

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

PREBİYOTİK ÜRETİMİ

ZEHRA ÖLÇER
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE

2011

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

PREBİYOTİK ÜRETİMİ

ZEHRA ÖLÇER
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. AZİZ TANRISEVEN

GEBZE

2011



DOKTORA TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/06/2010....tarih ve 2010./25 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 21/12/2010 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Zehra ÖLÇER'in tez çalışması Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof.Dr. Aziz TANRISEVEN

ÜYE

: Prof.Dr. Bülent KESKİNLER

ÜYE

: Doç.Dr. Ayhan ÇELİK

ÜYE

: Yrd.Doç.Dr. Ali TÜRKAN

ÜYE

: Yrd.Doç.Dr.M. Fatih ABASIYANIK

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: PREBİYOTİK ÜRETİMİ

YAZAR ADI: ZEHRA ÖLÇER

Tez çalışmasında bağırsaklarda yaşayan, mide-bağırsak ve karaciğer sorunlarına karşı biyolojik fonksiyonları olan faydalı bakterileri (*Bifidobacterium sp*, *Lactobacillus sp*) uyararan prebiyotiklerin üretimi için yeni ve etkili metodlar geliştirildi. İzomaltooligosakkaritler, fruktooligosakkaritler ve galaktooligosakkaritler prebiyotik oligosakkaritlerdir. Tez izomaltooligosakkaritlerin üretim metodlarının çalışıldığı dört bölümden oluşmaktadır.

Birinci bölümde, *Leuconostoc mesenteroides* dekstransükraz ve *Penicillium lilacinum* dekstranaz birlikte immobilize edildi ve sükrozdan izomaltooligosakkarit üretiminde kullanıldı. Birlikte-immobilizasyon değişik alginat matrikslerde (bead, fiber ve kapsül), serbest dekstransükraz ve Eupergit C üzerine immobilize edilen dekstranaz ile yapıldı. En iyi immobilizasyon verimi (%71) alginat kapsül ko-immobilizasyonunda gerçekleştirildi ve bir ay süresince aktivitede azalma görülmedi. Birlikte-immobilize enzimlerin sükrozdan izomaltooligosakkaritlerin üretiminde kullanılabileceği gösterildi. Ayrıca üretilen oligosakkaritler, sükroz ilavesi ve alginat fiberlerde immobilize dekstransükraz ile reaksiyon yapıldı. Şeker karışımındaki prebiyotik oligosakkaritlerin miktarı %43 (w/w) tür.

İkinci bölümde, izomaltoz yüksek saflıkla, birlikte-immobilize dekstransükraz ve dekstranaz kullanarak sükroz ve glukoz karışımından üretildi. Dekstransükraz, sükrozun glukoz birimlerini kullanarak dekstran oluşumunu katalizlerken, açığa çıkan fruktozun akseptör etkisiyle lükroz oluşur. Dekstranaz ve glukozun etkisiyle, fruktozun akseptör etkisi tamamen ortadan kaldırıldı ve dekstran oluşumu da inhibe edildi. Dekstranazın oluşan oligosakkaritleri hidroliziyle izomaltoz üretildi. İzomaltoz, oligosakkaritler, fruktoz ve glukozdan oluşan karışım ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) ile muamele edildi, fruktoz ve glukoz uzaklaştırıldı. İzomaltozun saflığı %82 (w/w) dir.

Üçüncü bölümde, dekstransükraz substrat ve akseptörlerin (maltoz, laktoz, fruktoz, glukoz ve galaktoz) varlığında dietilpirokarbonat (DEP) ile modifiye edildi. Çalışma şartlarında DEP histidinlerin imidazol gruplarıyla reaksiyon verir. Substrat ve akseptörlerin varlığında enzim DEP inaktivasyonundan korundu. DEP-modifiye dekstransükrazın dekstran biyosentezi inhibe olurken akseptör reaksiyonlarını etkili şekilde gerçekleştirdiği görüldü. Bulgular aktif bölgede imidazol gruplarının rolü ve önemini gösterdi. Ayrıca DEP-modifiye dekstransükraz prebiyotik oligosakkaritlerin üretiminde kullanıldı.

Dördüncü bölümde, DEP-modifiye dekstransükraz ve ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisia*) alginat bead'lerde birlikte immobilize edildi ve sükrozdan izomaltooligosakkaritle elde edildi. Reaksiyon karışımında ekmek mayası invertazı sükrozu hidroliz ederken, DEP-modifiye dekstransükraz akseptör reaksiyonları yoluyla izomaltooligosakkaritleri üretir. Bu metod izomaltooligosakkaritlerin endüstriyel üretiminde kullanılabilir.

SUMMARY

TITLE OF THESIS: PREBIOTIC PRODUCTION

AUTOR NAME: ZEHRA ÖLÇER

The thesis work is on the development of novel and effective methods for the production of prebiotics, which are oligosaccharides stimulating the growth of beneficial bacteria (*Bifidobacterium sp*, *Lactobacillus sp*) in the human intestine. The beneficial bacteria have biological functions including resistance to gastrointestinal infections, restoration of bowel flora, and improvement of liver enzymes in human alcohol-induced liver injury. Prebiotics include isomaltooligosaccharides, fructooligosaccharides, and galactooligosaccharides. In this thesis, consisting of four chapters, production methods for isomaltooligosaccharides were studied.

In the first chapter, *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase and *Penicillium lilacinum* dextranase were co-immobilized and used for the production of isomaltooligosaccharides from sucrose. Co-immobilization was carried out by encapsulating in alginate (beads, fibers, and capsules) of soluble dextransucrase and dextranase covalently attached to Eupergit C. The alginate capsule co-immobilization resulted in a high immobilization yield (71%) retaining their activities for a month in storage. It was shown that co-immobilized enzymes could be used for the production of isomaltooligosaccharides from sucrose. In addition, the oligosaccharides produced, after addition of sucrose, were reacted with dextransucrase encapsulated in alginate fibers to increase the amount of prebiotics. The percentage of prebiotic oligosaccharides in sugar mixture was 43% (w/w).

In the second chapter, high pure isomaltose was produced from a mixture of sucrose and glucose using co-immobilized dextransucrase-dextranase. Dextransucrase catalyzes the formation of dextran using glucosyl units of sucrose molecules releasing fructose as an acceptor to form leucrose. Dextranase hydrolyzes dextran forming oligosaccharides including isomaltose. The action of dextranase and presence of glucose almost completely eliminated acceptor activity of fructose and formation of dextran. Thus, a mixture composed of

isomaltose, oligosaccharides, fructose and glucose was obtained. The sugar mixture was treated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) to remove fructose and glucose. The purity of isomaltose obtained was 82% (w/w).

In the third chapter, dextransucrase was modified with diethylpyrocarbonate (DEP) in the presence and absence of substrate and acceptors (maltose, lactose, fructose, glucose, and galactose. Under the conditions studied, DEP reacts with imidazole groups of histidines. The presence of substrate and the acceptors partially protected the enzyme from DEP inactivation. Partially DEP-modified dextransucrase carried out the acceptor reaction effectively. However, dextran biosynthesis was inhibited to a large degree. These findings show the importance and the role of imidazole groups at the active site. In addition, DEP-modified dextransucrase was used to produce prebiotic oligosaccharides.

In the last chapter, DEP modified dextransucrase and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) were co-immobilized in alginate beads and used for the production of isomaltooligosaccharides from sucrose. Yeast invertase hydrolyzes sucrose forming glucose and fructose which act as acceptors in dextransucrase reactions. DEP-modified enzyme carries out mostly acceptor reactions forming isomaltooligosaccharides. The method developed could have potential to be used in industrially production of isomaltooligosaccharides.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının her aşamasında, fikirleri, yardımları ve yönlendirmeleri ile bana büyük emeği geçen ve hiçbir yardımı esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Aziz TANRISEVEN'e içtenlikle teşekkür ederim.

Bana her zaman inanan ve güvenen Kimya Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Adem KILIÇ'a; yardımları ve ilgilerinden dolayı Prof. Dr. Bülent KESKİNLER, Yrd. Doç. Dr. Ali TÜRKAN ve Doç. Dr. Ayhan ÇELİK'e,

Proje desteği için TÜBİTAK'a, deneylerde kullanılan bazı maddeleri hediye eden, başta Iowa State Üniversitesinden Dr. John F. Robyt'e, Novozyme (Bagsvaerd, Danimarka) ve Roehm GmbH&co.KG (Darmstadt, Almanya) firmalarına teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince yaptıkları yardımlardan ve verdikleri moral destekten dolayı Biyokimya Bölümündeki çok değerli arkadaşlarıma sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman olduğu gibi doktora çalışmalarım boyunca sevgilerini, ilgilerini, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	I
SUMMARY	
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	
XIII	
1. GİRİŞ	1
1.1. Fonksiyonel Gıdalar; Probiyotik ve Prebiyotikler	
1.11. Probiyotikler	
1.12. Prebiyotikler	4
1.1.2.1. İzomaltooligosakkaritler (IMO)	5
1.1.2.2. Fruktooligosakkaritler (FOS)	8
1.1.2.3. Galaktooligosakkaritler (GOS)	9
1.1.2.4. Prebiyotiklerin Sağlığa Yararlı Etkileri	10
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	12
2.1. Dietilpirokarbonat (DEP)	12
2.2. Dekstransükraz ve Dekstran Sentez Mekanizması	
15 2.2.1. Dekstransükraz	15
2.2.2. Dekstransükrazın Etki Mekanizması	
16 2.2.2.1. Dekstran Sentezi	17
2.2.2.2. Oligosakkarit Sentezi (Akseptör Reaksiyonu)	23
2.3. Dekstransükraz'ın İmmobilizasyonu	25
2.4. Kalsiyum Alginat	26
2.5. İzomaltoz	28
3. MATERYAL VE METOD	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Enzim	30
3.1.2. Kimyasal Maddeler	30
3.1.3. Araç ve Gereçler	31
3.2. Metod	32

	3.2.1. Dekstransükraz Üretimi	32
	3.2.1.1. Dekstransükrazın Aktivite Tayini	33
	3.2.2. Kantitatif Protein Tayini	34
	3.2.3. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)-Densitometre ile Kantitatif Karbohidrat Tayini	
34	3.2.4. Dinitrosalisilik Asit (DNS) Metodu ile Kantitatif Karbonhidrat Tayini	
34	3.2.5. Birlikte-immobilize Dekstransükraz ve Dekstranaz Kullanarak İzomaltooligosakkarit Üretimi	35
	3.2.5.1. Dekstranazın İmmobilizasyonu	35
Birlikte-	3.2.5.2. Dekstransükraz ve Dekstranazın Alginat Kapsüllerde İmmobilizasyonu	35
Birlikte-	3.2.5.3. Dekstransükraz ve Dekstranazın Alginat Bead'lerde İmmobilizasyonu	36
Birlikte-	3.2.5.4. Dekstransükraz ve Dekstranazın Alginat Fiberlerde İmmobilizasyonu	36
36	3.2.5.5. Dekstransükrazın Alginat Fiberlerde İmmobilizasyonu	
37	3.2.5.6. Dekstranazın Aktivite Tayini	
37	3.2.5.7. Dekstransükrazın Aktivite Tayini	37
	3.2.5.8. Dekstransükraz-Dekstranaz Aktivite Tayini	
37	3.2.5.9. Dekstransükrazın Aktivitesine Dekstranazın Etkisi	
38	3.2.5.10. Alginat Matrislerden (kapsül, bead ve fiberler) Dekstranazın Kaçışı	38
	3.2.5.11. Alginat Kapsüllerde Dekstransükrazın Aktivitesine Nişastanın Etkisi	38
	3.2.5.12. Birlikte-immobilize Enzimlerin Kullanım ve Saklama Kararlılığı	39
	3.2.5.13. Birlikte-immobilize Enzimler Kullanarak İzomaltooligosakkarit Üretimi	
39	3.2.6. Birlikte-immobilize Dekstransükraz ve Dekstranaz Kullanarak İzomaltoz Üretimi	39
	3.2.6.1. Ekmek Mayasının (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) Alginat Bead'lerinde İmmobilizasyonu	40

	3.2.6.2. Birlikte-immobilize Dekstransükraz ve Dekstranaz ile İzomaltoz Eldesi	40
	3.2.7. Dietilpirokarbonat (DEP) ile Dekstransükrazın Modifikasyonu	
41	3.2.7.1. Dietilpirokarbonat (DEP) Stok Çözeltisinin Konsantrasyonunun Hesaplanması	
41	3.2.7.2. Dietilpirokarbonat (DEP) ile Serbest Dekstransükrazın Modifikasyonu	41
	3.2.7.3. DEP-Modifiye Dekstransükrazın Hidroksilamin ile Tekrar Aktivasyonu	42
	3.2.7.4. Dietilpirokarbonat (DEP) ile İmmobilize Dekstransükraz'ın Modifikasyonu	42
	3.2.7.4.1. İmmobilize Dekstransükraz Bead'lerinin Hazırlanması	
42	3.2.7.4.2. İmmobilize Dekstransükrazın DEP ile Modifikasyonu	
43	3.2.7.5. DEP-Modifiye İmmobilize Dekstransükraz Aktivite Tayini	43
	3.2.7.6. İmmobilize Dekstransükrazın DEP İle Modifikasyonuna Akseptörlerin (Maltoz, Sükroz, Glukoz, Laktoz ve Galaktoz) Etkisi	43
	3.2.7.7. İmmobilize Dekstransükraz'ın DEP İle Modifikasyonuna Akseptör Karışımlarının Etkisi	44
	3.2.7.8. Dietilpyrokarbonat (DEP)' ın Akseptör Ürünlerinin Oluşumuna Etkisi	44
	3.2.7.9. Dietilpyrokarbonat (DEP) İle İmmobilize Dekstransükraz Modifikasyonunda Modifikasyon Süresinin Akseptör Ürünlerinin Oluşumuna Etkisi	45
	3.2.8. Dekstransükraz İle Ekmek Mayasının (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) Birlikte-immobilizasyonu	45
	3.2.8.1. Dekstransükraz Aktivite Tayini	45
	3.2.8.2. Ekmek Mayası İnvertazın Aktivite Tayini	
45	3.2.8.3. Dekstransükraz ve Maya Aktivite Oranı Değişiminin Ürün Bileşimi Üzerine Etkisi	46
	3.2.8.4. DEP ile Modifiye Edilen Dekstransükraz ve Mayanın Birlikte-İmmobilizasyonu	46

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	47
4.1. Birlikte-İmmobilize Dekstransükraz ve Dekstranaz Kullanarak İzomaltooligosakkarit Üretimi	
47 4.1.1. Dekstransükraz ve Dekstranaz'ın Alginat Kapsül, Bead ve Fiberlerde İmmobilizasyonu	47
4.1.2. Dekstransükrazın Aktivitesine Dekstranazın Etkisi	
51 4.1.3. Birlikte-immobilize Dekstransükraz ve Dekstranaz ile Sükrozdan İzomaltooligosakkarit Üretimi	53
4.2. İzomaltoz Üretimi	
58 4.3. Dietilpirokarbonat (DEP) ile Dekstransükrazın Modifikasyonu	
69 4.3.1. Dietilpirokarbonat (DEP) ile Serbest Dekstransükrazın Modifikasyonu	69
4.3.2. DEP ile Modifiye Dekstransükraz'ın Hidroksilamin ile Tekrar Aktivasyonu	
72 4.3.3. Dietilpirokarbonat (DEP) ile İmmobilize Dekstransükrazın Modifikasyonu	73
4.3.4. Dekstransükraz'ın DEP İle Modifikasyonuna Akseptörlerin (Maltoz, Sükroz, Glukoz, Laktoz ve Galaktoz) Etkisi	
74 4.3.5. Dekstransükraz'ın DEP İle Modifikasyonuna Akseptör Karışımlarının Etkisi	75
4.3.6. Dietilpirokarbonat (DEP)' ın Akseptör Ürünlerinin Oluşumuna Etkisi	76
4.4. Dekstransükraz İle Ekmek Mayasının (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) Birlikte-immobilizasyonu	89
5. GENEL SONUÇ	93
KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	mikrogram
µl	mikrolitre
M	molarite
mg	miligram
ml	mililitre
w	kütle
v	hacim
mm	milimetre
nm	nanometre
°C	santigrad derece
rpm	bir dakikadaki devir sayısı
MW	molekül ağırlığı
pH	$-\log[H^+]$
IU	uluslar arası enzim birimi
DNS	dinitrosalisilik asit
PEG	polietilen glikol
NaOH	sodyum hidroksit
CaCl ₂	kalsiyum klorür
Na	sodyum
KH ₂ PO ₄	potasyum dihidrojen fosfat
DEP	dietilpirokarbonat
TLC	ince tabaka kromatografisi
IM	izomaltoz
IM3	izomaltotrioz
IMO	izomaltooligosakkarit
FOS	fruktooligosakkarit
GOS	galaktooligosakkarit
Fru	fruktoz
Glu	gluktoz
Suc	sükroz
Leu	lükroz

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Dekstransükraz ile sükrozdan dekstran sentezi ve dekstranın dekstranaz ile hidrolizi	
1.2. Fruktooligosakkaritlerin molekül yapısı	8
1.3. Galaktooligosakkaritlerin molekül yapısı	9
2.1. Dietilpirokarbonat (DEP) ile histidinin reaksiyonu ve hidroksilamin ile reaksiyonun geri dönüşümü	13
2.2 Aşırı DEP varlığına disubstitue histidil gruplarının oluşumu	
2.3. İstenilen molekül ağırlıklı dekstran eldesi	18
2.4. Dekstran biyosentez mekanizması	20
2.5. Dekstran sentezi ve akseptör reaksiyonunun mekanizması	
2.6. Aktif bölgedeki imidazol grubunun etki mekanizması ve α (1,6)-glukozidik bağın oluşumu	22
2.7. Alginat'ın yapısı ve kalsiyum iyonu ile etkileşimi	27
2.8. İzomaltozun molekül yapısı	28
4.1. Alginat fiber, kapsül ve beadlerde birlikte-immobilize dekstransükraz-dekstranaz	48
4.2. Birlikte-immobilize dekstransükraz ve Eupergit C-immobilize dekstranazın kullanım kararlılığı	49
4.3. Birlikte-immobilize dekstransükraz ve Eupergit C-immobilize dekstranazın saklama kararlılığı	49
4.4. Alginat kapsüllerde ko-immobilize serbest dekstransükraz ve serbest dekstranazın kullanım kararlılığı	
4.5. Alginat kapsüllerde birlikte-immobilize dekstransükraz ve Eupergit C-immobilize dekstranazın farklı konsantrasyonlarda sükroz { %5 (w/v) [A], %10 (w/v) [B], %20 (w/v) [C], %40 (w/v) [D]} ile reaksiyonunda oluşan ürünlerin zamana bağlı değişimi	55
4.6. Üretilen şeker karışımlarının kompozisyonu	
4.7. (A1, B1, C1) ve (A2, B2, C2) şeker karışımlarının TLC analizi	57
4.8. Alginat kapsüllerde birlikte-immobilize dekstransükraz ve Eupergit C-immobilize dekstranazın sükroz (150mM) ve farklı konsantrasyonlarda glukoz {150mM [A], 300mM [B], 600mM [C]} ile reaksiyonunda oluşan	

ürünlerin zamana bağlı değişimi	60
4.9. Alginat kapsüllerde birlikte-immobilize dekstransükraz ve Eupergit C-immobilize dekstranazın sükroz (300mM) ve farklı konsantrasyonlarda glukoz {150mM [A], 300mM [B], 600mM [C]} ile reaksiyonunda oluşan ürünlerin zamana bağlı değişimi	62
4.10. Alginat kapsüllerde birlikte-immobilize dekstransükraz ve Eupergit C-immobilize dekstranazın sükroz (600mM) ve farklı konsantrasyonlarda glukoz {150mM [A], 300mM [B], 600mM [C]} ile reaksiyonunda oluşan ürünlerin zamana bağlı değişimi	64
4.11. İzomaltoz eldesi basamaklarının TLC analizi	66
4.12. Farklı konsantrasyonlarda DEP ile dekstransükrazın inaktivasyonu	
4.13. DEP ile dekstransükrazın inaktivasyon kinetiği	71
4.14. DEP modifikasyonunda zamana bağlı absorban değişimi	
4.15. İmmobilize dekstransükrazın DEP ile modifikasyonu	74
4.16. Dekstransükrazın modifikasyonunda karbohidratların koruma etkisi	
4.17. Dekstransükrazın modifikasyonunda karbohidrat karışımlarının etkisi	
4.18. DEP modifiye enzimlerin akseptör reaksiyonunda zamana karşı-kalan sükroz	77
4.19. DEP modifikasyonunun TLC analizi	78
4.20. Farklı sürelerde DEP ile modifiye enzimlerin akseptör reaksiyonunda zamana karşı-kalan sükroz	79
4.21. Farklı sürelerde DEP modifikasyonunun TLC analizi	80
4.22. DEP ile modifikasyon sonunda oluşan farklı tiplerde dekstransükrazlar	
4.23. Dekstransükrazın aktif bölgesi	86
4.24. Dekstransükrazın reaksiyon mekanizmasında aspartik asit ve histidinlerin rolü	87
4.25. Birlikte-immobilize dekstransükraz ve mayanın sükroz ile reaksiyonunda oluşan ürün bileşimi	

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Probiyotik ürünlerde kullanılan mikroorganizmalar	
2.1. Dekstransükrazın immobilizasyon metodları	
35. Deneylerde kullanılan araç ve gereçler	
32. Kullanılan besi ortamlarının kimyasal içerikleri	33
4.1. Modifiye dekstransükrazın hidroksilamin ile tekrar aktivasyonu	
42. Dekstransükraz/Maya (DS/M) Aktive Oranı Değişiminin Ürün Kompozisyonuna Etkisi	91

1. GİRİŞ

1.1. Fonksiyonel Gıdalar; Probiyotik ve Prebiyotikler

Fonksiyonel gıdalar, geleneksel besinler gibi normal diyetin bir parçası olarak tüketilen temel besleyici özelliklerinin ötesinde, kronik hastalık risklerini indirgeme özelliği ve fizyolojik faydaları olan gıdalardır [Neeser and German, 2004].

