

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

77735

SÜKROZDAN FRUKTOOLİGOSAKKARİT
ÜRETİMİ

Fatma GÖKMEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

77735

TEZ DANIŞMANI
Yrd.Doç.Dr.Aziz TANRISEVEN

GEBZE

1998

Bu tez çalışması G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 03-07-1998 tarih ve 98/17a sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN, G.Y.T.E.
(Tez Danışmanı)

ÜYE : Prof. Dr. Abdülkadir AKÇİN, G.Y.T.E.

ÜYE : Prof. Dr. Yavuz SEZEN, G.Y.T.E.

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

23/07/1998..tarih ve ...98/20.....sayılı kararı.



ÖZET

Fruktooligosakkaritler; tabii olarak domates, soğan, yerelması ve muzda bulunan, oligosakkaritlerdir. Bunlar bir, iki veya üç fruktoz biriminin β -(2-1) glukosidik bağlarıyla sükroz'a ilavesinden elde edilirler.

Fruktooligosakkaritler yenildiğinde sindirime uğramadan kalın bağırsağa ulaşır orada *Bifidobakteriler*'in çoğalmasını sağlarlar. Bu karbohidratlar sükroz'a fruktosiltransferaz enziminin etkisiyle elde edilir. Ele geçen karışımda fruktooligosakkaritlerin yanısıra reaksiyona girmeden kalan sükroz ile yan ürün olan glukoz bulunur.

Bu çalışmada ilk olarak sükroz'dan, immobilize fruktosiltransferaz enzimi kullanılarak, fruktooligosakkaritler, sükroz ve glukoz'dan oluşan bir şeker karışımı elde edildi. Daha sonra elde edilen bu şeker karışımı, *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM Dextranucrase enzimiyle reaksiyona sokularak şeker karışımında bulunan sükroz'un tamamı ve bir miktar glukoz kalın bağırsakta bulunan *Bifidobakteriler*'i çoğaltan bir diğer karbohidrat olan isomaltooligosakkaritlere dönüştürüldü.

SUMMARY

Fructooligosaccharides are oligosaccharides, found naturally in tomato, onion, *Jerusalem artichoke*, and banana. These compounds are obtained by transferring one, two, or three fructose units to sucrose. The fructose units are linked to sucrose by β -(2 $\rightarrow$ 1) glucosidic linkages.

Fructooligosaccharides are non-caloric and, when ingested, they can reach large intestine where they can enhance the number of *Bifidobacteria*. Fructooligosaccharides are produced from sucrose using a fructosyltransferase. The product contains fructooligosaccharides, glucose as a by-product and some unreacted sucrose.

In this study, a sugar mixture composed of fructooligosaccharides, sucrose, and glucose was obtained from sucrose using an immobilized fructosyltransferase. Then by reacting the sugar mixture with *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM Dextranucrase, all of the unreacted sucrose and some of the glucose was converted into isomaltooligosaccharides, which are also *Bifidobacteria* enhancing carbohydrates.

TEŞEKKÜR

, Tez konusunu bana öneren ve bu çalışmayı yapabilmem için tüm imkanları sağlayan yardımları ile beni destekleyen değerli hocam Yrd. Doc. Dr. Aziz TANRISEVEN' e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yardımlarından dolayı G.Y.T.E. Biyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Abdülkadir AKÇİN'e , kimya labratuvarlarının imkanlarını sunan Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. Adem KILÇ'a ve Anorganik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Vefa AHSEN' e , laboratuvardaki çalışma arkadaşlarıma ve benden maddi manevi desteği esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	IV
SUMMARY.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
ŞEKİLLER.....	X
TABLolar.....	XI
1.GİRİŞ.....	1
2.KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR.....	6
2.1. Bifidobakterilerin İnsan Sağlığı Üzerine etkileri.....	6
2.2. Bifidobakterilerin Biyolojik Önemi.....	7
2.3. Fruktosiltransferaz	12
2.3.1. Fruktooligosakkarit enzimini sentezleyen bitkiler ve Mikroorganizmalar.....	12
2.4. Bitki ve Mikroorganizma Kaynaklı Fruktooligosakkarit Sentezi. Hakkında Bilgi.....	15
2.5. Çeşitli Fruktosiltransferaz Enzimleri Hakkında Bilgi.....	16
2.6. Fruktooligosakkaritlerin Fiziko Kimyasal Özellikleri.....	17
2.6.1. Fiziko Kimyasal Karakterler.....	17
2.7. Fruktooligosakkaritlerin Üretimi.....	18
2.7.1. Fruktooligosakkaritlerin İnülininden Üretimi.....	18
2.7.2. Fruktooligosakkaritlerin Endüstriyel Üretimi.....	18
2.7.3. Fruktooligosakkaritlerin Tesbiti ve Saflaştırılması.....	21
2.7.4. Yüksek Miktarda Fruktooligosakkarit İçeren Karışım Eldesi.....	21
2.7.5. Fruktooligosakkaritlerin Fonksiyonları ve Uygulama Alanları.....	22
2.8. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512 FM Dextranucrase	23
2.9. Enzim İmmobilizasyonu.....	25
3.7.1. Enzimlerin Ca- alginate ile İmmobilizasyonu.....	25
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
4.1. Gereçler.....	27

4.1.1. Kullanılan Maddeler.....	27
4.1.2. Kullanılan Aletler.....	27
4.2.' Yöntem.....	28
4.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi ile Fruktooligosakkarit Analizi.....	28
4.2.2. Enzimler.....	28
4.2.2.1. Pectinex Ultra SP-L.....	28
4.2.3. Pectinex Ultra SP-L Enziminin Gliserol ve Ca - alginate. ile İmmobilizasyonu.....	29
4.2.3. Fruktooligosakkarit Üretimi.....	30
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	31
KAYNAKLAR.....	34
ÖZGEÇMİŞ.....	37



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİN

TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
HPLC	High-Performance Liquid Cromatography
pH	$-\log [H^+]$
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
Ca- alginate	Kalsiyum alginate
E.coli	<i>Echericha coli</i>
sp	Species
HCL	Hidrojen Klorür
M	Molar
NaOH	Sodyum Hidroksit
α -naftol	Alfa-naftol
H ₂ SO ₄	Sülfirik Asit
C ₂ H ₅ OH	Etil Alkol
Unit (Enzim aktivitesi)	25°C' de ve bir dakikada 1 mikromol substratı ürüne çeviren enzim miktarı.
FOS	Fruktooligosakkaritler
DS	Dextransucrase

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Fruktooligosakkaritlerin Sentezi	2
1.2. Dextransucrase Enziminin Akseptör Reaksiyonları ve İsomaltooligosakkaritlerin sentezi	4
2.1. Prebiotiklerin Kimyasal Formülleri	8
3.5.3. Fruktooligosakkaritlerin Endüstriyel Üretimi	18
3.5.3. Neosugar G ve P'nin Üretim Basamakları	19
3.6. Dextran Biyosentezi	23
3.7.1. Enzimlerin Ca- alginate İle İmmobilizasyonu	24
5. Pectinex Ultra SP-L; Pectinex Ultra SP-L + Dextransucrase enzimleri ile elde edilen şeker karışımlarının TLC analizi.	32

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Fruktoziltransferaz Enzimini Sentezleyen Bitkiler	13
Tablo 2. Fruktoziltransferaz Enzimini Sentezleyen Mikroorganizmalar	14
Tablo 3. Fruktooligosakkarit sentezinde uygulanan prosesler	21
Tablo 4 Deneyde kullanılan sarf maddeler	27
Tablo 5 Deneyde kullanılan demir baş aletler	27

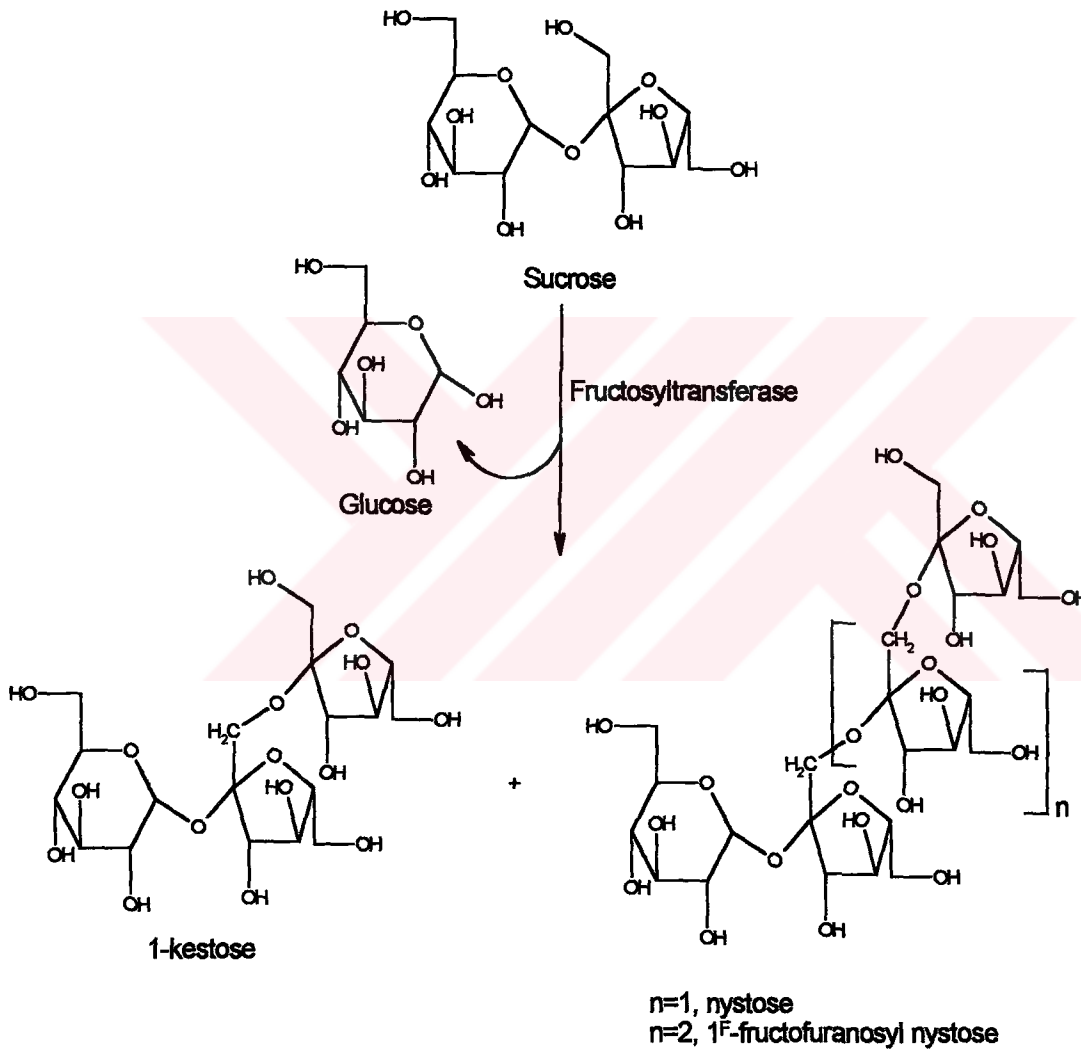
1. GİRİŞ

Kalın bağırsakta bulunan bakteriler insan sağlığı açısından faydalı (*Bifidobakterium* ve *Lactobasillus*) zararlı (*E.coli*, *Clostridium* veya *Proteus*) ve nötral bakteriler olarak sınıflandırılabilir(Mitsuoka, 1989). Gastro intestinal sistemdeki mikroorganizmalarla sağlık arasında kompleks bir ilişki vardır. Mikroorganizmaların endogenous ve exogenous substratelerden kanserojen ve toksin ürettikleri bilinmektedir. Diyetin, intestinal mikrofloranın metabolik karakterlerini ve kompozisyonunu etkilediği açıktır.

