

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Zymomonas mobilis İLE LEVANSUKRAZ ENZİMİNİN
ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI

Özlem ERDAL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Yekta GÖKSUNGUR

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 28.03.2016

Bornova-İZMİR

2016

Özlem ERDAL tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Zymomonas mobilis* ile Levansukraz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 28/03/2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR

Raportör Üye: Yrd. Doç. Dr. Burcu KAPLAN TÜRKÖZ

Üye : Prof. Dr. Haluk HAMAMCI

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* ile Levansukraz Enziminin Üretimi ve Saflaştırılması” 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.

.../.../2016

Özlem ERDAL

ÖZET***Zymomonas mobilis* İLE LEVANSUKRAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI**

Erdal, Özlem

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Yekta Göksungur

Mart 2016, 75 sayfa

Levansukrazlar (E.C.2.4.1.10), GH68 glikozit hidrolaz enzim ailesine ait olup sakkarozu substrat olarak kullanarak levan ve levan tipi fruktooligosakkaritlerin (FOS) oluşumunu katalizleyen fruktoziltransferaz grubu enzimlerdir. Bu çalışmada *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 ile levansukraz üretimi üzerine fermantasyon süresi, başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık ve pH'nın etkileri incelenmiş ve bunlardan; sıcaklık (28-32 °C) başlangıç sakkaroz konsantrasyonu (100-200 g/L) ve pH'nın (4.5-5.5) levansukraz üretimine etkilerini incelemek ve bu parametrelerin optimum seviyelerini belirlemek amacıyla Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanılmıştır.

Başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık ve pH'nın levansukraz üretimi üzerine önemli bir etkiye sahip olduğu, regresyon modelinin önemli ($P < 0.05$) ve modelin matematiksel uygunsuzluğundan kaynaklanan hatanın önemsiz olduğu ($P > 0.05$) olduğu belirlenmiştir.

Deneysel veriler kullanılarak bir matematik model oluşturulmuş ve bu verilerle modelden elde edilen verilerin uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Bu model yardımıyla proses için optimum koşullar olan 159.01 g/L başlangıç substrat konsantrasyonunda, 30.3 °C sıcaklıkta ve pH 4.91'de modelin tahminlediği aktivite değeri 13.18 mM glukoz/dak iken, üretim sonunda 13.3 mM glukoz/dak levansukraz aktivitesi elde edilmiştir.

Zymomonas mobilis NRRL B-14023 ile üretilen levansukraz enzimi kullanılarak FOS üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Cevap Yüzey Yöntemi ile belirlenen optimum koşullarda üretilen enzim saflaştırılmış ve SDS-PAGE ile saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 48 kDa olarak belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Levansukraz, *Zymomonas mobilis*, optimizasyon, Cevap Yüzey Yöntemi, saflaştırma.



ABSTRACT**PRODUCTION AND PURIFICATION OF LEVANSUCRASE ENZYME
BY *Zymomonas mobilis***

Erdal, Ozlem

Msc. in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Yekta Göksungur

March 2016, 75 page

Levansucrases (E.C.2. 4. 1. 10) are fructosyltransferase (Ftase) which belong to GH68 glycoside hydrolase enzyme family and catalyze the formation of levan and fructooligosaccharides (FOS) using sucrose as substrate. In this study, the effects of initial substrate concentration, fermentation time, temperature and pH on levansucrase production by *Z. mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 was investigated. Response Surface Methodology was used optimized the enzyme production based on three selected parameters; initial substrate concentration, (100-200 g/L), temperature (28-32 °C) and pH (4.5-5.5).

Initial substrate concentration, fermentation temperature and pH had a strong linear effect on levansucrase production. Regression model was significant ($P < 0.05$) and lack of fit was insignificant ($P > 0.05$).

Results of the statistical analysis showed that the fit of the model was good in all cases. Maximum levansucrase production of 13.3 mM glucose/min was obtained at the optimum levels of process variables (initial substrate concentration 159.01 g/L, fermentation temperature 30.3 °C and pH 4.91). These values were obtained by fitting of the experimental data to the model equation.

Levansucrase enzyme of *Z. mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 was used to produce fructooligosaccharides (FOS). Levansucrase enzyme was purified and the molecular weight was found to be 48 kDa by SDS-PAGE.

Keywords: Levansucrase, *Zymomonas mobilis*, optimization, Response Surface Methodology, purification.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, iyi bir akademisyen olma yolunda bana inanan ve güvenen saygıdeğer danışmanın Sayın Prof. Dr. Yekta GÖKSUNGUR'a sabrı ve özverisi için sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Paylaştığı deneyimi ve sunduğu motive edici teşviğiyle Sayın Ar. Gör. Dr. Sırma YEĞİN'e,

Tez çalışmalarımın her aşamasında beni sabır ve özveri ile dinleyen, yardım etmek için zaman ayıran Sayın Prof. Dr. Taner BAYSAL'a, proje yürütücümüz Sayın Yrd. Doç. Dr. Burcu KAPLAN TÜRKÖZ'e,

Çalışmalarımın her aşamasında büyük özveriyle yer alan yardım ve desteklerini her zaman hissettiren değerli ekip arkadaşım Sayın Özge TAŞTAN'a, yazım aşamasında ve her koşulda varlığını hissettiren yüksek lisans arkadaşım Sayın Filiz DÖNER'e, çalışmalarım süresince ihtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyen laboratuvar sorumlusu Sayın Berna ERDOĞAN'a,

214O174 no'lu projemize olan desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a,

Attığım her adım ve aldığım her kararda koşulsuz hep yanımda olan canım annem ve babama tüm kalbimle teşekkürlerimi sunuyorum.



İÇİNDEKİLER**Sayfa**

| | |
|---|-------|
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | ix |
| TEŞEKKÜR | xi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xv |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | xvi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | xviii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ..... | 4 |
| 2.1. Levansukraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar | 4 |
| 2.2 Levansukraz Enziminin Mikrobiyal Yolla Üretimi..... | 6 |
| 2.2.1 <i>Zymomonas mobilis</i> | 9 |
| 2.3 Levansukraz Tarafından Sentezlenen Polimerler | 11 |
| 2.3.1 Levan ve fonksiyonu..... | 12 |
| 2.3.2 Fruktooligosakkaritler (FOS) ve fonksiyonu..... | 14 |
| 2.4 Levansukraz Enziminin Saflaştırma ve Karakterizasyon Strateji | 18 |
| 2.5 Cevap Yüzey Yöntemi..... | 21 |
| 2.5.1 Cevap yüzey yönteminin kullanıldığı çalışmalar | 23 |

İÇİNDEKİLER(devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM..... | 25 |
| 3.1 Materyal | 25 |
| 3.1.1 Mikroorganizma..... | 25 |
| 3.1.2 Üretim Ortamı | 25 |
| 3.2 Yöntemler..... | 26 |
| 3.2.1 Statik kültür ile levansukraz üretimi | 26 |
| 3.2.2 Üretilen levansukrazın izolasyonu | 28 |
| 3.2.3 Fruktooligosakkarit (FOS) üretimi..... | 28 |
| 3.3 Analiz Yöntemleri..... | 29 |
| 3.3.1 Biyokütle miktarı | 29 |
| 3.3.2 Hücre yoğunluğu (OD) | 30 |
| 3.3.3 Levansukraz enzim aktivite tayini | 30 |
| 3.3.4 Toplam şeker tayini..... | 32 |
| 3.3.5 Protein tayini | 33 |
| 3.3.6 Deneysel tasarım ve istatistiksel analiz | 34 |
| 3.3.7 Levansukraz enzimin saflaştırılması..... | 35 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 3.3.8 Tartım | 40 |
| 3.3.9 pH | 40 |
| 3.3.10 Santrifügasyon | 40 |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA | 41 |
| 4.1 Levansukraz Enzim Üretimi Kinetiği | 41 |
| 4.2 Fermantasyon Sıcaklığının Levansukraz Üretimine Etkisi | 42 |
| 4.3 Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun Levansukraz Üretimine Etkisi | 43 |
| 4.4 Başlangıç pH'ının Levansukraz Üretimine Etkisi..... | 45 |
| 4.5 Levansukraz Üretiminin Optimizasyonu | 46 |
| 4.6 <i>Zymomonas mobilis</i> Levansukraz ile FOS Üretimi | 55 |
| 4.7 <i>Zymomonas mobilis</i> Levansukrazın Saflaştırılması | 57 |
| 5. SONUÇ | 61 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ..... | 64 |

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

ÖZGEÇMİŞ75

EKLER.....



ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Sekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| 2.1 Levansukraz enziminin katalizlediği reaksiyonlarda alıcı ve verici moleküller | 4 |
| 2.2 Levansukraz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonlar..... | 6 |
| 2.3 <i>Zymomonas mobilis</i> 'in taramalı elektron mikroskobu görüntüleri..... | 11 |
| 2.4 Levanın moleküler yapısı | 12 |
| 2.5 Levansukraz enzimi tarafından sentezlenen FOS çeşitleri | 15 |
| 2.6 <i>Zymomonas mobilis</i> levansukraz enzimi tarafından FOS ve levan oluşumu . | 16 |
| 3.1 FOS üretim basamakları | 29 |
| 3.2 İndirgen şeker tayini için kullanılan DNS standart grafiği..... | 31 |
| 3.3 DNS yöntemi ile levansukraz aktivite tayini basamakları..... | 31 |
| 3.4 Toplam şeker ve kalan şeker tayini için kullanılan fenol-sülfürik asit standart grafiği..... | 32 |
| 3.5 Protein tayini için kullanılan BSA standart grafiği..... | 34 |
| 4.1 Zamana bağlı aktivite, biyokütle ve kalan şeker miktarı değişimi | 41 |
| 4.2 Zamana bağlı aktivite ve protein miktarı değişimi | 42 |
| 4.3 Sıcaklığa bağlı aktivite ve protein miktarı değişimi | 43 |
| 4.4 Sakkaroz konsantrasyonuna bağlı aktivite ve protein miktarı değişimi | 44 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Sekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 4.5 pH'ya bağlı aktivite ve protein miktarı değişimi | 45 |
| 4.6 Sabit sakkaroz konsantrasyonunda (150 g/L), sıcaklık ve pH'nın izohips eğrisi ve yüzey grafiği..... | 51 |
| 4.7 Sabit pH'da (5.0), sakkaroz konsantrasyonu ve sıcaklığın izohips eğrisi ve yüzey grafiği | 52 |
| 4.8 Sabit sıcaklıkta (30 °C) substrat konsantrasyonu ve pH'nın izohips eğrisi ve yüzey grafiği | 53 |
| 4.9 Glukoz, fruktoz ve sakkaroz standartları | 55 |
| 4.10 1-kestoz, nistoz ve fruktofuranozilnistoz standartları | 56 |
| 4.11 <i>Zymomonas mobilis</i> levansukraz ile üretilen 1-kestoz..... | 56 |
| 4.12 SDS-PAGE jel görüntüsü 1..... | 59 |
| 4.13 SDS-PAGE jel görüntüsü 2..... | 60 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Cizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| 2.1 Levansukraz üreten mikroorganizmalar | 7 |
| 2.2 FOS üretiminde görev alan fruktosiltransferaz grubu enzimlerin bitkisel ve mikrobiyal kaynakları | 14 |
| 2.3 Levansukraz enziminin saflaştırma ve karakterizasyon stratejisi..... | 20 |
| 3.1 Stok besiyerinin bileşimi | 25 |
| 3.2 Aşı ve üretim ortamlarının bileşimi..... | 26 |
| 3.3 Levansukraz üretimine etkisi incelenen parametreler ve aralıkları | 28 |
| 3.4 Cevap yüzey yönteminde incelenen parametreler ve seviyeleri..... | 35 |
| 3.5 %5'lik SDS-PAGE jel içeriği | 38 |
| 3.6 %12'lik SDS-PAGE jel içeriği | 38 |
| 3.7 4X örnek yükleme boyası içeriği | 38 |
| 3.8 SDS-PAGE tamponu içeriği | 38 |
| 4.1 Cevap yüzey yönteminde kullanılan deneme deseni | 47 |
| 4.2 İkinci dereceden model denklemin istatistiksel analizi | 47 |
| 4.3 Levansukraz enzim aktivitesi için tahmin edilen regresyon katsayıları | 49 |
| 4.4 Glukoz, fruktoz ve sakkaroz standartlarının alıkonma zamanları | 55 |

ÇİZELGELER DİZİNİ(devam)**Çizelge****Sayfa**

4.5 1-kestoz, nistoz ve fruktofuranozilnistoz standartlarının alıkonma zamanları 56

4.6 *Zymomonas mobilis* levansukraz tarafından üretilen FOS çeşitleri ve alıkonma zamanları.....57

4.7 Levansukraz enziminin saflaştırma sonuçları58



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| <u>Simgeler</u> | <u>Açıklama</u> |
|------------------------------|---------------------------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Amonyum Sülfat |
| adj R^2 | düzeltilmiş regresyon katsayısı |
| g | gram |
| H_2O | Su |
| HCl | Hidroklorik asit |
| kDa | kilo Dalton |
| KH_2PO_4 | Monopotasyum fosfat |
| K_M | Michealis Katsayısı |
| L | Litre |
| M | Mol |
| mL | Mililitre |
| nm | nanometre |
| $^\circ\text{C}$ | Santigrat |
| R^2 | regresyon katsayısı |
| rpm | revolutions per minute |

| | |
|-------|--|
| v/v | hacimce yüzde |
| w/v | ağırlıkça yüzde |
| BSA | Sığır serum albümin |
| CYY | Cevap Yüzey Yöntemi |
| DNS | di-nitro salisilik asit |
| FDA | Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Kurumu) |
| FOS | Fruktooligosakkarit |
| Ftase | Fruktoziltransferaz |
| GRAS | Generally Recognized as Safe |
| HPLC | Yüksek performans sıvı kromatografisi |
| UV | Ultraviyole |

1. GİRİŞ

Levansukrazlar (E.C.2.4. 1.10), GH68 glikozit hidrolaz enzim ailesine ait olup sakkarozu substrat olarak kullanarak levan ve levan tipi fruktooligosakkaritlerin (FOS) oluşumunu katalizleyen fruktoziltransferaz grubu enzimlerdir. Fruktoziltransferaz (Ftase) grubu enzimler hem transfruktosilasyon hem de hidroliz aktivitesi göstermektedir. Transfruktosilasyon aktivitesi ile sakkarozda bulunan $\beta(2\rightarrow1)$ bağları parçalanarak sakkaroz ve serbest glukoz gibi alıcı moleküllere fruktozil gruplarının transferi gerçekleşmektedir. Enzimin bu aktivitesi sayesinde fruktooligosakkaritlerin oluşumunu katalizlenmektedir (Belghith et al., 2012). Hidroliz aktivitesi ise sakkarozdaki $\alpha(2\rightarrow1)$ bağlarını parçalayarak serbest fruktozların oluşumunu gerçekleştirmektedir. Oluşan serbest haldeki fruktozlar levanbioz, levantrioz gibi farklı levan oligomerlerini meydana getirmektedir (Santos-Moriano et al., 2015).

Levan, tekrarlayan fruktoz ünitelerinden oluşan hücre dışı bir β -fruktandır ve fruktoz ünitelerinin $\beta(2\rightarrow6)$ glikozit bağları ile bağlanmasıyla oluşmaktadır (Arvidson et al., 2006). Zincirin başında sakkaroz molekülünden gelen D-glukoz molekülü, dallanma noktalarında ise $\beta(2\rightarrow1)$ bağları bulunmaktadır (Benigar et al., 2014). Levan, $\beta(2\rightarrow6)$ bağları sayesinde hem suda hem yağda çözünebilir özellik göstermektedir. Hem hidrofobik hem hidrofilik karaktere sahip olması, levanın sulu çözeltilerde nano boyutta parçacıklar halinde bulunmasını sağlamaktadır (Rehm, 2009). Levan; yapışkan bir özellik göstermesi, biyofilm oluşturması, düşük vizkoziteye sahip olması, yüksek su tutma kapasitesi, toksik ve mutajenik etki göstermemesi, iltihap önleyici etkisi, kandaki lipit düzeyini düşürmesi, AIDS ve tümör engelleyici özellikleri ile son yıllarda birçok araştırmacı tarafından incelenmektedir. Bu özellikleri sayesinde levan gıda, biyomedikal, tıp, kozmetik, kimya ve nanoteknoloji gibi pek çok farklı alanda kullanılmaktadır (Barone et al., 2007; Srikanth et al., 2015a).

İnulin tipi FOS'lar başlangıç D-glukoz molekülüne fruktoz ünitelerinin $\beta(2\rightarrow1)$ bağları ile bağlanmasından oluşmaktadır ve FOS'ların polimerizasyon

derecesi 2-9 arasında değişmektedir (Yıldız, 2011). Mikrobiyal levansukrazlar tarafından sentezlenen FOS'lar ise hem inulin hem de levan tipi bağlar içermektedir. Zincirde bulunan fruktoz molekülünün sayısına bağlı olarak kestoz (1-kestoz, 6-kestoz), nistoz ve fruktofuranozilstoz gibi farklı fruktooligosakkarit çeşitleri sentezlenmektedir (Santos–Moriano et al., 2015).

FOS'lar üst sindirim sisteminde sindirilememeleri, *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* türleri tarafından kullanılabilmesi sayesinde prebiyotik özellik göstermektedir. Ayrıca FOS'ların zararlı mikroorganizmaların gelişimini engelleyici etki gösterdiği belirtilmiştir (Kaplan and Hutkins, 2000; Sangeetha et al., 2005). Bu özelliklere ek olarak FOS'ların diyet lifi ve düşük kalorili tatlandırıcı özelliğe sahip olmaları gıda endüstrisinde fonksiyonel kullanımını arttırmaktadır (Sangeetha et al., 2005).

FOS'lar temel olarak bitkisel kaynaklardan elde edilebileceği gibi mikrobiyal yolla bakteriyel ve fungal kaynaklardan sentezlenen fruktosiltransferaz (E.C. 2. 4. 1. 9) grubu enzimler ile de elde edilmektedir (Sangeetha, 2003). Mevsimsel koşullardan dolayı bitkisel kaynaklardan elde edilen fruktosiltransferaz grubu enzimlerin miktarı ve verimi düşüktür. Bu nedenle endüstriyel uygulamalar için genellikle mikrobiyal yolla üretilen fruktosiltransferazlar tercih edilmektedir (Yun, 1996).

Fruktosiltransferaz grubu enzimler içerisinde yer alan levansukrazlar *Acetobacter xylinum* NCI 1005 (Tajima et al., 2000), *Bacillus subtilis* (Beine et al., 2008), *Bacillus megaterium* (Korneli et al., 2013), *Bacillus amyloliquefaciens* (Tian et al., 2011), *Erwinia amylovora* (Caputi et al., 2013), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Martinez-Fleites et al., 2005), *Lactobacillus reuteri* 121 (Biedendieck et al., 2007), *Leuconostoc mesenteroids* B-512 FMC (Kang et al., 2005), *Pseudomonas syringae* (Visnapuu et al., 2011), *Streptococcus mutans* (Hettwer et al., 1995), *Zymomonas mobilis* (Bekers et al., 2002; Goldman et al., 2008) gibi birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir.

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023, fakültatif anaerobik ve Gram negatif bir bakteridir. *Zymomonas mobilis*,

fruktooligosakkarit ve levan üretiminin yanı sıra sorbitol, glukonik asit ve etanol gibi farklı metabolitler de üretmektedir (Viikari, 1984; Doelle and Greenfield, 1985; Bekers et al., 2000). Glukoz, fruktoz, sakkaroz ve ksilozu Entner-Doudoroff yol izi ile metabolize edebilen bu bakteri, dışarıdan aldığı karbon kaynaklarının %98'i ile metabolit üretirken sadece %2'sini biyokütle oluşturmak için kullanmaktadır (Sprenger, 1996; de Graaf, 2000; Pentjuss et al., 2013).

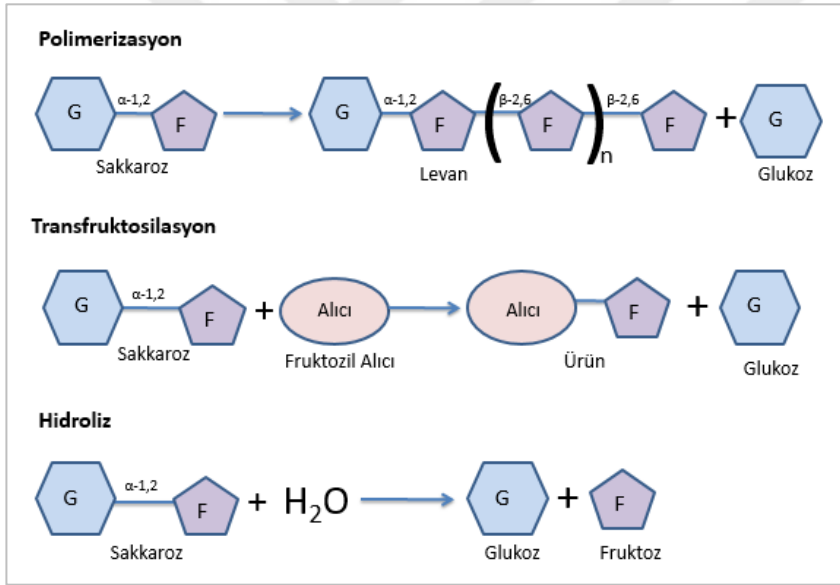
Çalışmanın ilk aşamasında *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 suşu kullanılarak levansukraz enzimi üretilmiştir ve başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve fermantasyon süresi gibi önemli proses parametrelerin enzim üretimine etkisi incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise; levansukraz üretimi üzerine en fazla etkiye sahip olduğu belirlenen başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık ve pH'nın levansukraz üretimine doğrusal, interaksiyon ve kuadratik etkileri Cevap Yüzey Yöntemi (CYY, RSM) ile incelenmiş ve bu yöntem ile matematiksel model oluşturularak maksimum enzim aktivitesi için optimum koşullar belirlenmiştir. *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 ile üretilen levansukraz enzimi kullanılarak FOS üretimi gerçekleştirilmiştir ve enzim tarafından üretilen FOS'lar ise yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Ayrıca, Cevap Yüzey Yöntemi ile belirlenen optimum koşullarda üretilen enzim saflaştırılmış ve SDS-PAGE ile saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Levansukraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

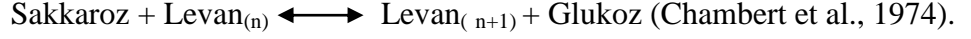
Levan ve fruktooligosakkaritlerin sentezini sağlayan levansukraz, alıcı moleküle bağlı olarak polimerizasyon, transfruktosilasyon ve hidroliz gibi üç farklı reaksiyonu katalizlemektedir. Polimerizasyon reaksiyonunda uzayan levan zinciri alıcı molekül olarak kullanılırken, transfruktosilasyonda monosakkaritler, disakkaritler ya da oligosakkaritler kullanılmaktadır. Hidroliz reaksiyonunda ise ortamdaki su molekülü alıcı molekül görevi görmektedir (Li et al., 2015). Şekil 2.1’de levansukraz enziminin katalizlediği reaksiyonlarda alıcı ve verici moleküller gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Levansukraz enziminin katalizlediği reaksiyonlarda alıcı ve verici moleküller (Li et al., 2015).

Levansukrazın katalizlediği reaksiyonlar ilk olarak fruktozil vericiden (sakkaroz) fruktozil-enzim yapısının oluşması (fruktozil-enzim kompleksi) ve daha sonra fruktozilin enzimden alıcı moleküle transferi olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir (Suzuki et al., 1993).

Polimerizasyon reaksiyonu sırasında küçük levan molekülleri alıcı molekül ve sakkaroz verici molekül olarak davranarak levan oluşumu gerçekleşmektedir (Chambert et al., 1974).



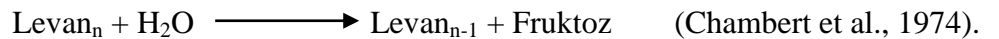
Polimerizasyon sırasında indirgen olmayan uçtan fruktozil birimlerin uç uca eklenmesi ile levan polimerinin büyümesinin gerçekleştiği ifade edilmiştir (Iizuka et al., 2002).

Transfruktosilasyon reaksiyonunda ise sakkarozda bulunan $\beta(2 \rightarrow 1)$ bağlarının parçalanması, sakkaroz ve serbest glukoz gibi alıcı moleküllere fruktozil gruplarının transferi gerçekleşmektedir (Belghith et al., 2012).

