüklerinin birleşmesinde oluşmuş ve ilk olarak renkli bitkisel pigmentleri ayırmada Rus botanikçi M.S. Tsweet

tarafından kullanılmış, daha sonra farklı amaçlar için geliştirilerek yaygınlaşmıştır. Kromatografik sistemlerin hepsinde ortak olarak bir hareketli bir de sabit faz bulunmaktadır. Bu sistemlerde kromatografinin isimlendirilmesi sabit ve hareketli fazın durumuna göre olmaktadır. Belli uzunluktaki kolon sıvı emdirilmiş bir dolgu maddesi kullanılarak doldurulur ve bu sabit faz adını alır. Örnek sisteme bir taşıyıcı ile birlikte verilmekte ve bu taşıyıcıya da hareketli faz adını verilmektedir. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Kromatografi mekanizmaları için sabit ve hareketli fazlar.

| Kromatografi mekanizması | Hareketli faz | Sabit faz | Kromatografi |
|---------------------------------|----------------------|------------------|---|
| Partisyon | Sıvı | Sıvı | Kolon, İnce tabaka, Kağıt, Jel Filtrasyon, HPLC |
| Partisyon | Gaz | Sıvı | Gaz-sıvı kromatografisi |
| Adsorpsiyon | Gaz | Katı | Gaz-katı kromatografisi |
| Adsorpsiyon | Sıvı | Katı | Kolon, İnce tabaka, İyon değiştirme, HPLC |

Ayrımı yapılmak istenen maddeler kolon ya da tabakaya verilmekte ve hareketli faz sabit fazın üzerinde ilerlerken bileşenleri taşımaktadır. Sabit fazın özelliğine bağlı olarak bileşenlerin fazlar arası transferi bazı faktörlere göre değişmektedir.

Partisyon katsayısı

Bu katsayı fazların her birindeki madde konsantrasyonunu belirtmektedir. Değer sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. Bileşenin yüksek partisyon katsayısı olduğu durumlarda sabit faza ilgisi yüksek demektir ve kromatografik sistemde uzun süre alıkonulmaktadır. Partisyon katsayısı

$$K=C_s/C_m$$

denkliği ile ifade edilmektedir. C_s sabit fazdaki madde konsantrasyonu ve C_m hareketli fazdaki madde konsantrasyonunu ifade etmektedir.

Alıkonma faktörü

Bileşenin hareketli fazda bulunduğu süreyi ifade etmektedir. Bu değer maddenin yer değiştirme hızının oranıdır. Değeri 0.0 ile 1.0 arasında değişmektedir. 0.0 değeri bileşen sisteme girmemiş, hareket etmemiş; 1.0.

değeri ise hareketli faz ile sistemden hemen çıkmış anlamına gelmektedir.

Alıkonma faktörü

$$R = t_m / t_m + t_s$$

denkliği ile ifade edilmektedir. t_m maddenin hareketli fazda geçirdiği zaman ve t_s maddenin sabit fazda geçirdiği zaman anlamına gelmektedir. R_f değeri de kromatografide sıklıkla kullanılmaktadır.

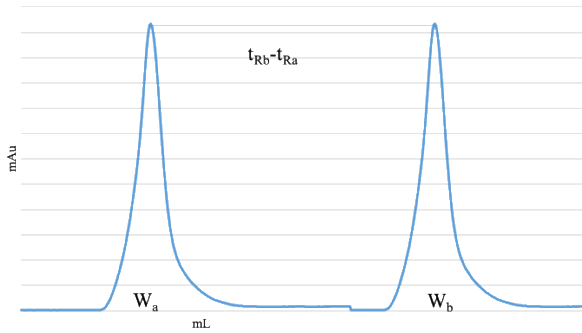
$R_f = \text{Maddenin aldığı yol} / \text{Hareketli fazın aldığı yol}$ şeklinde ifade edilmektedir. Kağıt ve ince tabaka kromatografi sistemlerinde rutin analitik çalışmalarda kullanılmaktadır.

Rezolüsyon

Bir kolonun ayırma gücü anlamına gelmektedir. Elde edilen iki pikin maksimumları arasındaki alıkonma zamanları arasındaki farklılık durumunda rezolüsyon gerçekleşmektedir. İki pikin alıkonma zamanları farklarının ortalama pik tabanı genişliğine oranıdır. Pikler birbiri üzerine çakışmıyor yani piklerin ayrımı iyi gerçekleştiyse rezolüsyon iyi demektir. Rezolüsyon hesaplanırken

$$R = 2(t_{Rb} - t_{Ra}) / (W_a + W_b)$$

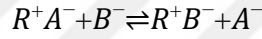
eşitliği kullanılmaktadır. Rezolüsyonun ölçülmesi için gerekli değerler şekil 2.12'de gösterilmiştir (Hışıl, 2013).



Şekil 2.9 Rezolüsyon değerinin ölçümü.

2.2.1 İyon değişim kromatografisi

İyon değişim kromatografisi ilk olarak 1850'de İngiltere'de H. Thompson ve J. T. Way isimli bilim insanları tarafından çözelti içerisinde bulunan kileri amonyum sülfat ve karbonat ile muamele etmesi sonucu amonyum ve kalsiyumun ayrılması ile kullanılmış, ilerleyen yıllarda anyon değiştirme kromatografisi ve katyon değiştirme kromatografisi olarak sınıflandırılmıştır (Esen, 2008). Anyon değiştirici kolonlarda pozitif yüklü, katyon değiştirici kolonlarda negatif yüklü matris bulunur. Bu kromatografide mekanizma olarak iyon değişim mekanizması kullanılır ve temeli çözelti içerisinde bulunan iyonlar ile sabit fazdaki fonksiyonel grupların arasındaki elektrostatik kuvvetlerin sitokiyometrik kimyasal reaksiyonuna dayanır.



Verilen kimyasal reaksiyonda R; çözünmeyen matris (kolon dolgu maddesi), B^- ; çözeltideki anyon ve R^+A^- ; A^- anyon değiştiriciyi ifade etmektedir. Eğer yine benzer mekanizma ile kromatografik işlem sırasında katyon değişimi gerçekleşiyorsa da katyon değiştirici olarak adlandırılmaktadır (Voet and Voet, 2011).

Proteinler içinde buldukları tamponun pH değerine göre pozitif ya da negatif yüklü olabilmektedirler. Protein izoelektrik noktasının üzerindeki pH değerinde negatif yüklü olur. Saflaştırılmak istenen protein kolona yüklenir, bu işlem sırasında örneğin içerisinde bulunan reçineye göre zıt yüklü iyonlar elektrostatik kuvvet etkisiyle bağlanır ve uzun süre bağlı kalırken nötr veya reçine ile aynı yükteki iyonlar hareketli faz ile ilerler ve kolonu ilk önce terk ederler. Proteinin kolondan ayrılması için kolona reçineye bağlanmada ilgisi proteinden daha yüksek iyonlar içeren elüsyon çözeltisi yüklenir ve kolon boyunca iyon değişimi gerçekleşir, böylece bu adımda ayrılmak istenen örnek kolonu terk eder. Kolon yıkama işlemi boyunca tuz konsantrasyonu ve/veya pH değiştirilerek kolona bağlanan farklı proteinlerin farklı piklerde kolondan çıkması sağlanabilir. En çok kullanılan elüsyon çeşidi doğrusal elüsyondur;

elüsyon çözeltisinin konsantrasyonu kolon içerisinden geçirilen çözeltini hacmi ile doğrusal olarak değişmektedir (GE Healthcare, 2017).

Elüsyon için genellikle anyon değiştiricide sitrat, SO_4^{-2} , okzalat, I^- , NO_3^- , Br^- , Cl^- , asetat, OH^- , F^- ; kation değiştiricide Fe^{+3} , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Ag^+ , Rb^+ , K^+ , NH_4^+ , Na^+ , H^+ , Li^+ gibi iyonlar kullanılmaktadır. Kuvvetli anyon değiştiriciler dörtlü amonyum tuzu, zayıf anyon değiştiriciler tersiyer amin esaslıdır. Kuvvetli kation değiştiriciler sülfonik asit esaslı, zayıf kation değiştiriciler karbosiklik asit esaslıdır (Hışıl, 2013).

2.2.2. Jel filtrasyon kromatografisi

Moleküler elek kromatografisi olarak da adlandırılan jel filtrasyon kromatografisinde, moleküller boyutlarına ve şekline göre ayrılmaktadırlar. Bu kromatografide sabit faz belirli boyut aralığında moleküler boyutlarda gözenek içeren sünger benzeri bir malzemenin boncuklarından oluşmaktadır. Farklı boyutlarda moleküller içeren çözelti bu şekilde oluşturulan moleküler elekler içeren kolondan geçirildiğinde, gözeneklerden geçmek için çok büyük olan moleküller kolondaki boşluklar arasından geçerek ilk önce kolonu terk etmektedirler. Daha küçük moleküller ise kolon dolgu maddesi arasındaki boşluklardan dolaşarak kolonu daha geç terk etmektedirler (Hışıl, 2013).

Bir molekülün jel filtrasyon kolonu üzerindeki davranışı karakterize edilebilmektedir. V_x jel boncukları hacmi ve V_0 boşluk hacmi ise V_t kolonun toplam hacminin basitçe toplamıdır;

$$V_t = V_0 + V_x$$

Belirli bir çözünen maddenin elüsyon hacmi, V_e , jel ile temas ettikten sonra kolondan çözünen maddeyi ayırmak için gereken çözücü hacmidir. Bir çözünenin jel filtrasyondaki davranışı V_e/V_0 oranıyla karakterize edilir. Bir maddenin göreceli elüsyon hacmi ile moleküler kütesinin logaritması arasında doğrusal bir ilişki vardır (Voet and Voet, 2011).

Jel filtrasyon kolonlarını yapmak için en yaygın kullanılan malzemeler, dekstran, agaroz ve poliakrilamiddir (Voet and Voet, 2011).

2.3 Kristalizasyon

2.3.1 Tarihten Kristalizasyona Bakış

İlk kristal tanımı Antik Yunan zamanına kadar dayanmakta ve bu dönemde kristal terimi açık, şeffaf ve sert buz anlamında kullanılmaktadır. Pisagor mükemmellik kavramı, uyum, güzellik gibi terimleri tanımlarken de kristal kelimesini kullanmıştır. Kristal günümüzde de düzenli şekilde bir arada duran moleküller topluluğu olarak tanımlanmaktadır (Sunagawa, 2005). 7 farklı kristal sistemi vardır ve bunlar Ek-2’de verilmiştir.

1895 yılında Wilhelm Röntgen tarafından X-ışınlarının bulunması ile kristalografi ve kristalizasyon metodlarının yolu açılmıştır. X-ışınlarının bulunması ve kristal sistemlerinin tanımlanmasının ardından Von Laue, Henry ve Lawrence Bragg X ışınlarının kristaller tarafından diffrakte edildiğini ve bu bilginin kullanılarak kristal yapıyı oluşturan birimlerin atomik konumlarının belirlenebileceğini göstermişlerdir (Brooks-Barlett and Garman, 2015).

Miyogloblin (Kendrew et al., 1960) ve hemogloblin (Perutz, 1963) kristal eldesi ve ardından yapılarının çözülmesiyle protein kristalleri elde edilebileceği ve proteinlerin yapılarının bu yöntem ile aydınlatılabileceği anlaşılmıştır. Enzimlerin kristalize olabileceği ile ilgili çalışmaları Sumner’a 1946 yılında kimya dalında nobel ödülü getirmiştir (IUCr, 2013). 1965 yılında lizozim enziminin yapısının çözülmesiyle enzimlerin saflaştırılarak kristalize olabileceği gösterilmiştir (Blake et al., 1965). Kristalografi alanında farklı dallarda Nobel ödülü olan bilim insanları Çizelge 2.3’te listelenmiştir (IUCr, 2013).

Çizelge 2.3 Kristalografi alanında Nobel ödülü alan bilim insanları.

| Yıl/Dal | Bilim İnsanı |
|-------------|---|
| 1901/ Fizik | W.C. Röntgen |
| 1914/Fizik | M. Von Laue |
| 1915/ Fizik | W. H. Bragg, W. L. Bragg |
| 1917/Fizik | C.G. Barkla |
| 1929/Fizik | L.-V. de Broglie |
| 1936/Kimya | P. J. W. Debye |
| 1937/Fizik | C. J. Davison, G. Thompson |
| 1946/Kimya | J. B. Sumner |
| 1954/Kimya | L. C. Pauling |
| 1962/Kimya | J. C. Kendrew, M. Perutz |
| 1962/Tıp | F. Crick, J. Watson, M. Wilkins |
| 1964/Kimya | D. Hodgkin |
| 1972/Kimya | C. B. Anfinsen |
| 1976/Kimya | W. N. Lipscomb |
| 1982/Kimya | A. Klug |
| 1985/Kimya | H. Hauptman, J. Karle |
| 1988/Kimya | J. Deisenhofer, R. Huber, H. Michel |
| 1991/Fizik | P.-G. de Gennes |
| 1992/Fizik | G. Charpak |
| 1994/Fizik | C. Shull, N. Brockhouse |
| 1996/Kimya | R.Curl, H. Kroto, R. Smalley |
| 1997/Kimya | P. D. Boyer, J. E. Walker, J. C. Skou |
| 2003/Kimya | P. Agre, R. MacKinnon |
| 2006/Kimya | R. D. Kornberg |
| 2009/Kimya | V. Ramakrishnan, T. A. Steitz, A. E. Yonath |
| 2010/Fizik | A. Geim, K. Novoselov |
| 2011/Kimya | D. Shechtman |
| 2012/Kimya | R. J. Lefkowitz, B. K. Kobilka |
| 2013/Kimya | M. Karplus, M. Levitt, A. Warshel |

Daha sonraki yıllarda rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle birlikte X ışını difraksiyonu ile çalışılan proteinlerin eldesi hızlanmıştır. Günümüzde yapısı X ışını kırınım yöntemi ile çözülen proteinlerin büyük kısmı rekombinant kaynaklardan elde edilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisinin X-ışını kristalografisi ile birlikte çalışması sonucunda moleküler biyoloji alanında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanlarında yapı tahminleme ile yapılacak çalışmalar yüksek hassasiyet gerektirmekte ve bu hassasiyet kristalografi çalışmaları ile sağlanabilmektedir (McPherson and Gavira, 2014).

Protein veri bankası içerisinde (PDB) oldukça fazla sayıda kullanılabilir protein yapısı depolanmaktadır. Makromoleküler (protein, nükleik asit, protein-protein kompleksi veya protein-nükleik asit kompleksi vb.) yapılarla ait verilerin büyük çoğunluğu X-ışını kristalografisi, nükleer manyetik rezonans (NMR), elektron mikroskobu olmak üzere üç yöntem ile elde edilmiştir. Bu yöntemler içerisinde de en çok kullanılan yöntemin X-ışını kristalografisi olduğu Çizelge 2.4'de görülmektedir (Protein Data Bank, 2019).

Çizelge 2.4 Protein veri bankasında bulunan makromoleküller ve elde edilme yöntemlerinin analizi.

| DeneySEL Yöntem | Protein | Nükleik asit | Protein/Nükleik asit Kompleksleri |
|---------------------------------|----------------|---------------------|--|
| X-ışını kristalografisi | 125241 | 1997 | 6484 |
| Nükleer manyetik rezonans (NMR) | 11013 | 1276 | 259 |
| Elektron mikroskobu | 2123 | 31 | 750 |
| Diğer | 250 | 4 | 6 |
| Birlikte kullanım | 127 | 5 | 2 |
| Toplam | 138754 | 3313 | 7501 |

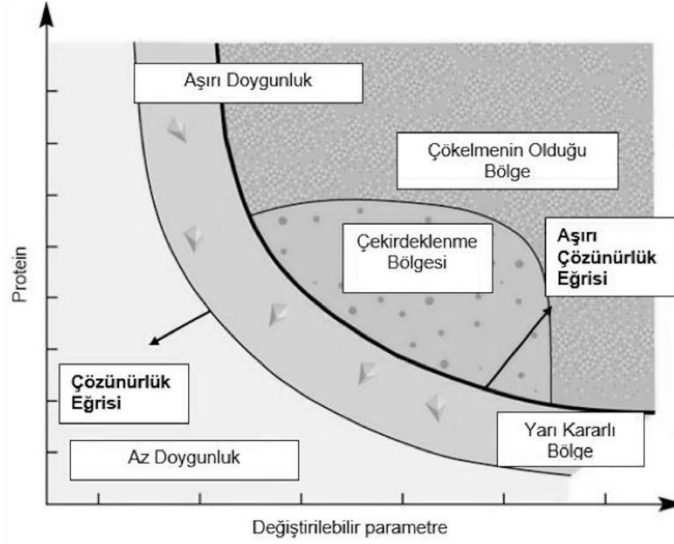
Bir makromolekülün üç boyutlu yapısının X-ışını kristalografisi ile çözülmesi için yeterli boyut ve yüksek kalitede kristaller elde edilmesi gerekmektedir (Drenth, 2007; McPherson and Gavira, 2014).

2.3.2 Kristalizasyon için Temel Adımlar

Protein kristalizasyonu için moleküllerin yüksek saflıkta ve homojen olarak elde edilmesi gerekmektedir. Proteinlerin kristalizasyonu, elde edilen homojen ve yüksek saflıktaki proteinin bir çözelti içerisinde konsantre edilirken kristalleşmesini sağlayan doğru koşullarda gerçekleşir. Bu koşullar protein konsantrasyonu, çözelti iyonik güç, pH ve hidrofobikliği, ortam sıcaklığı gibi birçok parametreye bağlıdır. Bu sebeple kristalizasyon aslında bir deneme yanılma deneyidir ve temel olarak dört basamaktan oluşur (Drenth, 2007).

- i. Protein yüksek saflıkta elde edilmelidir. Eğer istenilen saflık derecesinde değilse, en yüksek saflığa getirilene kadar saflaştırma üzerinde çalışılmalıdır.
- ii. Protein uygun bir çözücü içinde çözülmelidir. Bu çözelti çoğunlukla bir su-tampon çözeltisidir. Bazı durumlarda proteinin özelliğine göre organik bileşikler ve deterjanlar gibi bileşenler de kullanılmaktadır.
- iii. Çözelti aşırı doymunluk durumuna getirilmelidir. Bu aşamada kristal oluşumunun başlangıcı olan çekirdekleri oluşturan küçük yapılar oluşmaktadır.
- iv. Çekirdek oluştuğunda gerçek kristal büyümesi başlamaktadır.

Protein kristalizasyonu için uygun koşullar faz diyagramı ile gösterilir (Şekil 2.10) Kristalizasyon teorisi, en iyi kristallerin, süper doymunluğu daha düşük bir seviyeye indirerek büyüdüğünü söyler; genellikle aşırı doymunluk bölgesinde çok sayıda çekirdek ve dolayısıyla çok fazla küçük kristal oluşur. Aşırı doymunluk bölgesinin hemen altındaki konsantrasyonda ise daha kaliteli kristal elde edilebilir. Ayrıca kristaller yapılarındaki maksimum düzene ulaşabilmek için yavaş büyümelidirler. Doymunluk derecesini değiştirmek için en çok kullanılan yöntem farklı sıcaklık ve çöktürücü ajan konsantrasyonları denemektir.



Şekil 2.10 Protein kristalizasyonu faz diyagramı gösterimi.

Özetle kristal oluşumu makromolekülün aşırı doymuluk bölgesinde başlayarak çöktürücü ajanların konsantrasyonu, pH, sıcaklık, protein konsantrasyonu gibi bazı değişkenlerin değiştirilmesi ile gerçekleşmektedir.

2.3.3 Teknikleri

2.3.3.1 Batch Kristalizasyon

Bilinen en eski ve en basit yöntemlerdendir. Protein çözeltisine eklenen çöktürücü ajan ile çözelti hemen aşırı doyma noktasına gelmekte ve kristaller başka bir işleme gerek duymadan yavaş yavaş oluşmaktadır. Mikrobath kristalizasyonu için oluşturulmuş otomatik sistemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerde protein-çöktürücü ajan kompleksi yağda süspansiyon edilirler ve yağ sistemde buharlaşmayı önleyici görev alarak kristal oluşumunu sağlamaktadır (Drenth, 2007).

2.3.3.2 Sıvı-Sıvı Difüzyonu

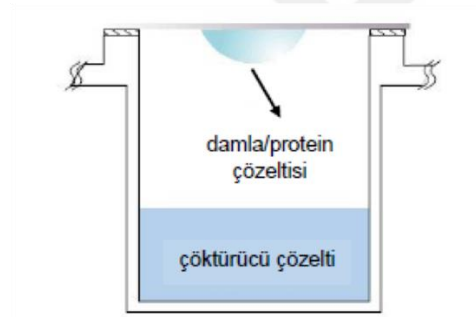
Küçük bir kapilerin içerisine protein ve çöktürücü ajan içeren çözelti üst üste katman olacak şekilde yerleştirilir. Alt katmanda yoğunluğu yüksek olan çözelti bulunmaktadır. Alt katmandan başlanarak çözeltiler kapilerin

içerisine enjekte edilmekte ve ilk katmandaki hava baloncuklarını gidermek için kapiler santrifüj edilmektedir. Ardından diğer çözelti enjekte edilmekte ve iki katman arasında oluşan sınırdan çözeltiler birbiri içerine difüze olmaktadır. Bu şekilde kristal oluşumu gerçekleşmektedir (Drenth, 2007).

2.3.3.3 Buhar Difüzyonu

Sallanan Damla Yöntemi (Hanging drop)

Bu yöntemde 3-10 μ l protein çözeltisi ve 3-10 μ l çöktürücü ajan içeren damlalar özel olarak hazırlanmış silikonize cam üzerine damlatılır ve 0.1-1 mL çöktürücü çözelti içeren kuyucuk üzerine damlalar baş aşağı sallanır olacak şekilde yerleştirilir (Şekil 2.14a ve Şekil 2.14b) (McPherson and Gavira, 2014).