Bifidobakteriler insan bağırsağında tabii olarak bulunur ve kompleks B vitamini sentezi(Hughes, and Hoover, 1991), serum kolesterolünün azaltılması, kansere karşı olan etkileri, kalsiyum absorpsiyonu(Robert et al, 1995; Chanon et al, 1995), immün sistemin aktive edilmesi, ishal ve kabızlığın iyileştirilmesi gibi sağlıkla ilgili pek çok fayda sağlamaktadır(Hoover, 1993). Ayrıca Fruktooligosakkaritler'in göğüs kanseri tedavisinde de etkili olduğu belirtilmiştir(Roberfroid et al, 1998). İnsan bağırsağındaki *Bifidobakteriler*'in sayısı iki şekilde çoğaltılabilir. *Bifidobakteri* ihtiva eden yiyecekler alınabilir veya *Bifidobakteriler*'in kalın bağırsakta gelişmesini artıran özel karbohidratlar alınabilir. Bu karbohidratlar, Fruktooligosakkaritler, İsomaltooligosakkaritler, Galaktooligosakkaritler ve Cyclodextrinler'dir(Mitsuoka, 1989). İnsanların düşük kalorili ve sağlıklı yiyeceklere taleplerinin artmasıyla birlikte alternatif tatlandırıcılar olarak adlandırılan palatinoz, isomaltooligosakkaritler, soya fasülyesi oligosakkaritleri ve fruktooligosakkaritler 1980' den sonra önem kazanmıştır(Yung, 1996). Bunların ticari üretimi yapılarak pek çok yiyeceğin içinde alternatif tatlandırıcı olarak kullanılmaktadırlar(Yun, 1996).

Fruktooligosakkaritler ince bağırsaktaki enzimler tarafından sindirilmediği için kana geçip kan şekerini yükseltmez ve insanı şişmanlatmaz(Molis et al, 1996). Ülkemiz insanlarının önemli sağlık problemlerinden birisi de diş çürümesidir. Ağız boşluğunda bulunan *Streptococcus mutans* türü bakteriler sükröz'u diş yüzeyinde film tabakası oluşturan dekstran'a çevirirler. Dextran oluşumu diş çürümesinin başlangıcıdır. Fruktooligosakkaritler dextran ve asit oluşturmadığı için diş çürütmeyen şeker özelliğine sahiptir(Yun, 1996).

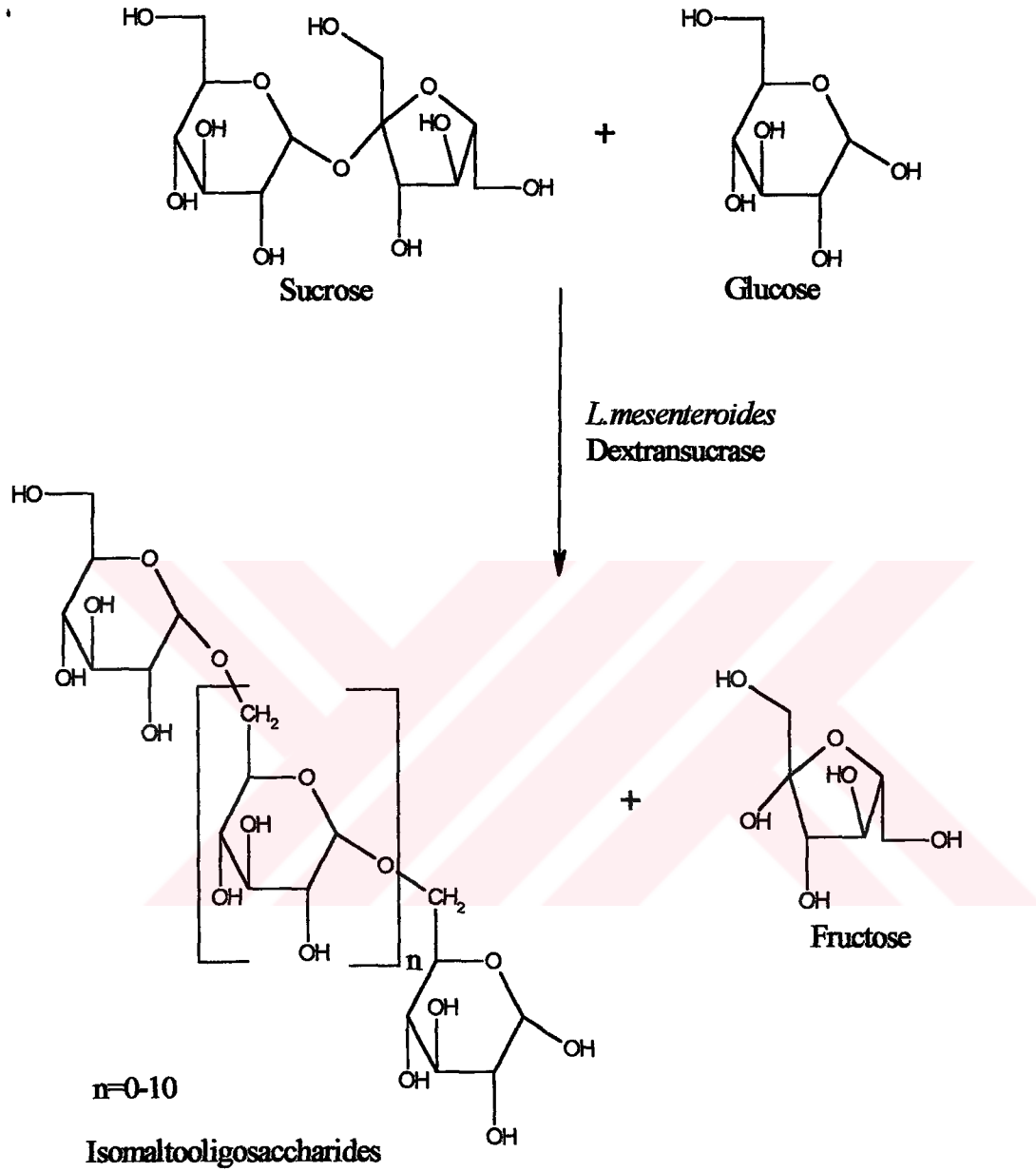
Fruktooligosakkaritler - yer elmasının hidrolizinden veya sükröz'a fruktosiltransferaz enziminin etkisiyle elde edilirler. Fruktooligosakkaritler başlıca 1-kestose (GF₂), nystose (GF₃) ve 1^F-fruktosyl nystose (GF₄) den oluşan fruktosil oligomerlerdir ve fruktoz üniteleri β -(2→1) glukosidik bağlarıyla sükröz'a bağlanırlar(Yun, 1996). Şekil 1 de fruktooligosakkaritlerin sükröz kullanılarak sentezi gösterilmektedir:



Şekil 1. Fruktooligosakkaritlerin sentezi.

Bu reaksiyon esnasında glukoz bir yan ürün olarak açığa çıkar. Glukoz'un bir kompetatif inhibitör olmasından dolayı, sükroz'un hepsi fruktosiltransferaz enzimi tarafından kullanılamaz ve elde edilen üründe %10 civarında sükroz bulunur. Kore'li bir araştırma grubunca yapılan çalışmada, fruktooligosakkarit enzimi ile birlikte glukoz oksidaz enzimi de kullanılarak oluşan glukoz, glukonik aside çevrilmiş ve sükroz'un büyük bir kısmı ürüne dönüştürülebilmıştır.(Jung et. all. 1993)

Leuconostoc mesenteroides B-512 FM Dextranucrase enzimi sukroz'un glukoz birimlerini α -(1→6) bağlarıyla birbirine bağlayarak dextran molekülünü oluşturur ve fruktoz yan ürün olarak açığa çıkar. *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM Dextranucrase sükroz karışımında akseptör adı verilen çeşitli karbohidratlar bulunduğunda, enzim yüksek molekül ağırlıklı dextran sentezi yerine sükroz'un glukoz kısmını bu akseptörlere transfer ederek akseptör ürünleri oluşturur. Çeşitli karbohidratlar (glukoz, maltoz, fruktoz, isomaltoz) akseptör olarak hareket ederler. Bazı akseptör ürünleri, mesela glukoz'un akseptör olduğu akseptör ürünleri, kendileri de akseptör olarak hareket ederek yeni akseptör ürünleri oluştururlar. Şekil 2'de glukoz akseptör olduğunda meydana gelen ürünler (isomaltooligosakkaritler) gösterilmektedir.



Şekil 2. Dextransucrase enziminin akseptör reaksiyonları ve isomaltooligosakkaritlerin sentezi.

Sıcaklığa, sükröz'un konsantrasyonuna ve kullanılan akseptöre ve konsantrasyonuna göre, akseptör ürünlerinin miktarı değişir. Bazı akseptörler dextran oluşumunu tamamen durdurur ve bu durumda Dextransucrase sadece akseptör ürünleri oluşturur.

Bu tez çalışmasındaki amacımız; yukarıda belirttiğimiz biyolojik öneme sahip fruktooligosakkaritleri ülkemizde de ekonomik bir şekilde üretmektir. Fruktooligosakkarit eldesinde, meyve suyu üretiminde kullanılan ve yüksek fruktosiltransferaz aktivitesine sahip olan Pectinex Ultra SP-L' yi kullanıldı. Enzimi orjinal bir yöntemle %18' lik Ca -alginate kullanarak immobilize edildi. Na – alginate, su-gliserol karışımında çözülerek alginate'in çözünürlüğü artırıldı ve bu sayede enzimin çözeltiye kaçması önlediği gibi matriksin fiziksel dayanıklılığı da artmış oldu. Geliştirilen bu metodla, düşük molekül ağırlıklı enzimler de Ca-alginate kullanılarak immobilize edilebilirler.

%60'lık sükroz çözeltisi immobilize fruktosiltransferaz enzimi ile reaksiyona sokularak fruktooligosakkarit ihtiva eden şeker karışımı elde edildi. Reaksiyona girmeden kalan sükroz'un tamamı ve yan ürün olarak meydana gelen glukoz'un bir kısmı *Leuconostoc mesenteroides* B-512 Dextranucrase enzimi kullanılarak, *Bifidobakteriler*'i artıran karbohidratlardan olan isomaltooligosakkaritlere çevrildi. Fruktooligosakkarit, isomaltooligosakkarit, glukoz ve fruktoz içeren bir karışım elde edildi.

2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. Bifidobakterilerin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Bifidobakteriler ilk kez 1899 yılında Paris pastör laboratuvarında Henry Tissier tarafından yeni doğan çocukların dışkılarında keşfedildi (İshibashi and Shimamura, 1993). *Bifidobakteriler* gram-pozitif bakterilerdir ve çok yaygın olmayan bir glukoz metabolizma sistemini kullanarak asetik asit ve laktik asitlerin her ikisini de üretirler. Bu asitlerin yanında az miktar da etil alkol ve formik asitte fermentasyonla üretilir (Hughes, and Hoover, 1991). Bu bakteriler anne sütü ile beslenen çocukların intestinal florasının büyük bir çoğunluğunu oluşturur. *Bifidobakteriler* yeni doğan çocukların kalın bağırsaklarında bulunduğu gibi yetişkinlerde de bulunur. Her insanın intestinal florasında yüz değişik bakteri suşu bulunur ve bunların sayıları takriben yüz trilyon civarındadır. İntestinal florada bulunan bakteriler üç gruba ayrılabilirler (Mitsuoka, 1991).

- 1-) Laktik asit bakterileri (*Bifidobakterium*, *Lactobasillus*, *Streptococcus*)
- 2-) Anaerobik bakteriler (*Bakteriodaceae*, *Anaerobic curved rods*, *Eubacterium*, *Peptococcaceae*, *Veillonella*, *Megasphaera*, *Gemmiger*, *Clostridium* ve *Treponema*)
- 3-) Aerobik bakteriler (*Enterobakteriaceae*, *Staphylacoccus*, *Basillus*, *Corynebakterium* *Pseudomonas* ve mayalar)

İntestinal florada bulunan bakteriler insan sağlığı açısından ise faydalı (*Bifidobakterium* veya *Lactobasillus*) zararlı (*Escherichia coli*, *Clostridium* veya *Proteus*) ve nötral bakteriler olarak sınıflandırılabilir (İshibashi, and Shimamura, 1993).