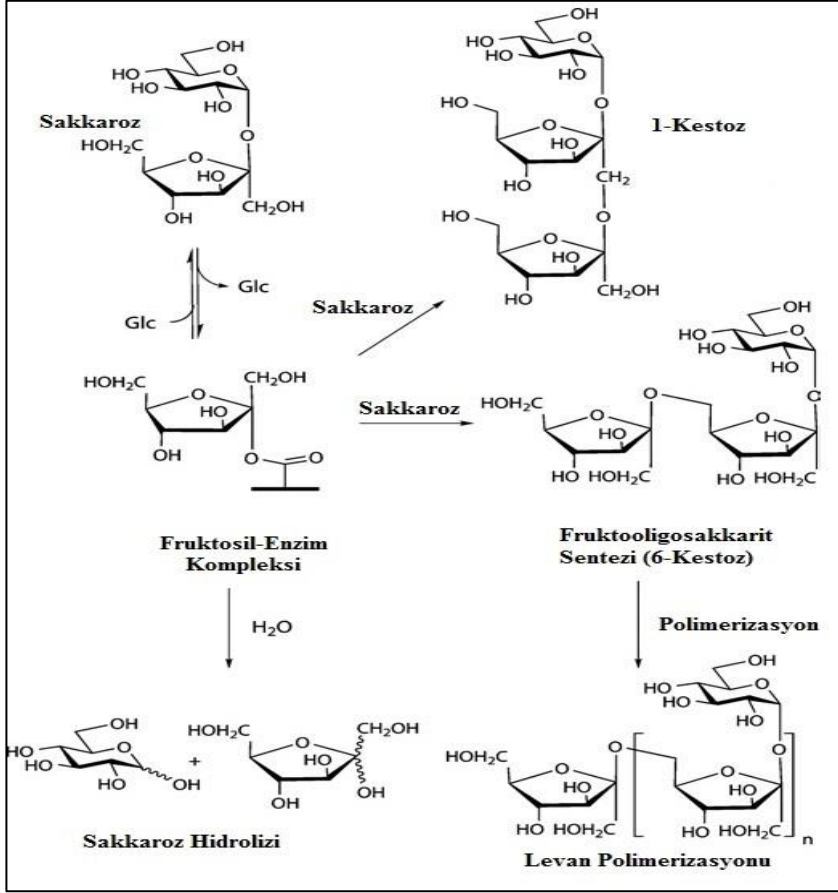


Levansukraz enziminin transfruktosilasyon aktivitesi ile kestoz (1-kestoz, 6-kestoz), nistoz ve fruktofuranozilnistoz gibi kısa zincirli FOS'lar üretilmektedir (Belghith et al., 2012).

Hidroliz reaksiyonunda ise sakkarozdaki $\alpha(2 \rightarrow 1)$ bağlarının parçalanması sonucunda serbest fruktozların oluşumu gerçekleşmektedir. Reaksiyon sırasında sakkaroz verici molekül olarak kullanılabilen gibi levan polimeri de kullanılabilir. Hidroliz sonucu oluşan serbest haldeki fruktozlar levanbioz, levantrioz gibi farklı levan oligomerlerinin oluşumunda fruktozil ünitesi olarak görev almaktadır (Santos-Moriano et al., 2015).



Şekil 2.2’de levansukraz tarafından katalizlenen reaksiyonlar verilmiştir.



Şekil 2.2 Levansukraz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Martinez-Fleites et al., 2005).

2.2 Levansukraz Enziminin Mikrobiyal Yolla Üretimi

Son yıllarda sağlığa yararlı ve düşük kalorili gıdalara yönelim artmıştır ve bu tür fonksiyonel gıdaların içerisinde FOS’lar da yer almaktadır. FOS’ların kaynakları, mikrobiyal üretim yolları, sağlık üzerine etkileri ve fonksiyonel özellikleri gibi konulara ilgi artmıştır (Sangeetha et al., 2005). FOS’lar inülince zengin bitkisel kaynaklardan ekstraksiyon ile elde edilebileceği gibi mikrobiyal yolla üretilen fruktosiltransferaz grubu enzimler kullanılarak da üretilmektedir (Yun, 1996; Sangeetha et al., 2005; Dominguez de Matos, 2013).

Fruktosiltransferaz grubu enzimlerden biri olan levansukraz Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir.

Çizelge 2.1 Levansukraz üreten mikroorganizmalar

| Mikroorganizma | Referans |
|--|----------------------------------|
| <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> | (Martinez- Fleites et al., 2005) |
| <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 | (Inthanavong et al., 2013) |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> 121 | (Biedendieck et al., 2007) |
| <i>Lactobacillus panis</i> TMW 1.648 | (Waldherr et al, 2008) |
| <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW 1.392 | (Tieking et al., 2005) |
| <i>Leuconostoc mesenteroids</i> B-512 FMC | (Kang et al., 2005) |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | (Visnapuu et al., 2011) |
| <i>Pantoea agglomerans</i> (= <i>Erwinia herbicola</i>) | (Hettwer et al., 1995) |
| <i>Rahnella aquatilis</i> | (Hettwer et al., 1995) |
| <i>Streptococcus salivarius</i> (SS2). | (Simms et al., 1990) |
| <i>Zymomonas mobilis</i> | (Şilbir ve ark., 2014) |

Levansukraz üretimi, genellikle sıvı kültür fermantasyon ve endüstriyel atıklar değerlendirilerek katı kültür fermantasyon ile gerçekleştirilmektedir (Ahmed, 2008; Belghith et al., 2012; Korneli et al., 2013; Esawy et al., 2013). Enzimlerin mikrobiyal yolla üretilmesinde maksimum miktarda ürün elde edilebilmesi için fermantasyon koşullarının (sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu, çalkalama hızı vb.) iyi bilinmesi gerekmektedir. Farklı fermantasyon koşullarının levansukraz enzim üretimine etkisi çok sayıda araştırmacı tarafından incelenmiştir (Abdel-Fattah et al., 2005; Belghith et al., 2012; Korneli et al., 2013; Esawy et al., 2013).

Cote (1988) tarafından *Erwinia herbicola* ile gerçekleştirilen çalışmada sakkaroz, glukoz, fruktoz, sorbitol ve mannitol gibi çeşitli karbon kaynaklarının levansukraz üretimine etkisi incelenmiş ve fruktozun hücre gelişimini

yavaşlatarak enzim üretimini azalttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında ise maksimum enzim üretimi elde edilmiştir.

Başka bir çalışmada termofilik *Bacillus* sp. ile levansukraz üretiminde karbon kaynağı olarak glukoz ve fruktoz kullanıldığında düşük verimde enzim üretimi gerçekleşirken, sakkaroz kullanıldığında ise sakkarozun hücre gelişimini destekleyici etkisinin enzim üretimini arttırdığı belirlenmiştir (Belghith et al., 2012). Yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi karbon kaynağı levansukraz üretiminde önemli bir etkiye sahip olup kullanılan mikroorganizmaya bağlı olarak etki mekanizması değişmektedir (Li et al., 2015). *Bacillus circulans* (Oseguera et al., 1996) ve *Bacillus amyloliquefaciens* (Tian et al., 2011) ile sakkaroz konsantrasyonu enzim üretimini artırıcı etki gösterirken, *Bacillus subtilis* NRC 33a (Abdel-Fattah et al., 2005) levansukrazın hem sakkaroz hem de glukoz ile üretildiği gösterilmiştir (Li et al., 2015).

Aynı zamanda levansukraz üretiminde azot kaynağı da önemli bir rol oynamaktadır. Farklı azot kaynaklarının (mısır ıslatma suyu, pepton, maya özütü, ekmek mayası ve buğday kepeği) *Bacillus subtilis* NRC 33a levansukraz üretimine etkisi incelenmiş ve ekmek mayası içeren fermantasyon ortamında en yüksek levansukraz aktivitesi elde edilmiştir (Abdel-Fattah et al., 2005). Başka bir çalışmada ise *Bacillus* sp. levansukraz üretiminde en uygun azot kaynağı maya özütü olarak belirlenmiştir (Belghith ve ark., 2012).

Sıcaklık ve metal iyonları gibi diğer faktörler de levansukraz üretimi üzerine etkilidir. *Bacillus subtilis* NRC 33a levansukraz üretimi için optimum sıcaklık değeri 30 °C ve uygun metal iyonu Mg^{+2} olarak belirlenmiştir (Abdel-Fattah et al., 2005). Termofilik *Bacillus* sp. için ise maksimum enzim üretiminin 50 °C ve 50 mM Fe^{+2} varlığında gerçekleştiği gösterilmiştir (Belghith et al., 2012).

Ahmed (2008) tarafından *Bacillus megaterium* ile gerçekleştirilen çalışmada çeşitli gıda ve tarımsal atıklar (portakal kabukları, muz kabukları, limon atıkları, talaş ve buğday kepeği) kullanılarak yüksek verim sağlayan katı kültür fermantasyon ile levansukraz üretimi optimize edilmiştir. Başlangıç pH değeri 6.0

olan nemli talaş ortamında 30 °C statik koşullarda 72 saat inkübasyon sonrasında üretilen enzimin maksimum aktiviteye (140.54 U/g) sahip olduğu belirtilmiştir.

Levansukrazlar, farklı sıcaklıklarda transfruktosilasyon ve hidroliz aktivitesi göstermektedir, genellikle düşük sıcaklıklarda transfruktosilasyonu tercih etmektedir. *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından hücre dışı olarak üretilen levansukraz için optimum transfruktosilasyon aktivitesi 40 °C’de, optimum hidroliz aktivitesi ise 50 °C’de belirlenmiştir (Tian et al., 2011).

Mikrobiyal levansukrazlar genel olarak 50 °C’den daha düşük sıcaklıklarda levan üretmektedir ve üretilen levanın molekül ağırlığı fermantasyon sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir (Wu et al., 2013). *Bacillus licheniformis* RN-01 levansukraz tarafından yüksek sıcaklıkta (50 °C) üretilen levan, 612 kDa gibi yüksek molekül ağırlığına sahip iken düşük sıcaklık değerlerinde (30 °C) 11 kDa gibi düşük molekül ağırlığına sahip olduğu belirtilmiştir (Nakapong et al., 2013).

Levanın molekül ağırlığı ve dallanma derecesi hem levanı üreten mikroorganizmaya, hem de fermantasyon şartlarına göre farklılık göstermektedir ve molekül ağırlığındaki farklılıklar levanın fonksiyonel özelliklerinde etkili olup, farklı uygulamalarda kullanılmasını sağlamaktadır (Wu et al., 2013). Wu et al. (2013) tarafından *Bacillus subtilis* natto ile gerçekleştirilen çalışmada kesikli ve kesikli-beslemeli sistemlerde levan polimeri üretilmiş ve levanın molekül ağırlığına etki eden faktörler araştırılmıştır. Üretilen levanın molekül ağırlığının başlangıç sakkaroz konsantrasyonundan önemli ölçüde etkilendiği belirlenmiş ve yüksek sakkaroz konsantrasyonunda (400 g/L) düşük molekül ağırlıklı levan üretilirken, düşük sakkaroz konsantrasyonunda (20 g/L) ise yüksek molekül ağırlıklı levan üretildiği gösterilmiştir.

2.2.1 *Zymomonas mobilis*

Çalışmada kullanılan mikroorganizma *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023, fakültatif anaerobik, Gram negatif ve çubuk şeklinde bir bakteridir (Şekil 2.3). (Rogers et al., 1982; Weir, 2016). *Zymomonas mobilis* ilk olarak tropikal ve

subtropikal bölgelerde yetişen agav sapı ve şeker kamışı gibi şekerce zengin bitkilerden izole edilmiştir (Sahm et al., 2006).

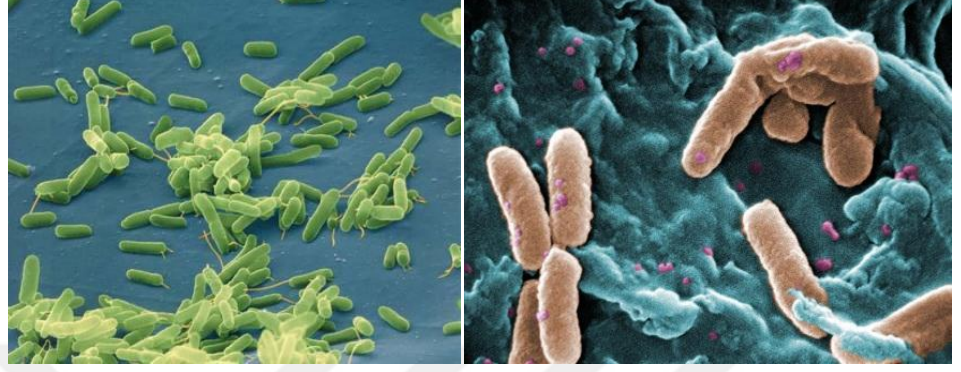
Bu bakteri Entner-Doudoroff metabolik yol izini kullanarak glukoz ve fruktozdan etanol üretmektedir. *Zymomonas mobilis* tarafından 1 mol glukoz kullanılarak net 1 mol ATP elde edilmektedir. Ayrıca sakkaroz içeren besiyerinde levan ve sorbitol üretmektedir (Sahm et al., 2006).

Z. mobilis glukoz içeren besiyerinde teorik verimin %97-98'i kadar yüksek verimlerde etanol üretmekte ve çok düşük miktarlarda yan ürün oluşturmaktadır. *Z. mobilis*'in etanol verimliliği (3-5 kat) şeker toleransı (400 g/L'ye kadar) ve etanol direnci (%12-13) mayalardan daha yüksektir. Bu bakterinin substrat spektrumu glukoz, fruktoz ve sakkaroz ile sınırlı olduğundan son yıllarda lignoselülozik materyallerden etanol üretimini arttırmak için ksilozu metabolize edebilen *Z. mobilis* suşları geliştirilmektedir (Schügerl et al., 2000).

Hem glukozu hem de fruktozu metabolize edebilen *Z. mobilis*'in fruktoz varlığında büyümesi yavaşlamakta, biyokütle miktarı azalmakta ve etanol verimi düşmektedir. Bunun sebebinin fruktoz varlığında oluşan gliserol ve dihidroksi aseton gibi yan ürünlerin toksik etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Viikari and Korhola, 1986).

Z. mobilis, çok yüksek bir glikoliz hızına sahiptir ve $900 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{g kuru ağırlık})^{-1}$ kadar glukoz alım hızlarına ulaştığı belirlenmiştir. Sakkaroz hidroliz hızı glikoliz hızını geçtiğinde ortamdaki serbest haldeki glukoz miktarı artmaktadır (Schügerl et al., 2000). Yüksek glukoz konsantrasyonu levansukraz enzimi üzerinde inhibe edici etki gösterdiğinden nispeten daha düşük sakkaroz hidroliz hızında enzim tarafından levan üretimi daha yüksek olmaktadır (Hestrin and Avineri-Shapiro, 1943). Sakkarozun hidroliz hızına pH, sakkaroz konsantrasyonu ve sıcaklık gibi parametreler etki etmektedir ve *Z. mobilis*'in %46 (w/v)'ya ulaşan başlangıç sakkaroz konsantrasyonlarında gelişip aktif şekilde fermantasyona devam edebildiği bilinmektedir. Başlangıç sakkaroz konsantrasyonunun yükseltilmesi fermantasyon süresini arttırmasına rağmen toplam biyokütle

miktarında önemli bir değişiklik oluşturmadığı ifade edilmiştir (Doelle and Greenfield, 1985).



Şekil 2.3 *Zymomonas mobilis*'in taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (Anonymous, 2012a; Anonymous 2012b).

Z. mobilis'in gelişmesi için optimum pH 7.3 olmasına rağmen bu bakterinin 3.8 ile 7.5 gibi geniş pH aralığında da gelişebildiği belirtilmiştir (Sahm et al., 2006). En iyi gelişme sıcaklığının ise 25-30 °C olduğu ifade edilmiştir (Ruiz-Argueso and Rodriguez-Navarro, 1975).

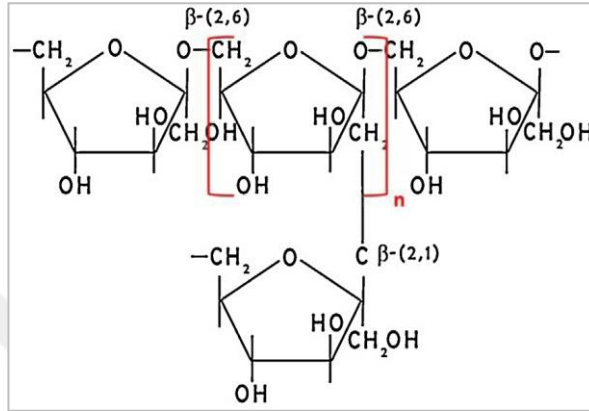
Z. mobilis, sakkaroz içeren besiyerinde FOS ve levan sentezinde görev alan levansukraz enzimini sentezlemektedir. Sakkaroz konsantrasyonu ve sıcaklık levansukraz aktivitesi için önemli parametrelerdir (Borsari et al., 2006; Dağbağlı ve ark., 2012). Yüksek sakkaroz konsantrasyonu ve yüksek sıcaklık FOS sentezini arttırmakta ve etanol üretim hızını azaltmaktadır (Beker et al 2002; Dağbağlı ve ark., 2012).

2.3 Levansukraz Tarafından Sentezlenen Polimerler

Bakteriler tarafından üretilen levansukrazlar yüksek sakkaroz konsantrasyonunda levan ve/veya fruktooligosakkaritlerin (FOS) oluşumunu katalizlemektedir (Bekers et al., 2002; Vigants et al., 2003; Belghith et al., 2012).

2.3.1 Levan ve fonksiyonu

Levan, $\beta(2\rightarrow6)$ bağları ile birbirine bağlanmış fruktoz ünitelerinden oluşan bir polisakkarittir (Bekers et al., 2005) ve $\beta(2\rightarrow1)$ bağlarında dallanma yapmaktadır (Arvidson et al., 2006). Şekil 2.4'te levanın moleküler yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.4 Levanın moleküler yapısı. $\beta(2\rightarrow6)$ bağlarından oluşan fruktan omurgası ve $\beta(2\rightarrow1)$ noktasında oluşan dallanma (Srikanth et al., 2015a).

Levan, levansukraz enziminin transfruktosilasyon aktivitesi ile sakkarozdan sentezlenmektedir. (Crittenden and Doelle, 1994). Levansukrazın levan oluşumu için temel işlevi polimerizasyon reaksiyonu sırasında transfruktosilasyon aktivitesi ile D-fruktozil ünitelerinin transferini katalizlemektir (Han, 1990; Donot et al., 2012).

Donot et al. (2012) ve Hernández et al. (1999) tarafından levansukrazın öncelikle periplazmada birikerek burada son konformasyonunu aldıktan sonra hücre dışına salgılandığı belirtilmiştir. Bakterilerde levansukraz sentez mekanizmasının iki farklı yolla gerçekleştiği ifade edilmiştir. İlk olarak *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* ve *Bacillus amyloliquefaciens* gibi Gram pozitif bakterilerde levansukrazın iki aşamalı sentezidir; periplazmada protein katlanmasının ardından sinyal peptidin levansukrazdan kesilmesi ve dış ortamda bulunan demir, kalsiyum iyonları ya da pH değişimi gibi etkilerin enzimin hücre dışına salınması için gerekli sinyali tamamlaması ile gerçekleşmektedir. *Zymomonas*

mobilis, *Erwinia amylovora*, *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas syringae* gibi Gram negatif bakterilerde ise levansukrazın hücre dışına salgılanmasının sinyal peptit yollarını ile bağlantısının olmadığı önesürülmüştür (Hestrin, Feingold and Avigad, 1956; Ben Ammar et al., 2002; Donot et al., 2012).

Farklı fonksiyonel özellikleri sayesinde levan gıda, biyomedikal, tıp, kozmetik, kimya, nanoteknoloji gibi pek çok farklı alanda kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde kullanılan levanların genellikle *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, *Lactobacillus reuteri* LB121 gibi laktik asit bakterileri tarafından üretildiği bildirilmiştir (Srikanth et al., 2015a).

Endüstriyel bir biyopolimer olan levan, hem suda hem yağda çözünebilir olması, yüksek molekül ağırlığı, düşük bir iç viskoziteye sahip olması ve ayrıca oda sıcaklığında su içinde şişmemesi gibi birçok özelliği sayesinde özellikle gıda endüstrisinde jelleştirici ajan, emülgatör, stabilizatör ve kıvam arttırıcı olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Arvidson et al., 2006; Rehm, 2009; Srikanth et al., 2015). Levana teknolojik özelliklerinin yanı sıra iltihap önleyici, AIDS ve tümör engelleyici, kandaki lipit miktarını düşürme gibi özelliklere de sahiptir (Srikanth et al., 2015b).

Mikrobiyal levana karşı son yıllarda artan ilginin en önemli sebeplerinden biri levanın iyi bir biyofilm oluşturma özelliği ile gıda maddelerinin kaplanması ve paketlenmesinde kullanılmasıdır (Göksungur ve ark., 2012). Göksungur ve ark. (2012), kayısı ve incir gibi orta nemli meyvelerin raf ömrünün artırılması amacıyla levandan ürettikleri yenilebilir filmi, kaplama materyali olarak kullanmışlardır. Depolama süresince her iki ürün grubunda da nem kaybının az olduğu belirlenmiş ve bu sebeple levanın orta nemli gıdalarda kaplama materyali olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir.

Tinzi-Malang et al. (2015), yaptıkları çalışmada *Weissella confusa* F3/2-2 laktik asit bakterisinin ürettiği dekstran-levan biyopolimerini ekme hamurunda kullanarak hamurun reolojik özellikleri ve ekmeğin tekstürel yapısını incelemişler

ve hamurun elastikiyeti, su tutma kapasitesi ve tekstürel yapısının, ticari olarak üretilen ekmek hamurunun özelliklerine benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir.

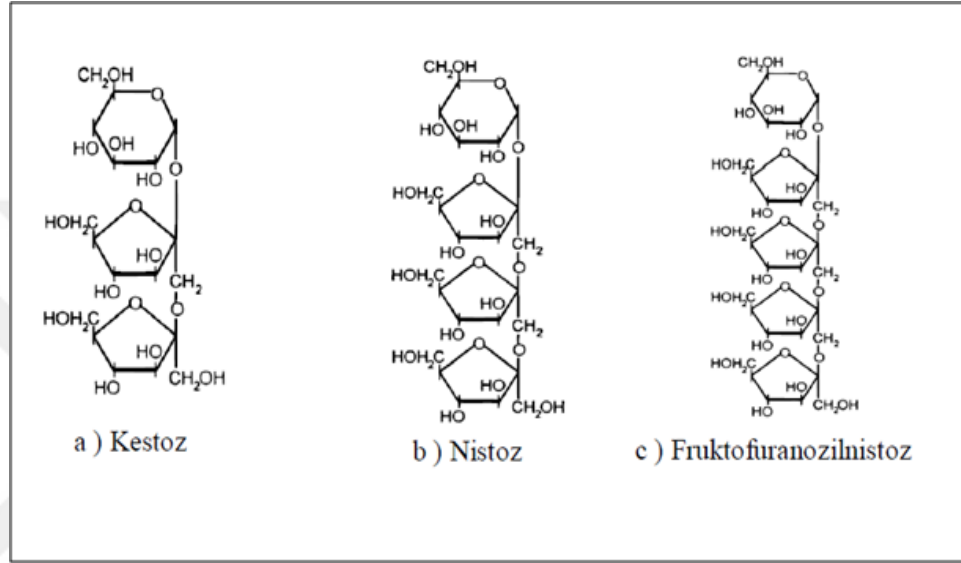
2.3.2 Fruktooligosakkaritler (FOS) ve fonksiyonu

FOS'lar sağlığa yararlı etkileri ve birçok farklı fonksiyonel özelliği sayesinde insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir (Sarup-Singh et al., 2016). İnsanlar beslenmesinde doğal olarak FOS içeren bitkileri tüketebilir fakat bitkilerin FOS içeriği düşüktür. Endüstriyel biyoteknolojideki gelişmeler FOS'ların büyük çapta üretimini mümkün kılmıştır. FOS'ların endüstriyel üretimi gerek bitkisel kaynaklardan ekstraksiyon yapılarak gerekse farklı substratlar kullanılarak enzimatik yolla gerçekleştirilebilir. Fakat endüstriyel açıdan bitkisel kaynaklardan FOS'ların ekstraksiyonu hem düşük verimli hem de ekonomik olarak yüksek maliyetlidir. FOS'ların enzimatik üretimi ise ekonomik açıdan daha uygundur. Bu nedenle prebiyotik özelliğe sahip olan FOS'lar inülinin enzimatik hidrolizi veya sakkarozun transfruktosilasyonu ile üretilir. Sakkarozdan FOS'ların enzimatik yolla üretimi fruktosiltransferaz grubu enzimler aracılığı ile gerçekleşmektedir (Sarup-Singh et al., 2016). Çizelge 2.2'de FOS üretiminde görev alan fruktosiltransferaz grubu enzimlerin bitkisel ve mikrobiyal kaynakları verilmiştir.