(a)

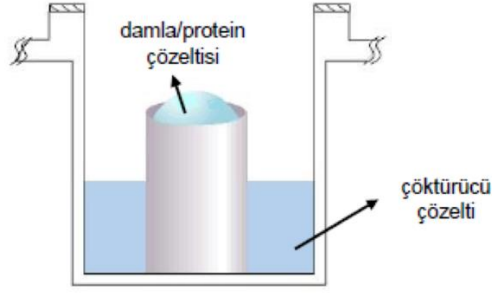


(b)

Şekil 2.11 Protein kristalizasyonunda (a) sallanan damla (b) silikonize cam-damla gösterimi.

Oturan Damla Yöntemi (Sitting drop)

Bu yöntemde oluşturulan damlalar sallanan değil oturur durumda bulunmaktadır (Şekil 2.15). Eğer protein çözeltisinin yüzey gerilimi düşük ve silikonize cam üzerinde dağılıyorsa bu durumda oturan damla yöntemi tercih edilmektedir (Drenth, 2007).



Şekil 2.12 Protein kristalizasyonunda oturan damla gösterimi.

Kullanılan iki yönremde de damla/protein çözeltilisi ile çöktürücü çözeltili arasında konsantrasyon farkı buhar difüzyonu yoluyla dengeye ulaşmaktadır. Damla/protein çözeltilisi içerisindeki çöktürücü konsantrasyonu su molekülünün sistemden uzaklaşması yoluyla artar ve aşırı doygunluk seviyesine geldiğinde protein kristalleri veya çekirdeklenmesi başlamaktadır. Bu durumda sistem dengede ya da dengeye çok yakın durumda bulunmaktadır (Drenth, 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Mikroorganizma ve Kültür Koşulları

Tez çalışmasında mikroorganizma olarak *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 kullanılmıştır. Bu mikroorganizma Agricultural Research Service Culture Collection (Peoria, USA)'dan temin edilmiştir. Mikroorganizma stok besiyeri (Çizelge 3.1) ve %50 gliserol içerisinde -86 °C'de saklanmıştır. 1 mL mikroorganizma taze hazırlanan 20 mL stok besiyerine (% 5) ekilmiş, 28 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.1 Stok besiyeri bileşimi.

| Bileşen | Konsantrasyon (g/L) |
|---------------|---------------------|
| Glukoz | 20 |
| Bacto-peptone | 10 |
| Maya Özütü | 10 |

3.1.2 Üretim ortamı

Zymomonas mobilis subsp. *mobilis* 'den levansukraz enzimi üretimi için sakkaroz içeren sentetik sıvı besiyeri kullanılmıştır. Aşı ve üretim ortamlarının içerikleri çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Aşı ve üretim ortamlarının bileşimi.

| Bileşen | Aşı Ortamı (g/L), pH 5.0 | Üretim Ortamı(g/L), pH 4.91 |
|---|-----------------------------|--------------------------------|
| Sakkaroz | 50 | 159.1 |
| Maya Özütü | 7 | 2.5 |
| KH ₂ PO ₄ | 2.5 | 2 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.6 | 2 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1 | 1 |

3.2 Yöntemler

3.2.1 Fermantasyon ve Levansukraz Üretimi

Taze stok besiyerinde geliştirilen 2.5 mL *Z. mobilis* 50 mL aşı kültür ortamına (%5, v/v) ekilmiş ve 28 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aşı ortamında üreyen mikroorganizmalar yine %5 (v/v) oranında 200 mL üretim ortamına ekilmiş, 30.3°C’de 36 saat inkübasyona bırakılmıştır. *Zymomonas mobilis* levansukrazı hücre dışı üretilen bir enzimdir (Bekers et al., 2002). Fermantasyon ortamından enzimi izole etmek için hücreler 4 °C’de 6500 rpm’de 20 dakika santrifüj (Hettich Universal 320 R ve Velocity 18R Refrigerated) edilerek ayrılmış ve elde edilen levansukraz içeren üstfazda üstfaz bulanıklık değeri (OD), enzim aktivitesi ve protein miktarı belirlenmiştir.

3.2.2 Hücre Yoğunluğu (OD)

Fermantasyon ortamında bulunan hücre yoğunluğunun saptanması amacıyla küvetlere 1.5 mL alınan örneklerin spektrofotometrede (GENESYS 10S UV-Vis, ThermoScientific) 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk değerleri (OD) okunmuştur.

3.2.3 Üst Faz Bulanıklık Değeri

Fermantasyon üstfazının bulanıklık değerinin saptanması için spektrofotometrede (GENESYS 10S UV-Vis, ThermoScientific) 400 nm dalga boyunda optik yoğunluk değerleri (OD) okunmuştur. Üstfazdaki bulanıklığın levandan kaynaklı olduğu literatürde belirtilmiştir (Vigants et al., 2003).

3.2.4 Levansukraz Enzim Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi indirgen şeker tayini DNS (di-nitro salisilik asit) yöntemi ile belirlenmiştir (Miller, 1959). DNS çözeltisi hazırlanırken 10.6 g 3,5-dinitrosalisilik asit ve 19.8 g NaOH, saf suda çözündürülmüş, ardından sırasıyla 306 g potasyum sodyum tartarat, 8.3 g sodyum metabisülfid ve 50 °C'de eriyik halde 7.6 ml fenol eklendikten sonra hacim 1.5 L'ye tamamlanıp karıştırılmıştır. 22 mM sitrat fosfat pH 5.4 tampon kullanılarak enzim absorbans değeri standart eğri aralığında olacak şekilde 250 ya da 500 kat seyreltilmiştir. 0.25 mL seyreltilen enzim kör okuma için 0.75 mL 22 mM sitrat-fosfat pH 5.4 tampon ve 3 mL DNS çözeltisi eklenerek 100 °C'de 5 dakika bekletilmiş ve 1 dakika boyunca soğutularak 540 nm dalga boyunda absorbans okuması alınmıştır. Örneklerin okuması için ise yine 0.25 mL seyreltilen enzim 0.75 mL %17.1 sakkaroz içeren 22 mM sitrat fosfat pH 5.4 ile 35 °C'de 10 dakika inkübe edilmiş ardından da 3 mL DNS çözeltisi eklenerek 100 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. 1 dakika boyunca soğutulan örneğin 540 nm dalga boyunda absorbans okuması alınmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan glukoz ile elde edilen absorbans değerleri ile de standart eğri hazırlanmıştır (Şekil 3.1). Enzim aktivitesi hesaplamasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır. Bir birim levansukraz aktivitesi dakikada 1 µmol indirgen şekeri açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Hideshi Yanase et al., 1992).

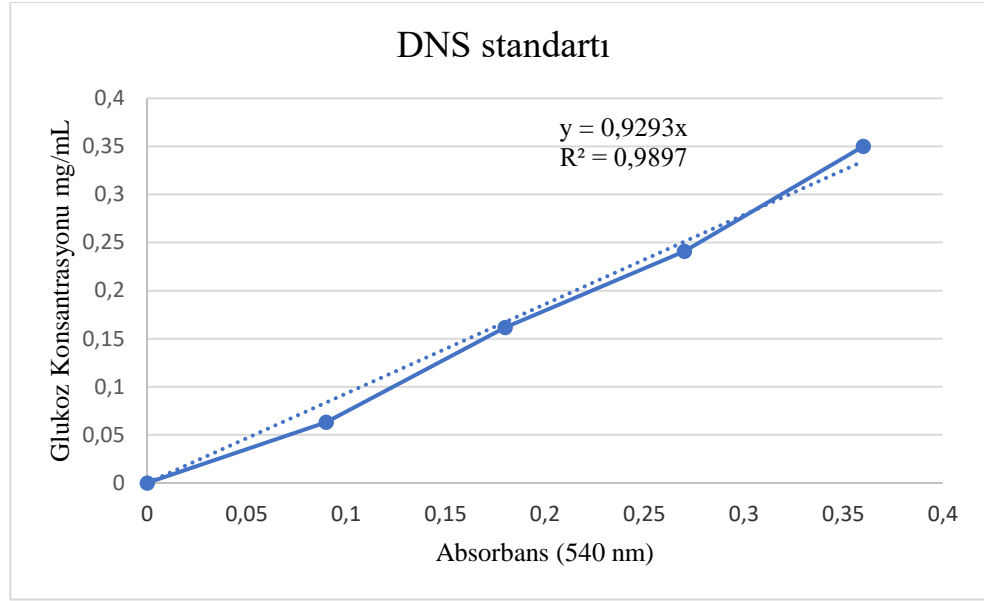
$$\text{Levansukraz Aktivitesi (mM glukoz/dak)} = \left(\frac{A}{c * t * 180} \right) * D * 1000$$

A: Ortalama örnek absorbansı – kör absorbansı

c: standart denklemden gelen katsayı

t: inkübasyon süresi (10 dakika)

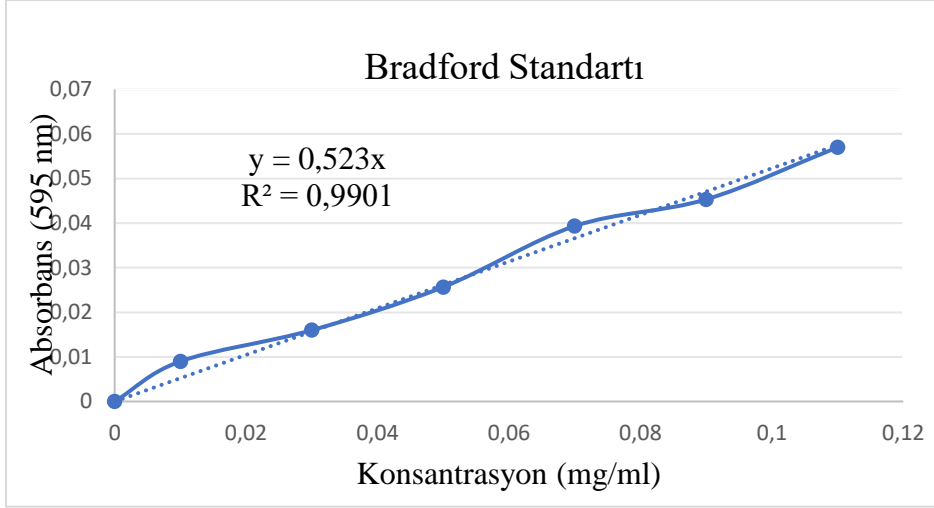
D: enzim seyreltme oranı



Şekil 3.1 İndirgen şeker tayininde kullanılan DNS yöntemi için örnek glukoz standart eğri grafiği.

3.2.5 Protein tayini

Protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Bradford, 1976). Bu yöntem boya bağlamaya dayanan bir yöntemdir. Boyaların asidik grupları ile proteinlerin içerdiği bazik grupların bağlanması esasına dayanır. Oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür. Bradford boyası hazırlanması için Coomassie Brilliant Blue G-250 (100 mg) %95'lik 50 mL etanolde çözülmüş, 100 mL %85'lik fosforik asit ilave edilmiş ve son hacim distile su ile 1 L' ye tamamlanmıştır. Boya filtre edilerek +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Protein miktar ölçümleri için hazırlanan boya çözeltisi 1:4 oranında seyreltilmiş ve 200 µL seyreltilmiş boya çözeltisi üzerine 4 µL örnek ilave edilerek Thermo Scientific Multiscan Go sistemde 96 kuyulu plakalarda 595 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Sığır serum albüminin (BSA) 0.2 mg/mL konsantrasyonda distile su içerisinde hazırlanmış ve seyreltilerek belirli protein konsantrasyonlarında standart eğri oluşturulmuştur. BSA ile oluşturulan standart eğri denklem kullanılarak protein miktarı hesaplanmıştır. Şekil 3.2'de standart grafik gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Protein tayininde kullanılan Bradford yöntemi için örnek BSA standart grafiği.

3.2.6 A280 değeri

Saf protein konsantrasyonu 280 nm absorbans değerinin ekstinksiyon katsayısı ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır (Layne, 1957). Levansukraz ekstinksiyon katsayısı $2.262 \text{ (mg/mL).cm}^{-1}$ olarak tahmin edilmiştir (<http://web.expasy.org/protparam>).

3.2.7 Ön İşlem ve Liyofilizasyon

Levan üretiminde kullanılmayacak örnekler için, hücrelerden ayrılan üstfazlar $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5 saat çalkalamalı (50 rpm) inkübatörde bırakılmıştır. Elde edilen ham enzimin konsantre edilmesi için balonlarda $-86 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulmuş ve liyofilize edilmiştir (ALPHA 1-2 LDPlus, Christ). Liyofilize toz haldeki örnekler saflaştırmaya kadar $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Liyofilizasyon kısaca, maddenin dondurulması ve ilgilenilen çözücünün bir kısmının katı fazdan sıvı faza uğramadan doğrudan gaz fazında uzaklaştırılması yöntemidir (Meister, 2009). Bu yöntemin prensibi çok düşük basınç altında donmuş haldeki çözeltiden serbest suyun süblimasyon yolu ile uzaklaşmasıdır (Özenir, 2009). Liyofilizasyon işlemi $-50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 0.003 mbar'da gerçekleştirilmiştir.

3.2.8 Amonyum Sülfat Çöktürme

Protein saflaştırmada en çok kullanılan örnek konsantre etme yöntemlerinden biri olan amonyum sülfat çöktürme tekniğinde prensip, protein bulunan çözelti ortamına $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gibi nötral tuzların ilavesi ile proteinlerin yapısında bulunan hidrofobik grupların birbirleri ile bağ yapılması sonucu çökmesidir (Tuncer, 2008).

Fermantasyon sonrası üstfaza %70-90 doygunluğa gelene kadar amonyum sülfat yavaş yavaş ilave edilip karıştırıcıda 80 rpm'de sürekli karıştırılmıştır. Karışım $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de gece boyu bekletilmiş ve ertesi sabah 16000 g'de $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 20 dk çöktürülmüştür. Oluşan çökelti tamponda çözüldükten sonra gece boyu diyaliz edilmiştir.

3.2.9 Diyaliz

Diyaliz işlemi çözelti içerisinde bulunan küçük membran gözenek genişliğinden küçük molekülleri uzaklaştırmak için kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin kullanılmasıyla çoğunlukla tuzlar ve diğer küçük moleküller ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Aynı zamanda örneğin istenilen tampona geçirilmesi işlemi de gerçekleştirilmektedir (Tuncer, 2008).

Amonyum sülfat çöktürmesi ya da liyofilizasyon sonrası elde edilen örnek tamponda çözülerek yarı geçirgen özellikli bir membranda (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da, 25 mm x 16mm) belirli sıcaklıkta ($+4\text{ }^\circ\text{C}$, $+17\text{ }^\circ\text{C}$), belirli sürede (gece boyu veya 2 gün) karıştırıcı ile karıştırılarak proteaz inhibitör içeren farklı tamponlara (22 mM sitrat-fosfat pH 5.4, 100 mM potasyum fosfat pH 7.0, 100 mM potasyum fosfat pH 8.0, 100 mM HEPES pH 7.4) karşı diyaliz edilmiştir.

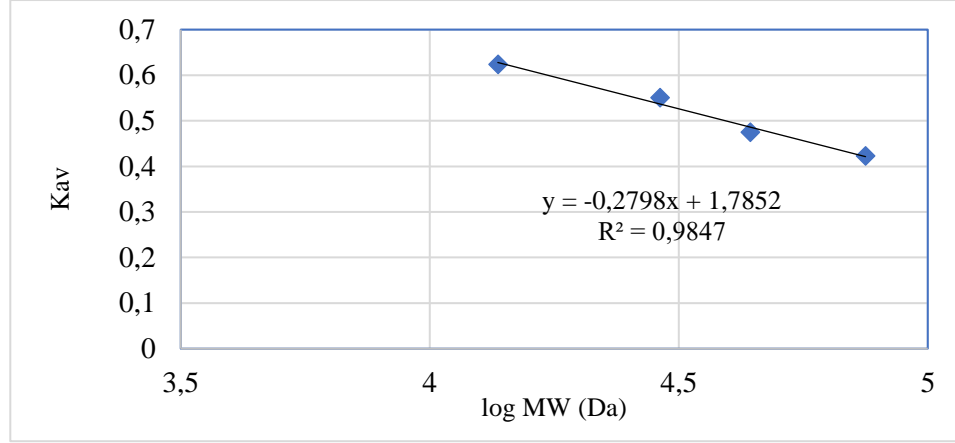
3.2.10 İyon Değişim Kromatografisi

Diyaliz sonrası elde edilen örneğin saflaştırılma işleminde ilk basamak olarak iyon değişim kromatografisi kullanılmıştır. Saflaştırma güçlü veya zayıf iyon değiştiriciler (HiTrap DEAE FF ve HiTrap Q HP) ve farklı tampon çözeltiler (22 mM sitrat fosfat pH 5.4, 100 mM potasyum fosfat pH 7.0, 100 mM potasyum fosfat pH 8.0, 100 mM HEPES pH 7.4) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diyaliz sonrası elde edilen örnek kolona 4 mL/dk akış hızında yüklenmiş ve bu sırada akıntı toplanmıştır. Yükleme işlemi bittikten sonra kolon 5 kolon hacmi tampon ile yıkanmış ve ardından elüsyon için 0-100 %1 M NaCl içeren tampon ile lineer gradyan 20 kolon hacmi boyunca uygulanmış, 2 mL fraksiyonlar toplanmıştır.

3.2.11 Jel Filtrasyon Kromatografisi

İyon değişim kromatografisinden elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE ile incelenmiş ve örneğin bulunduğu fraksiyonlar ultrafiltrasyon üniteleri (AmiconUltra-15, ya da 0.5, 3 kDa) kullanılarak santrifugasyon ile konsantre edilmiştir. 0.5 mL hacimde örnek elde edildikten sonra Superdex 200 10/300 GL kolonu kullanarak molekül ağırlıklarına göre ayrılmıştır. Jel filtrasyon 100 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl tampon kullanılarak yapılmıştır.

Molekül ağırlıklarının hesaplanması için jel filtrasyon kolonunun kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.3). Standart olarak 2.5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan konalbumin (75 kDa), ovalbumin (44 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa) ve ribonükleaz A (13.7 kDa) proteinleri kullanılmıştır. Kolon boşluk hacmi 1 mg/mL mavi dekstran ile 7.313 mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3 Superdex-200 jel filtrasyon kolon kalibrasyon eğrisi.

Tampon 100 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT (Kav : $(V_e - V_o)/(V_c - V_o)$).

3.2.12 Elektroferez

SDS-poliakrilamid (SDS-PAGE) poliakrilamid jel elektroforezi Laemmli 1970 tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. Saflaştırma işleminin her basamağında kontrol amaçlı olarak gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE işlemi uygulanacak örnekler hazırlanırken 4X örnek yükleme boyası (10 µL) ile örnek (30 µL) karıştırılıp 100 °C'de 10 dakika kaynatılmıştır. Hazırlanan %12 Tris-Glisin jelin kuyucuklarına 10 µL protein markörü (unstained, Thermo Scientific LSG-26614) ve 20 µL örnek yüklenmiş, jelin %5'lik kısmında 80 V ve %12'lik kısmında 120 V akım uygulanarak yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroferez işleminin sonrasında jellerin boyanmasında Coomassie-Brilliant Blue boya çözeltisi kullanılmıştır (Lawrence and Besir, 2009). Jeller boya ile birlikte yatay karıştırıcıda bantlar belirginleşene kadar karıştırılarak boyanmıştır.

Zimogram analizi ile jel üzerinde levansukrazın levan aktivitesi belirlenmiştir (P. O'Mullan et al., 1991). 40 µL, 100 µg protein içeren levansukraz denatüre edici olmayan %10'luk poliakrilamid jelde 80 V akım uygulanarak yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrasında jel %5 sakkaroz içeren tampon 1 (sitrata-fosfat, pH 5,4) ile gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.13 Kristalizasyon

Saflaştırma sonrası elde edilen yüksek saflıktaki levansukraz enzimi Amicon 500 NMWCO 10 kDa konsantrasyon üniteleri kullanılarak yüksek konsantrasyona getirilmiştir. Farklı tarama çözeltileri ile sallanan damla (hanging drop) buhar difüzyon yöntemiyle damlada 3-5 µL protein ile 3-5 µL çözelti ve rezervuarda 0.5-1.0 mL çözelti olacak şekilde 48 kuyulu kristal tabaklarda kristalizasyon denemeleri yapılmıştır. Tabaklar sıcaklık kontrollü inkübatörde (FRIOCELL 222 Cooling İncubator) 16 °C’de depolanmıştır. Kristal oluşumu için ilk hafta her gün, daha sonra haftada bir kez mikroskop ile incelenmiştir. Kristalizasyon denemeleri için PACT Premier I ve II (katalog no: 036-1-29/038-1-37 ve 036-1-29/038-1-37) ve elde hazırlanan tarama çözeltileri (Ek -3) kullanılmıştır. EMBL Hamburg SPC laboratuvarında Mosquito-LCP (ttplabtech) robot kullanılarak oturan damla (sitting drop) buhar difüzyon yöntemiyle QIAGEN_Classics-I ve II, MD_Morpheus I ve II, QIAGEN_JCSG-Plus çözeltileriyle 50 nL protein ile 50 nL çözelti ile plakalar hazırlanmış, The RockImager-1000 (Formulatrix) sistemde 19 °C’de depolanmış ve Crims sistemi üzerinden kristal oluşumu gözlenmiştir.

