

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

MODİFİYE DEKSTRANSÜKRAZ
KULLANARAK PREBİYOTİK SENTEZİ

MAHMUT PARLAK
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE

2013

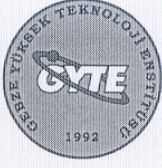
T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

MODİFİYE DEKSTRANSÜKRAZ
KULLANARAK PREBİYOTİK SENTEZİ

MAHMUT PARLAK
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. AZİZ TANRISEVEN
EŞ DANIŞMAN: Doç. Dr. DURAN ÜSTEK

GEBZE
2013



DOKTORA TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28/12/2012 tarih ve 2012/47 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 03/01/2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Mahmut Parlak'ın tez çalışması Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN (GYTE, Kimya Anabilim Dalı)

ÜYE

(EŞ DANIŞMAN) : Doç. Dr. Duran ÜSTEK (İÜ, İstanbul Tıp Fakültesi, DETAE, Genetik)

ÜYE

: Prof. Dr. Bülent KESKİNER (GYTE, Çevre Mühendisliği)

ÜYE

: Doç. Dr. Ali TÜRKAN (GYTE, Kimya Anabilim Dalı)

ÜYE

: Doç. Dr. M. Fatih ABASIYANIK (FÜ, Genetik ve Biyomühendislik)

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../2012 tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: MODİFİYE DEKSTRANSÜKRAZ KULLANARAK PREBİYOTİK SENTEZİ

YAZARIN ADI: MAHMUT PARLAK

Prebiyotikler, glikozidik bağlarla bağlı 2-10 monosakkarit biriminden oluşan oligosakkaritlerdir. İzomaltooligosakkaritler yaygın olarak kullanılan ve binlerce ton üretilen prebiyotiklerdendir. İnsanlar tarafından sindirilemeyen bu karbohidratlar bağırsakta yaşayan *Bifidobacterium*, *Laktobacillus* gibi yararlı bakteriler tarafından fermente edilebilir. Bu oligosakkaritlerin dış çürümesinin önlenmesi, kabızlık ve ishal gibi hastalıkların giderilmesi, kemik erimesinin önlenmesi ve kolesterolün düşürülmesi gibi çok önemli faydaları vardır.

Bu prebiyotikler B-512F Dekstransükraz'ın akseptör reaksiyonlarıyla ticari olarak üretilmektedir. Endüstriyel öneme sahip olan bu enzim aynı zamanda dekstran üretiminde de kullanılmaktadır. Prebiyotik üretiminin ekonomik olabilmesi için enzim immobilize olarak kullanılmalıdır. Bu enzimin kovalent olarak immobilizasyonu üzerine yapılan çalışmalarda enzimin yapısından kaynaklanan sebeplerden dolayı başarılı sonuçlar alınamamıştır. Enzimin yapısında bulunan dekstranın enzim üzerindeki reaktif grupların reaksiyonlarını önlemesi ve enzim aktif bölgesinde bulunan amino asitlerin immobilizasyon matriks reaktif gruplarıyla reaksiyonları bu enzimin kovalent immobilizasyonunu etkilemektedir. Bu tez çalışmasında immobilizasyonda karşılaşılan problemleri çözmek için, biyo-mühendislik metodları kullanılarak yeni bir B-512F dekstransükraz üretilmiştir. Dekstransükraz sinyal peptit, değişken gölge, katalitik bölge ve glukana bağlama bölgesi olmak üzere dört bölgeden oluşmaktadır. Yeni dekstransükrazın üretiminde, sinyal peptit, değişken bölge ve glukana bağlama bölgeleri gen mühendisliği ile kırıldı ve kovalent immobilizasyonun gerçekleşebilmesi için enzimin N-terminaline vektör kaynaklı Glutasyon S-transferaz ilave edildi. Bu enzim ticari bir immobilizasyon matriksi olan Eupergit C 250L üzerine başarılı bir şekilde (%100 immobilizasyon verimi, %83.3 aktivite verimi) kovalent olarak immobilize edildi. Immobilize enzim

karakterize edildi ve dekstran/prebiyotik üretimlerinde başarılı olarak kullanılabilceği gösterildi. Prebiyotik üretimlerinde glukoz ve maltoz akseptor olarak kullanıldı. Endüstriyel kullanım potansiyeli olan yeni enzimin doğal dekstransükraza göre daha fazla prebiyotik üretimini gerçekleştirdiği belirlendi.

SUMMARY

TITLE OF THESIS: PREBIOTIC SYNTHESIS USING MODIFIED DEXTRANSUCRASE

AUTOR NAME: MAHMUT PARLAK

Prebiotics are oligosaccharides consisting of 2-10 monosaccharide units. One of the prebiotics is isomaltooligosaccharides that are widely used and produced in large quantities. Despite not being digested by humans, these carbohydrates can be fermented by such beneficial bacteria as *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* living in the human large intestines. These oligosaccharides have important biological functions such as preventing tooth decay and osteolysis, alleviating constipation and diarrhea and reducing cholesterol level.

These prebiotics have been commercially produced using acceptor reactions of B-512F Dextranase. This industrially important enzyme is also used in dextran production. In order to produce prebiotics economically, this enzyme must be used in immobilized form. Due to the structure of the enzyme, successful results have not been attained in its covalent immobilization. Covalent immobilization of dextranase is hindered by the dextran associated with the enzyme preventing reactive groups on the enzyme from reacting with immobilization matrix. In addition, the essential amino acids at the active site of the enzyme react with the reactive groups of matrix, resulting in low activity yields. In this dissertation, a novel B-512F dextranase was produced using bio- engineering methods to overcome the problems faced in the immobilization process. Dextranase is composed of four regions, namely signal peptide, variable region, catalytic region, and glucan binding region. In producing the novel dextranase, signal peptide, variable region, and glucan binding regions are truncated. To enable covalent immobilization of dextranase, vector-originated glutathione S-transferase was added to the N-terminal of the enzyme. This novel enzyme was successfully immobilized covalently onto a commercial immobilization matrix called Eupergit C 250L, yielding 100% immobilization and 83.3% activity yields. The immobilized enzyme was characterized and it was shown that it could be used successfully in dextran and prebiotics productions. Glucose and

maltose were used as acceptors in the prebiotic production. The novel enzyme, having a potential to be used industrially, produces more prebiotics than the native dextransucrase.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın her aşamasında, her türlü konuda desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Aziz Tanrıseven ve Doç. Dr. Duran Üstek e,

Çalışmalarımın her aşamasında her türlü konuda desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Hülya Azaklı ya, Dr. Neslihan Abacı ya, Dr. Aris Çakiris e, Nilgün Genç e, Fırat Çaralan a, Pınar Akkuş a, Fatih Aktaş a ve Betül Genç e,

İsimlerini sayamadığım bütün DETAE Destek laboratuvar arkadaşlarıma,

Yine isimlerini sayamadığım GYTE Biyokimya bölümündeki laboratuvar arkadaşlarıma,

Ayrıca tüm hayatım boyunca yanımda olan ve beni her konuda destekleyen sevgili annem Hatice Parlak, babam Muhittin Parlak, abilerim ve kardeşlerim ile eşlerine,

en içten duygularım ile teşekkür ederim.

Bu tez çalışması GYTE Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından 2009-A-03 no lu BAP araştırma projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
SUMMARY	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
SİMGE VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XIII
GRAFİKLER DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. B-512F Dekstransükraz	4
1.2. DSR-S Üretimi	6
1.3. Dekstran	6
1.4. Dekstran Biyosentezi	9
1.5. Probiyotik ve Prebiyotikler	13
1.6. Prebiyotik Sentezi	17
1.6.1. Akseptör Reaksiyonları	18
1.7. İmmobilizasyon Çalışmaları	20
1.7.1. Eupergit C	23
1.7.2. DSR-S nin İmmobilizasyonu	24
2. MATERYAL	28
2.1. Mikroorganizma ve Enzim	28
2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	28
2.3. Kullanılan Cihazlar	30
3. YÖNTEM	31
3.1. Besiyerleri	31
3.2. Çözeltiler	32

4. METODLAR	37
4.1. <i>L. mesenteroides</i> B-512 FMC-13 Glc nin Üretimi	38
4.2. Genomik DNA izolasyonu	38
4.3. Genomik DNA dan <i>dsr-s</i> nin İzolasyonu	39
4.4. TA Klonlama	40
4.5. <i>dsr-s</i> Geninin Dizi Analizi	40
4.6. <i>dsr-s</i> nin Kırılması	41
4.7. Enzim Kesimi	42
4.8. Bağlama İşlemi	43
4.9. Transformasyon İşlemi	44
4.10. Klonlama İşleminin Analizi	44
4.11. Protein Sentezi Optimizasyonu	45
4.12. KDSR-S Enziminin Miktar Tayini	46
4.13. Kantitatif Karbohidrat Tayini	47
4.14. fKDSR-S ve İmmobilize fKDSR-S nin Aktivite Tayini	47
4.15. Optimum Sıcaklık, pH ve Kinetik Parametrelerin Tespiti	48
4.16. Sıcaklık ve pH Kararlılığının Tespiti	48
4.17. Tampon Çözelti Çeşitlerinin Enzim Aktivitesine Etkisi	48
4.18. Dekstran ve Akseptör Reaksiyonları	48
4.19. İmmobilizasyon Optimizasyonu	49
4.20. İmmobilizasyon	49
4.21. İmmobilize fKDSR-S nin Reaksiyon ve Depolama Kararlılığı	49
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	50
5.1. Genetik Çalışmalar	51
5.2. Protein Sentezinin Optimizasyonu	54
5.3. fKDSR-S nin Karakterizasyonu	57
5.4. fKDSR-S nin Eupergit C 250L ye İmmobilizasyonu	62

5.5. İmmobilize Enzim Karakterizasyonu	66
5.6. İmmobilize fKDSR-S Dekstran-Prebiyotik Sentezi	69
6. SONUÇ	72
KAYNAKLAR	77

SİMGE VE KISALTMALAR

APS	: Amonyum persulfat
Ca	: Kalsiyum
Ca-ac	: Kalsiyum asetat çözeltisi
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CTAB	: Hekzadesil trimetil amonyum bromide
Da	: Dalton
ddH ₂ O	: İki kere distile su
dH ₂ O	: Distile su
DSR-S	: B-512F dekstrasükraz
EDTA	: Etilen diamidin tetraasetik asit
fKDSR-S	: Glutathione S-transferase ile füzyon edilmiş KDSR-S
g	: Gram
G	: Geri primer
Xg	: merkezciil kuvvet
İ	: İleri primer
IPTG	: Isopropil β -D-1-thiogalaktopiranosid
kDa	: kilo dalton
KDSR-S	: Kırpılmış B-512F Dekstransükraz
KCl	: Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidroksi fosfat
M	: Molar
μ g	: Mikrogram

MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
mL	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
MRS	: De man, rogosa ve sharpe besi yeri
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum hidroksi fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
°C	: Derece santigrat
OD	: Optik yoğunluk
PBS	: Fosfat tuz tamponu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun negatif logaritması
PMSF	: Fenilmethilsulfonyl florid
SDS	: Sodyum Dodesil sülfat
TAE	: Tris-asetat-EDTA
TE	: Tris EDTA
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
v/v	: hacim/hacim
w/v	: ağırlık/hacim
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil-b-D-galaktosid

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Dekstransükraz reaksiyonu [Robyt, 1985]	1
1.2: Dekstransükrazın prebiyotik reaksiyonları.	2
1.3: B -512F dekstransükraz yapısı [Monchois et al., 1997].	4
1.4: Dekstran yapısı [Robyt, 1985].	7
1.5: DSR-S tarafından α -1,6 glukan sentezinin başlaması ve uzaması [Robyt et al., 2008].	11
1.6: Dekstranın sonlanma (A-B) ve dallanma (C) reaksiyonları (ABB: Akseptör Bağlanma Bölgesi) [German et al., 1999].	12
1.7: İzomaltooligosakkarit yapısı.	14
1.8: Galaktooligosakkarit yapısı.	15
1.9: Fruktooligosakkarit yapısı.	15
1.10: Dekstranın asit ya da dekstranaz ile muamelesi sonucu izomaltooligosakkarit üretimi.	18
1.11: Dekstransükrazın akseptör reaksiyonları (akseptör: maltoz) [German et al., 1999].	20
1.12: Eupergit C yapısı [Katchalski-Katzir and Kraemer, 2000].	23
4.1: Tez çalışmasında uygulanan metodların özeti.	37
4.2: <i>dsr-s</i> geninin kırpma işleminin gerçekleştirildiği bölge.	41
5.1: PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü [a: <i>dsr-s</i> (226 ng/ μ l), b: <i>tdsr-s</i> (97 ng/ μ l)].	51
5.2: fKDSR-S ve DSR-S nin SDS-PAGE görüntüsü.	51
5.3: <i>kdsr-s</i> geninin ve pGEX 4T-1 vektörünün <i>BamH I</i> ve <i>Xho I</i> restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildikten sonra % 1 lik agaroz gel görüntüsü [<i>kdsr-s</i> : 2648 bp (73 ng/ μ L), pGEX 4T-1: 4942 bp (242 ng/ μ L)].	53
5.4: pGEX 4T-1 + <i>kdsr-s</i> vektörünün <i>BamH I</i> ve <i>Xho I</i> restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildikten sonra agaroz gel elektroforez görüntüsü.	53
5.5: Modifiye Studier Oto-induction indüklemesi sonucu zamana bağlı fKDSR-S üretimi.	56

- 5.6:** Optimum şartlarda modifiye studier oto-induction besiyerinde üretilen rekombinant *E. coli* hücre pelleti, üst sıvı ve saflaştırma sonucu elde edilen fKDSR-S miktarları. 56
- 5.7:** fKDSR-S ve DSR-S enzimlerinin dekstran ve akseptör ürünlerinin TLC analizleri. 60
- 5.8:** Eupergit C 250L ve Eupergit C matrislerine immobilize edilen fKDSR-S nin katalizlediği maltoz akseptör reaksiyonlarının ince tabaka kromatografisi (TLC). 63
- 5.9:** İmmobilize fKDSR-S ve DSR-S tarafından sentezlenen dekstran ve akseptör ürünlerinin TLC ile incelenmesi. 70
- 5.10:** fKDSR-S ve immobilize fKDSR-S ürün bileşiminin TLC analizi. 71

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Dekstransükrazın sınıflandırılması [Robyt, 1985].	1
1.2: Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar [Salminen et al., 1999].	13
1.3: DSR-S enziminin akseptörleri ve akseptör reaksiyonları sonucunda oluşan ürünler [Herman et al., 1996].	19
1.4: Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.	22
1.5: İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması [Wiesman, 1983].	23
2.1: Kullanılan sarf malzeme listesi.	28
2.2: Kullanılan cihazların listesi.	30
3.1: MRS besiyeri içeriği.	31
4.1: <i>dsr-s</i> geninin <i>L. mesenteroides</i> B-512 FMC-13 Glc suşunun genomik DNA sından izolasyonu için kullanılan PCR şartları.	40
4.2: <i>dsr-s</i> geninin kırılması amacı ile kullanılan PCR şartları.	42
4.3: <i>kdsr-s</i> geni ve pGEX 4T-1 vektörünün klonlama amaçlı <i>BamH I</i> ve <i>Xho I</i> restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim şartları.	42
4.4: <i>kdsr-s</i> geni ve pGEX 4T-1 vektörünün bağlama şartları (1:3 oranı).	43
4.5: pGEX 4T-1 + <i>kdsr-s</i> klon vektörünün kontrolü amacı ile yapılan enzim kesim şartları.	45
5.1: fKDSR-S karakterizasyonu.	52
5.2: Eupergit C 250L miktarının fKDSR-S immobilizasyonuna etkisi.	63
5.3: Tampon çözelti konsantrasyonunun fKDSR-S immobilizasyonu üzerine etkisi.	64
5.4: İnkübasyon süresinin fTDSR-S nin immobilizasyonu üzerine etkisi.	64
5.5: pH nın fTDSR-S immobilizasyonu üzerine etkisi.	65

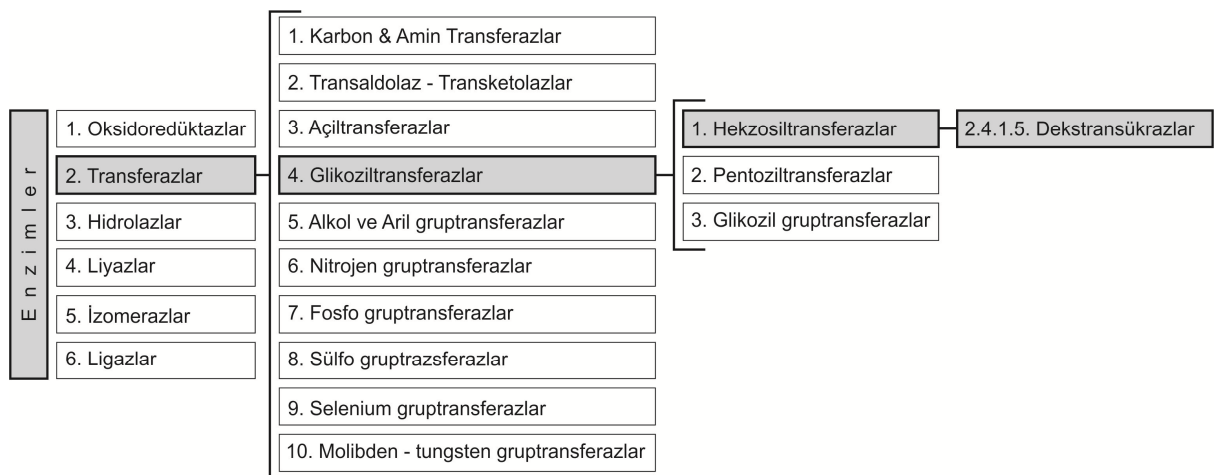
GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
5.1: <i>E. coli</i> BL21 (DE3) rekombinant bakterisinin üreme eğrisi ve fKDSR-S aktivitesi.	55
5.2: Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi (fTDSR-S -●-, DSR-S -○-).	57
5.3: Enzim aktivitesine pH nın etkisi (fTDSR-S -●-, DSR-S -○-).	58
5.4: Enzim kararlılığına sıcaklığın etkisi (fTDSR-S -●-, DSR-S -○-).	58
5.5: Enzim kararlılığına pH nın etkisi (fTDSR-S -●-, DSR-S -○-).	58
5.6: Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi.	59
5.7: Kalsiyum asetat (-●-) ve sodyum asetat (-○-) tampon çözelti konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi.	61
5.8: Kalsiyum klörür (a) ve tampon çözeltilerin (b) enzim aktivitesi üzerine etkisi.	61
5.9: Tampon çözeltilerin enzim aktivitesi üzerine etkisi.	62
5.10: fKDSR-S için Lineweaver–Burk grafiği.	62
5.11: BSA uygulamasının immobilize fKDSR-S aktivitesi üzerine etkisi.	66
5.12: pH nın serbest fKDSR-S (-●-) ve immobilize fTDSR-S (-○-) aktivitesi üzerine etkisi.	66
5.13: Sıcaklığın serbest fKDSR-S (-●-) ve immobilize fTDSR-S (-○-) aktivitesi üzerine etkisi.	67
5.14: pH nın serbest fKDSR-S (-●-) ve immobilize fTDSR-S (-○-) nin kararlılığına etkisi.	67
5.15: Sıcaklığın serbest fKDSR-S (-●-) ve immobilize fTDSR-S (-○-) nin kararlılığına etkisi.	68
5.16: Serbest (-●-) ve immobilize (-○-) fKDSR-S için Lineweaver-Burk grafikleri.	68
5.17: İmmobilize fTDSR-S nin reaksiyon kararlılığı.	69
5.18: İmmobilize fTDSR-S nin saklama kararlılığı.	69

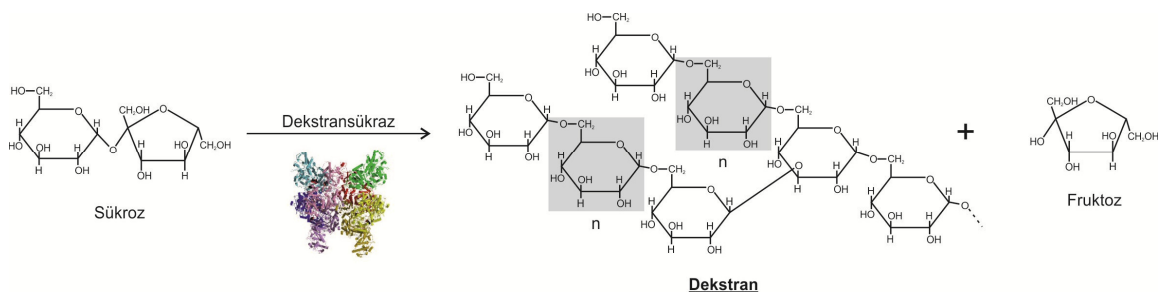
1. GİRİŞ

Sükrozu substrat olarak kullanarak dekstran üreten enzimler dekstransükraz olarak adlandırılır ve glikozid hidrolaz 70 ailesinin bir üyesidir (Tablo 1.1) [Coutinho and Henrissat, 1999]. Dekstransükrazlar *Leuconostoc*, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* cinslerinden olan lakto bakteriler tarafından üretilir [Monsan et al., 2001].

Tablo 1.1: Dekstransükrazın sınıflandırılması [Robyt, 1985].

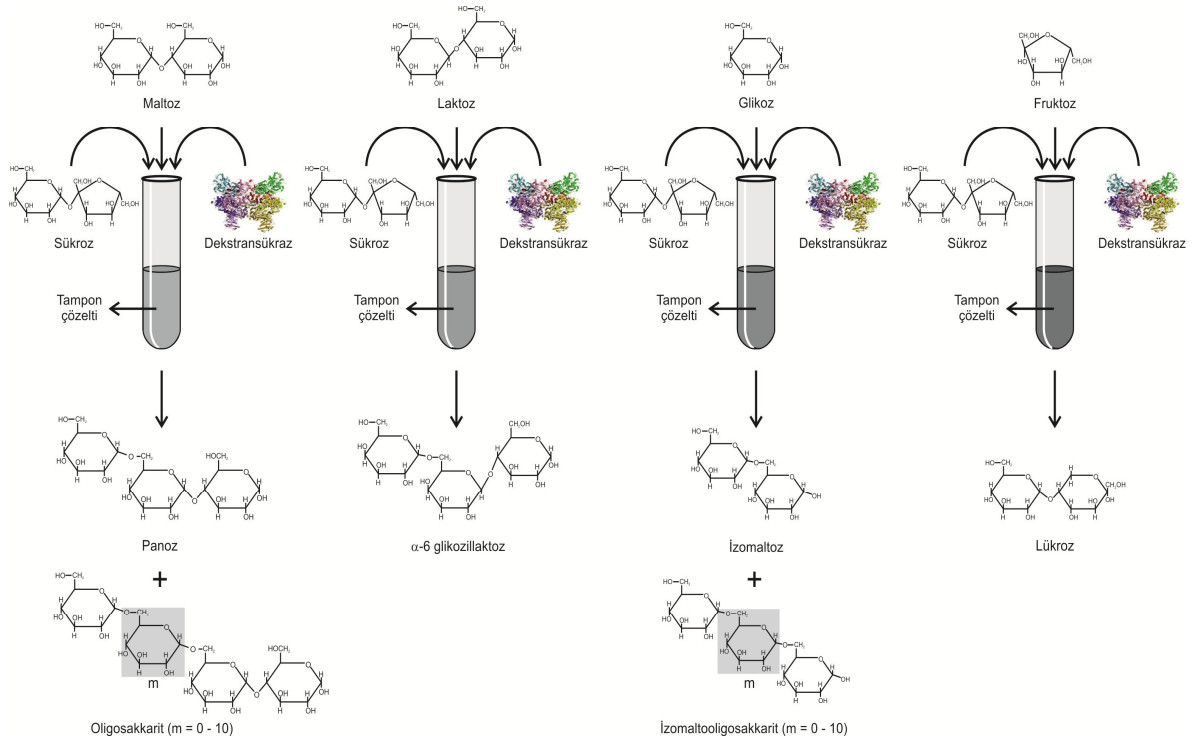


Endüstriyel olarak kullanılan dekstransükraz, sükrozun D-glikopiranozil rezidüslerinin transferini kataliz ederek dekstran üreten bir hücre dışı glikozil transferaz enzimidir. Reaksiyon süresince sükrozdan fruktoz salınımı gerçekleşir (Şekil 1.1) [Robyt, 1985].



Şekil 1.1: Dekstransükraz reaksiyonu [Robyt, 1985]

Bu enzim, sükrozun yanında ortama akseptör madde (glikoz, fruktoz, maltoz, laktoz vs.) eklenmesi halinde sükrozun bir kısım glikoz birimlerini bu akseptörlere transfer ederek izomaltooligosakkarit gibi prebiyotik ürünlerini sentezler (Şekil 1.2). Bazı akseptör ürünler gıda, ilaç ve kozmetik gibi bir çok alanda prebiyotik olarak kullanılmaktadır.



Şekil 1.2: Dekstransükrazın prebiyotik reaksiyonları.

Dekstransükrazın, değişik molekül ağırlıklara sahip (64-245 kDa) formlarının olduğu bildirilmiştir [Kobayashi and Matsuda, 1976, 1980; Tanriseven and Robyt, 1992; Goyal and Katiyar, 1994].

Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F dekstransükraz (DSR-S) sükrözden dekstran üretimi için kullanılan tek ticari enzimdir. Enzim miktarı, sıcaklık ve sükröz konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dekstranın molekül ağırlığı değişir. Bu şekilde elde edilen ticari dekstran ise yaklaşık olarak 10^8 Da büyüklüğündedir [Robyt, 1985].

10 ile 100 kDa büyüklüğündeki dekstranların ticari olarak doğrudan sentezi şu an için mümkün değildir. Halihazırda üretilen düşük molekül ağırlıklı dekstranlar, yüksek moleküler ağırlıklı dekstranların asit hidrolizi sonrasında organik çözücülerde fraksiyonlaması ile elde edilmektedir. Fakat ikinci basamağın verimliliği çok düşüktür [Khalikova et al., 2005].

Monchois ve arkadaşları, DSR-S nin karboksil ucunu kırptığında, C-terminalde lokalize olan glukon bağlama bölgesinin rolünün aktif bölgenin uzağında dekstran ve oligosakkarit transferine olanak sağladığını gördüler [Monchois et al., 1998].

Amerikan patenti US-A-5,229,277 *Leuconostoc mesenteroides* ve mutant *Lipomyces satarkei* ATCC 74054 (bir maya olan *Lipomyces satarkei* ATCC 74054 nin ürettiği dekstranaz, dekstranın α -1,6 bağlarının hidrolizini gerçekleştirir) kullanarak homojen ve düşük molekül ağırlıklı dekstran polimerleri üretilmesini tarif eder. Bu metod özel kültür koşulları ve titizlikle düzenlenmiş reaksiyon şartları gerektirir. Bu metodla üretilmiş dekstran 40 ila 150 kDa arasında molar ağırlıklara sahiptir [Wilke-Douglas et al., 1989].

Asit hidrolizi ve fraksiyonlamanın maliyet ve zahmetinin yüksek olması hızlı ve daha verimli bir şekilde moleküler ağırlığı 10 ila 100 kDa arasındaki dekstranların üretimine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Ticari açıdan bakılınca 2-6 monomer sayısına sahip IMO verimliliği çok düşük olduğu için dekstransükrazın akseptör reaksiyonları ile üretimi çok maliyetlidir. Bu nedenle hali hazırda IMO lar nişastanın α -amilaz ve glukozidaz enzim karışımlarının hidrolizi ile üretilmektedir [Nakakuki, 2002].

Bu tez çalışması, enzimatik yolla ve düşük maliyetli prebiyotik sentezini gerçekleştirmek amacı ile rekombinant DNA teknolojisi kullanarak yeni bir B-512F Dekstransükraz ın üretimi ve immobilizasyon çalışmasıyla ilgilidir. Bu yeni enzim, dekstransükraz geninin kırılması ve Glutathione S-transferase (GST) proteinine füzyonu ile üretilmiştir. Aktif olarak üretilen bu enzim yüksek başarı ile (%100 immobilizasyon ve %83.3 aktivite verimi ile) Eupergit C 250L matrisine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimin üretim ve karakterizasyonu yapıldı.

Bu tez çalışması aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

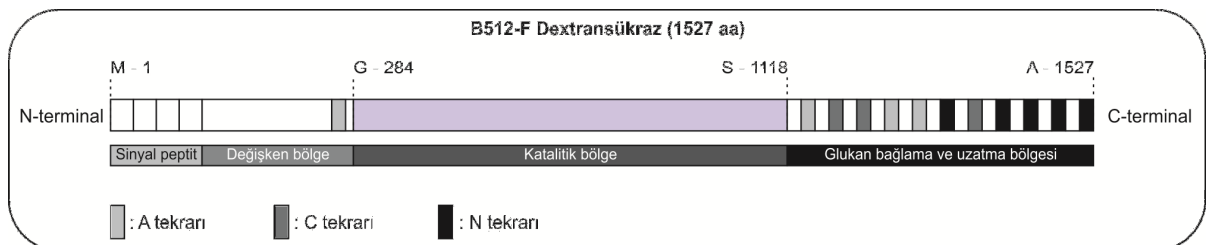
1. DSR-S nin nükleotit dizisi üzerinden PCR yöntemi ile kırılması,
2. Kırılmış gen parçasının pGEX 4T-1 vektörüne yüklenmesi,
3. Kırılmış gen parçasının vektör yapısında bulunan GST geni ile füzyon hale getirilmesi,
4. Rekombinant vektörün konak bakteriye aktarıldıktan sonra maksimum-aktif enzim üretimi için optimum bakteri üreme şartlarının tespiti,

5. Üretilen rekombinant enzimin karakterizasyonu,
6. Rekombinant enzimin Eupergit C 250L matriksine immobilizasyonu ve optimum immobilizasyon şartlarının tespiti,
7. İmmobilize rekombinant enzimin karakterizasyonu,
8. İmmobilize rekombinant enziminin prebiyotik sentezinde kullanılması.