Çizelge 2.2 FOS üretiminde görev alan fruktosiltransferaz grubu enzimlerin bitkisel ve mikrobiyal kaynakları (Fujita et al., 1994; Yun, 1996; Kim et al., 2000; Hayashi et al., 2000; Wang and Rakshit, 2000; Park et al., 2001; Cha et al., 2001; Tien et al., 2001; Sangeetha et al., 2005).

| Bitkisel Kaynaklar | Mikrobiyal Kaynaklar | |
|------------------------------|-----------------------------------|--|
| | Fungal Kaynaklar | Bakteriyel Kaynaklar |
| <i>Agave americana</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Arthrobacter sps.</i> |
| <i>Agave vera cruz</i> | <i>Aspergillus phoenicis</i> | <i>Bacillus macerans</i> |
| <i>Asparagus officinalis</i> | <i>Aspergillus sydowi</i> | <i>Microbacterium sp. AL-210</i> |
| <i>Allium cepa</i> | <i>Calviceps purpurea</i> | <i>Arthrobacter sp. K-1</i> |
| <i>Cichorium intybus</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Microbacterium levaniformans ATCC 15953</i> |
| <i>Crinum longifolium</i> | <i>Penicillium spinulosum</i> | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> |
| <i>Helianthus tuberosus</i> | <i>Phytophthora parasitica</i> | <i>Zymomonas mobilis</i> |
| <i>Lactuca sativa</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | |
| <i>Lycoris radiata</i> | <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> | |

Fruktosiltransferaz grubu enzimlerden biri olan levansukrazlar, levan biyopolimerinin yanı sıra transfruktosilasyon aktivitesi ile FOS üretmektedir (Li et al., 2015). Levansukraz enzimi tarafından kestoz (1-kestoz, 6-kestoz, neokestoz), nistoz ve fruktofuranozilnistoz gibi farklı FOS çeşitleri üretilmektedir ve üretilen FOS'lar Şekil 2.5'te gösterilmektedir (Sangeetha et al., 2005).

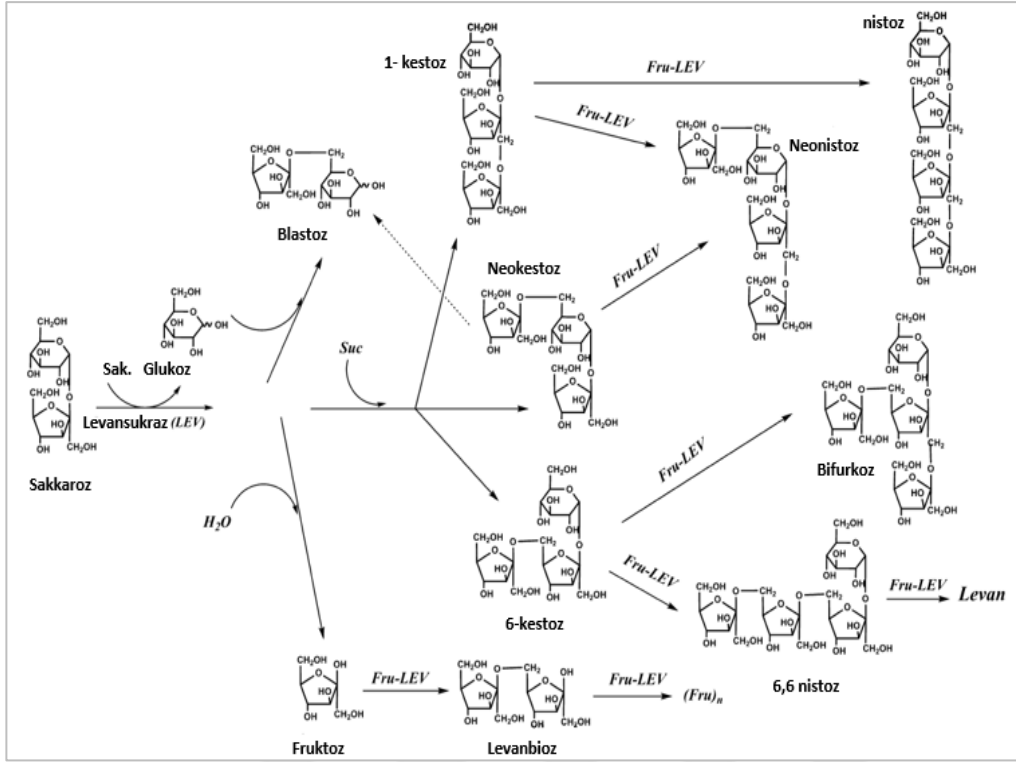


Şekil 2.5 Levansukraz enzimi tarafından sentezlenen FOS çeşitleri (Kurban, 2013)

Belghith et al. (2012), tarafından *Bacillus* sp. ile gerçekleştirilen çalışmada %20 (w/v) sakkaroz içeren ortamda levansukraz üretimi gerçekleştirilmiş ve enzimin FOS ürettiği gösterilmiştir.

Bekers et al. (2002), *Zymomonas mobilis* ile ürettikleri levansukraz enzimini kullanarak sakkaroz şurubundan %22-32 verimlilikte 1-kestoz, 6-kestoz, nistoz ve fruktofuranozilnistoz gibi FOS'ları üretmişler ve elde edilen bu FOS çeşitlerinin düşük kalorili prebiyotik kaynağı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Bekers et al., 2002).

Santos-Moriano et al. (2015), tarafından *Zymomonas mobilis* ile gerçekleştirilen çalışmada levansukrazın levan ve FOS oluşum mekanizması açıklanmıştır ve öngörülen mekanizma Şekil 2.6'de verilmiştir.



Şekil 2.6 *Zymomonas mobilis* levansukraz enzimi tarafından FOS ve levan oluşumu (Santos-Moriano et al., 2015).

Zymomonas mobilis tarafından üretilen levansukraz ile sakkarozdan FOS ve levan oluşumunun farklı aşamalarda gerçekleştiği ifade edilmiş ve fruktozil-enzim ara bileşenin oluşması ile sakkaroz alıcı molekül olarak kullanıldığında 3 farklı FOS (1-kestoz, neokestoz ve 6-kestoz) oluşumunun gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu FOS çeşitlerinden 6-kestoz levan oluşumunun belirleyicisidir ve levan oluşumunun temel yapı birimi olarak görülmektedir. Bir disakkarit olan blastoz ise neokestozun hidrolizi ile oluşabileceği gibi glukoz alıcı molekül olarak kullanılmasıyla da oluşmaktadır. Fruktoz alıcı molekül olarak kullanıldığında ise levansukrazın hidroliz aktivitesi ile levanbioz, levantrioz gibi levan oligomerlerinin meydana geldiği ifade edilmiştir (Santos-Moriano et al., 2015).

Yine aynı çalışmada levansukrazın levan polimerizasyonu, kısa zincirli fruktooligosakkaritlerin oluşumu ve sakkarozun hidrolizi gibi 3 farklı katalitik aktivitesi üzerine sıcaklık ve sakkaroz konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. En fazla levan oluşumu 4 °C'de 100 g/L sakkaroz içeriğinde gerçekleşmiş ve sıcaklık (40 °C) ve sakkaroz konsantrasyonunun artması (600 g/L) levan oluşumunu

azaltırken FOS oluşumunu önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Aynı zamanda sıcaklığın artmasının levansukrazın hidroliz aktivitesini de arttırdığı ifade edilmiştir (Santos-Moriano et al., 2015).

Trujillo et al. (2001) tarafından yapılan çalışmada *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansukraz rekombinant olarak *Pichia pastoris*'de üretilmiş ve rekombinant levansukrazın %50 sakkaroz içeren ortamda yüksek verimlilikte (%43) 1-kestoz sentezlediği belirtilmiştir.

FOS'lar FDA (Food and Drug Administration-Gıda ve İlaç Kurumu) tarafından GRAS (Generally Recognized as Safe) statüsüne sahip bileşenler olarak tanımlanmaktadır (FDA, 2016). Bu durum FOS'ların fonksiyonel gıda katkısı olarak öne çıkmasına sebep olmuştur. Sakkarozdan 3 kat daha az tatlılık değeri olan FOS'lar, sakkaroz yerine reçeller, şekerlemeler ve çikolatalarda düşük kalorili fonksiyonel tatlandırıcı olarak kullanılmakta olup, diyabet hastaları için bu gıdaların tüketimi güvenli hale gelmektedir (Yıldız, 2011). Ayrıca prebiyotik özelliğe sahip olan FOS'lar midede sindirilememekte, kolonda *Bifidobacteria* gibi yararlı mikroorganizmaların gelişimini olumlu yönde etkileyerek mide ve bağırsak rahatsızlıklarına karşı koruyucu etki göstermektedir (Sangeetha et al., 2005). Ayrıca FOS'ların mineral emilimi üzerine etkili olduğu, kalın bağırsakta mineral emilimini arttırdığı ve bu durumun FOS'ların kolon mikroorganizmaları tarafından fermente edilebilmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (YuWang et al., 2010). FOS'lar geniş pH aralığında (pH 4.0-7.0) depolamada bir yıla kadar bozulmadan kalmalarından dolayı gıda katkı maddesi olarak kullanılabilir (Ganaie et al., 2014). *Aspergillus oryzae* MTCC5154 levansukraz kullanarak üretilen FOS'lar mango, portakal ve ananas suyu gibi meyve sularına ilave edilerek 6 ay süresince depolanmıştır. Depolama boyunca meyve sularının fizikokimyasal yapısında değişiklik olmadığı, mikrobiyal ya da enzimatik bir bozulma gerçekleşmediği belirlenmiştir. Böylece FOS eklenerek hazırlanan sağlıklı içeceklerin depolama koşullarına bağlı olarak uzun süre saklanabileceği belirtilmiştir (Renuka et al., 2013).

Padma Ishwarya et al. (2013) tarafından yapılan çalışmada bisküvi üretiminde FOS'lar kullanılarak hamur ve son ürünün özellikleri incelenmiş ve

standartlara uygun olarak hazırlanan bisküvi hamuruna şeker yerine FOS'lar ilave edilmiştir. FOS eklenen ürünlerde daha iyi bir bağlanma ve matriks stabilitesinin sağlandığı belirtilmiştir.

Angiolillo et al. (2015) tarafından yapılan çalışmada ise hamburgerlere fonksiyonel özellik kazandırmak için etlere FOS eklenmiş ve FOS eklenerek pişirilen etlerde pişirme kaybının azaldığı saptanmıştır. Böylece FOS'ların katkı maddesi olarak bu üründe kullanılabilceği ve pişirme kaybını azaltarak daha kaliteli bir ürün elde edilebileceği belirtilmiştir.

Krem karamelli tatlı üretiminde sakkaroz ile birlikte FOS ilave ederek ürünlerin hem reolojik özellikleri, hem de duysal özellikleri incelenmiş ve ürünlerdeki FOS miktarı arttıkça jelleşme özelliğinin de arttığı saptanmıştır (Protonotariou et al., 2013).

2.4 Levansukraz Enziminin Saflaştırma ve Karakterizasyon Strateji

Farklı mikroorganizmalar kullanılarak üretilen hücre içi ve hücre dışı levansukrazların saflaştırılmasına yönelik literatürde birçok çalışma bulunmaktadır (Tian et al., 2011; Nakapong et al., 2013; Caputi et al., 2013). Üretilen bu enzimin kullanım amacına ve mikroorganizmalar tarafından üretim şekline bağlı olarak saflaştırma yöntemleri de değişmektedir (Tian et al., 2011; Nakapong et al., 2013; Caputi et al., 2013). Çizelge 2.3'te mikrobiyal yolla üretilen levansukrazların saflaştırma stratejileri yer almaktadır. Bu çalışmaların bazılarında levansukraz *E. coli*'de rekombinant olarak üretilmiş ve *E. coli*'den üretilen levansukrazlar füzyon partnerine uygun affinite kromatografi yöntemi ile saflaştırılmıştır (Caputi et al., 2013). Hücre dışına salgılanan levansukrazlar santrifüj uygulaması ile fermantasyon ortamından ayrılırken, hücre içi levansukrazlar için sonikasyon gibi hücre parçalama yöntemleri uygulanarak mikroorganizmaların hücre zarı/duvarı parçalanıp enzimin elde edildiği belirtilmiştir (Nakapong et al., 2013; Caputi et al., 2013). Çalışmalarda genel olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gibi tuzlar kullanılarak istenilen enzim çökelti halinde elde edilmiş ve çökeltideki tuzların uzaklaştırılması amacıyla diyaliz işlemi uygulanmıştır (Nakapong et al., 2013; Inthanavong et al., 2013). Yüksek saflıkta

levansukraz elde etmek için farklı kromatografik yöntemler uygulanmıştır (Waldherr et al., 2008; Goldman et al., 2008; Caputi et al., 2013).

Çizelge 2.3'te görüldüğü gibi mikrobiyal yolla üretilen levansukrazlar saflaştırıldıktan sonra hem ürettiği biyopolimerlerin hem de saflaştırılan enzimin özelliklerinin belirlenmesi amacı ile karakterize edilmiştir (Goldman et al., 2008; Tian et al., 2011).

Tian et al. (2011) tarafından *Bacillus amyloliquefaciens* ile gerçekleştirilen çalışmada hücre içi ve hücre dışı formda üretilen levansukraz saflaştırılmış ve sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Levansukraz transfruktosilasyon aktivitesi dakikada 1 μ mol glukozun açığa çıkması için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Hücre içi levansukrazın transfruktosilasyon aktivitesi için optimum sıcaklık 25-30 °C iken, hücre dışı enzim için 40 °C olarak belirlenmiştir. Ayrıca hücre içi ve hücre dışı levansukrazın substrat afinitelerinin de farklı olduğu belirtilmiş ve transfruktosilasyon aktivitesi için Michealis Katsayısı (K_M) değerleri sırasıyla 322.5 mM ve 1556.4 mM olarak bulunmuştur.

Goldman et al. (2008) tarafından yapılan çalışmada *Zymomonas mobilis* levansukrazın transfruktosilasyon aktivitesi için K_M değeri 36 mM olarak belirlenmiş ve enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık 46.7 kDa olarak bulunmuştur. Enzimin ürettiği FOS'lar ise ince tabaka kromatografisi ve yüksek performans iyon değişim kromatografisi ile kestoz ve nistoz olarak belirlenmiştir.

Erwinia amylovora levansukrazın 37 °C optimum sıcaklıkta maksimum transfruktosilasyon aktivitesi 856 μ mol/dak.mg olarak ölçülmüş, toplam aktivitesi için K_M değeri 33.6 mM olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda enzimin toplam aktivitesi reaksiyon boyunca açığa çıkan glukoz miktarı, transfruktosilasyon aktivitesi ise serbest glukoz ve serbest fruktoz miktarları arasındaki fark ölçülerek bulunmuştur (Caputi et al., 2013).

Çizelge 2.3 Levansukraz enziminin saflaştırma ve karakterizasyon stratejisi

| Saflaştırma ve Karakterizasyon Stratejisi | Saflaştırılan Enzimin Özellikleri | Referans |
|---|--|---------------------------------|
| Hücre dışı <i>Bacillus licheniformis</i> RN-01 Levansukraz Santrifügasyon, İyon Değişim Kromatografisi, Amonyum Sülfat Presipitasyonu, Diyaliz, İyon Değişim Kromatografisi, SDS-Page | Opt. Sıcaklık: 50 °C Opt pH: 6.0, Molekül ağırlığı: 52 kDa | (Nakapong et al., 2013) |
| Hücre içi <i>Geobacillus stearothermophilus</i> Rekombinant Levansukraz Ultrasonikasyon, Diyaliz, Amonyum Sülfat Presipitasyonu, Jel Filtrasyon Kromatografisi, İyon Değişim Kromatografisi, | Opt. Sıcaklık: 57 °C Opt. pH: 6.75 K_m^a : 269 (\pm 9.7) mM, V_{max} : 58.48 (\pm 4.92) μ mol/mg | (Inthanovong et al., 2013) |
| Hücre içi <i>Bacillus subtilis</i> Rekombinant Levansukraz Sonikasyon, İyon Değişim Kromatografisi, Yüksek Performans İyon Değişim Kromatografisi (HPAEC) | K_m^a : 222 mM K_{cat}^a : 40.2 s ⁻¹ | (Beine et al., 2008) |
| Hücre içi ve Hücre dışı <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Levansukraz Santrifügasyon, Ultrasonikasyon, Ultrafiltrasyon, SDS-Page | Hücre içi Levansukraz Opt. Sıcaklık: 25 °C ve 30 °C K_m^a =322.5 V_{max} =31.5 Hücre dışı Levansukraz Opt. Sıcaklık: 40 °C K_m^a = 1556.4 V_{max} =11.3 (\pm 1.2) | (Tian et al., 2011) |
| Hücre dışı <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Rekombinant Levansukraz Santrifügasyon, Etanol Presipitasyonu, Evaporasyon, Diyaliz, Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC), Ultrafiltrasyon, SDS-page | Opt. Sıcaklık: 30 °C pH:5.2 Moleküler ağırlık: 63.5 kDa, K_m^b :11.9mM | (Martinez-Fleites et al., 2005) |
| Hücre içi <i>Erwinia amylovora</i> Rekombinant Levansukraz Santrifügasyon, Sonikasyon, Afinite kromatografisi | Moleküler ağırlık: 46.5 kDa K_m^c : 33.6 mM | (Caputi et al., 2013) |
| Hücre içi <i>Zymomonas mobilis</i> Rekombinant Levansukraz Santrifügasyon, Hücre Presleme (Fransız Pres), Santrifügasyon, Mangan Klorür Presipitasyonu, Santrifügasyon, Jel Filtrasyon Kromatografisi, SDS-Page | Opt. pH: 5.0 Moleküler ağırlık: 46.7 kDa K_m^a : 36 mM | (Goldman et al., 2008) |

a:Fruktosilasyon reaksiyon aktivitesi **b:** Hidroliz reaksiyon aktivitesi **c:** Toplam aktivite

2.5 Cevap Yüzey Yöntemi

Optimizasyon prosesler için olası çözümler arasından etkili ve sistematik bir şekilde en iyi çözümün bulunması olarak tanımlanmaktadır ve optimizasyon işlemi belirlenen hedefleri maksimize veya minimize etmek için uygun koşulların bulunmasıdır. Cevap Yüzey Yöntemi optimizasyon için yaygın olarak kullanılan istatistiksel bir metottur (Banga et al., 2003).

Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology, CYY), ilk olarak Box ve Wilson tarafından endüstriyel süreçlerin iyileştirilmesi ve optimizasyonu için geliştirilmiş ve “Denemelerin Optimum Koşullara Ulaşması” olarak tanımlanmıştır (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2009). Ayrıca Cevap Yüzey Yöntemi, Myers and Montgomery (1995), tarafından proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntem olarak tanımlanmıştır.

CYY ile deneysel olarak elde edilen veriler, en yüksek verimin elde edilmesi için en iyi proses koşullarının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Myers et al, 2009). CYY genel olarak 3 aşamalı bir işlemdir. İlk olarak eleme denemelerinde bir takım ön denemeler yapılarak sistemin cevabı üzerine etkili olabilecek faktörler arasından istatistiksel olarak en önemli olanlar seçilmektedir. Böylece eleme denemeleri, daha az sayıda ve daha verimli esas denemelerin yapılmasına yardımcı olmaktadır (Eren, 2004; Koç ve Kaymak-Ertekin, 2009). İkinci aşama bölge araştırması olarak tanımlanmaktadır. Eleme denemelerinde istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenen bağımsız değişkenlerin sistemin yanıtında oluşturduğu değerlerin, optimum noktaya yakın sonuçlar verip vermediği incelenmektedir. Son aşama ise ürün veya işlem optimizasyonunu içermektedir. Bölge araştırması sonrasında elde edilen sistem yanıtı optimum nokta etrafında bir eğrilik gösterir ve bu eğriliğin tahminlenmesinde lineer olmayan modeller, çoğunlukla ikinci dereceden polinomiyal modeller, üssel modeller veya ekponensiyel modeller kullanılmaktadır. Uygun bir modelin elde edilmesi ile sistem için optimum nokta belirlenmektedir (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2009).

Cevap ve bağımsız değişkenler arasındaki fonksiyonun matematiksel ifadesi bilinmediği için modelin oluşturulmasında bu fonksiyonun tahminlenmesi gerekmektedir. Sistem cevabı, bağımsız değişkenin lineer fonksiyonu olarak iyi bir uyum gösteriyor ise birinci dereceden polinomiyal denklemin model olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Genellikle birinci dereceden polinomiyal modeller cevap yüzeyinin eğriliğinin tahminlemesinde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle matematiksel olarak optimum noktanın belirlenmesinde yaygın olarak ikinci dereceden polinomiyal modeller kullanılmaktadır. İkinci dereceden polinomiyal modeller ile sistem yüzeyinin eğriliği kolayca belirlenmektedir. Ayrıca optimizasyon çalışmalarında ikinci dereceden polinomiyal modelin sadece bir tane bölgesel minimum yada bölgesel maksimum noktaya sahip olması kolay bir yaklaşım sağlamaktadır. Sistem cevabının eğiliminin ikinci dereceden bir modele uygun olmadığı durumlarda ise sistem cevabının veya bağımsız değişkenlerin transformasyonu yapılarak ya da bağımsız değişkenlerin aralıkları uygun bir şekilde değiştirilerek cevabın eğiliminin bu model ile açıklanması sağlanmalıdır (Baş ve ark., 2007).

Sistem için uygun model belirlendikten sonra denklemin model ile ilişkisi ve denklem kullanılarak yapılan model doğruluğunun araştırılması gerekmektedir (İkiz ve ark., 2000). Bu amaçla regresyon katsayısı (R^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısının hesaplanması ($adj R^2$), tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamının hesaplanması, yeterli tahminleme değerinin hesaplanması, model uygunsuzluğunun tespit edilmesi (Lack of fit testi) gibi farklı test yöntemleri uygulanmaktadır (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2009).

Model uygunsuzluğu (Lack of fit) modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hata olarak tanımlanmaktadır ve ideal olarak modelin matematiksel formunun uygunsuzluğunun (lack of fit) istatistiksel açıdan önemsiz ve regresyon modeli açısından önemli olması gerektiği belirtilmiştir (Myers and Montgomery, 1995; Castillo, 2007; Box and Draper, 2007).

Genellikle proseslerin optimizasyonunda sistemin performansını ya da işlem sonrasında elde edilen ürünün kalite kriterlerini belirleyen birçok yanıt detaylı

olarak araştırılır. Optimizasyon için sistem yanıtlarından bazılarının maksimum bazılarının minimum seviyede tutulması, ya da kabul edilebilir değerler veya hedef değer alması istenir. Bu amaçla yanıtların izohips eğrileri çizilerek üst üste yerleştirilir ve bir izohips eğrisi, bir bağımsız değişken merkezdeyken, diğer iki değişkenin verdiği kombinasyonlar incelenir. Çizilen izohips eğrilerinin dairesel, eliptik ya da eğer şeklinde olması; maksimum nokta, minimum nokta, (eyer noktası (saddle point)) durgun tepe ya da yükselen/azalan tepe koşullarını ifade etmektedir. Cevap yüzeyinin dairesel olması, değişkenler arasındaki etkileşimin ihmal edilebilir olduğunu, elips ya da eyer şeklindeki yüzeyler ise iç etkileşimin önemli olduğunu göstermektedir. En küçük elips ya da dairesel şekil ile sınırlandırılmış yüzeyin öngörülen en yüksek veya en düşük yanıtı belirttiği ifade edilmektedir. Cevap Yüzey Yöntemi proseslerin optimizasyonu için kullanılabileceği gibi, birçok optimizasyon çalışmasında değişkenlerin ayrı ayrı ve birbirleriyle etkileşimlerinin yanıtlar üzerine etkilerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2009).

2.5.1 Cevap yüzey yönteminin kullanıldığı çalışmalar

Cevap Yüzey Yöntemini kullanarak fermantasyonu etkileyen parametreler arasındaki ilişki veya ortam kompozisyonunu oluşturan besiyeri bileşenlerinin optimizasyonu sağlanabilir. Levansukraz üretimi üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen matematiksel yöntemlerle üretiminin optimize edildiği az sayıda çalışma bulunmaktadır (Gonçalves et al., 2013).