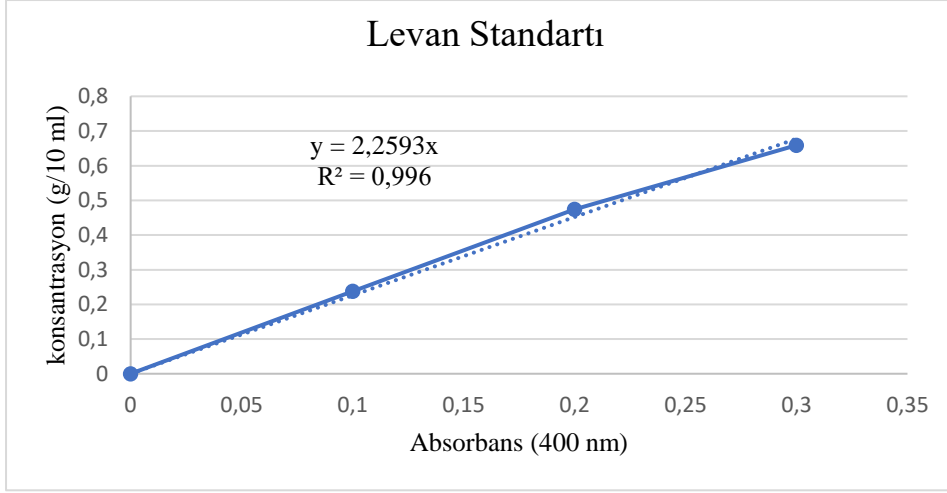
3.2.14 Kısıtlı Proteoliz

Levansukraz enzimi 2 ve 10 µg tripsin ile buzda inkübe edilmiş ve inkübasyon boyunca farklı zamanlarda örnekler alınmıştır. Alınan örnekler hemen kaynatılmış ve SDS-PAGE ile incelenmiştir. Enzim üzerine etkilerinin incelenmesi için sakkaroz (1 mM), fruktoz (1 mM), glukoz (1 mM), çinko (10 mM) veya DTT (10 mM) ilave edilmiş örnekler 30 dakika yatay karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 µg tripsin eklenerek reaksiyon başlatılmış, belirli zamanlarda örnekler alınmış ve SDS-PAGE ile incelenmiştir.

3.2.15 Ham levansukraz ile levan üretimi

Levan üretimi için fermantasyon sonrası elde edilen ham enzim kullanılmıştır. Ham enzim eldesi hücrelerin proteinlerden ayrılması ile gerçekleşmiş bu da iki şekilde yapılmıştır. İlk yöntem olan santrifugasyonda fermantasyon bitiminde elde edilen üretim ortamları 4 °C'de 6500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve üstfaz ham enzim olarak ayrılmıştır. İkinci olarak filtrasyon yöntemi kullanılmış ve fermantasyon ortamı 0.22 µm selüloz asetat filtreden geçirilmiş, altfaz ham enzim olarak ayrılmıştır. Toplam 15 mL hacimde reaksiyon 30 birim enzim, 0.2 M sakkaroz içeren 22 mM sitrat fosfat pH 5.4 tampon ile birlikte 15 °C ve 25 °C olmak üzere 2 farklı sıcaklıktaki su banyosunda gerçekleştirilmiş, belirli zaman aralıklarında örnek alınmıştır. Elde edilen levan miktarı hesabında doğrudan miktar belirlenmesi için reaksiyonların 400 nm'deki bulanıklık değerlerinin değişimi takip edilmiştir (Vigants et al., 2001). Standart olarak da ticari levan ile oluşturulan eğriler kullanılmış ve levan miktarı g/L olarak hesaplanmıştır. Kullanılan levan standart eğrisi şekil 3.4'te verilmiştir.

Levansukrazın levan üretiminde iyonik yükün etkisini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda NaCl kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca yine levansukrazın levan üretimine etkisinin belirlenmesi için EDTA ve 10 mM MgCl₂, KCl, (NH₄)₂SO₄, CaCl₂ ve ZnSO₄.7H₂O iyonları varlığında da levan reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Sözgen vd., 2018).



Şekil 3.4 Ticari levan ile oluşturulan levan standart grafiği.

3.2.16 pH ölçümü

Bu tez çalışmasında bütün pH ayarlama ve okuma işlemleri WTW pH Meter İnoblab pH7110 marka pHmetre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. pH metre kalibrasyonu düzenli olarak pH tamponları ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.17 Yapısal modelleme ve modellerin grafik gösterimi

Z.mobilis levansukrazın üç boyutlu yapısı RaptorX (Källberg et al., 2012) ve I-TASSER (Roy et al., 2010; Yang et al., 2014) programları ile modellenmiştir. Modeller ve atomik yapılar PyMOL Molecular grafik sistem ile gösterilmiştir.

I-TASSER programı, amino asit dizisinden protein yapı ve fonksiyonunu tahminleyen çevrimiçi kullanılan bir programdır. Elde edilen model yapısı bilinen proteinlerin hizalanarak ve hizalanamayan bölgelerin de burada bulunan aminoasitlerin fizikokimyasal durumlarına göre konumlarının belirlenmesi yöntemiyle oluşturulmuştur (Roy et al., 2010; Yang et al., 2014). Bu program modelleme sonuçlarını birkaç başlık altında vermektedir. İkinci yapı tahmininde Sarmal yapı bölgeleri (H) ve β yaprak bölgeleri çoğunlukla 9 puan almıştır güven aralığında yer almaktadır. Başlangıç ve bitiş bölgelerindeki puanlama daha düşüktür ve bu bölgelerin

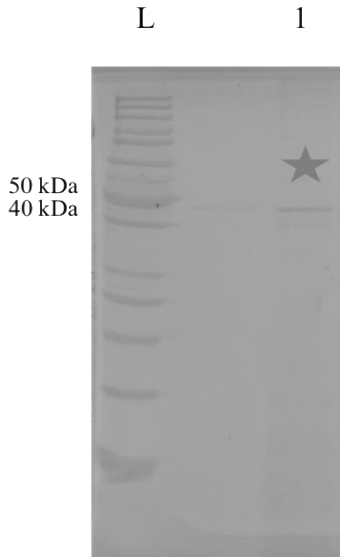
tahminlenmesinin zor olduğu söylenebilir. Normalize B değeri (B-faktör) proteinde bulunan aminoasitlerin ve atomların termal hareketliliğinin göstergesidir. B-Faktör [-2,5] arasında değerler alır. Negatif değerler daha az termal hareketliliği belirtmekte ve yapıdaki nispeten daha kararlı bölgeleri göstermektedir. Elde edilen modelde β yaprak bölgelerinin en kararlı bölgeler olduğu görölmektedir. Modelin oluşturulması sonucu model kalite göstergesi olarak “C-score” ile değerlendirilmektedir. Bu değer [-5,2] aralığındadır ve değer ne kadar yüksekse güvenilirlik o kadar yüksektir. Elde edilen modelde “C-score” değeri 1.07’dir ve 1,5’ten büyük olması model için kabul edilebilirdir.

RaptorX, üçüncül yapı tahmininde homoloji modelleme yaklaşımını kullanan çevrimiçi bir programdır. Bu yaklaşım, hedef diziye en benzer olan ve yapısı bilinen bir proteini kalıp olarak kullanarak, hedef modeli bu kalıba uydurmaya çalışır. Bu programda *Z. mobilis* levansukraz yapısı için *E. amylovora* (pdb: 4D47) levansukrazı kalıp olarak kullanılmıştır. Bunu yaparken, uygunluk durumuna göre bazı kalite değerleri ile modelin kalitesi hakkında bilgi verir (Källberg et al., 2012). “p-value” değeri modelin kalitesini belirten bir göstergedir. Bu değer ile kalite arasında ters bir ilişki vardır. Değer ne kadar düşükse model o kadar kalitelidir. Modelimizde elde edilen değer $9.86e-23$ olduğundan kalitelidir denilebilir. uGDT (GDT) değeri kesin model kalitesiyle ilgilidir. Amino asit sayısı 100’den yüksek olan protein dizilerinde uGDT değerinin 50 ‘den yüksek olması modelin kaliteli olduğu anlamına gelmektedir. Amino asit sayısının 100 ‘den küçük olduğu durumlardaysa uGDT değerinin 50 ‘den yüksek olması modelin kaliteli olduğunu göstermektedir. Modelde bu değer 338 (80) olduğundan model kalitedir. Modellenebilen aminoasit sayısı %100 olarak verilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Levansukrazın Üretimi

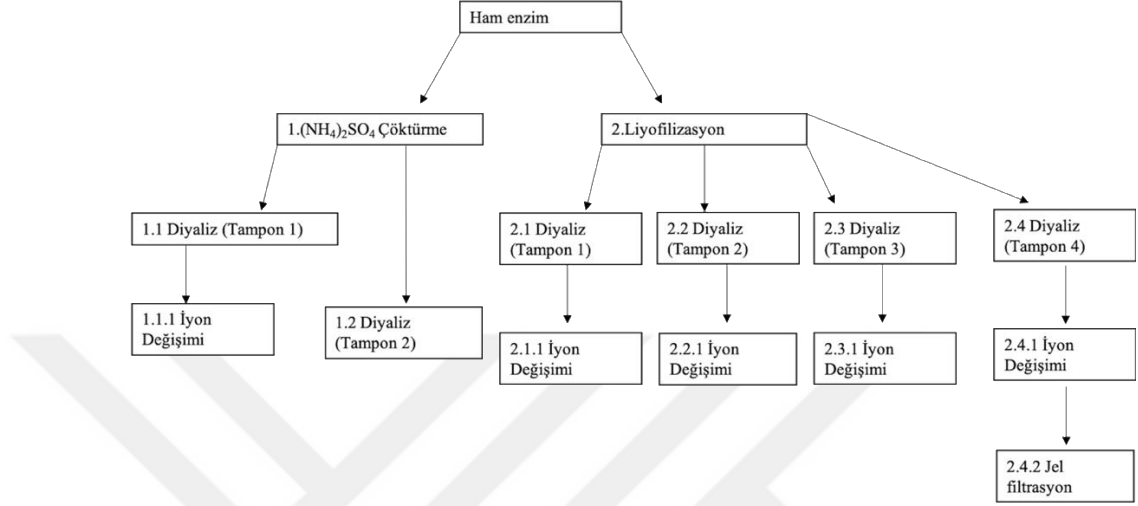
Levansukraz enziminin üretimi *Z. mobilis* levansukrazı için daha önce optimize edilmiş koşullarda (159 g/L başlangıç substrat konsantrasyonunda 30.3 °C'de pH 4.91'de 36 saat süreyle) gerçekleştirilmiştir. Bir birim levansukraz aktivitesi dakikada 1 µmol indirgen şekeri açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Hideshi Yanase et al., 1992). 36 saat sonucunda ortalama olarak 382 mL üst faz elde edilmiş ve ortalama 40 birim aktivitede levansukraz elde edilmiştir. Elde edilen üst fazda ortalama 13.6 mg protein olduğu tespit edilmiştir. Üst faz 4 kez konsantre edilerek %12 SDS-PAGE jele yüklenmiş ve jel incelendiğinde üst fazda belirgin tek bir bandın bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.1). Levansukraz enziminin tahmini molekül ağırlığı ExPasy, ProtParam Tool kullanılarak 47.3 kDa olarak hesaplanmıştır. Jelde yaklaşık 47 kDa olarak gözükken belirgin bant sekanslanmıştır ve *Z. mobilis* NRRL B-14023 tarafından üretilen levansukraz enziminin sekansına sahip olduğu gösterilmiştir (Erdal et al., 2017).



Şekil 4.1 *Z. mobilis* fermantasyon sonrası üst fazın %12 SDS PAGE jelde incelenmesi L: Protein ladder, 1: 4 kat seyreltilmiş örnek. Levansukraz bandı yıldız ile işaretlenmiştir.

4.2 Levansukrazın Saflaştırılması

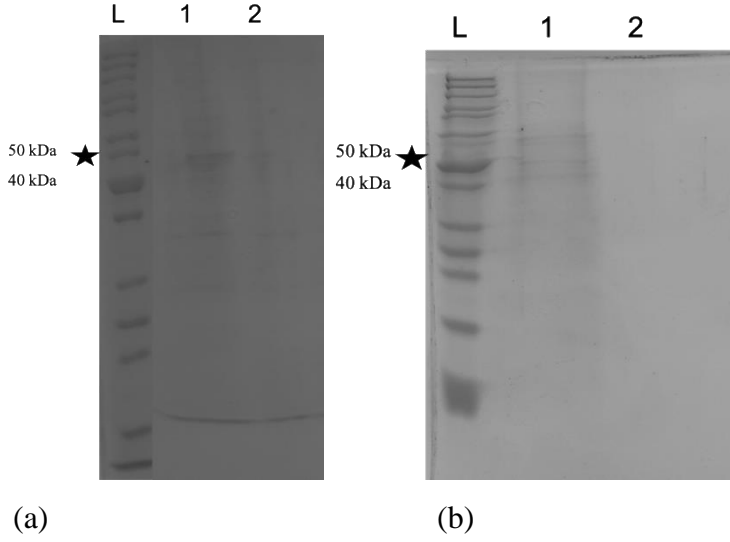
Levansukraz enzimi için uygulanan saflaştırma stratejisi Şekil 4.2’de verilmiştir. Farklı basamaklardan elde edilen proteinler o basamağın numarası ile (Örneğin 3.2) isimlendirilecektir.



Şekil 4.2 Saflaştırma Stratejisi Şeması.

4.2.1 Amonyum Sülfat Çöktürme

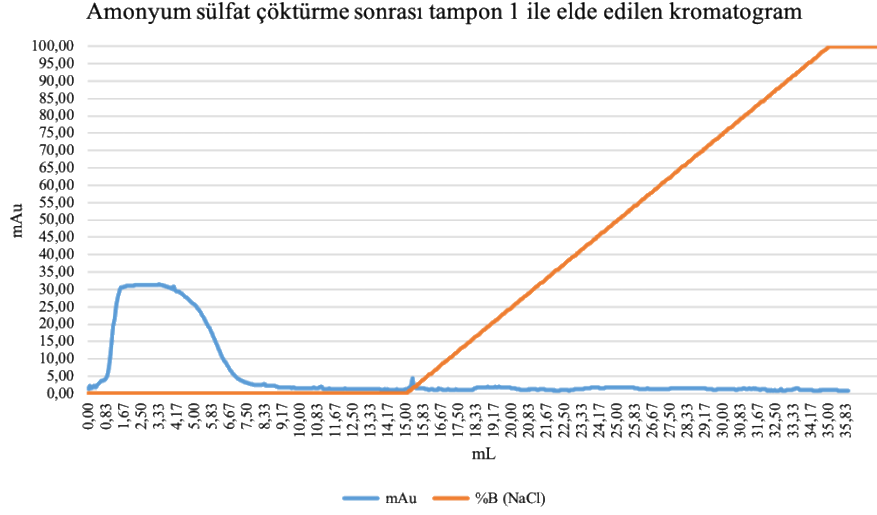
Üretim sonrası yaklaşık 400 mL üretim üstfazu elde edildiğinden saflaştırmanın ilk adımı olarak örneğin konsantre edilmesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle amonyum sülfat ile çöktürme işlemi denenmiştir. Şekil 4.3’de amonyum sülfat sonrası SDS-PAGE incelendiğinde 47 kDa civarında belirgin bant olduğu, bu banttan farklı molekül ağırlığındaki diğer proteinlerin çok az miktarda olduğu görülmüştür. Bu sonuç levansukrazın *Z. mobilis* sakkaroz fermantasyonu sonucunda salgılanan en önemli protein olduğunu göstermiştir. Amonyum sülfat çöktürme tampon 1 (22 mM sitrat-fosfat pH 5.4) ve tampon 2 (100 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ pH 7.0) ile gerçekleştirilmiştir.



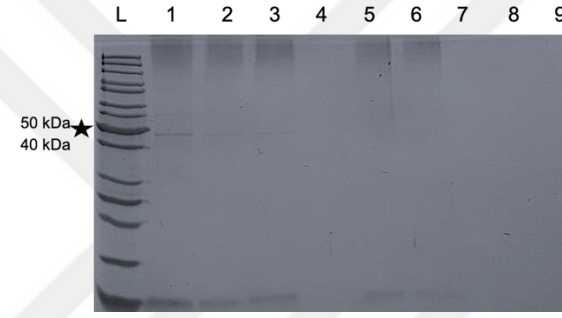
Şekil 4.3 *Z. mobilis* levansukrazın amonyum sülfat çöktürme sonrası %12 SDS-PAGE ile incelenmesi.

(a) L: protein markörü 1: amonyum sülfat çöktürme sonrası pellet 2: amonyum sülfat çöktürme sonrası üst faz (b) 1: amonyum sülfat çöktürme öncesi örnek 2: amonyum sülfat çöktürme sonrası pellet. Levansukraz bandı yıldız ile gösterilmiştir.

Yapılan denemeler sonucu Tampon 1 ile %80 amonyum sülfat doygunluğunda levansukraz enzimi hem pellet kısımda hem de üst fazda görülmüştür (Şekil 4.3a kuyu 1 ve 2). Tampon 2 ile amonyum sülfat denemesinde ise levansukraz enziminin çökmediği gözlenmiştir (Şekil 4.3b kuyu 2). Tampon 1 ile elde edilen amonyum sülfat pelletleri aynı tamponda çözülerek gece boyu diyalize bırakılmış ve ertesi gün anyon değişim kolonu (DEAE, 1mL) kullanılarak saflaştırma denemeleri yapılmıştır. Anyon değişim saflaştırma aşaması için AKTA Prime Plus sistemde 1 mL DEAE –FF kolonu kullanılmıştır (Şekil 4.4).



(a)



(b)

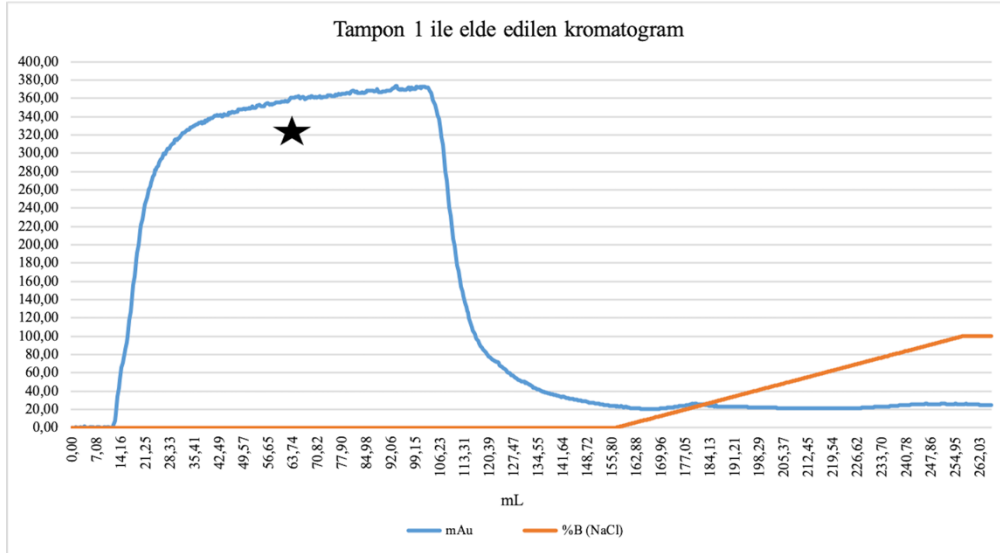
Şekil 4.4 Levansukraz 22 mM sitrat-fosfat pH 5.4 tamponda anyon değişim saflaştırma sonucu, amonyum sülfat çöktürme DEAE, 1mL kolon.

(a) kromatogramı (b) %12 SDS-PAGE jel sonucu. L: protein markörü, 1: Amonyum sülfat pellet 2-9: Akıntı ve gradyan fraksiyonları. Levansukraz bandı yıldız ile gösterilmiştir.

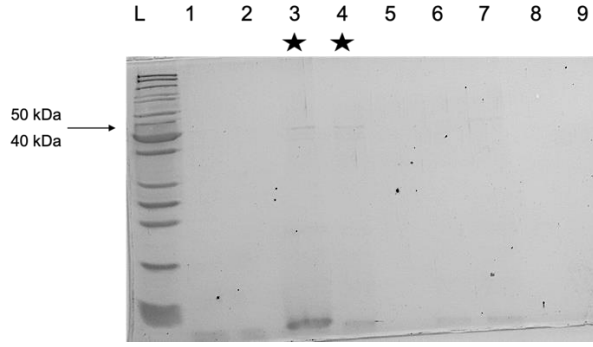
İyon değişim kolonuna levansukrazın bağlanmadığı görülmüştür (Şekil 4.4a ve Şekil 4.4b). Sonuç olarak amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile devam edilmemesine karar verilmiştir. Yüksek hacim üstfazların konsantre edilmesi için liyofilizasyon yapılmıştır.

4.2.2 Levansukraz Enziminin Tampon 1 Kullanılarak Sıfırlanması

Aktif formda enzim eldesi için enzimin aktif olduğu bilinen Tampon 1 (22 mM sitrat fosfat pH 5.4) ile sıfırlama denemelerine başlanmıştır. Sıfırlama basamağı 2.1 ile elde edilen örnek Tampon 1 ile 17 °C’de gece boyu diyaliz edilmiş ve diyaliz sonrası örneğin hidroliz aktivitesi 11.664 ± 1.86 mM glukoz/dakika olarak hesaplanmıştır ve bu değer toplam başlangıç aktiviteye göre 4 kat daha azdır. Liyofilizasyon öncesi ortalama 382 mL örneğin aktivitesi 11.354 ± 1.004 iken, diyaliz sonrası ortalama 102.5 mL örnekte 10.642 ± 1.86 aktivite elde edilmiştir. Diyaliz sonrası elde edilen 100 mL örnek anyon değişim kolonuna 4 mL/dakika hızda yüklenmiş, bu sırada akıntı fraksiyonları toplanmıştır. Elüsyon için lineer gradyan (0-1 M NaCl) 100 mL boyunca 4 mL/dakika akış hızında uygulanmış ve fraksiyonlar toplanmıştır. Deney sonucunda levansukrazın kolona tutunmadığı, akıntı ve yıkama fraksiyonlarında kolondan ayrıldığı görülmüştür (Şekil 4.5a ve Şekil 4.5b).