Çocuklar doğduktan sonra bağırsakları *Bifidobakteriler* tarafından kolonize olmaktadır. Anne sütü ile beslenen çocukların intestinal florasının %92' sini *Bifidobakteriler* oluşturduğu halde sütle beslenen çocuklarda bu oran %20 dir (Hughes, and Hoover). Yetişkinlerde *Bifidobakteriler*'in sayısı azalırken zararlı bakterilerin sayısında artış olmaktadır (*Clostridia* gibi) (Hidaka et al, 1991). *Bifidobakteriler* bazı hayvanların bağırsaklarında da bulunmaktadır (Muramatsu, et al, 1992). İntestinal flora insan sağlığı için çok önemlidir. Kalın bağırsakta bulunan zararlı bakterilerin çoğalması karaciğer ve böbrek bozuklukları, hipertansiyon, atherosclerosis, kanser ve yaşlanma gibi metabolik bozukluklara sebep

olmaktadır(Mitsuoka, 1989). *Bifidobakteriler* *Enteropatojenik* bakterilerin gelişmesini engelleyerek kanserojen N-nitrosaminleri azaltırlar. Farelerde yapılan deneyler de *Bifidobakteriler*'in karaciğer tümörlerini azalttığı görülmüştür(Muramatsu, et al, 1992).

2.2. Bifidobakterilerin Biyolojik Önemi

Anne sütü ile beslenen çocuklar formula ile beslenen çocuklardan daha iyi büyürler. Bu durum anne sütü ile beslenen çocuklarda çok sayıda *Bifidobakteri* bulunmasıyla açıklanabilir. *Bifidobakteriler* tarafından üretilen asitler (asetik asit ve laktik asit) ortamın pH'sını düşürerek zararlı bakterilerin üremesini önler. Çok sayıda *Bifidobakteri*'ye sahip olan çocuklar bazı enterik enfeksiyonlara etkili bir şekilde direnirler. Japon çocuklarında bu tür enfeksiyonları tedavide *Bifidobakteri* ihtiva eden süt ürünleri başarıyla kullanılmıştır. Düzenli olarak küçük çocukların yiyeceklerine *Bifidobakteri* ilavesi normal intestinal şartları korumak için kullanılabilir. Çocuk ve yetişkinlerle kıyaslandığında yaşlılarda daha az *Bifidobakteri* bulunur. Yaşlılarda zararlı bakteri sayısında ise bir artış görülmektedir. Canlı *Bifidobakteri* ihtiva eden yiyecekler alınarak bu durum düzeltilebilmektedir. 34 Rus kozmonotunda görülen intestinal bozukluklar *Bifidobakteri* ihtiva eden tabletler alınarak tedavi edilmiştir(Hughes, and Hoover, 1991)

Bifidobakteriler, thimin, riboflavin, B₆ ve K vitaminlerini insan kalın bağırsağında üretirler. Bu vitaminler vücut tarafından absorbe edilirler. (Hidaka, et al 1991)

Bifidobakteriler'in serum kolesterol seviyesini nasıl düşürdüğü bilinmemektedir. Farelerle yapılan çalışmada *Bifidobakteri* verildiğinde serum kolesterolünün düştüğü gözlenmiştir(Hidaka, et al 1991).

Bifidobakteriler doğrudan veya dolaylı olarak kanser yapıcı (procarcinogen) maddeleri uzaklaştırmak suretiyle vücudun immün sistemini aktive ederler. *Bifidobakteriler* kanser yapıcı maddelerin kaynaklarını veya onları meydana getiren enzimleri uzaklaştırırlar. Mesela intestinal florada *E.coli*, *Enterococcus faecalis* ve *Clostridium paraputrificum* bulunduğu farelerde çok sayıda karaciğer tümörleri

oluşur. Bununla birlikte *Bifidobacterium longum* bulunduğunda tümörlerin büyümesi büyük ölçüde azaltılmaktadır. (Hughes, and Hoover, 1991)

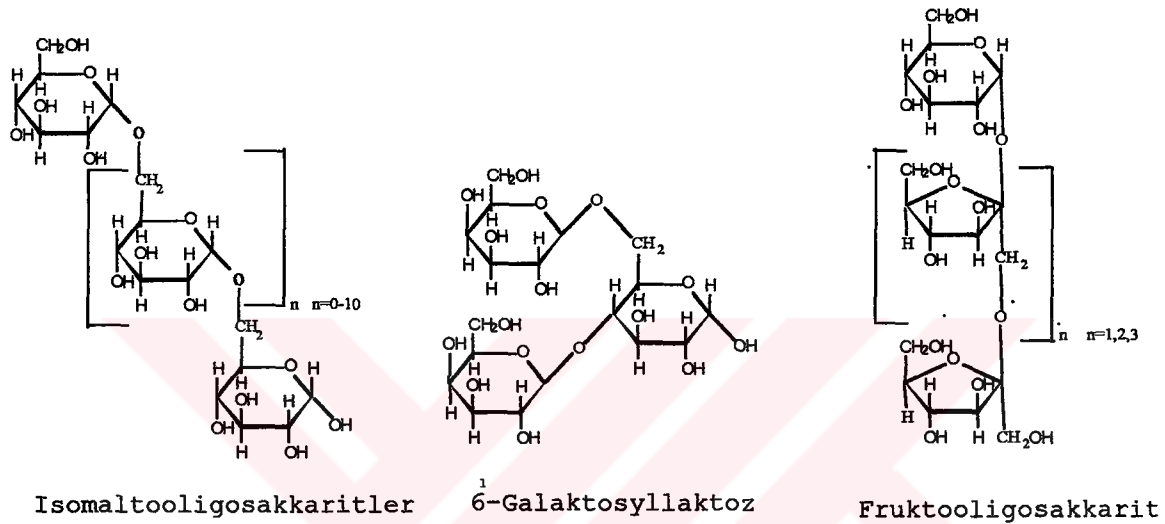
Danimarka'da doktorlar bağırsak rahatsızlığı olan hastalara *Bifidobakteri* ihtiva eden yiyecekleri tavsiye etmektedirler(Hughes, and Hoover, 1991). Kabızlık çok sayıda yaşlı insanlar için bir problem oluşturmaktadır. Japonya' da yapılan bir çalışmada, kabızlık çeken ve 20 günde 10.8 defa tuvalete giden yaşlılara *Bifidobakteri* ihtiva eden yoğurt verildiğinde ortalama olarak bu oran 13.1' e çıkmıştır(İshibashi, and Shimamura, 1993). Bu yoğurdun kullanımı kesildiğinde kabızlığın eski haline döndüğü gözlenmiştir. Japonya'da çocuklardaki ishaller *Bifidobakteri* ihtiva eden yiyecekler verilerek tedavi edilmiştir(Hoover, 1993).

Yaşlılarda ve menopozdan sonra pek çok kadında kemik erimesi görülmektedir. Estrogen miktarındaki azalma kadınlardaki kemik erimesini artırmaktadır. *Bifidobakteriler*'in(Roberts, 1995) ve onların çoğalmasını temin eden oligosakkaritlerden olan galaktooligosakkaritlerin[Chanon, et al, 1995] kalsiyum absorpsiyonu ve kemik kaybının önlenmesinde etkili oldukları bilinmektedir. Kalsiyum absorpsiyonu, *Bifidobakteriler* tarafından oluşturulan uçucu yağ asitlerinin kalsiyumun çözünürlülüğünü artırmasıyla açıklanabilmektedir(Chanon, et al, 1995).

İnsan sağlığına faydalı etkileri olan *Bifidobakteriler*'i insan kalınbağırsağında artırmak için iki değişik metot kullanılmaktadır: birincisinde *Bifidobakteriler* fabrikada üretilip çeşitli yiyeceklerle ilave edilebilmektedir[Hughes and Hoover, 1991]. İkincisinde ise *Bifidobakteriler*'in kullanıp çoğalabileceği özel oligosakkaritler tüketilebilir(Machida, et al. 1988). Bu oligosakkaritler yenildiğinde ağızda, midede, ve ince bağırsakta hiç bir değişikliğe uğramadan kalın bağırsağa ulaşp orada yalnız vücuda faydalı bakteriler (*Bifidobakteriler*) tarafından kullanılmaktadırlar.

Günümüzde gelişmiş pek çok ülkede (Amerika, Japonya, Fransa, Almanya, Danimarka, Kanada, İtalya, İngiltere ve Brezilya) 70'den fazla *Bifidobakteri* ihtiva eden yoğurt ve dondurulmuş tatlılar üretilmekte ve bu ürünler geniş halk kitleleri tarafından kullanılmaktadır(Molis,et al, 1996). Bu ürünlerden bazıları şunlardır: süt, süt tozu, yoğurt ve dondurulmuş tatlılar. Anaerobik olduğundan *Bifidobakteri* ihtiva eden ürünler hazırlanırken ürünün oksijen bulundurmamasına dikkat edilmesi

gerekmektedir(İshibashi and Shimamura, 1993). İntestinal *Bifidobakteriler*'in sayısını artıran oligosakkaritler isomaltooligosakkaritler(İMO)(Tanrıseven, 1993), fruktooligosakkaritler(FOS)(Sipiegel,1994) ve galaktooligosakkaritlerdir(GOS). (Hoshimoto, et al, 1990). Bu oligosakkaritler için prebiotik ismi son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır(Food Manufacture, 1995). Aşağıda kimyasal formülleri verilen bu oligosakkaritler Japonya'da büyük miktarlarda üretilmekte ve çeşitli ürünlerde kullanılmaktadır(Fujii and, Komoto 1991).



Şekil 3. Prebiotiklerin kimyasal formülleri

Yoshiaki Machida ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada(Patel et al., 1994) isomaltooligosakkaritlerin in vitro olarak *Bifidobakteriler*'in sayısını artırdığı bunun yanısıra zararlı bakterilerin bu ortamda büyümedikleri tesbit edilmiştir. Aynı grup tarafından yapılan bir deneyde isomaltooligosakkaritler ihtiva eden ekmekler hazırlanmış, kadın ve erkeklerden oluşan bir grup bu ekmekleri 4 hafta süreyle yemişlerdir. Bu deneyin başlangıcında ve sonucunda feces örnekleri toplanmış ve örneklerde bulunan mikroorganizma sayıları belirlenmiştir. İomaltooligosakkaritler ihtiva eden yiyecekleri tüketen insanların feceslerinde bulunan mikroorganizma sayısının 100 kat arttığı ve aynı zamanda zararlı bakterilerin, (*Clostridium* ve *Escherichia coli*.) sayılarında azalma olduğu bulunmuştur. İomaltooligosakkaritler ihtiva eden tabletler hazırlanmış ve bunları kullanan insanlarda da *Bifidobakteriler*'in çoğaldığı bulunmuştur.

Bifidobakteriler'in sayısını artıran diğer bir oligosakkarit ise fruktooligosakkaritlerdir. Bunlar az miktarda muz, arpa, soğan, sarımsak, domates, buğday, yer elması, kuşkonmaz bitkisinin dalları ve şekerpancarında bulunmaktadır(Borthomeuf, and Pourrat, 1995). Bu oligosakkaritler Amerika ve Japonya'da büyük miktarlarda çay şekerinden üretilmekte, özellikle Japonya'da beşyüzden fazla yiyeceğin içinde kullanılmaktadır(Borthomeuf, and Pourrat, 1995). İnsan üzerinde yapılan klinik deneyler fruktooligosakkaritlerin *Bifidobakteriler* tarafından kullanıldığını ishali ve kabızlığı iyileştirdiğini göstermiştir. Galaktooligosakkaritler de *Bifidobakteri* sayısını artırmaktadır(Shin, and Yong, 1994). Anne sütünde de bulunan 6¹-galaktosyllaktoz Japonlar tarafından sentetik olarak üretilmekte ve bebek mamalarında kullanılmaktadır(Dya Yukijirushi et al., 1990). Bu şeker aynı zamanda domuz yavrularının gelişmesini de hızlandırmaktadır.