Bacillus subtilis natto CCT7712 ile substrat konsantrasyonu, pH ve karıştırma hızının enzim üretimi ve levan oluşumuna etkisi incelenmiş ve bu parametrelerin optimizasyonu Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 300 g/L sakkaroz içeren üretim ortamında (pH 7.5), 160 rpm karıştırma hızında en yüksek levansukraz aktivitesi (8.53 U/ml) ve levan üretimi elde edilmiştir. Ayrıca, *Bacillus subtilis* natto CCT7712 levansukraz enziminin 50 °C'de 10 gün boyunca stabilitesini koruduğu ve aktif olduğu belirlenmiş, birçok endüstriyel uygulama için kullanılabilir olduğu belirtilmiştir (Gonçalves et al., 2013).

Esawy et al. (2013) tarafından levansukrazın katı kültür fermantasyon ile üretildiği bir çalışmada Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak ortam kompozisyonunu oluşturan farklı karbon kaynakları (bakla, buğday kepeği, pirinç, nişasta ve mısır unu) enzim aktivitesi için optimize edilmiştir. Sakkaroz içeren fermantasyon ortamında maksimum enzim aktivitesi 170 U/g olarak belirlenmiştir.

Şılbır ve ark. (2014) tarafından *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 ile gerçekleştirilen çalışmada kesikli sistemde levansukraz enzimi tarafından üretilen levan üretiminin optimizasyonu için Cevap Yüzey Yöntemi kullanılmış ve maksimum levan konsantrasyonu olan 40.2 g/L levana 299.1 g/L başlangıç sakkaroz konsantrasyonu, 42.3 saat inkübasyon süresi ve başlangıç pH değeri 6.0 ile ulaşıldığı bildirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizma

Levansukraz üretimi için Agricultural Research Service Culture Collection (Peoria, USA)'dan temin edilen *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 kullanılmıştır. Mikroorganizma, stok besiyeri ortamında (Yeast Pepton Broth) +4 °C'de saklanmış ve her hafta taze stok besiyerine ekim yapılarak kültür yenilenmiştir. Taze stok besiyerine ekilen mikroorganizma 24 saat karıştırma ya da havalandırma yapılmaksızın 28 °C'de inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrası +4 °C'de muhafaza edilmiştir. *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 için stok besiyerinin bileşimi Çizelge 3.1'de verilmiştir. Tüm inkübasyonlar Nüve EN 400 inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1 Stok besiyerinin bileşimi.

| Bileşen | Konsantrasyon (g/L) |
|----------------|---------------------|
| Glukoz | 20 |
| Bacto Peptone | 10 |
| Maya Ekstraktı | 10 |

3.1.2 Üretim ortamı

Levansukraz üretimi için sakkaroz içeren sentetik besiyeri kullanılmıştır. Kullanılan aşı ortamı ve üretim ortamının bileşenleri aynı, fakat bileşenlerinin konsantrasyonları farklıdır. Levansukraz üretiminde sakkaroz konsantrasyonu oldukça önemlidir (Crittenden and Doelle, 1994; Bekers et al., 2003; Borsari et al., 2006; Belghith et al., 2012). Üretim ortamı için kullanılan besiyeri karbon kaynağı olarak yüksek konsantrasyonda (%15) sakkaroz içermektedir. Aşı ortamında ise mikroorganizmanın çoğalmasını desteklemek amacıyla sakkaroz

konsantrasyonu daha düşük, organik azot kaynağı olarak kullanılan maya ekstraktı konsantrasyonu ise daha yüksektir (Bekers et al., 2001).

Her üretimden önce stok besiyerinden aşı ortamına %5 (v/v) oranında inokulasyon yapılmış ve aşı ortamı karıştırma ya da havalandırma yapılmadan 24 saat boyunca 28 °C’de inkübe edilerek mikroorganizma çoğaltılmıştır. Aşı ortamı ve üretim ortamları (HIRAYAMA HG-50 otoklavda) 121 °C’de 15 dakika steril edilmiştir. Aşı ortamı ve üretim ortamının bileşenleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. Üretim ortamının pH’sı 1 M HCl ile 5.0’a ayarlanmıştır, stok besiyeri için ise pH ayarlaması yapılmamıştır. Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Çizelge 3.2 Aşı ve üretim ortamlarının bileşimi

| Bileşen | Aşı ortamı (g/L) | Üretim ortamı (g/L) |
|---|------------------|---------------------|
| Sakkaroz | 50 | 150 |
| Maya Ekstraktı | 7.0 | 2.5 |
| KH ₂ PO ₄ | 2.5 | 2.0 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.6 | 2.0 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1.0 | 1.0 |

3.2 Yöntemler

Bu tez çalışmasında bahsi geçen üretimler ve analizler, 2 paralel ve 2 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 Statik kültür ile levansukraz üretimi

Çalışmanın ilk aşamasında *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 suşu kullanılarak statik kültür ile levansukraz üretimi gerçekleştirilmiştir. Başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve fermantasyon süresi gibi önemli proses parametrelerinin levansukraz üretiminde etkilerinin belirlenmesi ve ikinci aşamada yapılacak olan optimizasyon çalışması için önemli olduğu belirlenen parametrelerin sınır koşullarının belirlenmesi amacıyla ön denemeler gerçekleştirilmiştir.

Levansukraz üretimi ilk olarak sıcaklık kontrollü inkübatörde çalkalama yapılmaksızın içerisinde 50 ml üretim ortamı bulunan 250 ml' lik erlenlerde statik kültür olarak gerçekleştirilmiştir. Üretim öncesinde stok kültür ortamından taze kültür ortamına ekilen mikroorganizma 24 saat karıştırma ya da havalandırma yapılmaksızın 28 °C'de inkübasyona bırakılarak gelişmesi sağlanmıştır. Kültür ortamında geliştirilen mikroorganizma, fermantasyon başlangıcında aseptik koşullarda %5 (v/v) oranında, hazırlanan üretim ortamlarına inokule edilmiştir.

Fermantasyon süresinin levansukraz üretimine etkisini belirlemek için 150 g/L sakkaroz içeren üretim ortamları (pH 5.0) hazırlanmış ve 30 °C sıcaklıkta enzim üretimi başlatılmıştır. Fermantasyon süresince 12 saat aralıklarla örnek alınarak hücre yoğunluğu (OD), biyokütle miktarı, enzim aktivitesi, protein miktarı ve kalan şeker miktarı belirlenmiştir. Bu analizler sonrasında levansukraz üretim kinetiği çıkartılarak enzim aktivitesinin en yüksek olduğu fermantasyon süresi belirlenmiştir.

Sıcaklığın enzim üretimine etkisini belirlemek amacıyla diğer proses parametleri sabit tutularak 28, 30, 32, 34 ve 36 °C gibi farklı sıcaklık değerlerinde enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Farklı sıcaklık değerlerinde gerçekleştirilen üretim sonrasında levansukraz aktivitesinin en yüksek olduğu üretim sıcaklığı belirlenmiştir.

Diğer bir proses parametresi olan başlangıç substrat konsantrasyonunun levansukraz üretimine etkisini belirlemek amacıyla 50-300 g/L arasında sakkaroz içeren üretim ortamlarında enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu başlangıç substrat konsantrasyonu belirlenmiştir.

Son olarak 4.5-6.0 arasında değişen pH değerlerindeki üretim ortamlarında enzim üretimi gerçekleştirilerek pH'nın enzim üretimine etkisi incelenmiştir ve levansukraz aktivitesinin en yüksek olduğu pH değeri belirlenmiştir. Çizelge 3.3'te levansukraz üretimine etkisi incelenen parametreler ve bu parametrelerin değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.3 Levansukraz üretimine etkisi incelenen parametreler ve parametrelerin değerleri

| Parametreler | Değerler |
|---|-----------------------------|
| Fermantasyon süresi (saat) | 12, 24, 36, 38, 60 |
| Sıcaklık (°C) | 28, 30, 32, 34, 36 |
| Başlangıç Substrat Konsantrasyonu (g/L) | 50, 100, 150, 200, 250, 300 |
| pH | 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 |

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, levansukraz üretimine etki eden parametrelerden başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık ve pH değişkenlerinin levansukraz üretimine olan lineer, kuadratik ve interaksiyon etkileri Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanılarak incelenmiş ve bu parametrelerin maksimum levansukraz aktivitesini sağlayacak optimum seviyeleri belirlenmiştir. Bu amaçla MINITAB Release 13.20 istatistik paket programı kullanılarak deneme planı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen deneysel veriler kullanılarak matematiksel bir model oluşturulmuş ve elde edilen bu model yardımıyla proses için optimum koşullar belirlenmiştir.

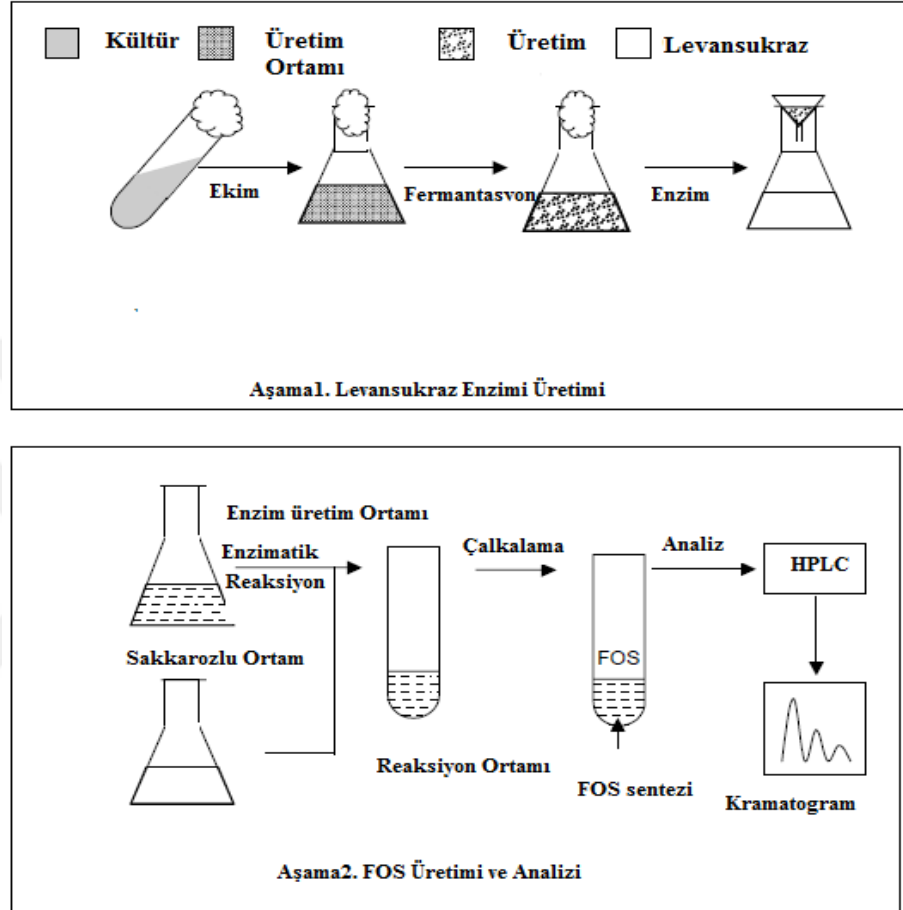
3.2.2 Üretilen levansukrazın izolasyonu

Zymomonas mobilis ile üretilen levansukraz hücre dışı bir enzimdir (Bekers et al., 2002) ve besiyerinden izolasyonu için fermantasyon sonrasında alınan üretim ortamları 4°C'de 6500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek biyokütle ayrımı sağlanmıştır.

3.2.3 Fruktooligosakkarit (FOS) üretimi

Zymomonas mobilis levansukraz ile FOS üretimi Kurban (2013) tarafından belirlenen optimum koşullar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. FOS üretiminin prensibi; öncelikle *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 suşu ile levansukraz enziminin üretilmesi ve üretilen bu enzim kullanılarak FOS üretiminin gerçekleştirilmesidir. 150 g/L sakkaroz içeren pH 5.0 üretim ortamında 30 °C'de levansukraz enzimi üretilmiş ve fermantasyon sonrasında biyokütle santrifügasyon ile ayrılmıştır. Hücre dışı enzimi içeren ortam sakkaroz içeriği

artırılarak FOS üretimi için kullanılmıştır. FOS üretimi Gerhard Thermoshake marka çalkalamalı inkübatörde 100 rpm karıştırma hızında %60 (v/v) başlangıç sakkaroz konsantrasyonunda 24 saat boyunca 45 °C’de gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1’de FOS üretiminin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 3.1 FOS üretim basamakları (Sangeetha et al., 2005)

3.3 Analiz Yöntemleri

3.3.1 Biyokütle miktarı

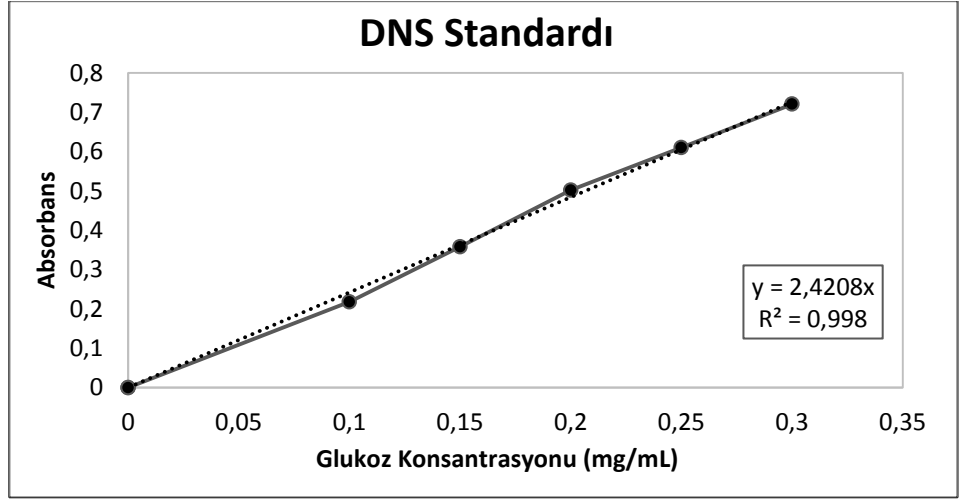
Santrifüjasyon ile üstfaz ve biyokütle ayrımı yapıldıktan sonra örnekteki biyokütle miktarının belirlenmesi amacıyla oluşan biyokütle distile suda çözülüp 50 °C’de kurutularak biyokütle miktarı g/L cinsinden hesaplanmıştır.

3.3.2 Hücre yoğunluğu (OD)

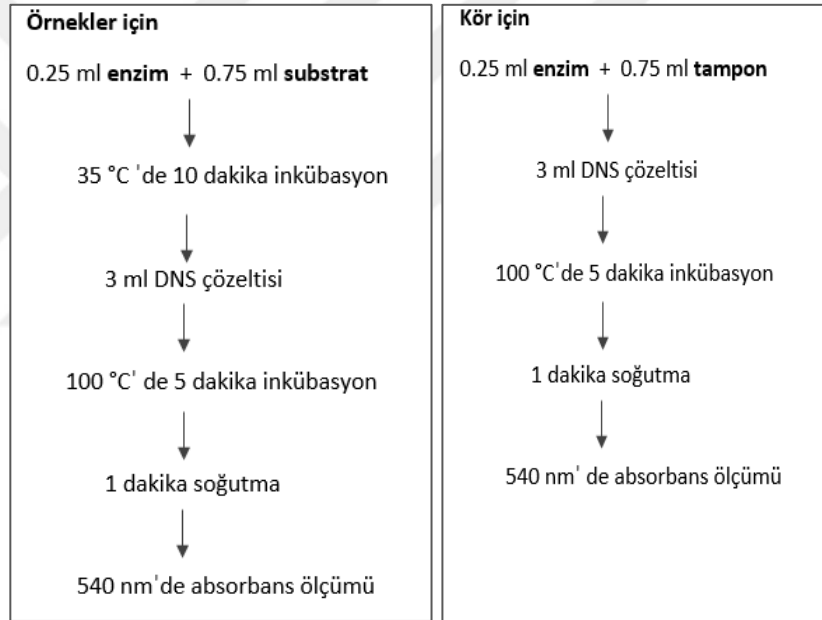
Fermantasyon ortamındaki hücrelerin yoğunluğunu kontrol etmek amacıyla fermantasyon sonrasında 1.5 ml alınan örnek santrifügasyon yapılmaksızın Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda optik yoğunluk değeri (OD) belirlenmiştir.

3.3.3 Levansukraz enzim aktivite tayini

Levansukraz enzim aktivitesinde Ghose (1984)'un indirgen şeker tayini için önerdiği DNS (di-nitro salisilik asit) yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Levansukraz aktivite tayininde esas; substrat olarak sakkarozun kullanılmasıyla enzimatik hidroliz sonucunda açığa çıkan indirgen şeker miktarının DNS yöntemi ile belirlenmesine dayanmaktadır. Levansukraz aktivitesinin bir ünitesi, standart şartlar altında dakikada 1 μ mol indirgen şekeri açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Yanase et al., 1992; Goldman et al., 2008). DNS yönteminin esası ise indirgen şekerlerdeki serbest karbonil gruplarının (C=O) varlığını tespit etmektir. Bununla birlikte glukozdaki aldehit grubu ile fruktozun fonksiyonel keton gruplarının oksidasyonunu ve 3,5-dinitrosalisilik asitin 3-amino-5-nitrosalisilik asite indirgenmesini içermektedir. Reaksiyonda ortamdaki şekerler 3,5-dinitrosalisilik asit ile reaksiyona girerek 3-amino,5-nitrosalisilik asit oluşturmaktadır ve oluşan nitroaminsalisilik asit konsantrasyonu 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (Kat ve Yılmaz-Keskin, 2013). Standart denklem için artan konsantrasyonlarda saf glukoz içeren standart çözeltilerin absorbans değerleri Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okunmuş ve elde edilen değerlere lineer regresyon uygulanarak birinci dereceden doğrusal bir denklem elde edilmiştir (Şekil 3.2). Standart grafik glukoz ile çizilerek analiz edilecek örnekler 0.4 – 0.7 arasında absorbans verecek şekilde seyreltilerek DNS yöntemine göre standart denklem üzerinden glukoz konsantrasyonları hesaplanmıştır. Şekil 3.3'te aktivite tayini basamakları verilmiştir.



Şekil 3.2 İndirgen şeker tayini için kullanılan DNS standart grafiği



Şekil 3.3 DNS yöntemi ile levansukraz aktivite tayini basamakları

Şekil 3.3'de verilen enzimatik reaksiyon için substrat olarak 0.5 M sakkaroz çözeltisi ve tampon olarak 22 mM pH 5.4 sitrat-fosfat tamponu kullanılmıştır.

Enzim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

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

A: Ortalama örnek absorbansı – kör absorbansı

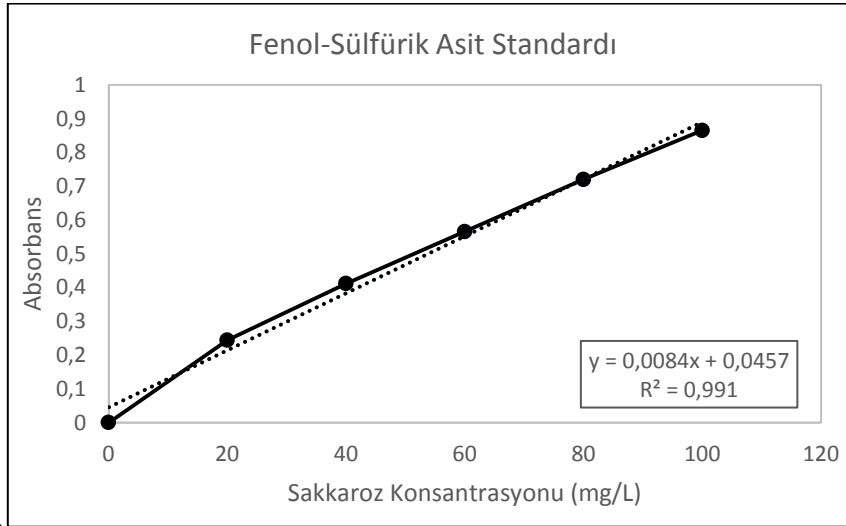
c: standart denklemden gelen katsayı

t: inkübasyon süresi (10 dakika)

D: enzim seyreltme oranı

3.3.4 Toplam şeker tayini

Levansukrazın fermantasyon ortamından izolasyonu sonrasında elde edilen üst faz, içerdiği toplam şeker miktarının belirlenmesi için fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir (DuBois et al., 1956). Uygun oranda seyreltilen 1 ml üst faza 1ml %5'lik fenol çözeltisi ve 5 ml H₂SO₄ ilave edilerek fermantasyon sonrası toplam şeker miktarı belirlenmiştir. Okumalar 490 nm dalga boyunda Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS spektrofotometrede yapılmıştır. Standart denklem için artan konsantrasyonlarda saf sakkaroz çözeltileri kullanılmıştır (Şekil 3.4).



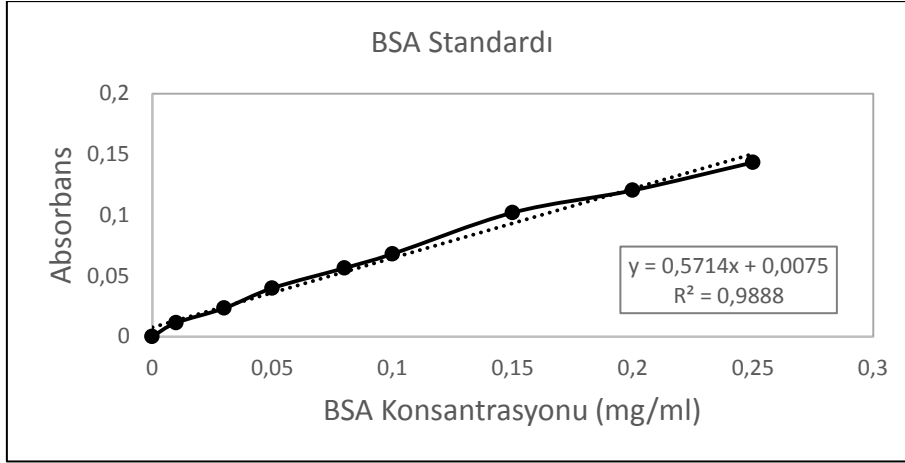
Şekil 3.4 Toplam şeker ve kalan şeker tayini için kullanılan fenol-sülfürik asit standart grafiği

3.3.5 Protein tayini

Fermantasyon sonrası üst fazların içerdiği protein miktarı Bradford yöntemi (Bradford, 1976) ile gerçekleştirilmiştir. Boya bağlama temeli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı yöntemdir. Bradford yönteminin esası, organik boyaların asidik grupları ile proteinlerin bazik gruplarının (Lys, Arg) etkileşerek renk oluşturması ve oluşan rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Sığır serum albüminin (BSA), distile suda hazırlanmış 0.2 mg/ml 'lik stok standart çözeltisinden 0,05-0.25 mg/ml konsantrasyon aralığı ile hazırlanan standart grafik kullanılarak örnek protein konsantrasyonları hesaplanmıştır. Şekil 3.5'te BSA standart grafiği verilmiştir.

Bradford reaktifi için 100 mg Coomassie Brilliant Blue (G-250 Sigma Aldrich) %95'lik 50 ml etanolde çözülmüştür. Üzerine 100 ml %85'lik fosforik asit ilave edilerek son hacim distile su ile 1 L' ye tamamlanmış ve filtre edilerek +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Absorbans okumaları için hazırlanan boya çözeltisi 1:4 oranında seyreltilerek kullanılmaktadır. 200 µl seyreltilmiş boya çözeltisi üzerine 4 µl örnek ilave edilerek Thermo Scientific Multiscan Go sistemde 96 kuyulu plakalarda 595 nm dalga boyunda okuma yapılmış ve standart eğri yardımıyla protein miktarı saptanmıştır.

Diyaliz sonrası örneğin protein konsantrasyonu ise Layne ve ark. (1957), tarafından belirtildiği gibi 280 nm'de ölçülen absorbans değerinin ekstinksiyon katsayısı (levansukraz için $\epsilon=2.262 \text{ (mg/ml).cm}^{-1}$) ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır. Ekte örneklerin 280 nm'de spektrumları verilmiştir.