Son yıllarda fonksiyonel gıdalara olan talebin artmasıyla birlikte süt ve süt ürünleri, bebek mamaları, şekerlemeler, yoğurtlar, enerji içecekleri ve tahıl ürünleri gibi birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır. Bu gıdaların etkileri ve faydaları içeriklerine göre farklı yollarla sağlanır; vitamin ve minerallerle güçlendirme, kolesterol düşürücüler, antioksidanlar, bitki kaynaklılar; fitokimyasallar, probiyotikler, prebiyotikler ve sinbiyotikler [Gibson and Williams, 2000].

Vitamin ve minerallerle canlandırılan ürünlere örnekler; kalsiyum ve folik asit ile zenginleştirilen meyve suları ve süt ürünleridir. Hamilelik döneminde folik asit ve kalsiyum alımının öneminin anlaşılmasından sonra, özellikle kalsiyumun ileri yaşlarda kemik yoğunluğunun korunması açısından önemli olduğu araştırmalarla ortaya çıktıktan sonra kalsiyum açısından zengin ek gıdalara ilgi artmıştır. Özellikle gelişmiş ülkelerde bu tür fonksiyonel gıdalara talep çok fazladır [Scholz-Ahrens et al, 2001].

Birçok gıda içeriği kalp hastalıklarının en önemli nedenlerinden biri olduğu düşünülen kolesterolün absorpsiyonunu engellemek amacıyla katkı maddesi olarak kullanılmaktadır [Gibson and Williams, 2000]. Bunlar omega-3 yağ asitleri ve bitki sterolleridir. Bu alanda kullanılan ürünlere, bitki sterol yağ asit esterleri ve omega-3 yağ asitleri ile zenginleştirilen margarinler örnek verilebilir.

Kanser ve diğer mutasyonların, aerobik metabolizmanın yan etkisi olarak üretilen serbest radikallerle DNA da meydana gelen oksidatif yıkımın sonucu olduğu

bilinmektedir. Bitki ve hayvan hücreleri bu etkilere antioksidan adı verilen bileşiklerle karşı koyarlar ve antioksidanlar vücudun koruma kalkanıdır. Antioksidanların içinde E vitamini, karoten, C vitamini ve fitokimyasallar yer alır. Fitokimyasalların kanser, osteoporoz ve kalp hastalıkları gibi kronik hastalık risklerini indirgeme özellikleri vardır. Bunlar; glukosinolatlar ve flavonoidlere benzer fenolik bileşiklerdir ve oldukça etkili antioksidanlardır. Bu bileşikler bitki kaynaklı olup, bitkilere renk, koku, aroma ve bazen de toksik özellikler katan bileşiklerdir. Son yıllarda bitki kaynaklı bir çok besin (ginkgo, ginseng) fonksiyonel gıda pazarında fiziksel ve zihinsel aktiviteyi artırmak amaçlı kullanılmaktadır. Enerji içecekleri, sporcu besinleri ve içecekleri de bu pazarda yerini almıştır. Bunlar genellikle kreatin, kafein, karnitin ve triptofan içermektedir.

Probiyotikler, bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek faydalı etkiler sağlayan, canlı mikrobiyal besin maddeleri olarak tanımlanırlar [Salminen et al, 1999]. Kolesterolü düşürme, kanser risklerini azaltma, bağışıklık sistemine etkiler gibi sağlığa faydalı etkileri vardır ve dünyada fonksiyonel gıda ürünlerinde en çok kullanılan katkılardır. Son yıllarda, bağırsaklarda faydalı bakterilerin artırılmasında etkili olan prebiyotiklerin geliştirilmesiyle, probiyotik ve prebiyotiklerin birlikte kullanıldığı sinbiyotiklerin üretilmesiyle fonksiyonel gıda pazarı canlanmıştır. Mide-bağırsak bölgesinin insan sağlığı açısından öneminin artmasıyla birlikte şu an fonksiyonel gıda biliminde en çok çalışmanın yapıldığı alandır.

1.1.1. Probiyotikler

20. yüzyılın başlarında bazı spesifik bakterilerin sağlığa faydalı oldukları düşünülmeye başladı. Nobel ödülü sahibi ve Pasteur Enstitüsü müdürü Elie Metchnikoff, yüzyılın başında yoğurttaki bakterilerin faydalı etkilerinin olduğunu önerdi. 1907 de yayınlanan “The Prolongation of Life” adlı kitabında, bakteri (*Lactobacillus bulgaricus*) içeren fermente yoğurtların tüketilmesinin insan sağlığında rol oynadığını yazdı [Metchnikoff, 1907]. Bulgar köylülerinin uzun yaşamlarının nedenini *Lactobacillus* türleri içeren yoğurtları tüketmelerine bağladı. Sonra H.Tisser’in anne sütüyle beslenen küçük çocuklarda bifidobakterileri

keşfetmesi, sağlığın korunmasında rol oynayan bakteri fikrinin kurulmasında anahtar bir rol oynadı [Tissier, 1906]. Fakat yoğurt bakterisinin bağırsakta fazla yaşayabilmesine, kolonize olmasına ve bakteriyel terapi fikrine şüpheyle bakılıyordu. Delillerin artmasıyla bilim adamları ve medikal uzmanlar arasında bu bakterilere talep artmaya başladı [Shortt, 1999].

Probiyotikler, insan sağlığına etkilerinin anlaşılmasına bağlı olarak birkaç yolla tanımlandılar. Probiyotik, Yunanca'dan türetilmiş “for life” anlamına gelen bir kelimedir. 1965 yılında D.M. Lilly ve R.H. Stillwell probiyotikleri, bir diğerinin gelişmesini uyaran mikroorganizmalar, antibiyotiklerin karşıtı olarak tanımladılar [Lilly and Stillwell, 1965]. Daha sonra R.B. Parker 1974 yılında probiyotikleri, bağırsak dengesine katkıda bulunan organizmalar olarak tanımladı. Şimdi en çok kullanılan tanımı 1989 yılında R. Fuller yaptı: Probiyotikler, konak canlıya faydalı etkileri olan, canlının bağırsak mikrobiyal dengesini düzenleyen, canlı mikrobiyal besin ilaveleridir [Fuller,1989].

Probiyotiklerin kullanıldıkları yiyeceklerde sağlıklı imajı oluşturmaları, ticari olarak da tüketimlerinin artmasına yol açmıştır. Dünya çapında pek çok ülkede, ülkemiz de dahil probiyotik içeren sütler ve probiyotiklerle fermente edilen süt ürünleri üretilmektedir [Salminen, 1999].

Tablo 1.1 Probiyotik ürünlerde kullanılan mikroorganizmalar

Probiyotik Ürünlerde Kullanılan Mikroorganizmalar		
Lactobacillus Türleri	Bifidobakteri Türleri	Diğerleri
<i>L.acidophilus</i>	<i>B.animalis</i>	<i>E.faecium</i>
<i>L.casei</i>	<i>B.breve</i>	<i>E.faecalis</i>
<i>L.salvarius</i>	<i>B.infantis</i>	<i>S.bolulardii</i>
<i>L.johnsonii</i>	<i>B.lactis</i>	
<i>L.plantarum</i>	<i>B.bifidum</i>	
<i>L.crispatus</i>	<i>B.langum</i>	

Probiyotikler, kronik ülser, laktozu sindiremeyen kişilerde sindirim güçlüğü, kabızlık, ishal gibi hastalıkları engellemede ya da hafifletmede, antibiyotiklerle bozulan bağırsak florasının dengesini yeniden kurmak için kullanılır [Adawi et al, 2001], [Kirpich et al, 2008], [Fukushima et al, 1998]. Kolesterolü düşürme, *H.pylori*'nin etkisiz hale getirilmesi, hiper tansiyonu düzenleme etkileri insanlar üzerinde pozitif sonuçlar vermesine rağmen, daha ileri araştırmalar yapılması gereken konulardır [German et al, 1999].

1.1.2. Prebiyotikler

Bifidobakteri, lactobacillus gibi bağırsaklarda yaşayan bakterileri uyarak insan sağlığına olumlu etkileri olan, sindirilemeyen fakat fermente olabilen karbonhidratlar prebiyotikler olarak adlandırılırlar [Gibson and Roberfroid, 1995]. Prebiyotiklerin özellikleri şunlardır:

- Sindirim sistemi tarafından hidroliz edilemezler.
- Bağırsaklarda bulunan faydalı bakteriler tarafında fermente edilirler.
- *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ve *Eubacterium* gibi faydalı bakterileri artırırken *Clostridium* ve *Bacteroides* gibi zararlı bakterileri azaltarak bağırsak florasını düzenlemek.
- Konak canlının sağlığı için faydalı etkileri artırmak.

Prebiyotik etkileri olan karbonhidratlar, birçok farklı çeşit oligosakkaritlerdir ve glukozidik bağlarla bağlı 2-10 monosakkarit biriminden oluşan sakkarit polimerleridir. Bunlar; izomaltooligosakkaritler (IMO), fruktooligosakkaritler (FOS) ve galaktooligosakkaritler (GOS) dir. En önemli özellikleri sindirim enzimlerine karşı dayanıklı olmaları ve konak tarafından direkt absorbe edilememeleridir. Bu yüzden düşük kalorilidirler. Üretim yöntemleri, bitki kaynaklarından ekstrakte edilme, polisakkaritlerin enzimatik ya da kimyasal hidrolizi veya enzimatik sentez şeklinde olabilir [Gibson and Roberfroid, 2008].

1.1.2.1. İzomaltooligosakkaritler (IMO)

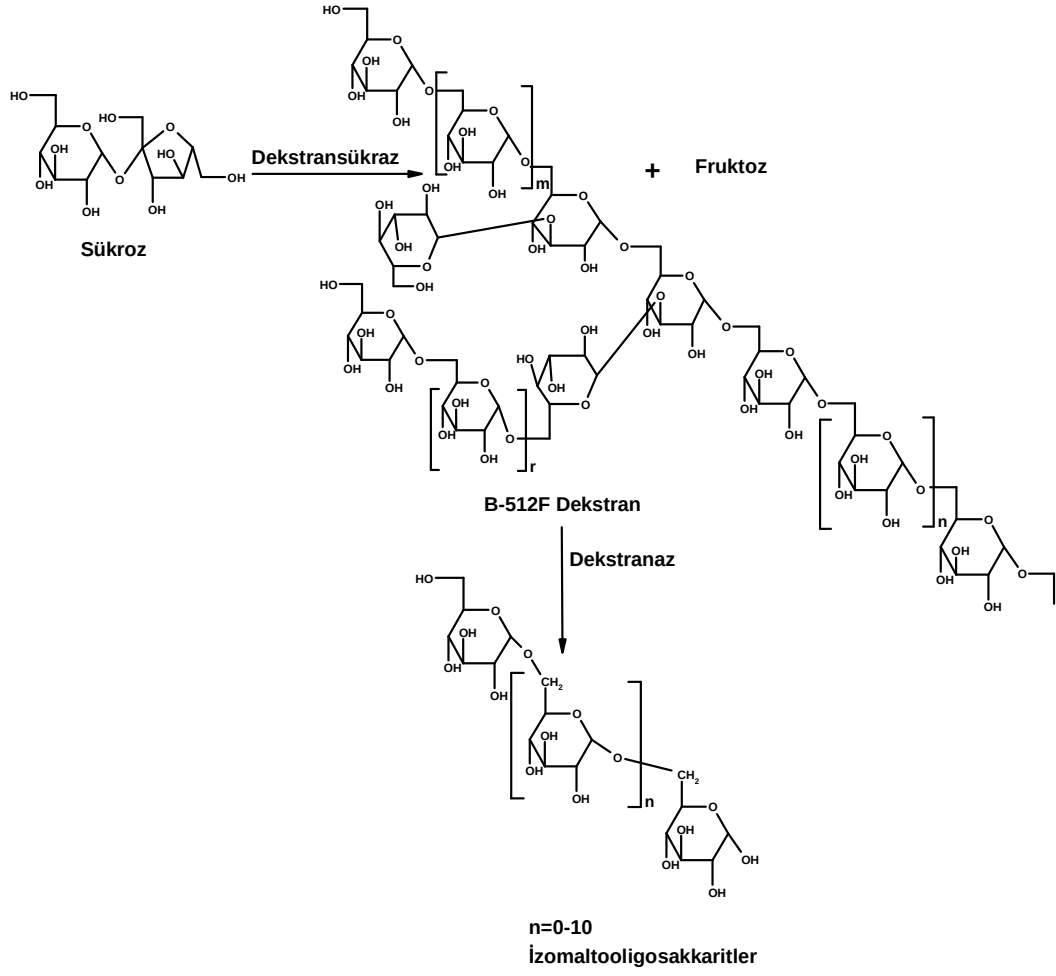
İzomaltooligosakkaritler (IMO), $\alpha(1-6)$ glukozidik bağlarla bağlı glukoz monomerlerinden oluşan prebiyotik etkileri olan oligosakkaritlerdir. İzomaltooligosakkaritler sükroz, maltoz, nişasta ve dekstran gibi karbohidratlar kullanılarak farklı metodlarla üretilirler. Nişasta, *Bacillus subtilis* α -amilaz ve neopullulanaz ile muamele edilerek glukoz, maltoz, panoz ve IMO karışımı elde edilir [Krike et al, 1993]. Dekstran, asit veya dekstranaz kullanılarak izomaltooligosakkaritlere dönüştürülür. Sükroz ile birlikte akseptör olarak glukoz substrat olarak kullanıldığında izomaltooligosakkaritler elde edilir [Tanrıseven and Doğan, 2002]. Sükrozdan oligosakkaritlerin üretimi, dekstransükraz ve dekstranazın birlikte kullanımı ile de gerçekleştirilmektedir. Dekstransükrazın glikozil transferaz aktivitesi ile dekstran molekülleri oluşurken, dekstranaz enziminin hidroliz aktivitesiyle de dekstran molekülleri hidroliz olur [Goulas, 2004] (Şekil 1.1).

İzomaltooligosakkaritler, bifidobakteriler ve *Bacteroides fragilis* tarafından fermente edilir, fakat *E.coli* ve diğer bakteri popülasyonları tarafından fermente edilemezler. Laktik asit bakterilerini de etkileyen oldukça etkili prebiyotiklerdir [Olano et al, 2000]. İzomaltooligosakkaritlerin izomaltotriozdan büyük olanları kalınbağırsakta fermente edilirler, izomaltoz ve izomaltotrioz ise ince bağırsakta kısmen sindirilir.

İzomaltooligosakkaritlerin prebiyotik etkilerinin yanında, dekstran-antibody çökme reaksiyonlarına engel olma özelliği de vardır. Dekstran-antibody etkileşimi, ağır kan kayıplarında kan hacmini eski haline getirmede kullanılan klinik dekstranın neden olduğu bir durumdur. IMO çözeltisi bazı insanlarda yan etkilere sebep olan dekstran-antibody çökme reaksiyonunu engeller [Ingelman et al, 1980].

İzomaltooligosakkaritlerin önemli bir özelliği de diş çürümesini önlemektir. Diş çürümesinin en büyük nedenlerinden biri, ağız boşluğunda bulunan çok sayıdaki bakterilerden biri olan *Streptococcus mutans* bakterileridir. Bu bakterilerin ürettiği

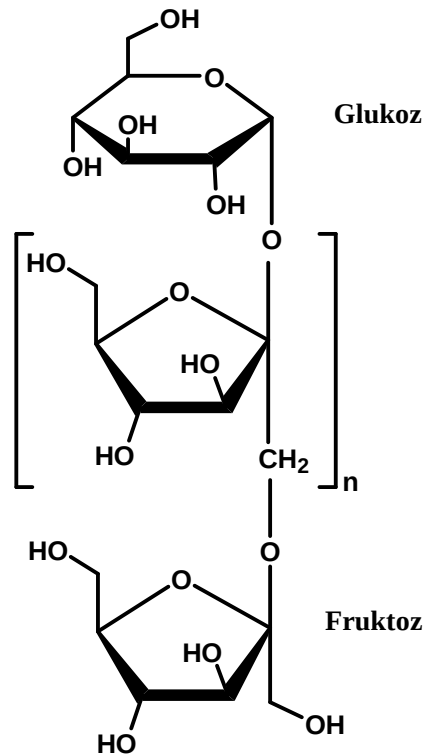
dekstransükraz enzimi, süktroz ile reaksiyona girerek suda çözünmeyen dekstran polimerini meydana getirir. Bakteri üretilen polimerle dişe yapışır ve diş plağını oluşturur. Diş plağı, bakterileri diş yüzeyinde tutar ve aynı zamanda fermentasyon için anaerobik bir ortam sağlar. Süktroz ve fruktoz anaerobik fermentasyonla laktik asite çevrilir. Diş minesini için kritik pH değeri (pH 5.0) altında diş çürümesi başlar [Taubman, 2006]. Süktroza IMO ilave edildiğinde, süktrozdan dekstran polimerinin sentezi engellenir ve diş çürümesi önlenir [Miyake, 1981].



Şekil 1.1 Dekstransükraz ile sükrozdan dekstran sentezi ve dekstranın dekstranaz ile hidrolizi.

1.1.2.2. Fruktooligosakkaritler (FOS)

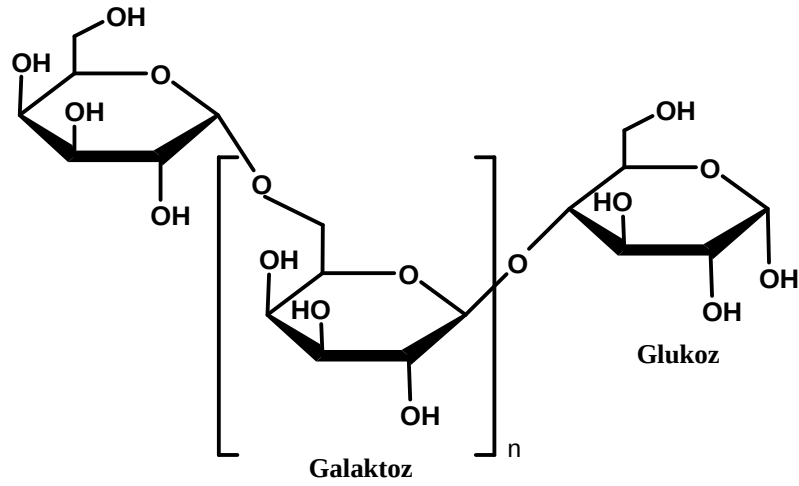
Fruktooligosakkaritler farklı polimerizasyon derecelerine sahip β -D-fruktanlardır. Fruktooligosakkaritler, buğday, soğan, sarımsak ve muzda daha yoğun olmak üzere birçok sebze, meyve ve tahıllarda bulunur. FOS'lar inülinin endo-inülinaz enzimi tarafından hidrolizi ile elde edilir. İnülin $\text{Glu } \alpha(1-2)[\beta\text{-Fru } (1-2)]_n$ $n > 10$ yapısında, fruktoz birimlerinden oluşan ve kudüs enginarında yoğun olarak bulunan bir polimerdir [Gibson et al, 1995]. Ayrıca *Aspergillus sp.* ve *Aureobasidium sp.* gibi bakterilerden elde edilen fruktoziltransferazlar ile sükrozdan FOS' ler üretilir. Fruktoziltransferazlar, sükrozdaki fruktoza 1-3 adet fruktoz transfer ederek FOS sentezini gerçekleştirir [Yun, 1996].



Şekil 1.2 Fruktooligosakkaritlerin molekül yapısı ($n=1-3$).

1.1.2.3. Galaktooligosakkaritler (GOS)

Galaktooligosakkaritler galaktoz içeren $\text{Glu } 1-4[\beta\text{-Gal } 1-6]_n$ $n=1-4$ yapısında bulunan oligosakkaritlerdir. β -galaktosidaz enziminin trans-galaktosidaz aktivitesiyle laktozdan üretilir. Bitki kaynaklarından (baklagiller, soya fasulyesi) ekstrakte edilerek de elde edilirler [Bouhnik et al, 1997].