1.1. B-512F Dekstransükraz

Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F dekstransükraz (DSR-S) 1527 amino asit içerir [Monchois et al., 1997; Wilke-Douglas, 1989]. Bu enzim % 95 den fazla α -1,6 bağları olan glikoz homopolimerlerinin sentezini gerçekleştirir. Reaksiyon ortamına uygun akseptörler eklenmesi ile dekstran üretimi oligosakkarit veya glikozillenme sentezine yönlendirilebilir [Koepsell et al., 1953; Monchois et al., 1997].

Yapılan çalışmalar DSR-S nin dört farklı bölgeden oluştuğunu göstermektedir (Şekil 1.1). N-terminalde 32-34 aa lik böge sinyal peptit olduğu ve sonrasındaki 123-129 aa lik bölgenin yüksek miktarda değişkenlik gösteren bölge olduğu tespit edilmiştir. Değişken bölgeden sonraki yaklaşık 1000 aminoasitlik bölge katalitik bölge olarak isimlendirilir. Bu bölge sükrozun bağlanması ve kesilmesinde görevlidir. C-terminaldeki yaklaşık 500 aminoasitlik bölge ise peş peşe tekrarlardan oluşur. Bu bölge glukana bağlama ve uzamasından sorumlu olan bölgedir (Şekil 1.3) [Giffard et al., 1993; Simpson et al., 1995; Vickermann et al., 1997; Russell, 1990; Monchois et al., 1997].



Şekil 1.3: B -512F dekstransükraz yapısı [Monchois et al., 1997].

DSR-S nin sinyal peptiti tipik gram pozitif bakteri sinyal peptidine benzer. Bazik bir N-terminal parçayı hidrofobik çekirdek bölgesi takip eder ve daha polar bir C-terminal ile sonlanır [Izard and Kendall, 1994].

Sinyal peptidin hemen sonrasında yüksek değişkenlik gösteren bölge bulunmaktadır [Abo et al., 1991]. *L. mesenteroides* NRRL B-1299 den izole edilen DSR-A daki bu değişken bölgenin kırılması enzim aktivitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür [Monchois et al., 1996]. Enzim aktivitesinde etkisi olmayan bu bölgenin fonksiyonu bilinmemektedir [Monchois et al. 1999].

Yapılan çalışmalar enzim aktivitesinin birbirinden uzak iki farklı bölgeden oluştuğunu göstermektedir. Bu çalışmalar, DSR-S nin N-terminalinde bulunan ve sükrözün kesilmesi ve glukozil birimlerinin transferini katalizleyen bölge (katalitik bölge) ile C-terminalinde (yaklaşık 500 aa lik bölge) bulunan ve glukan zincirlerinin uzamasından sorumlu olan (glukan bağlama bölgesi) bölge olmak üzere iki farklı bölgesinin bulunduğunu göstermektedir [Ferretti et al. 1987; Mooser and Wong, 1988; Kobayashi et al., 1989; Abo et al., 1991]. Sonuç olarak C-terminalde bulunan glukan bağlama bölgesinin kırılması glikozil transferini engellemeyerek polimer sentezini durdurmaktadır [Ferretti et al. 1987; Abo et al., 1991; Kato and Kuramitsu, 1990; Lis et al., 1995; Monchois et al., 1999].

Özet olarak enzim:

- a. Enzimin hücre dışına salgılanmasını sağlayan sinyal peptit
- b. Yüksek miktarda değişkenlik gösteren bölge
- c. Reaksiyonun gerçekleşmesini sağlayan katalitik bölge
- d. Sentez sırasında dekstran uzamasını sağlayan bölge

gibi fonksiyonlarının olduğu tespit edilmiştir [Giffard et al., 1993; Simpson et al., 1995; Vickermann et al., 1997; Russell, 1990; Monchois et al., 1997].

Yapılan kinetik çalışmalarda DSR-S nin, sükröz için Km değeri 12-16 mM, optimum pH sının 5.0-5.5 ve optimum sıcaklığı 28-30 °C değerleri

arasında olduğu tespit edilmiştir [Roby, 1985; Kitaoka and Roby, 1998; Roby et al. 1995].

Dekstransükraz sinonimleri: CEP, Dekstran-sükraz, DS, DSR-S , Glukoziltransferaz, Sukroz 1, 6 α -glukan, SGE, Sukroz 6-glukoziltransferaz.

1.2. DSR-S Üretimi

Dekstransükraz üretimi için gerekli besi ortamı ve fermantasyon şartları optimize edilmiştir. Enzim üretimi için optimum pH 6.5-7.0, sıcaklık 23 °C, sükroz konsantrasyonunun ise % 2 olarak tespit edilmiştir. Hücre çoğalması sırasında ortama salınan organik artıklar nedeniyle 10 saat sonra ortam pH sı 5.0-5.5 e kadar düşmektedir. Bu pH aralığı ise DSR-S nin optimum kararlılık pH sıdır [Roby, 1985].

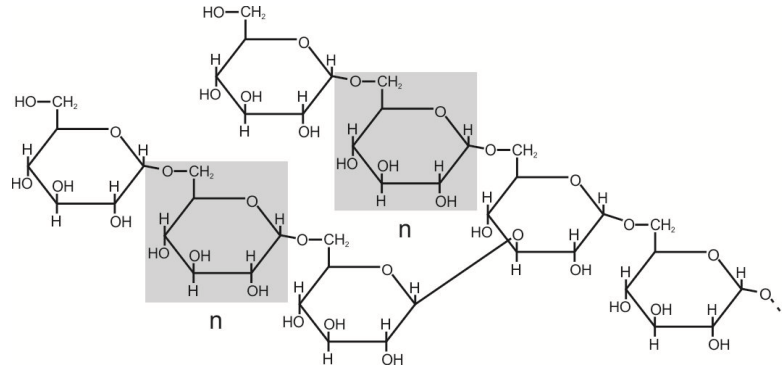
Besi ortamında % 0.5 kalsiyum klorür bulunması dekstransükraz üretimini iki kat arttırdığı gözlemlenmiştir [Roby and Walsth, 1979].

Bakteriler tarafından üretilen DSR-S nin ortamdaki sükrozların bir kısmını dekstrana dönüştürmesinden dolayı, besi ortamında sükrozun bulunması besi ortamının viskozitesini artırmasından dolayı enzim saflaştırılmasında sorunlara neden olmaktadır. Bununla birlikte, enzimin aktif yapısının kazandırılması ve kararlılığının artırılmasında yardımcı olduğu tespit edilmiştir [Kitaoka and Roby, 1998; Roby et al. 1995].

1.3. Dekstran

Bakteriyel enzimler tarafından sentezlenen ve glikozil birimlerinden oluşan bir polisakkarit sınıfı olan dektranla ilgili ilk çalışmalar 1861 yılında Pasteur tarafından yapılmıştır. Yapısı ilk kez 1874 yılında Scheubler tarafından tespit edilmiş ve dekstran olarak adlandırılmıştır [Roby, 1985].

Dekstranlar farklı yapıları bulunan α -D-glukanlardır. Dekstranlar, sıralı bir şekilde glikozil monomerlerinin birbirlerine (% 50 den fazla) α -1,6 bağları ile bağlanarak oluşturdukları düz zincirler ve α -1,2, α -1,3 ve/veya α -1,4 yan zincirlerinden oluşur (Şekil 1.4) [Monsan et al., 2001].



Şekil 1.4: Dekstran yapısı [Robyt, 1985].

Dekstran; şarap, bira, konserve meyveler, meyve suları ve şekerle muamele edilmiş jambonlarda bolca üretilmektedir. Ayrıca dekstran, şeker rafine endüstrisinde boruların ve filtrelerin içinde plakların oluşmasını sağlayarak ve kristalizasyonu engelleyerek verimin düşmesine neden olmaktadır [Herman et al., 1996]. Bunun yanında optik ölçümlerde sapmalara neden olarak sükröz saflığının belirlenmesi ve standardizasyonunda sorunlara yol açmaktadır. 1970 lerde ise dekstranın dış plaklarının önemli bir bileşeni olduğu anlaşılmıştır [Russell, 1990].

Bu olumsuzluklarının yanında dekstran kan plazması, kolon dolgu maddesi (sephadex), antikoagülant, gıda katkı maddesi, patlayıcı, güçlü yapıştırıcı gibi maddelerin üretiminde kullanılmaktadır [Thunell, 1995].

Dekstranın, alkol fraksiyonlama yöntemi ile L ve S fraksiyonları olmak üzere iki farklı türü bulunmaktadır. L fraksiyonu, % 36-37 alkol ile çöktürülen ve az çözünen türüdür. % 40-44 alkol ile çöktürülebilen ve daha çözünür olan ikinci fraksiyon ise S fraksiyonu olarak adlandırılır. *L. mesenteroides* B-1355, B-742 ve B-1299 türleri iki farklı polisakkarit üretirken, B-512 F türü tek tip (S fraksiyonu) polisakkarit üretmektedir [Herman et al., 1996].

N-asetil homosistein tiolakton ile dekstranın muamelesiyle merkaptodekstran sentezlenebilir. Disülfid bağlarını indirgeyen tiol grupları genellikle otooksidasyonlara karşı stabil değildir. Fakat oldukça reaktiftir. Gümüş, civa, bakır, gibi ağır metal iyonlarına karşı afinitesi yüksek olan merkaptodekstran akut ağır metal zehirlenmelerinde ve çevre kirliliğinin giderilmesinde kullanılmaktadır [Aaseth, 1972].

Dekstran, organ taşınması ve saklanması da kullanılabilir. Karaciğer nakillerinde kullanılan UW (University of Wisconsin) çözeltisinde hydroxyethylstarch (HES), raffinose, allopurinol, insulin, penicillin veya dexamethasone ve potasyum bulunur. Yeni geliştirilen çözeltide HES yerine dekstran-40 ve potasyum yerine sodium kullanılmaktadır. Fare kalplerinin saklanması ise % 5 lik 160 kDa molekül ağırlığına sahip dekstranlar kullanıldığında iyi sonuç alındığı tespit edilmiştir [Albes et al., 1995].

İnsanlarda antikoagulant veya antilipemik ajan olarak kullanılan 7.300 Da ağırlığındaki dekstran sülfatın HIV-1 glikoproteini ile etkileşerek onun CD4⁺ reseptörlerine bağlanmasını engellediği tespit edilmiştir [Mitsuya et al., 1988].

Epiklorohidrin ile modifiye edilen dekstran, bakteri ve virüslerin içinden geçemeyeceği kadar küçük gözeneklere sahip olduğundan, yaraların örtülmesinde kullanılmaktadır [Bellengier et al., 1997].

Özellikle belli büyüklükteki dekstran ve dekstran türevleri için endüstriyel kullanım alanları artmaktadır. Örneğin, 70 ve 100 kDa arasındaki dekstranlar yapay kan plazması yerine kullanılır [Groenwall and Ingelman, 1948]. 40 kDa boyutundaki dekstran kan akışını iyileştirmede kullanılır [Robyt, 1985; De Belder, 1996]. Sülfatlamadan sonra 10 kDa boyutunun altındaki dekstranlar demir veya antikoagulant taşıyıcıları olarak kullanılır [Ahsan, 1998; De Belder, 1996]. Bu bileşiklerin antiviral özellikleri vardır [Jagotzinski et al., 2002; Hersline, 2004].

Epiklorohidrin ile çapraz bağlanan dekstran türevleri (Sephadex), moleküler ayrıştırma alanında 1961 den bu yana kullanılmaktadır [Robyt, 1985].

Avrupa topluluğu 2000 yılında aldığı bir kararla, moleküler ağırlığı 2×10^6 daltondan büyük ve % 95 ten daha fazla α -1,6 bağı içeren dekstranların unlu mamüllerde besin katkı maddesi olarak kullanılmasına izin vermiştir [Scientific Committee On Food, 2000].

1.4. Dekstran Biyosentezi

Dekstransükrazın dekstranı sentezleyebilmesi için ortamda kesinlikle sükroz olması gerekmektedir. Glikoz, fruktoz, bu şekerlerin karışımı ya da diğer her hangi bir doğal şeker kullanarak dekstran sentezleyemez. DSR-S, dekstran sentezi için ATP veya kofaktöre gerek duymaz. Sükroz yapısındaki glikoz-fruktoz arasındaki asetal-ketal bağının kırılması ile açığa çıkan enerjiyi (16.7-20.9 kJ/mol) kullanarak dekstran yapısında bulunan glikozlar arasındaki α -1,6 bağını oluşturur. Yapay substrat olarak glukansükraz için α -D glukopironozil florid ve p-nitrofenil α -D-glukopironozid substrat olabilir [Roby, 1985].

DSR-S aktif bölgesinde iki nükleofilik bölge (Asp551, Asp662) içermektedir. Ayrıca aktif merkezde bir (Glu589) [Roby et al., 2008] veya bir ya da iki (His) [Daotian and Roby, 1988] proton verici bölge bulunmaktadır.

Dekstran biyosentezinin mekanizması aşağıda özet olarak verilmiştir.

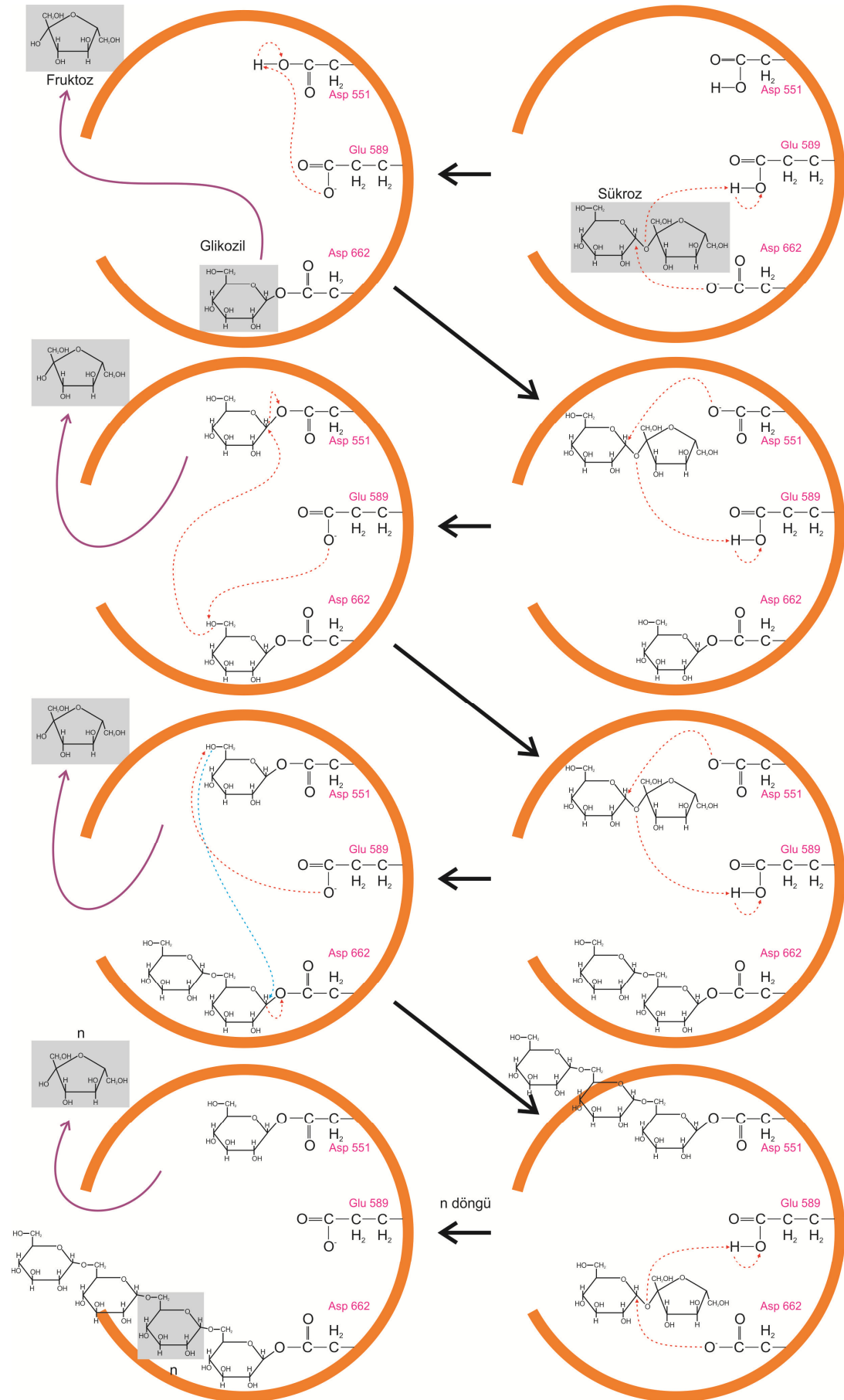
1. Enzim aktif merkezindeki her iki nükleofilik bölge de (Asp551 ve Asp662) sükroz molekülünün glikoz rezidülerinin C₁ ine nükleofilik olarak etkileşerek glikozlarla kovalent olarak bağ oluşturur.
2. Oluşan fruktoz C₄-O⁻, enzim aktif merkezindeki Glu589-OH dan (ya da imidozol-H dan) nükleofilik etki ile bir proton alır. Bunun sonucu olarak ortama bir fruktoz salınımı gerçekleşir.
3. Oluşan Glu589-O⁻ enzime bağlı glukozil rezidülerinden birinin C₆-OH grubuna nükleofilik atak yaparak glikozilin C₆-O⁻ haline dönüşmesini sağlar.
4. C₆-O⁻ haline dönüşen glikozil rezidüsü ikinci nükleofilik bölgeye bağlı olan glikozil rezidüsünün enzime kovalent olarak bağlı olan C₁ ile etkileşerek α -1,6 bağını oluşturur.
5. Böylece bir glikozil rezidüsü bir diğerine transfer edilmiş olur.
6. Serbest kalan nükleofilik etki bölgesi başka bir sükroz a atak yaparak sükrozun glikozil rezidüsünün C₁ i ile kovalent bağ yapar ve yukarıda

anlatılan reaksiyonlarla fruktozu reaksiyon ortamına salar. Yine yukarıda anlatılan reaksiyonlarla bu yeni glikozil rezidüsünün C₆-O⁻ grubu uzayan dekstran zincirinin C₁ ine atakta bulunarak dekstran zincirinin uzamasını sağlar.

7. Dekstranozil ünitelerinin mekik şeklinde her iki nükleofilik bölgede glukozil rezidülerine sıralı transferi ile dektran sentezi uzatılır.

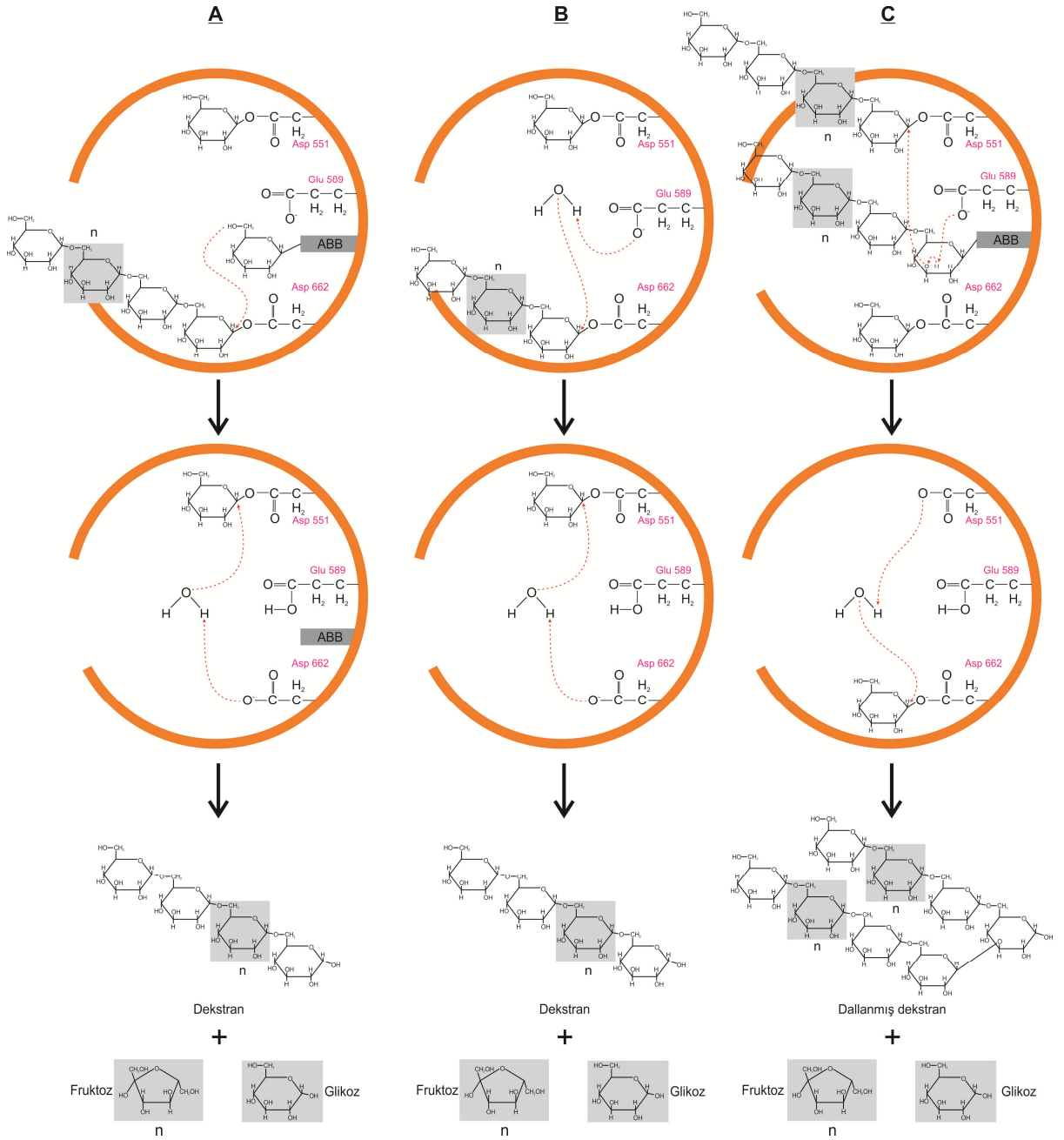
Bu şekilde dekstran zinciri indirgenmiş uçtan uzatılmaktadır (Şekil 1.5) [German et al., 1999; Robyt et al., 2008].

Alternatif olarak Fu ve Robyt in 1988 yılında ve TÜBİTAK tarafından desteklenen (2007) ve Prof. Dr. Aziz Tanriseven tarafından yürütülen DSR-S nin kimyasal modifikasyonu ile (DEP) yaptıkları çalışmalarda, ayrılan fruktoz birimlerine proton veren grubun enzim yapısındaki imidozoller olduğu iddia edilmektedir [Fu and Robyt, 1988].



Şekil 1.5: DSR-S tarafından α -1,6 glukan sentezinin başlaması ve uzaması [Robyet et al., 2008].

Zincir uzaması, akseptör reaksiyonları ve/veya suyun proton verici olarak kullanılması ile sonlandırılır (Şekil 1.6 A-B). Dekstranın kendisi akseptör olarak davrandığında dekstranda uzama durur ve yan dallanmalar gerçekleşir (Şekil 1.6 C) [German et al., 1999].



Şekil 1.6: Dekstranın sonlanma (A-B) ve dallanma (C) reaksiyonları (ABB: Akseptör Bağlanma Bölgesi) [German et al., 1999].

1.5. Probiyotik ve Prebiyotikler

Kronik hastalık risklerini giderme ve fizyolojik özelliği olan gıdalara fonksiyonel gıdalar denir. Bu gıdalar genel olarak probiyotik ve prebiyotikler olarak iki gruba ayrılırlar [Neeser and German, 2004].

Probiyotikler: temelde konak canlının bağırsak mikrobiyal dengesini düzenleyen, böylece konak canlıya faydalı etkileri olan canlı mikrobiyal besin ilaveleridir [Fuller, 1989].

İnsan vücuduna olan faydaları keşfedildikten sonra probiyotikler, ülkemiz de dahil olmak üzere dünya çapında süt ve süt ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Böylece ticari değeri oldukça yüksek bir sanayi haline gelmiştir [Salminen et al., 1999]. Gıda sektöründe kullanılan probiyotikler Tablo 1.2 de verilmiştir.

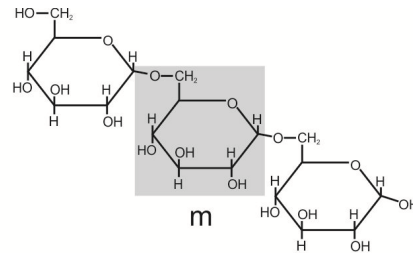
Tablo 1.2: Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar [Salminen et al., 1999].

Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalar		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus salvarius</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Bifidobacterium langum</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>

Prebiyotikler, glikozidik bağlarla bağlı 2-10 monosakkarit biriminden oluşan oligosakkaritlerdir. Prebiyotikler genel olarak; izomaltooligosakkaritler (IMO), fruktooligosakkaritler (FOS) ve galaktooligosakkaritler (GOS) olarak gruplandırılabilir. İnsanlar tarafından sindirilemeyen bu şekerler sindirim sistemi tarafından da direkt absorbe edilemez. Bu yüzden düşük kalorilidirler. Prebiyotikler, bitki kaynaklarından ekstrakte edilme, polisakkaritlerin kimyasal ya da enzimatik hidrolizi veya enzimatik sentez şeklinde üretilebilmektedir [Gibson and Roberfroid, 2008].

Basit bir tanım ile **prebiyotikler**, insanlar tarafından sindirilemeyen fakat bağırsakta yaşayan *Bifidobakterium*, *Laktobacillus* gibi yararlı bakteriler tarafından fermente edilebilen karbohidratlardır [Gibson and Roberfroid, 1995].

İzomaltooligosakkaritler (İMO), α -1,6 glukozidik bağlarla bağlı glukoz monomerlerinden oluşan prebiyotik etkileri olan oligosakkaritlerdir (Şekil 1.7).



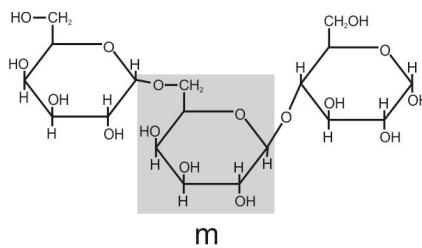
İzomaltooligosakkarit (İMO) ($m = 0 - 10$)

Şekil 1.7: İzomaltooligosakkarit yapısı.

İMO lar sindirim enzimlerine dirençli şekerlerdir [Naessens et al., 2005]. İMO ların ticari değeri giderek artmaktadır. Örneğin japonyada İMO tüketimi yılda yaklaşık 15 bin tondur. 2-6 monomer sayısına sahip İMO lar unlu mamül, içecek, baharat, çeşni, konfeksiyon ve antikaryojenik tatlandırıcılarda kullanılmaktadır. Bu İMO lar prebiyotik özellikleri ile sindirim sistemi ve/veya vajinal florada bulunan yararlı bakterilerin artışında kullanılmaktadır [Goulas et al., 2004; Rousseau et al., 2005]. Bu özellikler İMO nun büyüklüğü ile ilişkilidir. Polimerizasyonun artması bu etkiyi desteklemektedir [Goulas et al., 2004].

İMO lar, bağırsakta yaşayan *Bifidobakterium*, *Laktobacillus* ve *Bacteroides* türleri gibi yararlı bakteriler tarafından fermente edilebildiği halde *E. coli* ve diğer bakteri popülasyonları tarafından fermente edilemezler (izomaltotriozdan büyük olan İMO lar kalın bağırsakta fermente edilirken daha küçük olanlar ince bağırsakta kısmen sindirilir) [Olano et al., 2000].

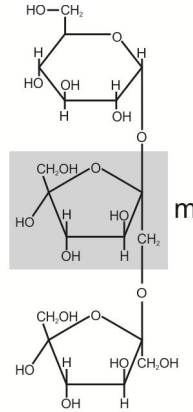
Galaktooligosakkaritler (GOS), farklı polimerizasyon derecelerine sahip β -D-galaktanlardır ($\text{Glu } \beta$ -1,4 [β -Gal-1,6]_n n = 1-4) (Şekil 1.8). GOS lar laktozdan elde edilebilir ve anne sütünde az miktarda da olsa bulunmaktadır.



Galaktooligosakkarit (GOS) ($m = 1 - 4$)

Şekil 1.8: Galaktooligosakkarit yapısı.

Fruktooligosakkaritler (FOS), farklı polimerizasyon derecelerine sahip β -D-fruktanlardır. FOS lar buğday, soğan, sarımsan, muz gibi meyve ve sebzelerde bulunur. İnülin Glu α -1,2 [β -Fru-1,2]_n n>10 yapısındaki bir polimerdir ve Kudüs enginarında bol miktarda bulunur (Şekil 1.9).



Fruktooligosakkaritler (FOS) (m = 1 - 3)

Şekil 1.9: Fruktooligosakkarit yapısı.

Prebiyotikler ve probiyotikler kronik ülser, laktozu sindiremeyen kişilerde sindirim güçlüğü, ishal gibi hastalıkların engellenmesi ya da hafifletilmesi, antibiyotiklerle bozulan bağırsak florasının yeniden kurulması, *H. pylori* nin etkisiz hale getirilmesi, hipertansiyonun düzenlenmesi gibi birçok yararlı etkilerinin yanında aşağıda verilen yararları rapor edilmiştir. [Fukushima et al., 1998; German et al., 1999].

- 1. Kolon kanseri riskini azaltma:** Bazı bakteriyal enzimler, bağırsakta aktif karsinojen maddelere dönüşen prekarsinojen maddeler üretirler. Prebiyotiklerin bağırsak florasındaki yararlı bakteri sayısını artırması sonucu karsinojen maddeleri detoksifikasyon ve metabolik aktivasyon yoluyla değiştirerek ya da butirat gibi kısa zincirli yağ asitlerinin üretilmesini uyarak kolon kanseri riskini azaltır. Bunun yanında yararlı bakterilerin faaliyeti sonucunda kalın bağırsak pH sı düşer (pH 5-6). Buna bağlı olarak karsinojen madde üreten zararlı bakterilerin sayısının azalmasının yanında 7α -hidroksilaz ve nitroredüktaz aktivitesinin azalması sağlanır [Campbell et al., 1997; Lamprecht and Lipkin, 2003; Lim et al., 2005].