Şekil 3.5 Protein tayini için kullanılan BSA standart grafiği

3.3.6 Deneysel tasarım ve istatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizinde Minitab Statistical Software (Release 13.20) kullanılmıştır. Levansukraz üretiminin optimizasyonu için deneysel tasarımda kullanılan parametreler (bağımsız değişkenler) ve bu parametrelerin seviyeleri ön denemeler sonucunda tespit edilmiştir. Seçilen parametrelerin seviyeleri Çizelge 3.4'te verilmiştir. Optimizasyon çalışmasında, 20 deneysel noktadan (14 farklı kombinasyona sahip ve merkezde 6 tekrarlı) oluşan ve 3 değişken ile oluşturulan yüzey merkezli istatistiksel tasarım (face centered statistical design, $\alpha=1$) kullanılmıştır. Her deneme 2 paralel yapılmıştır ve denemelerin standart sapması 0.02 ile 0.38 arasında değişmektedir. Seviyeler, 0 merkez noktası olmak üzere -1, 0 ve +1'den oluşmaktadır. Her faktörün merkez noktasındaki gerçek seviyesi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Kodlanmış değer} = \frac{\text{Gerçek seviye} - (\text{Yüksek seviye} + \text{Düşük seviye})/2}{(\text{Yüksek seviye} - \text{Düşük seviye})/2}$$

Proses değişkenlerinin levansukraz aktivitesine etkisini tahminleyen ikinci derece polinomial denklem aşağıda verilmiştir. Burada, $\beta_0, \beta_1, \beta_2 \dots \beta_{23}$ regresyon katsayılarını, X_1, X_2 ve X_3 ise bağımsız değişkenleri ifade etmektedir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Oluşturulan bu modelin deneysel verileri ne ölçüde karşıladığı varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Bu yöntem ile her bir faktörün lineer, quadratik ve interaksiyon etkilerinin cevaplar üzerindeki istatistiksel önemlilikleri %95 güvenlik seviyesinde Fischer (F testi) uygulanarak bulunmuştur. Her bir etki için hesaplanan F_{cal} ile tablo F_{tab} değerleri karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak önemli olmayan etkiler modelden çıkarılmıştır. Bir model sistemin gerçek cevaba uygun bir yaklaşım olup olmadığına uyum eksikliğinden (lack of fit) kaynaklanan hatanın önemsiz olması ve regresyondan kaynaklanan varyasyonun %95 güvenlik seviyesinde önemli olması koşulu ile karar verilmiştir.

Çizelge 3.4 Cevap Yüzey Yönteminde incelenen parametreler ve seviyeleri

| Faktörler | Bağımsız Değişkenler | Değişken Seviyeleri | | |
|-----------|---|---------------------|-----|-----|
| | | -1 | 0 | +1 |
| X_1 | Sıcaklık (° C) | 28 | 30 | 32 |
| X_2 | Başlangıç Sakkaroz Konsantrasyonu (g/L) | 100 | 150 | 200 |
| X_3 | pH | 4.5 | 5.0 | 5.5 |

3.3.7 Levansukraz enziminin saflaştırılması

Cevap Yüzey Yöntemi ile fermantasyon koşullarının optimizasyonu sonrasında, optimum koşullarda üretilen levansukraz kısmi olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırmada ilk olarak $(NH_4)_2SO_4$ (amonyum sülfat) çöktürmesi yapılarak elde edilen çökelti yarı geçirgen membran yardımıyla diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrasında elde edilen örneğin aktivitesi ölçülmüş ve SDS-PAGE ile saflığı kontrol edilmiştir.

Ayrıca optimum koşullarda üretilen enzimin protein miktarını konsantre etmek amacıyla üretim sonrası elde edilen ham ekstrakt - 40 °C’de dondurularak liyofilize edilmiştir. Liyofilize örnek 22 mM pH 5.4 sitrat-fosfat tamponunda çözülerek aktivitesi ölçülmüş ve moleküler boyutu SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir.

3.3.7.1 (NH₄)₂SO₄ (amonyum sülfat) çöktürmesi

Enzim saflaştırmanın ilk basamaklarında daha çok örneği deriştirmeye yönelik teknikler kullanılmaktadır. Enzim saflaştırmada en çok kullanılan tekniklerden biri, yüksek tuz konsantrasyonlarında istenilen örneğin çöktürülmesidir. Genellikle proteinlerin su içerisindeki çözünürlükleri oldukça düşüktür ve ortama NaCl veya (NH₄)₂SO₄ gibi nötral tuzların ilavesi proteinlerin yüzeyinde bulunan hidrofilik grupların su ile etkileşim derecesini arttırmaktadır. (Metin ve ark., 2007).

Fermantasyon sonrasında santrifügasyon ile elde edilen üst faz amonyum sülfat çöktürme denemesi için kullanılmıştır ve %80 doygunlukta amonyum sülfat manyetik karıştırıcıda 2 saat düşük karıştırma hızında azar azar ilave edilmiştir ve amonyum sülfat ilavesi sonrasında örnek karıştırma yapılmaksızın +4 °C’de gece boyu bekletilmiştir. Belirtilen koşullarda inkübasyon sonrasında +4 °C’de 15.000xg’de 30 dakika santrifüjlenerek üst faz ve pellet birbirinden ayrılmıştır. Oluşan pellet 22 mM pH 5.4 sitrat-fosfat tamponunda çözülerek diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminden sonra elde edilen örneğin aktivite ve protein miktarı belirlenmiş ve SDS-PAGE ile örneğin saflığı kontrol edilmiştir.

3.3.7.2 Diyaliz

Diyaliz işlemi, iyonik ve iyonik olmayan tüm küçük molekülleri uzaklaştırmak için basit ve etkin bir yöntemdir. Bu yöntem genellikle çözeltilerdeki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdan uzaklaştırmakta kullanılmaktadır. Ayrıca biyolojik moleküllere zayıf bir şekilde bağlı olan küçük iyonları ve molekülleri de bu yöntem ile ortamdan uzaklaştırmak mümkündür (Metin ve ark., 2007). Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen pellet 22 mM pH 5.4 sitrat-fosfat tamponunda çözülerek yarı geçirgen bir membranda (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da, 25 mm x 16mm) 22 mM sitrat-fosfat 5.4 + 50 mM NaCl tampona karşı gece boyu diyaliz edilmiştir.

3.3.7.3 Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve moleküler kütle tayini

SDS-PAGE, poliakrilamid jel elektroforezinin yaygın olarak uygulanan çeşidi olup, protein karışımlarının özelliklerini belirlemek için kullanılmaktadır. Protein saflık kontrolünde ve proteinin molekül boyutuna göre bir ayırım yapması nedeni ile bağıl molekül kütlesi tayininde de kullanılmaktadır. Saflaştırılan levansukraz enziminin saflığını kontrol etmek ve moleküler külesini belirlemek amacıyla Cleaver Scientific elektroforez ünitesinde SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Poliakrilamid jel elektroforezi Laemmli (1970), tarafından geliştirilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Ayırma kapasitesi oldukça iyi olan bu yöntemde proteinler yürütücü jelle girmeden önce düzenleyici jelle elektroforez tamponu ve jel arasındaki pH ve iyonik şiddet yardımıyla dengelenir.

3.3.7.3.1 Örneklerinin hazırlanması ve elektroforeze uygulanması

SDS-PAGE'de ayrılacak tüm örnekler ilk olarak 4X SDS örnek yükleme boyası ile karıştırılarak 100 °C'de 5 dakika kaynatılmıştır. 4X boya içerisindeki merkaptotanol proteinin tersiyer yapısını bir arada tutan disülfid bağlarını indirgemektedir. SDS ise proteini denature etmektedir. Bromofenol mavisi ise iyonize olabilen boyadır ve elektroforezin kolay izlenebilmesi için ortama ilave edilir. Gliserol ise örnek çözeltiye yoğunluk kazandırarak örneğin jelle yerleşmesini sağlamaktadır.

30 µl örnek 10 µl 4X boya ile karıştırılıp 100 °C'de kaynatıldıktan sonra %5'lik jelin her kuyucuğuna 20 µl örnek yüklenmiştir. Anot ve katot rezervuarlarındaki Tris/glisin/SDS tamponu ile elektroforez yürütülmüştür. Proteinlerin elektroforezinde %5'lik jelle 50 V %12'lik jelle ise 120 V akım uygulanmıştır. Kullanılan tamponların içerikleri aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3.5 %5 'lik SDS-PAGE jel içeriği

| % 5'lik Jel | µL |
|-----------------------------|-----------|
| Distile su | 3960 |
| 1.5M Tris, pH 8.9 | 3000 |
| % 10 SDS | 120 |
| % 30 akrilamid-bisakrilamid | 4800 |
| %10 Amonyum persülfat (APS) | 120 |
| TEMED | 4.8 |

Çizelge 3.6 %12 'lik SDS-PAGE jel içeriği

| % 5'lik Jel | µL |
|-----------------------------|-----------|
| Distile su | 3960 |
| 1.5M Tris, pH 8.9 | 3000 |
| % 10 SDS | 120 |
| % 30 akrilamid-bisakrilamid | 4800 |
| %10 Amonyum persülfat (APS) | 120 |
| TEMED | 4.8 |

Çizelge 3.7 4X örnek yükleme boyası içeriği

| 4X Örnek Yükleme Boyası | mL |
|--------------------------------|-----------|
| Distile su | 3.8 |
| 0.5M Tris, pH 6.8 | 1.0 |
| % 10 SDS | 1.6 |
| 100% Gliserol | 0.8 |
| % 1 Bromofenol mavisi | 0.4 |
| Merkaptoetanol (BME) | 0.95 |

Çizelge 3.8 SDS tamponu içeriği

| SDS Tamponu | |
|--------------------|--------|
| Tris baz | 15.1 g |
| Glisin | 72 g |
| % 20 SDS | 25 mL |
| Distile su | 450 mL |

3.3.7.3.2 Protein bantlarının boyanması

Elektroforez sonrasında jellerin boyanmasında Coomassie-Brilliant Blue yöntemi kullanılmıştır. Bu boyama yönteminde ise boyanın asidik pH'da proteinlere bağlanması esastır. Jeller, Coomassie-Brilliant Blue boya çözeltisi ile 1 saat boyunca yavaşça karıştırılarak boyanmıştır.

3.3.7.4 FOS çeşitlerinin belirlenmesi

Z. mobilis levansukraz ile üretilen FOS çeşitleri Agilent 1200 HPLC cihazı ile Bekers et al. (2000), tarafından önerilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Glukoz, fruktoz, sakkaroz standartları için asetonitril:su (85:15) ve FOS standartları için asetonitril:su (70:30) mobil faz ile 1.5 ml/dakika akış hızıyla amin (4.6mm x 250mm) kolonda (30 °C) refraktif indeks dedektör (RID) kullanılarak ölçüm yapılmıştır.

Analitik saflıktaki (Merck Ltd. Almanya) glukoz, fruktoz ve sakkaroz standartları 100.000 ppm stok çözelti olarak hazırlanmıştır ve daha sonra stok çözeltilerden 2000 ppm, 5000 ppm, 10000 ppm'lik seriler hazırlanmış ve 20µl enjeksiyonla bu değerlere karşılık gelen alanlar ve alıkonma zamanları belirlenmiştir.

HPLC saflıktaki 1-kestoz, nistoz ve fruktofuranozilnistoz standartları (Wako Pure Chemicals-Japonya) 200.000 ppm stok çözelti olarak hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden 10.000 ppm, 20.000 ppm ve 40.000 ppm lik seriler oluşturularak 20µl enjeksiyonla bu değerlere karşılık gelen alanlar ve alıkonma zamanları belirlenmiştir.

Levansukraz ile FOS üretimi bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi yapılmıştır. FOS üretim reaksiyonundan alınan örnekler 1/5 kat kromatografik saflıktaki su ile seyreltilerek kolona yüklenmiş ve FOS üretimi sonunda, üstfazda bulunan 1-

kestoz, nistoz ve fruktofuranozilnistoz miktarları ise amin kolonda asetonitril:su (70:30) mobil faz ile 1.5 ml/dakika akış hızıyla 30°C’de tespit edilmiştir. Tüm standartlar ve örnekler 0.45µl gözenekli filtreden geçirilerek cihaza verilmiştir.

3.3.8 Tartım

Tüm tartım işlemleri Shimadzu marka elektronik tartı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.9 pH

pH ayarlamaları ve okumaları, WTW Series pH 720 marka pH-metre ile yapılmıştır. Cihazın kalibrasyonu düzenli aralıklarla pH tampon çözeltileri ile yapılmıştır.

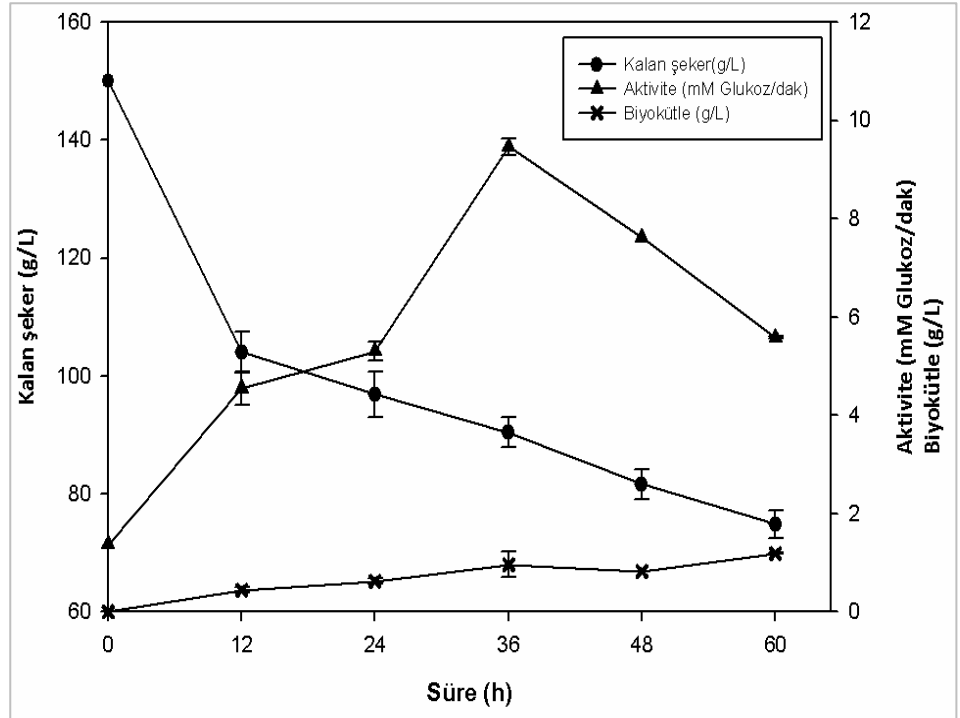
3.3.10 Santrifügasyon

Tüm santrifüj uygulamaları Hettich Universal 320 R santrifügasyon cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

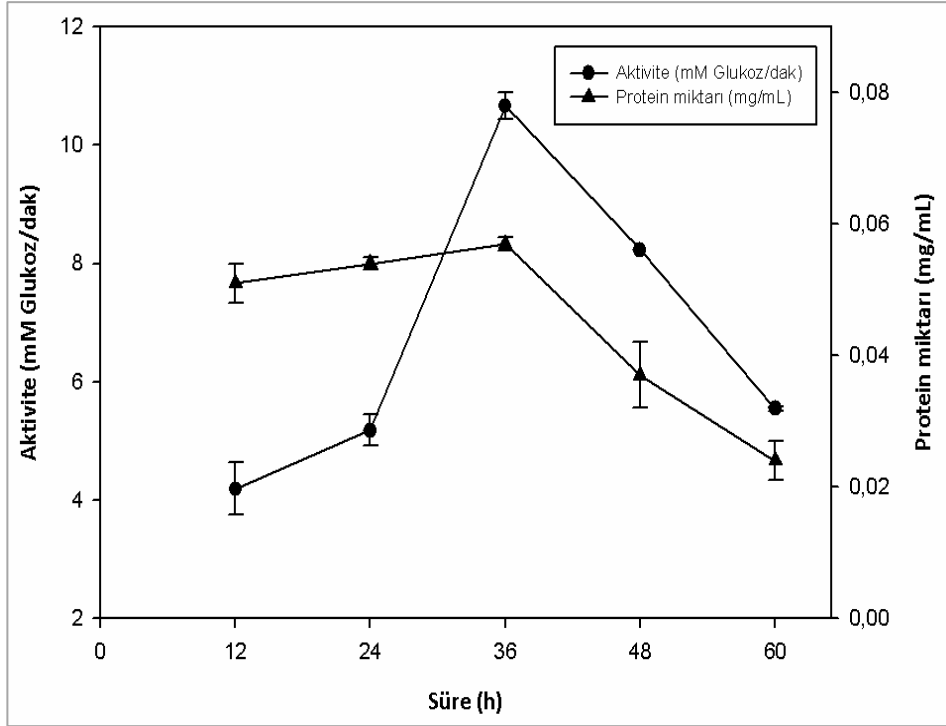
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Levansukraz Enzim Üretimi Kinetiği

Statik kültür ile 150 g/L başlangıç sakkaroz konsantrasyonundaki üretim ortamında (pH 5.0) 30 °C sıcaklıkta *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 hücrelerinin büyüme ve levansukraz üretim kinetiği incelenmiştir. Şekil 4.1’de görüldüğü enzim aktivitesi logaritmik fazın başlangıcında maksimum seviyeye ulaşmıştır. Enzim aktivitesi fermantasyonun başlangıcında daha düşük düzeyde iken, 36. saatte en yüksek değere (10.66 mM glukoz/dak) sahip olmuş ve fermantasyonun 48. saatinden itibaren enzim aktivitesindeki düşüş devam etmiştir. Ortamdaki kalan şeker miktarı beklenildiği gibi azalmış ve başlangıçta 150 g/L sakkaroz içeren üretim ortamında fermantasyon sonunda 74.82 g/L sakkaroz kaldığı belirlenmiştir. Ortam pH’sı fermantasyon boyunca azalmış başlangıçta 5.0 olan pH’nın 60 saatlik fermantasyon sonunda 3.2-3.3’e düştüğü gözlenmiştir. Şekil 4.2’de zamana bağlı aktivite ve protein miktarı değişimi incelendiğinde ise levansukraz aktivitesinin en yüksek olduğu 36. saatte protein miktarı da en yüksektir.



Şekil 4.1 Zamana bağlı aktivite, biyokütle ve kalan şeker miktarı değişimi

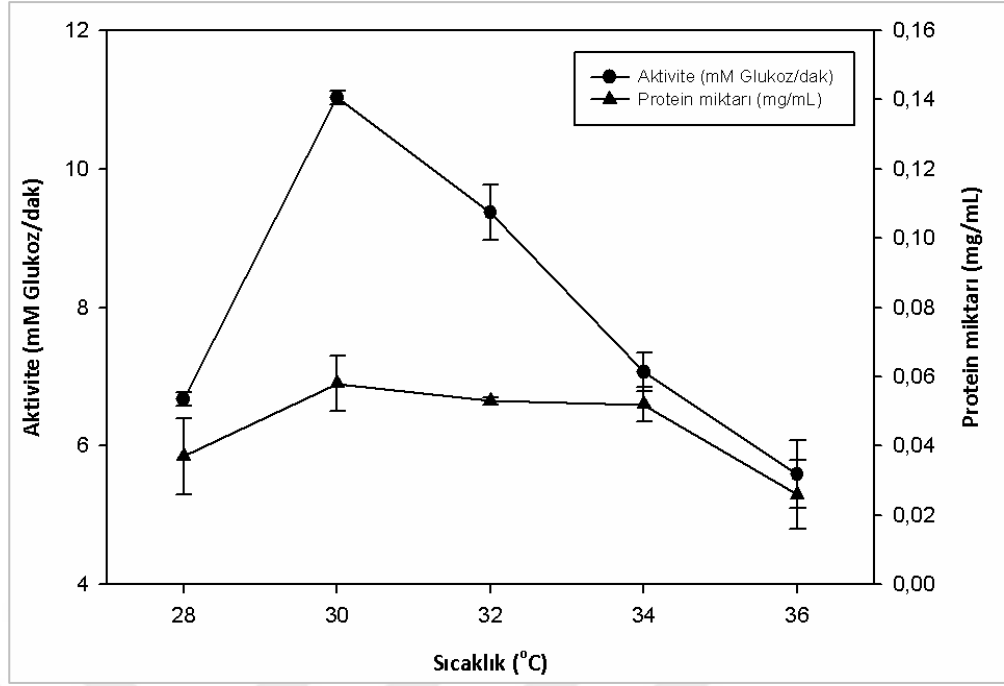


Şekil 4.2 Zamana bağlı aktivite ve protein miktarı değişimi

4.2 Fermantasyon Sıcaklığının Levansukraz Üretimine Etkisi

Zymomonas mobilis ile levansukraz üretiminde fermantasyon sıcaklığının etkisini belirlemek amacıyla 150 g/L başlangıç sakkaroz konsantrasyonunda (pH 5.0) 28, 30, 32, 34, 36 °C gibi farklı sıcaklık değerlerinde enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi 30 °C fermantasyon sıcaklığında en yüksek levansukraz enzim aktivitesi (11.03 mM glukoz/dak) elde edilmiştir. Aynı sıcaklık değerinde protein miktarı da en yüksektir ve fermantasyon sıcaklığının maksimum enzim aktivitesi elde edebilmek için yapılacak optimizasyon çalışmasında göz önünde bulundurulması gereken önemli bir parametre olduğu belirlenmiştir.

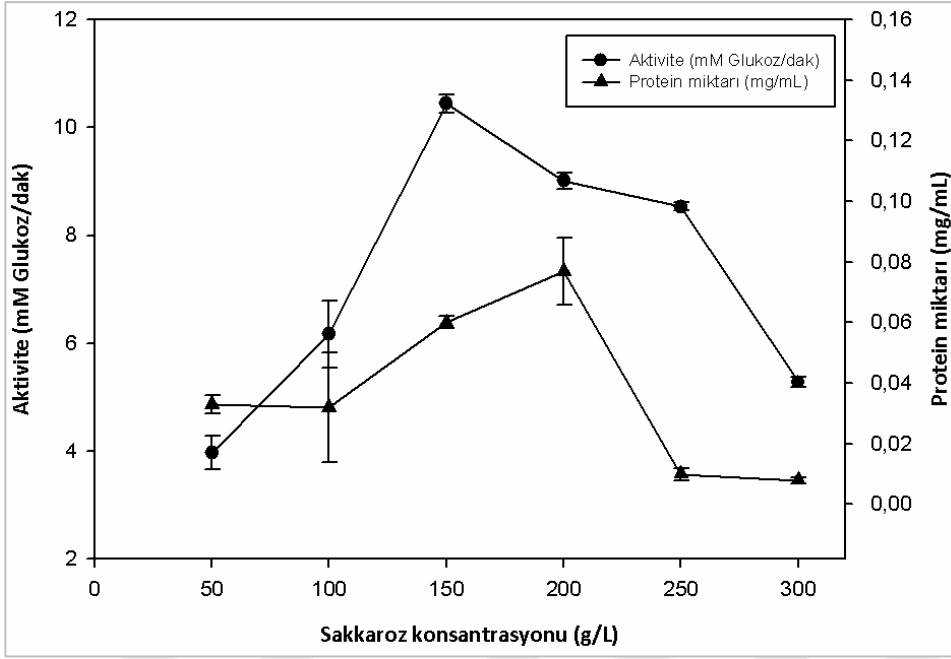
Bekers et al. (2002), tarafından *Zymomonas mobilis* 113S ile gerçekleştirilen çalışmada sakkaroz, maya özütü ve KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren ve başlangıç pH'sı 4.9 olan üretim ortamında 30 °C'de karıştırma ve havalandırma yapmaksızın levansukraz enzimi üretilmiştir.