Şekil 1.3 Galaktooligosakkaritlerin molekül yapısı ($n=1-4$).

1.1.2.4. Prebiyotiklerin Sağlığa Yararlı Etkileri

Prebiyotikler, insan bağırsağında yaşayan faydalı bakterilerin büyümesini ve aktivitesini uyaran, sindirim sistemi enzimleri tarafında sindirilemeyen fakat bakteriler tarafından fermente edilen oligosakkaritlerdir. Bağırsaklardaki zararlı bakteriler kolon kanseri için risk faktörüdürler. Çünkü bazı bakteriyal enzimler, bağırsakta aktif kanserojen maddelere dönüşen prekanserojen maddeler üretirler. Bağırsak mikroflorasının metabolik aktivitesi ya da kompozisyonu prebiyotiklerle değiştirilerek kolon kanseri riski azaltılabilir. Prebiyotiklerin olumlu etki mekanizması karsinojenlerin aktivitesini detoksifikasyon ve metabolik aktivasyon yoluyla değiştirmek ya da butirat gibi kısa zincirli yağ asitinin üretilmesini uyarmak şeklinde olabilir [Lim et al, 2005], [Campbell et al, 1997].

Bağırsak mikrobiyal dengesini düzenleyerek faydalı etkileri olan canlı mikrobiyal besin içeriği olarak kullanılan probiyotiklerin aksine prebiyotikler mikrobiyal büyümeyi ve aktiviteyi artıran, bakteri hücrelerini direkt etkileyen gıdalardır. Bu yüzden prebiyotikler, probiyotikleri kapsayan daha geniş sahası olan gıdalardır. Ayrıca probiyotikler, bağırsak mikroçevresinin bileşiminde geçici değişimler yapar, probiyotik verilmesi bırakıldığında değişimler devam etmez [Alender et al, 1999].

Bakteriyel büyüme, mide-bağırsak bölgesi enzimlerinden kaçan polisakkaritler (selüloz, hemiselüloz), bazı oligosakkaritler, absorbe edilemeyen şekerler ve şeker alkolleri gıda içeriklerinin anaerobik fermentasyonu ile desteklenir. İnsan sindirim sistemi enzimleri bu besinleri metabolize edemezken, sakkarolitik bakteri türleri bunları kısa zincirli yağ asitlerine (propionat, asetat ve butirat; daha az oranda format, valerat ve kaprolat) dönüştürebilirler. Bakteriyel metabolik aktivite ve sakkarolitik fermentasyonun hepsi kalın bağırsakta meydana gelir ve kısa zincirli yağ asitlerinin üretimi sonucu bağırsak pH'ı asidik aralıkta (pH 5-6) kalır. Prebiyotikler bağırsak bakterileri için fermente edilebilen karbohidrat kaynaklarıdır. Bu nedenle kısa zincirli yağ asitlerinin üretimiyle ve toksigenik bakteri reaksiyonlarının

baskılanmasıyla kolon kanseri risklerinin indirgenmesinde oldukça önemli etki sağlar [Reddy, 1998].

Prebiyotikler, bağırsak pH'ını düşürerek kalsiyum, magnezyum ve demir iyonları gibi minerallerin çözünürlüğünü ve emilimini artırır. Divalent katyonlara bağlanan bazı maddelerin (myoinositol hekzafosfat) fermentasyonu yoluyla bu etki görülür. Ayrıca kalsiyum-kısa zincirli yağ asitleri etkileşimi de mineral emilimini artırır. Araştırmalar uzun süreli prebiyotik tüketimi ve osteoporoz riskinin azalması, kemik yoğunluğunun artması arasındaki bağlantıyı göstermektedir. Asidik bağırsak mikroçevresi prokarsinogenik enzim (7α -hidroksilaz ve nitroredüktaz) aktivitesinin azalmasına da neden olur [Lamprecht, 2003]. Birçok çalışma prebiyotiklerin bu enzimlerin ve metabolitlerin seviyesini düşürdüğünü göstermektedir.

Prebiyotikler, bağırsak floralarında *Bifidobacterium sp.* sayıları azalmış, yerine zararlı bakterilerin geçtiği yaşlı bireylerde uygulandığında kabızlık gibi bağırsak sorunlarının giderilmesinde oldukça etkilidir. Bebeklerde probiyotik sayısını artırdığından dolayı gıda alerjilerini önlemede etkilidir. Prebiyotiklerin bifidogenik etkileri en önemli özellikleridir. Probiyotik *Bifidobacterium sp.* ile birlikte prebiyotikler kullanıldığında fizyolojik ve sağlık etkileri görülmektedir. Prebiyotikler bifidobakterilerin sayılarının artmasını sağlar ve böylece bifidobakterilerin sağlığa faydalı etkilerinin ortaya çıkmasında önemlidirler. Bu etkiler şunlardır:

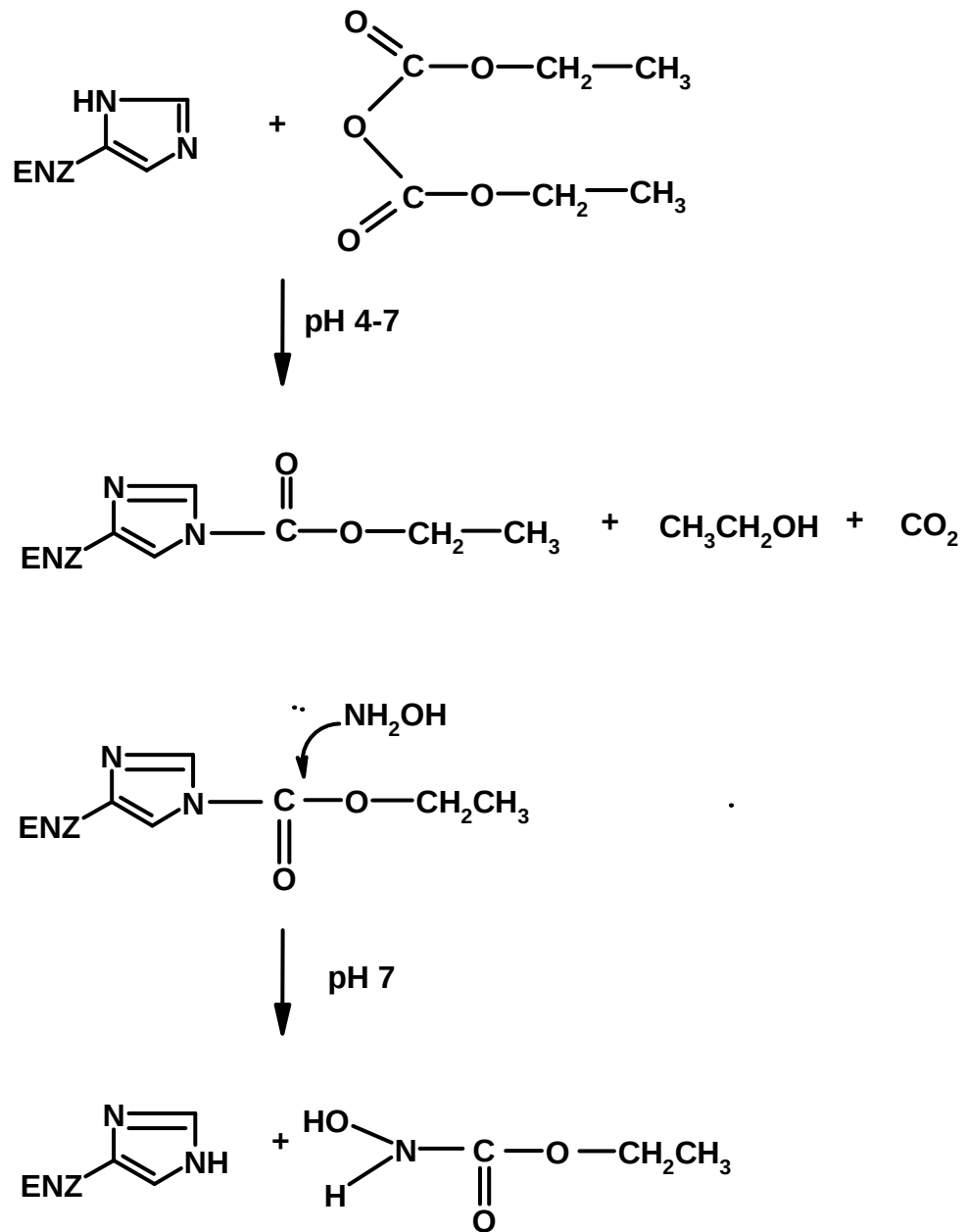
Bifidobakteriler, B₁, riboflavin, B₆ ve K vitaminlerini insan kalın bağırsağında üretirler. Bu vitaminler vücut tarafından yavaşça absorbe edilirler. Bifidobakteriler tarafından üretilen asitler (asetik ve laktik asit) ortamın pH'ını düşürerek zararlı bakterilerin büyümesini önler. Bifidobakterilerin ve onların çoğalmasını sağlayan oligosakkaritlerin kalsiyum absorpsiyonu ve kemik kaybının önlenmesinde etkili oldukları bilinmektedir. Kalsiyum absorpsiyonu, bifidobakteriler tarafından oluşturulan uçucu yağ asitlerinin kalsiyumun çözünürlüğünü artırmasıyla açıklanmaktadır. Farelere bifidobakteri verildiğinde, serum kolesterolünün düştüğü gözlenmiştir. Bifidobakteriler'in serum kolesterol seviyesini nasıl düşürdüğü

bilinmemektedir [Ishibashi and Shimamura, 1993]. Ayrıca bifidobakterilerin bağışıklık sistemini pozitif yönde etkilediği görülmüştür. Hayvan modelleri ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda bu bakterilerin immunoglobulin ve cytokin seviyesini artırdığı gözlenmiştir [Fukushima et al, 1998].

2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

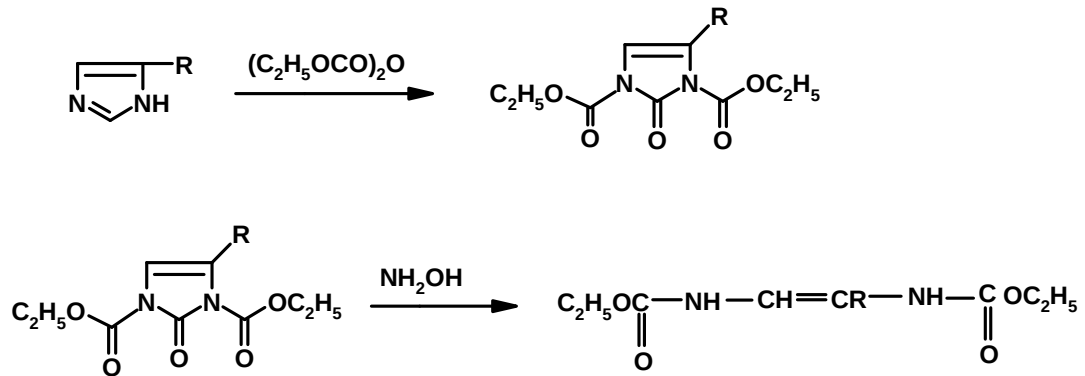
2.1. Dietilpirokarbonat (DEP)

Dietilpirokarbonat proteinlerde histidin gruplarının modifikasyonunda kullanılmaktadır. Reaksiyon sonunda N-karboksihistidin türevi oluşmaktadır ve bu reaksiyon 230-250nm de maksimum absorbans olarak spektrofotometrik olarak izlenebilir (Şekil 2.1). Dietilpirokarbonat sulu çözeltilerinde karbondioksit ve etanole bozunduğu için, DEP çözeltileri etanol ile hazırlanır ve stok çözeltilerin konsantrasyonlarının hesaplanması gerekir. Stok çözeltide DEP konsantrasyonu, 50 mM pH 6.0 asetat tampon çözeltide hazırlanan 10 mM N-asetil-L-histidin çözeltisine küçük miktarlarda DEP ilavesiyle oluşan karbetoksi türevinin 240nm de absorbans artışıyla belirlenir ($\epsilon_{240}=3200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [Fu and Robyt, 1988].



Şekil 2.1 Dietilpirokarbonat (DEP) ile histidinin reaksiyonu ve hidroksilamin ile reaksiyonun geri dönüşümü

Dietilpirokarbonat (DEP), birçok enzimin modifiye edilmesinde yaygın olarak kullanılmıştır [Fu and Robyt, 1988], [Beau et al, 1971], [Pelton and Ganzhorn, 1992]. Bu modifikasyon proteinlerdeki amino asit yan zincirlerinin (özellikle histidinin imidazol grubu) dietilpirokarbonat ile karbetoksilasyonu temeline dayanır. Uygun pH değerlerinde DEP, lizin amino asidinin ϵ -amino grubu, sistenin sülfidril grubu ve tirozinin hidroksil grubu gibi diğer amino asit yan-zincirleriyle de reaksiyon ($>\text{pH } 7$) verebilir. Fakat pH 7 ve daha düşük pH larda DEP histidin amino asidinin imidazol grubuyla spesifik olarak reaksiyon verir. Reaksiyon sonunda N-karboetoksihistidin türevi oluşur ve bu reaksiyon 240 nm de maksimum absorbans artışıyla spektrofotometrik olarak izlenebilmektedir. Aşırı miktarda DEP varlığında imidazol halkasındaki her iki azot atomunun modifikasyonu ile disubstitue olmuş histidil grupları oluşur (Şekil 2.2). Bu gruplar da hidroksilamin ile reaksiyon verir; imidazol halkası açılır, fakat modifikasyon geri döndürülemez.



Şekil 2.2 Aşırı DEP varlığında disubstitue histidil gruplarının oluşumu

Dietilpirokarbonat ile histidinin modifikasyonu hidroksilamin ile inkübe edilerek geri çevrilebilir. Tirozin, lizin ya da sülfidril yan zincirlerinin dietilpirokarbonat ile etoksiformilasyonu pH 6 da minimum düzeyde olmasına rağmen nötral hidroksilamin ile reaksiyon geri döndürülemediği için, histidin modifikasyonunun hidroksilamin ile geri dönüşümü önemlidir.

2.2.Dekstransükraz ve Dekstran Sentez Mekanizması

2.2.1. Dekstransükraz

İlk olarak 1941 yılında Henre tarafından, sükroz kullanılarak hücreden bağımsız olarak dekstranın sentezlendiği yayınlandı. Bundan kısa bir süre sonra sentezden sorumlu enzim dekstransükraz (EC 2.4.1.5) olarak adlandırıldı. *Leuconostoc mesenteroides* ve *Streptococcus sp.* soylarının dekstransükraz ürettikleri bulundu [Naessens et al, 2005]. Dekstransükraz, sükrozdan farklı yapılarda dekstranlar sentezleyen enzim ailesinin genel ismidir. Dekstransükraz, sükrozdan fruktoz açığa çıkarken, D-glukopiranozil birimlerinin dekstrana transferini katalizleyen ekstraselüler bir glukoziltransferazdır. Dekstranlar, *L.mesenteroides* ya da *Streptococcus sp.* soyları tarafından üretilen dekstransükraza bağlı olarak, ana zincirde α (1,6) glukozidik bağlar ve üç farklı dallanma noktasında [α (1,2), α (1,3) ya da α (1,4)] yan zincirler içeren glukanlardır. Jeanes ve arkadaşları 1954 de *L.mesenteroides* ve *Streptococcus sp.* lerin 96 soyu tarafından sentezlenen birçok farklı çeşit dekstranın sentezlendiğini yayınladılar. Streptococci'ler anaerob iken *L.mesenteroides* soyları ise koşula bağlı olarak anaerobturlar ve heriki tip bakteri de gram-pozitif bakterilerdir. Bu iki tür arasındaki diğer bir fark ise, *L.mesenteroides* soylarında glukansükrazların oluşumunun indüklenmesi için kültür ortamında sükroz bulunması gerekirken *streptococcus sp.* lerde sükroz gerekmez, yani konstitütdir [Robyt et al, 2008]. Kim ve Robyt, bir mutajen olan etil metansülfonat kullanarak birkaç tane *L.mesenteroides* soyunda (B-512 FMC, B-742 CA, B-1142C, B-1299C, B-1355CA ve B-1355CB) mutasyon gerçekleştirdiler ve kültür ortamında sükroz olmadan da dekstransükraz üretebildiklerini yayınladılar [Kim and Robyt, 1994].

Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512 F dekstransükraz ticari olarak dekstran üretiminde en fazla kullanılan enzimdir. Bu enzim kültür sıvısında oldukça büyük miktarlarda üretilir. Bu özelliğiyle diğer *L.mesenteroides* türleri ve dış plağına neden olan Streptococci türlerinin ürettiği dekstransükrazdan farklıdır. Bu diğer türler çözünebilir ve çözünemeyen dekstranın her ikisini de üretirler ve ayrıca oldukça fazla miktarda invertaz ve levansükraz gibi istenmeye kontamine enzimleri de üretirler. Bu sebeplerden dolayı *L.mesenteroides* NRRL B-512 F, dekstransükraz ile

dekstranın biyosentez mekanizması çalışmalarında tercih edilen önemli bir türdür [Naessens et al, 2005].

L.mesenteroides NRRL B-512 F dekstransükrazın saflaştırılması ve karakterizasyonu konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Enzimin agregasyon ile oluşan çoklu moleküler formlarının olduğu ve saflaştırılmasında zorluklara neden olan polisakkarit ürünüyle birleştiği gösterilmiştir [Miller et al, 1986]. Enzim, 185 kDa molekül ağırlığına, pI 4.1 ve süktroz için Michelis-Menten sabiti (K_m) ~12-16 mM değerlerine sahiptir. Optimum pH 5.0-5.5 ve optimum sıcaklık 30°C dir ve enzim üretimi ve aktivitesi için düşük miktarda kalsiyum gereklidir [Kim and Robyt, 1994].

2.2.2. Dekstransükrazın Etki Mekanizması

Yaklaşık 30 kadar glukoziltransferaz geninin dizi analizi yapılmış, katalitik bölgeleri tanımlanmış ve glukozid-hidrolaz 13 ailesinden (α -amilaz ailesi) enzimlerle karşılaştırılmıştır [Plou et al, 2002]. Her iki enzim ailesinde de mekanik ve yapısal özellikleri açısından benzerlikler vardır. Bu sınıflandırmaya göre dekstransükraz, glukozid-hidrolaz (GH) 70 (EC. 2.4.1.5) ailesine mensuptur.

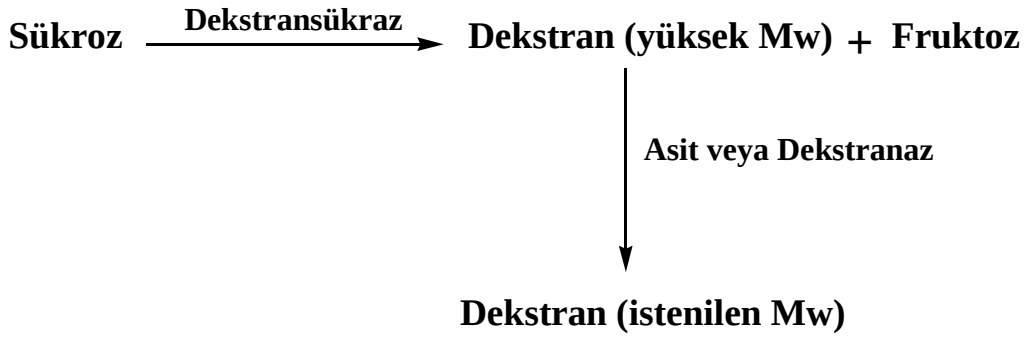
GH 70 ailesinden olan glukansükrazlar, laktik asit bakterilerinden *Leuconostoc*, *Streptococcus* ya da *Lactobacillus*'lar tarafından üretilen ekstraselüler enzimlerdir. Süktrozdan yüksek molekül ağırlıklı glukanoların sentezini katalizlerler. Ayrıca, süktrozun bir akseptöre donör olduğu ve “akseptör reaksiyonu” denilen transglukozilasyon reaksiyonuyla oligosakkaritlerin sentezini de gerçekleştirirler. GH 70 ailesi enzimleri α -1,4; α -1,3; α -1,2 ya da α -1,6 glukozidik bağ çeşitlerinin hepsini sentezleme yeteneğine sahiptirler [Moullis et al, 2006]. Bu yüzden enzim özelliğine bağlı olarak farklı büyüklük, yapı ve dallanma derecelerine sahip çok çeşitli glukanolar üretebilirler.

Günümüzde GH 70 ailesinden en az 44 farklı glukansükrazın birincil yapısı mevcuttur. Bunların hepsi de benzer organizasyona sahip katalitik bölgeyi içeren N-terminal ve benzer tekrarlayan birimleri içeren C-terminal domaine sahiptirler ve molekül ağırlıkları ortalama 160000 Da dan fazladır. Streptococcal glukansükrazların bir çoğunda ve *L.mesenteroides* NRRL B-512 F dekstransükrazda C- terminal domaini enzim glukana bağlanmasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir ve bu domain “glukan (dekstran) bağlanma domain” i olarak adlandırılır [Robyt et al, 1995], [Monchois et al, 1998]. Dekstran sentezlendiği zaman enzim agregatları oluşur ve dekstran, dekstran bağlanma bölgesine bağlanır, dekstransükrazın allosterik aktivasyonu meydana gelir. Ayrıca dekstransükrazda iki adet sükroz bağlanma bölgesi ve bir adet akseptör bağlanma bölgesi bulunmaktadır [Su and Robyt, 1994].