- 2. Minerallerin emilimini artırma:** Mide-bağırsak bölgesindeki enzimlerden kaçan çeşitli polisakkarit (selüloz, hemiselüloz, vb.), bazı oligosakkaritler (IMO, FOS, GOS, vb.), absorbe edilemeyen şekerler ve şeker alkolleri kalın bağırsakta bulunan sakkarolitik bakteri türleri aracılığı ile kısa zincirli yağ asitlerine (propionat, asetat, bütirat, az miktarda format, valerat, kaprolat, vb.) dönüştürürler. Bu yağ asitleri ve *Lactobacillus* türlerinin aktiviteleri sonucu üretilen laktik asit sonucunda kalın bağırsak pH sı asidik aralıkta (pH 5-6) tutulur. Kalın bağırsak pH sıının asidik aralıkta tutulması sonucu olarak kalsiyum, magnezyum, demir gibi iyonların kısa zincirli yağ asitlerine bağlanması ve/veya bivalent katyonların myoinositol hekzafosfat gibi maddelere bağlanması artar. Bunun sonucu olarak kalın bağırsaktan mineral emilimi artar [Reddy, 1998].
- 3. Osteoporoz riskinin azaltılması & kemik yoğunluğunun artırılması:** Prebiyotiklerin kalın bağırsak florasındaki yararlı bakteri sayısını artırmaya bağlı olarak kalın bağırsak pH sı düşer ve buna bağlı olarak mineral emilimi artar. Böylece vücuttaki mineral miktarının artması, kemik yoğunluğunun artmasını ve ostoporoz riskinin azalmasını sağlar [Lamprecht and Lipkin, 2003].
- 4. Yaşlılarda kabızlığın giderilmesi:** Prebiyotiklerin bağırsaktaki yararlı bakteri sayısını artırması sonucunda kabızlığın giderildiği tespit edilmiştir [Lamprecht and Lipkin, 2003].
- 5. Bebeklerde gıda alerjisinin önlenmesi:** Prebiyotik verilen bebeklerde gıda alerjilerinin azaldığı tespit edilmiştir [Lamprecht and Lipkin, 2003].
- 6. B₁, B₂, B₆ ve K vitaminlerinin sentezinin artırılması:** Prebiyotiklerin bağırsaktaki yararlı bakteri sayısını artırması sonucu vitamin sentezi artar [Lamprecht and Lipkin, 2003].
- 7. Kandaki kolesterol seviyesinin düşürülmesi:** Farelere *Bifidobakterium* türleri verildiğinde kandaki kolesterol seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir. Ama mekanizması aydınlatılamamıştır [Ishibashi and Shimamura, 1993].

8. Bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi: Hayvan modelleri ve insanlar üzerine yapılan çalışmalarda *Bifidobacterium* türlerinin immunoglobulin ve sitokin seviyesini artırdığı tespit edilmiştir [Fukushima et al., 1998].

9. Diş çürümesinin engellenmesi: Ağız florasının önemli bir miktarını teşkil eden *Streptococcus mutans* ürettiği dekstransükroz yemek ile alınan sükrozu suda çözünmeyen dekstrana dönüştürür. Bu dekstran diş minesine tutunarak diş plağı oluşumuna böylece anaerobik bir ortam oluşumuna sebep olur. Diyet sırasında alınan sükroz ve fruktoz diş plağında bulunan anaerobik bakteriler tarafından fermentasyon ile laktik aside dönüştürülür. Bunun sonucu olarak diş minesi üzerinde bölgesel pH kritik eşiğin altına (pH 5) inerek diş çürümesini başlatır [Taubman and Nash, 2006].

Diyet sırasında sükroza IMO ilave edilmesi diş çürümesinin sebebi olan sükrozdan dekstran üretimini azaltarak diş çürümesini önemli ölçüde engeller [Miyake et al., 1981].

10. Dekstran-antikör çökeltme reaksiyonlarının engellenmesi: Ağır kan kayıplarında kan hacminin eski haline getirilmesi amacı ile klinik dekstran kullanılır. Bazı insan ve hayvanlarda klinik dekstrana karşı dekstran-antibody savunması gelişir. Bu etki bu tür insanlara IMO çözeltisi verilerek giderilir [Ingelman et al., 1980].

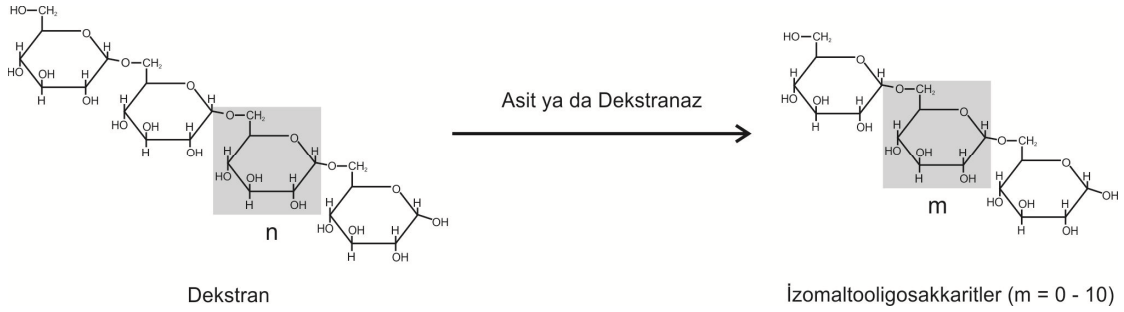
Probiyotikler bağırsak mikroflorasını geçici olarak değiştirir. Probiyotik alımı durduğunda bu etki devam etmez. Fakat prebiyotikler doğal bağırsak mikroflorasındaki yararlı mikrobiyal büyümeyi ve aktiviteyi artırdığından dolayı, probiyotikleri de içine alan daha geniş kapsamlı gıdalar olarak karşımıza çıkar [Alander et al., 1999].

1.6. Prebiyotik Sentezi

IMO lar, aşağıdaki şekillerde üretilir.

1. Nişasta *Bacillus subtilis* α -amilaz ve neopullulanaz ile muamel edilerek izomaltoz, panoz, izopanoz ihtiva eden bir şeker karışımı elde edilir [Kuriki et al., 1993],

2. Maltoz, *Aureobasidium pullulans* ile muamele edilerek panoz ve izomaltozil maltoz elde edilir [Yun et al., 1994].
3. Dekstranın asit ya da dekstranaz ile muamelesi sonucunda IMO lar üretilebilir (Şekil 1.10) [Khalikova et al., 2005].



Şekil 1.10: Dekstranın asit ya da dekstranaz ile muamelesi sonucu izomaltooligosakkarit üretimi.

4. Dextransükrazın bazı akseptör reaksiyonları ile IMO lar sentezlenebilir. Glukansakkarit üzerinden yürütülen akseptör reaksiyonları, sükroz ve reaksiyon ortamına ilave edilen diğer akseptör maddelerin (maltoz, glikoz, vs.) glukozil rezidülerinin transferini içerir. Örneğin dekstransükraz reaksiyon ortamına sükroz ile birlikte glukoz eklenmesi ile farklı büyüklükte IMO üretilebilir [Tanriseven and Dogan, 2002],
5. Sükrozun dekstransükraz ve dekstranaz muamelesiyle de sentezlenebilir [Poul et al., 1989; Pereira et al., 1998; Gulas et al., 2004].

Laktozu substrat olarak kullanan β -galaktozidaz enziminin transgalaktozidaz aktivitesi ile **GOS** lar sentezlenebileceği gibi bitki kaynaklarından (baklagiller, soya fasülyesi vb.) ekstrakte edilerek de elde edilebilir [Bouhnik et al., 1997].

Fruktoziltransferaz aracılığıyla sükrozun fruktozil rezidülerini β -2,6 bağları ile birbirine bağlayarak **FOS** lar sentezlenebileceği gibi inülinin endoinülaz enzimi tarafından hidrolizi inülinin sindirimi sonucuyla da sentezlenebilir [Gibson et al., 1995; Yun, 1996].

1.6.1. Akseptör Reaksiyonları

DSR-S nin katalitik bölgesinde akseptör maddelerin bağlanabileceği bölge(ler) olduğu bilinmektedir. Bu bölgelere akseptör maddeleri

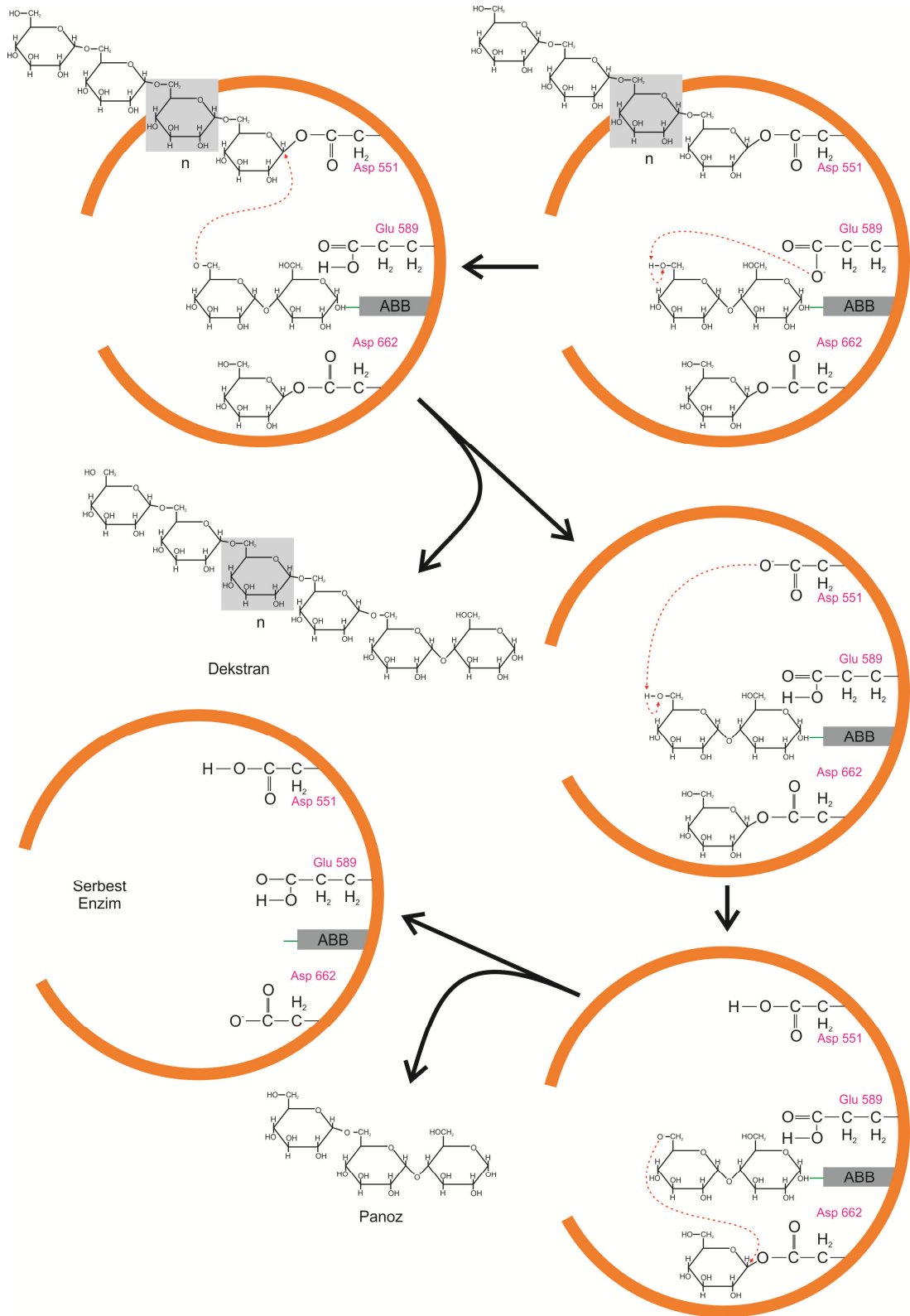
bağlandığında glikozil transferi uzayan dekstrozil rezidüsü yerine akseptör maddeye iletilir. Böylece dekstran sentezi sonlanarak IMO sentezi gerçekleşir. Eğer bu transfer dekstrozil rezidüsünün akseptör ürününe transferi şeklinde gerçekleşirse daha büyük molekül ağırlıklı IMO ların sentezi gerçekleşmiş olur (Şekil 1.9). Eğer akseptör aktif bölgede uzayan dekstran ile reaksiyona girerse polimerizasyon sonlanır ve sentezlenen dekstran reaksiyon ortamına salınır (Şekil 1.6) [German et al., 1999].

DSR-S için 27 akseptör tanımlanmıştır ve sonuçta oluşan ürünlerin yapısı tespit edilmiştir. DSR-S için bazı akseptör maddeler ve ürünleri Tablo 1.3 te verilmiştir.

Tablo 1.3: DSR-S enziminin akseptörleri ve akseptör reaksiyonları sonucunda oluşan ürünler [Herman et al., 1996].

Akseptör	Ürünler
D - glukoz	İzomaltodekstrin
α - metil - D - glukozid	α - metil - izomaltoz
D - fruktoz	Lükroz ve izomaltuloz
D - mannoz	α - D - glikopayronozil - β - D - monopayronizad
D - galaktoz	α - D - glikopayronozil - β - D - galaktofuranozad
İzomaltoz	İzomaltodekstrin
Maltoz	Penoz ve izomaltodekstrin
Sellobioz	2 - α - izomaltodekstrin - sellobioz
Laktoz	2 - α - D - glikopayronozil - laktoz
Raffinoz	2 - α - D - glikopayronozil - raffinoz
B - 512F dekstran	α - 1, 3 - dekstronozil - dekstran veya α - 1, 3 - glikopayronozil dekstran

DSR-S nin gerçekleştirdiği akseptör reaksiyonu Şekil 1.11 de özetlenmiştir. Akseptör bölgesinde bulunan amino asit rezidüleri tam olarak aydınlatılmadığından bu bölgeler akseptör bağlama bölgesi (ABB) olarak belirtilmiştir [German et al., 1999].



Şekil 1.11: Dekstransükrasin akseptör reaksiyonları (akseptör: maltoz) [German et al., 1999].

1.7. İmmobilizasyon Çalışmaları

Enzimler endüstriyel, analitiksel, tıpta teşhis, tedavi ve ilaç tasarım amaçları ile geniş uygulama alanı bulmaktadır [Wiesman, 1986]. Her bir

alanda kullanılan enzimlerin fiyatları özelliklerine göre birkaç dolardan birkaç bin dolara kadar değişebilmektedir. 2012 yılında endüstri ve araştırma alanında kullanılan enzimin toplamda 2,7 milyar \$ a yükseleceği tahmin edilmektedir (BIO030E, 2008). Enzim üretiminde hammadde sorunu mikrobiyal kaynaklar sayesinde büyük ölçüde çözülmüş görünmektedir. Bununla birlikte enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan üretilmesi ve saflaştırılması oldukça masraflıdır.

Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması ve reaksiyon kontrolü amacı ile reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılması çok güçtür. Reaksiyonun kontrolü amacı ile reaksiyon ortamına inhibitör eklemek hem masrafın artması hem de reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik eklenmesinden dolayı uygulanabilir değildir. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden uzaklaştırabilmek imkansızdır. Bu nedenle serbest enzimin yeniden kullanılması ve sürekli üretim sistemlerine de uygulanamaması enzim kullanılan çalışmaların maliyetini artıran önemli etmenlerdendir.

Enzimlerin ekonomik olarak kullanılabilmesinin en iyi yollarından biri enzimlerin immobilize edilmeleridir. Bu amaçla çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir.

Genel olarak enzimler,

1. Suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmasıyla
2. Suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla
3. Suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanmasıyla

şeklinde immobilize edilirler [Klibanov, 1983].

İmmobilize enzimin serbest enzime göre bazı üstünlükleri aşağıda verilmiştir.

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılması (süzme, magnetik alan, santrifüjleme v.b.)
- Ürünlerin enzim tarafından kirletilmesinin engellenmesi
- Saf ürün elde edilmesi böylece ürün saflaştırma maliyetinin azaltılması
- Enzimlerin tekrar tekrar ve uzun süre kullanılabilmesine imkan sağlanması
- Sürekli işlemlere uygulanabilmesi
- Enzim kararlılığının artırılması
- Reaksiyon kontrolüne serbest enzime göre daha çok imkan sağlaması
- Çok basamaklı reaksiyonların gerçekleşmesine imkan sağlaması (koimmobilizasyon)
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite göstermesi
- Enzimin denatürasyon süresinin uzatılması

Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri: İmmobilizasyon yöntemleri çeşitli şekillerde sınıflandırılmakla beraber Tablo 1.4 de verildiği gibi sınıflandırmak mümkündür.

Tablo 1.4: Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.

Enzim immobilizasyon yöntemleri					
Çözünür formda immobilizasyon			Çözünmez formda immobilizasyon		
Hollow - fiber membranlar	Çözünen - çözünmeyen enzimler	Ultrafiltrasyon membranları	Tutuklama		Bağlama
			Lipozom tekniği	Mikro kapsülleme	Jelde Tutuklama
				Enzim kopolimerizasyonu	Taşıyıcı bağlama
					Adsorpsiyon
					İyonik bağlama
					Şelat bağlama
					Kovalent bağlama
					Biyospesifik bağlama
					Çapraz bağlama

İmmobilizasyon Yöntemlerinin Kıyaslanması: Enzim immobilizasyonunda kullanılan çok sayıda tekniği vardır. Bunun nedeni ise enzim bileşenlerinin ve kimyasal özelliklerinin yüksek çeşitlilik göstermesinin yanında ürün ve substrat çeşitliliğidir. Bu nedenle bütün enzimler veya uygulamalar için geçerli tek bir yöntem belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle immobilizasyonu düşünülen enzimin yapısı, bileşenleri, kimyasal özellikleri, substrat ve ürün çeşidi gibi özellikler göz önünde bulundurularak immobilizasyon yöntemi belirlenmelidir.

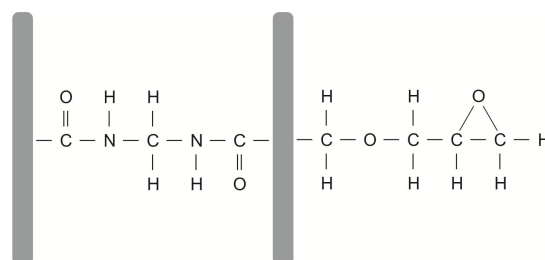
Tablo 1.5 de immobilizasyon yöntemleri ve özellikleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 1.5: İmmobilizasyon yöntemlerinin kıyaslanması [Wiesman, 1983].

Karakteristik	Karşı Bağlama	Fiziki Adsorbsiyon	İyonik Bağlama	Şelat veya Metale Bağlama	Kovalent Bağlama	Hapsetme
Hazırlama	Orta	Kolay	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Bağlanma	Güçlü	Zayıf	Orta	Orta	Güçlü	Orta
Enzim Aktivitesi	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Düşük
Desteğin Tekrar Kullanılabilirliği	İmkansız	Mümkün	Mümkün	Mümkün	Nadiren	İmkansız
İmmobilizasyon Maliyeti	Orta	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Orta
Kararlılık	Yüksek	Düşük	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek
Genel Uygulanabilirlik	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
Enzimin Mikrobiyal Ataklara Karşı Korunabilmesi	Mümkün	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Mümkün

1.7.1. Eupergit C

Eupergit, N-N'-metilenbis (metakrilamid), glisidil metakrilat, alilglisidil eter ve metakrilatın kopolimerizasyonu ile oluşan ve reaktif epoksi grupları içeren organik bir polimer olup Roehm GmbH & Co.KG firması tarafından geliştirilen ve endüstriyel uygulamalarda kullanılan bir destektir (Şekil 1.12).



Şekil 1.12: Eupergit C yapısı [Katchalski-Katzir and Kraemer, 2000].

Eupergit C nin avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir.

1. Kimyasallara, mekanik etkilere dayanıklıdır.
2. pH 0-14 aralığında kararlı olup bu pH larda şişmez
3. Karıştırmalı reaktör tanklarında 650 döngü sonunda partikül boyutunda ve yapısında önemli bir değişim göstermez
4. pH 2-12 aralığında immobilizasyona izin verir.
5. Süzme işlemi ile basit bir şekilde geri kazanılabilir.

Bu nedenlerle eupergit C reaktörlerde kullanıma uygun bir destek materyali olduğu bildirilmektedir [Katchalski-Katzir and Kraemer, 2000].

Bu avantajlarının yanında proteinlerin genellikle aktif merkezlerinde bulunan ve üç boyutlu yapı kazanmasında etkili olan -COOH, -OH ve -NH₃ grupları ile bağ yapması, santrifüj ile çöktürülememesi ve boyutunun çok küçük olmasından dolayı süzme işleminde bir kısmının geri kazanılamaması gibi dezavantajlara da sahiptir.

Eupergit C 150 µm çapına sahip ve yüksek yoğunlukta oksiran grupları (600 µmol/g kuru Eupergit C) içermesi nedeniyle proteinlerin yapısında bulunan amino, tiyol ve fenolik grupları ile kovalent bağ yapabilir. Eupergit C 250L, Eupergit C ile aynı kimyasal yapıya sahip olup daha büyük çaplı (250 µm) fakat daha az oksiran gruplarının (200 µmol/g kuru Eupergit C 250L) olduğu organik bir matrikstir.

1.7.2. DSR-S nin İmmobilizasyonu

Dekstran ve oligosakkaritlerin ekonomik üretimi için dekstransükrazın immobilizasyonu gereklidir. Dekstransükrazın kovalent immobilizasyonu için değişik metodlar denenmiş olmasına rağmen şimdiye kadar büyük bir başarı sağlanamamıştır.

Kaboli ve Reilley, Enzacryl AA, Enzacryl AH gibi matriksler dahil 13 değişik matriks kullanarak dekstransükrazın immobilizasyonunu

gerçekleştirmelerine rağmen en iyi immobilizasyon verimini (%19.6) glutaraldehid ile aktive ettikleri alkilamin por silika larda elde ettiler. Çalışmalarının sonunda “dextransükrazın immobilize edilmesinin oldukça güç” olduğunu ileri sürdüler [Kaboli and Reilley, 1980].

Monsan ve Lopez in yaptığı çalışmada, dextransükrazı silikaya kovalent olarak immobilize etmek için iki farklı yol izlemiştir. Immobilizasyon karışımına maltoz ilave ederek enzimin aktif merkezi korunduğunda %4.3, korumasız olarak yaptığı çalışmada ise %3.1 immobilizasyon verimi elde etmiştir. Maltozun çok güçlü bir akseptör madde olduğu bilindiği için bu sonuç matriks üzerindeki reaktif grupların enzimin aktif merkezindeki amino asit rezidüleri ile reaksiyona girdiğini göstermektedir [Monsan and Lopez, 1981].

Alcalde ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, glutaraldehit ile aktive edilmiş silikaya dekstransükraz immobilize edilmiştir. Doğal dekstransükraz immobilize edildiğinde %0.6 immobilizasyon verimi elde etmesine rağmen dekstranaz ile dekstransükraz üzerindeki dekstranlar uzaklaştırıldıktan sonra dekstransükraz immobilize edildiğinde verimin %13 e çıktığı bulunmuştur. Bu sonuç dekstransükrazın başarılı bir şekilde immobilize edilebilmesi için üzerindeki dekstranların uzaklaştırılması gerektiği sonucuna götürmüştür. Immobilizasyon veriminin buna rağmen düşük olmasını enzimin aktif merkezinde lizin rezidüsünün bulunduğu ve bunun immobilizasyon sırasında matriks ile reaksiyona girdiğini iddia etmişlerdir [Alcalde et al., 1999].

Gómez de Segura dekstranaz ile dekstransükraz üzerindeki dekstranları uzaklandırdıktan sonra dekstransükrazı Eupergit C ye immobilize ettiğinde %72 immobilizasyon verimi ve %22 aktivite verimi elde etmiştir. Fakat 30 °C de 2 saat içinde immobilize enzim aktivitesinin %55 ini kaybetmektedir [Gomez de Segura et al., 2004].

Yukarıda özetlenen çalışmalar dekstransükrazın kovalent immobilizasyonu için başarılı bir metodun hali hazırda bulunmadığını göstermektedir. Bu başarısızlığın iki nedeni olduğu düşünülmektedir: birincisi, dekstransükrazın dekstran tarafından maskelenmesi sonucu matriksteki reaktif grupların enzim üzerindeki amino asit rezidüleri ile etkileşime girememesi ve

ikinci olarak, enzim aktif merkezinde bulunan aspartik asit, glutamik asit ve lizin rezidülerinin matriksteki reaktif grupları ile reaksiyona girmesidir [Hernaiz and Crout, 2000; Martin et al., 2003; Gomez de Segura et al., 2003-2004; Funane et al., 2005; Robyt et al., 2008].

Dekstransükrazın fonoksi aserilselüloz veya hipoksiapatit e adsorbe edilmesi, immobilizasyon veriminin yüksek olmasından dolayı, kovalent immobilizasyona alternatif görülse de bir kaç tekrarlanan reaksiyon sonunda enzimin hızlı bir şekilde adsorbent ayrılması bu yöntemin dezavantajı olarak rapor edilmiştir [Parnaik et al., 1983; Chang et al., 1981].

Dekstransükrazın DEAE-Sephadex veya SP-Sephadex gibi matrikslere immobilizasyonu maksimum %10 verimle gerçekleşmesi bu yöntemin de çok başarılı olmadığını göstermektedir [Kaboli and Reilly, 1980].

Dekstransükrazın Sephadex G-200 reçinesine affinitesi ile gerçekleşen immobilizasyon her ne kadar %80 gibi yüksek bir aktivite verimi ile gerçekleşse de hem 15 gün içinde enzimin bütün aktivitesini yitirmesi hem de enzimin ürettiği dextranın reçine dışına salınamamasından dolayı bu yöntemin de başarısız olduğunu görülmüştür [Han et al., 2005].

Alginat kullanılarak enkapsülasyon hali hazırda dekstransükraz immobilizasyonu için tek başarılı metod olarak kabul edilmektedir. Bu alanda bir çok çalışma yapılmış ve en yüksek aktivite verimi %90 olarak rapor edilmiştir. Enkapsülasyon ile immobilize edilmiş dekstransükraz, yalnızca oligosakkarit üretiminde kullanılabilir. Bu metod dextran üretiminde kullanılamaz. Çünkü oluşan dekstran alginat matriksinin dışına çıkamaz. Bunun yanında fiziksel etkilere karşı dayanıksız olması, ayrıca solüsyondaki birçok iyon ile etkileşime girmesi bu tekniğin başarısı önündeki en önemli engellerdir [Reh et al., 1966; Reischwitz et al., 1995; Alcalde et al., 1999; Tanriseven and Dogan, 2002; Ölçer and Tanriseven, 2010; Kothari et al., 2012].

Bu tez çalışmasında, başarılı bir şekilde kovalent olarak immobilize edilebilen yeni bir dekstransükraz üretildi. Dekstransükrazın kovalent immobilizasyonunun önündeki en büyük engellerden biri olan dekstran

maskesi, enzimin C-terminalde bulunan ve dekstranın enzim üzerine bağlanmasından sorumlu bölgenin (409 aa) genetik mühendisliği ile kırılması sonucu gerçekleştirildi. Bunun yanında enzim aktivitesinde görevli olmadığı rapor edilen enzimin N-terminalindeki sinyal peptit ve değişken bölge bölümleri de (284 aa) genetik mühendisliği ile kırıldı. Bu işlem enzimin molekül ağırlığını küçülterek enzimin *E. coli* tarafından üretilme miktarını artırdı. Dekstransükrazın immobilizasyonu önündeki ikinci önemli problem olan aktif bölgedeki amino asit rezidülerinin (lizin, aspartik asit, glutamik asit) matriks ile etkileşme ihtimalini azaltmak amacı ile dekstransükraz GST proteini ile N ucundan birleştirildi. GST (26 kDa), enzime 19 lizin, 18 aspartik asit, 16 glutamik asit ve 4 lizin rezidüsünün eklenmesi ile Eupergit C üzerindeki epoksi gruplarının enzim aktif bölgesindeki amino asit rezidüleri ile etkileşme ihtimalini azalttı. Böylece dekstransükrazın immobilizasyonu önündeki engeller başarılı bir şekilde ortadan kaldırılarak yeni üretilen enzimin Eupergit C 250L ile başarılı bir şekilde immobilizasyonunun gerçekleşmesi sağladı (%100 immobilizasyon verimi, %83.3 aktivite verimi). Enzimin kırılması ve GST ile füzyon edilmesi enzim aktivitesinde önemli bir değişiklik meydana getirmede.

Yeni üretilen immobilize kırılmış dekstransükraz başarılı bir şekilde prebiyotik üretiminde kullanıldı. Böylece enzimatik yolla sanayi ölçeğinde prebiyotik sentezinin gerçekleştirilebileceği gösterildi.

2. MATERYAL

2.1. Mikroorganizma ve Enzim

L. mesenteriodes B-512FMC-13 Glc nitrozoguanidin ile mutasyona uğratılarak ana soydan daha yüksek miktarda, sürekli üretim sağlayan dekstransükraz üreten mutant bir mikroorganizmadır. Mutant *L. mesenteriodes* B-512FMC-13 Glc dekstransükrazın sentezlediği dekstran ile DSR-S tarafından sentezlenen dektran aynı yapıdadır. Bu mutant bakteri Dr. J. F. Robyt (Iowa State University, Department of Biochemistry and Biophysics, Ames, IA, USA) tarafından sağlanmıştır.

E. coli DH5 α , *E. coli* BL21 (DE3) bakteri suşları sırasıyla Promega (Fitchberg, WI, USA) ve Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) firmalarından temin edildi. Taşıyıcı vektör (pGEM-T) Easy ve ekspresyon vektörü (GEX-4T I) sırasıyla Promega ve GE Healthcare (Little Chalfont, United Kingdom) firmalarından temin edildi.

2.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Kullanılan sarf malzemelerin listesi Tablo 2.1 de verilmiştir.

Tablo 2.1: Kullanılan sarf malzeme listesi.