Çiftlik hayvanlarının hasta olsun veya olmasınlar, yemlerine çok sayıda bakterilere karşı etkili olan antibiyotikler ilave edildiğinde, bu hayvanlar daha hızlı gelişme göstermektedirler(New scientist, 1990). Yemlere katılan antibiyotikler hayvan bağırsağında bulunan zararlı bakterileri öldürmektedir. Ancak bu antibiyotiklerin zararları da vardır. Bu antibiyotikler bağırsakta bulunan faydalı bakterileride öldürdüğü gibi, antibiyotiklere dayanıklı bakterilerin meydana gelmesinde sebep olmaktadır. Bu tarzda beslenen hayvanların etleri ilede insanlara geçmektedir. Hayvanların hızlı gelişmesini sağlamak için hayvan yemlerinde antibiyotikler yerine prebiotikler kullanılabilmekte ve daha sağlıklı sonuçlar alınabilmektedir. Prebiotikler sayesinde sayıları artan *Bifidobakteriler* yiyecek zehirlenmesi ve diğer enfeksiyonlara sebep olan bakterilerin sayısını azaltır ve bazı yiyeceklerin sindirimine yardımcı olmaktadır. Böylece hayvanlar yiyeceklerden daha çok faydalanabilmektedirler. *Bifidobakteriler* aynı zamanda zararlı mikroorganizmaları yok eden makrofajları da aktif hale geçirmektedirler. *Bifidobakteriler*'i artıran özel bir oligosakkarit geliştirilmiştir[New scientist, 1990]. Bu prebiotik domuz yavrularına verildiğinde üç ay içinde bunların kontrol domuz yavrularına göre altı kilo daha ağır oldukları tesbit edilmiştir.

Özet olarak, insan ve bazı hayvan kalın bağırsaklarında bulunan *Bifidobakteriler*, serum kolesterol seviyesini düşürmekte, kompleks B-vitamiyi sentezlemekte, kabızlık ve ishali iyileştirmekte, immün sistemi aktive etmekte , bazı

kanserleri önlemekte, kalın bağırsaktaki zararlı bakterilerin sayılarını azaltmakta ve kalsiyumun vücut tarafından absorpsiyonunda etkili olmaktadır. *Bifidobakteriler* prebiotik adı verilen özel oligosakkaritlerle veya canlı *Bifidobakteri* ihtiva eden yiyeceklerle çoğaltılabilmektedir. Gelişmiş ülkelerde (özellikle Japonya’da) *Bifidobakteri* ihtiva eden yiyeceklere veya *Bifidobakteriler*’i çoğaltan oligosakkaritlere olan ilgi giderek artmaktadır.



2.3. Fruktosiltransferaz

2.3.1. Fruktooligosakkarit Enzimini Sentezleyen Bitkiler ve Mikroorganizmalar

Çok sayıda yüksek yapılı bitkide depo karbohidratı olarak; şükroz'dan fruktoz oligomerleri ve polimerleri üretilmektedir(Yun, 1996). Fruktooligosakkaritler soğan, *asparagus*, buğday, çavdar, *tritikale*(Duon et al, 1993), yer elması, sarımsak ve muzda doğal olarak bulunmaktadır(Yun, 1996). Fruktooligosakkarit enzimi bitki ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Tablo 1 ve Tablo 2'de fruktosiltransferaz enzimi üreten bitki ve mikroorganizmalar gösterilmektedir.

Enzim kaynağı	Kaynaklar
<i>Agave ameicana</i> (agave)	Bhatia et al. (1979); Nandra and Bhatia (1980)
<i>Agave vera cruze</i> (agave)	Bhatia et al.(1954, 1955); Satyanarayana (1976)
<i>Asparagus officinalis</i> (asparagus root)	Shiomi et al. (1976,1979a, 1979b, 1980, 1981, 1982)
<i>Allium cepa</i> (anion bulbs)	Darbishire et al.(1978); Henry Henry and Darbishire (1980)
<i>Cichorium intybus</i> (chicory)	Sing and Bhatia (1971); Chandorkar and Collins (1972)
<i>Crinum longifolium</i>	Bhatia et al. (1959)
Sugar- beet leaves	Allen and Bacon (1956)
<i>Heliantus tuberosus</i> (Jerusalem artichoke)	Edelman and Dickerson (1966); Scott et al. (1966); Praznik et al. (1990)
<i>Lactuca sativa L.</i> (lettuce)	Candorkar and Collins (1972)
<i>Lycoris radiata</i> (monocot)	Nagamatsu et al. (1990)
<i>Taraxacum officinale</i> (dandelion)	Chandorkar and collins (1972)

Tablo 1: Fruktooligosakkarit enzimi sentezleyen bitkiler

Mikroorganizmalar**Kaynaklar**

<i>Aureobasidium pullulans</i>	Jung et al. (1987, 1989); Yun et al. (1990, 1992, 1993a, b,c,d); Smith et al. (1980)
<i>Aureobasidium sp.</i>	Hayashi et al. (1989, 1990, 1991a, 1991b)
<i>Arthrobacter sp.</i>	Fujita et al. (1990)
<i>Aspergillus japonicus</i>	Duan et al. (1994)
<i>Aspergillus niger</i>	Hidaka et al. (1988, 1989); Bealing and Bacon (1953)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Pazur (1952), Kida et al. (1988); Bealing and Bacon (1953)
<i>Aspergillus phoenicis</i>	Balken et al.(1991)
<i>Aspergillus sydowi</i>	Muramatsu et al. (1988)
<i>Claviceps purpurea</i>	Dikerson (1972), Arcomone et al. (1970)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Grupta et. al.(1982); Maruyama et al (1979); Patel et al.(1994)
<i>Penicillium frequentas</i>	Usami et al. (1991)
<i>Penicillium spiculosum</i>	Bealing and Bacon (1953)
<i>Phytophthora parasitica</i>	Hankin and Meintype (1977)
<i>Scopuloriopsis brevicaulis</i>	Takeda et al. (1994)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Straathof et al. (1986)

Tablo 2: Fruktooligosakkarit enzimi sentezleyen mikroorganizmalar

2.4. Bitki ve Mikroorganizma Kaynaklı Fruktooligosakkaritlerin Sentezi Hakkında Bilgi

Fruktooligosakkarit sentezi için enzim kaynakları başlıca bitki ve mikroorganizma olarak iki kısma ayrılmaktadır. Bitkilerin gelişim dönemlerinin uzun olması nedeniyle enzim eldesi zor ve sınırlıdır. Bunun için fruktooligosakkaritlerin sükroz'dan enzimatik reaksiyonla ticari üretiminde fungal (*Aspergillus niger*, *Aureobasidium sp.* gibi) kaynaklı enzimler tercih edilmektedir(Yun, 1996).

Ayrıca bitki kaynaklı fruktooligosakkaritlerin sentezlenmesinde bir seri enzim rol oynarken; mikroorganizma kaynaklı fruktooligosakkaritlerin sentezini tek tip enzim gerçekleştirebilmektedir. Örneğin yer elması bitkisinde iki enzim tarafından yürütülen fruktooligosakkarit oluşumu aşağıda gösterildiği gibidir[Yun, 1996].



GF : sükroz

G : glikoz

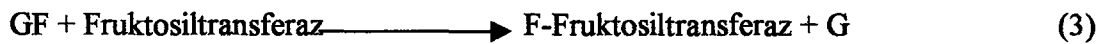
F : fruktoz

SST : sükroz: sükroz 1-fruktosyltransferaz

FFT : β -(2→1) fruktoz: β -(2→1) fruktan 1-fruktotransferaz

n : fruktooligosakkaritte bulunan fruktoz sayısı

Amerika'da yetişen sabır otunda'ki fruktooligosakkarit sentezi de aşağıda gösterildiği gibidir.



Shiomi ve arkadaşları (1979)Asparagus dallarından 11 Fruktooligosakkarit bilşğini izole ederek invitro olarak sentezlemişlerdir. *Asparagus* oligosakkaritlerinin en az üç çeşit enzimin birlikte çalışmasıyla sentezlendiğini göstermişlerdir. Bu enzimler: 1-Fruktosiltransferaz, 6-Fruktosiltransferaz ve 1^F-Fruktosiltransferaz'dır. Bu araştırmacılar enzimleri saflaştırıp karakterlerini de belirlemiştir.

2.5. Çeşitli Fruktosiltransferaz Enzimleri

Çok sayıda fruktosiltransferaz enzimi saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Genellikle mikroorganizma kaynaklı enzimler bitki kaynaklı enzimlerden daha büyük molekül ağırlığına sahiptir ve sıcaklığa daha dayanıklıdır.

Duan ve arkadaşları (1993) tarafından yapılan çalışmaya göre *Aspergillus japonicus* dan elde edilen β -Fruktofronosidase enziminin optimum pH'sı 5.4 ve optimum sıcaklığı 60°C dir. Moleküler ağırlığı 236 kda. ve iki alt birimden oluşmuştur. Enzimin izoelektrik pH'sı 4 dür. Ayrıca enzim 5mM Hg^{+2} ve Ag iyonları tarafından da inaktive edilmektedir.

Aspergillus niger'den elde edilen enzimler meyve suyu üretiminde kullanılan pektinolitik ve selülotik enzimlerdir. Hang ve Wooddams (1995) tarafından çalışılan 22 ticari enzimden fruktosiltransferaz en iyi aktivitesini Pectinex Ultra SP-L göstermiş ve şeker pancarı küspesinde bulunan sükroz'dan fruktooligosakkarit üretmişlerdir(Jung et al., 1993), Pectinex Ultra SP-L enziminin optimum sıcaklığı 65°C, optimum pH'sı 5.6 olarak tesbit edilmiştir(Hang and Woodams, 1995).

Genel olarak enzimin optimum pH ve sıcaklığı 5 - 6.5 ve 50 -60 °C dir⁸. *Agave americana* dan elde edilen fruktosiltransferaz, Ca^{+2} , Mg^{+2} , Co ve Li^{+} tarafından aktive edilirken Ag^{+} , Pb, Hg, Al^{+3} , ve Sn tarafından da inhibe edilmektedir(Yun, 1996).

Fruktosiltransferaz enzimi bir gluko proteindir. Patel ve arkadaşlarının (1997) yaptıkları bir çalışmada; enzim üzerindeki glukoz birimlerini uzaklaştırarak molekül ağırlığı 260 K Da olan FTF enziminin molekül ağırlığını % 42 oranında azaltmışlardır. Buna bağlı olarak enzimin stabilitesi azalırken aktivitesi üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır.

Fujita ve arkadaşlarının (1994) yaptıkları bir çalışmaya göre, heterooligosakkarit üreten *Arthrobacter sp.* K-1' in ürettiği β -Fruktofuronosidase enzimi sükroz'lu ortamda hem fruktoz transferi ve hem de hidroliz reaksiyonlarını katalizleyebilmektedir. Enzim yüksek sükroz konsantrasyonunda transfruktosilasyon

reaksiyonunu katalizleyebilmektedir. Buna ilave olarak enzimin yüksek sıcaklıkta çalışması ticari üretimde kontaminasyonu önlediği için oldukça kullanışlıdır(Yun, 1996).

2.6. Fruktooligosakkaritlerin Fiziko Kimyasal Özellikleri

2.6.1. Fiziko Kimyasal Karakterler

Fruktooligosakkaritlerin fizikokimyasal karakterleri hakkında çok fazla çalışma yoktur. Beyaz ve kristal formdadırlar. %10'luk süktroz çözeltisine göre 1-kestose, nystose ve 1^F-fructofuranosylnystose'un tatlılık oranları, sırasıyla %31, 22, ve 16' olarak tesbit edilmiştir[Yun, 1996]. Fruktooligosakkaritler yüksek derecede nem çekicidirler. Atmosfer şartları altında fruktooligosakkaritleri kristal halde tutmak zordur. Fruktooligosakkaritlerin çözelti viskositesi aynı konsantrasyondaki süktroz'dan daha yüksektir ve sıcaklığa dayanıklılığı da süktroz'dan daha yüksektir. Bunlara ilave olarak yiyecekler içindeki fruktooligosakkaritler normal pH aralığında (4 - 7) süktroz'a göre daha dayanıklıdır. Buz dolabında bir yıldan daha fazla bozulmadan kalabilirler. Süktroz'dan enzim reaksiyonu ile elde edilen fruktooligosakkaritlerin çözünürlük, donma ve kaynama noktaları süktroz'a benzemektedir(Yun, 1996).