Şekil 4.3 Sıcaklığa bağlı aktivite ve protein miktarı değişimi

4.3 Başlangıç Substrat Konsantrasyonunun Levansukraz Üretimine Etkisi

Başlangıç substrat konsantrasyonunun levansukraz üretimine etkisini incelemek amacıyla 50, 100, 150, 200, 250, 300 g/L sakkaroz içeren üretim ortamlarında *Zymomonas mobilis* büyütülerek enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi sakkaroz konsantrasyonu 50' den 150 g/L'ye kadar artırıldığında levansukraz üretimi de artmaktadır. 200 g/L sakkaroz konsantrasyonunun üzerinde enzim aktivitesinde önemli bir düşüş gözlenmiştir ve bu düşüşün yüksek sakkaroz konsantrasyonunda hücre gelişiminin yavaşlamasına bağlı olduğu düşünülmektedir. 36. saatin sonunda en yüksek levansukraz aktivitesi (10.44 mM glukoz/dak) başlangıç sakkaroz konsantrasyonu 150 g/L olduğunda bulunmuştur. Diğer başlangıç konsantrasyonları olan 50, 100, 200, 250 ve 300 g/L sakkaroz içeren üretim ortamlarında ise fermantasyonun 36. saatinde gözlemlenen levansukraz aktivitesi sırasıyla 3.97, 6.17, 9.01, 8.53, 5.28 mM glukoz/dak'dır. Bu sonuçlara göre başlangıç sakkaroz konsantrasyonunun en yüksek enzim aktivitesi elde edebilmek için yapılacak optimizasyon çalışmasında göz önünde bulundurulması gereken önemli bir parametre olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4 Sakkaroz konsantrasyonuna bağlı aktivite ve protein miktarı değişimi

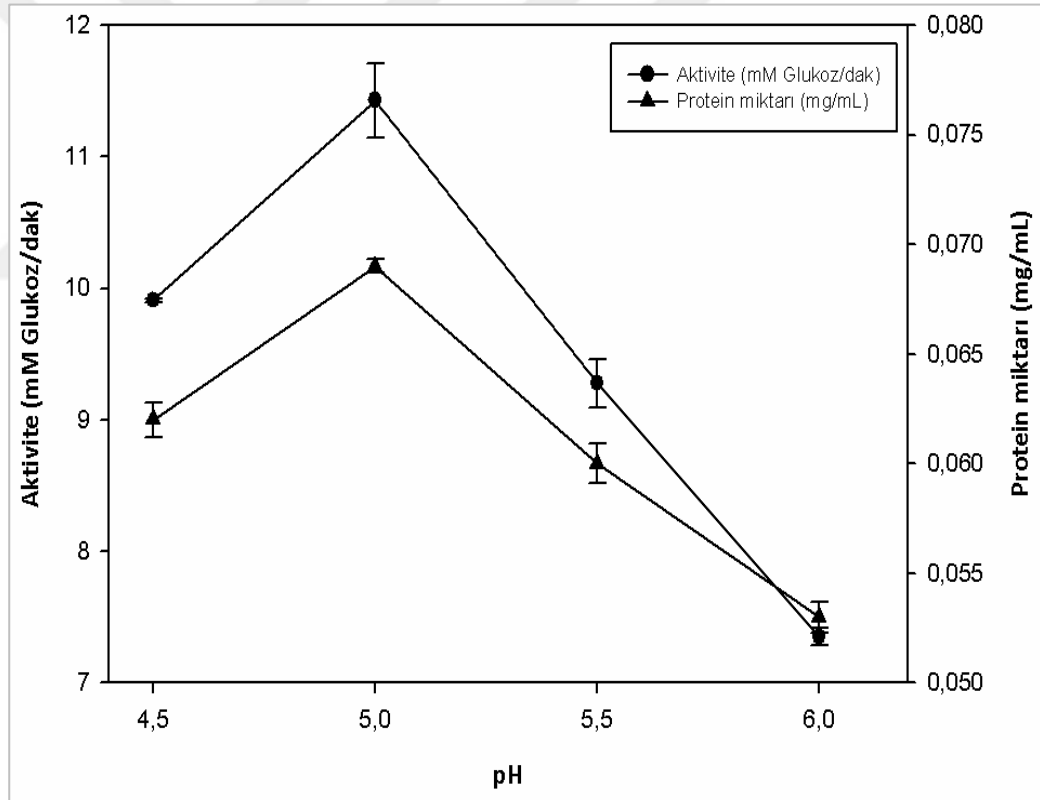
Birçok araştırmacı tarafından *Zymomonas mobilis* ile levansukraz üretiminde sakkaroz konsantrasyonunun önemli bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Crittenden and Doelle, 1994; Bekers et al., 2003; Borsari et al., 2006; Belghith et al., 2012; Silbir ve ark., 2013).

Doelle and Greenfield (1985) tarafından *Zymomonas mobilis*'in sakkaroz konsantrasyonuna bağlı olarak farklı metabolik aktivitelere sahip olduğu belirtilmiştir ve 400 g/L sakkaroz konsantrasyonuna sahip üretim ortamında yüksek miktarda (132 g/L) etanol ürettiği saptanmıştır. Ayrıca yüksek sakkaroz konsantrasyonunun levansukraz aktivitesini inhibe edici özelliği sahip olduğu belirtilmiştir.

Yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi sakkaroz konsantrasyonu hem *Zymomonas mobilis* bakterisi için hem de bu bakteri tarafından üretilen enzimin katalizlediği reaksiyonlar için önemlidir.

4.4 Başlangıç pH'sının Levansukraz Üretimine Etkisi

Zymomonas mobilis NRRL B-14023 suşu ile 150 g/L sakkaroz içeren üretim ortamlarında başlangıç pH'nın enzim aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla 30 °C'de 4.5, 5.0, 5.5 ve 6.0 gibi farklı pH değerlerinde denemeler yapılmıştır. Elde edilen enzim aktivite değerleri Şekil 4.5'te verilmiştir ve en yüksek levansukraz aktivitesi (11.43 mM glukoz/dak) başlangıç pH'sı 5.0 olduğunda elde edilmiştir. pH 4.5, 5.5 ve 6.0 değerlerinde ise enzim aktivite değerleri sırasıyla 9.91, 9.28 ve 7.35 mM glukoz/dak olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre başlangıç pH değerinin en yüksek enzim aktivitesini elde edebilmek için yapılacak optimizasyon çalışmasında göz önünde bulundurulması gereken önemli bir parametre olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5 pH'ya bağlı aktivite ve protein miktarı değişimi

Esawy et al. (2013) tarafından *Bacillus subtilis* NRC1 ile gerçekleştirilen çalışmada katı kültür fermantasyon ile levansukraz üretiminde farklı karbon kaynakları (glukoz, sakkaroz), azot kaynakları (pepton, maya özütü), pH, nem

içeriği ve mineral tuzlar (KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) gibi ortam bileşenleri ve fermantasyon koşulları arasından levansukraz aktivitesine en etkili proses parametresinin pH olduğu belirtilmiş ve pH 8.0 üretim ortamında levansukraz aktivitesi 13.81 U/g olarak belirlenmiştir.

4.5 Levansukraz Üretiminin Optimizasyonu

Birçok araştırmacı tarafından levansukraz üretiminde pH, sıcaklık ve başlangıç sakkaroz konsantrasyonu gibi faktörlerin önemli olduğu belirtilmiştir (Crittenden and Doelle, 1994; Bekers et al., 2003; Borsari et al., 2006; Belghith et al., 2012; Silbir ve ark., 2013).

Levansukraz üretiminde önemli proses parametreleri olan sıcaklık, başlangıç substrat konsantrasyonu ve pH'nın etkisini incelemek ve bu proses değişkenlerinin optimum seviyelerini belirlemek için Cevap Yüzey Yöntemi kullanılmıştır. Cevap Yüzey Yöntem'inde kullanılan deneme deseni ve analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Optimizasyon çalışmasında *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023, kültür ortamında geliştirilmiş (28 °C, 24 saat) daha sonra Çizelge 4.1' de verilen deneme desenindeki koşullar sağlanarak levansukraz üretimi çalkalama yapılmaksızın sıcaklık kontrollü Nüve EN 400 inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1 Cevap Yüzey Yönteminde kullanılan deneme deseni

| | FAKTÖRLER | | | Levansukraz Enzim Aktivitesi (mM Glukoz/dak) |
|----|---------------|-------------------------------|-----|--|
| | Sıcaklık (°C) | Sakkaroz Konsantrasyonu (g/L) | pH | |
| 1 | 32 | 200 | 5.5 | 7.105 |
| 2 | 28 | 200 | 4.5 | 6.82 |
| 3 | 28 | 200 | 5.5 | 5.569 |
| 4 | 32 | 200 | 4.5 | 8.436 |
| 5 | 28 | 100 | 5.5 | 4.72 |
| 6 | 30 | 150 | 5.5 | 10.625 |
| 7 | 32 | 100 | 4.5 | 7.205 |
| 8 | 28 | 150 | 5.0 | 9.202 |
| 9 | 30 | 100 | 5.0 | 9.299 |
| 10 | 30 | 150 | 5.0 | 12.3 |
| 11 | 30 | 200 | 5.0 | 10.299 |
| 12 | 32 | 150 | 5.0 | 10.642 |
| 13 | 30 | 150 | 5.0 | 12.2 |
| 14 | 30 | 150 | 5.0 | 12.283 |
| 15 | 28 | 100 | 4.5 | 5.936 |
| 16 | 32 | 100 | 5.5 | 6.063 |
| 17 | 30 | 150 | 4.5 | 11.859 |
| 18 | 30 | 150 | 5.0 | 12.3 |
| 19 | 30 | 150 | 5.0 | 12.25 |
| 20 | 30 | 150 | 5.0 | 12.35 |

Tasarım matrisi ve her bir terimin uyum varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2’te verilmiştir.

Çizelge 4.2 İkinci dereceden model denklemin istatistiksel analizi ($R^2= 0.994$)

| Kaynak | SD | KD | Düz. KT | Düz. KO | F | P |
|----------------|-----------|----------------|---------|---------|-------|-------|
| Regresyon | 9 | 137.096 | 137.096 | 15.2328 | 8E+03 | 0.000 |
| Lineer | 3 | 11.508 | 11.508 | 3.8359 | 2E+03 | 0.000 |
| İkinci Derece | 3 | 125.545 | 125.545 | 41.8484 | 2E+04 | 0.000 |
| Etkileşim | 3 | 0.043 | 0.043 | 0.0142 | 7.60 | 0.006 |
| Artık Hata | 10 | 0.019 | 0.019 | 0.0019 | | |
| Uyum eksikliği | 5 | 0.006 | 0.006 | 0.0011 | 0.44 | 0.805 |
| Saf Hata | 5 | 0.013 | 0.013 | 0.0026 | | |
| Toplam | 19 | 137.114 | | | | |

SD: serbestlik derecesi, **KT:** kareler toplamı, **Düz. KT:** düzeltilmiş kareler toplamı, **Düz. KO:** düzeltilmiş kareler ortalaması

Deneysel veriler ve tahmin edilen veriler arasındaki uyumu gösteren ilişki katsayısı (R^2) değeri 0.994 olarak elde edilmiştir. Bu değer; yüzey merkezli model ile deneysel verilerin %99.4 doğrulukta açıklanabileceğini ifade etmektedir. Bu sonuç 20 deneysel nokta kullanılarak elde edilen model denklemin levansukraz enzim aktivitesi için incelenen bağımsız değişken aralığında yüksek doğrulukta kullanılabilirliğini göstermektedir.

Çizelge 4.2 incelendiğinde Regresyon için F testinin %5 önem derecesinde anlamlı olduğu ($P < 0.05$), ayrıca model ile elde edilen veriler arasındaki uyum eksikliğinin (0.805) %5 önem derecesinde önemsiz olduğu ($P > 0.05$) görülmektedir. Bunun anlamı ise başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık ve pH'nın *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 hücreleri ile levansukraz üretimine etkilerinin oluşturulan model ile iyi bir şekilde açıklanabileceğidir.

Deneysel veriler üzerine çoklu regresyon analizi uygulanarak ve bulunan regresyon katsayıları kullanılarak (Çizelge 4.3) yüzey merkezli tasarım için ikinci dereceden model denklem üretilmiş ve aşağıda verilmiştir.

$$Y = 12.269 + 0.720X_1 + 0.501X_2 - 0.617X_3 - 2.329X_1^2 - 2.453X_2^2 - 1.007X_3^2 + 0.067X_1X_2 - 0.001X_1X_3 - 0.028X_2X_3$$

Y: Levansukraz enzim aktivitesi

X₁: Sıcaklık

X₂: Substrat Konsantrasyonu

X₃: pH

Model eşiklikteki terimlere ait regresyon katsayıları Çizelge 4.3' te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 Levansukraz enzim aktivitesi için tahmin edilen regresyon katsayıları

| Terim | Katsayılar | SH. Kat | T | P |
|----------------|-------------------|----------------|----------|----------|
| Sabit | 12.269 | 0.01489 | 824.216 | <0.001 |
| T | 0.720 | 0.01369 | 52.612 | <0.001 |
| SK | 0.501 | 0.01369 | 36.560 | <0.001 |
| pH | -0.617 | 0.01369 | -45.090 | <0.001 |
| T x T | -2.329 | 0.02611 | -89.215 | <0.001 |
| SK x SK | -2.453 | 0.02611 | -93.926 | <0.001 |
| pH x pH | -1.007 | 0.02611 | -38.662 | <0.001 |
| T x SK | 0.067 | 0.01531 | 4.406 | 0.001 |
| T x pH | -0.001 | 0.01531 | -0.049 | 0.962 |
| SK x pH | -0.028 | 0.01531 | -1.829 | 0.097 |

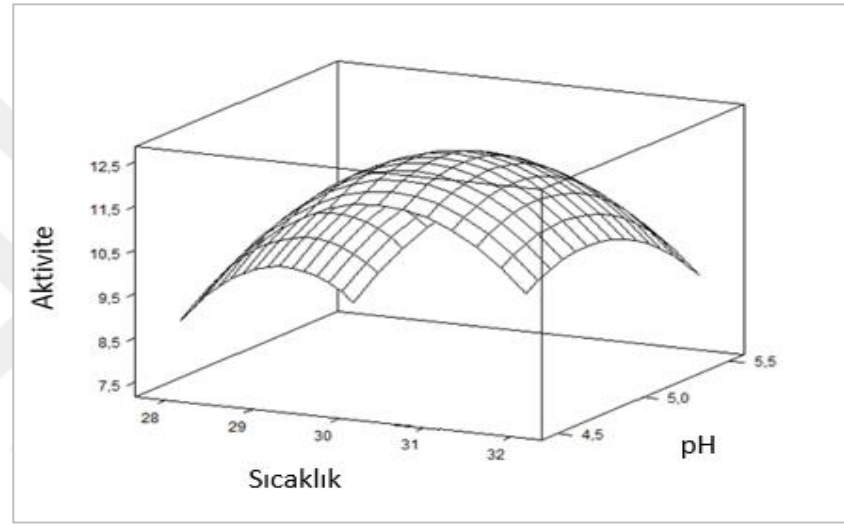
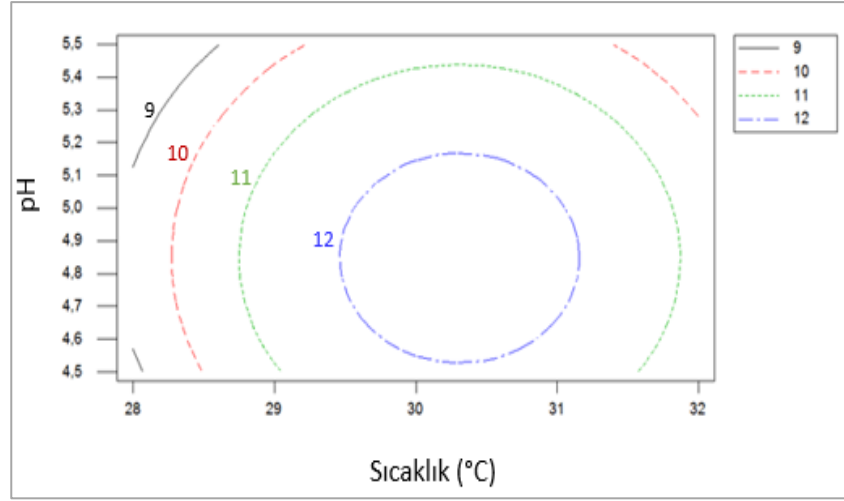
SH kat.: Standart Hata Katsayıları, **SK:** Substrat Konsantrasyonu, **T:** Sıcaklık

Çizelge 4.3 incelendiğinde sıcaklık ve başlangıç substrat konsantrasyonu ile cevap (levansukraz enzim aktivitesi) arasında pozitif doğrusal bir etki olduğu görülmektedir ($P<0.05$). Bu sonuç artan substrat konsantrasyonu ve sıcaklık değerlerinde levansukraz aktivitesinin artacağını göstermektedir. P değerleri her bir katsayının önemini kontrol etmede bir araç olarak kullanılmaktadır. P değerinin daha küçük olması katsayıya ilişkin korelasyonun önem derecesinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Sıcaklık, en yüksek doğrusal katsayı ile (0.720) levansukraz enzim aktivitesi üzerine en büyük etkiye sahiptir. Sıcaklığı sırasıyla substrat konsantrasyonu (0.501) ve pH (- 0.617) takip etmektedir.

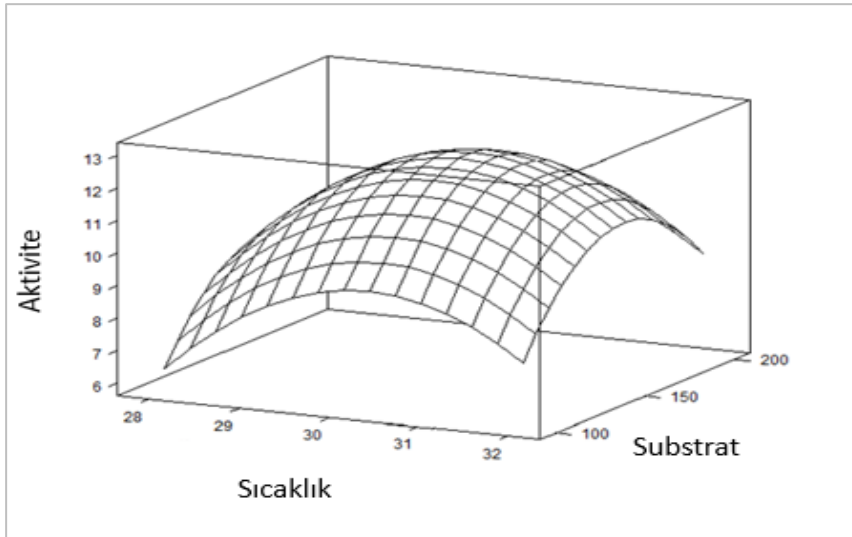
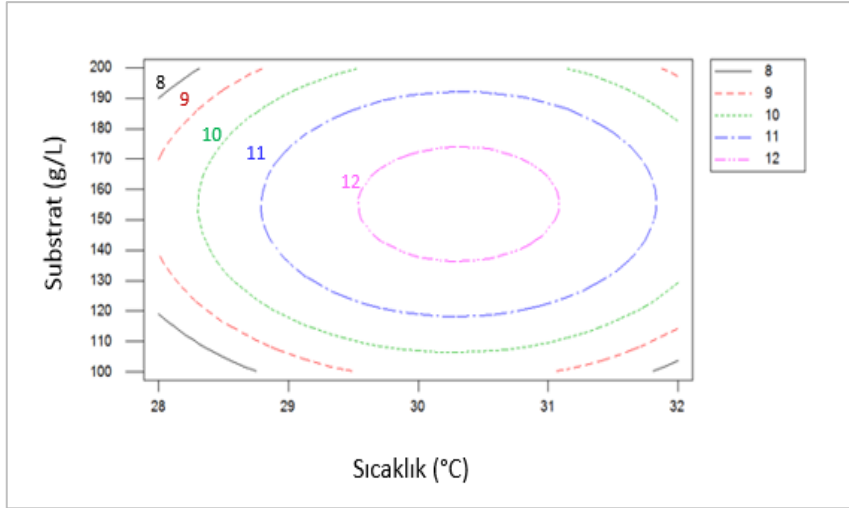
Aynı çizelge incelendiğinde sıcaklık, substrat konsantrasyonu ve pH'nın cevap üzerinde negatif kuadratik etkisinin olduğu da görülmektedir ($P<0.05$). Bunun anlamı artan sakkaroz konsantrasyonu, sıcaklık ve pH değerlerinde levansukraz aktivitesinin artması ve daha yüksek değerlere çıkılmaya devam edildiğinde levansukraz aktivitesinin azalmasıdır.

Substrat konsantrasyonu ve pH arasındaki negatif interaksiyon etkileşim, her iki parametrede meydana gelen artışlarda levansukraz aktivitesinin artacağı, belli bir değerde üretimin maksimum değerine ulaşacağı ve parametrelerde daha yüksek değerlere çıktığında enzim üretiminin azalacağı anlamı taşımaktadır. Benzer şekilde sıcaklık ve pH arasındaki negatif interaksiyon etkileşim, her iki parametrede meydana gelen artışlarda levansukraz aktivitesinin artacağı, belli bir değerde maksimum değerine ulaşacağı ve parametrelerde daha yüksek değerlere çıktığında enzim üretiminin azalacağını ifade etmektedir. Faktörler arasında sıcaklık ve sakkaroz konsantrasyonu arasındaki etkileşimler anlamlıdır ($P < 0.05$).

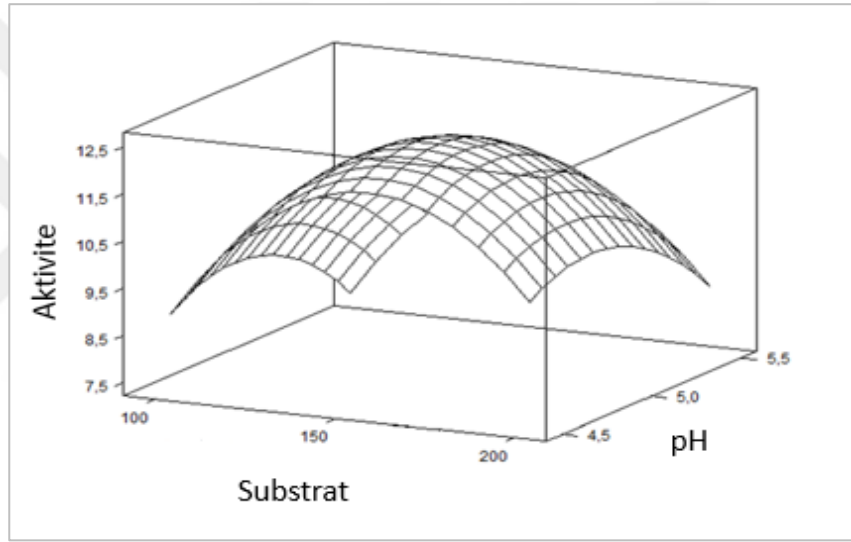
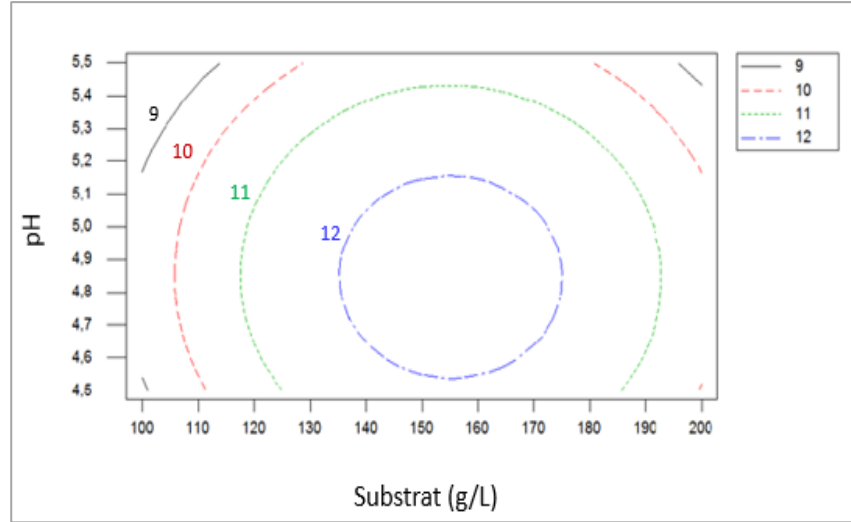
Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8’de faktörlerden bir tanesi merkezde sabit tutulduğunda, diğer iki faktör seviyelerinin levansukraz aktivitesi üzerine olan etkileri izohips eğrileri ve yüzey grafikleri ile gösterilmiştir. Şekil 4.6’da substrat konsantrasyonu sabit iken, merkez noktaya kadar levansukraz aktivitesinin arttığı, merkez noktadan sonra ise düştüğü belirlenmiştir. Şekil 4.7’de sabit pH değerlerinde, merkez noktaya kadar levansukraz aktivitesinin arttığı, merkez noktadan sonra ise düştüğü belirlenmiştir. Şekil 4.8’de sıcaklık sabit iken merkez noktaya kadar levansukraz aktivitesinin arttığı, merkez noktadan sonra ise enzim aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.6 Sabit sakkaroz konsantrasyonunda (150 g/L), sıcaklık ve pH'nın izohips eğrisi ve yüzey grafiği



Şekil 4.7 Sabit pH'da (5.0), sakkaroz konsantrasyonu ve sıcaklığın izohips eğrisi ve yüzey grafiği



Şekil 4.8 Sabit sıcaklıkta (30°C) substrat konsantrasyonu ve pH'nın izohips eğrisi ve yüzey grafiği

Levansukraz enzim aktivitesini modellemek için oluşturulan ikinci derece polinomiyal eşitlik çözülmüş ve proses için belirlenen optimum koşullar belirlenmiştir. Bu optimum koşullar, sıcaklık 30.3 °C (X_1), başlangıç substrat konsantrasyonu 159.01 g/L (X_2) ve pH 4.91 (X_3)'dir ve bu koşullarda model, fermantasyon sonunda maksimum 13.18 mM glukoz/dak enzim aktivitesi elde edilebileceği tahminlemiştir. Bu veriler *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 suşu ile sakkaroz içeren üretim ortamında maksimum levansukraz aktivitesi için en uygun seviyeler olarak belirlenmiştir.