Malzemenin Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Acetic acid	RIEDEL	27225
Acetone	MERCK	100013
Acetonitrile	CARLO ERBA	401201
Acrilamide	MERCK	1.107.840.100
Agar	MERCK	101614
Agaroz	SIGMA-ALDRICH	A-6013
Ammonium acetate	SIGMA-ALDRICH	A1542
Ampicilline	ROCHE	10835242001
Bacto-peptone	BD	211693
Bacto-tryptone	DIFCO	211699
Bisacrylamide	FLUKA	66667-25
Bradford Protein Assay	Bio-Rad	500-00006
Bromophenol blue	MERCK	114391
Calcium acetate	MERCK	1020521000
Calcium chloride	MERCK	208290
Chloroform	SIGMA-ALDRICH	C2432

Comassie brillante blue R	FLUKA	27816-25
CTAB	SIGMA-ALDRICH	H6269
D-Fructose	SIGMA-ALDRICH	47739
D-Glucose	FLUKA	49162
D-Maltose	SIGMA-ALDRICH	63420
D-Lactose	SIGMA-ALDRICH	61345
D-Sucrose	MERCK	107.651
EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid)	SIGMA-ALDRICH	077K0132
Ethanol	SIGMA-ALDRICH	459844
Ethidium bromide	SIGMA-ALDRICH	E7637
Expand Long Template PCR System	ROCHE	11681834001
Filtre (nitrocelüloz; 0.2 mm, 0.45 mm)	SIGMA-ALDRICH	N7892, N8267
Eupergit C	Roehm GmbH & Co.	gift
Gel Extraction Kit	QIAGEN	28704
Glycerole	MERCK	104.092
Glycine	FLUKA	50049
Isoamyl alcohol	SIGMA-ALDRICH	I9392
Isopropyl alcohol	VWR	PX-183514
İzopropil-β-D-1-tiyogalaktopiranozit (IPTG)	QIAGEN	129921
HCl	MERCK	100.314
H2SO4	MERCK	1007311000
KH ₂ PO ₄	RIEDEL	04243
Lambda DNA marker	Thermo Scientific	SM0361
Methanol	SIGMA-ALDRICH	550554
MgCl ₂	MERCK	105832
Na ₂ HPO ₄	RIEDEL	04269
NaCl	MERCK	1.06400.1000
NaOH	MERCK	1.064.621.000
MRS Broth	FLUKA	69966
Pfu DNA polymerase	Thermo Scientific	EP0501
pET 32a expression vector	Lablife	69015-3
pGEM T Easy vector system	Promega	A1360
pGEX4T 1 expression vector	Lablife	27458001
Phenole	SIGMA-ALDRICH	33522
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	SIGMA-ALDRICH	P7626
Protein standart	Thermo Scientific	SM1811
Proteinase K	QIAGEN	19131
Primerler		
QIAprep spin miniprep kit	QIAGEN	27104
QIAquick gel extraction kit	QIAGEN	28704
Restriction Endonucleases (BamHI, XhoI)	Thermo Scientific	ER0051, ER0691
Rnase (100mg/ml Dnase free)	QIAGEN	19101
Sodium Acetate	SIGMA-ALDRICH	S7899
Sodium Dodecyle Sulfate (SDS)	SIGMA-ALDRICH	L4509
T4 DNA ligase	Thermo Scientific	EL0011
Taq DNA plymerase	ROCHE	1.418.432

TEMED	SIGMA-ALDRICH	T-7024
Thin Layer Chromatography (TLC) plateleri (Whatman K5)	WHATMAN	4861-110
Tris (hidroksimetil) aminometan	MERCK	1.083.820.005
Tween 80	SIGMA-ALDRICH	P 8074
Yeast extract	MERCK	1.03753
β -mercaptoetanol	SIGMA-ALDRICH	M-6250
α -noftol	FLUKA	70442

2.3. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazların listesi Tablo 2.2 verilmiştir.

Tablo 2.2: Kullanılan cihazların listesi.

Kullanılan Cihazlar	Firma Adı	Modeli
+4 Buzdolabı	Beko	D8450SM
-80 Derin Dondurucu	Thermo Scientific	Forma -86 ULT
Agaroz jel elektroforez sistemi	Bio-Rad	170-4401
Densitometre	Bio-Rad	GS-607
Buz makinası	Brema	DC30-10A
Çalkalayıcı su banyosu	Altan	GFL
Güç kaynağı	Enduro	E0303
Hassas terazi	Sartorius	BL210S, BL3100
Jel görüntüleme sistemi	Bio-Rad	Gel-Doc XR
Isıtıcı magnetik karıştırıcı	HEIDOLPH	MR Hei-Tec
Mikrosantrifüj	Beckman Coulter	Microfuge 18
Nanodrop	NanoDrop	ND - 1000
Soğutmalı santrifüj	Hettich	Rotanta 460R
Otoklav	Varioklav	300
Protein elektroforez sistemi	Bio-Rad	Mini-PROTEAN TGX
Soğutmalı mikrosantrifüj	Beckman Coulter	Microfuge 22R
Sonikatör	Bio-equip	SKL1200-IIDN
Steril kabin	Tez-San	Clas II
Termal döngü cihazı	Techne	TC-412
UV spektrofotometre	Shimadzu	UV-1601
Vorteks	Thermo Scientific	M63210-33Q
İnkübatör	Nüve	FN 500
Çalkalamalı inkübatör	Thermo Scientific	Forma orbital
Mikrodalga fırın	Vestel	MD17
Mikropipet Seti	Thermo Scientific	Finnpipette

- Primer sentezi IDT (www.idt.com) firmasından; dizi analizi REFGEN (Ankara) firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi.

3. YÖNTEM

3.1. Besiyerleri

De Man, Rogosa and Sharpe Besiyeri (MRS Besiyeri): Dehidre besiyeri 51 g/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak çözüldü ve cam tüplere uygun miktarlarda dağıtıldı ve otoklavda 118 °C de 10 dakika sterilize edildi. Son pH 6.4 ± 0.2 (25°C) olarak ayarlandıktan sonra 4 °C de muhafaza edildi. MRS besiyeri içeriği Tablo 3.1 de verilmiştir.

Tablo 3.1: MRS besiyeri içeriği.

Madde	Miktar (g)
Dekstroz	20.0
Bakto pepton	10.0
Et suyu	8.0
Sodyum asetat	5.0
Yeast Extract	4.0
Dipotasyum fosfat	2.0
Amonyum sitrat	2.0
Tween 80	1.0
Magnezyum sülfat	0.2
Manganez sülfat	0.05

Lizojen Katı Besiyeri (LB Agar): 10 g bacto tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl, 12 g agar tartılıp distile su ile 1 litreye tamamlandıktan sonra pH 7 ye ayarlanarak otoklavda 118 °C de 10 dakika sterilize edildi. Besiyeri otoklavdan çıktıktan sonra 55-60 °C ye soğutulduktan sonra temiz petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı. Katılaşan petrilere 4 °C de muhafaza edildi.

Lizojen Besiyeri (LB): 10 g bacto tryptone, 5 g yeast extract, 5 g NaCl tartılıp distile su ile 1 litreye tamamlandıktan sonra otoklavda 118 °C de 15 dakika sterilize edilerek 4 °C de muhafaza edildi.

Süper Optimal Besiyeri (Katabolit baskılayıcılar ile) (SOC): 2 g bacto tryptone, 0.55 g yeast extract, 0.05 g NaCl, 3.73 g KCl, 20.2 g MgCl₂, 24.6 g MgSO₄, 9 g glikoz tartılarak distile su ile 100 mL ye tamamlandı. Besi yeri

0.22 μ luk steril filtreden geçirildikten sonra laminar flow da 10 mL lik parçalara bölerek -20 °C de muhafaza edildi.

Modifiye Studier Auto-Induction Besiyeri (MSOB): 5 g yeast extract, 20 g kazeinle parçalanmış pepton, 5 g NaCl, 6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 12.1 g Tris Base, 0.05 g CaCl₂, 1 g sükröz; % 10 luk glukoz çözeltisinden 5 mL, % 60 lık gliserol çözeltisinden 10 mL, % 8 lik laktoz çözeltisinden 25 mL alınarak 500 mL saf suda çözüldü, HCl ile pH 6.4 a getirildikten sonra son hacim dH₂O ile 1 L ye tamamlandı. Hazırlanan besiyeri, 118 °C de 10 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Besiyeri 4 °C de muhafaza edildi.

3.2. Çözeltiler

% 10 Amonyum Persulfat (APS): 0.1 g amonyum persulfat (%98 w/w) 1 mL dH₂O da çözüldü.

10 M Amonyum Asetat: 770 g amonyum asetat (%98 w/w) 800 mL dH₂O da çözüldü. Son hacim dH₂O ile 1 L ye tamamlandı. 0.45 μ luk filtre ile sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

% 30 Akrilamid: 29 g akrilamid (%99 w/w) ve 1 g N, N'-metilenbisakrilamid 60 mL dH₂O da çözüldü. pH nın 7 nin altında olduğu kontrol edildi. Son hacim dH₂O ile 100 mL ye tamamlandı. 0.45 μ luk filtre ile sterilize edilerek 4 °C ve karanlıkta muhafaza edildi.

1 M Kalsiyum klorür (CaCl₂): 54 g CaCl₂.6H₂O (%99 w/w) toplam hacim 200 mL olacak şekilde dH₂O da çözüldü. 0.22 μ luk filtre ile steril edilerek -20 °C de muhafaza edildi.

0.5 M EDTA (pH 8.0): 186.1 g Na₂C₁₀H₁₆N₂O₈.2H₂O (%99 w/w) 800 mL dH₂O da çözüldü. ~20 g NaOH ile pH nın 8.0 olması sağlandıktan sonra toplam hacim 1 L ye tamamlanıp otoklavla sterilize edildi. Hazırlanan çözelti 4 °C de muhafaza edildi.

10 mg/mL Etidyum Bromid: 1 g etidyum bromid (%95 w/w) son hacim 100 mL olacak şekilde dH₂O da çözüldükten sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta muhafaza edildi.

1M İzopropiltio-β-D-galaktosid (IPTG) (10 mL): 2 g IPTG (%99 w/w) 8 mL dH₂O da çözüldükten sonra son hacim dH₂O ile 10 mL ye tamamlandı. 0.22 µluk filtreler ile sterilize edildikten sonra 200 µL lik hacimlere bölünerek -20 °C de muhafaza edildi.

1 M Magnezyum klorür (MgCl₂): 203.3 g MgCl₂.6H₂O (%99 w/w) 800 mL dH₂O da çözüldü. Son hacim 1 L olacak şekilde dH₂O ile tamamlandıktan sonra otoklavla sterilize edilerek 4 °C de muhafaza edildi.

Fenol:Kloroform: 1:1 fenol:kloroform (%99 w/w) 0.1 M Tris HCl (pH 7.6) de çözüldükten sonra (0.01 M Tris HCl pH 7.6 olacak şekilde) 4 °C ve karanlıkta muhafaza edildi.

10 mM Fenilmetilsulfonyl florid (PMSF): 1.74 mg/mL PMSF (%98.5 w/w) 100 mL olacak şekilde isopropanol ile çözüldükten sonra -20 °C de muhafaza edildi. PMSF 25-4 °C ani sıcaklık değişimleri ile inaktif edilebilir.

Fosfat Tuz Tamponu (PBS): 8 g NaCl (%99 w/w), 0.2 g KCl (%99 w/w), 1.44 g Na₂HPO₄ (%99 w/w), 0.24 g KH₂PO₄ (%99 w/w) 800 mL dH₂O da çözüldü. Son hacim 1 L olacak şekilde dH₂O ile tamamlandıktan sonra otoklavla sterilize edilerek 4 °C muhafaza edildi.

% 10 Sodyumdodesilsülfat (SDS) (Sodium Lauryl Sulfate): 10 g SDS (%98.5 w/w) 90 mL dH₂O da 68 °C de çözüldü. HCl ile pH 7.2 e ayarlandıktan sonra son hacim 100 mL olacak şekilde dH₂O ile tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

5 M Sodyumhidroksil (NaOH): 200 g NaOH (%97 w/w) 800 ml dH₂O da çözüldükten sonra dH₂O ile son hacim 1 L ye tamamlanıp oda sıcaklığında muhafaza edildi.

1 M Tris: 121.1 g Tris base (%99.8 w/w) 800 mL dH₂O da çözüldü. Çözelti HCl ile pH 8.0 a ayarlandı. pH ayarlaması yapılırken her 1 °C ısı değişiminde ~ 0.03 pH nın değiştiği göz önünde bulunduruldu. Son hacim 1 L olacak şekilde dH₂O ile tamamlandıktan sonra otoklavlanarak steril edildi. Hazırlanan çözelti 4 °C de muhafaza edildi.

X-gal: 20 mg 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktosid (%98 w/w), 1 mL dimetilformamid (%99 v/v) polipropilen tüp içinde çözüldükten sonra -20 °C de karanlıkta muhafaza edildi.

RNase (DNase free): 10 mg RNase A (pankreatik), 10 mL, 10 mM Tris (pH 7.5), 15 mM NaCl (%99 w/w) çözeltisinde çözüldü. 100 °C 15 dakika sterilize edilen çözelti oda sıcaklığında soğutularak 200 μ L lik hacimlerde -20 °C de muhafaza edildi.

50X TAE (Tris asetat): 242 g Tris base, 57.1 mL % 99 luk asetik asit, 100 mL 0.5 M EDTA, pH 8.0 ve 800 mL dH₂O da çözüldü. Son hacim 1 L olacak şekilde dH₂O ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti 4 °C de muhafaza edildi.

Agaroz Jel (% 0.8): Agaroz (0.4 gr) 1XTAE (50 mL) ile karıştırıldı ve mikrodalga fırında ısıtılarak çözüldü. Mikrodalgadan çıkarılan agaroz jel yaklaşık 55 °C ye kadar soğuyunca 2 μ L etidyum bromür (10 mg/mL) ilave edildi.

6XDNA Yükleme Tamponu: 25 mg bromofenol mavisi (%99 w/w) ve 25 mg xylene cyanol FF (%75 w/w) 5 mL ddH₂O da çözüldükten sonra üzerine 3.3 mL gliserol (%99 v/v) eklendi. Homojen karışım elde edilinceye kadar karıştırılan çözelti ddH₂O ile 10 mL ye tamamlanarak 1 mL lik parçalara bölünerek -20 °C de saklandı.

S Tamponu: 1 M Tris-HCl (pH 8.0) den 20 mL (100 mM), 0.5 M EDTA (pH 8.0) dan 8 mL (20 mM), 5M NaCl den 56 ml (1.4 M), %10 CTAB tan 40 mL (%2 v/v) steril dH₂O ile 200 mL ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 4 °C de muhafaza edildi.

CTAB (Hekzadesiltrimetilamonyumbromid)/NaCl Çözeltisi (% 10 CTAB - 0.7 M NaCl): 4.1 g NaCl 80 mL dH₂O da çözüldü ve üzerine yavaş yavaş 10 g CTAB (%99) ilave edildi. CTAB çözüne kadar çözelti ısıtıldı (~60 °C). Son hacim 100 mL ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 4 °C de muhafaza edildi.

Proteinaz K (10 mg/mL): 5 mL gliserol, 1 M Tris-HCl (pH 8.0) den 0.1 mL, 0.029 g CaCl₂, 10 mL ye steril dH₂O ile tamamlandı. Hazırlanan tampon

içerisinde 100 mg Proteinaz K çözülerek 1.5 mL lik eppendorf tüplere dağıtıldı. Hazırlanan çözelti $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de muhafaza edildi.

3M Sodyum Asetat Tampon Çözeltisi (pH 5.5): 204.15 g $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (%99 w/w), 0.1 g NaN_3 400 mL dH_2O da çözüldü. Asetik asit (%99 v/v) ile pH sı 5.5 ye ayarlandı. Son hacim 500 mL olacak şekilde dH_2O ile tamamlanarak otoklavla sterilize edilip $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de muhafaza edildi.

2M Kalsiyum Asetat Tampon Çözeltisi (pH 5.5): 64.2 g $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (%99 w/w), 0.1 g NaN_3 400 mL dH_2O da çözüldü. Asetik asit ile pH 5.5 e ayarlandıktan sonra son hacim dH_2O ile 500 mL ye tamamlanıp $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de muhafaza edildi.

500 mM Sodyum Fosfat Tampon Çözeltisi (pH 6.8): 39 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (%99 w/w), 0.2 g NaN_3 800 mL dH_2O da çözüldü. Üzerine 89.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ eklenerek pH 6.8 e ayarlandıktan sonra son hacim dH_2O ile 1 L ye tamamlanıp $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de muhafaza edildi.

200 mM Sükroz Tampon Çözeltisi (1 L, pH 5.5): 68.46 g sükroz (%99.5 w/w), 0.2 NaN_3 son hacim 1 L olacak şekilde sodyum asetat tampon çözeltisinde (50 mM, pH 5.5) çözüldü. Çözelti $0.45\text{ }\mu$ luk filtrelerle sterilize edilerek $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de muhafaza edildi.

200 mM Sükroz & Maltoz Tampon Çözeltisi (200 mL, pH 5.5): 13.69 g sükroz, 14.41 g maltozmonohidrat (%99 w/w), 0.04 g NaN_3 son hacim 200 mL olacak şekilde sodyum asetat tampon çözeltisinde (50 mM, pH 5.5) çözüldü. Çözelti $0.45\text{ }\mu$ luk filtrelerle sterilize edilerek $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de muhafaza edildi.

200 mM Sükroz & Laktoz Tampon Çözeltisi (200 mL, pH 5.5): 13.69 g sükroz, 14.41 g laktoz monohidrat (%99 w/w), 0.04 g NaN_3 son hacim 200 mL olacak şekilde sodyum asetat tampon çözeltisinde (50 mM, pH 5.5) çözüldü. Çözelti $0.45\text{ }\mu$ luk filtrelerle sterilize edilerek $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de muhafaza edildi.

200 mM Sükroz & Glikoz Tampon Çözeltisi (200 mL, pH 5.5): 13.69 g sükroz, 7.21 g glikoz (%99.5 w/w), 0.04 g NaN_3 son hacim 200 mL olacak şekilde sodyum asetat tampon çözeltisinde (50 mM, pH 5.5) çözüldü. Çözelti $0.45\text{ }\mu$ luk filtrelerle sterilize edilerek $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de muhafaza edildi.

200 mM Sükroz & Fruktoz Tampon Çözeltisi (200 mL, pH 5.5): 13.69 g sükroz, 7.21 g fruktoz(%99.5 w/w), 0.04 g NaN_3 son hacim 200 mL olacak şekilde sodyum asetat tampon çözeltisinde (50 mM, pH 5.5) çözüldü. Çözelti 0.45 μ luk filtrelerle sterilize edilerek 4 °C de muhafaza edildi.

5x ekstraksiyon Tamponu: 250 mM Tris-HCl (pH 6.4), 500 mM NaCl ve 5 mM EDTA; dH_2O ile toplam hacim 100 mL olacak şekilde ayarlandı. 0.45 μ luk filtrelerle steril edilen tampon çözelti 4 °C de muhafaza edildi. Kullanım sırasında 1x solüsyona 1 mM DTT eklendi.

1 mM Ditiotreitol (DTT) Çözeltisi: 0.77 g DTT 70 mL dH_2O içerisinde çözüldükten sonra son hacim dH_2O ile 100 mL ye tamamlanarak 4 °C de muhafaza edildi.

50 mg/ml lizozim: 500 mg lizozim (%90 w/w) 10 ml steril ddH_2O da çözümlenerek 200 μ L lik hacimlerde -20 °C de muhafaza edildi.

% 10 (w/v) sarkozil: 10 g sarkozil (%97 w/w) 100 mL steril ddH_2O da çözümlenerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

% 20 (v/v) Triton X-100: 20 mL Triton X-100, 70 mL ddH_2O da çözüldükten sonra ddH_2O ile son hacim 100 mL ye tamamlanarak 4 °C de muhafaza edildi.

TLC Plate Yürütme Çözeltileri:

Asetonitril/su (85/15; v/v) mono, di ve trisakkaritlerin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanıldı.

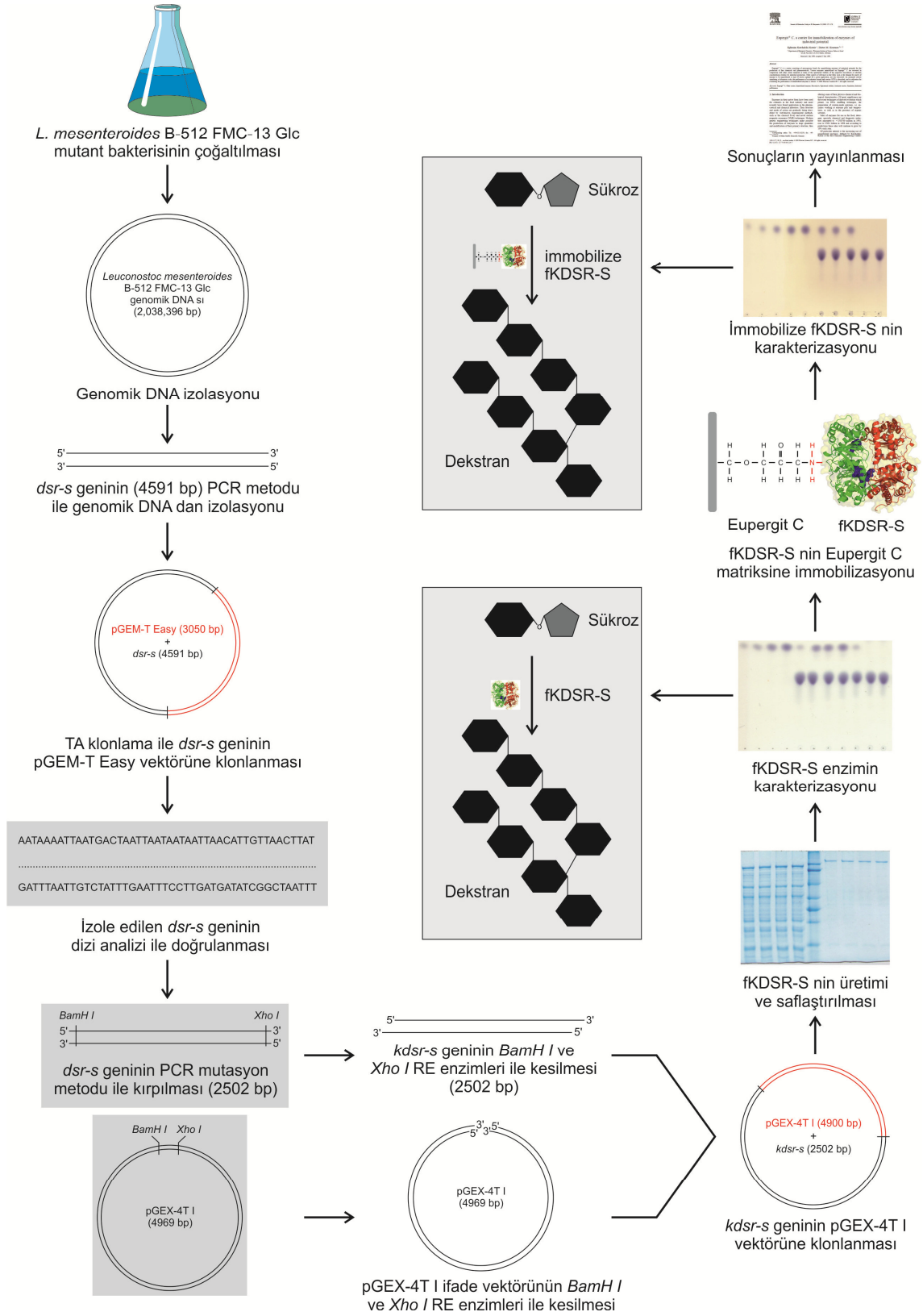
Nitrometan/su/1-propanol (2/3/5; v/v/v) Oligosakkaritlerin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanıldı.

Asetonitril/Etil Asetat/1-Propanol/Su (8.5/2/5/7; v/v/v/v) Oligosakkaritlerin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanıldı.

TLC Plate Renklendirme Çözeltisi: 5 g α -naftol (%99 w/w) 950 mL etanol (%99 w/w) içerisinde çözümlenerek üzerine 50 mL sülfirik asit (%98 v/v) yavaşça ilave edilip 1 L ye tamamlandı. Çözelti ışık geçirmeyen bir cam şişe içerisinde 4 °C de muhafaza edildi.

4. METODLAR

Tez çalışması Şekil 4.1 de özetlenmiştir.



Şekil 4.1: Tez çalışmasında uygulanan metodların özeti.

4.1. *L. mesenteroides* B-512 FMC-13 Glc nin Üretimi

L. mesenteroides B-512 FMC-13 Glc, -80 gliserol stoktan steril pipet ucu ile 200 ml 1:1000 oranında kloramfenikol içeren MRS besiyerine ekildi. Bakteri çoğalması için çalkalamalı inkübatörde 130 rpm, 23 °C de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerden genomik DNA izolasyonu yapıldı.

4.2. Genomik DNA izolasyonu

L. mesenteroides B-512 FMC-13 Glc suşundan genomik DNA izolasyonu için aşağıdaki prosedür izlendi.

1. Hücre kültürü nazikçe çalkalanarak hücrelerin besi yeri içinde eşit dağılması sağlandıktan sonra 50 mL lik falkonlara ayrıldı.
2. Hücre kültürü 4 °C, 2000 Xg de 15 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve üst sıvı atıldı.
3. Hücre peleti 20 mL S tampon içinde çözüldü, vakit kaybetmeden 100 µL Proteinaz K (10 mg/mL) hücre süspansiyonuna eklendi. Bütün peletin çözüldüğüne emin oluncaya kadar karışım vortekslendi.
4. 2 mL % 20 SDS eklenerek karışım nazikçe alt üst edildi.
5. Karışım 65 °C de 1 saat inkübe edildi. Bu süre içerisinde her 15 dakikada bir karışım nazikçe alt üst edildi.
6. Süre sonunda karışıma çeker ocak içinde 20 mL fenol:kloroform (1:1) çözeltisi ilave edilerek karışım 5 dakika alt üst edildi.
7. Süre sonunda karışım 4 °C, 3500 Xg de 10 dakika santrifüj edildi.
8. Üst sıvı steril bir tüpe transfer edilerek 6/10 oranında izopropanol eklendi. Karışım nazikçe alt üst edildi. Bu aşamada genomik DNA pamuksu bir yapı şeklinde tüpün içinde görünür hale geldi.
9. Bir pipet yardımı ile DNA alınarak 1.5 mL lik steril bir eppendorf tüpüne aktarıldı. Tüp %70 soğuk etanol ile yıkandı.

Tablo 4.1: *dsr-s* geninin *L. mesenteroides* B-512 FMC-13 Glc suşunun genomik DNA sıندان izolasyonu için kullanılan PCR şartları.

Madde	Miktar (µ l)	Uygulama	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)	
10X PCR tamponu (MgCl ₂ +)	5.0	Başlangıç	94	120	
Kalip DNA (123 ng/ µ l)	2.0	Ayrılma	94	15	10 döngü
dNTP mix (10 mM)	7.0	Birleşme	56	30	
İleri primer (10 pmol/ µ l)	1.0	Uzama	68	360	
Geri primer (10 pmol/ µ l)	1.0	Ayrılma	94	20	25 döngü
Ekspand long template enzim	0.75	Birleşme	56	30	
Regular Taq DNA plimeraz	0.25	Uzama	68	380	
H ₂ O	33.0	Sonlanma	68	600	
Total	50				

PCR sonrası karışım 6XDNA yükleme tamponuyla karıştırılıp % 0.8 lik low melting agaroz jelde (70 V, 90 dak) yürütüldü.

PCR ürününün agaroz jelden geri kazanımı QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ile üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. Saflaştırma sonucunda elde edilen PCR ürününün miktarının tespiti için nanodrop kullanıldı. Saflaştırma sonucu elde edilen PCR ürünü TA klonlamada kullanıldı.

4.4. TA Klonlama

TA klonlama için pGEM-T Easy (Promega) vektör sistemi kullanıldı. Firmanın önerdiği kullanım koşullarına göre klonlama gerçekleştirildi. Mavi-beyaz koloni seçimi ile klonlama kontrol edildi. Seçilen kolonilerden örnekler alınarak 5 ml LB besiyerine (100 µg/ml ampisilin içeren) ekilerek 200 rpm 37 °C de 10 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda çoğalan hücreler 4 °C, 2000 Xg de 15 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Üst sıvı atıldıktan sonra pelete klon vektör izolasyonu için miniprep presedürü uygulandı. Miniprep QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uygun bir şekilde gerçekleştirildi.

4.5. *dsr-s* Geninin Dizi Analizi

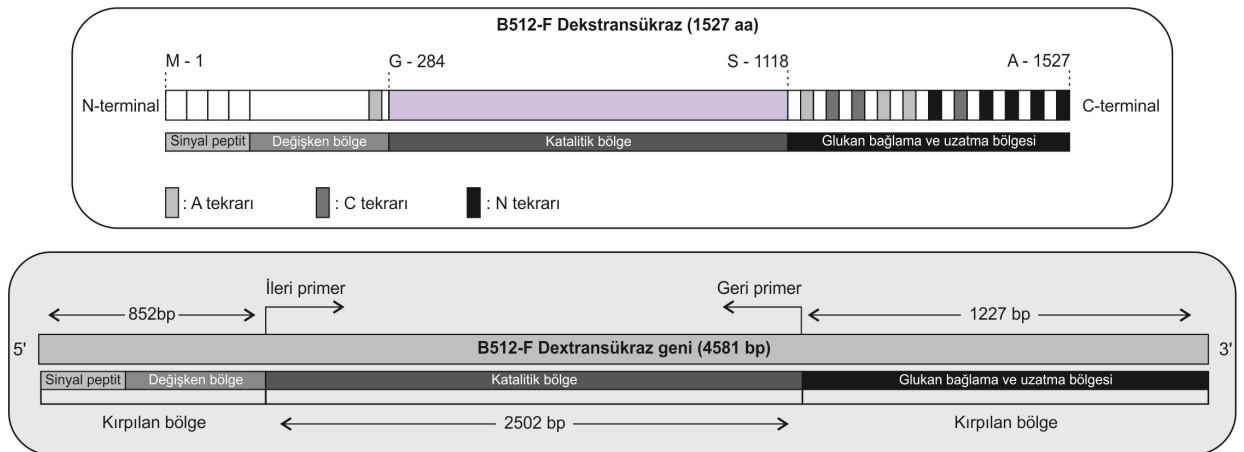
Dizi analizi REFGEN (Ankara) firmasından hizmet satın alınımı şeklinde gerçekleştirildi.