2.7. Fruktooligosakkaritlerin Üretimi

2.7.1. İnülinde Fruktooligosakkarit Üretimi

İnülin Fruktoz'un β -(2 $\rightarrow$ 1) bağlarıyla bağlanmasından oluşan lineer bir polimerdir ve yer elması, *Chicory* ve *Dahlia*'da depo karbohidratı olarak bulunur(Fujiita et al., 1994). İnülinde elde edilen inülooligosakkaritler, fruktooligosakkaritlere çok benzer yapı ve fonksiyona sahiptir. Ticari fruktooligosakkarit karışımının sadece %55-60'ını kestose, nystose ve 1^F-froktoşilnystose oluştururken, geri kalan kısmı sükroz, glukoz ve fruktoz'dan ibarettir(Novaik et al., 1996). Fruktooligosakkarit karışımında sükroz'un bulunması istenmeyen bir durumdur. Bunun için Yun ve arkadaşları 1997'de yüksek aktivitede endo inülinase kullanılarak inülinde inülooligosakkarit ürettirler. İnülooligosakkaritler ticari olarak inülinin hidroliziyle üretilmektedir.

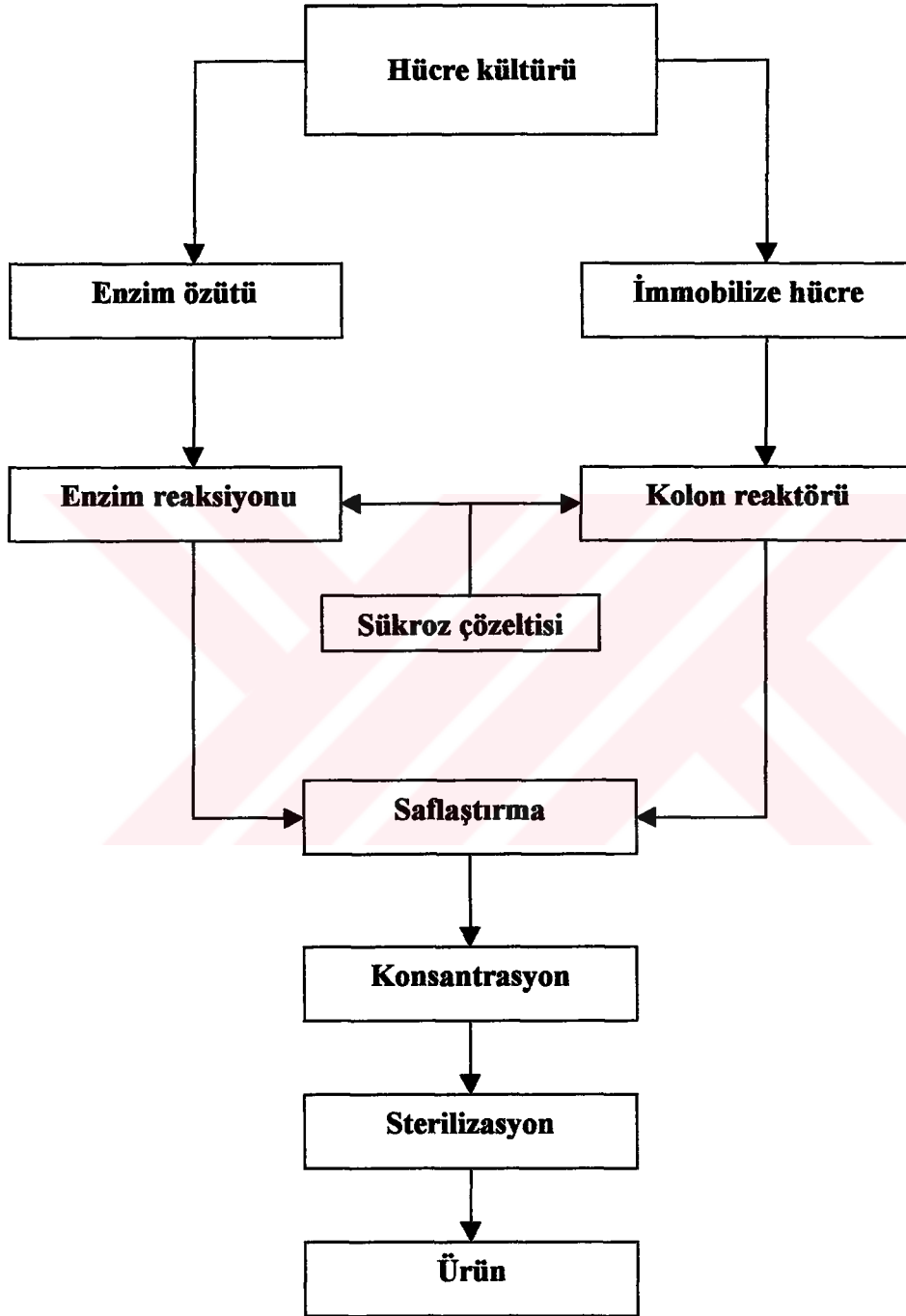
Farklı enzimlerle üretilen fruktooligosakkarit ve inülooligosakkaritlerin karbohidrat kompozisyonunu Jon Won Yun ve arkadaşları(1997) tarafından karşılaştırılmış ve inülooligosakkaritlerin fruktooligosakkaritlerden daha az sükroz içerdiği gösterilmiştir.

2.7.2. Fruktooligosakkaritlerin Endüstriyel Üretimi

Fruktooligosakkarit üretiminde ortamda biriken glukoz, fruktosiltransferaz enzimini belirli bir konsantrasyondan sonra inhibe etmektedir. Bu nedenle enzim, ortamdaki sükroz'un hepsini fruktooligosakkaritlere dönüştüremez. Jung ve arkadaşları (1993), fruktooligosakkarit üretimi esnasında glukoz oksidaz enzimini kullanarak glukoz'u glukonik aside çevirip ürün inhibisyonunu önlemişlerdir. Glukonik asidi iyon değıştirici ile üründen ayırıp fruktooligosakkarit miktarını %90'na çıkarmışlardır.

Fruktooligosakkaritlerin endüstriyel üretimi batch (kesikli) yada sürekli sistemler kullanılarak yapılmaktadır. Meiji Seika şirketi ilk olarak fruktooligosakkaritleri *Aspergillus niger* hücrelerini Ca-alginate jele immobilize ederek ürettirler. Daha sonraları Cheil foods and Chemicals şirketi de Ca-alginate kullanılarak immobilize edilen *Aspergillus pullulans* ile fruktooligosakkaritleri ürettirler.(Yun, 1996).

Fruktooligosakkaritlerin kesikli (batch) ve sürekli sistemde üretimi şekil 4’de gösterilmiştir.



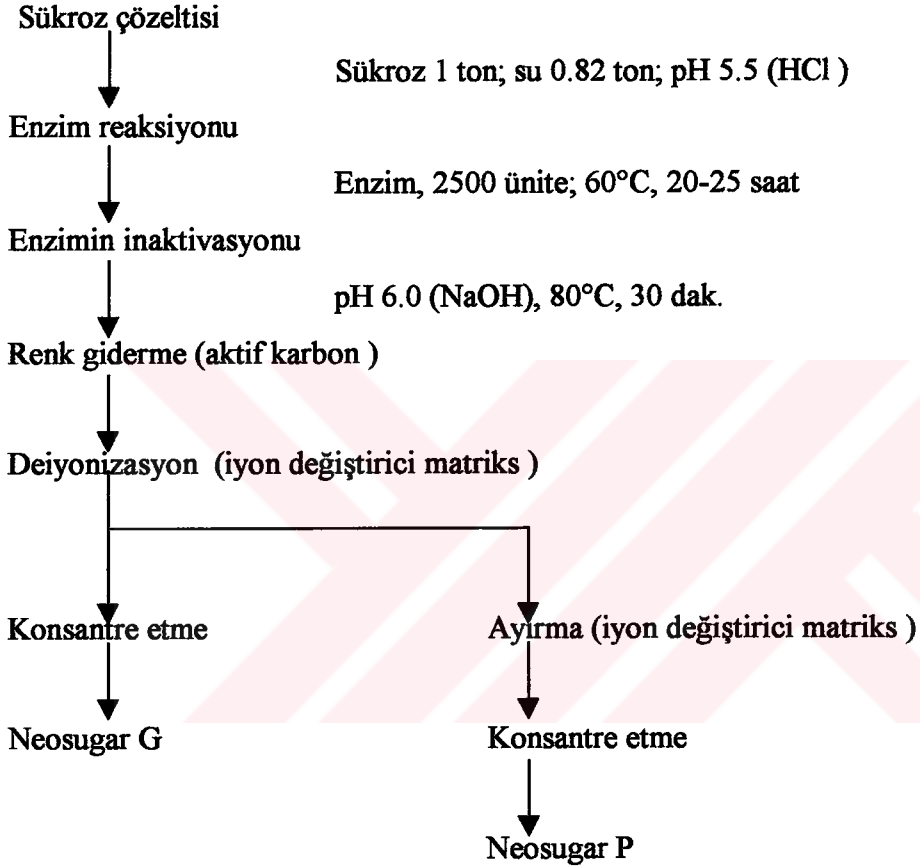
Kesikli üretim

Sürekli üretim

Şekil 4. Fruktooligosakkaritlerin endüstriyel üretimi(Yun, 1996).

Japonya'da fruktooligosakkaritler ticari olarak sükroz'dan fungal β - Fructofronosidase kullanılarak üretilip neosugar G ve P adı altında satılmakta olup insan yiyecek ve besin maddeleri ile hayvan yemlerinde kullanılmaktadır (Hand Book of Amylases). Neosugar G ve P'nin üretim basamakları şekil 5'de gösterilmiştir.

Üretim basamakları



Şekil 5. Neosugar G ve P'nin üretim basamakları

Elde edilen Neosugar G ve P' nin bileşenleri aşağıda verilmiştir.

Neosugar G ve P'nin Bileşenleri (%)					
Ürün G(F)	GF	GF ₂	GF ₃	GF ₄	(GF ₂₋₄)
Neosugar G	<12	25	25	11	56
Neosugar P	<5	35	50	11	95

Bu yöntemle elde edilen neosugar G, % 12 oranında süktroz içermektedir. Neosugar P ise iyon değıştirici matriksten geçirilmiştir. Bu sayede karışımındaki süktroz miktarı % 5'ten daha az seviyeye düşmüştür. Neosugar P daha az süktroz içediğı için daha yüksek talep görmüştür.

Tablo 3'de fruktooligosakkarit üretiminde uygulanan prosesler gösterilmiştir.

Enzim kaynağı	Substrate	Proses ^a	Stabilite ^b	Kaynaklar
<i>A. pullulans</i>	770 g l ⁻¹ süktroz	Semibatch (IC)	60 gün	Yun et al. (1990)
<i>A. pullulans.</i>	770 g l ⁻¹ süktroz	Continuous (IC)	100 gün	Yun et al. (1992)
<i>A. pullulans</i>	770 g l ⁻¹ süktroz	Semibatch (IE)	20 gün	Yun et al. (1993)
<i>Aureobasidium sp.</i>	400 g l ⁻¹ süktroz	Continuous (IE)	30 gün	Hayashi et al. (1991)
<i>A. Phoenicis</i>	750 g l ⁻¹ süktroz	Batch (M)	—	Balken et al. (1991)
<i>A. pullulans</i>	Sugar beet molasses	Continuous (IC)	25 gün	Fujisaki et al. (1989)

^aIC, IE ve M kısaltmaları sırasıyla immobilize hücre, immobilize enzim ve miselyumları ifade etmektedir.

^bStabilite: enzimin ilk aktivitesini kaybetmediğı maksimum reaksiyon süresi.

Tablo 3. Fruktooligosakkarit üretiminde uygulanan prosesler[Yun, 1996].