(a)



(b)

Şekil 4.5 Levansukraz anyon değişim saflaştırma sonucu, tampon 22 mM sitrat-fosfat pH 5.4, HiTrap Q HP 5 mL.

(a) Kromatogram sonucu. Akıntı fraksiyonu yıldız ile işaretlenmiştir. (b) %12 SDS-Page jel sonucu. L: protein markörü, 3 ve 4: Akıntı fraksiyonları 5-9: Gradyan fraksiyonları. Levansukraz bandı yıldız ve ok işareti ile gösterilmiştir.

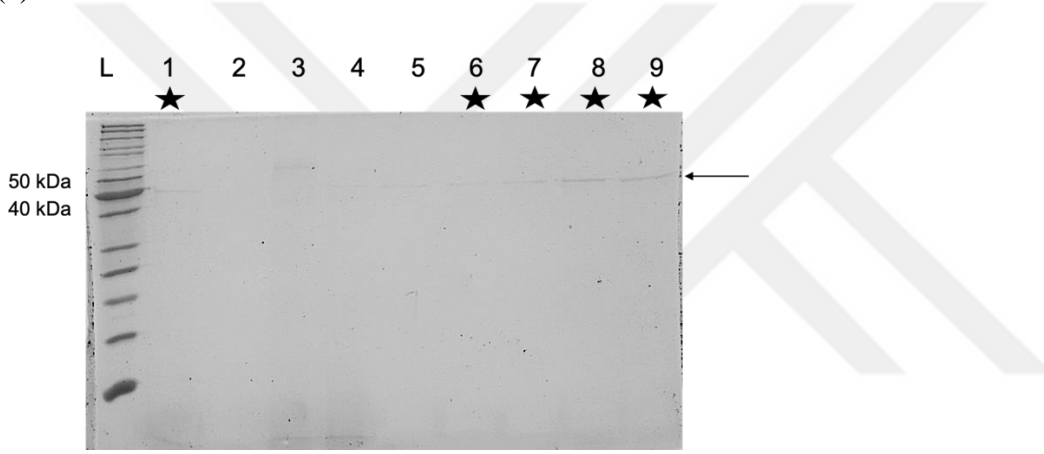
Denemeler sonucunda levansukrazın kolona tutunamadığı, akıntı ile geldiği tespit edilmiş ve saflaştırmalara tampon 1 ile devam edilmemiştir.

4.2.3 Levansukraz Enziminin Tampon 2 Kullanılarak Saflaştırılması

Farklı tamponlarda saflaştırmalara devam edilmiştir. Tampon 2 (100 mM KH_2PO_4 - K_2HPO_4 pH 7.0) ile saflaştırma denenmiştir. Saflaştırma basamağı 2.2 ile elde edilen örnek Tampon 2 ile 17 °C'de gece boyu diyaliz edilmiş ve diyaliz sonrası örneğin hidroliz aktivitesi 3.958 ± 1.83 mM glukoz/dakika olarak hesaplanmıştır ve bu değer toplam başlangıç aktiviteye göre yaklaşık 10 kat daha azdır. Diyaliz sonrası elde edilen 100 mL örnek anyon değişim kolonuna 4 mL/dakika akış hızında yüklenmiş, bu sırada akıntı fraksiyonları toplanmıştır. Elüsyon için lineer gradyan (0-1 M NaCl) 100 mL boyunca 4 mL/dakika akış hızında uygulanmış ve fraksiyonlar toplanmıştır (Şekil 4.6a ve Şekil 4.6b).



(a)



(b)

Şekil 4.6 Levansukraz anyon değişim saflaştırma sonucu, tampon 100 mM potasyum fosfat pH 7.0, HiTrap Q HP 5 mL.

(a) Kromatogram sonucu. Levansukraz içeren pik yıldız ile işaretlenmiştir. (b) %12 SDS-PAGE jel sonucu. L: protein markörü, 6-9: Gradyan fraksiyonları. Levansukraz bandı yıldız ve ok işareti ile gösterilmiştir.

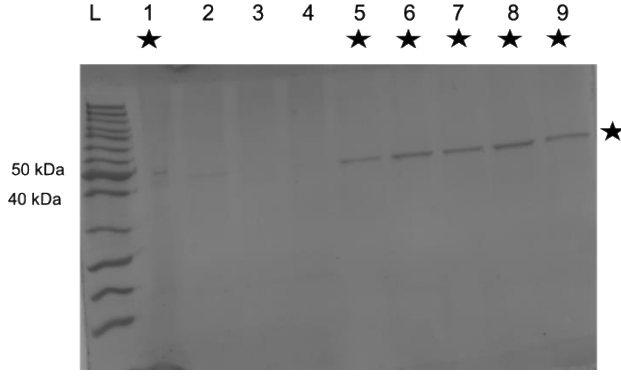
pH 7.0 fosfat tampon ile yapılan denemeler sonunda levansukrazın aktivitesinin büyük ölçüde kaybedildiği ve saflaştırılan protein miktarının da oldukça düşük olduğu görülmüş ve saflaştırmaya bu tampon ile devam edilmemiştir.

4.2.4 Levansukraz Enziminin Tampon 3 Kullanılarak Saflaştırılması

Tampon 3 (100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ pH 8.0) ile saflaştırma denemiştir. Saflaştırma basamağı 2.3 ile elde edilen örnek Tampon 3 ile 17°C 'de gece boyu diyaliz edilmiş ve diyaliz sonrası örneğin hidroliz aktivitesi $4.295 \pm 1.99\text{mM}$ glukoz/dakika olarak hesaplanmıştır ve bu değer toplam başlangıç aktiveye göre yaklaşık 10 kat daha azdır. Diyaliz sonrası elde edilen 100 mL örnek anyon değişim kolonuna 4 mL/dakika akış hızında yüklenmiş, bu sırada akıntı fraksiyonları toplanmıştır. Elüsyon için lineer gradyan (0-1 M NaCl) 100 mL boyunca 4 mL/dakika akış hızında uygulanmış ve fraksiyonlar toplanmıştır (Şekil 4.7a ve Şekil 4.7b).



(a)



(b)

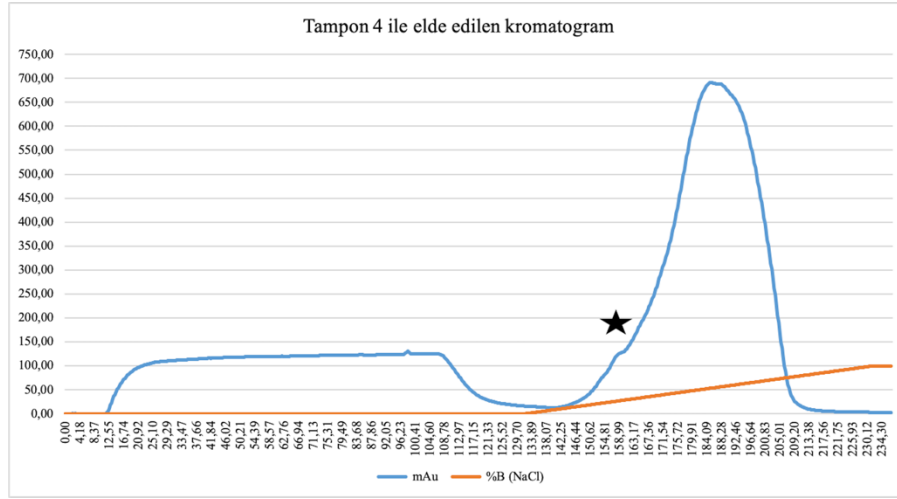
Şekil 4.7 Levansukraz anyon değişim saflaştırma sonucu, tampon 100 mM potasyum fosfat pH 8.0, HiTrap Q HP 5 mL.

(a) Kromatogram sonucu. Levansukraz içeren pik yıldız ile işaretlenmiştir. (b) %12 SDS-PAGE jel sonucu. L: protein markörü, 5-9: Gradyan fraksiyonları. Levansukraz bandı yıldız ile gösterilmiştir.

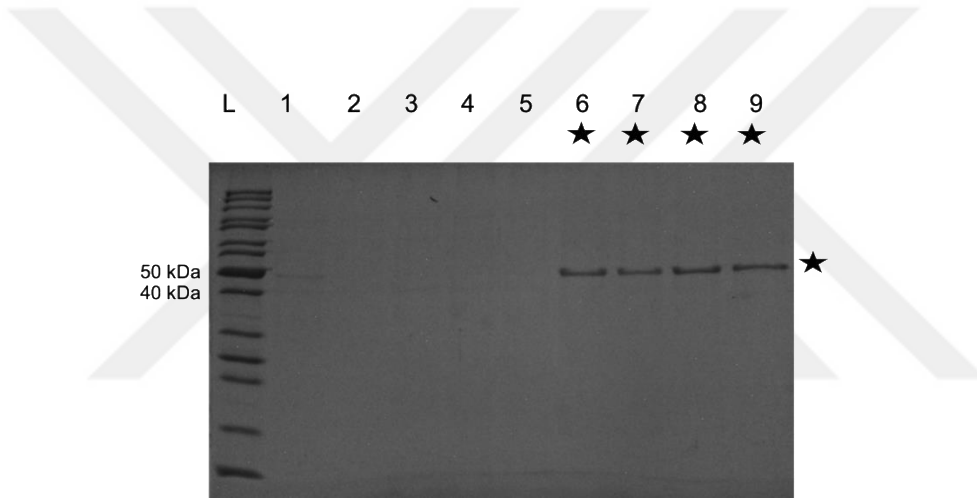
Denemeler sonucunda levansukrazın aktivitesinin ciddi oranda azaldığı görülmüştür. Ayrıca fosfat içeren tamponlar ile protein kristalizasyon sırasında tuz kristalleri oluşma olasılığı yüksek olduğu bilinmektedir. Bu nedenlerle saflaştırmalara fosfat tampon ile devam edilmemiştir.

4.2.5 Levansukraz Enziminin Tampon 4 Kullanılarak Saflaştırılması

Saflaştırmalara kristalizasyon için daha uygun bir tampon olan HEPES tampon ile devam edilmiştir. Tampon 4 (100 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM DTT) ile saflaştırma denenmiştir. Saflaştırma basamağı 2.4 ile elde edilen örnek Tampon 4 ile soğuk odada 48 saat boyunca 3 kez değişim ile diyaliz edilmiştir ve diyaliz sonrası örneğin hidroliz aktivitesi 0.031 ± 0.044 mM glukoz/dakika olarak hesaplanmıştır, bu koşullarda enzimin aktivitesi kaybolmuştur. Diyaliz sonrası elde edilen 100 mL örnek anyon değişim kolonuna 4 mL/dakika akış hızında yüklenmiş, bu sırada akıntı fraksiyonları toplanmıştır. Elüsyon için lineer gradyan (150 mM-1 M NaCl) 100 mL boyunca 4 mL/dakika akış hızında uygulanmış ve fraksiyonlar toplanmıştır (Şekil 4.8a ve Şekil 4.8b).



(a)

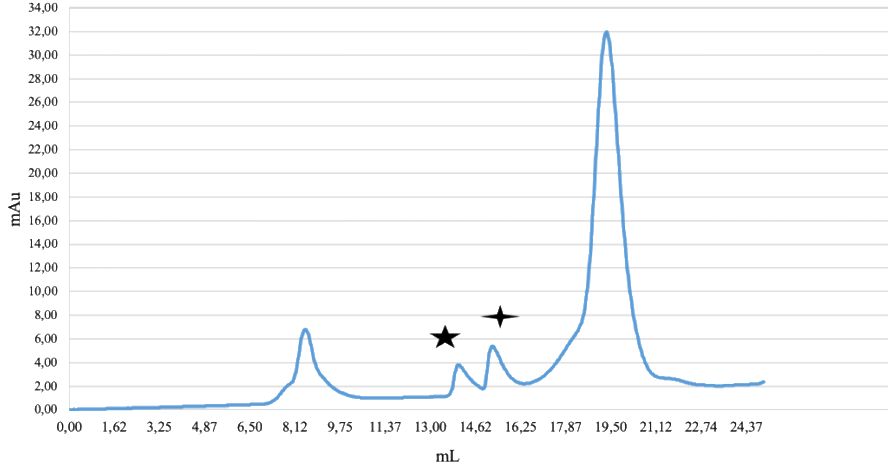


(b)

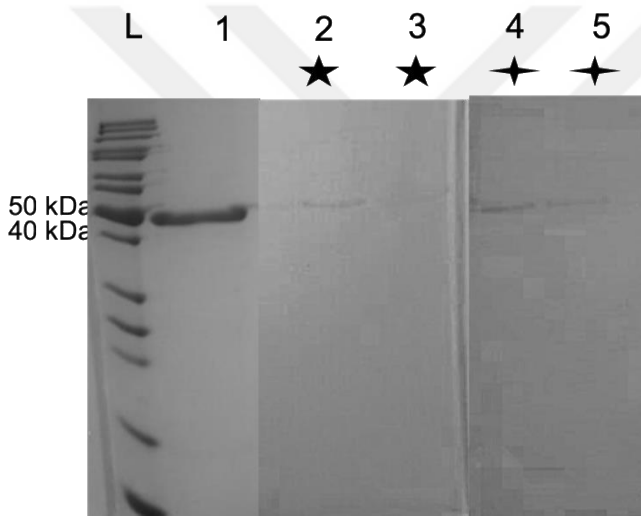
Şekil 4.8 Levansukraz anyon değişim saflaştırma sonucu, tampon 100 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM DTT, HiTrap Q HP 5 mL.

(a) Kromatogram sonucu. Levansukraz içeren pik yıldız ile işaretlenmiştir. (b) %12 SDS-PAGE jel sonucu. L: protein markörü 1: Diyaliz sonrası, 6-9: Gradyan fraksiyonları. Levansukraz bandı yıldız ile gösterilmiştir.

Elde edilen iyi saflıkta levansukraz fraksiyonları yaklaşık 1.6 mg/mL'ye konsantre edildikten sonra Superdex 200 kolona yüklenmiştir. Superdex 200 kolon ile jel filtrasyon sonrası dört adet pik elde edilmiş ve levansukrazın kolondan ayrılan ikinci ve üçüncü pikte olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9a ve Şekil 4.9b).



(a)



(b)

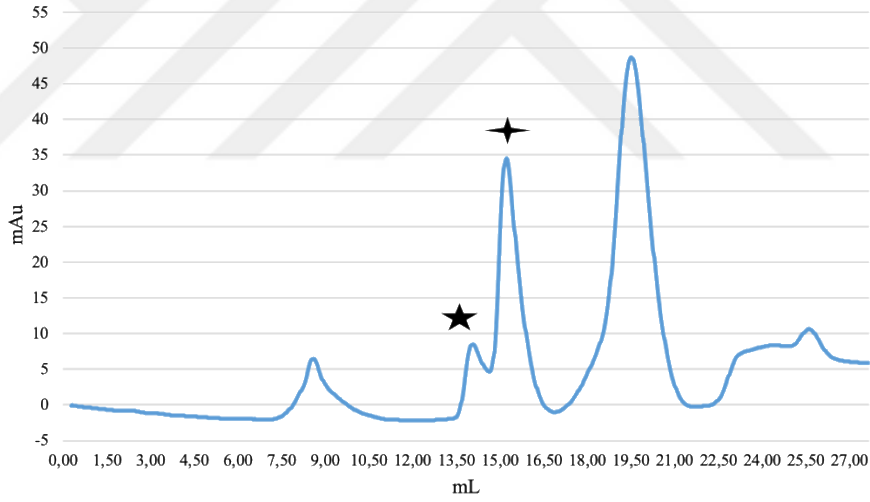
Şekil 4.9 Levansukraz jel filtrasyon saflaştırma sonucu, tampon 100 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM DTT, Superdex 200 kolon akış hızı 0.3 mL/dak.

(a) Kromatogram sonucu. Levansukraz fraksiyonları yıldızlar ile işaretlenmiştir. (b) %12 SDS-PAGE jel sonucu. L: protein markörü 1: Kolona verilen, 2-5: Gradyan fraksiyonları. Pik fraksiyonları şekil a'daki gibi işaretlenmiştir.

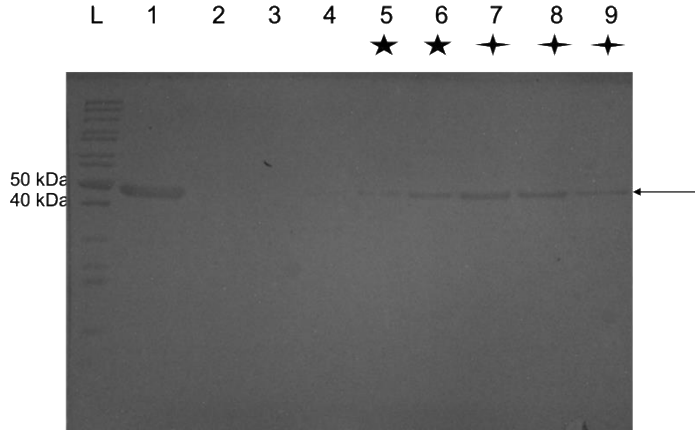
Levansukraz elüsyon hacimleri kolon kalibrasyon eğrisinden elde edilen denkleme yerleştirilerek molekül ağırlıkları hesaplanmıştır. Kromatogramda görülen ikinci pikin elüsyon hacminden (14 mL) molekül ağırlığı 83 kDa; üçüncü pikin elüsyon hacminden (15.24 mL) molekül ağırlığı 46 kDa olarak

hesaplanmıştır. Levansukrazın tahmini molekül ağırlığı 47.3 kDa olduğu için, jel filtrasyon sonucunda levansukraz dimerik ve monomerik formlar halinde ayrı ayrı elde edilmiştir.

Bu saflaştırma sonucunda levansukrazın monomerik formu yeterli miktarda elde edilememiş ve daha yüksek konsantrasyonda eldesi için levansukrazın sekansı incelenmiş (Ek-1) sekansta üç adet sistein amino asidi bulunduğu görülmüştür. Sistein amino asitlerinin birbirleri ile disülfid bağları yaptığı bilindiğinden bu bağın dimerik form oluşumuna sebep olabileceği düşünülmüş, bu bağa engel olmak için daha yüksek konsantrasyonda DTT kullanılmasına karar verilmiştir. Deneyle 10 mM DTT varlığında gerçekleştirilmiş, jel filtrasyon sonucunda dört pik elde edilmiş ve levansukrazın kolondan ayrılan ikinci ve üçüncü pikte olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10a ve Şekil 4.10b).



(a)

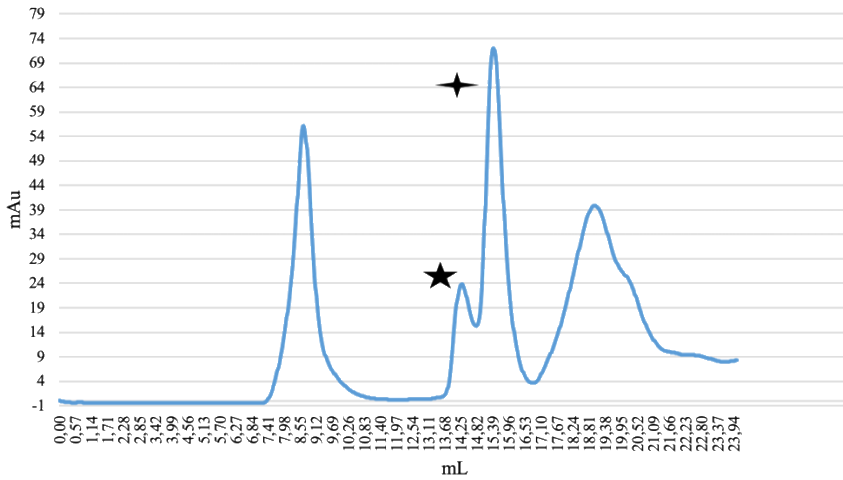


(b)

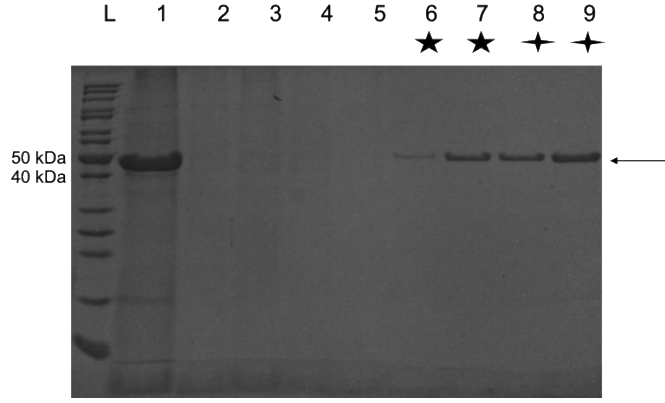
Şekil 4.10 Levansukraz jel filtrasyon saflaştırma sonucu, tampon 100 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM DTT.

(a): Superdex 200 kolon kromatogramı, akış hızı 0.3 mL/dak. (b): %12 SDS-PAGE jel sonucu. Pik fraksiyonları kendi şekilleri ile işaretlenmiştir.

Kromatografilerde rezolüsyonu arttırıp ayrımı daha iyi gerçekleştirmek için kolona verilen protein miktarı arttırılabilmektedir. Anyon değiştirme sonrası protein konsantrasyonu yaklaşık 2 mg/mL'ye çıkarılmış ve jel filtrasyon saflaştırma bu örnekle yapılmıştır. Aynı saflaştırma protokolü uygulanmış ve saflaştırma sonucunda benzer kromatogram elde edilmiştir (Şekil 4.11a ve Şekil 4.11b).