2.2.2.1. Dekstran Sentezi

Dekstran ismi ilk olarak Scheibler tarafından (1874), mısır ve pancar sularında meydana gelen gizemli koyulaşma ve tortuların, pozitif rotasyona sahip bir karbonhidrat tarafından oluştuğunu bulmasıyla kullanılmıştır [Scheibler,1874]. Daha önce Pasteur ve va Tieghem (1861) oluşan bu yapışkan maddenin bakteriyel bir etkiyle oluştuğunu söylemişler ve bu bakteriyi *Leuconostoc mesenteroides* olarak adlandırmışlardır [Pasteur, 1861]. Doğada dekstranların büyük çoğunluğu *Leuconostoc*, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* türleri tarafından üretilen dekstransükraz enzimleri ile sentezlenirler [Naessens et al, 2005].

Dekstranlar, ana zincirin %50'sinden fazlasında α (1,6) bağları ile bağlı glukoz içeren bir homopolisakkaritlerdir. Bu α -D-glukanlar, çoğunlukla α (1,3) ve az da olsa α (1,4) ya da α (1,2)-dallanmaları içeren yan zincirlere sahiptirler. Dekstranın yapısı onu üreten bakteriye, dolayısıyla dekstransükraz enzimine bağlıdır. Dekstranın molekül ağırlığı enzim miktarına, sıcaklığa ve kullanılan sükrozun konsantrasyonuna bağlı olarak değişir ve 5.10^8 dalton'a kadar ulaşabilir. Çeşitli metodlarla istenilen molekül ağırlığına sahip dekstran elde edilebilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 İstenilen molekül ağırlıklı dekstran eldesi.

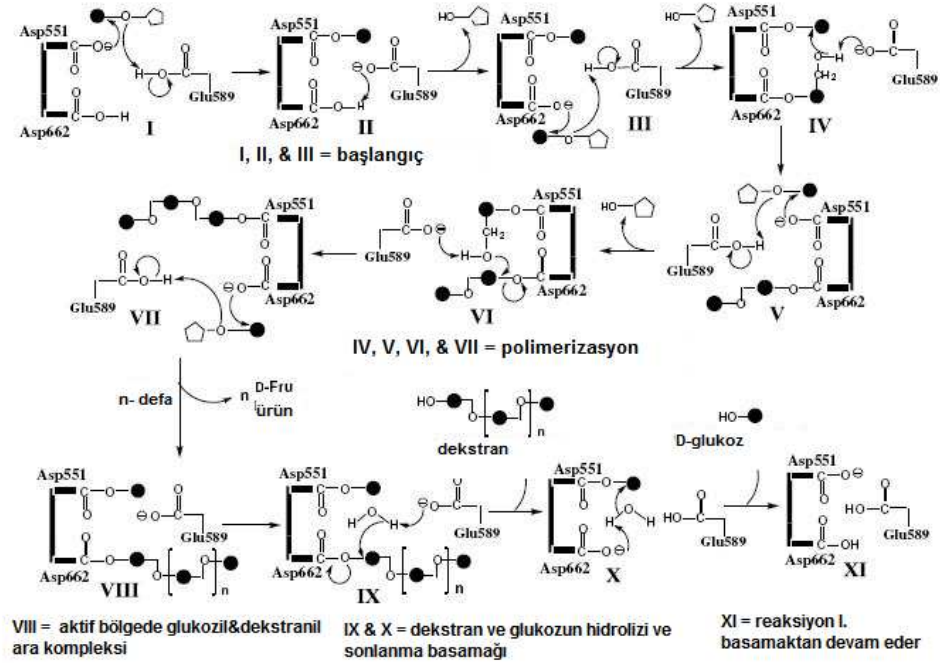
Molekül ağırlığı 50-100 kDa arasında olan dekstran klinik dekstran olarak adlandırılır ve kan plazması içeriği olarak kullanılır [De Balder, 1996]. Molekül ağırlığı 40 kDa olan dekstran, kan akışını iyileştirici olarak organların muhafazasında kullanılır. Sephadex olarak adlandırılan ve protein, nükleik asitler, polisakkaritler gibi biyomoleküllerin ayrılmasında ve saflaştırılmasında kullanılan çapraz bağlı dekstran ise, dekstranın epiklorohidrin ile muamele edilmesiyle elde edilir. Molekül ağırlığı 5000 Da olan dekstran demir taşıyıcı olarak kullanılır. Merkaptodekstran, gümüş, civa ve bakır iyonları gibi ağır metal iyonlarına karşı yüksek afiniteye sahiptir. Bu özelliğinden dolayı ağır metal çevre kirlenmelerinde uygulama alanı vardır. Ayrıca dekstran ve türevlerinin kozmetik ve gıda sektöründe bir çok çeşitli uygulamaları vardır [Naessen et al, 2005].

Dekstransükrazın reaksiyon mekanizması çalışmaları, dekstransükraz ile sükrözden sentezlenen B-512 F dekstranın, glukozil ara ürünleri yoluyla oluştuğunu göstermektedir [Robty and Eklund, 1982]. Glukozil parçaları enzimin aktif bölgesine kovalent olarak bağlı büyümekte olan glukanozil zincirinin indirgen ucuna transfer olur. Robty tarafından, B-512 F dekstranda α (1,6) bağlı glukoz birimlerinin sentezinde aktif bölgede iki nükleofilin rol aldığını ve sükröze etki ederek fruktozu iki β -glukozil ara geçişini vermek üzere ayırdığı mekanizmayı öne sürmüştür. ^{14}C etiketli sükröz ile yapılan “pulse and chase” çalışmaları *L.mesenteroides* NRRL B-512 F ve *Streptococcus mutant* 6715’in her ikisinde de dekstranın, glukozun büyüyen

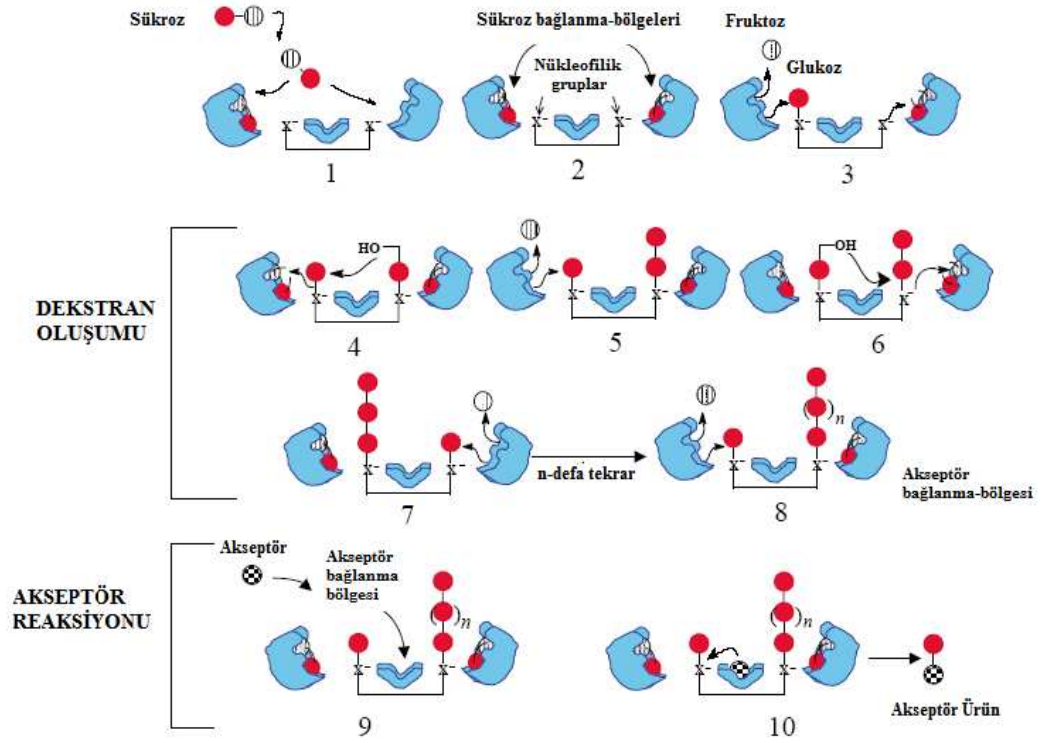
dekstran zincirinin indirgen ucuna eklenmesiyle sentezlendiğini ve zincir büyümesinin “two-site insertion” mekanizmasıyla oluştuğunu göstermektedir [Robyt et al, 1974].

Robyt ve Eklund’ın çalışmasına göre, glukozil birimlerinden bir tanesinin C-6 OH grubu diğer glukozil biriminin C-1’ine etki eder ve bir α (1,6) bağı oluşur, bir glukozil birimi diğerine transfer olur. Serbest kalan nükleofil, yeni bir glukozil ara ürünü oluşturmak üzere diğer bir sükroz molekülüne saldırır. Yeni glukozil ara ürününün C-6 OH grubu izomaltozil (büyüyen dekstran zinciri) biriminin C-1’ine etki eder. Glukozil ve dekstranozil birimleri iki nükleofil arasında sıra ile transfer olur ve böylece dekstran zinciri indirgen uca uzamaya devam eder (Şekil 2.5). Reaksiyon sırasında, sükroz molekülünün fruktoz birimine bir hidrojen iyonu transfer olur ve fruktoz ayrılır. Zincir uzaması akseptör reaksiyonlarıyla ya da dallanma noktası oluşturarak sonlanır. Yüksek molekül ağırlıklı dekstran zinciri akseptör olduğu zaman, akseptör dekstran zincirinin C-3 OH grubu, dekstranozil enzim kompleksinin C-1’ine etki ederek, dekstran zincirini bırakmasını sağlar ve iki dekstran zinciri arasında dallanma noktası oluşur [Robyt Eklund, 1982]. Dekstransükrazın kimyasal modifikasyonu dekstran sentezi için iki histidin imidazol grubunun etkili olduğunu göstermektedir (Şekil 2.6). Bu iki imidazol grubunun, ayrılan fruktoz birimlerine hidrojen iyonlarını verdiği, sonra ikinci adımda glukozil enzim kompleksinin C-6 OH grubuna saldırarak bir proton kopardığı ve α (1,6) bağı oluşturduğu kabul edilmiştir [Fu and Robyt, 1988].

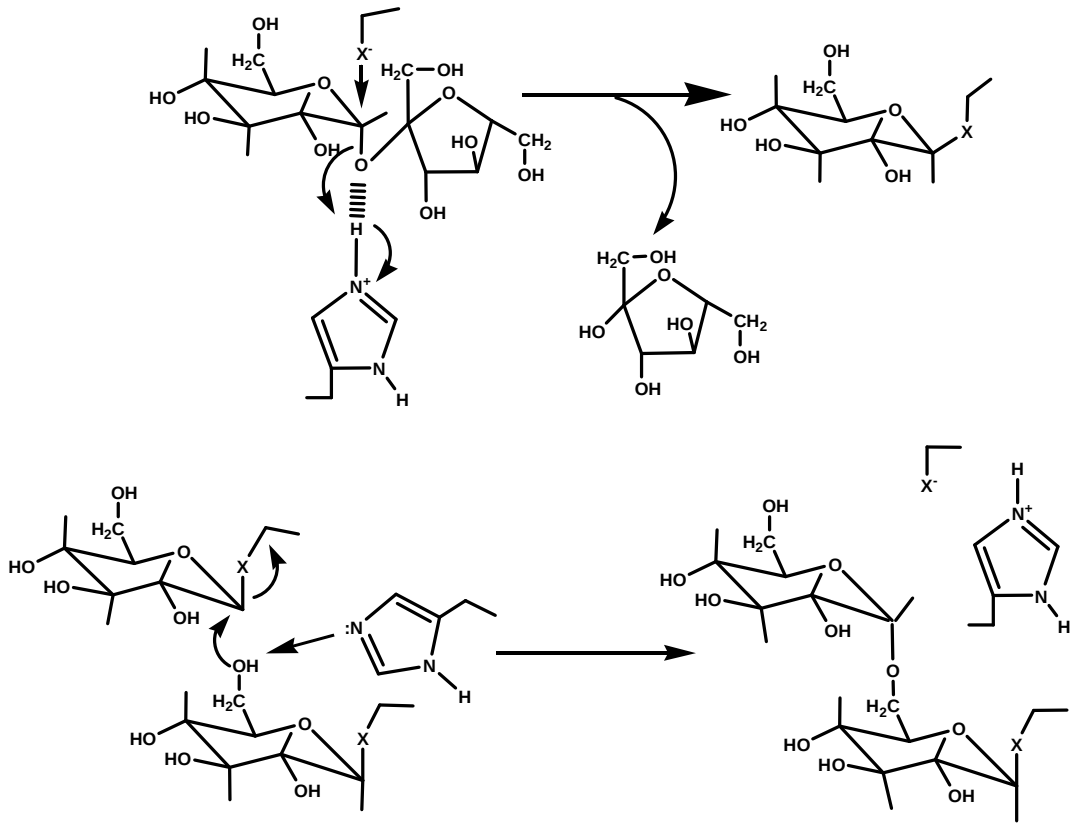
Glukozid-hidrolaz ailesi (GH 70) enzimlerin aktif bölge yakınlarında saklı üç amino asitin (Asp-551, Glu-589 ve Asp-662) benzerlik gösterdiğine dayanarak, dekstransükrazın dekstran sentezi mekanizması Robyt tarafından tekrar yazılmıştır [Robyt et al, 2008] (Şekil 2.4). Reaksiyon mekanizmasında, Glu-589’un karboksil grubu bir asit-baz katalizi başlatır; Asp-551 ve Asp-662 nin karboksilat grupları sükrozun D-glukozil grubunun C-1’ine etki ederek iki-katalitik bölge nükleofilik atakta bulunur. Glu-589 sükrozun ayrılan fruktoz birimine proton verir. D-glukoz birimleri birbirine kovalent bağlanırken Glu-589’un karboksilat grubu tekrar protonlanır. Bu şekilde D-glukoz birimleri zincirin indirgen ucuna eklenir. Reaksiyonlar iki katalitik bölge arasında devam eder.



Şekil 2.4 Dekstran biyosentez mekanizması [Robyt et al, 2008].



Şekil 2.5 Dekstran sentezi ve akseptör reaksiyonunun mekanizması [Plou et al, 2002]



Şekil 2.6 Aktif bölgedeki imidazol grubunun etki mekanizması ve $\alpha(1,6)$ -glukozidik bağın oluşumu.

Dekstransükrazın aktif bölgesinde, enzim katalizi için etkili bir lizin rezidüsünün de yer aldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalarda lizin spesifik reaktif pyrodoksal 5¹-fosfat ve o-fitalaldehit kullanılmıştır [Goyal and Katiyar, 1998].

2.2.2.2. Oligosakkarit Sentezi (Akseptör Reaksiyonu)

Dekstransükraz dekstran sentezinden başka, sükrozun D-glukoz biriminin mono- ve oligosakkaritlere transfer olduğu ikincil transglukozilasyon reaksiyonlarını da katalizler. Dekstran sentezine karşı oluşan bu reaksiyonlar akseptör reaksiyonu olarak adlandırılır. Akseptör reaksiyonları dört şekilde oluşabilir: 1) D-glukoz bir akseptör monosakkarite ya da oligosakkarite transfer olur, 2) D-glukoz, D-glukozil dallanma noktaları oluşturmak üzere dekstran zincirine transfer olur, 3) D-glukoz küçük olasılıkla suya transfer olur ve sükroz hidroliz olur, 4) Dekstran zinciri suya ya da bir akseptör sakkarite (glukoz, fruktoz, maltoz ya da izomaltoz) transfer olur ve aktif bölgeden dekstran bırakılır, polimerizasyon sonlanır [Robyt et al, 2008] (Şekil 2.5).

Sükrozla birlikte, örneğin maltoz gibi şekerler kullanıldığında, dekstransükraz yüksek molekül ağırlıklı dekstran oluşturmak yerine oligosakkaritler sentezlemeye başlar [Paul,1986]. Sükrozun glukozil birimleri dekstran oluşturmaz, akseptör adı verilen şekerlerin serbest hidroksil grubuna transfer olur. Mekanizma çalışmaları akseptörün kovalent dekstran zinciri ya da enzim-glukozil ara ürününü, glukoz ya da dekstran arasında kovalent bağ oluşturarak aktif bölgeden ayırdığını göstermektedir. Akseptör aktif bölgeden dekstranı uzaklaştırdığı zaman dekstran zincirinin polimerizasyonu sonlanır [Robyt and Eklund, 1983].

Bir çok akseptör şeker reaksiyon hızlarına, oligosakkarit oluşturma etkilerine göre sınıflandırılmıştır [Robyt and Eklund, 1983]. Akseptörler, maltoz ve izomaltoz gibi kuvvetli akseptörler ve fruktoz gibi zayıf akseptörler olmak üzere iki bölüme ayrılırlar. Kuvvetli akseptörler dekstran sentezini inhibe ederken reaksiyon hızını artırıcı etki göstererek akseptör ürünlerini oluştururlar. Zayıf akseptörler ise dekstran oluşumunu kısmen inhibe ederler, akseptör ürünlerinin verimi düşüktür. Akseptör olarak glukoz, metil 1-O- α -D-glukopiranozid, maltoz ya da izomaltoz kullanıldığı zaman, sükrozun glukoz birimi monosakkaritin C-6 OH grubuna ya da disakkaritin indirgen olmayan ucundaki glukozun 6-OH grubuna transfer olur. Böylece bir dizi izomaltodekstrinler oluşur [Daum and Buchholz, 2002], [Fernandes and Rodrigues,

2006]. Zayıf bir akseptör olan fruktoz kullanıldığında lükroz oluşur. Glukan sentez reaksiyonunun son aşamasında, fruktoz konsantrasyonu yüksek olduğunda lükroz sentezi meydana gelir. Sükroz ve fruktoz varlığında lükroz üretim prosesi geliştirilmiştir [Buchholz et al, 1998].

2.3. Dekstransükraz'ın İmmobilizasyonu

Dekstransükrazın immobilizasyonu için değişik metodlar denenmiş ve alginatla immobilizasyon en iyi metod olarak bulunmuştur [Tanrıseven and Doğan, 2002], [Reischwitz et al, 1995]. Bu metod yalnız oligosakkarit üretimi için uygun olup yüksek molekül ağırlıklı dekstran polimerlerinin sentezi için kullanılamaz. Alginat bead veya fiberlerinin içinde oluşan dekstran çözeltiye geçemez ve bir süre sonra bead ve fiberler bozulur. Aşağıda verilen tabloda dekstransükraz için kullanılan metodlar özetlenmiştir.

Tablo 2.1 Dekstransükrazın immobilizasyon metodları.