2.7.3. Fruktooligosakkaritlerin Tesbiti ve Saflaştırılması

Enzimatik reaksiyonla süktrozdan elde edilen fruktooligosakkaritlerin tesbiti HPLC veya TLC teknikleri ile yapılmaktadır.(Yun 1996)

Karbohidrat karışımından fruktooligosakkaritleri ayırmak çok güçtür. Fruktooligosakkaritler, aktif Karbon-celite kolonunda ethanol kullanılarak ayrılabilir. Hidaka ve arkadaşları (1987) GF₂ ve GF₃'ü aktif karbonla, GF₄'ü de HPLC ile ayırmışlardır.

2.7.4. Yüksek Miktarda Fruktooligosakkarit İçeren Karışım Eldesi

Sadece fruktosiltransferaz enzimi kullanılarak fruktooligosakkarit üretiminde en büyük problem, reaksiyon esnasında oluşan glikozun enzimi belirli bir süre sonra inhibe etmesidir. Bu sebeple pek çok ticari fruktooligosakkarit ürünleri dikkate değeri miktarda süktroz ve glikoz içermektedir. Piyasada fruktooligosakkarit olarak satılan ürünler, fruktooligosakkarit, süktroz ve glukoz karışımıdır.

Fruktooligosakkaritler kuru ağırlığın en fazla %55-60'ını oluşturmaktadır. Bu durum fruktooligosakkaritlerin tercih edilen özelliklerini sınırlamaktadır. Son zamanlarda araştırmacılar ekonomik ve yüksek miktarda fruktooligosakkarit içeren ürünün üretimi üzerinde çalışmaktadırlar(Yun 1996).

Jung ve arkadaşları(1993) fruktosiltransferaz ile birlikte glukoz oksidaz enzimini de kullanarak ortamdaki glukoz'u glukonik aside dönüştürerek glukoz'un enzimi inhibe etmesini önlemişlerdir. Oluşan glukonik asid kromatografik yöntemlerle üründen ayrılarak ürünlerdeki fruktooligosakkarit miktarının artması sağlanmıştır. Glukoz'un inhibisyonunu gidermek için, fruktosiltransferaz ile birlikte glukoz izomeraz enzimide kullanılmış ancak çok başarılı bir netice alınamamıştır.

2.7.5. Fruktooligosakkaritlerin Fonksiyonları ve Uygulama Alanları

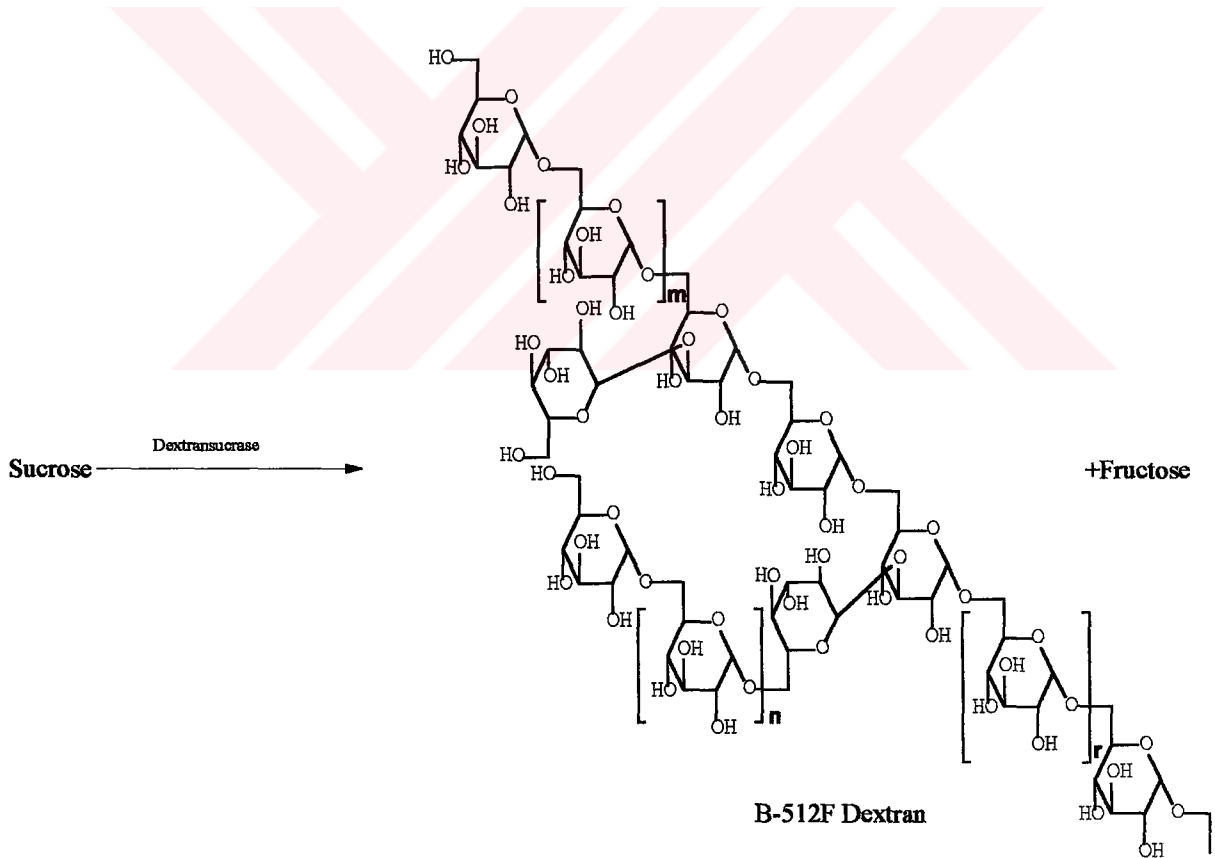
Fruktooligosakkaritlerin pek çok önemli özellikleri vardır. İlk olarak fruktooligosakkaritler sükroz'un üçte biri kadar tada sahiptir. Bu özelliği ile sükroz'un yüksek tatlılığının sınırladığı çok sayıdaki yiyecekte kullanılabilir. Fruktooligosakkaritler kalori vermezler. İnce bağırsaktaki sindirim enzimleri tarafından hidroliz edilmediği için sindirilmez ve enerji kaynağı olarak kullanılmaz ve şeker hastalarının da kullanabileceği doğal bir tatlandırıcıdır(Yun,1996).

Ağız boşluğundaki *Streptococcus mutans* tarafından kullanılmadığı için laktik asit ve dextran meydana getirmemekte ve dolayısıyla dişleri çürütmemektedir. Fruktooligosakkaritler yenildiğinde ağızda, midede ve ince bağırsakta hiç bir değişikliğe uğramadan kalın bağırsağa geçip orada sadece vücuda faydalı olan *Bifidobakteriler* tarafından kullanılmaktadır. *Bifidobakteriler*'in sayısının artmasıyla kalın bağırsakta ishale sebep olan zararlı mikroorganizmaların gelişmesi engellemektedir ve serum kolesterolünü düşürmektedir. Fruktooligosakkaritler sükroz'un kullanıldığı bütün yiyeceklerde kullanılmaktadır. Yurt dışında yiyecek marketlerinde fruktooligosakkarit içeren ürünlere talep yüksektir. Fruktooligosakkaritlerin yüksek konsantrasyondaki mısır şurubu ve tablet şekerlerle birlikte kullanımı daha etkilidir.

2.8. *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM Dextransucrase

Önemli bir endüstriyel enzim olan Dextransucrase, sükröz'un glucosyl kısımlarını kullanarak Şekil 6'da görüldüğü gibi dextran meydana getirir. Enzimin molekül ağırlığı 177-195 kDa. arasındadır. Enzim üç monomerden oluşmuştur ve monomerin molekül ağırlığı ise 65 kDa. dur. Saflaştırılmış enzimin optimum pH'sı 5.0-5.5 arasında olup, isoelektrik noktası ise 4.0'dır. Enzim, ürünü olan dextran tarafından kararlı hale getirilir.

Dextran glukoz moleküllerinden meydana gelen bir polimerdir ve sükröz'a *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM Dextransucrase'in etkisiyle elde edilir. Dextran polimerinde D-glukoz birimleri birbirlerine α -(1→6) bağlarıyla bağlanmıştır ve ayrıca % 5 oranında α -(1→3) dallanma bağları vardır. Dextran'ın kimyasal yapısı aşağıda gösterilmiştir.

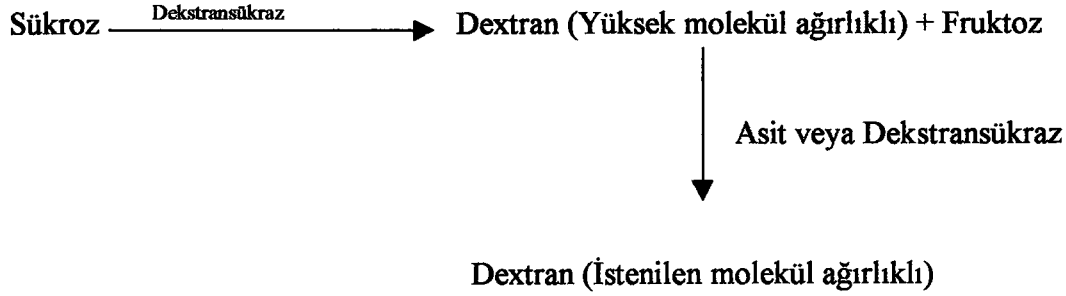


Şekil 6. Dextran Biyosentezi

Dextran'ın molekül ağırlığı, enzim miktarına, sıcaklığa ve kullanılan sükröz'un konsantrasyonuna bağlı olarak değişmekte ve $5 \cdot 10^8$ 'e kadar

ulaşabilmektedir. Çeşitli metodlarla değişik molekül ağırlıklarına sahip olan Dextran polimerleri elde edilebilir. Molekül ağırlığı 50.000 ile 100.000 arasında olan Dextran'a "Clinical Dextran" denir ve bu dextran kan-plasma substitute olarak kullanılır. İstenilen molekül ağırlığına sahip olan dextran aşağıda gösterilen metodlarla elde edilebilmektedir:

1.



Sükroz ve dekstransükraz kullanılarak elde edilen yüksek moleküllü dextran, asit veya dextranase enzimiyle hidrolize edilerek istenilen molekül ağırlıklı Dextran elde edilmektedir.

2.



Akseptör: Glukoz

Maltoz

İsomaltoz

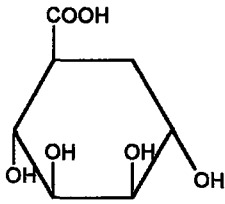
İsomaltodextrin

Karışım da sükroz'un yanısıra akseptör adı verilen çeşitli karbohidratlar da varsa meydana gelen Dextran'ın molekül ağırlığı kontrol altında tutularak Clinical Dextran elde edilmektedir.

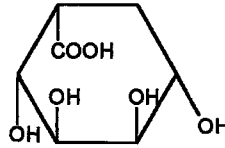
2.9. Enzim İmmobilizasyonu

2.9.1. Enzimlerin Ca-alginate ile immobilizasyonu:

Alginate deniz yosunlarında bulunan bir polisakkarit olup, aralarında (1→4) glukosidik bağları olan β -D-mannuronik asit ve α -L- gluronik asitlerden meydana gelir(Simidsrod et al., 1990). Aşağıda D-mannuronik asid ve L-gluronik asidin formülleri gösterilmektedir.