(a)



(b)

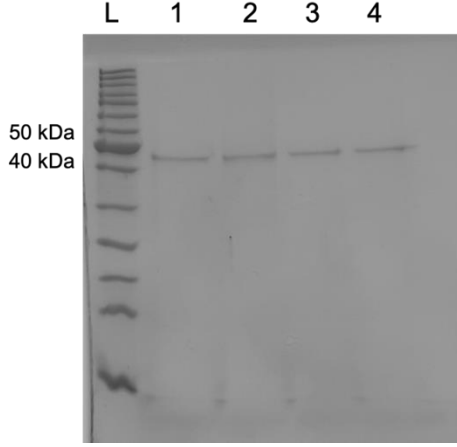
Şekil 4.11 Levansukraz jel filtrasyon saflaştırma sonucu, tampon 100 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM DTT.

(a): Superdex 200 kolon kromatogramı, akış hızı 0.3 mL/dak. (b): %12 SDS-PAGE jel sonucu. Pik fraksiyonları kendi şekilleri ile işaretlenmiştir.

Bu şekilde monomerik formda elde edilen saf levansukraz azotta dondurularak kalite, stabilite ve kristalizasyon koşullarının incelenmesi için Instruct desteği ile Hollanda Kanser Enstitüsüne (NKI) gönderilmiştir (Instruct proje numarası: 3982 - Understanding the product specificity of *Z. mobilis* levansucrase through structural biology). Sonuçlar beklenmektedir.

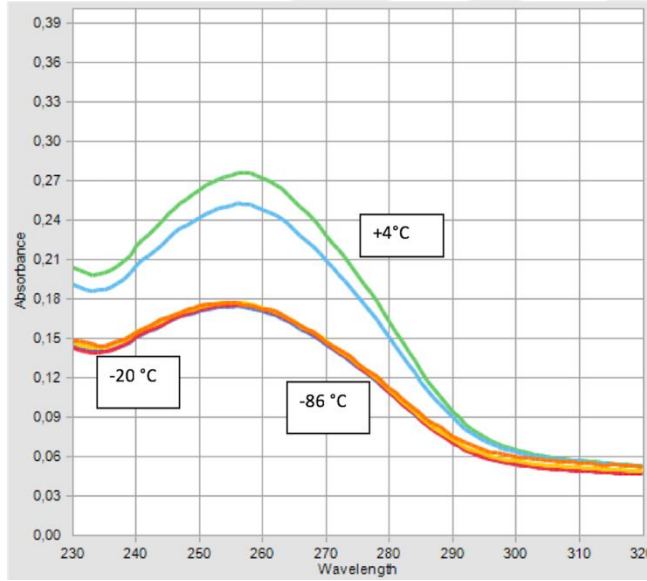
4.2.6 Levansukrazın Depolama Koşullarının İncelenmesi

Saflaştırma aşamasındaki levansukrazın depolama sıcaklığının belirlenmesi için saflaştırma basamağı 2.3.1'den elde edilen levansukraz 4 °C, -20 °C ve -86 °C'de gece boyu bekletilmiş, bu örneklerle protein miktar tayini yapılmış ve %12 SDS-PAGE jel yürütülmüştür (Şekil 4.12). A280 (Şekil 4.13) yöntemi ve Bradford yöntemiyle yapılan protein miktar tayini sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.12 Depolama koşullarının belirlenmesi için hazırlanan örneklerle yürütülen %12 SDS-Page jel.

L: protein markörü 1: Saflaştırma aşaması 2.3.1 ile elde edilen örnek 2: 4 °C'de bekletilen örnek 3: -20 °C'de bekletilen örnek 4: -86 °C'de bekletilen örnek.



Şekil 4.13 Levansukraz UV bölge absorpsiyon spektrası.

Çizelge 4.1 Depolama analizleri için hazırlanan örneklerin protein miktarları.

| Örnek | A280 | Bradford |
|----------------------------------|------|----------|
| Saflaştırma basamağı 2.3.1 | 1.25 | 0.033 |
| 4 °C | 1.96 | 0.036 |
| -20 °C | 1.22 | 0.031 |
| -86 °C | 1.23 | 0.032 |

Yapılan deney sonucunda levansukrazın hem A280 değeri hem de Bradford ile elde edilen protein değerlerinin -20 °C ya da -86 °C depolanan örnekler için başlangıç değerine daha yakın olduğu ve elde edilen spektrada +4 °C'de depolanan örnekte 260 nm dalga boyunda girişim yapan bir bileşik olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenlerden dolayı *Z. mobilis* levansukrazının dondurularak (-20 °C ya da -86 °C) depolanmasının daha uygun olduğu görülmüştür. Literatürde levansukrazın levan/fruktooligosakkarit üretmesi için optimum sıcaklık araştırması yapılmış ancak saf levansukrazın saklanması için gerekli optimum koşulların araştırılmasına rastlanmamıştır.

Bradford ve 280 nm ile elde edilen protein konsantrasyonları karşılaştırıldığında aralarında önemli ölçüde fark olduğu görülmüştür. Bu farkın sebebinin Bradford yöntemi için saflaştırma ilerledikçe hassasiyetin dışında kalınması ve A280 değeri incelenirken maksimum dalga boyunun 280 nm dalga boyunda değil de 260 nm dalga boyunda görülmesi olduğu düşünülmektedir. Layne (1957) proteinlerin maksimum absorpsiyon değerinin 280 nm dalga boyunda olduğunu bildirmiştir ancak incelenen örnekte 260 nm dalga boyunda olduğu görülmektedir.

4.2.7 Saflaştırma Özeti

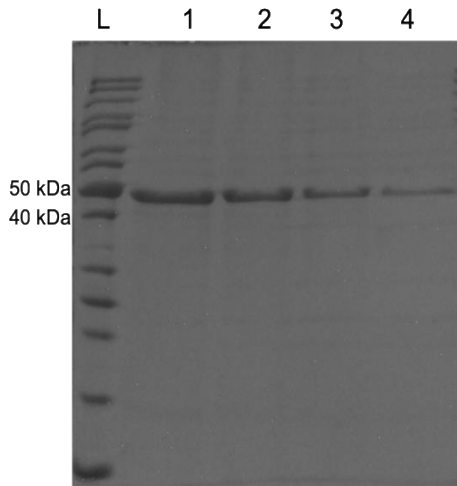
Saflaştırma aşaması 2.4.1'den elde edilen levansukraz enzimi ultrafiltrasyon üniteleri (Amicon 500, NMWCO 10 kDa) kullanılarak santrifugasyon ile yüksek konsantrasyona getirilmiştir. Protein konsantrasyon belirlemede yaşanan problemden dolayı hangi yöntemin daha tutarlı olduğunun belirlenmesi için farklı konsantrasyonlardaki örnekler ile ölçüm

yapılmıştır. Konsantre edilerek elde edilmiş örnekten ve tampon 4 kullanılarak sırasıyla 2 kat seyreltilmiş, 5 kat seyreltilmiş ve 10 kat seyreltilmiş örnekten %12 SDS-PAGE jel örneği alınmış, A280 değerleri ve Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonları okunmuştur. Bradford yöntemi ve A280 ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiş ve örneklerin jel görüntüleri ve absorpsiyon spektrası Şekil 4.14’te incelenmiştir.

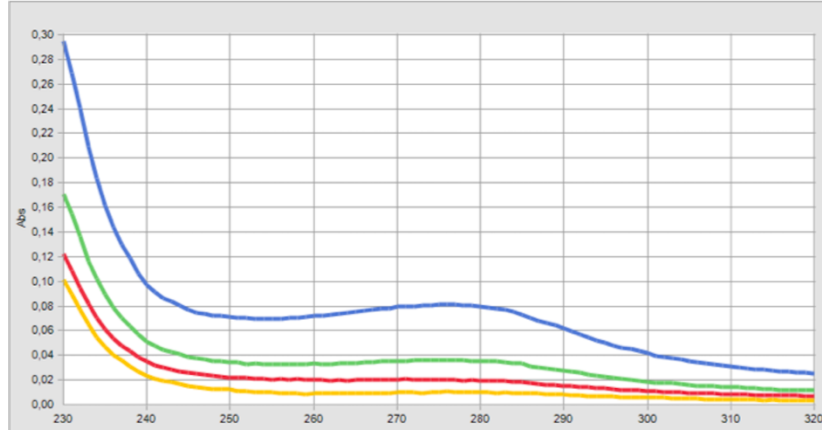
Çizelge 4.2 Verilen örneklerin protein miktarlarının A280 ve Bradford yöntemi ile karşılaştırılması.

| Örnek | A280 mg/mL | Bradford mg/mL |
|---------------------|---------------|-------------------|
| Konsantre örnek | 1.60 | 0.1995 |
| 2 kat seyreltilmiş | 0.687 | 0.124 |
| 5 kat seyreltilmiş | 0.293 | 0.0994 |
| 10 kat seyreltilmiş | 0.178 | 0.0293 |

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi Bradford yöntemi ile yapılan okumalar ile tutarsız sonuçlar elde edilmiştir. 280 nm absorbans değerlerinin ise tutarlı olduğu ve protein miktarı belirlemek için kullanılabilceği ortaya çıkmıştır (Şekil 4.13).



(a)



(b)

Şekil 4.14 Levansukraz ile konsantrasyon taraması.

(a) %12 SDS Page sonucu; L: protein markörü 1: Konsantre örnek 2: 2 kat seyreltilmiş örnek 3: 5 kat seyreltilmiş örnek 4: 10 kat seyreltilmiş örnek (b) Konsantre ve seyreltilmiş örneklerin UV bölgesinde elde edilen spektrası. Mavi konsantre, yeşil 2 kat seyreltilmiş, kırmızı 5 kat seyreltilmiş ve sarı 10 kat seyreltilmiş örnek.

Yapılan saflaştırma deneylerinin basamaklarında elde edilen levansukraz enziminin protein konsantrasyonları çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Verilen aşamalardaki protein miktarları.

| Örnek | mg/mL | mL | Toplam Protein (mg) | Yöntem |
|--------|---------------|--------|---------------------|----------|
| Üretim | 0.0356±0.0031 | 382 | 13.60 | Bradford |
| 1.1 | 0.0415±0.0075 | 6.15 | 0.26 | Bradford |
| 1.1.1 | 0.064±0.0114 | 46 | 2.94 | Bradford |
| 2.1 | 0.038±0.041 | 102.5 | 3.90 | Bradford |
| 2.1.1 | 0.0791±0.0021 | 50 | 3.96 | Bradford |
| 2.2 | 0.0383±0.0014 | 7.16 | 0.27 | Bradford |
| 2.3 | 0.0484±0.0042 | 101.7 | 4.92 | Bradford |
| 2.3.1 | 0.0397±0.0063 | 8 | 0.32 | Bradford |
| 2.4 | 0.0544±0.0093 | 101.43 | 5.52 | Bradford |
| 2.4.1 | 1.746±0.78 | 0.695 | 1.21 | A280 |
| 2.4.2 | 1.474±0.88 | 0.188 | 0.28 | A280 |

Yapılan denemeler sonucunda saflaştırmalarda bir özet tablo çıkaramayacağımız anlaşılmıştır. Kullandığımız Bradford yönteminde saflaştırma ilerledikçe hassasiyetin dışında kalındığı ve analiz için gereken 12 µL miktarın elde edilen saf enzim için çok yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca fermantasyon sonrası üst fazda besiyerinde bulunan bileşenlerin girişim yapacağından dolayı A280 değerinin kullanılamayacağı düşünülmüştür. Bu bilgilerin ışığında sonuçlar değerlendirilmiştir.

Toplam protein değerleri karşılaştırıldığında başlangıç protein miktarına en yakın miktarda proteinin tampon 4 (100 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM DTT) ile diyaliz sonrası elde edildiği görülmüştür. İleri saflaştırma aşamalarında da bu tampon ile iyi sonuç alındığından ve ayrıca kristalizasyon için de kullanımı uygun bir tampon olduğundan optimum saflaştırma tamponu olarak tampon 4 kullanılmıştır.

Yapılan saflaştırma deneylerinin basamaklarında elde edilen levansukraz enziminin indirgen şeker DNS yöntemine göre hesaplanan aktivite değerleri çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Verilen aşamalardaki ortalama aktivite miktarları.

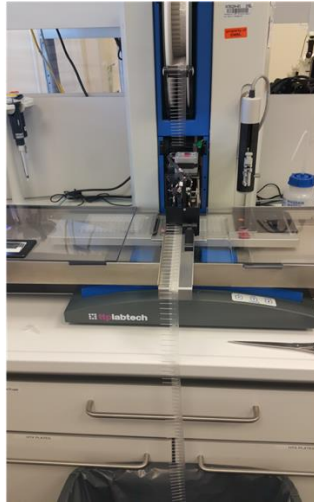
| Örnek | mM Glukoz /dakika | Hacim (mL) | Toplam Aktivite (mM Glukoz /dakika) |
|--------------|--------------------------|--------------------|--|
| Üretim | 11.354±1.004 | 382 | 4337.23 |
| 1.1 | 4.998±0.144 | 6.15 | 30.74 |
| 2.1 | 10.642±1.86 | 102.5 | 1090.81 |
| 2.2 | 3.958 ±1.83 | 101.1 | 400.15 |
| 2.2.1 | 4.029±0.295 | 7.16 | 28.85 |
| 2.3 | 3.624±1.395 | 101.7 | 368.57 |
| 2.4 | 0.646±0.041 | 101.43 | 65.52 |
| 2.4.1 | 0.266±0.006 | 0.695 | 0.18 |

Aktivite değerleri karşılaştırıldığında en yüksek aktivitenin 11.354±1.004 mM glukoz /dakika ile üretim sonrası olduğu ve bu değere en yakın değer saflaştırma aşaması 2.1 ile elde edilen levansukrazda olduğu görülmüştür. Tampon 4 (2.4 ve 2.4.1) ile yapılan saflaştırma sonrası aktivite tamamen kaybedilmiştir. Aktivitenin yüksek olduğu koşullarda (tampon 1, 2.1) ise ileri saflaştırma aşamalarında sonuç alınamamıştır. Tezin ana hedefi

levansukraz enzimini en yüksek saflık ve homojenlikte elde edip kristal koşulunun araştırılması olduğundan saflaştırma aktivitenin olmadığı ancak safı saflaştırma basamaklarında en iyi sonuç veren koşullarda (tampon 4) gerçekleştirilmiştir.

4.3 Levansukraz Kristalizasyon Denemeleri

Makromoleküler yapıları çözmek için kullanılan deneysel tekniklerin başında kristalizasyon gelmektedir. *Z. mobilis* levansukrazının kristalizasyonu için daha önce yapılan bir çalışma olmadığından kristalizasyon çalışması deneme yanılma yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Deneyler kristal yapı elde edebilmek için farklı kristalizasyon plakaları (koşulları), farklı saflaştırma aşamaları ve sıcaklık gibi parametreler değiştirilerek tekrarlanmıştır. Kristalizasyon denemelerinin bir kısmı EMBL- Hamburg'da bulunan SPC (Sample Preparation and Characterisation) laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. EMBL-Hamburg SPC laboratuvarında yapılan denemeler Mosquito-LCP (ttplabtech) robotta (Şekil 4.15a) gerçekleştirilmiş ve The RockImager-1000 (Formulatrix) sisteminde 19 °C'de depolanmış, 0, 1, 3, 7, 14, 28, 56 ve 84. günlerde görüntülenmiştir. EMBL-Hamburg SPC laboratuvarında elde edilen damla görüntülerden bazıları Ek-3'de verilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.15 (a) Mosquito-LCP (ttplabtech) kristal robotu. (b) Oturan damla plaka görseli.

Yapılan ilk deneme için 2.4.1 saflaştırma basamağından çıkan levansukraz kullanılmıştır. Protein konsantrasyonu ultrafiltrasyon üniteleri (Amicon 500, NMWCO 10 kDa) kullanılarak santrifugasyon ile 4.350 mg/mL konsantrasyona getirilmiş ve HH_QIAGEN_Classics-II, HH_MD_Morpheus HT-96, HH_QIAGEN_Classics-I ve HH_QIAGEN_JCSG-Plus kitleri kullanılarak oturan damla (sitting drop) plakalar oluşturulmuştur. Kristalizasyonun hangi koşulda başladığı, hangi fazda olduğu, kristal oluşup oluşmadığı ya da çökelti görülüp görülmediği sonraki kristalizasyon aşamaları için önemlidir. Bu deneyde kristal oluşumu gözlenmemiş ancak bazı damlalarda çökelti oluşumu gözlenmiştir (Ek-3).

Yapılan diğer denemede saflaştırma basamağı 2.4.2'den çıkan monomerik levansukraz kullanılmıştır. Protein ultrafiltrasyon üniteleri (Amicon 500, NMWCO 10 kDa) kullanılarak santrifugasyon ile 10.684 mg/mL konsantrasyona getirilmiş ve HH_QIAGEN_Classics-II, HH_MD_Morpheus II_HT, HH_MD_Morpheus HT-96, HH_QIAGEN_Classics-I ve HH_QIAGEN_JCSG-Plus kitleri kullanılarak oturan damla (sitting drop) plakalar oluşturulmuştur. Yapılan deneyde kristal oluşumu gözlenmemiş ancak bazı damlalarda çökelti oluşumu gözlenmiştir (Ek-3).

Bu sonuçlar elde edildikten sonra yüksek hacimde proteinle ve sallanan damla yöntemiyle kristalizasyon denemeleri yapılmıştır. Saflaştırma basamağı 2.4.1 ile elde edilen levansukraz ultrafiltrasyon üniteleri (Amicon 500, NMWCO 10 kDa) kullanılarak santrifugasyon ile 2.240 mg/mL konsantrasyona getirilmiş, laboratuvarında hazırlanan çözeltiler rezervuar çözeltisi olarak kullanılmış ve sallanan damla olacak şekilde plakalar hazırlanmıştır (Ek-4). Plakalar sıcaklık kontrollü inkübatörde (FRIOCELL 222 Cooling İncubator) 16 °C'de bekletilmiştir ve ilk hafta her gün daha sonra haftada bir kez Euromex Nexius Zoom stereo mikroskop ile gözlenmiştir (Şekil 4.16a).

Safılaştırma basamağı 2.4.2'den elde edilen levansukraz ile elde edilen ultrafiltrasyon üniteleri (Amicon 500, NMWCO 10 kDa) kullanılarak santrifugasyon ile 2.465 mg/mL konsantrasyona getirilmiş, laboratuvarıda hazırlanan çözeltiler rezervuar çözeltileri olarak kullanılmış ve sallanan damla olacak şekilde plakalar hazırlanmıştır. Yine aynı basamaktan elde edilen levansukraz ultrafiltrasyon üniteleri (Amicon 500, NMWCO 10 kDa) kullanılarak santrifugasyon ile 2.118 mg/mL konsantrasyona getirilmiş, hazır alınan PACT Premier kristalizasyon kitinden seçilen koşullar ile sallanan damla olacak şekilde plakalar hazırlanmıştır (Ek-4).

Safılaştırma 2.4.1 basamağından elde edilen protein ultrafiltrasyon üniteleri (Amicon 500, NMWCO 10 kDa) kullanılarak santrifugasyon ile 2.430 mg/mL konsantrasyona getirilmiş, daha önceki plakalardan gözlenen çekirdeklenme ile "streak seeding" yapılarak yeni plaka oluşturulmuştur (4 μ l çözeltili + 4 μ l protein) (Ek-4).



(a)



(b)

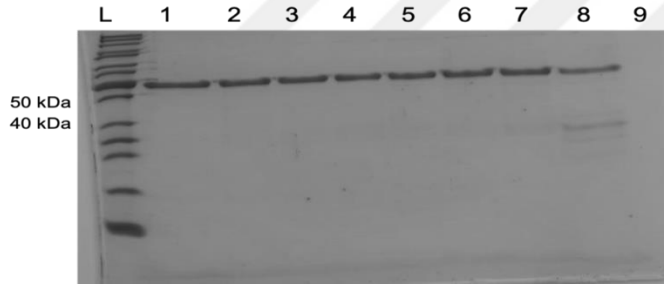
şekil 4.16 (a) Laboratuvarıda kullanılan Euromex Nexius Zoom stereo mikroskobu. (b) Oturan damla plaka görseli.

Yapılan denemeler sonrasında kristal elde edilememiştir. Kristalizasyona engel olan sebeplerden biri proteinlerin damla içinde yapısının bozulmasıdır. Kısıtlı proteoliz deneyi ile proteinlerin esnek bölgeleri

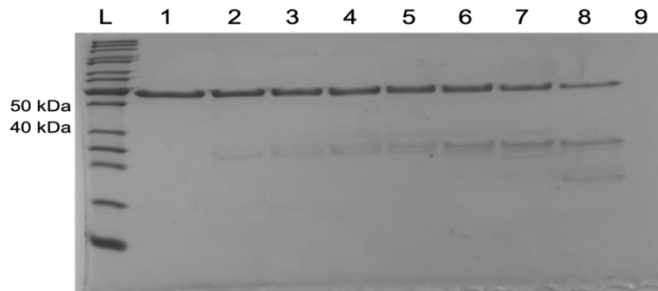
tespit edilebilir ve bu bölgeler ayrıldıktan sonra kristal elde etmek mümkün olabilmektedir. Levansukraz enziminin kristalize olabilecek bölgesini elde etmek için kısıtlı proteoliz denemesi yapılmasına karar verilmiştir.

4.3.1 Levansukrazın Kısıtlı Proteolizi

Globüler proteinlerin düzensiz/esnek proteinlere göre daha kolay kristalize olduğu bilinmektedir. Kısıtlı proteoliz proteinlerin esnek/düzensiz bölgelerinin tespit edilmesi ve bu bölgelerin elde edilmesi için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Kaplan-Turkoz et al., 2012). Saflaştırma aşaması 2.4.1'den elde edilen levansukraz enzimi ultrafiltrasyon üniteleri (Amicon 500, NMWCO 10 kDa) kullanılarak santrifugasyon ile yüksek konsantrasyona getirilmiştir. Levansukraz küçük miktarlarda tripsin ile ayrı ayrı inkübe edilmiş ve değişik zaman aralıklarında alınan örnekler SDS-PAGE jel elektroferez ile incelenmiştir (Şekil 4.17).