İmmobilizasyon metodu	İmmobilizasyon verimi (%)	Ürün	Referans
Eupergit C (epoksi grubuna kovalent bağlanma)	9.0	Oligosakkarit /Dekstran	[Segura et al, 2004]
Glutaraldehit aktive edilmiş aminosilica	4.2	Oligosakkarit /Dekstran	[Monsan and Lopez, 1981]
Glutaraldehit aktive edilmiş aminosilica	13.0 (iki gün içinde %83 aktivite kaybetti)	Oligosakkarit /Dekstran	[Alcalde et al,1999]
Glutaraldehit aktive edilmiş aminosilica	19.6	Oligosakkarit /Dekstran	[Kaboli and Reilly, 1980]
Entrapment (alginat)	90.0	Oligosakkarit	[Tanrıseven and Doğan, 2002]
Entrapment (alginat)	84.0	Oligosakkarit	[Reischwitz et al, 1995]
Adsorpsiyon (fenoksyasetil sellüloz)	80.6 (4 saatte aktivitenin %89'u kaybedildi)	Dekstran	[Chang et al, 1981]

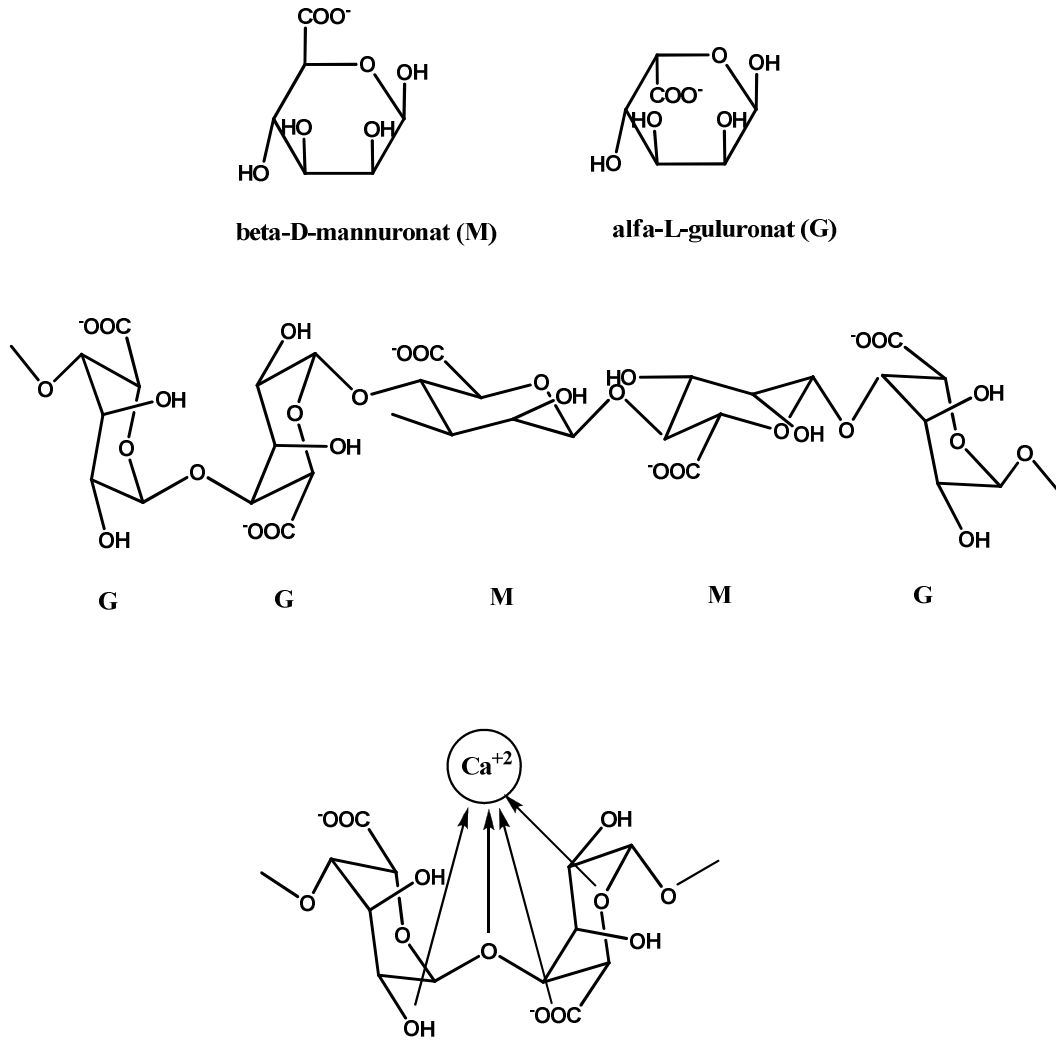
Tablo 2.1 den görüldüğü gibi bu enzimin dekstran sentezinde kullanılabileceği bir immobilizasyon başarılı bir şekilde yapılamamıştır. Serbest dekstransükraz ve dekstranazın birlikte kullanımıyla ilgili bazı çalışmalar mevcuttur [Goulas et al, 2004], [Paul et al, 1989]. Polonyalı araştırmacılar dekstransükrazı alginat bead'leri içinde immobilize ederek serbest dekstranazla birlikte süktrozdan glukooligosakkarit üretiminde kullanmışlardır [Kubiket al, 2004]. Herbiri 24 saat süren reaksiyonlar sonunda başlangıçta süktrozun %90'ı ürünlere dönüştürken 6. reaksiyon sonunda bu oran %60'a düşmektedir.

2.4. Kalsiyum Alginat

Alginat kahverengi deniz yosunlarından (Phaeophyceae, başlıca *Laminaria hyperborea*) elde edilen $\alpha(1-4)$ -L-gluronik asit (G) ve $\beta(1-4)$ -D-mannuronik asit (M) birimlerinden oluşmuş lineer bir polisakkarittir (Mw 10-600 kDa). Alginat polimerinin kimyasal yapısı Şekil 2.7 de görülmektedir. Alginat polimerinde bulunan G ve M monomerlerinin oranı ve dizilişi alginatın elde edildiği kaynağa göre değişmektedir. Alginatlar sulu çözeltilerde Ca^{+2} gibi iki değerlikli katyonlarla iyonik bağlanma yaparak jel oluştururlar. Jel oluşumu farklı alginat zincirlerindeki G lerin karboksil grupları ile Ca^{+2} iyonları arasındaki bağlanma sonucu gerçekleşir.

Alginat ile enzimler farklı metodlarla immobilize edilebilir. Enzim alginat çözeltisiyle karıştırılarak kalsiyum klorür çözeltisine damlatıldığında kalsiyum alginat bead'leri oluşur. Enzim kalsiyum klorür çözeltisi ile karıştırılarak alginat çözeltisine damlatıldığında ise kalsiyum alginat kapsülleri oluşur. Enzim-alginat-gliserol karışımı kalsiyum klorür çözeltisine bir şırınga ile iplik şeklinde enjekte edildiğinde ise kalsiyum alginat fiberleri oluşur. Oluşan bead, fiber ve kapsülün gözenek büyüklüğü, alginat ve kalsiyum klorür çözeltisinin derişimine bağlıdır. Molekül ağırlığı 300 kDa olan proteinler bile alginat jellerinden kaçabilmektedir. Bu durumu önlemek için proteini çapraz bağlama, bead'leri film tabakası ile kaplama ya

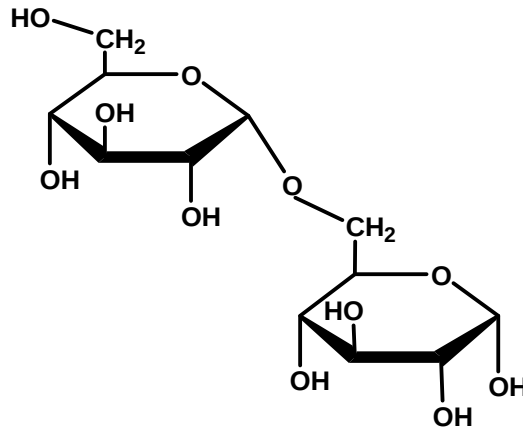
da bead ve fiberleri kurutarak gözenekleri küçültme yöntemleri uygulanabilir. Enzimler alginat polimerine karbodiimid kullanılarak kovalent olarak bağlanabilir. Koloidal slika yardımıyla alginat bead'leri sağlamlaştırılabilir.



Şekil 2.7 Alginat'ın yapısı ve kalsiyum iyonu ile etkileşimi.

2.5. İzomaltoz

İzomaltoz (6-O- α -D-glukopiranozil-D-glukoz), α -1,6-glikozidik bağlarla bağlı iki glukoz molekülünden oluşan bir disakkarittir (Şekil 2.8). Kalori değeri sükrozun (3.94 kcal/g) %50 si kadardır ve viskozitesi maltozdan düşüktür. *Streptococcus mutans* ile sükrozdan glukoz oluşumunu önleyen diğer şeker alkoller ve sükroz izomerleri gibi diş plağını önleme özelliği vardır. İzomaltoz, panoz, izomaltotrioz, izomaltotetraoz gibi en az bir α -1,6-glikozidik bağ içeren izomalto-oligosakkarit grubunun bir üyesidir [Harrion, 2007].



Şekil 2.8 İzomaltozun molekül yapısı

İzomaltooligosakkaritlerin insanlarda ve hayvanlarda günlük beslenmedeki önemi ve sağlık üzerine faydalı etkileri olduğu bilinmektedir. Düşük monosakkarit konsantrasyonlu oligo ve disakkarit şurupları, tatlandırıcılar ve lifli gıdalar gibi birçok gıda uygulamalarında düşük kalorili gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. Süt ürünleri, dondurmalar, çikolatalar, bisküviler, meyve karışımları ve ilaç preparatları

en çok kullanıldıkları yerlerdir. Düşük monosakkarit içeriklerinden dolayı diş çürümesine neden olmazlar. İzomaltoz, şekerlemeler, meyve ve sebze suları gibi gıda endüstrisinde kullanım alanının yanında, hayvan gıdalarında, kozmetikte ve ilaç alanında kullanılmaktadır. Nişastanın hidrolizi ve glukoz içeren şurupların eldesinde kimyasal ve enzimatik reaksiyonlar sırasında elde edilir. Henüz endüstriyel proseslerle disakkaritlerce zenginleştirilmiş ürün olarak elde edilmesi mümkün değildir. İzomaltozu ayrıca dekstransükraz ve dekstranazın enzimatik reaksiyonlarıyla elde etmek mümkündür.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Enzim

Dekstransükraz, Prof.Dr.John F Robyt (Iowa State University, Ames, IA USA) tarafından sağlanan (*Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC-13 Glc) suşlar kullanılarak üretildi.

Dekstranaz 50L Novozyme tarafından hediye edildi. Enzimin aktivitesi 63 IU/ml' dir. 1 IU: Molekül ağırlığı 5000 Da olan %2 w/v' lik dekstran çözeltisinden 30°C de, pH 5.4 de, 1 dakikada 1µmol izomaltooligosakkarit (izomaltoz ve izomaltotrioz) oluşturan enzim miktarıdır.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Kalsiyum asetat, potasyum dihidrojen fosfat, sükroz, glukoz, fruktoz, α-naftol, sülfürik asit, etanol, asetonitril, nitrometan, asetik asit, hidroklorik asit, dinitro salisilik asit, magnezyum sülfat, sodyum klorür, kalsiyum klorür, mangan sülfat, demir sülfat, MRS Broth ve agar, yeast extract, pepton, çözünür nişasta, polietilen glikol 2000, coomassie brilliant blue ve histidin monohidroklorit Merck'den, Sodyum alginat (medium viscosity) ve laktoz, maltoz, galaktoz, dietil pirokarbonat, bovin serum albumin Sigma'dan ve TLC tabakalar ise Whatman'dan (New York, USA) satın alındı. Eupergit C Roehm GmbH&Co. KG (Darmstadt, Almanya) tarafından hediye edildi.

3.1.3. Araç ve Gereçler

Tablo 3.1 Deneylerde kullanılan araç ve gereçler

Araç/Gereç	Marka	Model
TLC-Densitometre	Bio-Rad (Kaliforniya, ABD)	GS 670
UV-Spektrofotometre	Shimadzu (Kyoto, Japonya)	UV 3600
Mikroplate Reader	Bio-Rad (Kaliforniya, ABD)	3550-UV
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph (Schwabach, Almanya)	MR 3004
Su Banyosu	Gessellschaft Für Labortechnik (Burladingen, Almanya)	1086
İnkübatör Çalkalayıcı	New Brunswick Scientific, Amerika	Excella E25
Hassas Terazî	Sartorius (Goetingen, Almanya)	BA 110S
TLC-plate ısıtıcısı	Camag (Muttenez, İsviçre)	Ceran
pH-metre	Ino-Lab (Kladno, Çek Cumhuriyeti)	pH 730
Santrifüj	Beckman Coulter, Amerika	Allegra 64R
Mikro şırınga	Hamilton (Bonaduz, İsviçre)	7105
Otomatik pipet	Eppendorf (Hamburg, Almanya)	20µl, 200µl ve 1000µl

3.2. Metod

3.2.1. Dekstransükraz Üretimi

Mutant *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC-13Glc suşu glukoz ve sukroz besiyerlerinde aşağıda gösterilen prosedür kullanılarak çoğaltıldı [Kitaoka, 1998].

1. Liyofilize materyal 2ml sükroz besiyerine alınarak, 30°C’de mikroaerofilik koşullarda 15-24 saat inkübe edilir.
2. İnkübasyon süresince üreyen kültürden 0.2ml alınarak 2ml sükroz besiyerine aktarılır ve aynı koşullarda inkübasyona bırakılır.
3. Sükroz besiyerinde üretme aşamasından sonra bu kültürden 0.2ml alınıp 2 ml glukoz (MRS broth) aktarılır ve aynı koşullarda inkübasyona bırakılır. Bu işlem bir kere daha tekrarlanır.

Laboratuvarda liyofilize suşların canlandırılma ve çoğaltma işlemi tamamlandıktan sonra yatık MRS agara ekim yapılarak stoklanması sağlandı ve +4°C’ye yerleştirildi. Her iki ayda bir besiyeri yenilendi. -80°C stoğu, %80 lik gliserol (500 µl)’e MRS broth da büyüyen kültürden (500 µl) ilave edilerek hazırlandı.

Dekstransükraz üretiminde önce kültür hacmini arttırmak için MRS broth da taze kültür, stoklardan ekim yapılarak (2 ml) hazırlandı. Elde edilen 2ml kültür 18 ml glukoz besiyerine aktarıldı. Bu çalışmalar sırasında bakteri kültür hacminin son hacmin %10’u olmasına dikkat edildi. Daha sonraki aşamada 20 ml’lik kültürden 10 ml alınıp 90ml glukoz besiyerine aktarıldı. İnkübasyon işlemleri 30°C de 15-24 saat süreyle 150 rpm de karıştırılarak yapıldı. Dekstransükraz enzimini elde edebilmek için, 100 ml bakteri kültürü, 900 ml sükroz besiyerine aktarıldı 15 saat inkübe edildi (30°C, 150 rpm). Sonra besi ortamı santrifüj edilerek (10000xg, 15 dakika, 4°C) hücreler uzaklaştırıldı. Enzim konsantrasyonu polietilen glikol (PEG 2000)

çözeltisine karşı dializ yapılarak gerçekleştirildi. Kullanılan besiyeri ortamlarının kimyasal içerikleri Tablo 3.2 de yer almaktadır.

Tablo 3.2 Kullanılan besi ortamlarının kimyasal içerikleri

Kimyasal (g/l)	Glukoz Medyum	Sükroz Medyum	MRS Agar	MRS Broth
Glukoz	18.80	-	20.0	20.0
Sükroz	-	25.00	-	-
Bactopeptone	4.20	4.20	10.0	10.0
Yeast Extract	4.20	4.20	4.0	4.0
Meat Extract	-	-	8.0	8.0
Tween 80	-	-	1.0	1.0
Di-amonyumhidrojen sitrat	-	-	2.0	2.0
Sodyum asetat	-	-	5.0	5.0
K ₂ HPO ₄	20.00	16.70	2.0	2.0
MgSO ₄	0.17	0.17	0.2	0.2
NaCl	0.008	0.008	-	-
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.008	0.008	-	-
MnSO ₄ -2H ₂ O	0.008	0.008	0.04	0.04
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.010	0.010	-	-
Agar-Agar	-	-	14.00	-

3.2.1.1 Dekstransükrazın Aktivite Tayini

Dekstransükraz (0.5 ml), kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) kullanılarak hazırlanan sükroz (300 mM, 10 ml) içeren çözeltide 25°C de 30 dakika 500 rpm hızda karıştırılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda alınan numune (300 µl), saf suya (700 µl) ilave edilerek 10 dakika süre kaynatıldı. Reaksiyonda oluşan fruktoz miktarı DNS (3,5'-dinitrosalisilik asit) indirgen şeker tayini metodu ile analiz edildi. Aktivite 23±4 IU/ml; bir unit (U) dekstransukraz aktivitesi; yukarıda belirtilen şartlar altında, dakikada 1µmol fruktoz oluşturan enzim miktarı olarak belirlendi.

3.2.2. Kantitatif Protein Tayini

Protein tayini, bovin serum albumin standart olarak kullanılarak Bradford Metodu ile yapıldı [Bradford, 1976].

3.2.3. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)-Densitometre ile Kantitatif Karbohidrat Tayini

Standart çözelti ve örneklerden Hamilton mikrosiringa ile alınan örnekler (1 µl), TLC tabaka (Whatman K5 Slika) üzerine damlatıldı ve kurutuldu. Önce üç kere, nitrometan/su/1-propanol (2/3/5 v/v) çözelti sistemi ile TLC tabakanın üçte ikisine kadar, sonra 3 kere tabakanın tamamı asetronitril/su (85/15 v/v) sistemi ile yürütüldü. Karbonhidratların görünürlüğünü sağlamak için TLC plakası %5 sülfürik asit ve % 0.5 α-naftol içeren etanol çözeltisine daldırılıp 110 °C’ de 10 dakika hot plate üzerinde ısıtıldı. Karbonhidratların kantitatif analizi TLC densitometre (Bio-Rad GS-670) kullanılarak yapıldı [Grözs et al, 1989], [Robyt et al, 1994].

3.2.4. Dinitrosalisilik Asit (DNS) Metodu ile Kantitatif Karbonhidrat Tayini

Standart çözelti ve örneklerden alınan numuneler (100 µl) ve DNS çözeltisi (100 µl) karıştırılır ve 100°C de 5 dakika ısıtılır. Soğuduktan sonra saf su ile 1 ml’ye tamamlanır ve 575 nm de spektrofotometrik olarak absorbans ölçülür. 100 ml DNS çözeltisinde; 1.6 g NaOH, 1.0 g 3,5-dinitrosalisilik asit, 30.0 g KNa-tartarat, 0.2 g fenol ve 50 mg sodyum karbonat bulunmaktadır [Miller, 1959].

3.2.5. Birlikte-immobilize Dekstransükraz ve Dekstranaz Kullanarak İzomaltooligosakkarit Üretimi

Eupergit C üzerine immobilize edilmiş olan dekstranaz enzimi ve serbest dekstransükraz, alginat (bead, fiber ve kapsül) kullanarak birlikte immobilize edildi. Dekstransükraz'ın alginat bead, fiber ve kapsüllerinden çözeltiye geçmesini önlemek ve kararlılığını artırmak amacıyla enzim immobilizasyondan önce sükroz ile muamele edildi. Böylece oluşan dekstran, enzimin alginat polimerinin gözeneklerinden kaçmasını engeller.

3.2.5.1. Dekstranazın İmmobilizasyonu

Dekstranaz (100 µl) fosfat tampon çözeltisinde (5 ml, 1 M, pH 5.3) Eupergit C (200 mg) ile 150 rpm, 25°C de 24 saat çalkalanarak immobilize edildi. İmmobilizasyondan sonra Eupergit C beadleri süzüldü ve fosfat tampon çözeltisi (10 ml, 0.1 M, pH 5.3) ve saf suyla (10 ml) yıkandı. İmmobilizasyon verimi %90 [Aslan and Tanrıseven, 2007].

3.2.5.2. Dekstransükraz ve Dekstranazın Alginat Kapsüllerde Birlikte-İmmobilizasyonu

Dekstransükraz (2 ml, 32.4 IU) ve Eupergit C üzerine immobilize dekstranaz (200 mg) ya da serbest dekstranaz (0.1 ml, 6.3 IU), nişasta (2.0 g), CaCl₂ (0.1 g), kalsiyum asetat tampon çözeltisi (3 ml, 25 mM, pH 5.4) karıştırıldı ve şırınga ile karışmakta olan Na-Alginat çözeltisine [100 ml %1 (w/v)] damlatıldı. Oluşan kapsüller tampon çözeltide (200 ml) yıkandıktan sonra CaCl₂ çözeltisinde [100 ml, %1 (w/v)] yarım saat bekletildi. Alginat kapsüller kullanılabildiği kadar kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (25 mM, pH 5.4) buzdolabında (4°C) saklandı. Kapsüllerin ortalama çapı 4.48 mm ve duvar kalınlığı 0.14 mm.

3.2.5.3. Dekstransükraz ve Dekstranazın Alginat Bead'lerde Birlikte-İmmobilizasyonu

Dekstransükraz (2 ml, 32.4 IU) ve Eupergit C üzerine immobilize dekstranaz (200 mg), Na-Alginat çözeltisiyle [8 ml, %2 (w/v)] karıştırıldı ve karışım bir şırıngayla kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (25 mM, pH 5.4) hazırlanan CaCl_2 (100 ml, %2 w/v) çözeltisine damlatılarak ortalama çapı 3.54 mm olan bead'ler oluşturuldu. Bead'ler bu çözeltide 1 saat bekletildikten sonra kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (100 ml, 25 mM, pH 5.4) yıkandı ve kullanılabileceği kadar aynı tampon çözeltide buzdolabında (4°C) bekletildi.

3.2.5.4. Dekstransükraz ve Dekstranazın Alginat Fiberlerde Birlikte-İmmobilizasyonu

Dekstransükraz (2 ml, 32.4IU), Eupergit C üzerine immobilize dekstranaz (200 mg), Na-Alginat (0.25 g), Na-asetat tampon çözeltisi (1 ml, 25 mM, pH 5.4) ve gliserol (4 ml) kullanarak hazırlanan karışım bir şırınga yardımıyla kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (25 mM, pH 5.4) hazırlanan kalsiyum klorür [100 ml, %2 (w/v)] çözeltisine ilave edilerek alginat fiberler oluşturuldu (4.3 g, ortalama çap:1.74 mm) ve fiber oluşumu süresince çözelti karıştırılmadı. Fiberler 1 saat bekletildikten sonra kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (100 ml, 25 mM, pH 5.4) yıkandı ve bir makas ile küçük parçalara (0.5 cm) kesildi. Kullanılabileceği kadar aynı tampon çözelti içinde buzdolabında (4°C) saklandı.