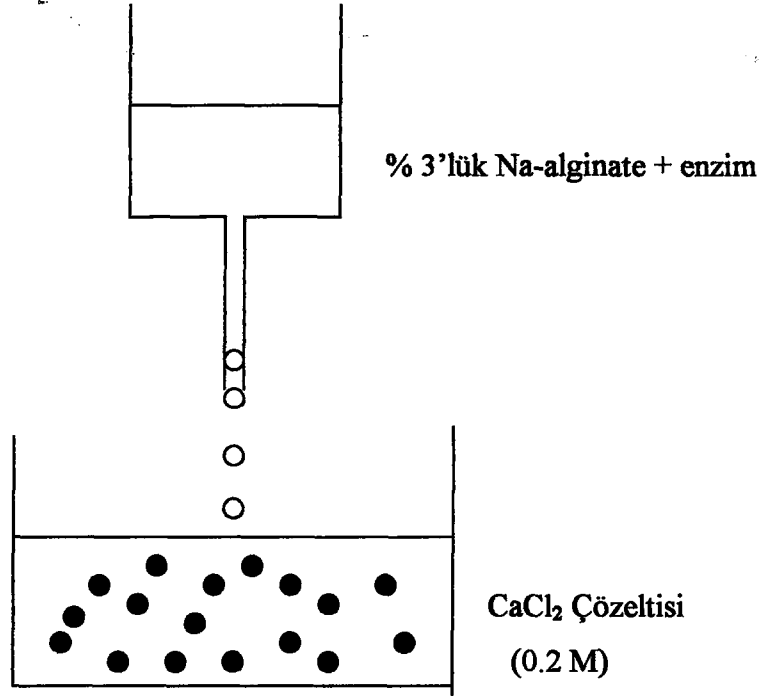
D-mannuronik asid



L-guluronik asid

Genellikle hücrelerin immobilizasyonunda kullanılan bu metod, enzimler için kullanıldığında, bazı özel tekniklerin de kullanılması gerekir. Alginate ile enzimlerin immobilizasyonunda, Na-alginate çözeltisine enzim ilave edildikten sonra bu çözelti 0.2 M CaCl_2 çözeltisine damlatılır. Na- alginate, CaCl_2 ile temas ettiğinde Na-Ca değişimi nedeniyle suda çözünmeyen Ca-alginate iplik veya boncukları meydana gelir ve enzim molekülleri bu matriks'lerin içinde bulunur. Zamanla enzim molekülleri matriksin dışına sızar. Bu durumu önlemek için çeşitli metodlar kullanılmaktadır : İmmobilizasyonda kullanılan enzimlerin molekül ağırlıkları bazı polimerlerle etkileşmesiyle artırılabilir. Mesela, Dextranucrase, molekül ağırlığının dextran polimerleriyle artırılmasıyla başarılı bir şekilde Ca-alginate içinde immobilize edilmiştir(Reischwitz et al., 1995). Enzimlerin alginate matriks'lerinden sızmasını önlemek için enzimler alginate kovalent olarak da bağlanabilmektedir(Dominguez et al., 1988).

Şekil 7 de enzimlerin alginate ile immobilizasyonu gösterilmiştir. Genellikle %2-3'lük alginate çözeltileri kullanılır. Enzimlerin matriks'in dışına sızmasını önlemek için ve Ca-alginate matriks'in sertliğini artırmak için koloidal silika kullanılabilir(Fukushima et al., 1988).



Şekil 7. Enzimlerin Ca-alginat ile immobilizasyonu

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Maddeler

ADI	ÜRETİCİ FİRMA	KATOLOG NO
Alginic asit	Sigma	A-2033
Glycerol	Merck	K 2094093
Pectinex Ultra SP-L	Nova Nordisk	
Dextranucrase	Dr. John F. Robyt, Iowastate Univ.	
NaOH	Fluka	71692
CaCl ₂	Merck	2381.1000
Sodyum asetat	Merck	1.06265
Sükroz	Sigma	S-5016
Glikoz	Sigma	G-8270
Fruktoz	Sigma	F-0127
Sodyum azide	Merck	1.06688.0250
Asetik asit	Merck	1.00056
Thymol	Sigma	T-0501
α -naftol	Sigma	N-1000
H ₂ SO ₄	Sigma	
C ₂ H ₅ OH	Merck	1.00030
Aceton	Merck	13.2500
Whatman K5 TLC plaka		

Tablo 4 Deneyde kullanılan sarf maddeler

4.1.2 Kullanılan Aletler

ALETİN ADI	BULUNDUĞU YER
Densitometre	Kimya laboratuvarı

Tablo 5 Deneyde kullanılan demirbaş aletler.

3.2. Yöntem

3.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi İle Fruktooligosakkarit Analizi

Fruktooligosakkaritler, Whatman K5 TLC plakaları ve iki değişik çözelti sistemi kullanılarak ayrıldı. Çözelti 1- 2: 3: 5: (V/ V/ V) nitrometan- su- 1-propanol(Roby, 1987).

Çözelti 2- 1.5 : 8.5 (V/ V) su- asetonitril(Roby, 1987).

TLC plakaları ilk önce 1.çözelti sistemi kullanılarak TLC plakalarının 2/3'üne kadar üç kez yürütüldü. Yürütülme işlemlerinden sonra plakalar saç kurutma makinasında kurutuldu. TLC plakaları daha sonra 2. Çözelti sistemi kullanılarak plakalar üç kez tepelerine kadar yürütüldü.

TLC, üzerindeki karbohidratları görünür hale getirmek için TLC plakaları % 0,5 tymol ve % 5 H₂SO₄ ihtiva eden etanol çözeltisine daldırılıp hot-plate üzerinde 110°C'de 5 dakika ısıtıldı.

3.2.2.Enzimler

3.2.2.1.Pectinex Ultra SP-L

Bu enzim Novo-Nordisk tarafından hediye edildi. *Aspergillus niger* 'den elde edilen ve meyve suyu üretiminde kullanılan Pectinex Ultra SP-L enziminin optimum sıcaklığı 65°C, optimum pH'sı 5.6 dır(Hang and Woodams, 1995).

3.2.2.2. *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM Dextranucrase

Bu enzimin aktivitesi 42/ml international unit (IU) idi. Bir IU aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır. 25°C ve pH 5.4' de bir dakikada sukroz'dan 1 mikromol glukoz'un dextran'a katılabilmesi için gerekli olan enzim miktar(Roby,1990)

3.2.3. Pectinex Ultra SP-L Enziminin Ca-alginate İmmobilizasyonu

Metod A: 0.45g Na – alginate, 1.25 ml glycerol, 1ml Pectinex Ultra SP – L ve 2.5 ml 50 mM asetat tampon (pH 5.4) çözeltisiyle homojen olarak karıştırıldı ve elde edilen bu alginate – enzim karışımı bir enjektör kullanılarak %5’lik 50ml CaCl_2 çözeltisine iplik halinde ilave edildi. İmmobilize enzim, bir saat CaCl_2 çözeltisinde bekletildi ve tampon çözelti ile (100 ml) yıkandıktan sonra 1 cm uzunluğunda küçük parçacıklara ayrıldı. İmmobilize enzim kullanılıncaya kadar asetat tampon çözeltisinde bekletildi(Gökmen, 1998).

Metod B: 1ml Pectinex Ultra SP-L, asetat tampon çözeltisiyle (50mM pH 5.4) hazırlanan 10ml % 5’lik Na-alginate ile homojen olarak karıştırıldı ve % 5’lik 50ml CaCl_2 iplik halinde ilave edildi. İmmobilize enzim, bir saat CaCl_2 çözeltisinde bekletildi ve tampon çözelti ile (100 ml) yıkandıktan sonra 1cm uzunluğunda küçük parçacıklara ayrıldı. İmmobilize enzim kullanılıncaya kadar asetat tampon çözeltisinde bekletildi

3.2.3. Fruktooligosakkarit Üretimi

Metod A kullanılarak alginat ile immobilize edilen Pectinex Ultra SP-L, asetat tampon çözeltisiyle hazırlanan (pH 5.4 50 mM) 50ml'lik % 60 süktroz çözeltisiyle 60°C'de 8 saat reaksiyona uğratıldı. Yapılan TLC (Asetonitril / su 8,5/1.5) süktroz'un çoğunun fruktooligosakkaritlere dönüştüğünü gösterdi. Reaksiyon karışımında fruktooligosakkaritlerin yanı sıra, bir miktar reaksiyona girmeden kalan süktroz ve reaksiyon yan ürünü olan glukoz vardı. Reaksiyon karışımından 25ml alınarak 2ml Dextranucrase enzimi ile oda sıcaklığında 16 saat reaksiyona tabi tutuldu. Yapılan TLC, reaksiyon karışımına süktroz'un bulunmadığını ve isomaltooligosakkaritlerin oluştuğunu gösterdi(Gökmen, 1998).

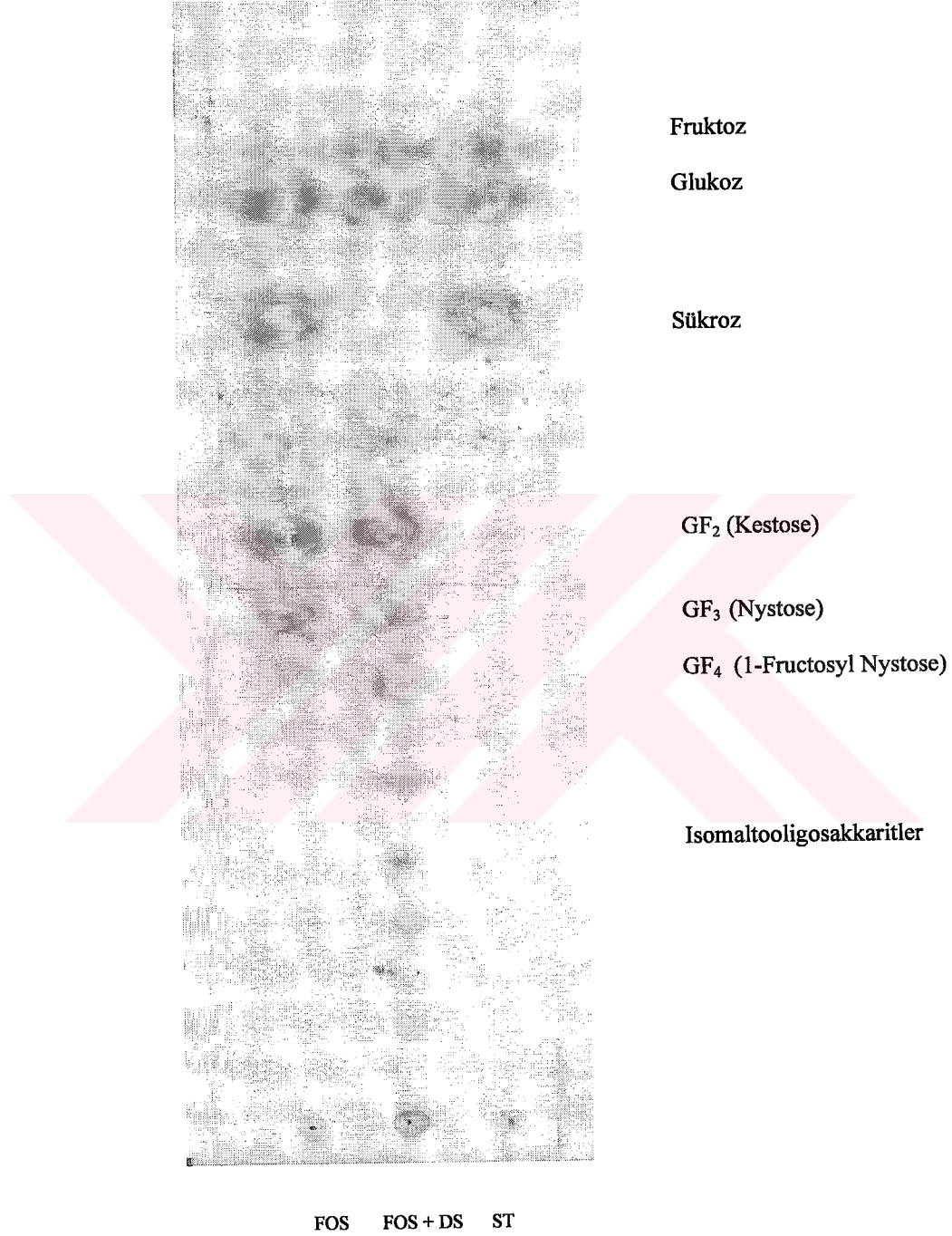
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Alginate immobilizasyonu, mikroorganizmalar için çok uygun olduğu halde, küçük molekül ağırlıklarından dolayı enzimler için uygun değildir. Molekül ağırlığı 300.000'e kadar olan enzimler zamanla alginate matriksinden dışarı sızabilmektedir. Alginate kullanılarak yapılan immobilizasyonun ikinci bir sakıncası ise matriksin çok dayanıklı olmamasıdır. Bu tez çalışmasında, Pectinex Ultra SP-L enzimini alginate kullanarak yeni bir metodla immobilize ettik. Na-alginate'in sudaki çözünürlüğü az olduğundan yaklaşık olarak % 10 dan daha konsantre alginate çözeltisi hazırlanamamaktadır, ve alginate matriksinin mekanik dayanıklılığı konsantre alginate çözeltilerinin kullanılmasıyla artmaktadır.