Dizi analizi için kullanılan primerler Sequencher ve FastPCR programları kullanılarak tasarlandı. Dizi analizi için kullanılan primerlerin listesi aşağıda verilmiştir.

Sekans ileri primeri	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (T7)
Sekans ileri primeri	5'-TGCAGCCCACGGTACGGATG-3'
Sekans ileri primeri	5'-GTATTCGTGTAAATGCAGTCGAC-3' (Asp - Asn)
Sekans ileri primeri	5'-GCTGGTGGCCAATCGATGTCC-3'
Sekans ileri primeri	5'-ACAAGCTTCCAATTGGCACC-3'
Sekans ileri primeri	5'-CAGAACTGGCTTTACACACG-3'
Sekans ileri primeri	5'-CCACAGTGAATGAA <u>ACTAGT</u> GAAG-3' (<i>SpeI</i>)
Sekans geri primeri	5'-CCGTCTGCATCAATGAATTCACC-3'
Sekans geri primeri	5'-GCTTCAACTGACACTGATCC-3'
Sekans geri primeri	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3' (SP6)

4.6. *dsr-s* nin Kırılması

DSR-S nin N-terminalinde sinyal dizi, değişken bölge ve katalitik bölge; C terminalinde ise glukan bağlama bölgesi bulunmaktadır [Giffard et al., 1993; Simpson et al., 1995; Vickermann et al., 1997; Russell, 1990; Monchois et al., 1997]. Bu dizilerin uzaklaştırılması PCR mutasyon yöntemi ile genin kırılması şeklinde gerçekleştirildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: *dsr-s* geninin kırma işleminin gerçekleştirildiği bölge.

PCR mutasyonu yöntemi ile genin kırılması ve sonraki klonlama işlemleri için kullanılması düşünülen primerler Sequencher, Clone Manager ve

FastPCR programları kullanılarak tasarlandı. Tasarlanan primerlerin listesi aşağıda verilmiştir.

İleri Primer (*BamH I*) : 5'-AAAAGGATCCTCTGGTGTGATTG-3'

Geri Primer (*Xho I*) : 5'-CCTTTATCCTCGAGTGTAAAGCC-3'

dsr-s genini kırmak amacı ile PCR reaksiyonunda kullanılan maddelerin miktarları ve PCR şartları Tablo 4.2 de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: *dsr-s* geninin kırılması amacı ile kullanılan PCR şartları.

Madde	Miktar (μ l)	Uygulama	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)	
10X PCR tamponu (MgCl ₂ +)	5.0	Başlangıç	94	120	
Kalıp DNA (157 ng/μ l)	2.0	Ayrılma	94	10	10 döngü
dNTP mix (10 mM)	4.0	Birleşme	56	40	
İleri primer (10 pmol/μ l)	1.0	Uzama	68	150	
Geri primer (10 pmol/μ l)	1.0	Ayrılma	94	15	25 döngü
LA taq enzim	0.75	Birleşme	56	40	
Regular Taq DNA plimeraz	0.25	Uzama	68	180	
H ₂ O	36.0	Sonlanma	68	300	
Total	50				

PCR sonrası karışım 6XDNA yükleme tamponuyla karıştırılıp % 0.8 lik low melting agaroz jelde (70 V, 90 dak) yürütüldü.

PCR ürününün agaroz jelden geri kazanımı QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ile üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. Saflaştırma sonucunda elde edilen PCR ürününün miktarının tespiti için nanodrop kullanıldı.

4.7. Enzim Kesimi

PCR ürünü olan *kdsr-s* geninin ve pGEX 4T-1 (Promega) vektörünün *BamH I* ve *Xho I* restriksiyon enzimleri (RE) ile kesimi yapıldı. Kesimde kullanılan kimyasallar, bu kiyasalların miktarları ve reaksiyon şartları Tablo 4.3 verilmiştir.

Tablo 4.3: *kdsr-s* geni ve pGEX 4T-1 vektörünün klonlama amaçlı *BamH I* ve *Xho I* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim şartları.

Madde	Miktar (μ l)	Madde	Miktar (μ l)
10X Buffer (Orange)	3	10X Buffer (Orange)	3
K. Dekstransucrase (72 ng/ μ l)	20	pGEX-4T 1 (273 ng/ μ l)	5
BamH I	1	BamH I	1
Xho I	1	Xho I	1
H ₂ O	5	H ₂ O	20
Toplam	30	Toplam	30

Enzim kesimi 37 °C de 4 saat inkübasyona ile gerçekleştirildi.

Kesim süresi sonunda reaksiyon karışımları 6XDNA yükleme tamponuyla karıştırıldı ve % 0.8 lik low melting agaroz jelde (70 V, 90 dak) yürütüldü.

Elde edilen serbest form enzim kesimi ürününleri agaroz jelden geri kazanımı QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ile üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. Saflaştırma sonrası miktar tayini nanodrop kullanılarak gerçekleştirildi.

4.8. Bağlama İşlemi

Bağlama işlemi için ROCHE firmasından temin edilen T4 DNA Ligaz Kit sistemi kullanıldı. Bağlama işlemi üretici firmanın (ROCHE) kullanım talimatlarına göre gerçekleştirildi.

Bağlama optimizasyonu amacı ile vektör:insert oranı 1:3 olarak seçildi. Ligasyonda kullanılan maddeler, madde miktarları ve ligasyon şartları Tablo 4.4 de verilmiştir.

Tablo 4.4: *kdsr-s* geni ve pGEX 4T-1 vektörünün bağlama şartları (1:3 oranı).

(+) (+)		(-) (-)	
Madde	Miktar (μ l)	Madde	Miktar (μ l)
T4 DNA ligase Buffer	2	T4 DNA ligase Buffer	2
K. Dekstransükraz (73 ng/ μ l)	7.5	K. Dekstransükraz (73 ng/ μ l)	-
pGEX-4T 1 (142 ng/ μ l)	2.5	pGEX-4T 1 (142 ng/ μ l)	2.5
T4 DNA ligase	1	T4 DNA ligase	1
H ₂ O	7	H ₂ O	14.5
Total	20	Total	20

Bağlama işlemi çalışmaları buz üzerinde gerçekleştirildi.

Bağlama işlemi oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon ile gerçekleştirildi.

4.9. Transformasyon İşlemi

Bağlama karışımı *E.coli* kompetent hücrelerine aşağıdaki prosedür uygulanarak transfer edildi.

1. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ den çıkarılan *E.coli* DH5 α kompetent hücreleri (90 μL) buz üzerinde 20 dakika çözüldü.
2. Bağlama karışımınının 10 μL si çözülmüş hücrelere pipetlenerek ilave edildi ve buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi.
3. Karışım $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ lik su banyosunda 45 saniye ısı şokuna tabi tutuldu.
4. Isı şokundan alınan hücreler 60 saniye buz üzerinde tutulduktan sonra $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ deki SOC besiyerine (900 μL) ilave edilerek $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 225 rpm de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon sonunda hücreler 2000 Xg de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve tüpün dibinde 50 μL kalacak şekilde üst sıvı atıldı.
6. Hücreler kalan sıvıda çözüldükten sonra LB-agar (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampisilin içeren) platalere ekim yapılarak 200 rpm ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de gece boyunca büyümeye bırakıldı.
7. Ertesi gün agar platalerdeki kolonilerin analizi yapıldı.

4.10. Klonlama İşleminin Analizi

Platelerdeki koloniler 5 ml sıvı LB ye (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ekilerek 200 rpm, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 10 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 3500 Xg de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant atıldıktan sonra klon vektörlerin izolasyonu için miniprep yapıldı. Bu amaçla Miniprep QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) kullanıldı. Üretici firmanın talimatlarına göre izole edilen klon vektörlerin miktar ve kalite analizi nanodrop ile gerçekleştirildi.

pGEX 4T-1 vektörüne kdsr-s geninin başarılı bir şekilde bağlandığını doğrulamak amacı ile *BamH I/Xho I* restriksiyon enzimleri kullanılarak

restriksiyon analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla hazırlanan reaksiyon şartları Tablo 4.5 da verilmiştir.

Tablo 4.5: pGEX 4T-1 + *kdsr-s* klon vektörünün kontrolü amacı ile yapılan enzim kesim şartları.

Madde	Miktar (µl)
10X Buffer (Orange)	1
DNA (Vektör)	5
BamH I	0.5
Xho I	0.5
H ₂ O	3
Toplam	10

Restriksiyon kesim karışımı kısa spin edilerek 37 °C de 90 dakika kesime bırakıldı. Kesim sonrasında karışım 6XDNA yükleme tamponuyla karıştırıldıktan sonra % 1 lik agaroz jelde (70 V, 90 dak) yürütülür.

Klon vektör, *E. coli* BL21 (DE3) kompatent hücrelerine standart transformasyon prosedürü uygulanarak transfer edildi.

4.11. Protein Sentezi Optimizasyonu

IPTG indüksiyonunun yüksek maliyeti ve zahmetli prosedüründen dolayı modifiye ettiğimiz studier auto-induction besiyerinde rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) ile protein sentezi gerçekleştirildi. 1 L modifiye studier auto-induction besiyerinin içeriği; kazein ile sindirilmiş pepton (20 g), yeast extract (5 g), NaCl (5 g), Na₂HPO₄ (6 g), KH₂PO₄ (3 g), glikoz (0.5 g), laktoz (2 g), gliserol (6 mL), Tris base (12.1 g), sükroz (0.0-2.0 g), CaCl₂ (0.05 g) olarak tespit edildi. Klon vektörü taşıyan rekombinant *E. coli* BL21 (DE3) 37 °C de 200 rpm de ampisilin içeren (5 µL, 1 g/ml) 5 mL lik LB besiyerinde gece boyunca çoğalmaya bırakıldı. Ertesi sabah çoğalmış olan kültürden, modifiye studier auto-induction besiyerlerine [pH (6.0-7.2), sükroz (0.0-0.4 g), (200 mL)] farklı miktarlarda (0.2-4 mL) ekim yapılarak 200 rpm de farklı sıcaklıklarda (18-28 °C) 12 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

Ekim anında, 2., 4., 6., 8., 10. ve 12. saatlerde olmak üzere 1 er mL 7 örnek alınarak protein sentez miktarının tespiti için % 12 lik SDS-PAGE protokolü uygulandı. Böylece zamana bağlı protein sentez miktarı nitel olarak tespit edildi.

Aynı süreçte aktivite tayini 12 saat boyunca her saat olmak üzere 10 mL 12 örnek alındı. Bu örnekler hem hücre miktarının hem de enzim aktivite miktarının tespiti için kullanıldı. Hücre miktarı UV spektrofotometrede $\lambda_{600\text{nm}}$ dalga boyunda OD ölçümleri ile tespit edildi. Hücre miktarı tayininden sonra alınan örneklerle aşağıdaki protein saflaştırma prosedürü uygulandı.

1. Alınan örnekler 3500 Xg de 15 dakika 4 °C de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra hücre peleti -80 °C de hızlı dondurulmaya bırakıldı.
2. Dondurma işleminden sonra gram pelet başına 3 mL olacak şekilde 1X ekstraksiyon tamponu eklendi ve pipetlenerek pelet çözüldü.
3. Karışıma 1 µg/mL olacak şekilde lizozim ve 1:500 PMSF eklendi.
4. Karışım 30 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Her 5 dakikada bir tüp alt üst edildi.
5. Süre sonunda % 1 son konsantrasyon olacak şekilde sarkozil eklendi.
6. Karışıma buz üzerinde 50 W, 20 kHz de 5X (10 saniye sonikasyon 30 saniye bekleme) sonikasyon uygulandı.
7. Sonikasyon sonrasında karışıma % 1 Triton-X100 eklenerek tüp alt üst edildi.
8. Karışım 8,000 Xg de 20 dakika 4 °C de santrifüj edildi.
9. Hücre peleti uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen üst sıvılar enzim aktivitesi için kullanıldı.

Enzim aktivitesinin tespiti için standart aktivite tayini kullanıldı.

4.12. KDSR-S Enziminin Miktar Tayini

SDS-PAGE analizinde, üst sıvı içindeki protein bantlarının büyüklükleri kontrol edildiğinde fKDSR-S nin dışında yüksek miktarda 100 kDa dan daha büyük protein bulunmadığı tespit edildi. Daha doğru bir sonuç elde etmek amacı ile Amicon ultra-15 centrifugal filter unit with ultracel-100 membrane kullanılarak hem protein konsantrasyonu hem de ikinci bir saflaştırma işlemi

gerçekleştirildi. Saflaştırma sonrasında elde edilen ürün % 12 lik SDS-PAGE ile kontrol edildi.

Saflaştırılan fKDSR-S miktar tayini, Thermo Scientific firmasından temin edilen Pierce BSA Protein Assay Kit ile üretici firmanın tavsiye ettiği protokole uygun olarak ELISA plateler kullanılarak gerçekleştirildi.

4.13. Kantitatif Karbohidrat Tayini

Kantitatif karbohidrat tayini için ince tabaka kromatografisi (TLC) metodu kullanıldı. Fruktoz tayini için, standart çözelti ve örneklerden Hamilton mikroşırınga ile 1 er μL alınarak Whatman K5 TLC tabaka üzerine damlandı ve kurutuldu. Mono, di ve trisakkaritlerin Whatman K5 TLC tabaka üzerine yürütülmesi amacıyla asetonitril/su (85/15 v/v) çözelti sisteminde iki kez yürütüldü. Oligosakkaritlerin Whatman K5 TLC tabaka üzerinde yürütülmesi amacıyla nitrometan/su/1-propanol (2/3/5 v/v/v) çözelti sistemi ile üç kez TLC tabakanın üçte ikisine kadar yürütüldükten sonra, asetonitril/su (85/15 v/v) çözelti sisteminde ise iki kez TLC tabakasının üst sınırına kadar yürütüldü. Karbohidratların görünürlüğünün sağlanması için TLC tabakası, içinde % 5 sülfürik asit ve % 0.5 α -naftol içeren etanol çözeltisine daldırılıp $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 10 dakika ısıtıldı. Karbohidratların kantitatif tayinleri TLC densitometre metodu kullanılarak gerçekleştirildi [Robyt et al.,1994; Pukl and Prosek, 1990].

4.14. fKDSR-S ve İmmobilize fKDSR-S nin Aktivite Tayini

Serbest (1 mL) veya immobilize enzim (0.45 g), CaCl_2 (18 mM) ihtiva eden sodyum asetat tampon çözeltisinde (50 mM, pH 5.5), sükrozla (200 mM) $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ de, 30 dakika boyunca çalkalamalı su banyosunda (200 rpm) muamele edildi. Reaksiyon sonunda alınan numune (200 μL), saf suya (800 μL) ilave edilerek 10 dakika kaynatıldı. Reaksiyonda oluşan fruktoz miktarı, TLC metodu kullanılarak tayin edildi. Aktivite (IU), CaCl_2 (18 mM) içeren asetat tampon çözeltisinde (50 mM, pH 5.5) sükrozla (200 mM) $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 1 μmol D-fruktoz üreten enzim miktarı olarak tanımlandı.

4.15. Optimum Sıcaklık, pH ve Kinetik Parametrelerin Tespiti

K_m, V_m, optimum sıcaklık ve pH her bir faktör için farklı şartlar [pH 4.0-7.0; sıcaklık 15-40 °C; sükröz (10-500 mM)] kullanılarak fKDSR-S veya immobilize fKDSR-S için aktivite tayini ile tespit edildi. K_m ve V_m tespiti için, 10-50 mM sükröz kullanıldı. Kinetik parametrelerin tayininde Lineweaver-Burk grafiğinden faydalanıldı.

4.16. Sıcaklık ve pH Kararlılığının Tespiti

Kararlılığın tespiti için fKDSR-S (1 mL) veya immobilize fKDSR-S (0.45 g) farklı pH (4.0-7.0) veya sıcaklıklarda (15-40 °C) 120 dakika tutuldu. Süre sonunda enzim aktiviteleri standart aktivite tayin metodu kullanılarak tespit edildi. Bu çalışmalar sırasında, sodyum asetat (50 mM, pH 4.0-5.5) ve sodyum fosfat tampon çözeltileri (50 mM, pH 6.0-7.0) kullanıldı.

4.17. Tampon Çözelti Çeşitlerinin Enzim Aktivitesine Etkisi

Tampon çözeltiler ve konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine olan etkilerinin tespit edilebilmesi için farklı konsantrasyonlara sahip (25-750 mM) kalsiyum ve sodyum asetat tampon çözeltilerinde enzim aktiviteleri ölçüldü. Enzim aktivitesine kalsiyum klorürün etkisinin tespit edilebilmesi için ise kalsiyum klorür (2-20 mM) içeren sodyum asetat tampon çözeltilerinde (50 mM, pH 5.5) enzim aktiviteleri tayin edildi.

4.18. Dekstran ve Akseptör Reaksiyonları

Dextran biyosentezi için DSR-S (15 IU), fKDSR-S (15 IU) veya immobilize fKDSR-S (15 IU), CaCl₂ (18 mM) ihtiva eden sodyum asetat tampon çözeltisinde (50 mM, pH 5.5), sükrözla (200 mM) 25 °C de, 12 saat çalkalamalı su banyosunda (200 rpm) muamele edildi. Akseptör reaksiyonlarının tespiti için DSR-S (15 IU), fKDSR-S (15 IU) veya immobilize fKDSR-S (15 IU), CaCl₂ (18 mM) ihtiva eden sodyum asetat tampon çözeltisinde (50 mM, pH 5.5), sükröz (200 mM) ile birlikte 200 mM

akseptör madde (maltoz, laktoz, glikoz veya fruktoz) konularak, 25 °C de, 12 saat çalkalamalı su banyosunda (200 rpm) muamele edildi.

4.19. İmmobilizasyon Optimizasyonu

Enzim immobilizasyonunun matriks miktarı, tampon konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve immobilizasyon süresi gibi parametrelere bağlı olduğu bilinmektedir [Boller et al., 2002]. Bu nedenle fKDSR-S nin immobilizasyonu için matriks miktarları (100-2000 mg), tampon konsantrasyonu (50-2000), inkübasyon süresi (3-15) ve pH (4.0-7.0) değişkenleri ayrı ayrı kontrol edildi.

4.20. İmmobilizasyon

İmmobilizasyon, fKDSR-S (1 mL; 30.6 IU) ve Eupergit C 250L (400 mg) karışımının kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (5 mL, 300 mM, pH:5.5) 4 °C de, 150 rpm de, 6 saat muamele edilmesi ile gerçekleştirildi. Daha sonra reaksiyon karışımına BSA (200-750 ng) eklenerek 4 °C de, 150 rpm de, 24 saat muamele edilerek Eupergit C 250L üzerindeki serbest epoksi grupları uzaklaştırıldı. Süre sonunda vakum altında sinter cam filtreler kullanılarak, matriks kalsiyum asetat tampon çözeltisi (10 mL, 100 mM, pH 5.5) ve dH₂O ile yıkandı.

4.21. İmmobilize fKDSR-S nin Reaksiyon ve Depolama Kararlılığı

İmmobilize enzimin reaksiyon kararlılığı 15 kez tekrarlanan reaksiyonlardan sonra enzim aktivitesinin ölçülmesiyle izlendi. Depolama kararlılığı ise her iki günde bir enzim aktivitesinin 35 gün süresince ölçülmesiyle belirlendi. Bu süre boyunca immobilize enzim kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (10 mL, 300 mM, pH 5.5), buzdolabında (4 °C) saklandı.

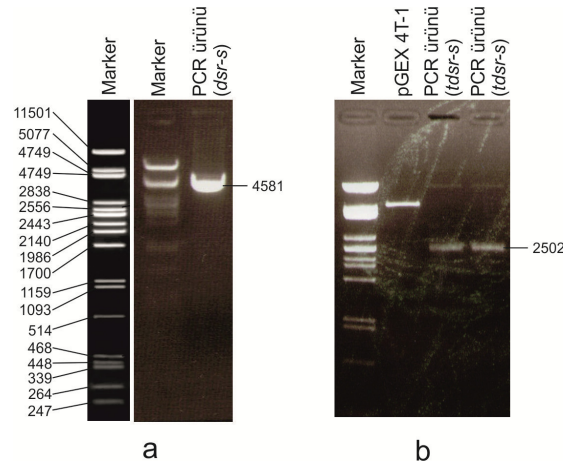
5. BULGULAR VE TARTIŞMA

Dekstransükraz; dekstran biyosentezinin yanında izomaltooligosakkarit ve panoz gibi bir kısım prebiyotiklerin sentezini gerçekleştiren ve endüstriyel olarak çok büyük öneme sahip bir enzimdir. Bu çalışmada, *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC bakterisinin sahip olduğu dekstransükraz geninin C-terminal bölgesindeki glukon bağlanma bölgesi ve N-terminaldeki sinyal peptit ve değişken bölge kısımları kırıldıktan sonra vektör kökenli GST proteini ile füzyon haline getirilmesi ile yeni ve aktif bir dekstransükraz enzimi üretildi. Dekstran uzamasını ve dekstranın enzim üzerine bağlanmasını sağlayan glukon bağlama bölgesinin gen mühendisliği ile kesilmesi, yeni dekstransükrazın daha yüksek miktarda oligosakkarit sentezlemesine yönlendirilmesinin yanında sinyal peptit ve değişken bölgenin kesilmesi yeni enzimin *E. coli* tarafından daha yüksek miktarda üretilmesini sağlamıştır.

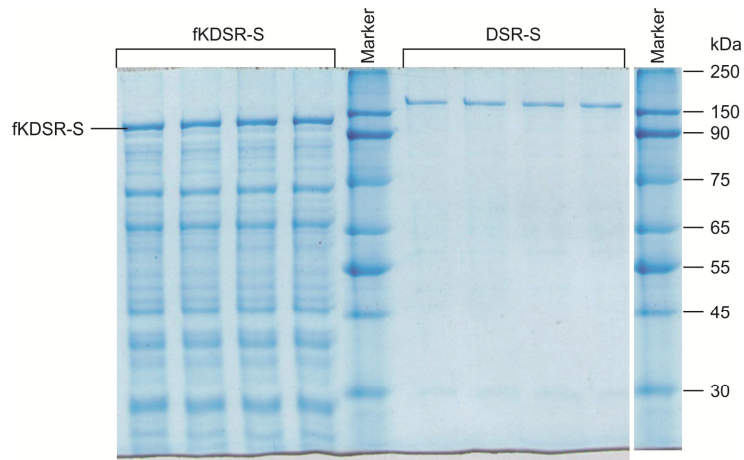
Dekstransükrazın kovalent immobilizasyonu bu güne kadar yüksek başarı ile gerçekleştirilememiştir. Bu başarısızlığın iki önemli nedeni vardır. Bunlardan birincisi enzimin etrafındaki dekstran maskesi, ikincisi ise enzimin aktif merkezinde bulunan lizin, aspartik ve glutamik asit rezidülerinin immobilizasyon matriksindeki reaktif gruplarla etkileşimi sonucu enzimin aktivitesini yitirmesidir. Enzimin C-terminaldeki glukon bağlama bölgesinin kırılması ile enzim etrafındaki dekstran maskesinin önemli ölçüde ortadan kaldırılması ve N-terminaline GST proteini ile birlikte 19 lizin, 34 karboksil ve 4 sistein rezidüsünün eklenmesi sonucu immobilizasyon matriksindeki reaktif grupların enzimin aktif bölgedeki amino asit rezidüleri ile etkileşiminin önemli ölçüde azaltılması sonucu enzimin kovalent immobilizasyonu yüksek bir başarı ile gerçekleştirildi (immobilizasyon verimi: %100, aktivite verimi: %83.3). 1980 li yıllardan bu yana dekstransükrazın kovalent immobilizasyonu ile ilgili yapılan birçok çalışmalarda en yüksek %13 aktivite veriminin elde edilmiş olması ve Kaboli ve Reilly nin bir çok farklı metod ve matriksi denedikten sonra önemli bir başarıya ulaşamayarak “dekstransükraz immobilizasyonu oldukça güç bir enzimdir” sonucuna varmaları bu çalışmanın önemini ortaya koymaktadır [Kaboli and Reilly, 1980; M. Alcalde et al., 1999].

5.1. Genetik Çalışmalar

B512-F Dekstransükraz ın rekombinant sistemlerde üretiminin artırılması ile birlikte akseptört reaksiyonlarına yönlendirilmesinin ve kovalent immobilizasyonuna engel olan sebeplerin ortadan kaldırılması amacı ile gen mühendisliği teknikleri kullanılarak yeni bir enzim üretildi. Böylece gen büyüklüğü 4581 olan *dsr-s* 852 bp N-terminalden ve 1227 bp C-terminalden olmak üzere toplam 2079 bp kırılarak 2502 bp büyüklüğüne indirildi (Şekil 5.1a-b). Dolayısıyla 1527 aa büyüklüğündeki DSR-S; 284 aa N ve 409 aa C-terminalden kırılarak, ~180 kDa olan enzim boyutu, 93 kDa kadar düşürüldü (GST proteiniyle birlikte ~120 kDa) (Şekil 5.2).



Şekil 5.1: PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü [a: *dsr-s* (226 ng/μl), b: *dsr-s* (97 ng/μl)].



Şekil 5.2: fKDSR-S ve DSR-S nin SDS-PAGE görüntüsü.

Gen ve mutasyon tespiti için yapılan dizi analizi sonucunda NCBI 587695 GI numaralı referans dizisi ile yalnızca 2742 pozisyonunda A-C sessiz mutasyonu dışında bir değişiklik olmadığı tespit edildi.

fKDSR-S nin bazı özellikleri Tablo 5.1 de verilmiştir.

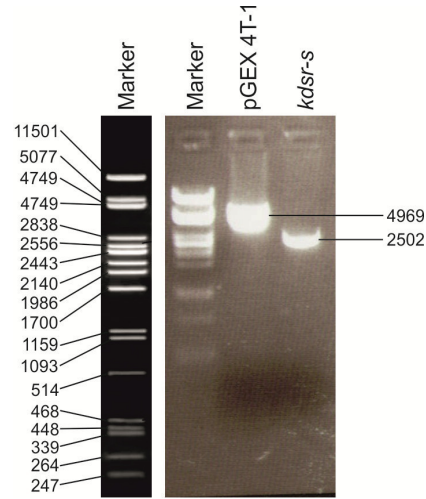
Tablo 5.1: fKDSR-S karakterizasyonu.

Toplam amino asit sayısı	839
Proteinin toplam ağırlığı	93 kd
Proteinin izoelektrik noktası	3.90

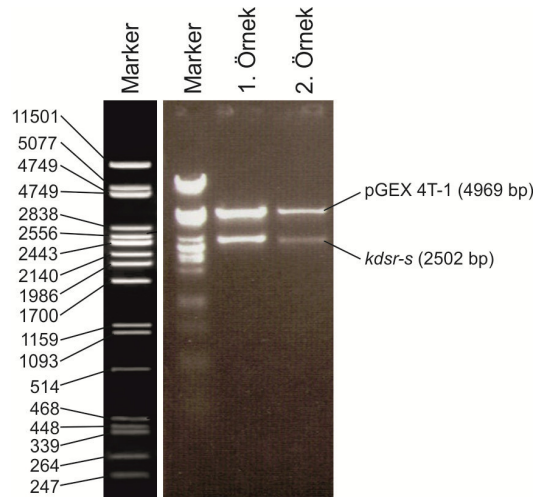
	Amino asit çeşidi	Amino asit sayısı
Polar amino asitler	Asn	61
	Gln	55
	Ser	66
	Thr	73
	Tyr	49
Bazik amino asitler	Lys	24
	Arg	21
	His	12

	Amino asit çeşidi	Amino asit sayısı
Nonpolar amino asitler	Ala	78
	Met	16
	Pro	24
	Phe	27
	Gly	50
	Ile	37
	Val	52
	Trp	13
	Leu	61
Asidik amino asitler	Asp	81
	Glu	39

Genetik olarak *dsr-s* kırıldıktan sonra pGEX 4T-1 vektörüne klonlandı (Şekil 5.3). Klonlama analizi agaroz jel elektroforezi ile doğrulandı (Şekil 5.4). Bu klonlama ile birlikte *kdsr-s* geninin 5' ucuna *gst* gen parçası eklendi. fKDSR-S nin aktivitesi 30.6 IU/mL ve spesifik aktivitesi 122.4 IU/mg protein olarak tespit edildi. Protein saflaştırılması için kullanılan GST proteininin enzimin aktivitesi üzerinde hiç bir etkisinin olmadığı tespit edildi. Bununla birlikte 21 lizin, 18 aspartik asit, 16 glutamik asit ve 4 tane sistein rezidüsünün enzime eklenmesini sağladı. Bu işlem, enzimin Eupergit C 250L matrisine başarılı bir şekilde kovalent olarak immobilize edilmesini sağladı (100% immobilizasyon verimi, 83.3% aktivite verimi). Bu kadar yüksek başarı hali hazırda rapor edilmemiştir. GST proteini enzimden uzaklaştırıldıktan sonra KDSR-S optimum koşullarda Eupergit C 250L ile immobilize edildiğinde immobilizasyon verimi %100 olmasına rağmen aktivite verimi %3 gibi çok düşük bir değerde kaldı. Bu sonuç GST proteininin fonksiyonunu açıkça göstermektedir.



Şekil 5.3: *kdsr-s* geninin ve pGEX 4T-1 vektörünün *BamH I* ve *Xho I* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildikten sonra % 1 lik agaroz gel görüntüsü [*kdsr-s*: 2648 bp (73 ng/μL), pGEX 4T-1: 4942 bp (242 ng/μL)].