3.2.5.5. Dekstransükrazın Alginat Fiberlerde İmmobilizasyonu

Dekstransükraz (2 ml, 32.4 IU) daha önce yayınlanan çalışmadaki şartlarla immobilize edildi [Tanrıseven and Doğan, 2002]. Fiberler küçük parçalara kesildi (0.9 cm, 4.49 g, ortalama çap:2.00 mm) ve kullanılabileceği kadar kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (25 mM, pH 5.4) buzdolabında (4°C) saklandı.

3.2.5.6. Dekstranazn Aktivite Tayini

Kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (10 ml, 25 mM, pH 5.4) hazırlanan dekstran (MW:5000 Da, %2 w/v), serbest ya da immobilize dekstranaz ile 200 rpm hızda su banyosunda (25°C) 1 saat süreyle muamele edildi. Reaksiyon sonunda alınan numune (200 µl), saf suya (800 µl) ilave edildi ve enzim aktivitesini durdurmak için 10 dakika süre ile kaynatıldı. Reaksiyonda oluşan izomaltoz ve izomaltotrioz miktarı TLC metodu kullanılarak tayin edildi. Aktivite 63 IU/ml, 1 IU: Molekül ağırlığı 5000 Da olan %2 w/v' lik dekstran çözeltisinden 30°C de, pH 5.4 de, 1 dakikada 1µmol izomaltooligosakkarit (izomaltoz ve izomaltotrioz) oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.2.5.7. Dekstransükrazın Aktivite Tayini

Serbest dekstransükraz (2 ml), kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) kullanılarak hazırlanan sükroz (300 mM) ve glukoz (300 mM) şeker karışımını içeren çözeltide (20 ml), 25°C de 30 dakika 500 rpm hızda karıştırılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda alınan numune (300 µl), saf suya (700 µl) ilave edilerek 10 dakika kaynatıldı. Reaksiyonda oluşan fruktoz, TLC metodu ile tayin edildi. Enzim aktivitesi 16.2 IU/ml. 1 IU: sükroz (300 mM)+glukoz (300 mM) çözeltisinden 25°C de, pH 5.4 de, 1 dakikada 1µmol fruktoz oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı.

3.2.5.8. Dekstransükraz-Dekstranaz Aktivite Tayini

Serbest veya birlikte immobilize dekstransükraz ve dekstranaz, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) kullanılarak hazırlanan sükroz çözeltisiyle (20 ml, 300 mM) manyetik karıştırıcıda, 25°C'de 30 dakika 500 rpm hızda muamele edildi. Reaksiyon sonunda alınan numune (300 µl), saf suya (700 µl) ilave edildi ve enzim

aktivitesini durdurmak için 10 dakika süre ile kaynatıldı. Reaksiyonda oluşan fruktoz ve oligosakkaritler (izomaltoz ve izomaltotrioz) tayin edildi.

3.2.5.9. Dekstransükrazın Aktivitesine Dekstranazın Etkisi

Dekstranaz enziminin dekstransükraz üzerine olan etkisi; kalsiyum asetat tampon çözeltisi (7.9 ml, 25 mM, pH 5.4) içerisinde dekstransükraz (2 ml, 32.4 IU) ve dekstranaz (0.1 ml, 6.3 IU) enzimleri 25°C de farklı sürelerde (0, 2 ve 4 saat) muamele edilerek test edildi. Süre sonlarında dekstransükraz aktivitesi belirlendi.

3.2.5.10. Alginat Matrislerden (kapsül, bead ve fiberler) Dekstranazın Kaçışı

Dekstranaz (0.1 ml, 6.3 IU) alginat kapsül, bead ve fiberlerde daha önce yukarıda anlatılan yöntemlerle immobilize edildi. Alginat matrisler (kapsül, bead ve fiberler) kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (25 mM, pH 5.4, 20 ml) 500 rpm hızda 3 saat süreyle karıştırıldı ve matrisler filtre edildi. Kaçan dekstranaz aktivitesi filtratta belirlendi.

3.2.5.11. Alginat Kapsüllerde Dekstransükrazın Aktivitesine Nişastanın Etkisi

Birlikte-immobilizasyon prosesinde nişastanın dekstransükraz üzerindeki etkisini belirlemek için, dekstransükraz ve Eupergit C üzerine immobilize dekstranazın birlikte immobilizasyonu sırasında kapsüller hazırlanırken, viskozite artırıcı olarak nişasta yerine maltoz kullanıldı. Dekstransükraz (2 ml, 32.4 IU) ve Eupergit C üzerine immobilize dekstranaz (200 mg), maltoz (4.0 g), CaCl₂ (0.1g), kalsiyum asetat tampon çözeltisi (3 ml, 25 mM, pH 5.4) karıştırıldı ve şırınga ile karışmakta olan Na-Alginat çözeltisine [100 ml %1 (w/v)] damlatıldı. Oluşan kapsüller saf su ile (200 ml) yıkandıktan sonra CaCl₂ çözeltisinde [100 ml, %1 (w/v)]

yarım saat bekletildi ve sonra kapsüller, kalsiyum asetat tampon çözeltisi ile (50 mlx8, 25 mM, pH 5.4) maltozu uzaklaştırmak için yıkandı.

3.2.5.12. Birlikte-immobilize Enzimlerin Kullanım ve Saklama Kararlılığı

Kullanım kararlılığı, birlikte-immobilize enzimler kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (25 mM, pH 5.4) hazırlanan sükroz çözeltisi (%10 w/v) ile 25°C de 3 saat süre ile ve ard arda 20 kez reaksiyon yapılarak test edildi. Saklama kararlılığı testi, 30 gün boyunca, iki günde bir yapılan reaksiyonla gerçekleştirildi.

3.2.5.13. Birlikte-immobilize Enzimler Kullanarak İzomaltooligosakkarit Üretimi

Alginat kapsüllerde birlikte-immobilize dekstansükraz ve dekstranaz ve kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (25mM, pH 5.4) hazırlanan sükroz çözeltileri ile [15 ml, (%5, 10, 20 ve 40 (w/v))] reaksiyon yapıldı. Farklı sürelerde (1-12 saat) alınan örneklerdeki (0.1 ml) ürünler analiz edildi. Sükroz çözeltileri [%5, 10 ve 20 (w/v)] kullanarak elde edilen reaksiyon karışımlarına (10 ml) sükroz (sırasıyla 4, 3 ve 2g) ilave edildi ve alginat fiberlerde immobilize dekstransükraz (4.49g) ile 25°C de 12 saat muamele edildi. TLC analizi sükrozun tamamının akseptör ürünlerine dönüştüğünü gösterdi.

3.2.6. Birlikte-immobilize Dekstransükraz ve Dekstranaz Kullanarak İzomaltoz Üretimi

İzomaltoz eldesi, alginat kapsüllerde birlikte-immobilize sistem ve farklı konsantrasyonlarda sükroz (150, 300 ve 600 mM) ile kombine edilen glukoz (150, 300 ve 600 mM) çözeltileriyle reaksiyon yapılarak gerçekleştirildi. Sükroz tüketildikten sonra izomaltotriozun ve diğer oligosakkaritlerin izomaltoza dönüşmesi

için karışım immobilize dekstranaz ile muamele edildi. Reaksiyon karışımında bulunan fruktoz ve glukoz ise son basamakta immobilize maya kullanarak tüketildi. Böylece karışımda izomaltoz yüksek saflıkla elde edildi.

3.2.6.1. Ekmek Mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) Alginat Bead'lerinde İmmobilizasyonu

Ekmek mayası (0.3 g), Na-Alginat çözeltisi [10 mL, % 2 (w/v)] ile karıştırıldı ve karışım bir şırıngayla Ca-asetat tampon çözeltisiyle (100 mL, 25 mM, pH 5.4) hazırlanan CaCl_2 (%2 w/v) çözeltisine damlatılarak bead'ler oluşturuldu. Bead'ler bu çözeltide 1 saat bekletildikten sonra Ca-asetat tamponu çözeltisiyle (25 mM, pH 5.4) yıkandı ve kullanılabilecek kadar aynı tampon çözeltide buzdolabında (4°C) saklandı.

3.2.6.2. Birlikte-immobilize Dekstransükraz ve Dekstranaz ile İzomaltoz Eldesi

Dekstransükraz ve dekstranaz enzimlerinin birlikte-immobilizasyonu ve dekstranaz enziminin Eupergit C üzerine immobilizasyonu daha önce bölüm 3.2.5.1 ve 3.2.5.2 de anlatılan metodla yapıldı.

Alginat kapsüllerde birlikte-immobilize dekstransükraz-dekstranaz, kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (25 mM, pH 5.4) hazırlanan ve farklı konsantrasyonlardaki sükroz (150, 300 ve 600 mM) ile kombine edilen glukoz (150, 300 ve 600 mM) çözeltileriyle 25°C de manyetik karıştırıcıda karıştırılarak (500 rpm) reaksiyon gerçekleştirildi. Çözeltilerde sükroz tamamen tüketildikten sonra çözeltiden kapsüller filtre edilerek uzaklaştırıldı ve karışımlara Eupergit C de immobilize dekstranaz (600 mg) ilave edilerek reaksiyona devam edildi. Farklı sürelerde (1-13 saat) alınan örneklerdeki izomaltoz ve izomaltotrioz miktarları hesaplandı. Daha sonra karışımdan immobilize dekstranaz filtre edilerek uzaklaştırıldı ve immobilize maya ilave edilerek fruktoz ve glukoz tüketilene kadar (4 saat) 35°C de muamele edildi.

3.2.7. Dietilpirokarbonat (DEP) ile Dekstransükrazın Modifikasyonu

Dietilpirokarbonat (DEP) ile alginat bead'lerde immobilize dekstransükraz modifiye edilerek, enzimin dekstran üretimi durduruldu. Modifikasyon sırasında bazı karbohidratların, özellikle maltozun enzimi koruyucu etkisi gözlemlendi ve modifiye enzimle oligosakkarit elde edildi.

3.2.7.1. Dietilpirokarbonat (DEP) Stok Çözeltisinin Konsantrasyonunun Hesaplanması

Yapılan çalışmada dietilpirokarbonat stok çözeltisinin konsantrasyonu, asetat tampon çözeltisinde (50 mM, pH 6.0) hazırlanan histidin monohidroklorid monohidrat çözeltisine (3 ml, 10 mM) ilave edilen farklı miktarlarda DEP çözeltisi [2, 3, 5, 10, 20, 30 ve 50 µl (1:10 etanolle seyreltilmiş)] ile oluşan karbetoksi türevinin 240 nm de absorbans artışıyla belirlendi. Maksimum absorbans artışı 10 µl DEP çözeltisi ilave edildiğinde gözlemlendi. Daha sonra DEP ilavelerinde maksimum absorbans değeri sabit kaldı. Yapılan hesaplamalar sonucu DEP stok çözeltisinin konsantrasyonu 5.12 M olarak hesaplandı.

3.2.7.2. Dietilpirokarbonat (DEP) ile Serbest Dekstransükrazın Modifikasyonu

Dekstransükraz (0.3-0.6 mg/mL, 24 IU/ml), farklı konsantrasyonlarda DEP çözeltisi (102, 51.0, 25.5, 15.0 ve 5.0 mM) içeren KH_2PO_4 tampon çözeltisi (100 mM, pH 6.0) karıştırılarak (25°C) farklı sürelerde (2, 4, 6, 8, 10 ve 12. dakika) alınan örnekler (0.4 ml), KH_2PO_4 tampon çözeltisinde (20mM, pH 6.0) hazırlanmış histidin çözeltisine (100 mM, 3.6 ml) ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Aktivite tayini için alınan örnekler süktroz çözeltisine (4mL, %20 w/v) ilave edilerek 4 saat reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyonun sonunda alınan numuneler (400 µl), saf suya (600 µl)

ilave edildi ve enzim aktivitesini durdurmak için 10 dakika süre ile kaynatıldı. Reaksiyonda oluşan fruktoz DNS metodu ile tayin edildi.

3.2.7.3. DEP-Modifiye Dekstransükrazın Hidroksilamin ile Tekrar Aktivasyonu

Dekstransükraz (1.33 mL, 24 IU/ml), DEP çözeltisi [5, 15 ve 25.5 mM] ve KH_2PO_4 tampon çözeltisi (toplam hacim 5 ml, 100 mM pH 6.0) karıştırılarak (25°C) 12. dakika sonunda herbirinden alınan iki örnek (1.5 ml), her biri KH_2PO_4 tampon çözeltisinde hazırlanmış (20 mM, pH 6.0) histidin çözeltisine (100 mM, 13.5 ml) ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Bu iki örnekten biri üzerine KH_2PO_4 tampon çözeltisinde (15 mL, 100 mM) hazırlanmış hidroksilamin çözeltisi (200 mM, pH 7.0) ilave edilerek 4 saat süreyle (4°C) karıştırıldı. Hidroksilaminin fazlası asetat buffer'a (25 mm, pH 5.4) karşı 20 saat 4°C de dializ edilerek uzaklaştırıldı.

3.2.7.4. Dietilpirokarbonat (DEP) ile İmmobilize Dekstransükraz'ın Modifikasyonu

3.2.7.4.1. İmmobilize Dekstransükraz Bead'lerinin Hazırlanması

Dekstransükraz (2 mL, 48 IU) ve Na-Alginat çözeltisi [8 mL, %2 (w/v)] ile karıştırıldı ve karışım bir şırıngayla, kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (100 mL, 25 mM pH 5.4) hazırlanan CaCl_2 (%2 w/v) çözeltisine damlatılarak bead'ler oluşturuldu. Bead' ler bu çözeltide 1 saat bekletildikten sonra bead hazırlamada kullanılan tampon çözeltiyle yıkandı (96 adet bead).

3.2.7.4.2. İmmobilize Dekstransükrazın DEP ile Modifikasyonu

İmmobilize dekstransükraz bead'leri hazırlandı ve tartılarak 13 ayrı gruba ayrıldı. İmmobilize dekstransükraz bead'leri, DEP çözeltisi [102 mM (etanolda hazırlanmış)] ve kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) karıştırılarak (25°C) farklı sürelerde (0-60 dk) muamele edildi. Sürelerin sonunda bead' ler tampon çözeltiyle yıkandı. Aktivite tayin edildi.

3.2.7.5. DEP-Modifiye İmmobilize Dekstransükraz Aktivite Tayini

Kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) kullanılarak hazırlanan sükroz (300 mM) ya da sükroz (300 mM)+glukoz (300 mM) içeren çözelti ile bead'ler çalkalayıcıda 25°C de karıştırılarak (1 saat) reaksiyon yapıldı. Reaksiyon sonunda alınan numunelerdeki fruktoz miktarı TLC metodu ile tayin edildi.

3.2.7.6. İmmobilize Dekstransükrazın DEP İle Modifikasyonuna Akseptörlerin (Maltoz, Sükroz, Glukoz, Laktoz ve Galaktoz) Etkisi

İmmobilize dekstransükraz bead'leri hazırlandı ve her bir akseptör için 5 ayrı gruba ayrıldı. Birinci grup bead' ler akseptörle muamele edilmedi. İkinci grup 250 mM akseptör içeren kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) ile, üçüncü grup 500 mM, dördüncü grup 750 mM ve beşinci grup bead' ler ise 1000 mM akseptör içeren kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle karıştırıldıktan (15 dakika) sonra her bir gruba DEP çözeltisi [102 mM (etanolda hazırlanmış)] ilave edilerek 1 saat süreyle çalkalayıcıda (150 rpm) karıştırılmaya devam edildi. Süre sonunda bead' ler kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (25 mM, pH 5.4), yıkama çözeltisinde akseptör bulunmayana kadar (~8x10 mL) yıkandı. Çözeltide şeker tayini TLC metodu ile yapıldı. Aktivite tayini yapılarak akseptörlerin etkisine bakıldı.

3.2.7.7. İmmobilize Dekstransükraz'ın DEP İle Modifikasyonuna Akseptör Karışımlarının Etkisi

İmmobilize dekstransükraz bead' leri hazırlandı ve tartılarak 11 eşit parçaya bölündü. Birinci grup bead' ler DEP ile muamele edilmeyen kontrol grubu (1), ikinci grup ise akseptörle muamele edilmeyen kontrol grubu (2) yapıldı. Diğer grup bead'ler sırasıyla maltoz (1 M), sükroz (1 M), laktoz (1 M), galaktoz (1 M), glukoz (1 M), sükroz (0.5 M)+maltoz (0.5 M), sükroz (0.5 M)+laktoz (0.5 M), sükroz (0.5 M)+galaktoz (0.5 M) ve sükroz (0.5 M)+glukoz (0.5 M) akseptör karışımlarını içeren kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle karıştırıldıktan (15 dakika) sonra her bir gruba DEP çözeltisi [102 mM (etanolda hazırlanmış)] ilave edilerek 1 saat süreyle çalkalayıcıda (150 rpm) karıştırılmaya devam edildi. Süre sonunda bead' ler kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (25 mM, pH 5.4) yıkama çözeltisinde şeker bulunmayana kadar (~8x10 ml) yıkandı. Çözeltide şeker tayini TLC metodu ile yapıldı. İmmobilize enzimlerin aktivitesine bakılarak şekerlerin etkisi görüldü.

3.2.7.8. Dietilpirokarbonat (DEP)' in Akseptör Ürünlerinin Oluşumuna Etkisi

İmmobilize dekstransükraz bead'leri hazırlandı ve 3 gruba ayrıldı. Birinci grup bead'ler kontrol beadleri olmak üzere DEP ile muamele edilmedi. İkinci grup bead'ler, 1 M maltoz içeren kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (13,5 ml) karıştırıldıktan (20 dakika) sonra DEP çözeltisi [1.5 ml, 102 mM (etanolda hazırlanmış)] ilave edilerek 1 saat süreyle çalkalayıcıda (150 rpm) karıştırılmaya devam edildi. Süre sonunda bead'ler kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (25 mM, pH 5.4) yıkandı. Üçüncü grup beadler aynı koşullarda yalnızca DEP ile mumele edildi. Akseptör ürünleri oluşumu için, serbest ve immobilize dekstransükraz sükroz (80 mM)+glukoz (80 mM) çözeltisi ile reaksiyon yapıldı ve ürünler TLC metodu ile incelendi.

3.2.7.9. Dietilpyrokarbonat (DEP) İle İmmobilize Dekstransükraz Modifikasyonunda Modifikasyon Süresinin Akseptör Ürünlerinin Oluşumuna Etkisi

İmmobilize dekstransükraz bead'leri hazırlandı ve 7 gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu olmak üzere DEP ile muamele edilmedi. Diğer grup bead'ler, 1 M maltoz içeren kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle karıştırıldıktan (20 dakika) sonra DEP çözeltisi [102 mM (etanolda hazırlanmış)] ilave edilerek farklı sürelerde (5, 10, 15, 30, 45 ve 60 dakika) çalkalayıcıda (150 rpm) karıştırılmaya devam edildi. Süre sonunda bead'ler kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (25 mM, pH 5.4) yıkandı. Akseptör ürünleri oluşumu, serbest ve immobilize dekstransükraz sükroz (300 mM)+glukoz (300 mM) çözeltisi ile reaksiyon yapıldı ve oluşan ürünler TLC metodu ile incelendi.

3.2.8. Dekstransükraz İle Ekmek Mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) Birlikte-immobilizasyonu

3.2.8.1. Dekstransükraz Aktivite Tayini

Dekstransükrazın aktivite tayini, bölüm 3.2.1.1 de anlatıldığı şekilde yapıldı. Bir unit (U) dekstransükraz aktivitesi; belirtilen şartlar altında, dakikada 1µmol fruktoz oluşturan enzim miktarı olarak belirlendi.

3.2.8.2. Ekmek Mayası İnvertazın Aktivite Tayini

Ekmek mayası (50 mg), kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) ile hazırlanan sükroz (300 mM, 20 ml) içeren çözeltide 25°C de 15 dakika hızda karıştırılarak (500 rpm) reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda alınan numune (300 µl), saf suya (700 µl) ilave edilerek 10 dakika süre kaynatıldı. Reaksiyonda oluşan indirgen şeker miktarı DNS metodu ile belirlendi. Bir unit (U) invertaz

aktivitesi; yukarıda belirtilen şartlar altında, dakikada 1 μ mol indirgen şeker oluşturan maya miktarı olarak belirlendi.

3.2.8.3. Dekstransükraz ve Maya Aktivite Oranı Değişiminin Ürün Bileşimi Üzerine Etkisi

Dekstransükraz (DS, 0.3 mg/ml, 16.0 IU/ml) ve maya (M, 2.0 IU/mg) invertaz enziminin aktive oranları DS/M: 0.1 ; 0.25 ; 0.5 ; 1.0 ; 2.0 ; 4.0 ; 8.0 ve 10.0 olacak şekilde alınarak, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) kullanılarak hazırlanan sükroz çözeltisinde (final konsantrasyon 300 mM, 15 ml) 25°C de 1 saat karıştırılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda alınan numunelerde, oluşan oligosakkaritler TLC metodu ile belirlendi.