Bulduğumuz yeni metotta Na-alginate, su-gliserol karışımı kullanılarak çözülmekte ve yüksek konsantrasyonlu Na-alginate çözeltileri elde edilebilmektedir. Bu metodla hazırladığımız Ca-alginate matriksleri, sadece su kullanılarak hazırlanan matrikslerden çok daha dayanıklı olmuşlardır. Bulunan bu metod, özellikle substrate'ı ve ürünü küçük molekül ağırlıklı olan enzimler için uygundur.

Fruktooligosakkaritler biyolojik öneme sahip olan ve şu anda bazı gelişmiş ülkelerde büyük miktarlarda üretimi yapılan oligosakkaritlerdir. Bu karbohidratların kullanım alanları sürekli olarak artmaktadır. Fruktooligosakkaritler, sükroz ve fruktosiltransferaz enzimi kullanılarak elde edildiğinde şeker karışımında % 55 – 60 oranında fruktooligosakkaritler bulunurken yaklaşık olarak % 10 reaksiyona girmeyen sükroz ve % 30 glukoz (yan ürün) bulunur. Yan ürün glukoz'un, enzim için bir kompetatif inhibitör olmasından dolayı sükroz'un tamamı fruktooligosakkaritlere dönüştürülememektedir. Sükroz ülkemiz insanlarının da büyük bir problemi olan diş çürümesine sebep olmaktadır. Düşük verime ve diş çürümesine sebep olduğu için üründe sükroz'un bulunması istenmez. Reaksiyon esnasında yan-ürün olarak meydana gelen glukoz'un kompetatif inhibitör etkisi, glukoz oksidaz enziminin Fruktosiltransferaz enzimiyle birlikte kullanılmasıyla giderilmiş ve oluşan glukoz'un glukonik aside çevrilmesiyle sükroz'un büyük bir kısmı fruktooligosakkaritlere dönüştürülebilmektedir. Bu metodun bir sakıncası, oluşturulan glukonik asitin ortamdan ayrılması için iyon değiştirici kolon kromatografisi'ne ihtiyaç duyulmasıdır.

Fruktooligosakkarit eldesinde reaksiyona girmeden kalan sükröz'un ortamdan uzaklaştırılması için yeni bir metod geliştirdik. İlk olarak sukroz ve immobilize Pectinex Ultra SP-L kullanılarak fruktooligosakkarit ihtiva eden bir şeker karışımı elde edildi. Şekil 8'de görüldüğü gibi şeker karışımında fruktooligosakkaritlerin



FOS: Fruktooligosakkarit Şurubu

FOS + DS: Fruktooligosakkarit Şurubu + Dekstransükraz

ST: Standart

Şekil 8. Pectinex Ultra SP-L; Pectinex Ultra SP-L + Dekstransucrase enzimleri ile elde edilen şeker karışımlarının TLC analizi.

yanında reaksiyona girmeden kalan sükroz ve yan ürün olarak meydana gelen glukoz bulunmaktadır. Şeker karışımında bulunan sükroz'un tamamını ve glukoz'un bir kısmını Dextransucrase enzimi kullanarak isomaltooligosakkaritlere çevirdik. Şekil 8 görüldüğü gibi Dextransucrase ile reaksiyona sokulan şeker karışımında hiç sükroz bulunmamaktadır. Bu şeker karışımında fruktooligosakkaritler, isomaltooligosakkaritler, glukoz ve fruktoz bulunmaktadır. İomaltooligosakkaritler de *Bifidobakteriler*'i artırır. İomaltooligosakkaritler sükroz'a belirli bir oranda ilave edildiğinde sükroz'un sebep olduğu diş çürümesini de önler. İomaltooligosakkaritler, ayrıca, Clinic Dextran'la birlikte insanlara yapay plazma olarak verilerek bazı insanlarda meydana gelen dextran-antibody reaksiyonunu önleyebilmektedir. Bulduğumuz metodla sükroz'un tamamı fruktooligosakkaritlere ve isomaltooligosakkaritlere dönüştürülebilmektedir. Bu metod, literatürdeki metodlardan daha iyidir. Hiç bir kromatografik ayırma işlemi gerekmeden, elde edilen şeker karışımı direkt olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Balken, Van, J.A.M., et al., App. Microbiol. Biochem., 31(1): 69 – 76, 1996.
2. Borthomeuf, C., and Pourrat, H., Biotechnology Letters, 17(9): 911 – 916, 1995.
3. Chanon, O., Matsumoto, K., and Watanuki, M., Biosci. Biochem., 59(2): 236 – 139, 1995.
4. Dominguez, E., Nissan, M., and Hahn – Hagerdal, B., Carbodiimide coupling of β -galaktosidase from *Aspergillus oryzae* to alginate, Enzyme Micob. Technol., 10, 606 – 610, 1988.
5. Duon, Kow – jen, et all. Bioser. Biotech. Biochem., 57, 1811 – 1815, 1993.
6. Food Manufacture, (4) 30, 1995.
7. Fujii, S., and Komoto, M., Zuckerind, 116,(3), 197 – 200, 1991.
8. Fujita, K., et all., Structures of oligosaccharides, Produced by β -Fructofronosidase, Japan. Bioser. Biotech. Biochem, 58 (2), 239 – 243, 1994.
9. Fukushima, Y., Okamura, K., Imai, K., and Motai, H., A nev immobilization technique of whole cells and enzymes with colloidal silica and alginate, Biotechnology and Bioengineering, 32, 584 – 594, 1988.
10. Gökmen, F. Ca-alginate immobilizasyonu orjinal metodu, GYTE., Fen. Fak. Biyoloji Bölümü, 1998.
11. Hand book of Amylases of Related Enzymes., p.p. 228-230.
12. Hang*, Y.D., Woodams, E:E, and Jang, K.Y., Enzimatic conversion of sucrose to kestose by fungal extracellular fructosyltransferase, Biotechnology letters, volume 17, no. 3, p.p. 295-298, 1995.
13. Hang, Y.D., and Woodams, E.E., Fructosyltransferae activity of commercial enzyme preparation used in fruit juice, Procecing Biotechnology Letters, Volume 17, No .7, p.p. 741 – 744, 1995.
14. Hidaka H., et all., Industrial production of fructooligosaccharies and its aplication for human and animals, Nippon Nogeikagaku Kaishi, 61, 915-923, 1987.
15. Hidaka, H., Hirayama, M., and Yamada, K., J. Carbohydr. Chem. , 509 – 522, 10(4), 1991.
16. Hoover, D.G., Food Technology, 120-124, (6), 1993.
17. Hoshimoto, H., Goto, M., and Katayama, C., Jpn. Koka: Tokkyo Koho Jp 05, 146,237.

18. Hughes, D.B., and Hoover, D.G., *Food Technology*, 74 – 83, (4), 1991.
19. Iwasaki, K.I., Nakajima, M., and Nakao, S-I., *Process Biochem.*,31(1): 69 – 76, 1996.
20. Ishibashi, N., and Shimamura, S., *Food Technology*, 126 –135, (6), 1993.
21. Kohmoto, T., Fukui, F., Takaku, H., and Mitsuoka, T., *Agric. Biol. Chem.*,55(8): 2157 – 2159, 1991.
22. Kyun Hoon Jung et al., Production of high. fructooligosaccharide syrup with two enzyme system of fuructosyltransferase and glyucose oxidase, *Biotechnology letters*, Volume 15, No 1, pp. 65 – 70, 1993.
23. Machida, Y., Fukui, F., and Komoto, I., US patent 4, 782, 045, 1988.
24. Mitsuoka, T., *Microbiology Applications in Food Biotechnology*, Edited by B.H. Nga and Y.K. Lee, London and New York: Elsevier Applied Science, 135 –148, 1989.
25. Molis, Christine, et al. Digestion of Fructooligosaccharides in Human USA. *American Society for Chlinical Nutrition*, 64, 324- 328, 1996.
26. Muramatsu, K., Onodera, S., Kikuchi, M., and Shiomi, Bsci. *Biotech. Biochem.*, 56(9): 1451 –1454, 1992.
27. *New scientist.*, 14, (4), 28, 1990.
28. Novaik, M., Stanek, J., Hollerova, *Biotehnlogy Letters*, volume 18, No 2, p.p., 211-212, 1996.
29. Patel, V., Saunders, G., and BucheC., *Biotechnology Letters.*, 16(11): 1139 – 1144, 1994.
30. Patel. V., et all., *Biotechnology Letters*, vol 19, No1, pp. 75 – 77, 1997.
31. Reischwitz, A., Reh, K – D., and Buchholz, K., unconventional immobilization of dextranucrase with alginate, *Enzyme and Microbial Technology*,17, 457 – 461, 1995.
32. Roberfroid, M., et all. Prevention of mammary carciogenesis and breast cancer treatment. *Unitet States patent* 5,7,21,345. Feb.24.1998.
33. Roberts,C. M., Fett, W.F.,Osman, S.F., Wiley, C., O'connor, J.V., and Hoover,D.G., *J.Appl. Bacteriol.*, 78: 463- 468, 1995.
34. Robyt John F., Bernard J. White, *Biocemical Technique Teory and Practice*, 1987.
35. Robyt, Jhon F., Iowa state Uniersity, Ames, Iowa, USA, 1990.
36. Shin, H. J., and Yong, J.V., *Biotechnology Letters*, 16(11): 1157 –1162, 1994.

37. Shiomi, N., et al., Synthesis of several fructooligosaccharides by asparagus fructosyltransferase, *Agric. Biol. Chem.*, 43, 2233-2244, 1979.
38. Simidsrod, O., and Skjak – Break, G., Alginate as immobilization matrix for cells, *TIBTECH.*, 8, 71 – 78, (1990).
39. Spiegel, J.E., Rose, R., Karabell, P., Frankos, Yh., and Schmitt, D.F., *Food Technology*, 85 – 89, (1), 1994.
40. Tanriseven, A., Ph.D. Thesis; Iowa State University, Ames, Iowa USA, 1993.
41. Yukijirushi, E.Dya, *Nygyo Kenkyusko Hokoku*, 92: 1 – 54, 1990.
42. Yun, Jon Won, Fructooligosaccharides – occurrence preparation, and application. *Enzyme and Mcrobial Technology*, 19, 107 – 117, Korea, 1996.
43. Yun, Jong Won, et al., Comparison of sugar compositions between inulo – and fructooligosaccharides produced by different enzym forms, *Biotechnology letters*, Vol. 19, No 6, pp.553 – 556, 1997.



ÖZGEÇMİŞ

ADI VE SOYADI : Fatma GÖKMEN

DOĞUM YERİ VE TARİHİ: Çay / Afyon 03-04-1972

İLKÖĞRENİM : Çay Çağlayan İlkokulu

ORTA ÖĞRENİM : Savaştepe Öğretmen Lisesi 1983 - 1989

YÜKSEK ÖĞRENİM : Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü 1989 - 1993

ÇALIŞTIĞI KURUMLAR : Ocak - 1994; Haziran - 1997 tarihleri arasında Milli Eğitimde Biyoloji Öğretmenliği

Haziran 1997 - ve sonrası G.Y.T.E.'de Biyoloji Araştırma Görevliliği.

YÜKSEK LİSANS BAŞLAMA : Eylül – 1995 - 1996 hazırlık

Eylül - 1996 - 1997 ders dönemi

Eylül – 1997 - 1998 tez dönemi

BİLİMSEL AKTİVİTELER : Temmuz - 1995 Çanakkale “İleri Biyoloji” Yaz okulu

Kasım - 1997 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi “Enzim İmmobilizasyonu ve Uygulama Alanları” kursu.

Temmuz - 1998 Tübitak “Enzimlerin Saflaştırılması ve Nitelendirilmesi” yaz okulu.