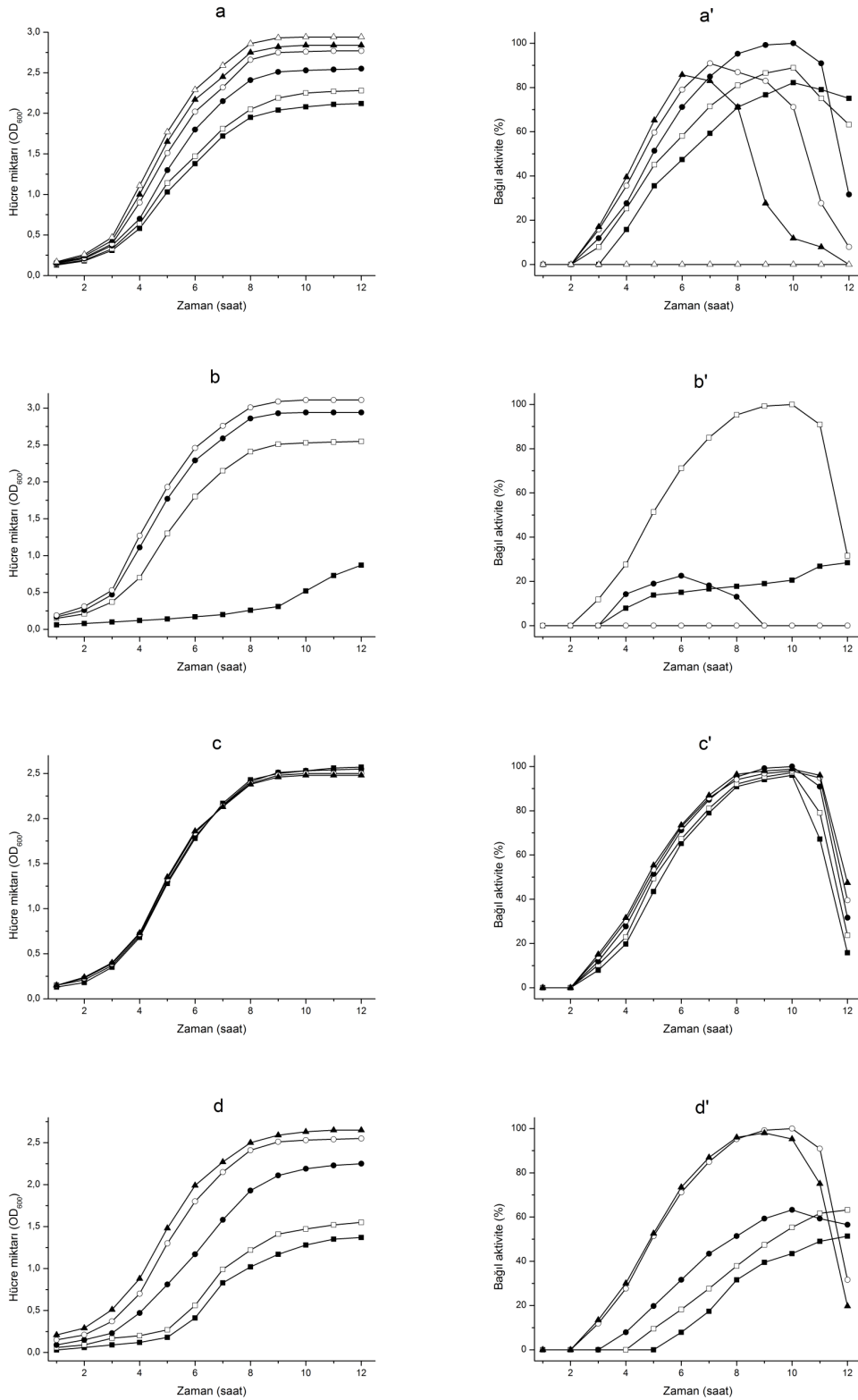
Şekil 5.4: pGEX 4T-1 + *kdsr-s* vektörünün *BamH I* ve *Xho I* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildikten sonra agaroz gel elektroforez görüntüsü.

Monchois, Moulis ve Monsan nın yanında bir çok araştırmacı dekstransükrazın kırılması ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Monchois ve ark. ilk olarak 1998 yılında enzimin C-terminal ucunu 83, 133, 170 ve 212 aa büyüklüğünde kademeli olarak kırarak 4 farklı boyutta dekstransükraz elde ettiler. Elde ettikleri bu mutant enzimleri sırasıyla DSR1, DSR2, DSR3, ve DSR4 olarak isimlendirdiler. Kırpma boyuna bağlı olarak enzim aktivitesinin kademeli olarak azaldığını ve DSR4 ün hiç bir aktiviteye sahip olmadığını tespit ettiler [Monchois et al., 1998]. Moulis ve ark. 2006 yılında yaptıkları çalışmada ise enzimi hem N (152 aa) hem de C-terminalden (77 aa) kırarak elde ettikleri mutant enzimin, aynı şartlarda sentezlenen doğal enzime göre 30

kat daha fazla aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu enzimin sentezlediği dextranın doğal enzimin ürünü ile aynı olduğunu belirtmişlerdir [Moulis et al., 2006]. Monsan ve ark. 2007 yılında yaptıkları kırpma çalışmalarında DSR-S vardel $\Delta 4N$, DSR-S vardel $\Delta 3$, DSR-S vardel Core, and DSR-S core ΔA olarak isimlendirdikleri beş farklı boyutta dekstransükraz elde etmişlerdir. En küçük aktif boyuta sahip olan mutant enzim DSR-S core ΔA 881 aa büyüklüğündedir [Monsan et al., 2007]. Bu tez çalışmasında üretilen aktif enzimin boyutu, Monsan'ın en küçük boyuttaki aktif dekstransükrazından 49 aa daha düşüktür. Bu sonuç dekstransükraz katalitik bölgesinin 832 aa ya da daha küçük olduğunu göstermektedir.

5.2. Protein Sentezinin Optimizasyonu

GST ile füzyon edilmiş KDSR-S enziminin (fKDSR-S) *E. coli* BL21 (DE3) suşunda üretimi; başlangıçta ekilen hücre miktarı, inkübasyon süresi, besiyeri pH sı ve ortam sıcaklığı faktörleri bakımından optimize edildi. Rekombinant *E. coli* nin üreme miktarı en iyi 28 °C ve 7.2 pH da olmasına rağmen en yüksek aktiviteye sahip enzim miktarı 22 °C ve 6.4 pH da gerçekleşti (Grafik 5.1a-a'-b-b'). Mediumdaki sükroz miktarının rekombinant *E. coli* üremesine etkisi çok az olmasına rağmen 1 L mediumda 1 g sükrozun aktif enzim üretimini ~%5 arttırdığı tespit edildi (Grafik 5.1c-c'). Başlangıçta ekilen hücre miktarının hem hücre çoğalması hem de aktif enzim üretimine etkisinin oldukça yüksek olduğu tespit edildi. En iyi rekombinant *E. coli* üremesi 1:50 başlangıç konsantrasyonu olduğu tespit edilmesine rağmen en yüksek aktif enzim üretimi 1:100 başlangıç konsantrasyonu olduğu tespit edildi (Grafik 5.1d-d'). Böylece modifiye studier auto-induction medium kullanılarak en yüksek aktif enzim üretiminin 1:100 başlangıç konsantrasyonu kullanılarak 22 °C, pH 6.4 ve 10 saat inkübasyon sonucunda olduğu tespit edildi.

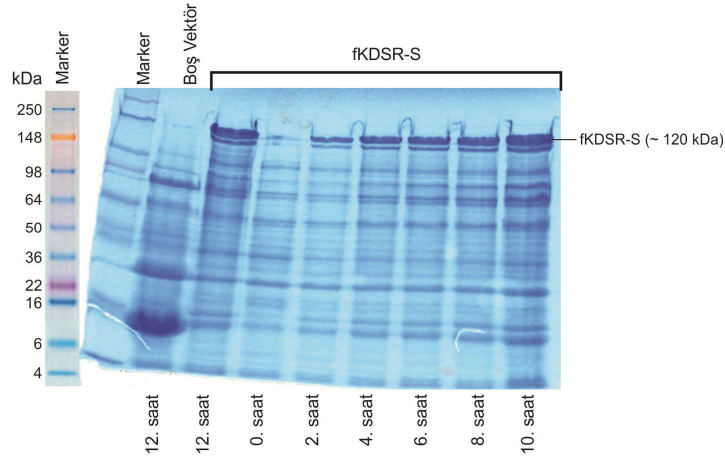


Grafik 5.1: *E. coli* BL21 (DE3) rekombinant bakterisinin üreme eğrisi ve ftDSR-S aktivitesi.

a: pH 6.4 de modifiye studier auto-induction besiyerinde, %18 sükröz konsantrasyonunda, sıcaklığın rekombinant *E. coli* üremesine etkisi; a': pH 6.4 de modifiye studier auto-induction besiyerinde, %18 sükröz konsantrasyonunda, sıcaklığın ftDSR-S aktivitesine etkisi. Enzim aktivite tayini standard assay metod ile gerçekleştirildi (-■-: 18, -□-: 20, -●-: 22, -○-: 24, -▲-: 26, -△-: 28 °C). b: 22 °C de, modifiye studier auto-induction besiyerinde, %20 sükröz konsantrasyonunda, pH'nın rekombinant *E. coli* üremesine etkisi; b': 22 °C de, modifiye studier auto-induction besiyerinde, %20 sükröz konsantrasyonunda, pH'nın ftDSR-S aktivitesine etkisi (-■-: 6.0, -□-: 6.4, -●-: 6.8, -○-: 7.2 pH). c:

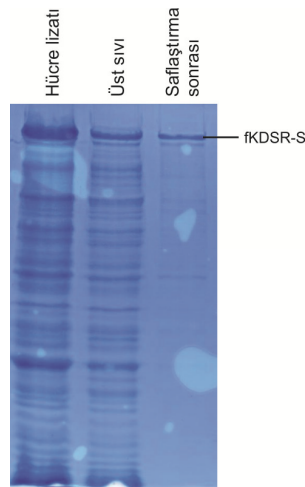
pH 6.4 de, 22 °C de, modifiye studier auto-induction besiyerinde, sükröz miktarının recombinant *E. coli* üremesine etkisi; c': pH 6.4 de, 22 °C de, modifiye studier auto-induction besiyerinde, sükröz miktarının fTDSR-S aktivitesine etkisi (-■-: 0.0, -□-: 0.5, -●-: 1.0, -○-: 1.5, -▲-: 2.0 g/L sükröz). d: pH 6.4 de, 22 °C de, modifiye studier auto-induction besiyerinde, %01 sükröz konsantrasyonunda, başlangıçta ekilen hücre miktarının recombinant *E. coli* üremesine etkisi; d': pH 6.4 de, 22 °C de, modifiye studier auto-induction besiyerinde, %01 sükröz konsantrasyonunda, başlangıçta ekilen hücre miktarının fTDSR-S aktivitesine etkisi (-■-: 1:1000, -□-: 1:500, -●-: 1:200, -○-: 1:100, -▲-: 1:50).

Optimum şartlarda (22 °C, pH 6.4, 1:100 başlangıç konsantrasyonu, modifiye studier auto-induction besiyerinde), zamana bağlı olarak üretilen fKDSR-S nin miktarı SDS-PAGE metodu kullanılarak tespit edildi (Şekil 5.5).



Şekil 5.5: Modifiye Studier Oto-induction indüklemesi sonucu zamana bağlı fKDSR-S üretimi.

Hücredeki protein miktarı, hücre lizatı, üst sıvı ve Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-100 membranları kullanılarak yapılan saflaştırma ile elde edilen saf fKDSR-S miktarları nitel olarak SDS-PAGE ile tespit edildi (Şekil 5.6). Bradford assay yöntemi kullanılarak yapılan nicel analizde üst sıvı ve saflaştırma sonucu elde edilen saf fKDSR-S miktarları sırasıyla ~830 ng/mL ve ~250 ng/mL protein olduğu tespit edildi.

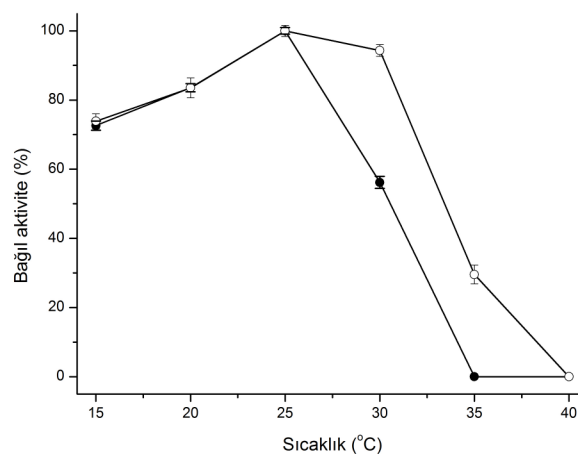


Şekil 5.6: Optimum şartlarda modifiye studier oto-induction besiyerinde üretilen rekombinant *E. coli* hücre pelleti, üst sıvı ve saflaştırma sonucu elde edilen fKDSR-S miktarları.

Optimum koşullarda üretilmiş olan fKDSR-S nin hücre lizat aktivitesi ($6330 \text{ U L}^{-1}_{\text{kültür}}$) DSR-S nin hücre lizat aktivitesinden ($\sim 180 \text{ U L}^{-1}_{\text{kültür}}$) 35 kat daha fazla olduğu tespit edildi. Bu aktivite aynı zamanda daha önce rapor edilmiş olan *L. mesenteroides* NRRL B-512F ($5850 \text{ U L}^{-1}_{\text{kültür}}$) [E. Fabre et al., 2005], *L. mesenteroides* NRRL B-1355 alternansucrase ($661 \text{ U L}^{-1}_{\text{kültür}}$) [G. Joucla et al., 2006], *L. mesenteroides* NRRL B-1299 ($580 \text{ U L}^{-1}_{\text{kültür}}$) [C. Moulis et el., 2006] sonuçlarından yüksektir.

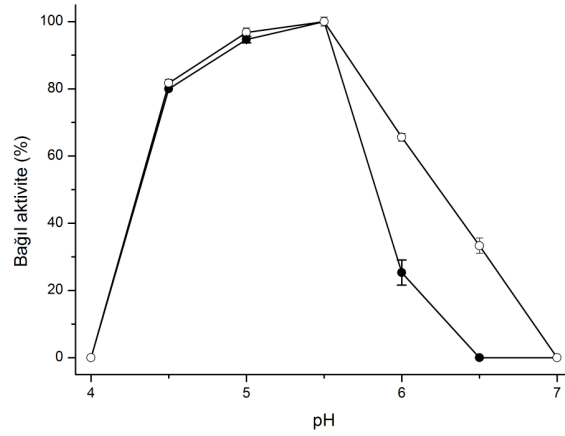
5.3. fKDSR-S nin Karakterizasyonu

Füzyon proteinin moleküler ağırlığı 118.974 kDa olarak tespit edildi. Enzim dekstran biyosentezini ve akseptör reaksiyonlarını etkili bir şekilde gerçekleştirmektedir. Enzimin kırılması ve GST ile birleştirilmesi, enzim optimum sıcaklık ve pH sında bir değişikliğe sebep olamdığı tespit edildi. Optimum sıcaklık ve pH, DSR-S ve fKDSR-S için sırasıyla $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ve 5.5 olarak belirlendi (Grafik 5.2-3). Bununla birlikte enzimin kırılması ve GST ile birleştirilmesi, enzimin sıcaklık ve pH kararlılığında olumsuz bir etkiye sebep olduğu tespit edildi. $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ de DSR-S aktivitesinin $\sim\%90$ nını korurken, fKDSR-S aktivitesinin tümünü yitirdiği tespit edildi (Grafik 5.4). pH 6.0 da, DSR-S aktivitesinin $\sim\%85$ ini korurken, fKDSR-S aktivitesinin $\sim\%10$ unu koruduğu gözlemlendi (Grafik 5.5).

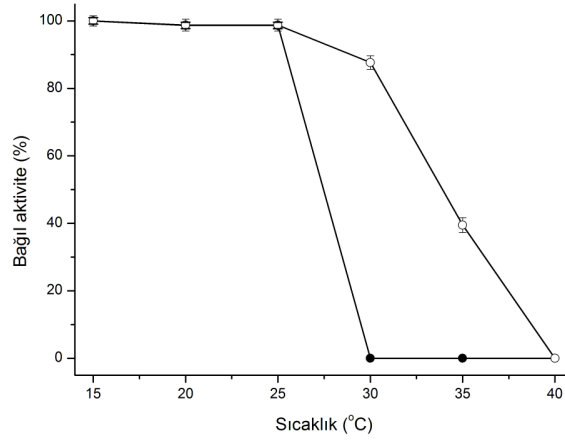


Grafik 5.2: Enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi (fKDSR-S -●-, DSR-S -○-).

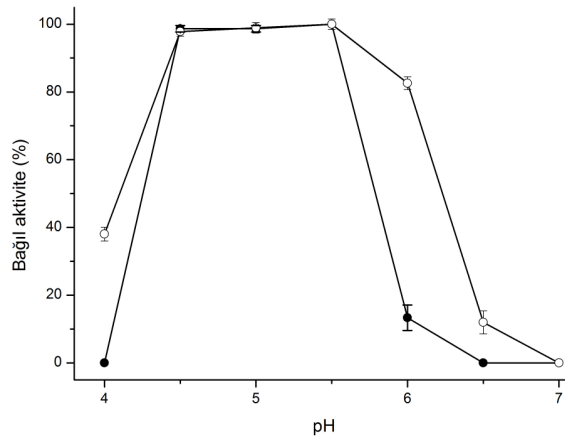
Herbir enzim için aktivitenin en yüksek değeri $\%100$ olarak kabul edildi.



Grafik 5.3: Enzim aktivitesine pH'nın etkisi (fTDSR-S -●-, DSR-S -○-). Herbir enzim için aktivitenin en yüksek değeri %100 olarak kabul edildi.

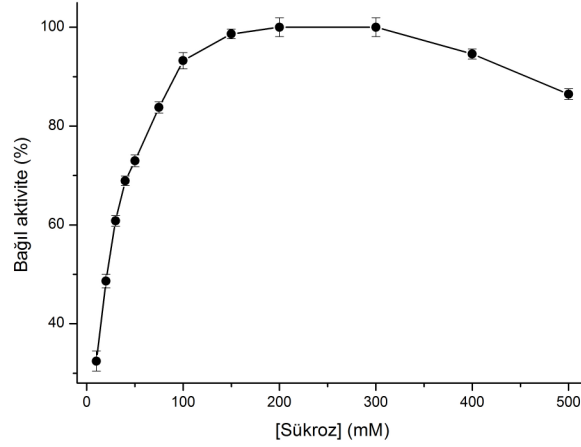


Grafik 5.4: Enzim kararlılığına sıcaklığın etkisi (fTDSR-S -●-, DSR-S -○-). Herbir enzim için aktivitenin en yüksek değeri %100 olarak kabul edildi.



Grafik 5.5: Enzim kararlılığına pH'nın etkisi (fTDSR-S -●-, DSR-S -○-). Herbir enzim için aktivitenin en yüksek değeri %100 olarak kabul edildi.

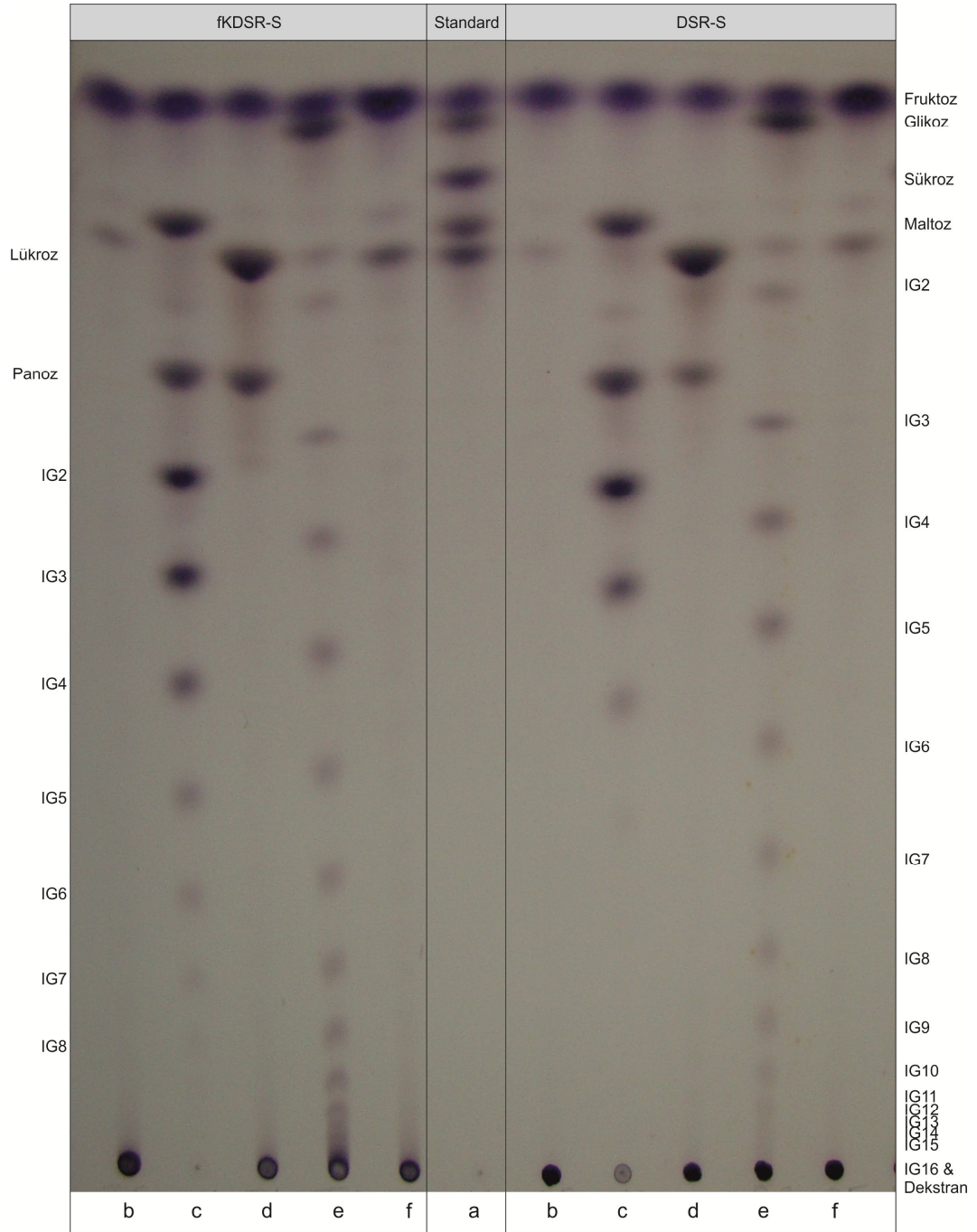
Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde 200 mM a kadar enzim aktivitesinin arttığı fakat 300 mM dan sonra sükrözün enzim inhibisyonu tespit edildi (Grafik 5.6).



Grafik 5.6: Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi.

Enzim aktivitesinin en yüksek değeri %100 olarak kabul edildi.

fKDSR-S dekstran biyosentezini ve akseptör reaksiyonlarını etkili bir şekilde katalizlemektedir (Şekil 5.7). Yapılan analizler sonucu fKDSR-S nin akseptör reaksiyonlarını doğal enzime göre daha etkili gerçekleştirdiği bulunmuştur. Eğer maltoz, laktoz, glikoz ve fruktoz akseptör olarak kullanılırsa fKDSR-S, DSR-S ye göre sırasıyla 13.0, 5.8, 7.9, 2.8 kat daha fazla akseptör ürün sentezlediği tespit edilmiştir.

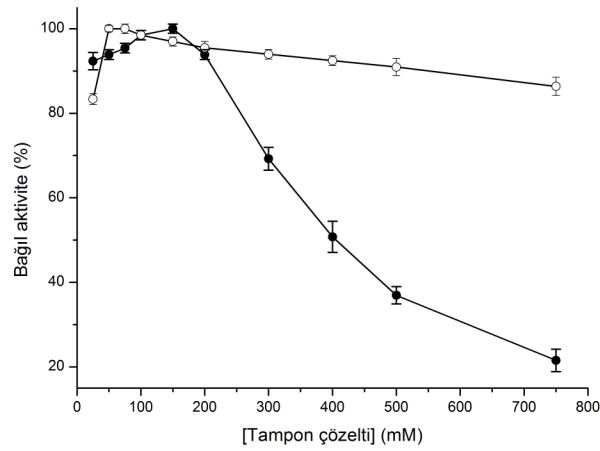


Şekil 5.7: fKDSR-S ve DSR-S enzimlerinin dekstran ve akseptör ürünlerinin TLC analizleri.

a: referans, b: substrat olarak sadece sükroz kullanıldığında oluşan ürünler, c: akseptör olarak maltoz kullanıldığında oluşan ürünler, d: akseptör olarak laktöz kullanıldığında oluşan ürünler, e: akseptör olarak glikoz kullanıldığında oluşan ürünler, f: akseptör olarak fruktoz kullanıldığında oluşan ürünler (IGn: n Glikoz birimlerinden oluşan oligosakkaritler).

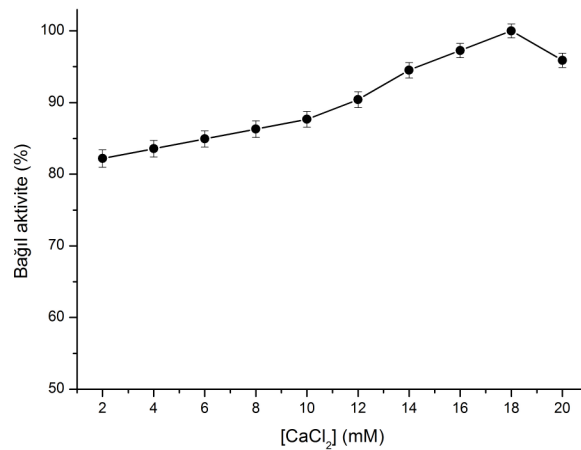
Birçok katyonun dekstransükraz aktivitesi üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir [Miller and Robyt et al., 1986; Kitaoka and Robyt et al., 1999]. Bu çalışmada, sodyum asetat, kalsiyum asetat ve kalsiyum klorürün enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelendi. 150 mM a kadar kalsiyum asetat tamponunun enzim aktivitesini yaklaşık olarak %7 artırdığı tespit edildi. Bu

değerden sonra kalsiyum asetatın enzim üzerinde inhibisyon etkisi gözlemlendi (Grafik 5.7). 100 mM a kadar sodyum asetat taponunun enzim aktivitesinde %17 lik artışa sebep olduğu tespit edildi (Grafik 5.7). Her iki tampon için, optimum koşullarda (sodyum asetat için 50 mM, kalsiyum asetat için 150 mM), enzim aktivitesinin kalsiyum asetat tamponunda daha yüksek olduğu gözlemlenmesine rağmen, 50 mM sodyum asetat tamponuna 18 mM kalsiyum klorür eklenmesi enzim aktivitesini ~%20 oranında artırdığı tespit edildi (Grafik 5.8-9).



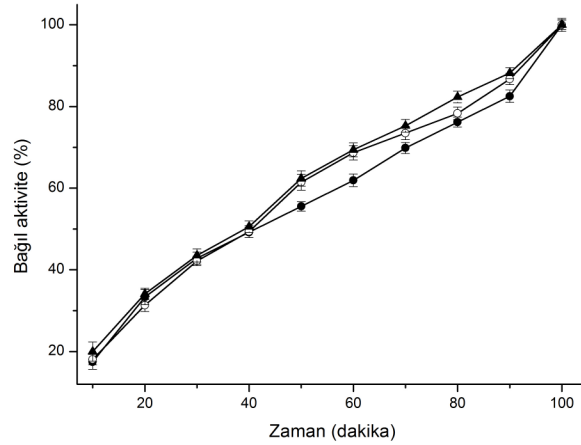
Grafik 5.7: Kalsiyum asetat (-●-) ve sodyum asetat (-○-) tampon çözelti konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi.

Herbir tampon çözelti için en yüksek enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi.



Grafik 5.8: Kalsiyum klorür (a) ve tampon çözeltilerin (b) enzim aktivitesi üzerine etkisi.

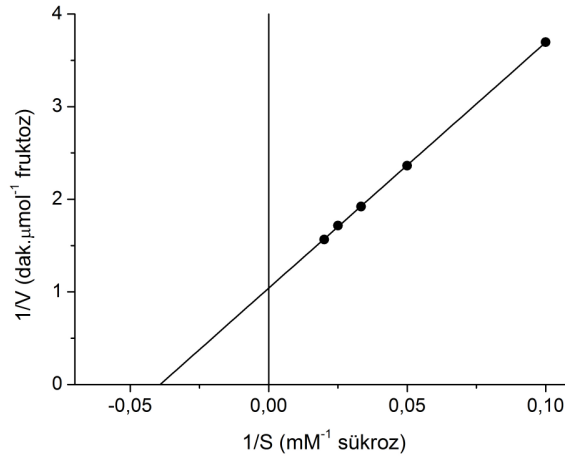
Herbir tampon çözelti için en yüksek enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi.



Grafik 5.9: Tampon çözeltilerin enzim aktivitesi üzerine etkisi.

Herbir tampon çözelti için en yüksek enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi. -●-: Sodyum asetat tampon çözeltisi (50 mM), -○-: Kalsiyum asetat tampon çözeltisi (150 mM), -▲-: İçinde 18 mM CaCl₂ bulunan sodyum asetat tampon çözeltisi (50 mM).

Kinetik parametreler Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak tespit edildi (Grafik 5.10). fKDSR-S için Km ve Vmax değerleri sırasıyla 25.5 mM sükroz ve 0,96 $\mu\text{mol fruktoz.dak.}^{-1}$ olarak tespit edildi. Doğal enzimin Km değeri 16 mM sükrozdur [Kim and Robyt, 1994].

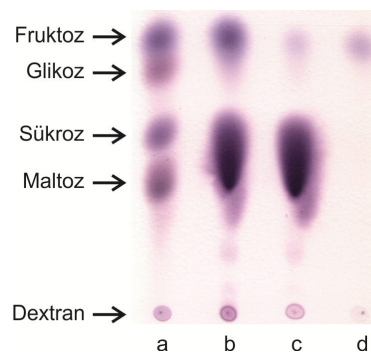


Grafik 5.10: fKDSR-S için Lineweaver-Burk grafiği.

5.4. fKDSR-S nin Eupergit C 250L ye İmmobilizasyonu

Eupergit C 250L ye enzim immobilizasyonunun matriks miktarı, pH, tampon çözelti konsantrasyonu, sıcaklık ve immobilizasyon süresi gibi parametrelere bağlı olduğu bilinmektedir [Boller et al., 2002]. Bu nedenle çalışma, immobilizasyona etki eden parametreler çalışılarak optimize edildi.