Modelin verdiği optimum koşullarda *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 suşu kullanılarak sakkaroz içeren üretim ortamında levansukraz enzim üretimi geręekleřtirilmiř ve fermantasyonun 36. saatinde maksimum levansukraz enzim aktivitesi (13.3 mM glukoz/dak) elde edilmiştir. Bu değer modelin verdiği değer olan 13.18 mM glukoz/dak değerine oldukęa yakın bir değerdir.

Levansukraz üretimi üzerine biręok ęalıřma yapılmış olmasına rağmen matematiksel yöntemlerle enzim üretiminin optimize edildiği az sayıda ęalıřma bulunmaktadır (Gonęalves et al., 2013) ve literatürde yer alan ęalıřmalarda ağırlıklı olarak enzim tarafından üretilen levan biyopolimeri optimize edilmiştir.

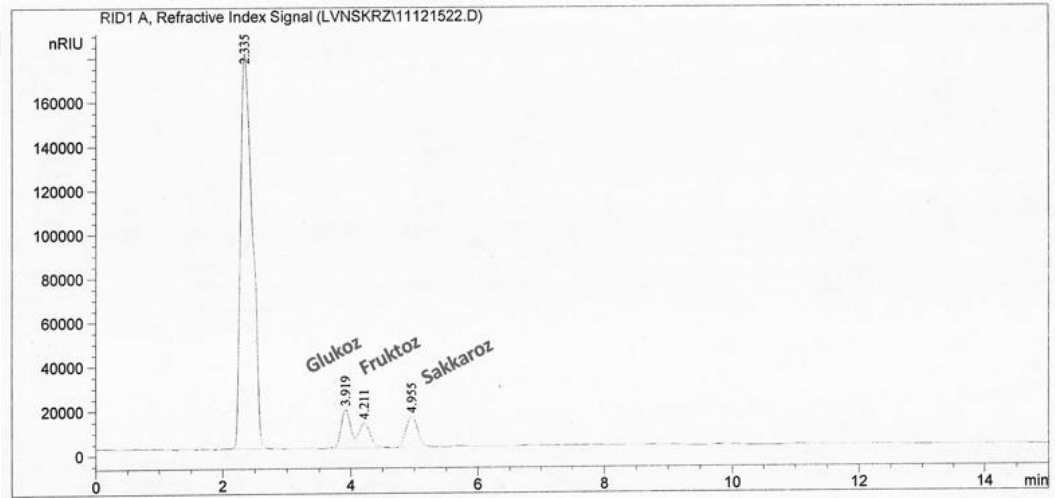
Bacillus subtilis natto CCT7712 ile substrat konsantrasyonu, pH ve karıştırma hızının levansukraz üretimi ve levan oluşumuna etkisi incelenmiş ve bu parametrelerin optimizasyonu Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak geręekleřtirilmiřtir. 300 g/L sakkaroz içeren üretim ortamında (pH 7.5), 160 rpm karıştırma hızında en yüksek levansukraz aktivitesi (8.53 U/ml) ve levan üretimi elde edilmiştir (Gonęalves et al., 2013).

şilbir ve ark. (2014), tarafından *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-14023 ile geręekleřtirilen ęalıřmada kesikli sistemde levansukraz enzimi tarafından üretilen levan üretiminin optimizasyonu için Cevap Yüzey Yöntemi kullanılmış ve maksimum levan konsantrasyonu olan 40.2 g/L levana 299.1 g/L başlangığ sakkaroz konsantrasyonu, 42.3 saat inkübasyon süresi ve başlangığ pH değerı 6.0 ile ulaşıldığı bildirilmiştir.

Esawy et al. (2013), tarafından *Bacillus subtilis* NRC1 ile yapılan ęalıřmada katı kültür fermantasyon ile levansukraz üretiminde Cevap Yüzey Yöntemini kullanarak enzim aktivitesi optimize edilmiştir. Optimizasyon ęalıřmaları iki aşamada geręekleřmiř ve ilk olarak ortam bileşenleri ve fermantasyon koşullarından en etkili parametreler belirlenmiş ve ikinci aşamada önemli olduğu belirlenen parametreler kullanılarak matematiksel olarak enzim üretimi optimize edilmiştir. 60 g/L sakkaroz konsantrasyonunda pH 8.0 üretim ortamında en yüksek levansukraz aktivitesi 170 U/g olarak belirlenmiştir.

4.6 *Zymomonas mobilis* Levansukraz ile FOS Üretimi

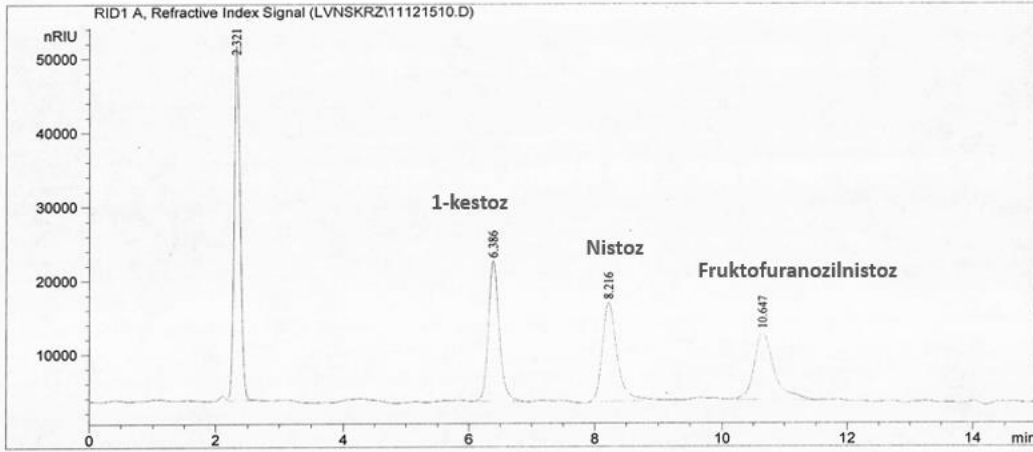
Kurban (2013) tarafından *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 suşu kullanılarak üretilen levansukraz enzimi ile FOS üretimi için optimum koşullar belirtilmiştir. Belirtilen optimum koşullar dikkate alınarak levansukraz enzimini içeren ortam sakkaroz konsantrasyonu (%60 v/v) istenilen aralığa getirilerek 100 rpm karıştırma hızından ve 45 °C'de sıcaklıkta 24 saat inkübasyon sonrasında FOS üretimi gerçekleştirilmiştir. Enzim tarafından üretilen FOS çeşitleri yüksek performans sıvı kromatografisi ile belirlenmiştir. HPLC analizinde kullanılan FOS standartları (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5) ve optimum koşullarda üretilen FOS çeşitleri (Çizelge 4.6) verilmiştir. Şekil 4.10 incelendiğinde 1-kestoz standardının alıkonma zamanı 6.38 dakika olarak bulunmuş ve Şekil 4.11'de ise 5 kat seyreltilmiş örnek için 6.30 uncu dakikada gelen pikin 1-kestoz olduğu belirlenmiştir. Alıkonma zamanları arasındaki farkın standartlar ve örnekler için kullanılan mobil fazdaki asetonitril:su oranının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.9 Glukoz, fruktoz ve sakkaroz standartları (mobil faz asetonitril:su (85:15))

Çizelge 4.4 Glukoz, fruktoz ve sakkaroz standartlarının alıkonma zamanları

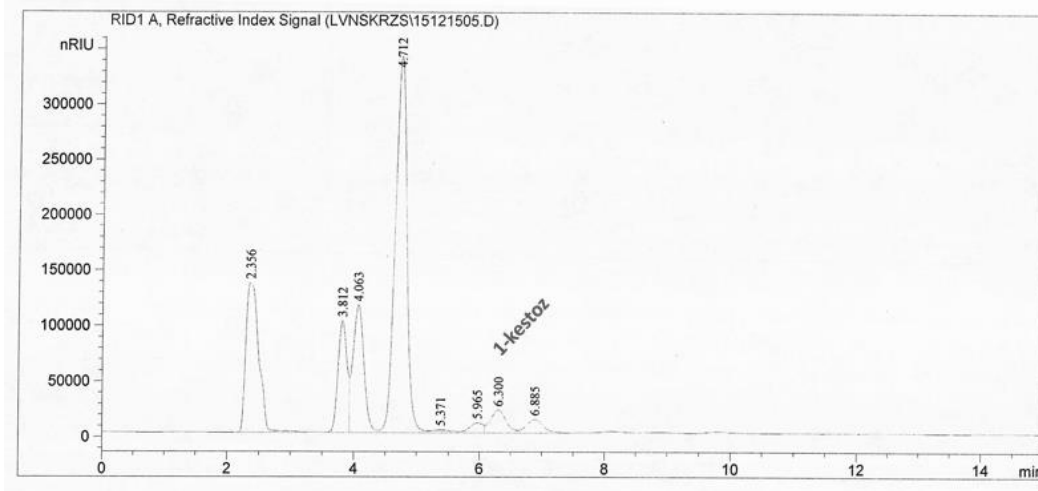
| Standartlar | Alıkonma zamanı (dakika) |
|-------------|--------------------------|
| Glukoz | 3.92 |
| Fruktoz | 4.21 |
| Sakkaroz | 4.91 |



Şekil 4.10 1-kestoz, nistoz ve fruktofranozilnistoz standartları (mobil faz asetonitril:su (70:30))

Çizelge 4.5 1-kestoz, nistoz ve fruktofranozilnistoz standartlarının alıkonma zamanları

| Standartlar | Alıkonma Zamanı (dakika) |
|-----------------------|--------------------------|
| 1-kestoz | 6.38 |
| Nistoz | 8.21 |
| Fruktofuranozilnistoz | 10.65 |



Şekil 4.11 *Zymomonas mobilis* levansukraz tarafından üretilen 1-kestoz (mobil faz asetonitril:su (70:30)) örnek 1/5 kat seyreltilerek kolona verilmiştir.

Çizelge 4.6 *Zymomonas mobilis* levansukraz tarafından üretilen FOS çeşitleri ve alıkonma zamanları

| Standartlar | Alıkonma zamanı (dakika) |
|-----------------|--------------------------|
| Glukoz | 3.812 |
| Fruktoz | 4.063 |
| Sakkaroz | 4.712 |
| 1-Kestoz | 6.288 |

Bekers et al. (2003), tarafından yapılan çalışmada *Zymomonas mobilis* 113 S suşuyla ürettikleri levansukraz enzimi ile FOS üretimi gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, 25 °C sıcaklıkta ve %15 sakkaroz konsantrasyonunda enzimin FOS üretmediği fakat %70 şeker konsantrasyonu ve 45 °C sıcaklıkta yüksek verimlilikte (%31) FOS ürettiği gözlemlenmiştir.

Bekers et al. (2002), *Zymomonas mobilis* ile ürettikleri levansukraz enzimini kullanarak sakkaroz şurubundan %22-32 verimlilikte 1-kestoz, 6-kestoz, nistoz ve fruktofuronozilnistoz gibi FOS'ları üretmiş ve elde edilen bu FOS çeşitlerinin düşük kalorili prebiyotik kaynağı olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

Goldman et al. (2008), tarafından yapılan çalışmada *E.coli* 'de rekombinant olarak üretilen *Zymomonas mobilis* levansukraz kullanılarak FOS üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen FOS'lar ince tabaka kromatografisi ve yüksek performans iyon değişim kromatografisi ile kestoz ve nistoz olarak belirlenmiştir.

4.7 *Zymomonas mobilis* Levansukrazın Saflaştırılması

Zymomonas mobilis NRRL B-14023 ile optimum koşullarda üretilen levansukraz enzimi, saflaştırma işlemlerinde yaygın olarak kullanılan amonyum sülfat (% 80) ile çöktürülmüş ve oluşan pellet 22 mM pH 5.4 sitrat-fosfat tamponunda çözülerek 12 kDa por çapına sahip membran kullanılarak 22 mM pH5.4 sitrat-fosfat+50 mM NaCl içeren tamponda diyaliz edilmiştir. Diyaliz

işleminde sonra örneğin aktivite ve protein miktarı belirlenmiştir. Çizelge 4.7’de saflaştırılan levansukraz enziminin aktivite ve protein miktarları verilmiştir. Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi *Zymomonas mobilis* levansukraz enzimi diyaliz sonrasında % 36.38’lik bir aktivite verimi ile saflaştırılmıştır.

Çizelge 4.7 Levansukraz enziminin kısmi saflaştırma sonuçları

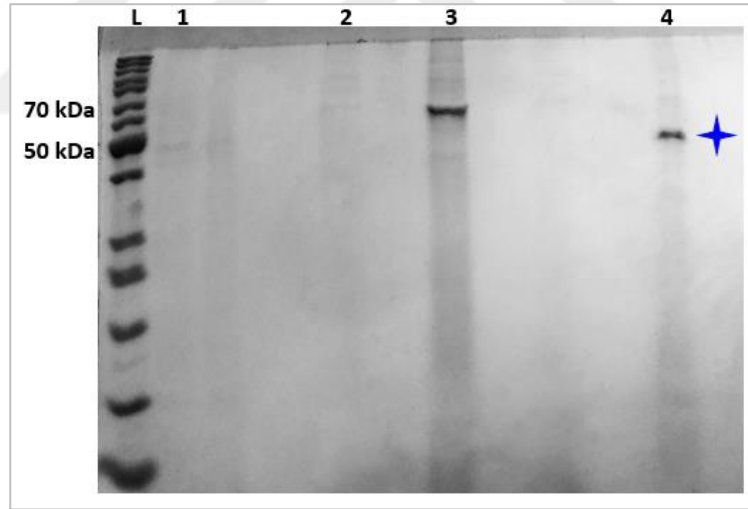
| Aşama | Aktivite (mM glukoz/dak) | Protein (mg/mL) | Aktivite verimi (%) |
|-----------------|--------------------------|-----------------|---------------------|
| Ham ekstrakt | 9.95 | 0.037 | 100 |
| Diyaliz sonrası | 3.62 | 0.762 | 36.38 |

Saflaştırılan enzimin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlesini belirlemek, saflaştırılan enzimi ham ekstrakt ile kıyaslamak için SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Şekil 4.12’de SDS-PAGE jel görüntüsünde görüldüğü gibi diyaliz sonrası enzim ham ekstrakta kıyasla daha belirgin ve homojen bir bant vermektedir. Enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 48 kDa olarak belirlenmiştir. Yapılan diyaliz işlemi sonrasında başlangıca göre enzim aktivitesinde önemli bir düşüş meydana gelmesine rağmen SDS-PAGE ile belirgin bir protein bandı gözlenmiştir. Diyaliz sonrasında enzim aktivitesinde ciddi bir azalma olmasının diyaliz tamponunda kullanılan NaCl ‘den kaynaklandığı düşünülmektedir. Vigants et al. (2003) tarafından *Zymomonas mobilis* ile gerçekleştirilen çalışmada ürettikleri hücre dışı levansukraz enzimini saflaştırmada üre, Tween 20 ve NaCl gibi farklı ajanlar kullanmışlardır ve 0.5 M NaCl varlığında enzim aktivitesinde düşüş olduğu ve en düşük enzim aktivitesi elde edildiği belirtilmiştir.

Goldman et al. (2008) tarafından yapılan çalışmada *Zymomonas mobilis* levansukraz *E. coli* hücrelerinde sitoplazmik olarak çözümlü halde üretilmiş ve üretilen rekombinant protein saflaştırılmıştır, enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık 46.7 kDa olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada pH 7.4 fosfat tamponunda dimerik yapıda elde ettikleri proteinin pH azaldıkça (pH 5.0-6.0) yüksek moleküler ağırlıklı oligomerlere dönüştüğü gösterilmiştir. Bu oligomerlerin fibril yapıda levan sentezleyebilen aktif enzimler olduğunu ve fibrillerin pH yükseldikçe tekrar dimerlere dönüşerek levan aktivitelerini kaybettiği belirtilmiştir. Diyaliz sonrası enzim aktivitesindeki düşüşün

levansukrazın pH değişimine bağlı olarak levan ile oligomerik yapı oluşturmasından dolayı substratın enzimin aktif bölgesine yerleşemediği böylece aktivitesinin düştüğü öngörülmektedir.

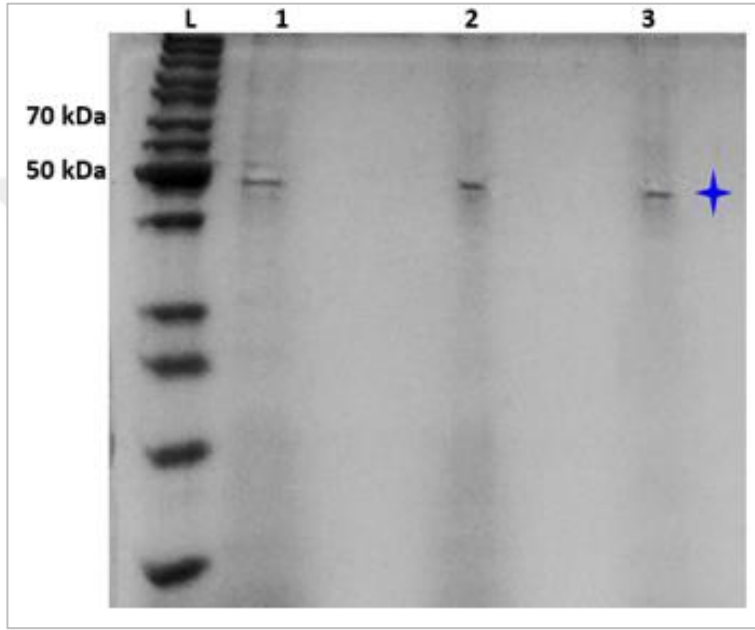
şekil 4.12'deki SDS-PAGE jel görüntüsü incelendiğinde ise 50 kDa boyunda amonyum sülfat sonrası elde edilen pellet ile bir bant oluşumu görülmemesine rağmen diyaliz sonrasında yaklaşık 48 kDa civarında belirgin bir protein bantı oluşmuştur ve bu oluşan bantın literatürde belirtilen moleköl ağırlığı civarında olduğu ve levansukraz enzimine ait olduğu düşünölmektedir. Amonyum sülfat sonrası elde edilen pellet yaklaşık 70 kDa civarında bir bant oluşumu vermiştir fakat elektroforezde yüksek tuz konsantrasyonlarında doğru sonuçların elde edilmesi zordur. Amonyum sülfat presipitasyonu sırasında oligomerik levan-levansukraz enzim kompleksi oluştuğu düşünölmekte ve bu kompleksin elektroforez başlangıcında 3 numaralı kuyuya giremeyen kısım olduğu düşünölmektedir.



şekil 4.12 SDS-PAGE jel görüntüsü 1. **L:** Protein ladder **1:** Ham enzim ekstraktı
2: Amonyum sülfat sonrası **3:** pellet **4:** Diyaliz sonrası saflaştırılmış enzim

Ayrıca optimum koşullarda üretilen enzimin protein miktarını konsantre etmek amacıyla üretim sonrası elde edilen ham ekstrakt liyofilize edilmiş ve liyofilizasyon sonrasında proteinin moleköl boyutu SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. şekil 4.13'te liyofilize edilen ham enzim ekstraktının SDS-PAGE jel görüntüsü verilmiştir. şekil 4.12'deki jel görüntüsü incelendiğinde yaklaşık 48

kDa civarında fermantasyon sonrası ham ekstrakta göre (1. örnek) daha belirgin bir protein bandı gözlenmektedir. Buna ek olarak liyofilizasyon sonrasında kuru enzim örneği 100 kat konsantre olacak şekilde 22 mM pH 5.4 sitrat-fosfat tamponunda çözülmüş ve aktivitesi 39.55 mM glukoz/dak olarak bulunmuştur. Böylece enzimin liyofilizasyon sonrasında aktif olduğu belirlenmiş ve uzun vadede liyofilizasyon sonrasında örneğin uygun saflaştırma yöntemleri ile saflaştırılması öngörülmüştür.



Şekil 4.13 SDS-PAGE jel görüntüsü 2. L: Protein ladder 1, 2, 3: Liyofilize örnekler

5. SONUÇ

Bu çalışmada *Zymomonas mobilis* B-14023 suşu kullanılarak, statik kültür ile levansukraz enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen enzim kullanılarak FOS üretilmiştir, optimum koşullarda üretilen enzim saflaştırılmış ve molekül ağırlığı belirlenmiştir.

İlk aşamada *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 suşu kullanılarak levansukraz üretimi yapılmış ve başlangıç substrat konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve fermantasyon süresi gibi önemli proses parametrelerin enzim üretimine etkisi incelenmiştir.

Başlangıç substrat konsantrasyonunun levansukraz üretimine etkisi incelendiğinde en yüksek levansukraz aktivitesi olan 10.44 mM glukoz/dak değeri, 150g/L başlangıç substrat konsantrasyonu içeren ortam kullanılarak elde edilmiştir. Daha yüksek substrat konsantrasyonları kullanıldığında elde edilen levansukraz aktivitesi azalmıştır. Böylece yüksek başlangıç substrat konsantrasyonlarının levansukraz aktivitesini inhibe edici etkisi olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon sıcaklığının enzim aktivitesine etkisi incelendiğinde en yüksek levansukraz aktivitesi 30 °C sıcaklık değerinde 11.03 mM glukoz/dak olarak bulunmuştur. pH'nın etkisini belirlemek amacıyla yapılan denemeler sonucunda en yüksek levansukraz aktivitesi pH 5.0 üretim ortamında 11.43 mM glukoz/dak olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise fermantasyon sıcaklığı, pH ve substrat konsantrasyonu levansukraz enzim aktivitesine etkilerinin incelenmesi için seçilmiş ve bunun için Cevap Yüzey Yöntemi kullanılmıştır. Bu üç değişkenin levansukraz aktivitesine lineer, kuadratik ve interaksiyon etkileri Cevap Yüzey Yöntemi ile belirlenmiştir. Bulunan model, proses değişkenlerinin etkilerini yeterli düzeyde açıklayabilmiştir. Cevap Yüzey Yönteminin uygulanması sırasında seçilen fermantasyon sıcaklığı, substrat konsantrasyonu ve pH aralıkları için yüzey merkezli tasarım kullanılmıştır. Seçilen tasarım için deney modeli oluşturulmuş ve modelin belirlediği 20 noktada deney yapılmıştır. Deneysel veriler kullanılarak ikinci dereceden model denklem elde edilmiş ve bu eşitlik

kullanılarak 20 deney noktası için levansukraz enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Tasarımın R^2 değeri 0.994 olarak belirlenmiş olup bu değer deneysel verilerin elde edilen model denklemde % 99.4 doğrulukla açıklanabileceğini ifade etmektedir. Levansukraz üretiminde optimum parametrelerin hesaplanması amacıyla yüzey merkezli tasarıma ait regresyon katsayıları kullanılarak 3 değişken (fermantasyon sıcaklığı, pH ve substrat konsantrasyonu) için matris çözümü yapılmıştır. Yapılan çözümleme sonucunda optimum fermentasyon sıcaklığı 30.3 °C, pH 4.91 ve substrat konsantrasyonu 159.01 g/L olarak bulunmuştur. Modelin bu değerler ile üretim için tahminlediği maksimum levansukraz aktivitesi 13.18 mM glukoz/dak iken, üretim sonucunda 13.3 mM glukoz/dak levansukraz enzim aktivitesi elde edilmiştir. Optimizasyon öncesi elde edilen en yüksek levansukraz aktivitesi 11.43 mM glukoz/dak iken, optimizasyon sonrası levansukraz aktivitesinin 13.3 mM glukoz/dak değerine ulaşması Cevap Yüzey Yönteminin levansukraz aktivitesinin optimizasyonunda başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. *Zymomonas mobilis* kullanılarak üretilen levansukraz enzimi FOS üretiminde kullanılmıştır. Enzimin yüksek sakkaroz konsantrasyonunda (%60 v/v) ve 45°C yüksek sıcaklık değerinde transfruktosilasyon aktivitesi ile 1-kestose ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca optimum koşullarda üretilen enzim saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS- PAGE ile yaklaşık 48 kDa olarak belirlenmiştir.

Son yıllarda stabilizatör, emülgatör, kıvam artırıcı özellikleri ile gıdalarda kullanımı mümkün olan levan ve fonksiyonel gıda katkıları olarak kullanılan FOS'ları üreten levansukraz enziminin önemi giderek artmaktadır. Levansukraz enziminin mikrobiyal biyoprosesler ile üretilmesi, bu enzimin birçok alanda kullanımını geliştirilebileceği ve farklı uygulamalar için yeni çalışmaları teşvik edeceği düşünülmektedir.