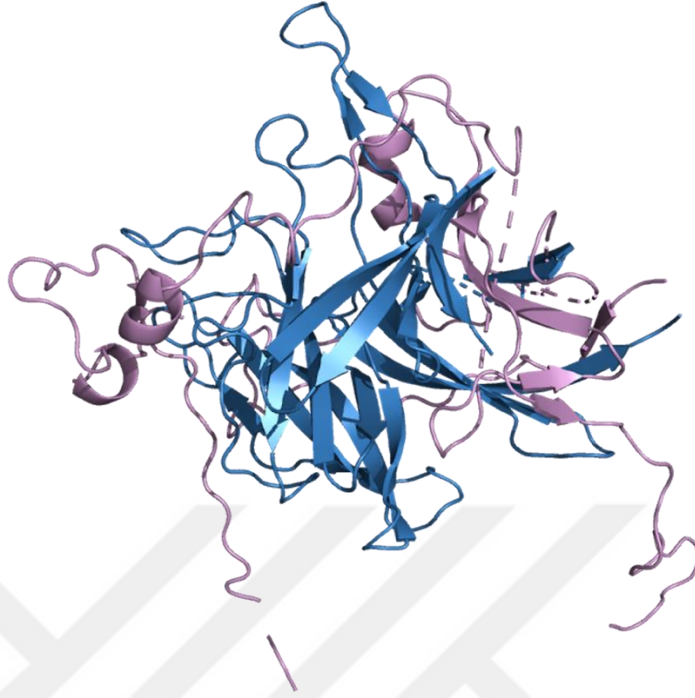
(a)



(b)

Şekil 4.17 Tripsin proteolizi sonrası örneklerin sds-page ile incelenmesi.

(a): 2 µg (b): 10 µg tripsin, L: protein markörü 1: Tripsin eklenmeden 2: 0. saat 3: 10. Dk 4: 20.dk 5: 30.dk 6: 1.saat 7: 2.saat 8: gece boyu 9: boş.



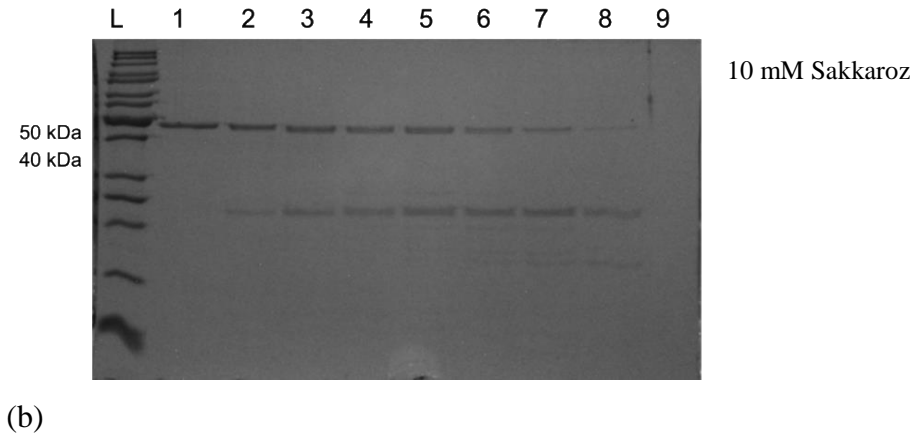
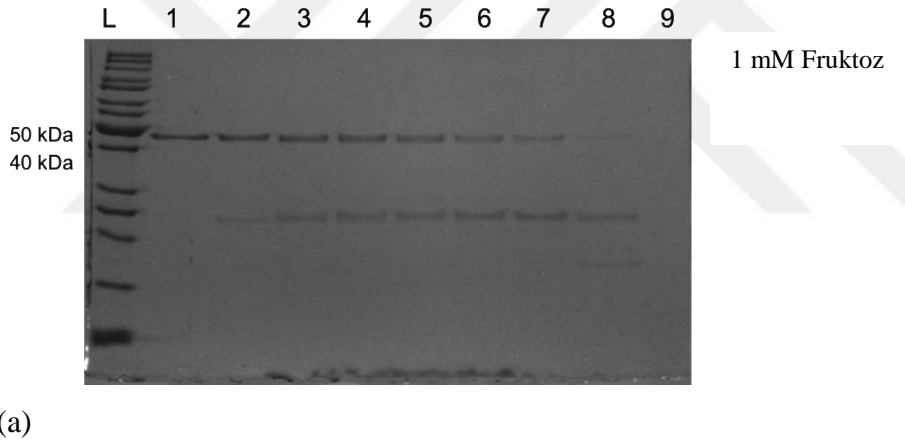
Şekil 4.18 Lsc yapı modeli üzerinde tripsin proteolizi tahmini.

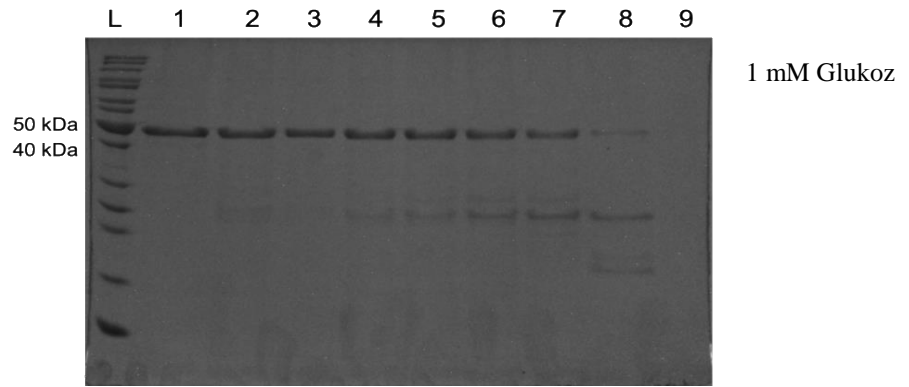
Proteoliz ile kesilecek bölgeler pembe, yapıda kalacak bölgeler mavi (beta yaprak) ile gösterilmiştir.

Tripsin ile kesim sonrası proteolize olmayan kararlı en yüksek molekül ağırlığa sahip bölgeye bakıldığında molekül ağırlığının yaklaşık 25 kDa olduğu görülmüştür (Şekil 4.17). Tripsin ile kesim sonrası kararlı bir bölge elde edilmesi ve bu bölgenin kristalize edilmesi düşünülmüştür. Tripsin substrat spesifik bir enzimdir; arjinin ve lizin amino asitlerini takip eden peptid bağlarını keser (Olsen, et al., 2004). Bu bilginin ışığında ve elde edilen kararlı bölgenin molekül ağırlığı da göz önüne alınarak levansukraz yapı modeli üzerinde tripsinin kestiği tahmin edilen bölgeler işaretlenmiştir. Tripsin kesim sonrası yapının çevre sarmallarının çoğunun parçalanacağı ve geriye merkez beta yaprakların kalacağı öngörülmüştür (Şekil 4.18). Bakar ve Kaplan Türköz (2017) *Z. mobilis* levansukrazının transfruktozilasyon aktivitesi için çevre sarmalların kritik olduğunu önermişlerdir. Şekil 4.18’de görüldüğü gibi tripsin ile kesim sonucunda büyük ihtimalle çevre sarmalları içermeyen yapısal kararlı bir parça oluştuğu ve bu bölgenin yapı çözümünün enzimin

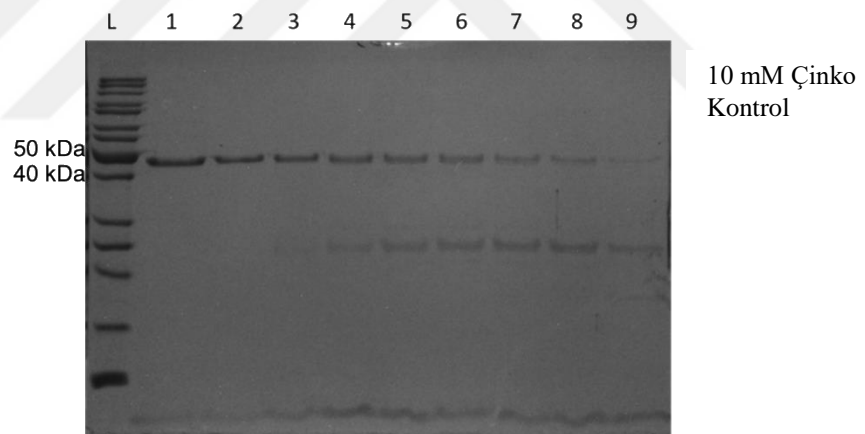
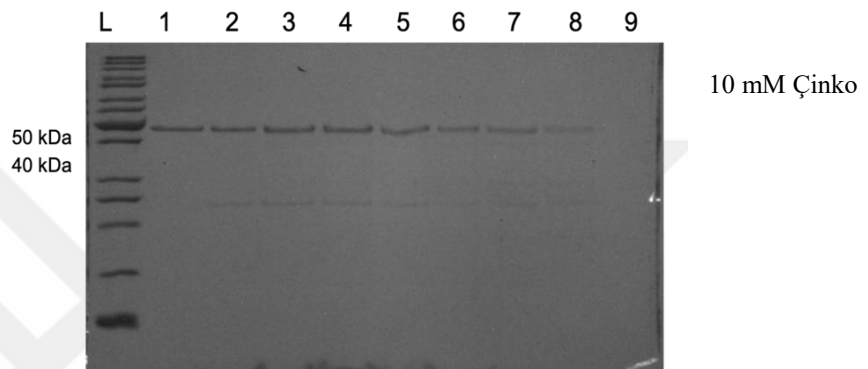
fonksiyonu hakkında bilgi sağlamayacağı düşünülmüştür. Bu sebeple çalışmalara devam edilmemiştir.

Bu denemelerden sonra proteini koruyan ligandlar olup olmadığının tespit edilmesi için fruktoz, sakkaroz, glukoz varlığında kısıtlı proteoliz denemesi yapılmıştır. Levansukrazın saflaştırılmasında monomer ve dimer formunu ayırmaya etkisi gözlemlenen DTT varlığında da kısıtlı proteoliz deneyleri yapılmıştır. Metal iyonu varlığında kısıtlı proteoliz deneyi için metal iyonun belirlenmesinde diyaliz sonrası elde edilen örnek ile atomik absorpsiyon spektroskopisi deneyi yapılmış ve çinko metali için absorpsiyon farkı gözlenmiştir (veriler gösterilmiyor). Bu sonuca göre çinko varlığında kısıtlı proteoliz deneyi yapılmıştır. %12 SDS-PAGE jel görüntüleri Şekil 4.19'da verilmiştir.

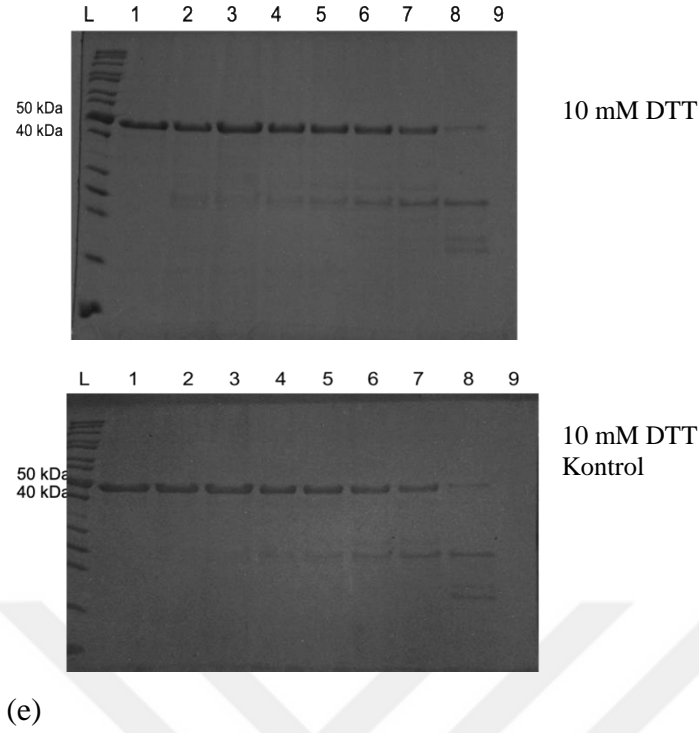




(c)



(d)



Şekil 4.19 Farklı ligandlar varlığında tripsin proteolizi sonrası örneklerin %12 SDS-PAGE ile incelenmesi.

(a): 1 mM Fruktoz (b): 10 mM sakkaroz (c): 1 mM Glukoz (d): 10 mM çinko (e): 10 mM DTT L: protein markörü 1: Tripsin eklenmeden 2: 0. saat 3: 10. dk 4: 20.dk 5: 30.dk 6: 1.saat 7: 2.saat 8: gece boyu 9: boş. Kontrol deneyinde örneklere tripsin eklenmemiştir.

Kısıtlı proteoliz deneyinde, levansukraz enziminin reaksiyonlarında kullandığı bilinen sakkaroz, fruktoz ve glukoz ligand olarak kullanılmıştır. Ancak bu ligandlar levansukrazı tripsin ile kesimden korumamıştır (Şekil 4.19).

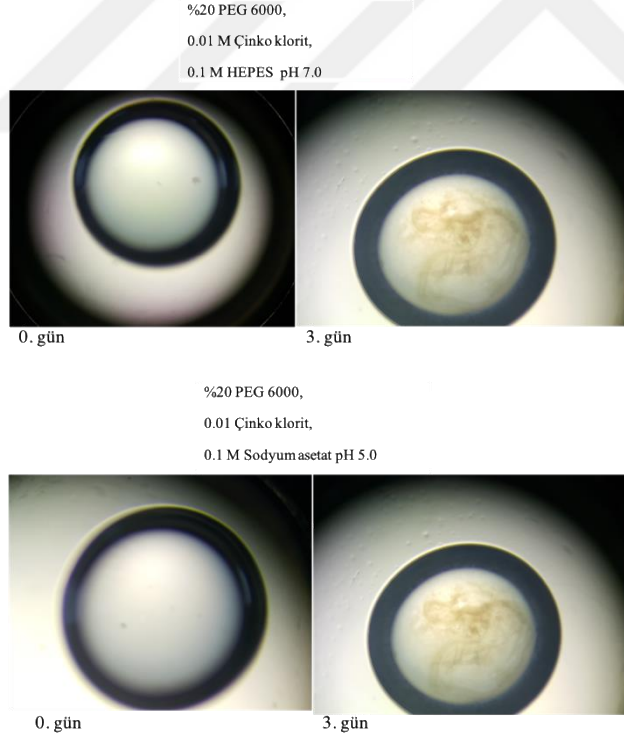
DTT varlığında gerçekleştirilen kısıtlı proteoliz denemesinde levansukrazın tripsin ile kesimine DTT'nin herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.19e).

Bu deneyin sonucunda 10 mM çinko varlığında levansukrazın tripsin ile kesimden korunduğunun tespit edilmiştir. Çinkonun tripsinin inhibitörü olduğu bilinmektedir (Paul et al., 2006). Bu etkinin en aza indirilmesi için levansukraz ve çinko 30 dk karıştırıcıda inkube edildikten sonra tripsin eklenmiş ve 10 dakika aralıklarla örnekler alınarak incelenmiştir. 10 mM çinko varlığında levansukrazın tripsin ile kesimden korunduğu görülmüş ve

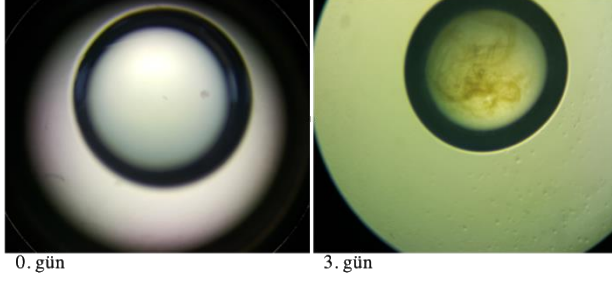
İNİNDE İINKO VE DİĞER METAL İYONLARI BULUNAN KRİSTAL TARAMA İÖZELTİLERİ İLE KRİSTALİZASYON DENEMELERİ YAPILMIŞTIR (ŞEKİL 4.20). ANCAK İINKO İİEREN BÜTÜN KOŞULLARDA LEVANSUKRAZIN İÖKELTİ OLUŞTURDUĞU GÖZLENMİŐTIR (ŞEKİL 4.21).

| | | | | | |
|--|---|---|--|--|---|
| %20 PEG 6000, 0,2 M Sodyum klorit, 0,1 M Sodyum asetat pH 5.0 | %20 PEG 6000, 0,2 M Amonyum klorit, 0,1 M Sodyum asetat pH 5.0 | %20 PEG 6000, 0,2 M Lityum klorit, 0,1 M Sodyum asetat pH 5.0 | %20 PEG 6000, 0,2 M Magnezyum klorit hegzahidrat, 0,1 M Sodyum asetat pH 5.0 | %20 PEG 6000, 0,2 M Kalsiyum klorit dihidrat, 0,1 M Sodyum asetat pH 5.0 | %20 PEG 6000, 0,01 M İinko klorit, 0,1 M Sodyum asetat pH 5.0 |
| %20 PEG 6000, 0,2 M Amonyum klorit, 0,1 M MES pH 6.0 | %20 PEG 6000, 0,2 M Kalsiyum klorit hegzahidrat, 0,1 M MES pH 6.0 | %20 PEG 6000, 0,01 M İinko klorit, 0,1 M MES pH 6.0 | %20 PEG 6000, 0,2 M Sodyum klorit, 0,1 M HEPES pH 7.0 | %20 PEG 6000, 0,2 M Amonyum klorit, 0,1 M HEPES pH 7.0 | %20 PEG 6000, 0,2 M Lityum klorit, 0,1 M HEPES pH 7.0 |
| %20 PEG 6000, 0,2 M Magnezyum klorit hegzahidrat, 0,1 M HEPES pH 7.0 | %20 PEG 6000, 0,2 M Kalsiyum klorit hegzahidrat, 0,1 M HEPES pH 7.0 | %20 PEG 6000, 0,01 M İinko klorit, 0,1 M HEPES pH 7.0 | %20 PEG 6000, 0,2 M Sodyum klorit, 0,1 M Tris pH 8.0 | %20 PEG 6000, 0,2 M Amonyum klorit, 0,1 M Tris pH 8.0 | %20 PEG 6000, 0,2 M Lityum klorit, 0,1 M Tris pH 8.0 |
| %20 PEG 6000, 0,1 M Magnezyum klorit hegzahidrat, 0,1 M Tris pH 8.0 | %20 PEG 6000, 0,2 M Kalsiyum klorit hegzahidrat, 0,1 M Tris pH 8.0 | %20 PEG 6000, 0,01 M İinko klorit, 0,1 M Tris pH 8.0 | %20 PEG 3350, 0,2 M Sodyum nitrat | %20 PEG 3350, 0,2 M Sodyum asetat trihidrat | %20 PEG 3350, 0,2 M Sodyum sülfat |

ŞEKİL 4.20 İINKO VE DİĞER METAL İYONLARI İİEREN KRİSTALİZASYON PLAKASI.



%20 PEG 6000,
0.01 M Çinko klorit,
0.1 M Tris pH 8.0



Şekil 4.21 Levansukraz kristalizasyon damlaları 0. ve 3. gün mikroskop görüntüleri. Damla ve rezervuar içerikleri verilmiştir.

Yapılan denemeler sonrasında çinko varlığında levansukrazın çökelti oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu çökelti içerisinde moleküllerin yüzeyleri birbirine üzerine gelerek tripsinin ulaşmasını engellemiş ve bu sebeple de çinko varlığında molekül tripsin ile kesimden korunmuş olabilir. Ancak çökelti yapılarından kristal elde etmek beklenmediğinden çinko koşulları ile denemelere devam edilmemiştir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak çinkonun proteinlerin bir arada durmasını sağlayan mekanizmaya etki ederek proteinleri bir araya getirdiği ve agregat oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir. Goldman ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada levansukrazın pH azaldıkça (pH 6.0'dan düşük değerler) yüksek moleküler ağırlıklı oligomerlere dönüştüğünü bildirmişlerdir. Çinko varlığında pH değerine bağlı olarak çökelmeye benzer şekilde yüksek molekül ağırlıklı oligomer oluşumunun gerçekleştiği düşünülmektedir.

Z. mobilis levansukraz enzimi üzerine yapılan çokça çalışma bulunmasına rağmen yalnızca (Yanase et al., 1992) amonyum sülfat içeren koşulda iğne şeklinde kristal görüldüğünü bildirmiş ancak günümüzde hala *Z. mobilis* levansukraz enziminin yapısı çözülememiştir. Bu sonuç difraksiyon denemelerinde kullanmak için uygun kristali elde etmenin zorluğunu kanıtlamaktadır. Kristal eldesi yüzey gerilimi, tampon koşulları, stabilite, protein yapısı, saflık-homojenlik değeri gibi birçok faktörden etkilenmektedir.

Ayrıca literatürde yapısı globüler olmasına karşılık kristalizasyona dirençli proteinler olduğu da belirtilmektedir (Dale et al., 2003).