Bu tez çalışmasında Eupergit C ve Eupergit C 250L immobilizasyon matriksi olarak kullanıldı. Her iki matriksin immobilizasyon verimleri %100 olmasına rağmen optimum koşullarda Eupergit C 250L matriksinin aktivite verimi (%83.3), Eupergit C matriksinin aktivite veriminin (%47.2) yaklaşık 1.8 katı olmasından dolayı bütün immobilizasyon çalışmaları Eupergit C 250L ile gerçekleştirildi (Şekil 5.8). Eupergit C üzerindeki oksiran gruplarının Eupergit C 250L ye göre 3 kat daha fazla olması, fazla oksiran gruplarının enzimin aktif merkezdeki amino asit rezidüleri ile reaksiyona girerek enzim aktivitesini azaltması bu sonucun ortaya çıkmasını düşündürmektedir.



Şekil 5.8: Eupergit C 250L ve Eupergit C matrikslerine immobilize edilen fKDSR-S nin katalizlediği maltoz akseptör reaksiyonlarının ince tabaka kromatografisi (TLC).

Reaksiyonlar, CaCl₂ (18 mM) ihtiva eden sodyum asetat tampon çözeltisinde (50 mM, pH 5.5), sükroz (200 mM) ve maltozla (200 mM) 25 °C de, 30 dakika boyunca çalkalamalı su banyosunda (200 rpm) gerçekleştirildi.

a: referans (fruktoz, glikoz, sükroz, maltoz); b: Eupergit C 250L matriksine immobilize edilen fKDSR-S nin ürün kompozisyonu; c: Eupergit C matriksine immobilize edilen fKDSR-S nin ürün kompozisyonu; d: referans (fruktoz).

fKDSR-S nin (250 ng) immobilizasyonu için farklı matriks miktarları (0.1-2 g) çalışıldı. Çalışma sonunda 400 mg matriksin immobilizasyon için en uygun matriks miktarı olduğu (%83.3 aktivite verimi) tespit edildi (Tablo 5.2).

Tablo 5.2: Eupergit C 250L miktarının fKDSR-S immobilizasyonuna etkisi.

Eupergit C-250L (mg)	İmmobilizasyon verimi (%) ^a	Aktivite verimi (%) ^b	İmmobilize enzim aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (IU)
100	87.2	72.4	19.3	3.92
200	94.4	75.3	21.8	1.70
300	98.3	78.9	23.7	0.51
400	100.0	83.3	25.5	0.00
500	100.0	76.1	23.3	0.00
800	100.0	66.3	20.3	0.00
1000	100.0	46.7	14.3	0.00
1500	100.0	18.5	5.70	0.00
2000	100.0	12.0	3.70	0.00

İmmobilizasyon şartları: fKDSR-S (1 mL; 30.6 IU) ve farklı miktarda Eupergit C 250L (100-2000 mg) ile kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (5 mL, 300 mM, pH:5.5), 4 °C de, 150 rpm de, 6 saat tutuldu. Hemen sonrasında reaksiyon karışımına BSA (750 µg) eklenerek 4 °C de, 150 rpm de, 24 saat tutuldu. (a: İmmobilize olan enzimin, serbest enzime oranı; b: İmmobilize enzim aktivitesinin, immobilize olan serbest enzim aktivitesine oranı).

Yüksek iyonik güce sahip tampon çözeltileri enzimlerin Eupergit C 250L ye immobilizasyonunu artırdığı bilinmektedir [Boller et al., 2002]. Bu nedenle enzim kararlılığının yüksek olduğu ve immobilizasyon için yüksek iyonik güce sahip olan kalsiyum asetat tampon çözeltisi tercih edildi. Tablo 5.3 de görüldüğü gibi immobilizasyon için 50 mM konsantrasyona sahip tampon çözelti kullanıldığında süzüntüde aktivite tespit edilmesine rağmen tampon çözelti konsantrasyonunun 300 mM a çıkması aktivite veriminin de %75.9 dan %83.3 e çıkmasına neden olmuştur.

Tablo 5.3: Tampon çözelti konsantrasyonunun fKDSR-S immobilizasyonu üzerine etkisi.

Konsantrasyon (mM)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (IU)
50	96.6	75.9	22.4	1.03
100	98.1	78.8	23.6	0.59
200	99.5	78.9	24.0	0.15
300	100.0	83.3	25.5	0.00
400	100.0	83.3	25.5	0.00
500	100.0	81.5	24.9	0.00
800	100.0	80.4	24.6	0.00
1000	100.0	79.3	24.3	0.00
1500	100.0	78.3	24.0	0.00
2000	100.0	77.2	23.6	0.00

İmmobilizasyon şartları: fKDSR-S (1 mL; 30.6 IU) ve Eupergit C 250L (400 mg) ile farklı konsantrasyonlara sahip (50-2000) kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (5 mL, pH:5.5), 4 °C de, 150 rpm de, 6 saat tutuldu. Hemen sonrasında reaksiyon karışımına BSA (750 µg) eklenerek 4 °C de, 150 rpm de, 24 saat tutuldu.

Enzimlerin matriksle olan etkileşme süreleri immobilizasyon verimleri açısından büyük öneme sahiptir. Tablo 5.4 de görüldüğü gibi sürenin 3 saatten 6 saate çıkarılması aktivite verimini %70.7 den %83.3 e çıkmasını sağlamıştır.

Tablo 5.4: İnkübasyon süresinin fTDSR-S nin immobilizasyonu üzerine etkisi.

Zaman (saat)	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (IU)
3	86.2	70.7	18,7	4.21
6	100.0	83.3	25,5	0.00
9	100.0	79.3	24,3	0.00
12	100.0	78.3	24,0	0.00
15	100.0	77.2	23,6	0.00

İmmobilizasyon şartları: fKDSR-S (1 mL; 30.6 IU) ve Eupergit C 250L (400 mg), kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (5 mL, 300 mM, pH:5.5), 4 °C de, 150 rpm de, farklı sürelerde (3-15 saat) tutuldu. Hemen sonrasında reaksiyon karışımına BSA (750 µg) eklenerek 4 °C de, 150 rpm de, 24 saat tutuldu.

Eupergit C üzerindeki epoksi grupları, 2-12 gibi çok geniş bir pH aralığında enzim üzerindeki amino, karboksil ya da sülfhidril grupları ile reaksiyona girebilmektedir. Eupergit C epoksi gruplarının alkali ve nötr ortamlarda daha çok amino, asidik ortamlarda ise daha çok karboksil ve sülfhidril gruplar ile reaksiyona girerler [Novic et al., 2005]. Bunun yanında enzimlerin immobilizasyonlarının daha çok kendi optimum pH larında en yüksek aktivite verimine sahip olduğu da bilinmektedir [Katchalski-Katzir and Kraemer, 2000]. Tablo 5.5 de görüldüğü gibi enzimin optimum pH sının dışındaki bölgelerde immobilizasyon verimi yüksek olmasına rağmen aktivite verimi düşüktür. fKDSR-S nin immobilizasyonda en iyi aktivite verimine sahip olduğu pH nın kendi optimum pH sı olan 5.5 olduğu görülmektedir.

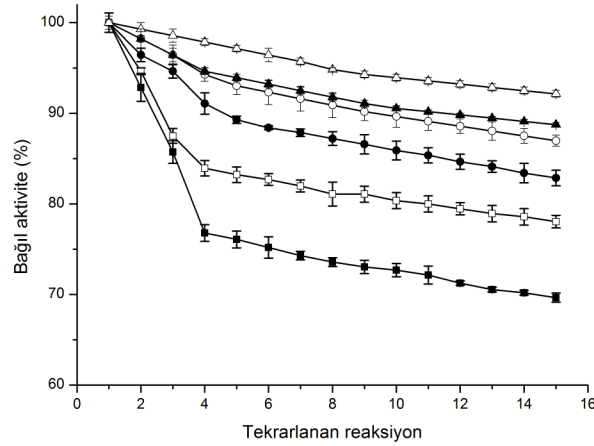
Tablo 5.5: pH nın fTDSR-S immobilizasyonu üzerine etkisi.

pH	İmmobilizasyon verimi (%)	Aktivite verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi (IU)	Süzüntüdeki toplam aktivite (IU)
4.00	100.0	0.0	0,0	0.00
4.50	100.0	70.7	21,6	0.00
5.00	100.0	78.3	24,0	0.00
5.50	100.0	83.3	25,5	0.00
6.00	100.0	30.4	9,3	0.00
6.50	100.0	2.2	0,7	0.00
7.00	100.0	0.0	0,0	0.00

İmmobilizasyon şartları: fKDSR-S (1 mL; 30.6 IU) ve Eupergit C 250L (400 mg), kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (5 mL, 300 mM), farklı pH larda (4.0-7.0), 4 °C de, 150 rpm de, 6 saat tutuldu. Hemen sonrasında reaksiyon karışımına BSA (750 µg) eklenerek 4 °C de, 150 rpm de, 24 saat tutuldu.

İmmobilizasyon gerçekleştirildikten sonra matriks üzerindeki serbest epoksi gruplarının uzaklaştırılması immobilizasyonun aktivite verimi açısından çok önemlidir. Bu amaçla çeşitli kimyasal maddeler kullanılmaktadır (BSA, etilendiamin, etilenamin, glisin, gibi). Bu çalışmada serbest epoksi gruplarının uzaklaştırılması amacı ile BSA kullanıldı. BSA kullanılmadığında 5 tekrarlanan reaksiyon sonucunda başlangıçtaki aktivitenin ~%28 kaybolmaktadır. İmmobilizasyon sonrasında ortama eklenen BSA miktarının artması tekrarlanan reaksiyonlar sırasında enzim aktivitesindeki azalmayı önlediği görüldü (Grafik 5.11). 750 ng BSA ile serbest epoksi gruplarının uzaklaştırılması enzim aktivitesinde görülen azalmayı tamamen ortadan

kaldırmaktadır. Tekrarlanan reaksiyonlar sırasında meydana gelen azalmanın sebebinin matriksin süzme işlemleri sırasında meydana gelen kayba bağlı olduğu, 15. tekrarlanan reaksiyon sonunda yapılan tartma işleminde matriksin yaklaşık %8 azalmasına bağlı olduğu bulunmuştur.

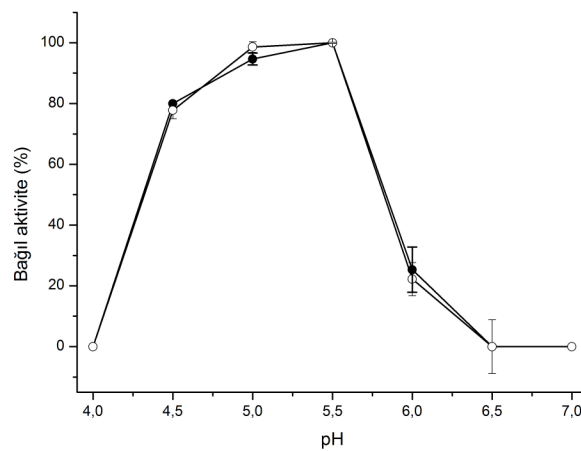


Grafik 5.11: BSA uygulamasının immobilize fKDSR-S aktivitesi üzerine etkisi.

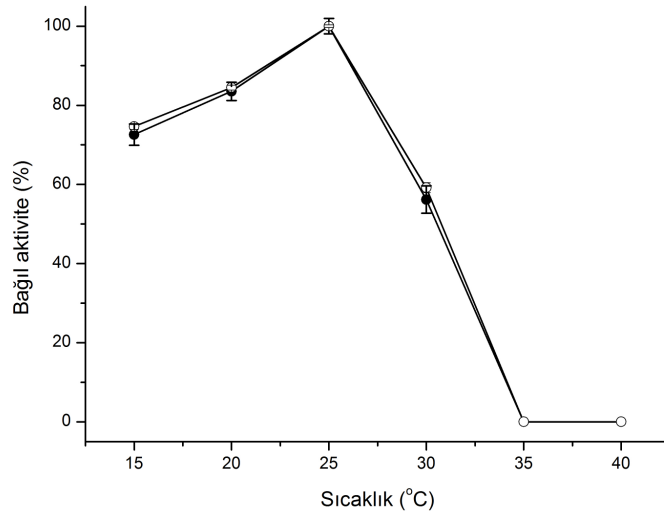
Enzim optimum şartlarda immobilize edildikten sonra [fTDSR-S (1 mL, 30.6 IU), Eupergit C (400 mg), kalsiyum asetat tampon çözeltisi (5 mL, 300 mM, pH 5.5), 25 °C, 6 saat] farklı miktarlardaki BSA ile muamele edilerek (0.20-0.75 µg) 4 °C de 150 rpm de 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. (-■-: 200, -□-: 300, -●-: 300, -○-: 400, -▲-: 500, -△-: 750 ng).

5.5. İmmobilize Enzim Karakterizasyonu

İmmobilizasyonun enzimin optimum pH ve sıcaklık değerlerinde bir değişiklik meydana getirmediği görüldü (Grafik 5.12-13).

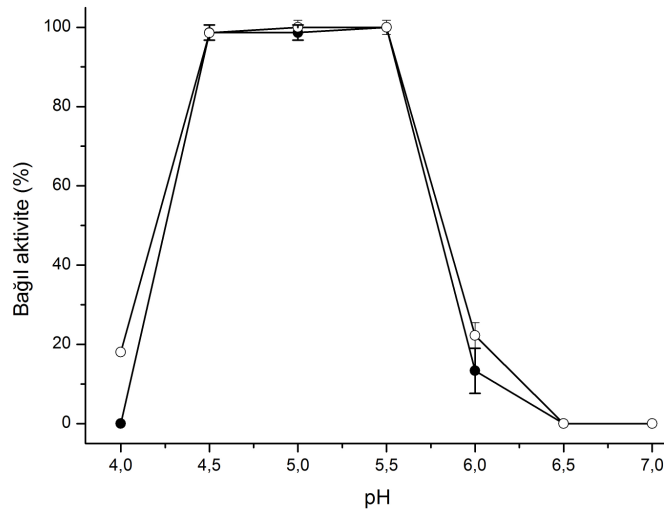


Grafik 5.12: pH'nın serbest fKDSR-S (-●-) ve immobilize fTDSR-S (-○-) aktivitesi üzerine etkisi. Herbir enzim için aktivitenin en yüksek değeri %100 olarak kabul edildi.

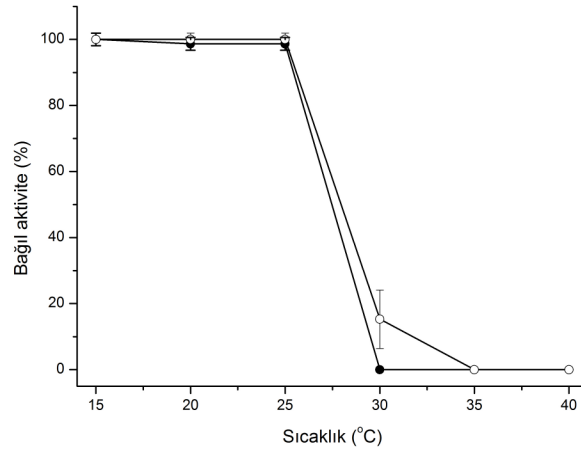


Grafik 5.13: Sıcaklığın serbest fKDSR-S (-●-) ve immobilize fTDSR-S (-○-) aktivitesi üzerine etkisi. Herbir enzim için aktivitenin en yüksek değeri %100 olarak kabul edildi.

İmmobilizasyon 4.0 pH da enzim aktivitesinin ~%18 korunmasını sağlamıştır (Grafik 5.14). Yine immobilizasyonun 30 °C de sıcaklık kararlılığını ~%15 korumasına neden olmuştur (Grafik 5.15).

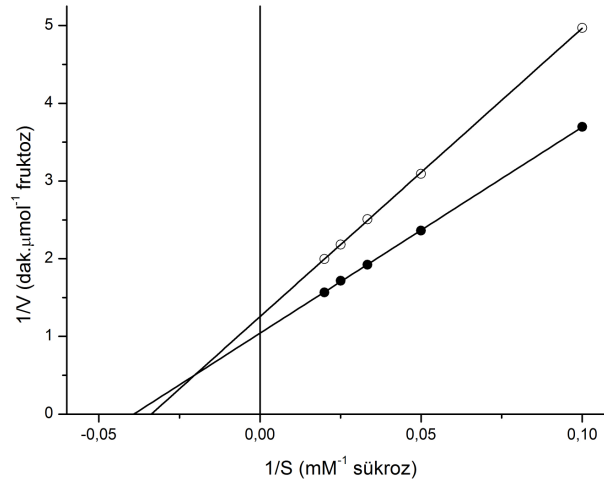


Grafik 5.14: pH'nin serbest fKDSR-S (-●-) ve immobilize fTDSR-S (-○-) nin kararlılığına etkisi. Herbir enzim için aktivitenin en yüksek değeri %100 olarak kabul edildi.



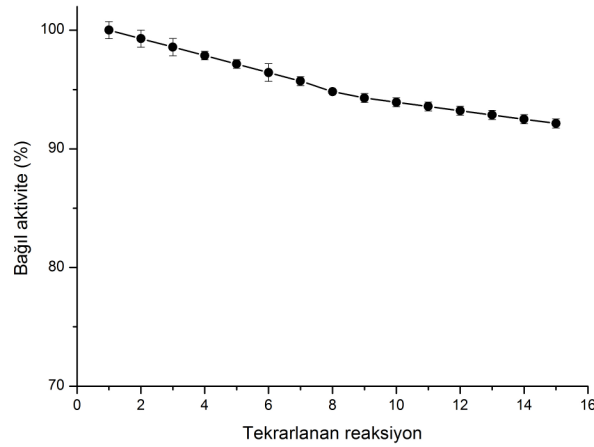
Grafik 5.15: Sıcaklığın serbest fKDSR-S (-●-) ve immobilize fTDSR-S (-○-) nin kararlılığına etkisi. Herbir enzim için aktivitenin en yüksek değeri %100 olarak kabul edildi.

Kinetik parametreler Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak hesaplandı. Serbest ve immobilize enzim için K_m değerleri sırasıyla 25.5 ve 29.7 mM sükroz. V_{max} değerleri ise sırasıyla 0,96 ve 0,80 $\mu\text{mol fruktoz}\cdot\text{min}^{-1}$ olarak tespit edildi (Grafik 5.16).



Grafik 5.16: Serbest (-●-) ve immobilize (-○-) fKDSR-S için Lineweaver-Burk grafikleri.

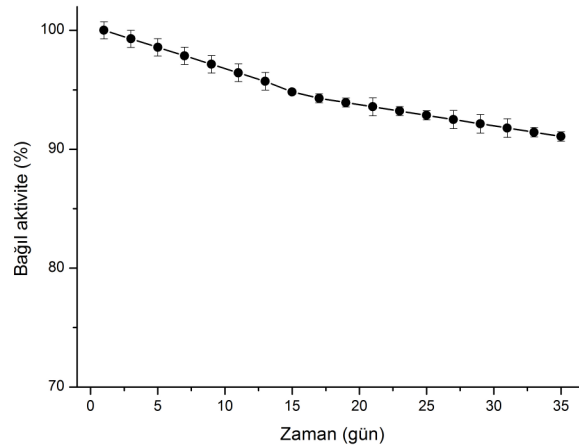
İmmobilize enzim 15 tekrarlanan reaksiyon boyunca takip edildiğinde aktivitesinde herhangi bir azalmanın olmadığı tespit edildi (Grafik 5.17).



Grafik 5.17: İmmobilize fTDSR-S nin reaksiyon kararlılığı.

Enzim aktiviteleri her iki günde bir standart aktivite tayin metodu kullanılarak tespit edildi.

İmmobilize enzim 35 gün boyunca saklama kararlılığı takip edildiğinde yine aktivitesinde herhangi bir azalmanın olmadığı görüldü (Grafik 5.18). Bütün reaksiyonlar aktivite tayin metodu kullanılarak gerçekleştirildi.



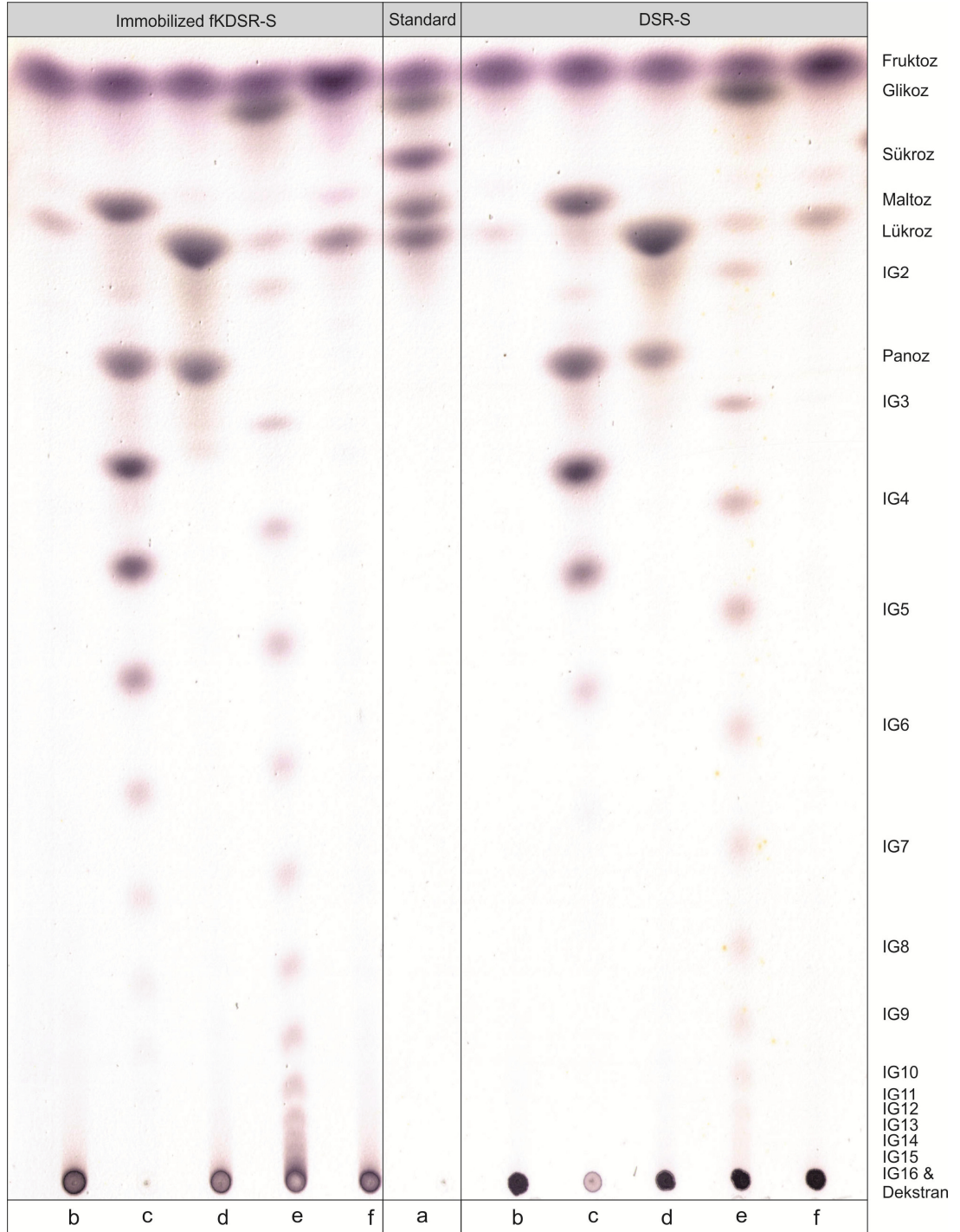
Grafik 5.18: İmmobilize fTDSR-S nin saklama kararlılığı.

Enzim aktiviteleri her iki günde bir standart aktivite tayin metodu kullanılarak tespit edildi.

5.6. İmmobilize fKDSR-S Dekstran-Prebiyotik Sentezi

İmmobilize enzim dekstran ve oligosakkarit sentezini etkili bir şekilde gerçekleştirebilmektedir. Serbest ve immobilize fKDSR-S nin dekstran biyosentezini DSR-S den daha etkili bir şekilde akseptör ürün sentezini gerçekleştirebildiği tespit edildi (Şekil 5.9). Akseptör olarak maltoz, laktoz, glikoz veya fruktoz kullanıldığında sırasıyla 13.0, 5.8, 7.9 ve 2.8 kat akseptör

ürününün oluştuğu tespit edilmiştir. Sadece süktroz kullanıldığında ise yeni enzimin doğal enzime göre 2.1 kat lükroz sentezlediği tespit edildi.

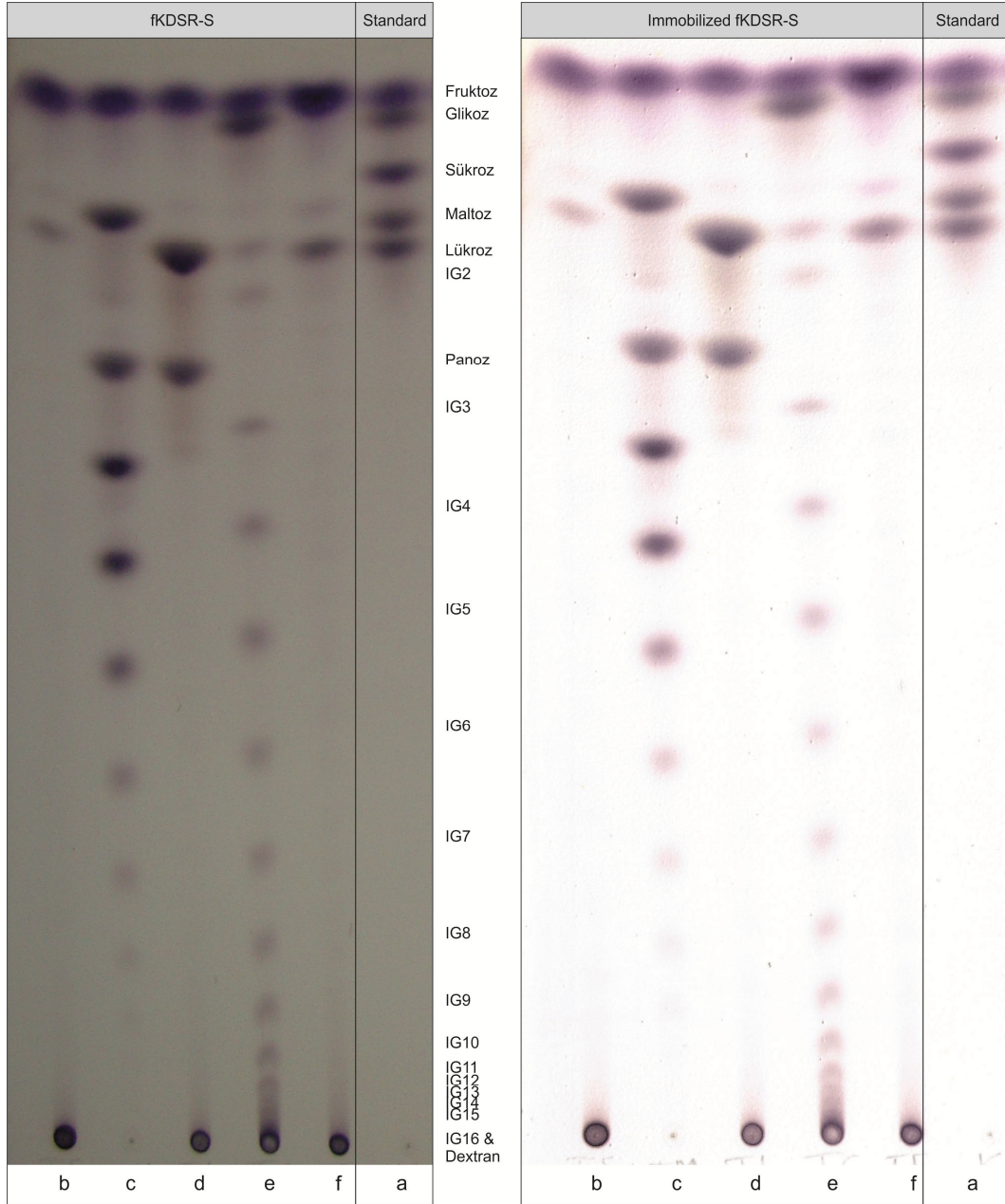


Şekil 5.9: İmmobilize fKDSR-S ve DSR-S tarafından sentezlenen dekstran ve akseptör ürünlerinin TLC ile incelenmesi.

a: referans, b: substrat olarak sadece süktroz kullanıldığında oluşan ürünler, c: akseptör olarak maltoz kullanıldığında oluşan ürünler, d: akseptör olarak laktöz kullanıldığında oluşan ürünler, e: akseptör olarak glikoz kullanıldığında oluşan ürünler, f: akseptör olarak fruktoz kullanıldığında oluşan ürünler.

Reaksiyonlar: DSR-S (15 IU), fKDSR-S (15 IU) veya immobilize fKDSR-S (15 IU), CaCl₂ (18 mM) ihtiva eden sodyum asetat tampon çözeltisinde (50 mM, pH 5.5), süktroz (200 mM) ile birlikte her 200 mM akseptör madde (maltoz, laktöz, glikoz veya fruktoz) konularak, 25 °C de, 12 saat çalkalamalı su banyosunda (200 rpm) muamele edildi.

Akseptör madde olarak maltoz kullanıldığında immobilize fKDSR-S %100 prebiyotik sentezi gerçekleştirdi ve yapılan ölçümlerde DSR-S ye göre 13 kat, akseptör olarak glikoz kullanıldığında ise 7.9 kat daha fazla prebiyotik sentezlediği tespit edildi (Şekil 5.9). İmmobilize ve serbest fKDSR-S nin ürün içeriğinde herhangi bir farklılığın olmadığı tespit edildi (Şekil 5.10).



Şekil 5.10: fKDSR-S ve immobilize fKDSR-S ürün bileşiminin TLC analizi.

a: referans, b: substrat olarak sadece sükroz kullanıldığında oluşan ürünler, c: akseptör olarak maltoz kullanıldığında oluşan ürünler, d: akseptör olarak laktöz kullanıldığında oluşan ürünler, e: akseptör olarak glikoz kullanıldığında oluşan ürünler, f: akseptör olarak fruktoz kullanıldığında oluşan ürünler.