3.2.8.4. DEP ile Modifiye Edilen Dekstransükraz ve Mayanın Birlikte-İmmobilizasyonu

Dekstransükraz (2 ml, 32 IU), DEP çözeltisi [0.5ml, 102 mM (etanolda hazırlanmış)] ve kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (2.5 ml, 25 mM, pH 5.4) hazırlanan maltoz çözeltisi (final konsantrasyon 1000 mM) ile karıştırılarak 30 dakika süre ile muamele edildi. KH₂PO₄ çözeltisinde (pH 6.0, 100 mM) hazırlanmış histidin çözeltisi (1 ml, 1000 mM) ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra maya (1.6 mg, 3.2 IU) ve Na-Alginat çözeltisi [6 ml, %4 (w/v)] ile karıştırıldı ve karışım bir şırıngayla, kalsiyum asetat tampon çözeltisiyle (100 mL, 25 mM pH 5.4) hazırlanan CaCl₂ (%2 w/v) çözeltisine damlatılarak bead ler oluşturuldu. Bead ler bu çözeltide 1 saat bekletildikten sonra bead hazırlamada kullanılan tampon çözeltiyle yıkandı (8x10 ml). IMO eldesi, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) kullanılarak hazırlanan sükroz (300 mM) çözeltisinde (20 mL) 25°C de 3 saat yapıldı.

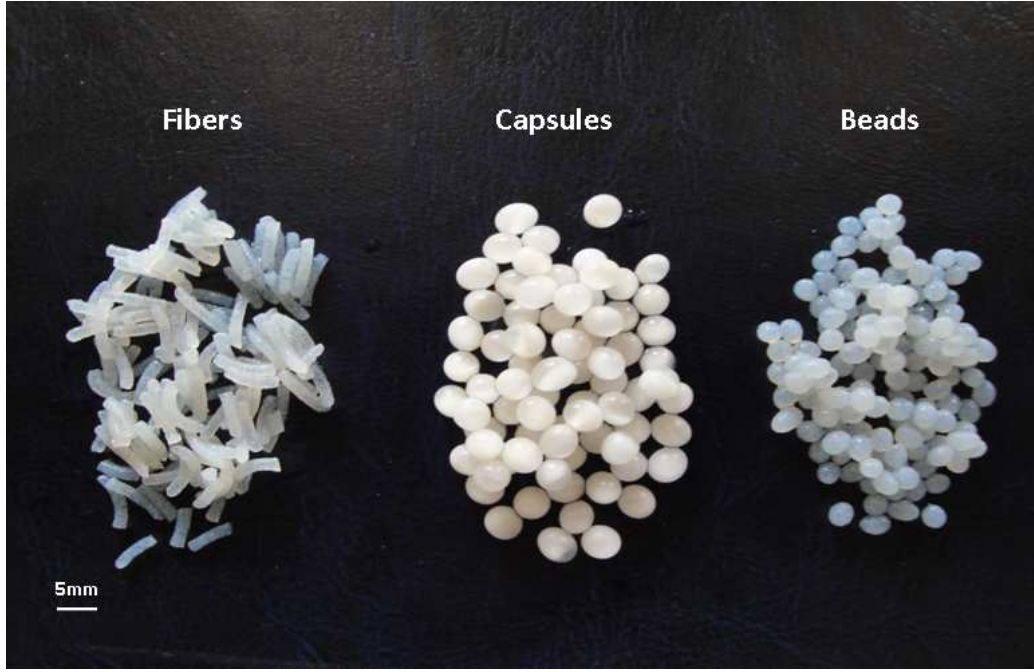
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Birlikte-İmmobilize Dekstransükraz ve Dekstranaz Kullanarak İzomaltooligosakkarit Üretimi

4.1.1. Dekstransükraz ve Dekstranaz'ın Alginat Kapsül, Bead ve Fiberlerde İmmobilizasyonu

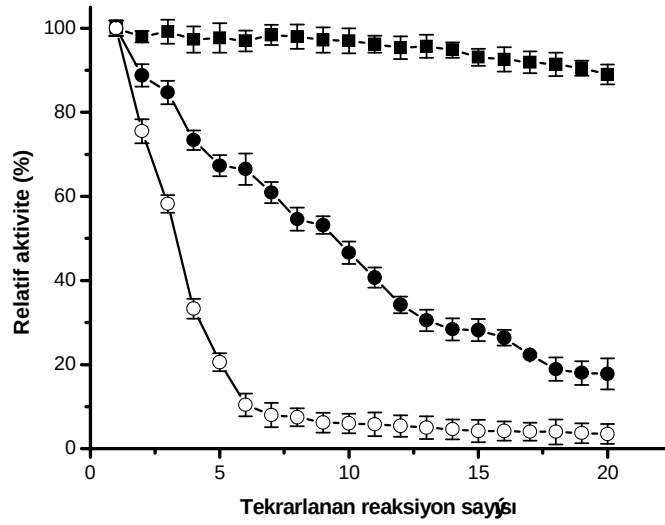
Dekstransükraz ve dekstranaz alginat matrislerde birlikte immobilize edilmeden önce, *Penicillium lilacinum* dekstranaz epoksi fonksiyonel grupları taşıyan ticari bir matriks olan Eupergit C üzerine %90 verimle kovalent olarak immobilize edildi [Aslan and Tanriseven, 2007]. Dekstranaz, dekstranı hidroliz ederek izomaltooligosakkarit üretir. Enzim literatürde, glutaraldehit ile aktive edilen kitosan [Naby et al, 1999], cam yüzey ve bentonit [Rogalski et al, 1998], [Madhu and Prabhu, 1985] gibi farklı metodlar kullanarak da immobilize edilmiştir. Dekstrandandan izomaltooligosakkarit üretiminde enzim kararlılığı açısından Eupergit C polimer beadlerine immobilize dekstranaz daha avantajlıdır.

Eupergit C ye kovalent bağlı dekstranaz ve serbest dekstransükraz alginat kapsül, bead ve fiberlerde başarılı bir şekilde ko-immobilize edildi (Şekil 4.1). En iyi sonuç, alginat kapsüller kullanılarak elde edildi (%71). Alginat fiber ve bead' ler ile elde edilen immobilizasyon verimleri ise sırayla %70 ve %64 tür. İmmobilizasyon verimi, birlikte-immobilize dekstransükraz-dekstranazın aktivitesinin immobilizasyonda kullanılan serbest dekstransükraz-dekstranazın aktivitelerine oranı olarak tanımlandı. Fruktoz ve oligosakkaritlerin (izomaltoz ve izomaltotrioz) oluşum hızları arasında bir korelasyon olduğu için aktivite belirlenirken fruktozun oluşum hızı kullanıldı.

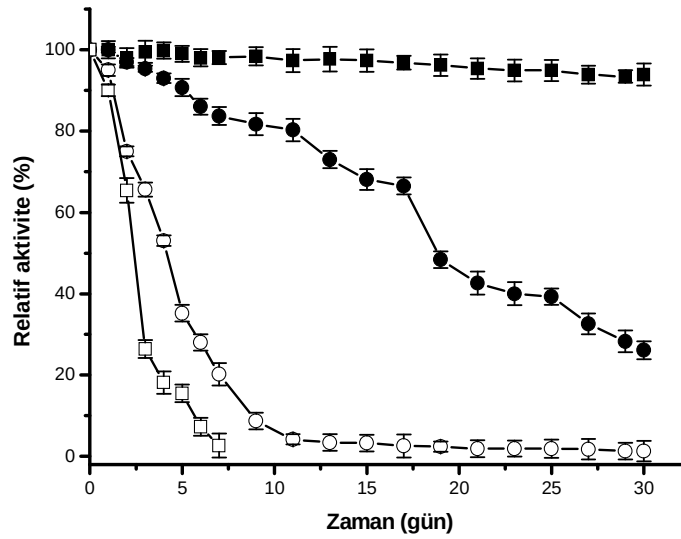


Şekil 4.1 Alginat fiber, kapsül ve bead’lerde birlikte-immobilize dekstransükraz-dekstranaz

Birlikte-immobilize enzimler süktrozdan izomaltooligosakkarit üretimi için kullanıldı. İmmobilize sistemde, dekstransükraz süktrozu dekstrana dönüştürürken, dekstranaz ise oluşan dekstranı izomaltooligosakkaritlere hidroliz eder. Kapsül içinde birlikte immobilize edilen enzimlerin uzun süre kullanılabilirliği gösterildi. Ard arda yapılan yirmi reaksiyon (Şekil 4.2) ve otuz gün süresince her gün (Şekil 4.3) yapılan aktivite testlerinde azalmalar olmadığı bulundu. İmmobilizasyon veriminin yüksek olması ve ayrıca birlikte-immobilize enzimlerin aktivitelerini 30 gün süresince koruması geliştirilen bu metodun süktrozdan oligosakkarit üretiminde uzun süreli olarak kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.2 Birlikte-immobilize dekstransükraz ve Eupergit C-immobilize dekstranazın kullanım kararlılığı: alginat kapsül (■), bead (○), fiber (●). İmmobilize enzimler kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (25mM, pH 5.4) hazırlanan sükröz çözeltisiyle (20ml, 300mM) 25°C de 3 saat reaksiyon yapıldı ve aktivite belirlendi.



Şekil 4.3 Birlikte-immobilize dekstransükraz ve Eupergit C-immobilize dekstranazın saklama kararlılığı: alginat kapsül (■), bead (○), fiber (●), maltoz kapsül (□). İmmobilize enzimler kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (25mM, pH 5.4) hazırlanan sükröz çözeltisiyle (20ml, 300mM) iki günde bir 25°C de 3 saat reaksiyon yapıldı ve aktivite belirlendi. +4°C de saklandı.

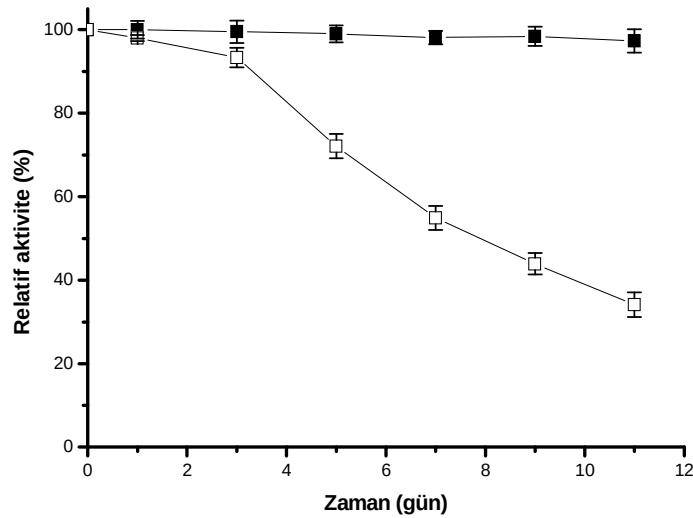
Alginat fiber ve bead'lerde birlikte-immobilize enzimlerde ise zamana bağı aktivitede azalmalar görüldü (Şekil 4.2). 30 gün içinde fiberlerde ve beadlerde aktivitede sırasıyla %74 ve %99 azalma gözlemlendi (Şekil 4.3). Bu aktivite azalmaları Eupergit C partiküllerinin zamanla alginat fiber ve bead yüzeylerinden ayrılması ve buna bağılı olarak dekstransükrazın açılan boşluklardan kaçmasıyla ya da immobilizasyon matrikslerinin yapısını bozan ve enzim reaksiyonlarını inhibe eden dekstranın matriks içinde birikimiyle açıklanabilir. Alginat fiber ve bead'lerde zamanla yumuşama ve şişmeler gözlenmesi bu açıklamayı desteklemektedir. Alginat kapsüllerde böyle bir problem görülmemektedir.

Literatürde dekstransükraz ve dekstranazın birlikte kullanımıyla ilgili bazı çalışmalar bulunmaktadır. Serbest dekstransükraz ve dekstranaz birlikte sükrozdan yüksek miktarda izomaltoz ihtiva eden bir şeker karışımının üretiminde kullanılmıştır [Paul et al, 1989]. Bir başka çalışmada Polonyalı bir grup, glutaraldehitte çapraz bağlanan dekstransükraz alginat beadler içinde immobilize edilerek serbest dekstranazla birlikte sükrozdan glukooligosakkarit üretiminde kullanılmıştır. Yaklaşık olarak %38 oranında bir aktivite verimi elde edilmiş ve herbiri 24 saat süren reaksiyonlar sonunda başlangıçta sükrozun %90'ı ürünlere dönüşürken 6. reaksiyon sonunda bu oran %60'a düşmüştür [Kubik et al, 2004]. İngiltere'de yapılan çalışmada ise serbest dekstransükraz ve dekstranaz birlikte izomaltooligosakkarit ve oligodekstran üretiminde kullanılmıştır [Goulas et al, 2004].

Literatürde dekstransükraz ve dekstranazın birlikte immobilizasyonuna dair bir Alman grubun çalışması bulunmaktadır. *Chaetomium erraticum* dekstranaz bentonit üzerine adsorplandıktan sonra dekstransükrazla birlikte alginat beadlerde izomaltooligosakkarit eldesi için immobilizasyon gerçekleştirilmiş. Fakat tekrarlanan altı reaksiyon sonunda başlangıç aktivitenin %25'inden daha az aktivite göstermiştir [Erhardt et al, 2006]. Aynı grup tarafından ko-immobilize enzimler izomaltoz sentezi için de kullanılmıştır [Erhardt et al, 2005].

4.1.2. Dekstransükrazın Aktivitesine Dekstranazın Etkisi

Serbest dekstransükraz ve serbest dekstranaz alginat kapsüllerde birlikte immobilize edildiler. Şekil 4.4 de görüldüğü gibi, 11 günde başlangıç aktivitesinin yalnızca %35'i kalmıştır. Aktivitedeki azalma, serbest dekstranazın kapsüllerden kaçması ve dekstransükraza bağlı bulunan dekstranın dekstranaz tarafından hidrolizi ya da dekstranaz karışımında az miktarda bulunan proteaz aktivitesinin dekstransükrazı inaktive etmesiyle açıklanabilir. Dekstransükrazın stabilitesini korumasında bağlı bulunan dekstranın önemli olduğu bilinmektedir [Willemot et al, 1988].



Şekil 4.4 Alginat kapsüllerde birlikte-immobilize serbest dekstransükraz ve serbest dekstranaz (□); serbest dekstransükraz ve Eupergit C-immobilize dekstranazın (■) saklama kararlılığı. Immobilize enzimler kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (25mM, pH 5.4) hazırlanan sükröz çözeltisiyle (20ml, 300mM) 25°C de 3 saat reaksiyon yapıldı ve aktivite belirlendi.

Dekstranazın alginat matrislerden kaçışını anlamak için, serbest dekstranaz alginat kapsül, bead ve fiberlerde immobilize edildi ve 3 saat süreyle tampon çözeltide karıştırıldığında çözeltide dekstranaz aktivitesi tesbit edildi. Dekstranaz enziminin molekül ağırlığı 35 kDa ve izoelektrik noktası 4.85 olduğundan dolayı, enzim alginat kapsüllerden, düşük molekül ağırlığı ve negatif yükü sebebiyle sızmaktadır. Ayrıca bu çalışmada kullanılan dekstranaz küçük miktarlarda proteaz, glukozamilaz, karboksimetilselülaz ve kitinaz aktiviteleri içeren ticari bir enzimdir [Rogalski et al, 1998].

Dekstransükrazın dekstranaz ile inaktive olduğu yapılan çalışmada görüldü. Dekstransükraz, dekstranaz ile çalışma koşullarında iki saat muamele edildiğinde başlangıç aktivitesinin %82 sini, dört saatte ise aktivitesinin %86 sını kaybettiği bulundu. Bu sonuçtan da anlaşıldığı üzere, dekstranazın serbest halde dekstransükrazla birlikte-immobilize edilmesi uygun değildir. Dekstransükraz, Eupergit C-immobilize dekstranaz ile alginat kapsüllerde birlikte immobilize edildiğinde aktivite azalması gözlenmemiştir (Şekil 4.3).

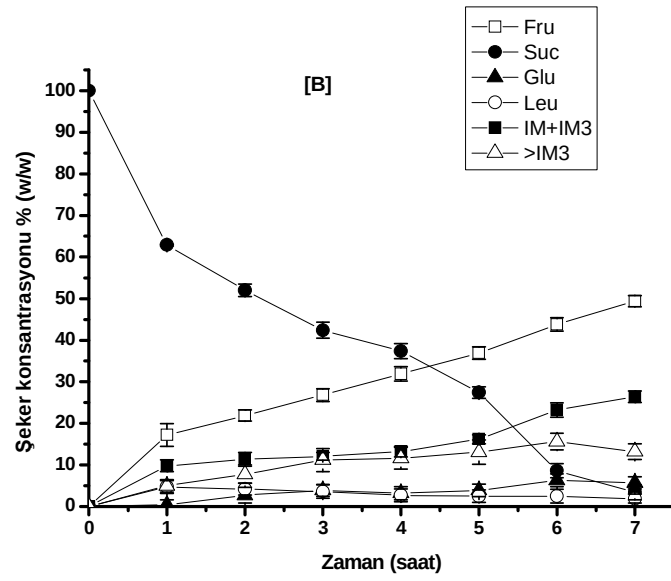
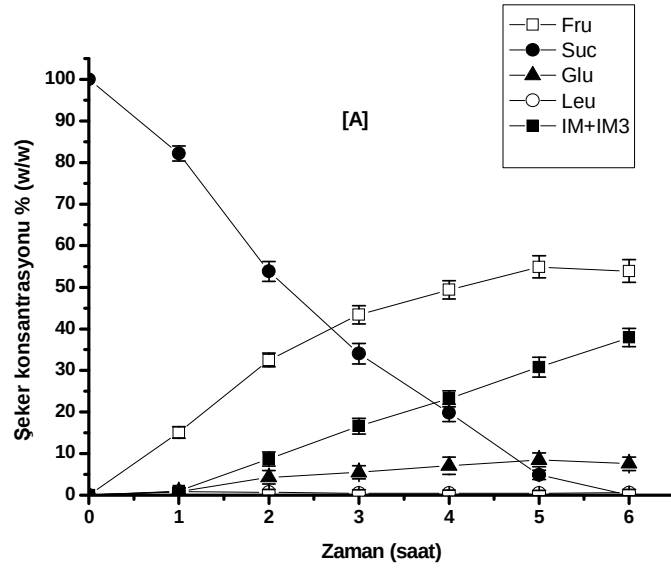
Yapılan çalışmalarda, alginat kapsüller hazırlanırken viskozite artırıcı olarak kullanılan nişastanın dekstransükrazi, dekstranazdan koruduğu bulundu. Koruma etkisini göstermek amacıyla ko-immobilizasyon sırasında nişasta yerine viskozite artırıcı olarak maltoz kullanıldı. Maltoz ile hazırlanan kapsüllerde birlikte immobilize enzimlerin 7 gün içinde aktivitelerini kaybettiği görüldü (Şekil 4.3). Nişastanın, dekstransükraza bağlı bulunan dekstranı hidroliz eden dekstranazdan dolayısıyla inaktivasyondan koruduğu açıktır. Serbest dekstranazda bulunan proteaz ise ya dekstranazın Eupergit C ye immobilizasyonu sırasında immobilize olmuyor ya da nişastanın koruma etkisinden dolayı dekstransükraz üzerinde aktif değildir.

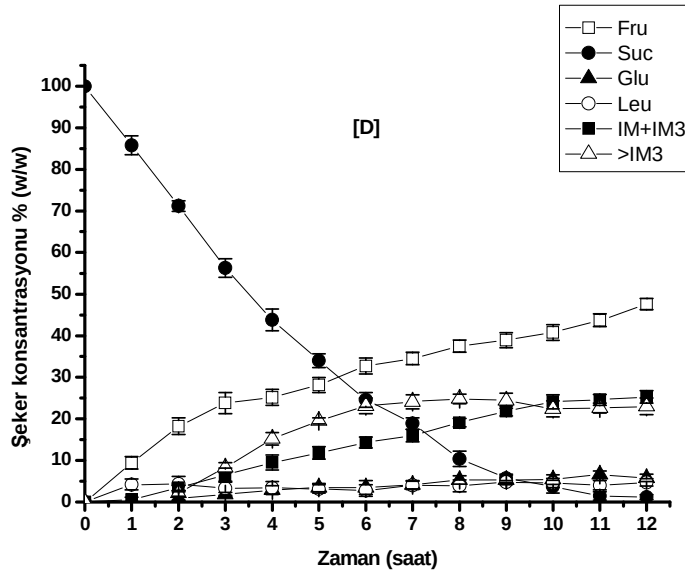
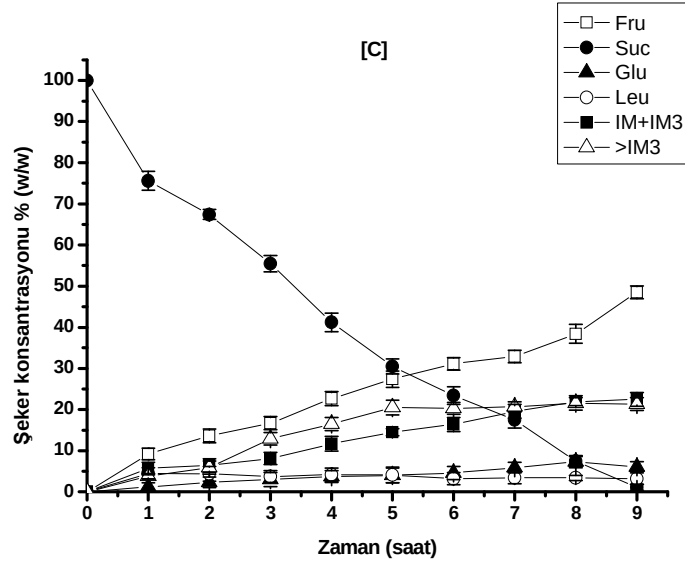
4.1.3. Birlikte-immobilize Dekstransükraz ve Dekstranaz ile Sükrozdan İzomaltooligosakkarit Üretimi

Alginat kapsüllerde birlikte immobilize dekstransükraz ve dekstranaz ve farklı konsantrasyonlarda [% 5, 10, 20 ve 40 (w/v)] sükroz çözeltileri ile reaksiyon gerçekleştirildi. Sükrozun tamamı konsantrasyonlara bağlı olarak sıra ile 6, 7, 9 ve 12 saatte ürünlere dönüştü. Saat başı alınan örneklerde, zamana bağlı ürün kompozisyonu değişimlerine bakıldı (Şekil 4.5). Sükroz konsantrasyonunun artmasıyla akseptör reaksiyonlarının oluşumu da artar [Tanrıseven and Robyt, 1993] ve böylece oligosakkaritlerin miktarının arttığı Şekil 4.5 de açıkça görülmektedir.