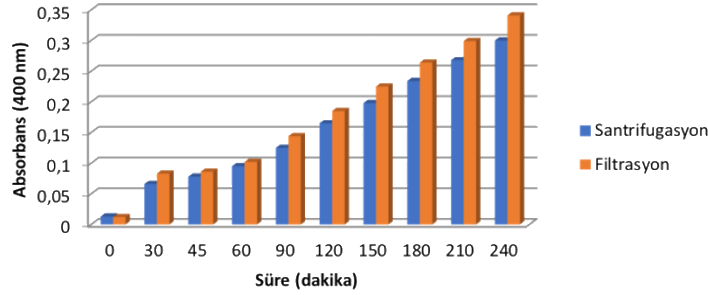
4.4 Ham Levansukraz ile Levan Üretimi

Levansukraz enziminin levan üretim aktivitesinin incelenmesi için üretim sonrası elde edilen ham levansukraz kullanılmıştır.

4.4.1 Levansukrazın Elde Edilmesi

Enzimin elde edilmesi için hem santrifugasyon hem de filtrasyon yöntemleri denenmiştir. Bu yöntemlerle elde edilen levansukraz levan üretiminde kullanılmış ve 400 nm dalga boyundaki absorbans değerleri filtrasyon sonrası alt fazda 1.76 ve santrifugasyon sonrası üst fazda 1.66 olarak bulunmuştur. Bu değerler birbirine oldukça yakındır ve santrifugasyon filtrasyona göre daha kolay ve hızlı yöntem olduğu için santrifugasyon ile elde edilen levansukraz ile deneylere devam edilmiştir (Şekil 4.22).

Levan Üretimi

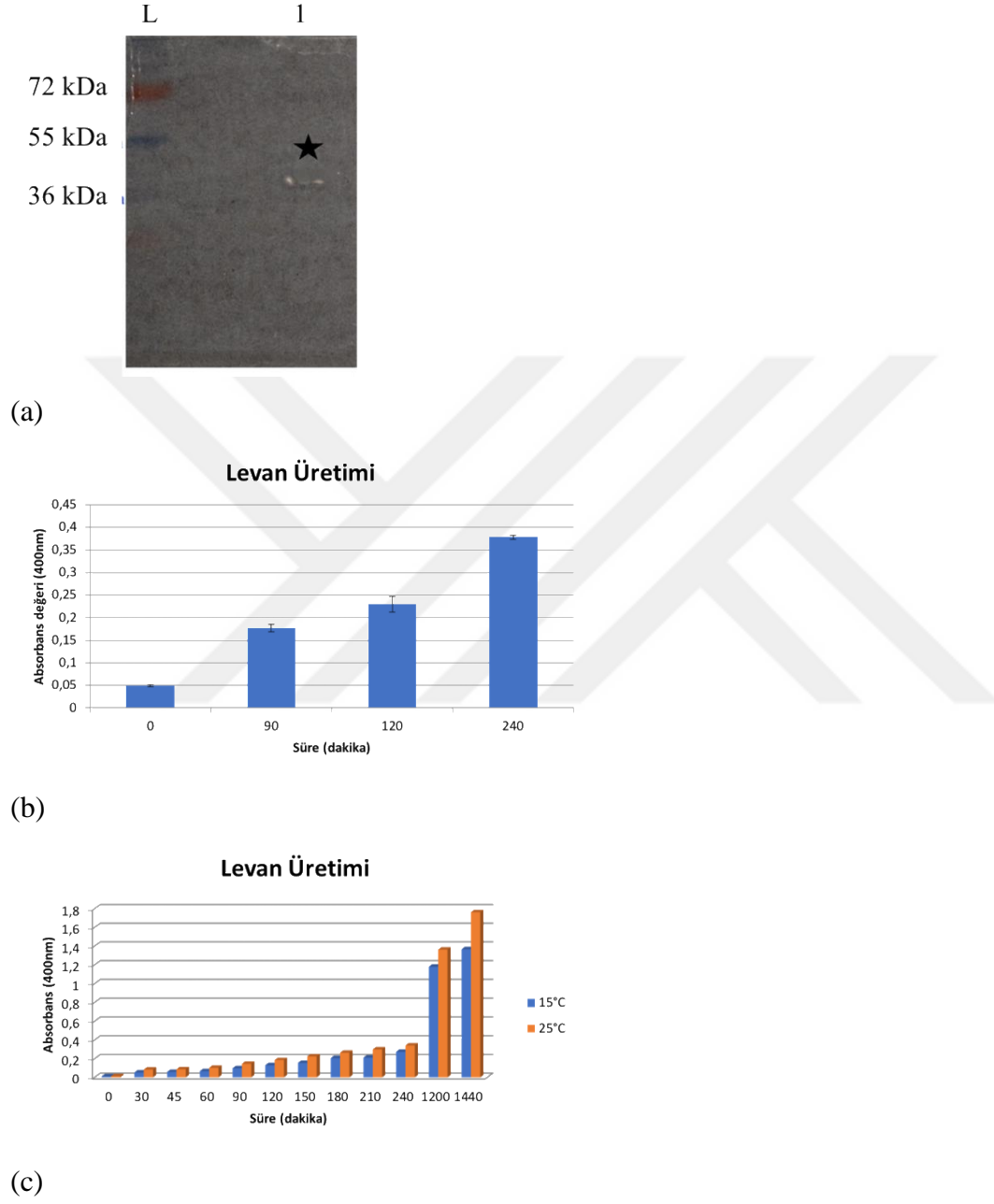


Şekil 4.22 Santrifugasyon ve filtrasyonla elde edilen ham levansukrazın 25 °C'de levan üretimi.

4.4.2 Levan Üretim Süresi ve Sıcaklığı

Levansukrazın levan üretme aktivitesi için farklı süre ve sıcaklık denemeleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan zimogram deneyi ile *Z. mobilis* levansukrazının levan aktivitesinin olduğu görülmüştür (Şekil 4.23a).

Levansukrazın ürettiği levanın artan süre ile levan üretiminin arttığı ve 25 °C’de 15 °C’ye göre daha yüksek levan ürettiği bulunmuştur (Şekil 4.23b ve Şekil 4.23c).

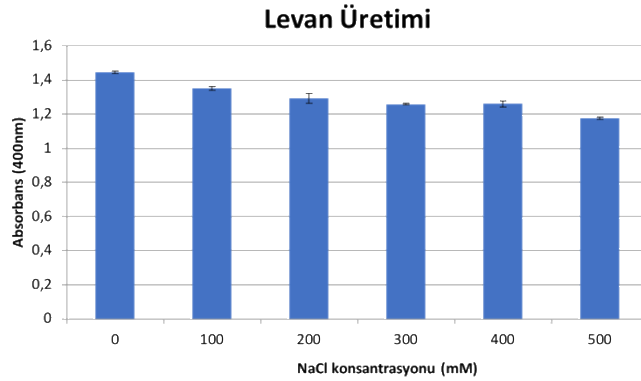


Şekil 4.23 Ham levansukraz ile zimogram analizi ve levan üretimi.

- (a) zimogram analizi L: Protein Ladder 1: örnek. Levansukraz bandı yıldız ile işaretlenmiştir.
 (b) farklı zamanlarda (c) farklı sıcaklıklarda levan üretimi.

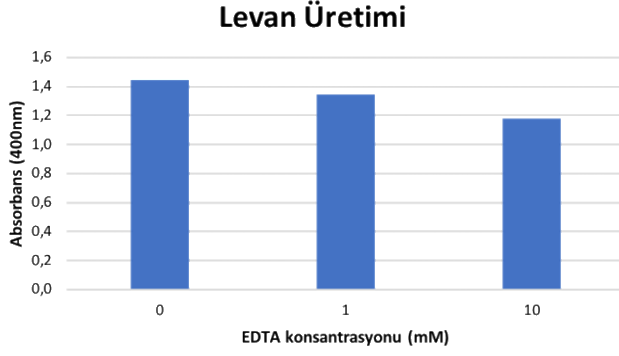
4.4.3 Levan Üretimine İyonik Yük, EDTA ve Metal İyon Etkisi

Levansukrazın levan üretme aktivitesi için uygun süre ve sıcaklık belirlenmiş ve diğer denemeler bu süre ve sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. İlk olarak farklı konsantrasyonlarda NaCl varlığında reaksiyonlar gerçekleşmiş ve artan NaCl konsantrasyonunda levan üretiminin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.24). 500 mM NaCl içeren koşulda levan üretimini gösteren bulanıklık değerinde %18.5'lük bir azalma tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç literatürde yapılan çalışmalar ile farklılık göstermektedir. *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4 levansukrazıyla 30 °C'de 0.1 M sakkaroz varlığında gerçekleştirilen bir çalışmada artan NaCl konsantrasyonu ile (0-1.2 M) levan üretiminin arttığı bildirilmiştir (Trujillo Toledo et al., 2004). *Z. mobilis* 113 S levansukrazı kullanılarak yapılan bir başka çalışmada 0.4 M NaCl konsantrasyonun levan üretimini 1.2 kat arttığı gösterilmiştir (Vigants et al., 1998). Literatür ile karşılaştırıldığında görülen bu farklılığın sebebi, enzim üretimi için kullanılan mikroorganizma türlerinin farklılığı ve levan üretimi gerçekleştirilen diğer parametrelerin farklılığı olarak açıklanabilir.



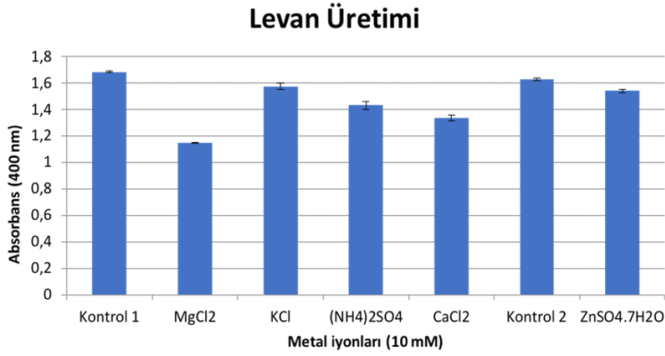
Şekil 4.24 25 °C'de 24 saat boyunca gerçekleştirilen levan reaksiyonlarının farklı NaCl konsantrasyonlarında 400 nm absorbans değeri.

Farklı konsantrasyonlarda EDTA varlığında reaksiyonlar yapılmış ve levan aktivitesinin 1mM ve 10 mM EDTA varlığında sırasıyla %7 ve %18.5 azaldığı görülmüştür (Şekil 4.25).



Şekil 4.25 25 °C’de 24 saat boyunca gerçekleştirilen levan reaksiyonlarının farklı EDTA konsantrasyonlarında 400 nm absorbans değeri.

EDTA varlığında gerçekleştirilen denemede 10 mM EDTA varlığında görülen azalma *Z. mobilis* levansukrazının levan üretmesi için metal iyonlarına ihtiyaç duyabileceğini göstermektedir. Buna göre levan üretim deneyi farklı metal iyonları varlığında tekrarlanmış ve 10 mM MgCl₂, KCl, (NH₄)₂SO₄, CaCl₂ ve ZnSO₄.7H₂O iyonları varlığında levan üretiminde bir düşüş görülmüş ancak MgCl₂ varlığındaki aktivitedeki düşüş diğerlerine göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 25 °C’de 24 saat boyunca gerçekleştirilen levan reaksiyonlarının farklı metal iyonları varlığında 400 nm absorbans değeri.

Metal iyonları ile gerçekleştirilen denemelerde kontrol üretimine göre MgCl₂ içeren reaksiyon %68.2, KCl içeren reaksiyon %93.52, (NH₄)₂SO₄ içeren koşul %85.05, CaCl₂ ile hazırlanan reaksiyon %79.44 ve ZnSO₄.7H₂O içeren koşulun %94.77 verimle gerçekleştiği görülmüştür.

4.4.4 Ham Levansukraz ile Levan Üretim Verimi

Levansukrazın levan üretme verimi 400 nm'deki absorbans ile levan standart eğrisi kullanılarak 62.42 ± 0.28 g/L levan hesaplanmıştır. Elde edilen bu değer literatürde yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında yüksektir. *Z. mobilis* ile yapılan bir çalışmada 100 mM sodyum asetat pH 5.0 tamponda 0.5 M sakkoz ile gerçekleştirilen reaksiyon 15 °C'de 9 saat inkübe edilmiş ve sonuç olarak 53 g/L levan elde edildiği bildirilmiştir (Chiang et al., 2009). *Z. mobilis* kullanılarak gerçekleştirilen başka bir çalışmada 50 mM asetat pH 5.0 tamponda %20 sakkaroz ile 0 °C'de 70 saat inkübasyon gerçekleştirilmiş ve sonuç olarak 50 g/L levan elde edildiği bildirilmiştir (Belghith, 1996).

Levan üretim denemelerinin sonucu olarak *Z. mobilis* NRRL B-14023 hücrelerinden üretilen levansukraz enziminin levan üretim aktivitesi gösterilmiştir ve belirlenen üretim süresi ve sıcaklıkta ortalama 62.42 ± 0.28 g/L levan üretimi gerçekleştirilmiştir. (Sözgen vd., 2018).

5. SONUÇ

Bu çalışmada *Z. mobilis* NRRL B-14023 hücreleri kullanılarak hücre dışı salgılanan levansukraz enziminin üretimi gerçekleştirilmiş, üretilen enzimin kullanılarak saflaştırma koşulları çalışılmış ve saf enzimin farklı formları elde edilerek kristalizasyon koşulları araştırılmıştır. Yine aynı enzim kullanılarak levan üretim deneyleri gerçekleştirilmiş, üretime etki eden faktörler incelenmiştir.

Z. mobilis NRRL B-14023 hücreleri ile yapılan fermantasyon sonrasında levansukraz enziminin hücre dışına salgılanan temel protein olduğu belirlenmiş ve bu proteini saflaştırma çalışmaları yapılmıştır. Saflaştırma için amonyum sülfat çöktürme, farklı tampon ve pH değerleri ile anyon değişim kromatografisi gibi yöntemler denenmiş, enzimin farklı koşullarda davranışının değiştiği tespit edilmiştir. Aktivitesinin en yüksek görüldüğü tampon olan 22 mM sitrat-fosfat pH 5.4 gibi düşük pH değerine sahip tamponlarda iyon değişim kolonlarına bağlanmadığı görülmüş ve bunun sebebinin enzimin oligomerik formda bulunması olduğu düşünülmüştür. Bunun üzerine enzimin monomerik formunun eldesi için farklı tampon ve pH değerleri denenmiş en uygun koşul olarak 100 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT tamponu bulunmuş ancak bu koşulda da enzim aktivitesi kaybolmuştur. Bulunan optimum koşulda enzimin monomerik formu elde edilmiş ve bu proteinin kristalizasyonu denenmiştir. Yapılan kısıtlı proteoliz deneylerinde levansukrazın çinko varlığında tripsin ile proteolize dirençli olduğu görülmüş ve çinko içeren rezervuar çözeltileri ile de kristalizasyon denemeleri yapılmıştır. Laboratuvar koşullarında el ile hazırlanan tarama çözeltileri ya da EMBL Hamburg'da robot ile hazırlanan tarama çözeltilerinde çok sayıda kristalizasyon koşulu denenmesine karşılık enzim kristalize edilememiştir. Tez çalışmasında kristal elde edilememiş olmasına rağmen *Z. mobilis* NRRL B-14023 hücreleriyle elde edilen levansukraz enziminin üretimi, saflaştırma stratejisi, depolama koşulları, monomerik veya dimerik form eldesi, proteolize dirençli olan koşulların bulunması gibi enzimin birçok biyokimyasal özelliği tespit edilmiştir.

Tezin diğ er bir bölümünde *Z. mobilis* NRRL B-14023 hücrelerinden üretilen levansukraz enziminin lev an aktivitesi üzerine deneyler yapılmıştır. *Z. mobilis* NRRL B-14023 hücrelerinden üretilen levansukraz enziminin lev an üretim aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Yapılan deneylerde levansukrazın lev an aktivitesi için optimum sıcaklık ve süre 25 °C ve 24 saat olarak bulunmuştur. Lev an üretimi gerçekleştirildikten sonra üretime etki eden faktörler araştırılmış ve NaCl konsantrasyonun artması ile lev an üretiminde azalma olduğu, 10 mM EDTA ve MgCl₂ varlığında da lev an üretim aktivitesinin azaldığı görülmüştür.