Literatürde *Zymomonas mobilis* levansukraz üretimi üzerine yapılan birçok çalışma olmasına rağmen fermentasyon koşullarının en yüksek enzim aktivitesi için matematiksel yöntemlerle optimize edildiği çalışma bulunmamaktadır. Bu tez projesinde sıcaklık, başlangıç substrat konsantrasyonu ve pH gibi fermentasyon koşullarına bağlı olarak farklı metabolik aktivite gösteren hem *Zymomonas mobilis* bakterisi hem de levansukraz enzimi için elde edilen optimizasyon

sonuçları literatüre kazandırılacak olup ayrıca saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı belirlenmiştir. Saflaştırma işlemleri sonrasında elde edilen sonuçların enzimin ileri düzeyde biyokimyasal karakterizasyonu için temel bir basamak oluşturacağı dşnlmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdel-Fattah, A., Mahmoud, D. and Esawy, M.** 2005, Production of Levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and Enzyme Sythesis of Levan and Fructo-oligosaccharides, *Curr Microbiol*, 51:402-407p.
- Ahmed, S.** 2008, Optimization of Production and Extraction Parameters of *Bacillus megaterium* Levansucrase Using Solid-State Fermentation, *J Appl Sci Res*, 4:1199-1204p.
- Angiolillo, L., Conte, A. and Del Nobile, M.** 2015, Technological Strategies to Produce Functional Meat Burgers, *Lwt-Food Sci Technol*, 62(1):697–703p.
- Anonymous,** 2012a, <http://bio-x.ru/articles/poluchenie-etilalkola-kak-topлива> (Erişim tarihi: 10 Şubat 2016).
- Anonymous,** 2012b, <http://www.indiatalkies.com/2010/12/bioengineers-develop-bacterial-strain-hike-ethanol-biofuel-production.html> (Erişim tarihi: 10 Şubat 2016).
- Arvidson, S., Rinehart, B. and Gadala-Maria, F.** 2006, Concentration Regimes of Solutions of Levan Polysaccharide from *Bacillus sp.*, *Carbohydr Polym*, 65 (2):144-149p.
- Banga, J.R., Balsa-Canto, E., Moles, C.G. and Alonso, A.A.** 2003, Improving food processing using modern optimization methods, *Trends Food Sci & Tech*, 14: 131-144p.
- Barone, J.R. and Medynets, M.** 2007, Thermally processed Levan polymers. *Carbohydrate Polymers*, 69(3):554–561p.
- Baş, D. ve Boyacı, İ.H.** 2007, Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *J Food Eng*, 78:836-845p.
- Bekers, M., Vigants, A., Laukevics, J., Toma, M., Rapoport, A., & Zikmanis, P.** 2000. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3):147–150p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bekers, M., Laukevics, J., Karsakevich, a., Ventina, E., Kaminska, E., Upite, D., Scherbaka, R.** 2001. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. *Process Biochemistry*, 36(10), 979–98
- 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 Biochem*, 38(5):701–706p.
- Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Grube, M., Laukevics, J., Vina, I., Vigants, A. and Zirkmanis, P.** 2003, Fructan biosynthesis by intra and extracellular *Zymomonas mobilis* levansucrase after simultaneous production of ethanol and levan. *Acta Biotechnol*, 23:85-93p.
- Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Grube, M., Vigants, a., & Linde, R.** 2005. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, 40(5), 1535–1539.
- Belghith, K., Dahech, I., Belghith, H. and Mejdoub, H.** 2012, Microbial Production of Levansucrase for Synthesis of Fructooligosaccharides and Levan, *Int J Biol Macromol*, 50:451–458p.
- Ben Ammar, Y., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P. and Minamiura, N.** 2002, Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature, *Journal of Biotechnology*, 99(2):111–119p.
- Benigar, E., Dogsa, I., Stopar, D., Jamnik, A., Cigic, I. and Tomsic, M.** 2014, Structure and Dynamics of a Polysaccharidematrix: Aqueous Solutions of Bacterial Levan, *Langmuir*, 30(14):4172-4182p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Biedendieck, R., Beine, R., Gamer, M., Jordan, E., Buchholz, K., Siebel, J., Dijkhuizen, L., Malten, M. and Jahn, D.** 2007, Export, purification and activities of affinity tagged *Lactobacillus reuteri* levansucrase produced by *Bacillus megaterium*, *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 1062-1073p.
- Borsari, J., Celligi, C., Buzato, B. and Silva, F.** 2006, Influence of Carbon Source and the Fermentation Process on Levan Production by *Zymomonas mobilis* Analyzed by the Surface Response Method, *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 26:604-609p.
- Box, G.E.P. and Draper, N.R.** 2007, Empirical Model Building and Response Surfaces, 2nd edition, John Wiley and Sons, New York, NY.
- Bradford, M.M.** 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding, *Analytical Biochemistry*, 72:248-254p.
- Caputi, L., Nepogodiev, S., Malnoy, M., Rejzek, M., Field, R., Benini, S.** 2013, Biomolecular Characterization of the Levansucrase of *Erwinia amylovora* a Promising Biocatalyst for the Synthesis of Fructooligosaccharides, *J Agric Food Chem*, 61:12265- 12273p.
- Castillo, E.D.** 2007, Process Optimization, a Statistical Approach, Springer Science + Business Media, LLC, New York, NY.
- Cha, J., Park, N. H., Yang, S. J. and Lee, T.H.** 2001, Molecular and enzymatic characterization of levan fructotransferase from *Microbacterium* sp. AL-210. *Journal of Biotechnology*, 91:49-61p.
- Chambert, R., Treboul, G. and Dedonder, R.** 1974, Kinetic studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*, *European Journal of Biochemistry*, 41:285-300p.
- Cote, L.** 1988, Production of Constitutive Extracellular Levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL-B 1678, *Biotechnol Lett.*, 10(12):879-882p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Crittenden, R. G. and Doelle, H. W.** 1994, Identification and Characterization of the Extracellular Sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM-2716 (ATCC-39676), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(3):302–308p.
- Dagbaglı, S. ve Göksungur, Y.** 2012, Mikrobiyal polisakkaritler, *Gıdalarda Isısal Olmayan İşlemler*, T. Baysal ve F. İçier (Derl.), Nobel Yayın, Ankara, 113-155s.
- De Graaf, A.A.** 2000, Metabolic Analysis of *Zymomonas mobilis*, In K. Schügerl (Ed.), *Bioreaction Engineering*, Springer, Verlag. (pp. 478–505).
- Dominguez de Matos, A.L.** 2013, Fructooligosaccharides Production-Ingredients for Functional Food, Ph.D. Thesis, Universidade do Minho, 8-51p.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. and Schorr-Galindo, S.** 2012, Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2):951–962p.
- DuBois, M., Gilles, K. a., Hamilton, J. K., Rebers, P. a. and Smith, F.** 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28(3):350–356p.
- Eren, İ.** 2004, Patateslerin Osmotik Dehidrasyonunun “Response Surface” Metodu Kullanılarak Optimizasyonu, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 142s.
- Esawy, M., Abdel-Fattah, A., Ali, M., Helmy, W., Salama, B., Taie, H. and Awad, G.** 2013, Levansucrase Optimization Using Solid State Fermentation and Levan Biological Activities Studies, *Carbohydr Polym*, 96(1):332–341p.
- Food and Drug Administration**, "GRAS Notice No. GRN 000044", <http://www.fda.gov/> (Son erişim tarihi: 28 Ocak 2016).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fujita, K., Kuwahara, N., Tanimoto, T., Koizumi, K., Iizuka, M., Minamiura, N., Furuichi, K. and Kitahata, S.** 1994, Chemical structures of heterooligosaccharides produced by *Arthrobacter* sp. K-1 β -fructofuranosidase, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58:239-243p.
- Ganaie, M., Lateef, A. and Gupta, U.** 2014, Enzymatic Trends of Fructooligosaccharides Production by Microorganisms, *Appl Biochem Biotechnol*, 172:2143-2159p.
- Goldman, D., Lavid, N. and Schwartz, A.** 2008, Microfibril Structure of the Two Active Forms of *Zymomonas mobilis* Levansucrase, *J Biol Chem*, 283:32209-32217p.
- Gonçalves, B. C. M., Mantovan, J., Ribeiro, M. L. L., Borsato, D., Antonia, M. and Celligoi, P.C.** 2013, Optimization production of thermo-active levansucrase from *Bacillus subtilis natto* CCT7712, *Journal of Applied Biology&Biotechnology*, 1:1-8p.
- Göksungur, Y., Baysal, T., Dağbağlı, S. ve Giray, N.** 2012, Organik Orta Nemli Bazı Meyvelerin Üretiminde Organik Biyokoruyucu İçeren Yenilebilir Levan Filmle Kaplamanın Kaliteye Etkileri, Tübitak Projesi (Proje no :110O079).
- Han, Y.** 1990, Microbial levan, *Adv. Appl. Microbiol.*, 35:171-194p.
- Hayashi S., Yoshiyama, T., Fuji, N. and Shinohara, S.** 2000, Production of a novel syrup containing neofructooligosaccharides by the cells of *Penicillium citrinum*, *Biotechnology Letters*, 22:1465–1469p.
- Hernández, L., Arrieta, J., Betancourt, L., Falcón, V., Madrazo, J., Coego, A. and Menéndez, C.** 1999, Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway, *Current Microbiology*, 39(3):146–152p

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hestrin, S. and Avineri-Shapiro, S.** 1944, The Mechanism of Polysaccharide Production from Sucrose 2, *Biochemical Journal*, 38:2-10p.
- Hestrin, S., Feingold, D.S. and Avigad, G.** 1956, The Mechanism of Polysaccharide Production from Sucrose 3: Donor-Acceptor Specificity of Levansucrase from *Aerobacter leanicum*, *Biochemical Journal*, 64:340-351p.
- Iizuki, M., Mima T., Ammar Y.B., Ito, K. and Minamiura, N.** 2002, Mechanism of Synthesis of Levan by *Bacillus natto* Levansucrase, *Journal of Applied Glycoscience*, 49(2):229-237p.
- 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, *Biotechnol Prog*, 29:1405–1415p.
- İkiz, F., Püskülcü, H. ve Eren, Ş.** 2000, İstatistiğe Giriş, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, 6. baskı, İzmir, Türkiye.
- Kaplan, H. and Hutkins, R.** 2000, Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria*, *Appl Environ Microbiol*, 66(6):2682–2684p.
- Kat, B. and Yilmazer-Keskin, S.** 2013, Üçlü faz sistemi ile saflaştırılan invertaz enziminin termal kararlılığının incelenmesi, *SAÜ. Fen Bil. Der.* 17(2):291-294p.
- Kim, Y. M., Park, J.P., Sinha, J., Lee, K. H. and Yun, J.W.** 2001, Acceptor reactions of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus* sp, *Biotechnology Letters*, 23:13-16p.
- Koç, B. ve Kaymak-Ertekin, F.** 2009, Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları. *GIDA* 35(1):1-8s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Korneli, C., Biedendieck, R., David, F., Jahn, D. and Wittmann, C.** 2013, High Yield Production of Extracellular Recombinant Levansucrase by *Bacillus megaterium*, *Appl Microbial Biotechnol*, 97:3343-3353p.
- 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.
- Layne, E.** 1957, Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods in Enzymology*, 1957. 3: p. 447-455
- Laemmlı, U.K.** 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:680-685p.
- Li, W., Yu, S., Zhang, T., Jiang, B., and Mu, W.** 2015, Recent Novel Applications of Levansucrases, *Appl Microbiol Biotechnol*, 99 (17):6959-6969p.
- Martínez-Fleites, C., Ortíz-Lombardía, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E.J., Arrieta, J.G., Hernández, L. and Davies, G.J.** 2005, Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *The Biochemical Journal*, 390:19-27p.
- Metin, K.** 2007, Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri. Moleküler Biyoloji (Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B.), Nobel Yayıncılık, Ankara, 555-598s.
- Myers, R.H. and Montgomery, D.D.** 1995, Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments, *John Wiley & Sons, Inc.*, New York, 700p.
- Myers, R.H., Montgomery, D. C. and Anderson-Cook, C. M.** 2009, Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, *Wiley Publication*, Canada, 19-40p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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, *Int J Biol Macromol*, 54:30-36p.
- Oseguera, M. A. P., Guera, L. and LopezMunguia, A.** 1996, Properties of Levansucrase from *Bacillus circulans* , *Appl. Microbiol Biotechnol*, 45: 465-471p.
- Pabst, M.J.** 1977, Levan and Levansucrase of *Actinomyces viscosus*, *Infection and Immunity*, 15(2):518-526p.
- Padma Ishwarya, S. and Prabhasankar, P.** 2013, Fructooligosaccharide-Retention During Baking and its Influence on Biscuit Quality, *Food Biosci*, 4:68–80p.
- Park, J., Oh, T. and Yun, J.W.** 2001, Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6, *Process Biochemistry*, 37:471–476pp.
- Pentjuss, A., Odzina, I., Kostromins, A., Fell, D. A., Stalidzans, E., & Kalnenieks, U.** 2013. Biotechnological potential of respiring *Zymomonas mobilis*: A stoichiometric analysis of its central metabolism. *Journal of Biotechnology*, 165(1):1–10p.
- Protonotariou, V., Euagelia, K., Evageliou, V., Yanniotis, S. and Mandala, I.** 2013, Rheological and Sensory Attributes of Cream Caramel Dessert Containing Fructooligosaccharides as Substitute Sweeteners, *Int J Food Sci Tech*, 48:663-668p.
- Rehm, A.** 2009, Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursor: Application and Perspectives, Norfolk, UK: Caizer Academic Press, 145p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Renuka, B., Kulkarni, G., Vijayananol, P. and Prapulla, G.** 2013, Fructooligosaccharides for Notification of Selected Fruit Juice Beverages: Effect on the Quality Characteristic, *Lwt-Food Sci Technol*, 42:1031-1033p.
- Rogers, P.L., Lee, K.J., Skotnichi, M.L. and Tribe D.E.** 1982, Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*. *Advances in Biochemical Engineering*, 23:37-84p.
- Ruiz-Argueso, T. and Rodriguez-Navarro, A.** 1975, Microbiology of ripening honey, *Appl. Microbiol*, 30:893-896p.
- Sahm, H., Bringer-Meyer, S. and Sprenger, G.** 2006, The genus *Zymomonas*, In: Balows, A., Truper, H., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K., *The Prokaryotes*, 3rd edition, Springer-Verlag, New York, 201-221p.
- Sangeetha, P.T.** 2003, Microbial production of fructooligosaccharides, Department of Fermentation Technology & Bioengineering Central Food Technological Research Institute, PhD thesis, India, 290p.
- Sangeethaa, P., Ramesha, M. and Prapulla, S.** 2005, Recent Trends in the Microbial Production, Analysis and Application of Fructooligosaccharides, *Trends Food Sci Technol.*, 16:442–457p.
- Santos-Moriano, P., Fernandez-Arrojo, L., Poveda A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A. and Plou, F.J.** 2015, Levan versus Fructooligosaccharide Synthesis Using the Levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of Reaction Conditions, *J Mol Catal B: Enzym*, 119:18–25p.
- Schügerl, K. and Bellgarat, K.H.** 2000, Metabolic Analysis of *Zymomonas mobilis*, A. A. de Graff (Edt.), Springer, New York, 478-496p.
- Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T. and Goksungur, Y.** 2014, Levan Production by *Zymomonas mobilis* in Batch and Continuous Fermentation Systems, *Carbohydr Polym*, 99:454-461p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Simms, P.J., Boyko, W.J. and Edwards, J.R.** 1990, The Structural Analysis of a Levan Produced by *Streptococcus salivarius* SS2, *Carbohydrate Research*, 208:193-198p.
- Sprenger, G.A.** 1996, Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes, *FEMS Microbiology Letters*, 145(3):301–307p.
- Srikanth, R., Reddy, C. Siddartha, G., Ramaiah, M. and Uppuluri, K.,** 2015a, Review on Production, Characterization and Applications of Microbial Levan, *Carbohydr Polym*, 120:102–114p.
- Srikanth, R., Siddartha, G., Sundhar, Reddy, C., Haris, B., Janaki-Ramaiah, M. and Uppuluri, K.** 2015b, Antioxidant and Anti-inflammatory Levan Produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its Statistical Optimization, *Carbohydr Polym*, 123:8–16p.
- Suzuki, M. and Chatterton, N.J.** 1993, Science and Technology of Fruktans. CRC Press, Florida, 141-168p.
- Tian, F., Inthanavong, L. and Karboune, S.** 2011, Purification and Characterization of Levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* in Intra- and Extracellular Forms Useful for the Sythesis of Levan and Fructooligosaccharides, *Biosci Biotechnol Biochem*, 75(10):1929-1938p.
- Tinzl-Malang, K., Rast, P., Grattepache, F., Sych, J. and Lacroix, C.** 2015, Exopolysaccharides from co-cultures of *Weissella confusa* 11GU-1 and *Propionibacterium freudenreichii* JS15 Act Synergiestically on Wheat Dough and Bread Texture, *Int J Food Microbiol*, 214:91-101p.
- Trujillo, E., Arrieta, G., Dafhnis, F., Garcia, J., Valdes, J., Tambara, Y. and Perez, M.** 2001, FOS Production by the *Gluconacetobacter diazotrophicus* Levansucrase Expressed in the Methylo-trophic yeast *Pichia pastoris*, *Enzyme Microb Tech*, 28:139–144p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- vanHijum, S., Szalowska, E., Van der Maarel, M. and Dijkhuizen, L.** 2004, Biochemical and Molecular Characterization of a Levansucrase from *Lactobacillus reuteri*, *Microbiology*, 150:621–630p.
- Vigants, A., Marx, S., Linde, R., Ore, S., Bekers, M., Vina, I. and Hicke H.** 2003, A Novel and Simple Method for the Purification of Extracellular Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Curr Microbiol*, 47: 198-202.
- Viikari, L. and Korhola. M.** 1986, Fructose Metabolism in *Zymomonas mobilis*, *Applied Microbiology*, 24:471-476p.
- 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, *J Biotechnol*, 155:338–349.
- Waldherr, F., Meissner, D. and Vogel, R.** 2008, Genetic and Functional Characterization of *Lactobacillus panis* Levansucrase, *Arch Microbiol*, 190: 497–505p.
- Wang, X. D. and Rakshit, S. K.** 2000, Isooligosaccharide production by multiple forms of transferase enzymes from *Aspergillus foetidus*, *Process Biochemistry*, 35:771-775p.
- Wu, F., Chou, S. and Shih, I.** 2013, Factors Affecting the Production and Molecular Weight of Levan of *Bacillus subtilis* natto in Batch and Fed-batch Culture in Fermenter, *J Taiwan Inst Chem Eng*, 44(6):846–853p.
- Yıldız, S.** 2011, The Metabolism of Fructooligosaccharides and Fructooligosaccharide-Related Compounds in Plants, *Food Rev Int*, 27:16–50p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

YuWang, M., Tao Zeng, M., Shu-e Wang, M., WeiWang, M., QianWang, M. and Hong-XiaYu, M. 2010, Fructooligosaccharides Enhance the Mineral Absorption and Counter Act the Adverse Effects of Phytic Acid in Mice, *Nutrition*, 26:305-311p.

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, *Carbohydr Polym*, 101:975–981p.



ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler:**

Adı Soyadı: Özlem ERDAL

Doğum yeri: İscehisar

Doğum Tarihi: 30.03.1992

Unvan: Yüksek lisans öğrencisi

Adres: Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği

Eğitim Bilgileri:

Yüksek lisans (2014-2016): Ege Üniversitesi Gıda Müh. A.B.D (İzmir)

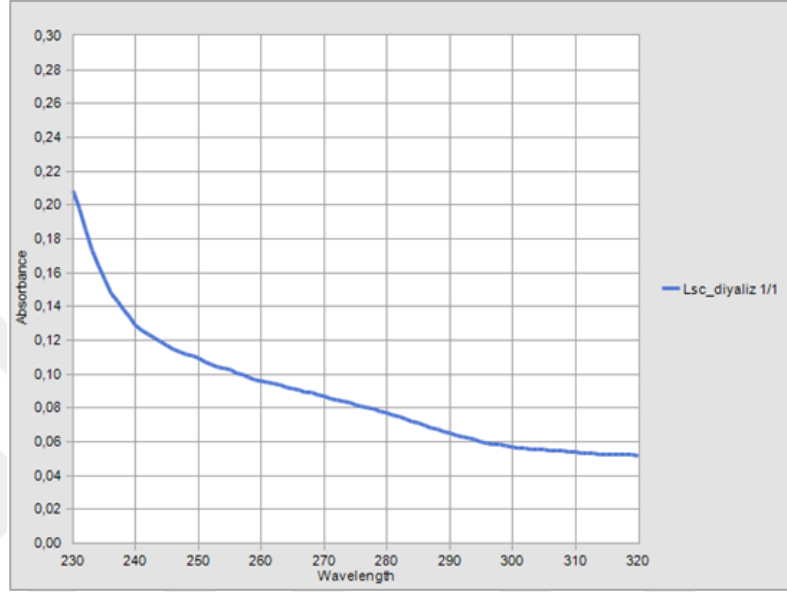
Yandal (2012-2015): Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü

Lisans (2010-2014): Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği

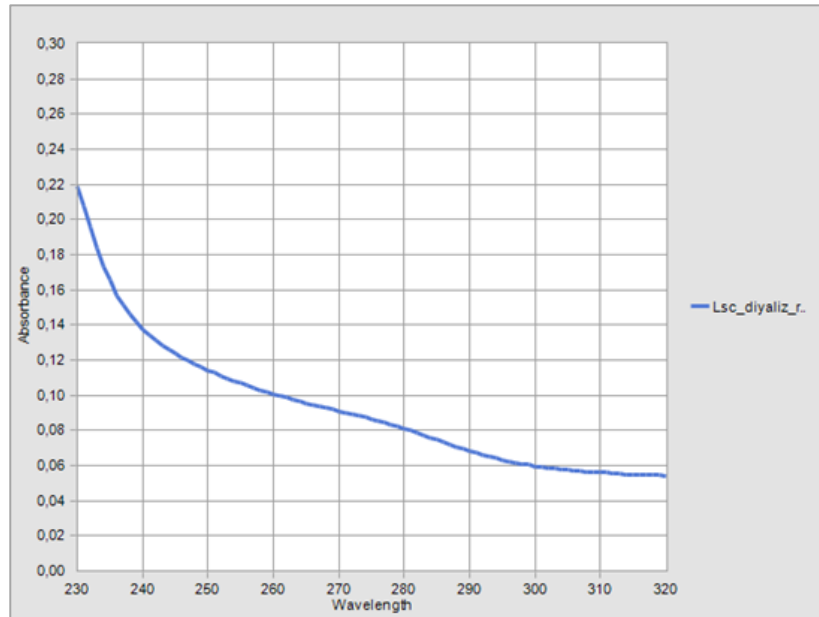
E-mail:

ozlem.erdal.ege@gmail.com

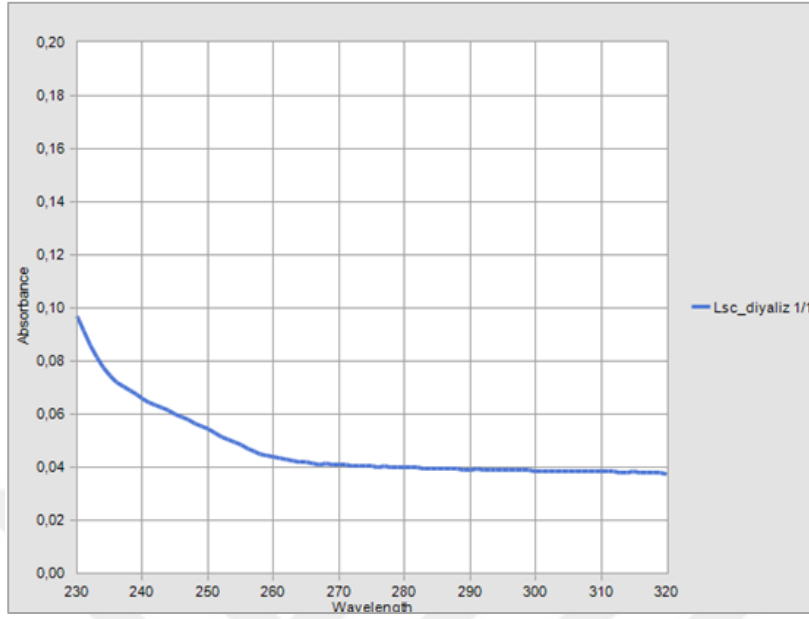
EKLER



Ek 3.1 280 nm'de diyaliz sonrası enzimin spektrasi



Ek 3.2 280 nm'de diyaliz sonrası enzimin spektrasi



Ek 3.3 280 nm'de 22 mM pH 5.4 sitrat-fosfat tamponunun spektrasi