Reaksiyonlar: DSR-S (15 IU), fKDSR-S (15 IU) veya immobilize fKDSR-S (15 IU), CaCl₂ (18 mM) ihtiva eden sodyum asetat tampon çözeltisinde (50 mM, pH 5.5), sükroz (200 mM) ile birlikte her 200 mM akseptör madde (maltoz, laktöz, glikoz veya fruktoz) konularak, 25 °C de, 12 saat çalkalamalı su banyosunda (200 rpm) muamele edildi.

6. SONUÇ

Farklı moleküler büyüklüklere sahip dekstran sanayi, tıp, temel bilimlerin bir çok alanı, araştırma geliştirme alanlarında çok sık olarak kullanılmaktadır. Buna rağmen istenilen büyüklükteki dekstranları üretmek düşük verim ve yüksek maliyetlidir. Özellikle 10 ila 100 kDa büyüklüğe sahip sanayi ölçekli dekstran üretmek hali hazırda mümkün değildir.

Ticari açıdan bakılınca 2-6 monomer sayısına sahip IMO ların dekstransükraz kullanılarak üretimi verimliliği çok düşük olduğu için prebiyotiklerin üretiminde tercih edilmemektedir. Bu IMO lar nişastanın α -amilaz ve glukozidaz enzim karışımlarının hidrolizi ile üretilmektedir [Nakakuki, 2002]. Ayrıca dekstran sentezinin enzimatik yolla gerçekleştirilmiş olması pek çok açıdan avantajlı olsa da fruktoz yan ürününün uzaklaştırılması sorunu ekonomik olmadığından ticari üretimde enzimatik yol oldukça maliyetlidir.

Şimdiye kadar DSR-S ile yapılan birçok çalışmada enzim yapısı aydınlatılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda DSR-S nin N-terminalinde sinyal peptit, değişken bölge ve katalitik bölge; C-terminalinde ise glukan bağlama bölgesi olmak üzere dört bölümden meydana geldiği tespit edilmiştir. Glukanın enzim üzerine bağlanması ve uzamasından sorumlu olan C-terminaldeki bölgenin gen mühendisliği ile kırılması, dekstran uzamasının durmasına ve IMO sentezinin artmasına yol açmıştır. Enzimin N-terminalde bulunan ve enzimin hücre dışına salgılanmasını sağlayan sinyal peptit ile fonksiyonu henüz aydınlatılmamış değişken bölgenin kırılmasının ise enzimin aktivitesinde herhangi bir değişmeye neden olmadığı tespit edilmiştir [Monchois et al., 1997, Monsan et al., 2007, Monchois et al., 2006].

Yukarıda anlatılan nedenlerden dolayı, bu tez çalışmasında DSR-S nin kırılması, böylece dekstran uzamasının engellenerek akseptör ürünlerin (prebiyotik sentezi) sentezine yönlendirilmesi amaçlandı. Bu amaçla, 4581 bp büyüklüğe sahip DSR-S nin tekrar dizileri, sinyal peptit ve değişken bölgeleri kırılarak 2502 nükleotide indirildi. Bu düzeyde kırma işlemi ilk kez gerçekleştirilmiştir. Kırma işleminden sonra elde edilen DNA dizisi pGEX

4T-1 vektörüne klonlanarak *E. coli* BL21 (DE3) suşuna transformasyonu sağlandı. Böylece kırılmış enzim vektör yapısında bulunan GST proteini ile N-terminalden birleştirilerek füzyon protein elde edildi. Bu işlem ile enzime 19 lizin, 18 aspartik asit, 16 glutamik asit, ve 4 sistein rezidüsü eklenmiş oldu.

Yeni üretilen enzimin moleküler ağırlığı 118.974 kDa dur. fKDSR-S ve DSR-S nin karakterizasyonu karşılaştırmalı olarak yapıldı. Kırpma ve füzyon işlemlerinin, enzimin optimum pH ve sıcaklığında herhangi bir değişmeye sebep olmadığı görüldü. Enzimin kırılması ve GST ile füzyon edilmesi enzimin *E. coli* de, DSR-S ye göre, 35 kat daha yüksek aktivite ile sentezlenmesini sağladı. fTDSR-S nin DSR-S ye göre çok daha yüksek miktarda prebiyotik (akseptör olarak maltoz kullanıldığında 13.0, glikoz kullanıldığında 7.9 kat) sentezlediği görüldü. Bunun yanında bu çalışma ile enzimin katalitik bölgesinin 49 aa daha kısa olduğu gösterildi.

fKDSR-S sentezinin optimizasyonu için besi yeri içeriği (20 g casein digest pepton, 5 g yeast ekstrakt, 6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 0.5 g glikoz, 2 g laktoz, 6 ml gliserol, 12.1 g tris base, 1 g sükroz, 0.05 g CaCl₂), besiyeri pH sı (6.4), inkübasyon sıcaklığı (22 °C), inkübasyon süresi (10 saat), çalkalama hızı (200 rpm) faktörleri ayrı ayrı kontrol edilerek optimize edildi.

DSR-S nin N ve C-terminallerden kırılması optimum pH ve sıcaklığı değiştirmemesine rağmen (pH 5.5 ve 25 °C) enzimin pH ve sıcaklık kararlılığında düşmeye (4.0 pH da ~%38, 6.0 pH da ~%85, ve 30 °C de ~%92) neden olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar DSR-S üzerindeki tekrarların (dekstran bağlanma ve uzamasını sağlayan gölgelerin) dolayısı ile enzim etrafındaki dekstranların enzim kararlılığını artırdığını göstermektedir. Buna ek olarak bu sonuçlar kırılan bölgelerin enzim aktivitesinde etkisinin olmadığını göstermektedir. Dolayısı ile enzimin katalitik bölgesinin literatürde belirtildiğinden en az 49 aa ya da daha kısa olduğu ortaya konuldu. Bunun yanında elde edilen sonuçlar fKDSR-S nin yüksek oranda prebiyotik sentezlediği görüldü. Bu ise enzimin kırılan tekrarlarının dekstran uzamasında önemli rol oynadıklarını gösteren literatür bilgilerini desteklemektedir.

fKDSR-S nin kalsiyum asetat tampon çözeltilisinde, sodyum asetat tampon çözeltilisine göre daha yüksek aktivite göstermesine rağmen sodyum asetat tampon çözeltilisine CaCl_2 (18 mM) ilavesinin enzim aktivitesini artırması (~%20) kalsiyumun enzim kararlılığını artırdığını gösteren literatür bilgilerini de desteklemektedir.

fKDSR-S nin aktivitesi 30.6 IU/mL, spesifik aktivitesi ise 122.4 IU/mg protein olduğu tespit edildi.

Bugüne kadar birçok araştırmacı dekstransükrazın kovalent immobilizasyonunu değişik metodlarla (glutaraldehid ile matriks aktivasyonu, dekstransükraz üzerindeki dekstranların giderilmesi) ve matrikslerle (Eupergit C, Enzacryl AA, Enzacryl AH, silika) denemesine rağmen önemli bir başarı elde edemedi. Dekstransükrazın kovalent immobilizasyonunu 13 değişik matriks ve yöntem denedikten sonra en fazla %19.6 immobilizasyon verimi ile gerçekleştiren Kobali ve Reilley in “dekstransükrazın immobilize edilmesi oldukça güçtür” ifadesi bu çalışmanın önemini ortaya koymaktadır [Kobali ve Reilley, 1980].

Kovalent immobilizasyon ile ilgili yapılan çalışmalar sonunda dekstransükrazın kovalent immobilizasyonunun önünde iki önemli engel olduğu tespit edildi. Bunlardan birincisi olan enzim etrafındaki dekstran maskesi enzimin C-terminalinde bulunan ve dekstranın enzim üzerine bağlanmasını sağlayan tekrarların gen mühendisliğiyle kırılması sonucu ortadan kaldırıldı. İkinci önemli engel olan matriksdeki reaktif grupların enzim aktif merkezindeki lizin, aspartik asit ve glutamik asit rezidüleri ile etkileşme ihtimali gen mühendisliği ile enzimin N-terminaline GST nin birleştirilmesi ile eklenen 19 lizin, 34 karboksilik asit ve 4 sistein rezidüsü ile azaltıldı. Bu çalışmalar sonucunda fKDSR-S nin Eupergit C 250L matriksine kovalent immobilizasyonu yüksek verimlilikle (%100 immobilizasyon verimi, %83.3 aktivite verimi) gerçekleştirildi.

Eupergit C ve Eupergit C 250L matrikslerinin destek olarak kullanıldığı fKDSR-S immobilizasyon çalışmalarında (sırasıyla 47.2 ve 83.3 aktivite verimi) 1.8 kat daha iyi aktivite verimine sahip Eupergit C 250L matriksi tercih edildi.

Segura ve arkadaşları proteinlerin eupergit e hafif asidik ortamda karboksil grubu üzerinden, nötral ve hafif bazik ortamda tiyol grupları üzerinden ve pH 9.0 un üstünde amino grupları üzerinden bağlanabildiğini bildirmişlerdir [Segura et al., 2004]. Ancak Novic ve Rozzell nötral ve alkali şartlarda enzimdeki amino gruplarının Eupergit C ye bağlanmada asıl sorumlu gruplar olduğunu, asidik ve nötral şartlarda sülfidril gruplarının ve karboksil gruplarının rol aldığını bildirmişlerdir [Novic and Rozzell, 2005]. Mateo ve arkadaşları epoksi gruplarının nötral pH da düşük reaktivite gösterdiğini bu nedenle enzimin desteğe immobilizasyonunun 2 basamakta gerçekleştiğini; birinci basamakta enzimin desteğe hızlı bir fiziksel adsorpsiyonun, ikinci basamakta ise adsorbe olan enzimin yakın çevresindeki epoksi grupları ile enzim arasında kovalent bağın oluştuğunu bildirmişlerdir [Mateo et al. 2000]. Literatürde hidrofilik desteklere enzim immobilizasyonunda düşük iyonik güce sahip tamponların kullanımı, hidrofobik desteklerde ise yüksek iyonik güce sahip tamponların kullanımı önerilmektedir (Mateo et al., 2003). Bu nedenle eupergit desteklere immobilizasyonun daha yüksek tampon derişimlerinde immobilizasyon yapılmıştır (D'annibale et al., 2000; Segura et al., 2004). Bu çalışmaların tümü Eupergit desteklerine enzimlerin kovalent immobilizasyonunun matriks miktarı, tampon konsantrasyonu, inkübana süresi, ortam pH sı gibi değişkenlere bağlı olarak farklılık gösterdiğini ispatlamaktadır. Bu nedenle fKDSR-S nin eupergit desteklere immobilizasyonunda, kalsiyum asetat gibi yüksek iyonik güce sahip tamponun kullanımının yanında tampon derişimi 50-2000 mM aralığında denendi ve en uygun tampon konsantrasyonunun 300 mM olduğu tespit edildi. Eupergit desteklere en yüksek bağlanma oranının enzimin aktif olduğu pH 5.5 te olduğu tespit edildi. Bu sonuç fKDSR-S nin dar bir pH aralığında Eupergit desteklere uygun konformasyon ve kararlılıkla bağlanabildiğini düşündürdü. En uygun matriks miktarının 400 mg ve en uygun inkübasyon süresinin ise 6 saat olduğu tespit edildi.

DSR-S nin kırılarak dekstran uzamasını ve dekstranın enzime bağlandığı bölgelerin uzaklaştırılmasının yanında GST proteini ile fizyon hale getirilmesi (19 adet amin, 34 karboksil ve 4 tiyol rezidüsünün enzime

eklenmesi ile) fKDSR-S nin eupergit desteklere immobilizasyonunu mümkün hale getirdi.

Kırpılmış ve GST ile füzyon edilmiş B-512F Dekstransükraz karakterizasyon çalışmalarında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. 15-25 °C de fazla değişiklik göstermemesine rağmen optimum sıcaklığın 25 °C dir.
2. 5.0-5.5 pH larda fazla bir değişiklik göstermemesine rağmen optimum pH nın 5.5 dir.
3. En iyi aktivite gösterdiği tampon çeşidi içinde 18 mM CaCl₂ bulunan 50 mM sodyum asetat tamponudur.
4. Kırpma ve GST ile füzyon haline getirme enzimin optimum pH ve sıcaklık değerlerinde değişiklik meydana getirmemesine rağmen, enzim kararlılığının 4.0 pH da ~%38, 6.0 pH da ~%85, ve 30 °C de ~%92 oranlarında azaldığı tespit edilmiştir.
5. Kırpma düşük molekül ağırlıklı dekstranların biyosentezi ve akseptör ürünlerinin daha yüksek miktarda üretilmesini sağlamıştır.
6. 200 mM sükroz konsantrasyonu optimum substrat konsantrasyonu olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak enzimsel yolla prebiyotik sentezinin mümkün olabileceğini ve enzimin kovalent immobilizasyonunun yüksek oranda aktivite verimi (%100 immobilizasyon verimi, %83.3 aktivite verimi) ile gerçekleşmesi sanayi ölçeğinde kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır. Prebiyotik sentezi için maltoz ve glikoz akseptör madde olarak kullanıldı. Elde edilen başarı bu enzim için uygulanan immobilizasyon tekniğinin başka enzimlerin immobilizasyonunda da kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Coutinho PM, Henrissat B. Carbonhydrate-Active Enzymes server, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/-cazy/CAZYindex.html>, 1999.
2. Monsan P, Bozonnet S, Albenne C, Joucla G, Willemot RM, Remaud-Simeon M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J* 2001;11:675-685.
3. Robyt JF. Encyclopedia of polymer science. Dextran, Vol. 4. (Kroschwitz JJ, ed), 1985;753–767. Wiley-VCH, New York.
4. Kobayashi M, Matsuda K. Characterization of multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biochim Biophys Acta*. 1980;614:46-62.
5. Kobayashi M, Matsuda K. Purification and properties of the extracellular dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *J Biochem*. 1976;79:1301-1308.
6. Tanriseven A, Robyt JF. Inhibition of dextransucrase synthesis by an acceptor reaction of dextransucrase and demonstration of separate acceptor binding site. *Carbohydr. Res*. 1992;225: 321-329.
7. Goyal A, Katiyar SS. Fractionation of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextran sucrose by polyethylene glycol: a simple and effective method purification. *J. Microbiol. Methods*. 1994;20: 225-231.
8. Khalikova E, Susi P, Korpela T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. *Microbiol. Mol. Biol*. 2005;69:306-25.
9. Monchois V, Reverte A, Remaud-Simeon M, Monsan P, Willemot RM. Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. *Appl. Environ. Microbiol*. 1998;64:1644-49.
10. Monchois V, Remaud-Simeon M, Russell RR, Monsan P, Willemot RM. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase (DSR-S) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 1997;48;465.

11. Wilke-Douglas M, Perchorowicz JT, Houck CM, Thomas BR. Methods and compositions for altering physical characteristics of fruit and fruit products. WO 89/12386 1989.
12. Nakakuki T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. *Pure App Chem* 2002;74:1245-1251.
13. Koepsell HJ, Tsuchiya HM, Hellman NN, Kazenko A, Hoffman CA, Sharpe ES, Jackson RW. Enzymatic synthesis of destran; acceptor specificity and chain initiation. *J Biol Chem* 1953;200:793-801.
14. Giffard PM, Allen DM, Milward CP, Simpson CL, Jacques NA. Sequence of the gtfK gene of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 and evolution of the gtf genes of oral streptococci. *J. Gen. Microbiol.* 1993;139:1511-1522.
15. Simpson CL, Giffard PM, Jacques NA. *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 possesses at least two genes coding for primer independent glucosyltransferases. *Infect. Immun.* 1995;63:609-621.
16. Vickermann MM, Sulavik MC, Nowak JD, Gardner NM, Jones CW, Clewell DB. Nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase gene, gtfG. *DNA Seq.* 1997;7:83-95.
17. Russell RRB. Molecular genetics of glucan metabolism in oral *Streptococci*. *Arch. Oral. Biol.* 1990;35:53-58.
18. Izard JW, Kendall DA. Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol. Microbiol.* 1994;13:765-773.
19. Abo H, Matsumura T, Kodama T, Ohta H, Fukui K, Kato K, Kagawa H. Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (Water-Insoluble glucan synthetase) *J. Bacteriol.* 1991;173:989-996.
20. Monchois V, Willemot RM, Remaud-Simeon M, Croux C, Monsan P. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only K(1-6) and K(1-3) linkages. *Gene* 1996;182:23-32.
21. Monchois V, Willemot RM, Monsan P. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiol. Rev.* 1999;23:131-151.

22. Ferretti JJ, Gilpin ML, Russell RRB. Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* Mfe28. J Bacteriol. 1987;169:4271-4278.
23. Mooser G, Wong C. Isolation of glucan-binding bölge of glucosyltransferase (1,6-K-glucan synthase) from *Streptococcus sobrinus*. Infect. Immun. 1988;56:880-884.
24. Kobayashi S, Koga K, Hayashida O, Nakano Y, Hasegawa Y. Glucan-binding bölge of a glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*: isolation of a 55-kilodalton peptide trypsin digest of glucosyltransferase prebound to insoluble glucan. Infect. Immun. 1989;57:2210 -2213.
25. Kato C, Kuramitsu HK. Carboxy-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-I enzyme. FEMS Microbiol. Lett. 1990;72:299-302.
26. Lis M, Shiroza T, Kuramitsu HK. Role of the C-terminal direct repeating units of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-S in glucan binding. Appl. Env. Microbiol. 1995;61:2040-2042.
27. Robyt JF, Walseth TF. Production, purification, and properties of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512F. Carbohydr Res. 1979;68:95-111.
28. Kitaoka M, Robyt J F. Large-scale preparation of highly purified dextranucrase from a high-producing constitutive mutant of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Carbohydr Res. 1998;147(1):119-133.
29. Robyt JF, Kim D, Yu L. Mechanism of dextran activation of dextranucrase. Carbohydr Res 1995;266:293-299.
30. Herman FM, Norbert B, Charles GO, Georg M, Jacqueline IK. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Volume 4, Composites, Fabrication to Die Design, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc 1996.
31. Thunell RK. Taxonomy of the *Leuconostocs*. Journal of Dairy Science Vol. 1995;78(11):2514-2522.
32. Aaseth J. The Effect of Mercaptodextran en distribution and toxicity of mercury in mice. Acta Pharmacology et Toxicologica. 1972;32 (6):430-441.

33. Albes M, Baumgaertel I, Rohde R, Hausen B, Demertzis St W Th. Influence of dextran on cardiac preservation in an extrakorporal rat heart model. *Eur. Surg. Res.* 1995;27(6):406-10.
34. Mitsuya H, Looney DJ, Kuno S, Ueno R, Wong-Staal F, Broder S. Dextran sulfate suppression of viruses in the HIV family: Inhibition of virion binding to CD4⁺ Cells. *Science.* 1988;240(4852):646-649.
35. Bellengier P, Richard J, Foucaud C. Associative growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* strains in milk. *Journal of Dairy Science* 1997;80:1520-1527.
36. Groenwall AJ, Ingelman GA. Manufacture of Infusion and Injection Fruids. U.S. Patent 2,437,518 1948.
37. De Belder AN. Medical Applications of Dextran and Its Derivatives p 275-296. In S. Domitriu (ed.), *Polysaccharides in medicinal applications*. Marcel Dekker, Inc., New York 1996.
38. Ahsan N. Intravenous infusion of total dose iron is superior to oral iron in treatment of anemia in peritoneal dialysis patients: A single center comparative study. *J Am Soc Nephro.* 1998;19:664-668.
39. Jagodzinski PP, Lewandowska M, Januchowski R, Franciszkiewicz K, Trzeciak WH. The effect of high molecular weight dextran sulfate on the production of interleukin-8 in monocyte cell culture. *Biomed Pharmacother* 2002;56:245-247.
40. Hersline R. Antiviral Composition. U.S. Patent 6 821 958 2004.
41. Scientific Committee On Food. Opinion on The Scientific Committee on Food on A Dextran Preparation Produced Using *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* ssp. As A Novel Food Ingredient In Bakery Products. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Brussels 2000.
42. Robyt JF, Yoon SH, Mukerjea R. Dextranase and the mechanism for dextran biosynthesis. *Carbohydrate Research* 2008;343:3039-3048.
43. Daotian F, Robyt JF, Essential histidine residues in dextranase: chemical modification by diethyl pyrocarbonate and dye photooxidation, *Carbohydr Res*, 1988;183:97-109.

44. German B, Schiffrin EJ, Renerio R, Mollet B, Pfeifer A, Neese JR. The development of functional foods. Lessons from the gut. *Trends in Biotechnology* 1999;17:492-499.
45. Fu D, Robyt JF. Essential histidine residues in dextransucrase: Chemical modification by diethyl pyrocarbonate and dye photooxidation. *Carbohydr Res* 1988;183:97-109.
46. Neeser JR, German JB. *Bioprocesses and biotechnology for functional foods and nutraceuticals*. Marcel Dekker, 2004.
47. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365-378.
48. Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. Probiotics: How should they be defined? *Trends in Food Sci & Technol* 1999;10:107-110.
49. Gibson GR, Roberfroid MB. *Handbook of prebiotics*. CRC Press, 2008.
50. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutrition* 1995;125:1401-1412.
51. Naessens M, Cerdobbel A, Soetaert W, Vandamme EJ, *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: Production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2005;80(8):845-860.
52. Goulas AK, Cooper JM, Grandison AS, Rastall RA. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans in a recycle membrane bioreactor by the combined use of dextransucrase and dextranase. *Biotechnol Bioeng* 2004;88:778-787.
53. Rousseau V, Lepargneur J, Roques C, Remaud-Simeon M, Paul F. Prebiotic effect of oligosaccharides on selected vaginal *Lactobacilli* and pathogenic microorganisms. *Anaerobe*, 2005;11(3):145-153.
54. Olano-Martin E, Mountzouris KC, Gibson GR, Rastall RA. In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *Br J Nutrition* 2000;83:247-255.
55. Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* 1998;42:39-44.

56. Campbell JM, Fahey GG, Wolf BW. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr* 1997;127:130-136.
57. Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colone cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nature Reviews Cancer* 2003;3:601-614.
58. Lim CC, Ferfuson LR, Tannock GW. Dietary fibers as “prebiotics”: Implications for colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:609-619.
59. Reddy BS. Prevention of colon cancer by pre- and probiotics: evidence from laboratory studies. *Br J Nutr* 1998;80:219-223.
60. Ishibashi N, Shimamura S. Bifidobacteria: Reserch and development in Japan. *Food Technol* 1993;126-135.
61. Taubman MA, Nash DA. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries *Nature Reviews Immunology* 2006;6:555-563.
62. Miyake T, Yoshiba M, Takeuchi K. Imparting low- or anti-cariogenic property to orally-usable products . US Patent 4,518,581 1981.
63. Ingelman BG, Richter AW, Granath KA. Sterile aqueous solution of a mixture of isomalto-oligosaccharides and its use for parenteral administration to mammals. US Patent 4,201,772 1980.
64. Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, Wright A. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology* 1999;65:351-354.
65. Kuriki T, Yanase M, Takata H, Takesada Y, Imanaka T, Okada SA. New way of producing isomaltooligosaccharide syrup by using the transglycosylation reaction of neopullulanase. *Appl Environ Microbiology* 1993;59(4): 953-959.
66. Yun JW, Lee MG, Song SK. Continuous production of isomaltooligosaccharides from maltose syrup by immobilized cells of permeabilized *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol. Lett.* 1994;16:1145-1150.

67. Tanriseven A, Doğan Ş, Production of isomaltooligosaccharides using dextransucrase immobilized in alginate fibres, *Process Biochem* 2002;37:1111-1115.
68. Poul FB, Monsan PF, Remaud MC, Pelenc VP. Process for the enzymatic preparation from sucrose of a mixture of sugars having a high content of isomaltose and products obtained. US Patent 4861381 1989.
69. Pereira AM, Costa FAA, Rodrigues MI, Maugeri F. In vitro synthesis of oligosaccharides by acceptor reaction of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnol. Lett.* 1998;20:397-401.
70. Gulas AK, Fisher DA, Grimble GK, Grandison AS, Rastall RA. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextranase. *Enzyme and Microbial Technology* 2004;35:327-338.
71. Bouhnik Y, Flourie B, D'Agay-Abensour L. Administration of transgalactooligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *J Nutrition* 1997;127:444-448.
72. Gibson GR, Beatty ER, Wang X, Cummings JH. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligo-fructose and inulin. *Gastroenterology* 1995;108:975-982.
73. Yun JW. Fructooligosaccharides-occurrence, preparation and application. *Enzyme Microb Technol* 1996;19:107-117.
74. German B, Schiffin J, Reniero R, Mollet B, Pfeifer A, Neeser JR. The development of functional foods: lesson from the gut. *Tibtech* 1999;17:492-499.
75. Wiesman A. *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2nd Edit., John Wiley & Sons, Chichester, England 1986.
76. <http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-bio030e.html>. 20.12.2012.
77. Klibanov AM. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science*, 1983;219:722-727.

78. Katchalski-Katzir E, Kraemer DM. Eupergit-C a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J Mol Catal. B: Enzym.* 2000;10 (1-3):157-176.
79. Kaboli H, Reilly PJ. Immobilization and Properties of *Leuconostoc mesenteroides* Dextranase, *Biotechnol Bioeng* 1980;22:1055-1069.
80. Monsan P, Lopez A. On the Production of dextran by free and immobilized dextranase. *Biotechnol Bioeng* 1981;23:2027-2037.
81. Alcalde M, Plou FJ, Gómez de Segura A, Remaud-Simeon M, Willemot RM, Monsan P, Ballesteros A. Immobilization of native and dextran-free dextranases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F for the synthesis of glucooligosaccharides. *Biotechnol Tech.* 1999;13(11):749-755.
82. Gómez de Segura A, Alcalde M, Yates M, Rojas-Cervantes ML, López-Cortés N, Ballesteros A, Plou FJ. Immobilization of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F on Eupergit C supports. *Biotechnol Prog.* 2004;20(5):1414-20.
83. Hernaiz MJ, Crout DH. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the beta-galactosidase from *B. circulans* and an alpha-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb Technol.* 2000;27(1-2):26-32.
84. Martin MT, Plou FJ, Alcade M, Ballasteros A. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. *J Mol Catal. B: Enzym.* 2003;21(4-6), 17:299-308.
85. Gómez de Segura A, Alcalde M, Plou FJ, Yates M, Ballesteros A. Synthesis of dextranase immobilized biocatalysts on epoxy-activated carriers of different porosity. Spanish Patent ES 200302264; 2003.
86. Funane K, Ishii T, Ono H, Kobayashi M. Changes in linkage pattern of glucan products induced by substitution of Lys residues in the dextranase. *FEBS Lett.* 2005;29;579(21):4739-45.
87. Parnaik VK, Luzio GA, Grahame DA, Ditson SL, Mayer RM. D-glycosylated form of dextranase: preparation and characteristics. *Carbohydr Res.* 1983;121:257-268.

88. Chang HN, Ghim YS, Cho YR, Landis DA, Reilly PJ. Immobilization of *Leuconostoc mesenteroides* Dextranase to Porous Phenoxyacetyl Cellulose Beads. *Biotechnol Bioeng.* 1981;23:2647-2653.
89. Han NS, Kang SY, Lee SB, Robyt JF. Affinity immobilization of dextranase on dextran-based support and the production of leucrose. *Food Sci Biotechnol.* 2005;14 (3):317-322.
90. Reh K-D, Noll-Borchers M, Buchholz K. Productivity of immobilized dextranase for leucrose formation. *Enzyme Microbiol Technol.* 1966;19:518-524.
91. Reischwitz A, Reh K-D, Buchholz K. Unconventional immobilization of dextranase with alginate. *Enzyme Microb Technol.* 1995;17:457-461.
92. Ölçer Z, Tanriseven A. Co-immobilization of dextranase and dextranase in alginate. *Process Biochemistry* 2010;45:1645-1651.
93. Kothari D, Baruah R, Goyal A. Immobilization of glucanase for the production of gluco-oligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnol Lett.* 2012;34(11):2101-6.
94. Robyt JF, Mukerjea R. Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by Thin-layer Chromatography, *Carbohydr Res.* 1994;251:187-202.
95. Pukl M, Prosek M, Rapid Quantitative TLC Analysis of Sugars Using an Improved Commonly Used Solvent System, *J Planar Chromatogr* 1990;3:173-6.
96. Moulis C, Joucla G, Harrison D, Fabre E, Potocki-Veronese G, Monsan P, Remaud-Simeon M. Understanding the Polymerization Mechanism of Glycoside-Hydrolase Family 70 Glucanases. *J Biol Chem.* 2006;281(42):31254-67.
97. Monsan P, Remaud-Simeon M, Potocki-Veronese G, Moulis C. Construction of new variants of dextranase DSR-S by genetic engineering. International Patent, PCT/IB2007/000951 2007.
98. Miller AW, Robyt JF. Activation and inhibition of dextranase by calcium. *Biochim Biophys Acta.* 1986;880(1):32-9.
99. Kitaoka M, Robyt JF. Mechanism of the action of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC dextranase: kinetics of the transfer of D-

- glucose to maltose and the effects of enzyme and substrate concentrations. *Carbohydr. Res.* 1999;320:183-191.
100. Boller T, Meier C, Menzler S. Eupergit oxirane acrylic beads: how to make enzymes fit for biocatalysis. *Org Proc Res Dev.* 2002;6(4):509-519.
 101. Kim D, Robyt JF. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B512-FMC constitutive dextransucrase. *Enzyme Microb Technol* 1994;16: 1010-1015.
 102. Novic SJ, Rozzel JD, Barredo JL (Ed.), *Methods in Biotechnology vol 17: Microbial Enzymes and Biotransformations*, Humana Press, Totowa 2005;256-257.
 103. Mateo C, Abain O, Lafuente RF, Guisan JM. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000;26:509-515.
 104. Mateo C, Torres R, Fernandez-Lorente G, Ortiz C, Fuentes M, Hidalgo A, Lopez-Gallego F, Abian O, Palomo JM, Betancor L, Pessela BCC, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules* 2003;4:772-77.
 105. D'Annibale A, Stazi S R, Vinciguerra V, Sermanni G. Oxirane-immobilized lentinula edodes laccase: Stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology* 2000;77:265-273.

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Kars ta doğdum. İlk ve orta eğitimimi yurdun çeşitli bölgelerinde tamamladıktan sonra 1997 yılında Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 2002 yılında GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümünde yüksek lisans eğitimimi tamamladım. 2006 yılında GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümünde doktora eğitimine başladım.