Daha önce yapılan çalışmalarda *Z. mobilis* NRRL B-14023 levansukrazı kullanarak sentetik ortamda FOS üretilebileceği gösterilmiştir (Erdal, et al., 2017). Yine *Z. mobilis* NRRL B-14023 levansukrazı ile yapılan çalışmada in situ olarak meyve sularında FOS üretilebileceği gösterilmiştir (Taştan, et al., hakem değerlendirmesinde). Yapılan tez çalışmasında da *Z. mobilis* NRRL B-14023 levansukrazı kullanarak lev an üretimi gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar ile birlikte bu tez çalışmasında kristalize edilip üç boyutlu atomik yapısı tahminlenmek istenen *Z. mobilis* NRRL B-14023 hücrelerinden üretilen levansukraz enziminin diğ er levansukraz enzimlerinden farklı olarak ikili aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır. Atomik yapısının çözülmesi ile bu ikili aktivitenin moleküler düzeyde mekanizması anlaşılacağından ve protein mühendisliği yöntemleri ile aktiviteleri geliştirebileceğ inden önemi büyüktür. İlerleyen çalışmalarda bu tezde tespit edilen biyokimyasal özellikler ışığında levansukrazın kristalizasyonu için denemeler yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdel-Fattah, A. F., Mahmoud, D. A. R. and Esawy, M. A. T.,** 2005, Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Current Microbiology*, 51(6), 402–407. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0111-1>.
- Arvidson, S. A., Rinehart, B. T. and Gadala-Maria, F.,** 2006, Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. *Carbohydrate Polymers*, 65(2), 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.12.039>.
- Bakar, B. and Kaplan Türköz, B.,** 2017, Structural Modelling and Structure-Function Analysis of *Zymomonas mobilis* Levansucrase. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(1), 279–285. <https://doi.org/10.19113/sdufbed.81065>.
- Barone, J. R. and Medynets, M.,** 2007, Thermally processed Levan polymers. *Carbohydrate Polymers*, 3(69), 554–561.
- Beine, R., Moraru, R., Nimtz, M., Na'amnieh, S., Pawlowski, A., Buchholz, K. and Seibel, J.,** 2008, Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering. *Journal of Biotechnology*, 138(1–2), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1998>.
- Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, U. and Danilevics, A.,** 2002, Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, 38(5), 701–706. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00189-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00189-9).
- Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Grube, M., Vigants, A. and Linde, R.,** 2005, Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, 40(5), 1535–1539. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.052>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Ionina, R. and Vigants, A.,** 2003, Catalytic activity of *Zymomonas mobilis* extracellular “levan-levansucrase” complex in sucrose medium. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 68(2 Pt A), 321–324.
- Belghith, H.,** 1996, Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. *Biotechnology Letters*, 18(4), 467–472. <https://doi.org/10.1007/BF00143472>.
- Belghith, K. S., Dahech, I., Belghith, H. and Mejdoub, H.,** 2012, Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(2), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.12.033>.
- Biedendieck, R., Beine, R., Gamer, M., Jordan, E., Buchholz, K., Siebel, J. and Jahn, D.,** 2007, Export, purification and activities of affinity tagged *Lactobacillus reuteri* levansucrase produced by *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol*, (74), 062-1073.
- Blake, C. C. F., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C. and Sarma, V. R.,** 1965, Structure of Hen Egg-white Lysozyme. *Nature*, 206, 757–761.
- Borsari, R. R. J., Celligoi, M. A. P. C., Buzato, J. B. and Silva, R. S. D. S. F. Da.,** 2006, Influence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(3), 604–609. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000300019>.
- Bradford, M. M.,** 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brooks-Barlett, J. and Garman, E.,** 2015, The Nobel Science: One Hundred Years of Crystallography. *Interdisciplinary Science Reviews*, 3(40), 244–264.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Caputi, L., Nepogodiev, S. A., Malnoy, M., Rejzek, M., Field, R. A. and Benini, S.,** 2013, Biomolecular characterization of the levansucrase of *Erwinia amylovora*, a promising biocatalyst for the synthesis of fructooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(50), 12265–12273. <https://doi.org/10.1021/jf4023178>.
- Chambert, R., Gonzy-Treboul, G. and Dedonder, R.,** 1974, Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 41, 285–300. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03269.x>.
- Chiang, C. J., Wang, J. Y., Chen, P. T. and Chao, Y. P.,** 2009, Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), 445–451. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1772-z>.
- Crittenden, R. G. and Doelle, H. W.,** 1994, Identification and characterisation of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(3), 302–308. <https://doi.org/10.1007/BF00221223>.
- Dahech, I., Belghith, K. S., Hamden, K., Feki, A., Belghith, H. and Mejdoub, H.,** 2011, Antidiabetic activity of Levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 4(49), 742–746.
- Dale, G. E., Oefner, C. and D’Arcy, A.,** 2003, The protein as a variable in protein crystallization. *Journal of Structural Biology*, 142(1), 88–97. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(03\)00041-8](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(03)00041-8).
- Daudé, D., Remaud-Siméon, M., André, I., Peters, S., Rose, T., Moser, M. and Thorson, J. S.,** 2012, Sucrose analogs: an attractive (bio)source for glycodiversification. *Natural Product Reports*, 29(9), 945. <https://doi.org/10.1039/c2np20054f>.
- Drenth, J.,** 2007, *Principles of protein X-ray crystallography* (3rd ed.). The Netherlands: Springer Science+Business Media, LLC.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erdal, Ö., Kaplan-Türköz, B., Taştan, Ö. and Göksungur, Y.,** 2017, Levansucrase production by *Zymomonas mobilis*: Optimization of process parameters and fructooligosaccharide production. *Journal of Food Biochemistry*, 41(3), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12361>.
- Ergene, E. ve Avcı, A.,** 2016, Mikrobiyel ekzopolisakkaritler. *SAÜ Fen Bil Der*, 20. Cilt(2.Sayı), 193–202.
- Esen, D.,** 2008, Sürekli Annular Kromatograf ile Saflaştırma: Denge Dışı Modelle Simülasyon Çalışmaları, Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı.
- Fonteles, T. and Rodrigues, S.,** 2018, Prebiotic in fruit juice: processing challenges, advances, and perspectives. *Curr Opin Food Sci.*, (22), 55–61.
- Food and Drug Administration.,** 2016, GRAS Notice No. GRN 000044, <http://www.fda.gov/> (Son Erişim Tarihi 10.03.2019).
- Ganaie, M. A., Lateef, A. and Gupta, U. S.,** 2014, Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4), 2143–2159. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0661-9>.
- GE Healthcare.,** 2017, Tips for successful ion exchange chromatography. Retrieved January 8, 2019, from https://d3v6gwebjc7bm7.cloudfront.net/event/14/02/79/0/rt/1/documents/resourceList1495702362950/29263856aa_tips_for_successful_ion_exchange_chromatography.pdf.
- Gibson, G.,** 1999, Dietary modulation of the human gut micro flora using prebiotics. Oligofructose and inulin. *J Nutr*, (129), 1438–1441.
- Gibson, G. and Roberfroid, M.,** 1995, Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, (125), 1401–1412.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Goldman, D., Lavid, N., Schwartz, A., Shoham, G., Danino, D. and Shoham, Y.,** 2008, Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase. An ordered microfibril structure of the enzyme promotes levan polymerization. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32209–32217. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805985200>.
- Gonzy-Treboul, G., Chambert, R. and Dedonder, R.,** 1975, Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Reexamination of some physical and chemical properties. *Biochimie*, 57(1), 17–28. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(75\)80105-2](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(75)80105-2).
- Hernandez, L., Arrieta, J., Menendez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V. and Chambert, R.,** 1995, Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochemical Journal*, 309(1), 113–118. <https://doi.org/10.1042/bj3090113>.
- Hettwer, U., Gross, M. and Rudolph, K.,** 1995, Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. These include: Purification and Characterization of an Extracellular Levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, 177(10).
- Hışıl, Y.,** 2013, *Enstrümental Gıda Analizleri* (8th ed.). İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları, Mühendislik Fakültesi Yayın no:48.
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D. and Seibel, J.,** 2007, Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *The Biochemical Journal*, 407(2), 189–198. <https://doi.org/10.1042/BJ20070600>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huang, M. Y., Lee, C. F., Ho, S. T., Lin, K. J. and Pan, C. L.,** 2013, High-yield levan produced by *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 in high-sucrose medium and its prebiotic effect. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 3(7), 1585–1599.
- International Union of Crystallography.,** 2013, Nobel Prize winners associated with crystallography. Retrieved February 11, 2019, from <https://www.iucr.org/people/nobel-prize>.
- Inthanavong, L., Tian, F., Khodadadi, M. and Karboune, S.,** 2013, Properties of *Geobacillus stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides. *Biotechnology Progress*, 29(6), 1405–1415. <https://doi.org/10.1002/btpr.1788>.
- Jakob, F., Meißner, D., and Vogel, R. F.,** 2012, Comparison of novel GH 68 levansucrases of levan-overproducing *Gluconobacter species*. *Acetic Acid Bacteria*, 1(1), 2. <https://doi.org/10.4081/aab.2012.e2>.
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H. and Xu, J.,** 2012, Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols*, 7(8), 1511–1522. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.085>.
- Kang, H. K., Seo, M. Y., Seo, E. S., Kim, D., Chung, S. Y., Kimura, A. and Robyt, J. F.,** 2005, Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1727(1), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2004.10.012>.
- Kaplan-Turkoz, B., Jimenez-Soto, L. F., Dian, C., Ertl, C., Remaut, H., Louche, A. and Terradot, L.,** 2012, Structural insights into *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA interaction with $\alpha 1$ integrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kekez, B. D., Gojgic-Cvijovic, G. D., Jakovljevic, D. M., Stefanovic Kojic, J. R., Markovic, M. D., Beskoski, V. P. and Vrvic, M. M.,** 2015, High Levan Production by *Bacillus licheniformis* NS032 Using Ammonium Chloride as the Sole Nitrogen Source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(6), 3068–3083. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1475-8>.
- Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B. E., Hart, R. G., Davies, D. R., Phillips, D. C. and Shore, V. C.,** 1960, Structure of myoglobin. *Nature*, 185, 422–471.
- Ki-hyo, J., Kang, S. A., Cho, Y., Kim, Y., Lee, Y.-J., Hong, K. and Choue, R. W.,** 2003, Prebiotic Properties of Levan in Rats.pdf. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 3(13), 348–353.
- Korneli, C., Biedendieck, R., David, F., Jahn, D. and Wittmann, C.,** 2013, High yield production of extracellular recombinant levansucrase by *Bacillus megaterium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8), 3343–3353. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4567-1>.
- Kurban, M.,** 2013, *Zymomonas mobilis*'ten elde edilen Levansukraz enzimi ile Fruktooligosakkarit Üretimi ve Elde Edilen Ürünün Püskürtmeli Kurutucuda Kurutulması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 122s.
- Laemmli, U. K.,** 1970, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lawrence, A.-M. and Besir, H.,** 2009, Staining of Proteins in Gels with Coomassie G-250 without Organic Solvent and Acetic Acid. *JoVE*, (30), e1350. <https://doi.org/doi:10.3791/1350>.
- Layne, E.,** 1957, Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*, (3), 447–454. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(57\)03413-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(57)03413-8)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, S. Y., Chen, M., Li, G., Yan, Y. L., Yu, H. Y., Zhan, Y. H. and Lin, M.,** 2008, Amino acid substitutions of His296 alter the catalytic properties of *Z. mobilis* 10232 LS.pdf, 55(1), 201–206.
- Lyness, E. W. and Doelle, H. W.,** 1983, Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, 5(5), 345–350. <https://doi.org/10.1007/BF01141136>.
- Macfarlane, G. T. and Macfarlane, S.,** 2011, Fermentation in the Human Large Intestine Its Physiologic Consequences and the Potential Contribution of Prebiotics, 45(December), 120–127.
- Martínez-Fleites, C., Ortíz-Lombardía, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E. J., Arrieta, J. G. and Davies, G. J.,** 2005, Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *The Biochemical Journal*, 390(Pt 1), 19–27. <https://doi.org/10.1042/BJ20050324>.
- McPherson, A. and Gavira, J. A.,** 2014, Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F:Structural Biology Communications*, 70(1), 2–20. <https://doi.org/10.1107/S2053230X13033141>.
- Meng, G. and Fütterer, K.,** 2003, Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural Biology*, 10(11), 935–941. <https://doi.org/10.1038/nsb974>.
- Miller, G. L.,** 1959, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem*, 31(3), 426–428.
- Nakapong, S., Pichyangkura, R., Ito, K., Iizuka, M. and Pongsawasdi, P.,** 2013, High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54(1), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.017>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Olsen, J. V., Ong, S. and Mann, M.,** 2004, Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Molecular & Cellular Proteomics* 3.6, 608–614. <https://doi.org/DOI 10.1074/mcp.T400003-MCP200>.
- Öner, E. T., Hernández, L. and Combie, J.,** 2016, Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances*, 34(5), 827–844. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.002>.
- Özenir, N.,** 2009, Meyvelerin Dondurarak Kurutulması, Yüksek Lisans Tezi. *Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı*.
- P. O'Mullan, M. Szakacs-Dobozi, D. E. E.,** 1991, Identification of Saccharolytic Enzymes of *Zymomonas mobilis* CP4. *Biotechnol Lett*, 13(2), 137–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01030465>
- Pabst, M. J.,** 1977, Levan and levansucrase of *Actinomyces viscosus*. *Infection and Immunity*, 15(2), 518–526.
- Paul, J. J., Kircus, S. R., Sorrell, T. N., Ropp, P. A. and Thorp, H. H.,** 2006, Effects of coordinating metal ions on the mediated inhibition of trypsin by bis(benzimidazoles) and related compounds. *Inorganic Chemistry*, 45(13), 5126–5135. <https://doi.org/10.1021/ic0516461>.
- Perutz, M. F.,** 1963, X-ray Analysis of Hemoglobin. *Science*, 140, 863–869.
- Polsinelli, I., Caliandro, R., Salomone-Stagni, M., Demitri, N., Rejzek, M., Field, R. A. and Benini, S.,** 2019, Comparison of the Levansucrase from the epiphyte *Erwinia tasmaniensis* vs its homologue from the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 496–501. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.074>.
- Protein Data Bank.,** 2019, PDB Data Distribution by Experimental Method and Molecular Type. Retrieved March 8, 2019, from <https://www.rcsb.org/stats/summary>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rairakhwada, D., Pal, A., Bhatena, Z., Sahu, N., Jha, A. and Mukherjee, S.,** 2007, Dietary microbial Levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*, 5(22), 477–486.
- Renuka, B., Kulkarni, S. G., Vijayanand, P. and Prapulla, S. G.,** 2009, Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: Effect on the quality characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 42(5), 1031–1033. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.11.004>.
- Roy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y.,** 2010, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>.
- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. and Prapulla, S. G.,** 2005, Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 16(10), 442–457. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.05.003>.
- Santos-Moriano, P., Fernandez-Arrojo, L., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A. O. and Plou, F. J.,** 2015, Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of reaction conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 119, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.05.011>.
- Senthikumar, V., Bushby, S. J. W. and Gunasekaran, P.,** 2003, Serine substitution for cysteine residues in levansucrase selectively abolishes levan forming activity. *Biotechnology Letters*, 25(19), 1653–1656. <https://doi.org/10.1023/A:1025650928313>.
- Shih, I. L., Chen, L. D., Wang, T. C., Wu, J. Y. and Liaw, K. S.,** 2010, Tandem production of levan and ethanol by microbial fermentation. *Green Chemistry*, 12(7), 1242–1247. <https://doi.org/10.1039/b924765c>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shih, I. L., Yu, Y. T., Shieh, C. J. and Hsieh, C. Y.,** 2005, Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) *Takahashi. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8211–8215. <https://doi.org/10.1021/jf058084o>.
- Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T. and Goksungur, Y.,** 2014, Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydrate Polymers*, 99, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.031>.
- Simms, P. J., Boyko, W. J. and Edwards, J. R.,** 1990, The structural analysis of a levan produced by *Streptococcus salivarius* SS2. *Carbohydr Res*, (208), 193–198.
- Singh, R. S., Singh, R. P. and Kennedy, J. F.,** 2016, Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.026>.
- Sözgen, G., Özdoğan, G. ve Kaplan Türköz, B.,** 2018, *Zymomonas mobilis* levansukraz enziminin levan üretiminde kullanılması. *Gıda / the Journal of Food*, 43(6), 1061–1074. <https://doi.org/10.15237/gida.gd18087>.
- Srikanth, R., Siddartha, G., Sundhar Reddy, C. H. S. S., Harish, B. S., Janaki Ramaiah, M. and Uppuluri, K. B.,** 2015, Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydrate Polymers*, 123, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.079>.
- Srikanth, S., Swathi, M., Tejaswini, M., Sharmila, G., Muthukumaran, C., Jaganathan, M. K. and Tamilarasan, K.,** 2014, Statistical optimization of molasses based exopolysaccharide and biomass production by *Aureobasidium pullulans* MTCC 2195. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.11.011>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Strube, C. P., Homann, A., Gamer, M., Jahn, D., Seibel, J., and Heinz, D. W.,** 2011, Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 20(286), 17593–17600.
- Sunagawa, I.,** 2005, *Crystals Growth, Morphology and Perfection* (1st ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Sunitha, K., Chung, B. H., Jang, K. H., Song, K. B., Kim, C. H. and Rhee, S. K.,** 2000, Refolding and purification of *Zymomonas mobilis* levansucrase produced as inclusion bodies in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 18(3), 388–393. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1204>.
- Tajima, K., Tanio, T., Kobayashi, Y., Kohno, H., Fujiwara, M., Shiba, T. and Takai, M.,** 2000, Cloning and sequencing of the levansucrase gene from *Acetobacter xylinum* NCI 1005. *DNA Research*, 7(4), 237–242. <https://doi.org/10.1093/dnares/7.4.237>.
- Tian, F., Inthanovong, L. and Karboune, S.,** 2011, Purification and Characterization of Levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* in Intra- and Extracellular Forms Useful for the Synthesis of Levan and Fructooligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(10), 1929–1938. <https://doi.org/10.1271/bbb.110315>.
- Trujillo, L. E., Tambara, Y., Pérez, M., Arrieta, J. G., Valdés, J., García, J. and Hernández, L.,** 2001, Fructo-oligosaccharides production by the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(2–3), 139–144. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(00\)00290-8](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00290-8)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Trujillo Toledo, L. E., Gómez Riera, R., Banguela Castillo, A., Soto Romero, M., Arrieta Sosa, J. G. and Hernández García, L.,** 2004, Catalytical properties of N-glycosylated *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase produced in yeast. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(2), 0–0. <https://doi.org/10.2225/vol7-issue2-fulltext-4>.
- Tuncer, M.,** 2008, *Protein Saflaştırma 1 Kromatografik Teknikler*. Mersin Üniversitesi Yayınları. ISBN: 978-9756-9000215.
- Vigants, a, Hicke, H. G. and Marx, S. P.,** 2001, A simple and efficient method for the purification of membrane-bound levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Current Microbiology*, 42(6), 415–418. <https://doi.org/10.1007/s002840010239>.
- Vigants, A., Hicke, H.-G. and Marx, S. P.,** 2001, A Simple and Efficient Method for the Purification of Membrane-Bound Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Current Microbiology*, 42(6), 415–418. <https://doi.org/10.1007/s002840010239>.
- Vigants, A., Kruce, R., Bekers, M. and Zikmanis, P.,** 1998, Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride. *Biotechnology Letters*, 20(11), 1017–1019. <https://doi.org/10.1023/A:1005454921301>.
- Vigants, A., Marx, S. P., Linde, R., Ore, S., Bekers, M., Vina, I. and Hicke, H. G.,** 2003, A novel and simple method for the purification of extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Current Microbiology*, 47(3), 198–202. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3984-2>.
- Vijayendra, S. V. N. and Gupta, R. C.,** 2014, Performance evaluation of bulk freeze dried starter cultures of dahi and yoghurt along with probiotic strains in standardized milk of cow and buffalo. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4114–4119. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0944-8>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vijayendra, S. V. N. and Shamala, T. R.**, 2014, Film forming microbial biopolymers for commercial applications-A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 34(4), 338–357. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.798254>.
- Visnapuu, T., Mardo, K. and Alamäe, T.**, 2015, Levansucrases of a *Pseudomonas syringae* pathovar as catalysts for the synthesis of potentially prebiotic oligo- and polysaccharides. *New Biotechnology*, 32(6), 597–605. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.01.009>.
- Visnapuu, T., Mardo, K., Mosoarca, C., Zamfir, A., Vigants, A. and Alamäe, T.**, 2011, Levansucrases from *Pseudomonas syringae* pv. Tomato and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: Substrate Specificity, Polymerizing Properties and Usage of Different Acceptors for Fructosylation. *Journal of Biotechnology/Biotechnol*, (155), 338–349.
- Voet, D. and Voet, J. G.**, 2011, *Biochemistry* (4th ed.). United States of America: John Wiley & Sons , INC. ISBN: 978-0470-57095-1.
- Wuerges, J., Caputi, L., Cianci, M., Boivin, S., Meijers, R. and Benini, S.**, 2015, The crystal structure of *Erwinia amylovora* levansucrase provides a snapshot of the products of sucrose hydrolysis trapped into the active site. *Journal of Structural Biology*, 191(3), 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.07.010>.
- Xiao, M., Feng, F., Lu, L.**, 2014, Preparation method of levan-contained yogurt. Chinese patent CN103190478B.
- Yanase, H., Fujimoto, J., Maeda, M., Okamoto, K., Kita, K. and Tonomura, K.**, 1998, Expression of the extracellular levansucrase and invertase genes from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli* cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(9), 1802–1805.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yanase, H., Iwata, M., Nakahigashi, R., Kita, K., Kato, N. and Tonomura, K.,** 1992, Purification, Crystallization, and Properties of the Extracellular Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56(8), 1335–1337. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.1335>.
- Yanase, H., Maeda, M., Hagiwara, E., Yagi, H., Taniguchi, K. and Okamoto, K.,** 2002, Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *Journal of Biochemistry*, 132(4), 565–572. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359071>.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. and Zhang, Y.,** 2014, The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>.
- Yun, J. W.,** 1996, Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(2), 107–117. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00188-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00188-3).
- Zhang, T., Li, R., Qian, H., Mu, W., Miao, M. and Jiang, B.,** 2014, Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 975–981. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.045>.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimde bilgi birikimini paylaşmayı esirgemeyen, akademik konularda desteğini, sabrını ve yol göstericiliğini sürekli hissettiğim, her soruma ve sorunuma sabırla cevap veren; bilimsel olarak bu kadar farklı ve ülkemizde çalışması zor konuda ulusal ve uluslararası imkanları benimle her fırsatta paylaşan çok değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Burcu KAPLAN TÜRKÖZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi incelemeye zaman ayırdıkları ve yaptıkları katkılar için tez savunma sınavı jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Zehra SAYERS ve Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın bir parçası olduğu TÜBİTAK 214O174 numaralı projede yer alan Sayın Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR ve Sayın Prof. Dr. Taner BAYSAL'a teşekkür ediyorum.

Bu tez sırasında beni Almanya-Hamburg'da bulunan EMBL laboratuvarına kabul edip, bilgi birikimini benimle paylaşarak tezime yaptığı katkılardan dolayı Rob MEIJERS'e; çalışmamıza değer verip INext programlarına kabul eden Instruct'a ve 214O174 numaralı projemize desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ediyorum.

Her zaman yanımda olarak bu zorlu yüksek lisans sürecinde arkamda yaslanacak bir dağ oluştukları, beni bu günlere getirdikleri ve desteklerini hiçbir konuda hiçbir zaman esirgemedikleri için annem Fetanet SÖZGEN ve babam Metin SÖZGEN'e minnetlerimi sunuyorum. Ve bana İzmir'deki ailem olan her zaman desteğini en içten hissettiğim, bu zorlu süreçte her koşulda yanımda olan Mehmet Ata ERÇETİN'e çokça teşekkür ediyorum.

Bilimde var olmamızı sağlayan, yaptıkları ve gösterdiği yol ile bu tezi yazabilmeme olanak veren, ülkemizin kurucusu Sayın Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e sevgi, minnet, saygı ve şükranlarımı sunuyorum.

Her ihtiyacım olduğunda yardım eden, bilmediklerimi öğrendiğim ve birlikte deneyerek yeni yollar bulduğumuz Biyotek Lab ekibine; Berna ERDOĞAN, Dicle Dilara AKPINAR, Bahar BAKAR, Ceren ÖZER ve Özge Taştan'a teşekkürlerimi sunuyorum. Yine bu tezin bir kısmını bitirme tezinde birlikte ilerlettiğimiz Gökçenaz ÖZDOĞAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecinde desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, her derdimde, zorluğumda yanımda olan canım arkadaşlarım Merve ÇAKIR ve Sinem ÇAKIR'a sonsuz teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Adı soyadı: Güler SÖZGEN

Doğum yeri: İzmir

Doğum tarihi: 30.01.1993

Unvan: Gıda Mühendisi, Yüksek Lisans Öğrencisi

Adres: Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

e-mail: gulersozgen93@gmail.com

Eğitim Bilgileri:

Yüksek lisans (2016-halen): Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Müh. A.B.D (İzmir)

Lisans (2011-2016): Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Müh. Bölümü

Lisans (2012-2017): Eskişehir Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi İşletme Bölümü

Lise: (2007-2011): Urla Anadolu Lisesi (İzmir)

Yabancı Diller:

İngilizce (İyi)

Almanca (Başlangıç)

Yayınlar:

1. Özge Taştan, Güler Sözgen, Taner Baysal, ve Burcu Kaplan Türköz, Production of prebiotic kestose using *Zymomonas mobilis* levansucrase in carob molasses and its effect on 5-HMF levels during storage. Food Chemistry Journal, (Hakem değerlendirmesinde)(SCI)
2. Güler Sözgen, Gökçenaz Özdoğan ve Burcu Kaplan Türköz, *Zymomonas mobilis* Levansukraz Enziminin Levan Üretiminde Kullanılması. Gıda- The Journal of Food, (2018) 43 (6): 1061-1074 doi: 10.15237/gida.GD18087 (TR-Dizin)

Bildiriler

1. Burcu Kaplan Türköz, Özge Taştan, Güler Sözgen, Taner Baysal, Yekta Göksungur, Synthesis of fructooligosaccharides (FOS) in apple nectar and carob syrup by *Zymomonas mobilis* levansucrase: Effect of FOS content on quality characteristics, *9th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Zagreb, Croatia (2018)*.
2. Güler Sözgen, Gökçenaz Özdoğan, Burcu Kaplan Türköz, Investigating the use of *Zymomonas mobilis* levansucrase for levan production, *6th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İzmir, Turkey (2018)*.
3. Güler Sözgen, Burcu Kaplan Türköz, Purification and Crystallization of *Zymomonas mobilis* levansucrase, *Open SESAME & Instruct-ERIC Workshop on Remote X-ray Data Collection from European Synchrotrons, Rehovot, Israel (2018)*.
4. *10th EMBO Young Scientists' Forum, İstanbul, Turkey (2018)*.
5. Güler Sözgen, Gökçenaz Özdoğan, Burcu Kaplan Türköz, Purification of levansucrase for crystallization, *15th SESAME Users's Meeting, Amman, Jordan (2017)*.
6. Güler Sözgen, Özge Taştan, Taner Baysal, Burcu Kaplan Türköz, Production of fructooligosacchharide containing fruit juices using *Z. mobilis* levansucrase, *31st EFFOST Food Science and Technology Challenges for the 21st Century, Sitges, Spain (2017)*.