İzomaltotriozdan büyük oligosakkaritlerin şeker karışımındaki miktarları, sükroz konsantrasyonlarına [% 5, 10, 20 ve 40 (w/v)] göre sırasıyla % 1.1, 13.2, 18.7 ve 22.6 w/w olarak bulundu. Sükroz konsantrasyonuna bağlı olarak oligosakkaritlerin miktarı da artmaktadır. Şeker karışımlarında oligosakkarit yüzdesinin çoğunluğunu izomaltoz ve izomaltotrioz oluşturmaktadır. Bunların da miktarı sükroz konsantrasyonuna bağlı olarak, izomaltoz için; % 18.9, 14.7, 9.9 ve 11.0 w/w, izomaltotrioz için; % 17.9, 11.7, 12.6 ve 14.3 w/w olarak değişmektedir (Şekil 4.5).

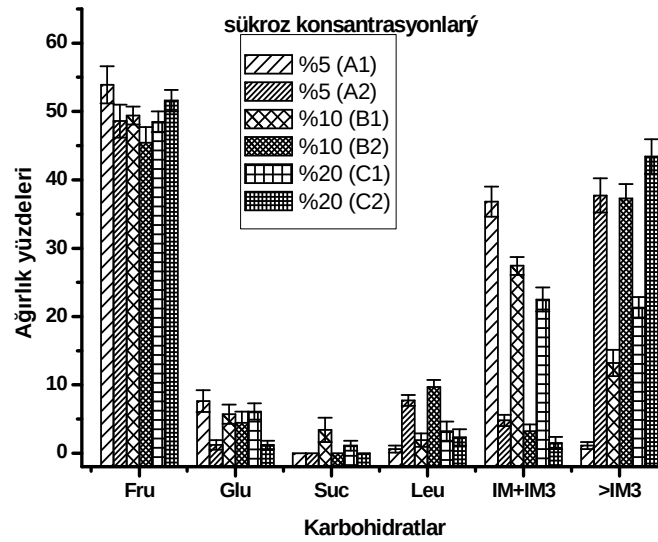
İzomaltooligosakkaritlerin üyesi olan izomaltoz ve izomaltotrioz ince bağırsakta kısmen sindirime uğrar. İzomaltozdan daha büyük olan oligosakkaritler prebiyotik vazifesi görürler ve bağırsaklarda bifidobakterilerin büyümesini artırır [Holzapfel and Schillinger, 2002].





Şekil 4.5 Alginat kapsüllerde birlikte-immobilize dekstransükraz ve Eupergit C-immobilize dekstranazın farklı konsantrasyonlarda sükröz { %5 (w/v) [A], %10 (w/v) [B], %20 (w/v) [C], %40 (w/v) [D] } ile reaksiyonunda oluşan ürünlerin zamana bağlı değişimi. Fru, fruktoz; Glu, glukoz; Suc, sükröz; Leu, lükroz; IM, izomaltoz; IM3, izomaltotrioz.

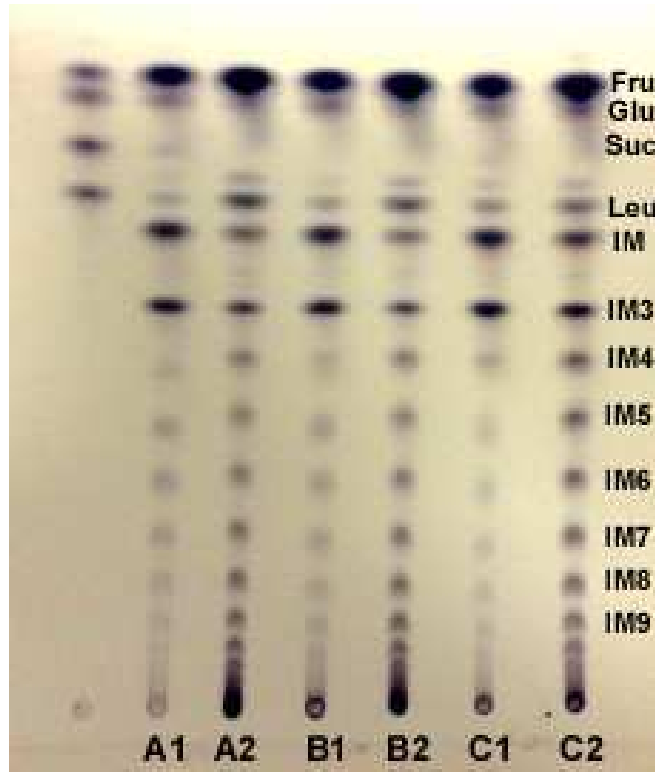
Prebiyotik oligosakkaritlerin miktarını artırmak için farklı konsantrasyonlardaki sükröz çözeltileriyle elde edilen reaksiyon karışımlarına sükröz ilave edildi ve alginat fiberlerde immobilize dekstransükraz ile reaksiyon yapıldı. Çözelti karışımlarındaki izomaltoz ve izomaltotrioz dekstransükraz için akseptör şekerlerdir. Bu ikinci basamakta dekstransükrazın akseptör reaksiyonları kullanılarak küçük oligosakkaritler (izomaltoz, izomaltotrioz), izomaltotriozdan daha büyük oligosakkaritlere dönüştürüldü (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Üretilen şeker karışımlarının kompozisyonu. A1, B1 ve C1; ko-immobilize dekstransükraz-dekstranazın farklı konsantrasyonlarda sükröz [% 5, 10 ve 20 (w/v)] ile 25°C de 9 saat reaksiyonundan sentezlenen şeker karışımı. Sonra karışımlara farklı miktarlarda sükröz (4, 3 ve 2g) ilave edildi ve fiberlerde immobilize dekstransükraz ile 25°C de 12 saat reaksiyon yapıldı, sırasıyla A2, B2 ve C2 şeker karışımları elde edildi.

Fru, fruktoz; Glu, glukoz; Suc, sükröz; Leu, lükroz; IM, izomaltoz; IM3, izomaltotrioz.

Şekil 4.6 da görüldüğü gibi, izomaltotriozdan büyük oligosakkaritlerin miktarı süktroz konsantrasyonuna [% 5, 10 ve 20 (w/v)] bağılı olarak sırasıyla %1.1, 13.2 ve 18.7 (w/v) den %37.7, 37.3 ve 43.4'e (w/v) yükseldi. İkinci reaksiyonda, ortamdaki fruktoz da akseptör etkisi gösterdiğinden lükroz miktarlarında da artış görüldü. TLC analizinden de izomaltoz ve izomaltotrioz miktarlarının azaldığı, buna karşılık izomaltotriozdan büyük oligosakkaritlerin miktarlarının arttığı açıkça görülmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 (A1, B1, C1) ve (A2, B2, C2) şeker karışımlarının TLC analizi

Fru, fruktoz; Glu, glukoz; Suc, süktroz; Leu, lükroz; IM, izomaltoz; IM3, izomaltotrioz; IMn, izomaltotriozdan büyük oligosakkaritler.

İzomaltooligosakkarit üretimi sükroz çözeltisinden, dekstransükraz ve dekstranaz serbest halde kullanılarak da denendi. Fakat dekstranazın dekstransükrazı inaktivasyonundan dolayı sükrozun ürünlere dönüşmediği görüldü.

Böylece yapılan bu çalışmada *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC-13 Glc dekstransükraz ve *Penicillium lilacinum* dekstranazın başarılı bir şekilde birlikte immobilize edildiği ve sükrozdan izomaltooligosakkaritlerin yüksek oranda üretildiği görülmektedir. Geliştirilen bu metod prebiyotik üretiminde etkili bir şekilde kullanılabilir.

4.2. İzomaltoz Üretimi

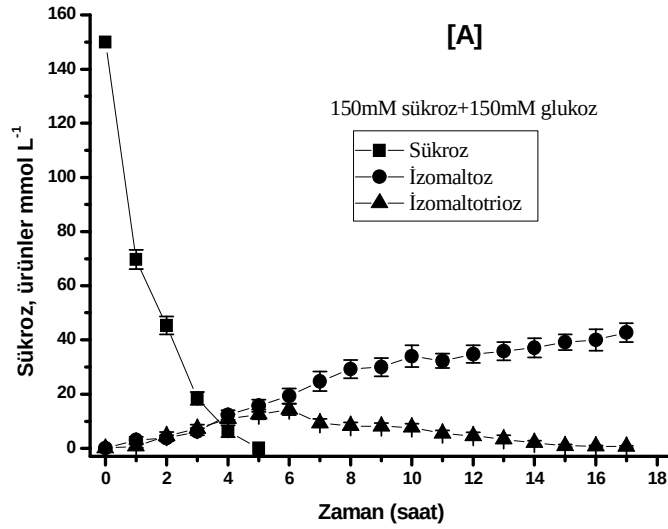
İzomaltoz eldesi için sükroz, glukoz, birlikte-immobilize dekstransükraz ve dekstranaz kullanıldı. Dekstransükraz için yan ürün fruktoz akseptör etki gösterdiği ve lükroz oluştuğu için, fruktozun akseptör etkisini en aza indirmek amacıyla sükrozla birlikte substrat olarak glukoz kullanıldı. Fruktoz ve glukoz akseptör bölgesi için yarışma halindedir. Reaksiyon sırasında glukoz akseptör etkisi ile dekstranı ve oligosakkaritlerin ayrılmasını sağlayarak dekstransükraz reaksiyonlarını sonlandırır. Dekstranaz ise dekstranı parçalayarak izomaltoz ve izomaltotriozu oluşturur.

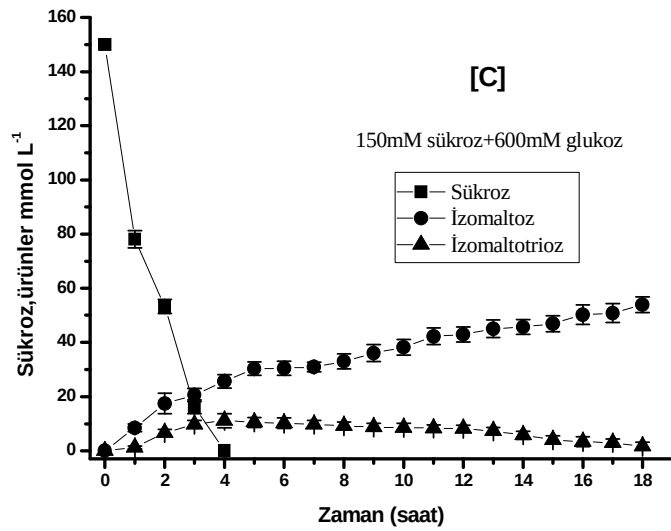
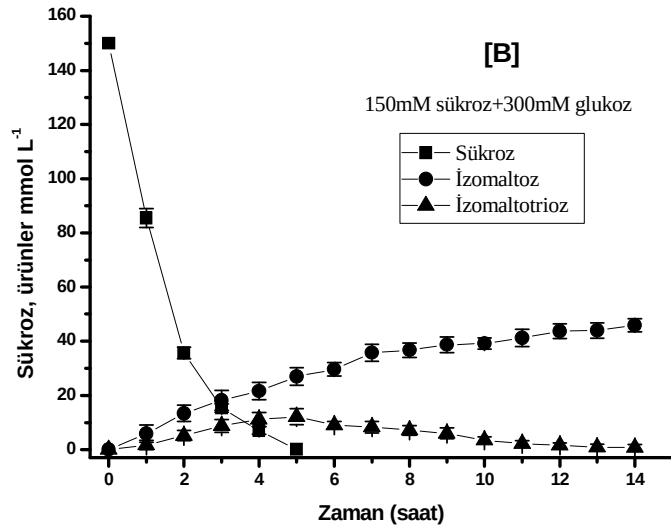
Sükroz+glukoz çözeltisi, birlikte-immobilize dekstransükraz ve dekstranaz reaksiyonu sonunda izomaltoz, izomaltotrioz, glukoz ve fruktoz içeren karışım elde edildi. İkinci aşamada Eupergit C de immobilize dekstranaz ile reaksiyona devam edilerek izomaltotriozun da izomaltoza dönüşmesi sağlandı. Üçüncü aşamada, fruktoz ve glukozu uzaklaştırmak için immobilize maya kullanıldı.

Dekstransükraz ve dekstranaz ikili enzim sisteminde yalnız sükroz kullanılsaydı izomaltoz oluşumu yüzde verim olarak ifade edilebilirdi. Sükrozla birlikte akseptör olarak glukoz kullanıldığı için molar verim ifadesi kullanılmaktadır; molar verim= $Y_{IM/S}$; IM, izomaltoz; S, sükroz [Erhardt et al, 2008].

Bu çalışmada birlikte-immobilize enzimler farklı oranlarda glukoz/sükroz konsantrasyonları ile çalışıldı (sük:150-600 mM; glu:150-600 mM). Molar oranlar, ($\text{mol}_{\text{glk}} \text{mol}_{\text{sük}}^{-1}$) 0.25-4.00 arasında değişmektedir. Bu oran 1'in altında olduğunda ürün izomaltoz dekstranazın oluşan dekstranı hidrolizi yoluyla meydana gelir. Oran 10'un üzerinde olduğunda ise, izomaltoz dekstransükrazın akseptör reaksiyonları yoluyla oluşur [Erhardt et al, 2008]. Glukoz/sükroz konsantrasyonu 1-10 arasında her iki enzimde izomaltoz oluşumunda rol alır.

Birinci basamak, farklı konsantrasyonlardaki sükroz (150, 300 ve 600 mM) ile kombine edilen glukoz (150, 300 ve 600 mM) çözeltileri ve alginat kapsüllerde ko-immobilize dekstransükraz ve dekstranaz ile reaksiyon yapılarak gerçekleştirildi. İkinci basamakta birlikte-immobilize enzimler çözeltiden uzaklaştırıldı ve reaksiyona immobilize dekstranaz ile devam edildi.





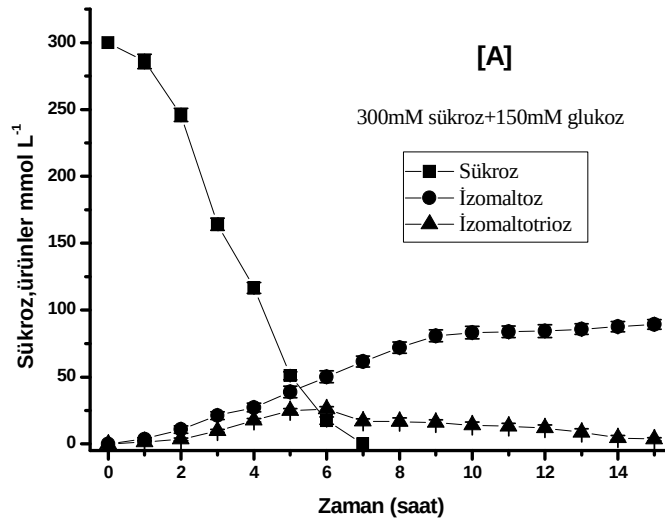
Şekil 4.8 Alginat kapsüllerde ko-immobilize dekstransükraz ve dekstranazın sükröz (150 mM) ve farklı konsantrasyonlarda glukoz {150 mM [A], 300 mM [B], 600 mM [C]} ile reaksiyonunda oluşan ürünlerin zamana bağlı değişimi. Sükröz bittiği an birlikte-immobilize sistem ayrıldı ve immobilize dekstranaz ile reaksiyona devam edildi.

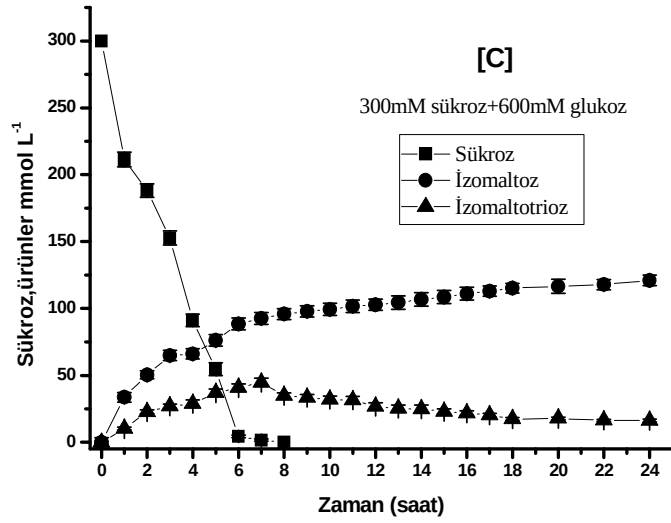
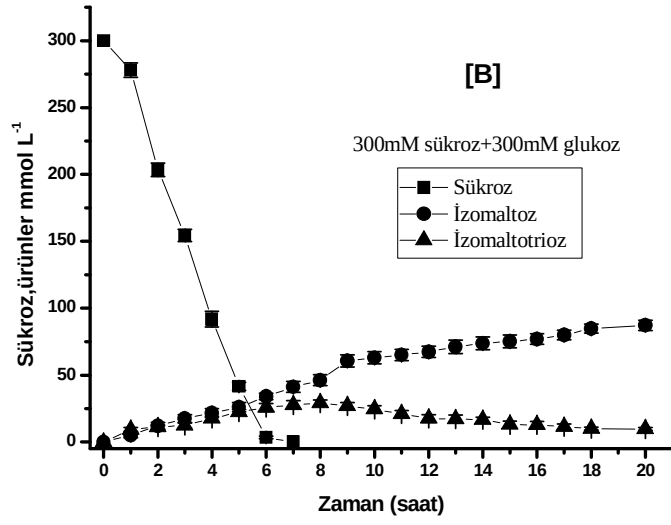
150 mM sükröz ve 150 mM glukoz ile başlanan izomaltoz eldesinde, birinci adımda sükröz birlikte-immobilize sistem tarafından 5 saatte tüketildi. Oluşan izomaltoz miktarı 5.4 g/l, izomaltotrioz miktarı 12.5 g/l dir. İkinci adımda, immobilize dekstranaz ile reaksiyona devam edildi ve izomaltotrioz miktarı

azalırken, izomaltoz miktarı arttığı görüldü (Şekil 4.8 A). Birinci ve ikinci adım reaksiyonları grafiklerde birleştirilmiştir. Sonuç olarak izomaltoz ve izomaltotrioz konsantrasyonları sırasıyla 42.7 ve 0.56 mM (14.6 ve 0.28 g/l) ve molar verim, $Y_{IM/S}=0.28$ olarak hesaplandı.

150 mM sükroz ve 300 mM glukoz ile başlanan izomaltoz eldesinde de, birinci adımda sükroz birlikte-immobilize sistem tarafından 5 saatte tüketildi. Oluşan izomaltoz ve izomaltotrioz miktarları 9.2 g/l ve 6.1 g/l dir. İkinci basamak dekstranaz reaksiyonu sonunda izomaltoz ve izomaltotrioz miktarları sırasıyla 15.7 ve 0.33 g/l (45.9 ve 0.66 mM) ve molar verim, $Y_{IM/S}=0.31$ olarak hesaplandı (Şekil 4.8 B).

150 mM sükroz ve 600 mM glukoz substrat ile yapılan reaksiyonlarda ise sükroz 4 saatte bitti. Akseptör konsantrasyonunun artışına bağlı olarak sükrozun tüketim hızı da artmaktadır. Sükrozun tüketildikten sonraki izomaltoz miktarı 8.8 g/l, izomaltotrioz miktarı ise 5.6 g/l dir. İkinci adımda dekstranaz ile muameleden sonra izomaltoz ve izomaltotrioz miktarları sırasıyla 18.4 ve 0.83 g/l (53.9 ve 1.66 mM) ve molar verim $Y_{IM/S}=0.36$ olarak hesaplandı (Şekil 4.8 C).



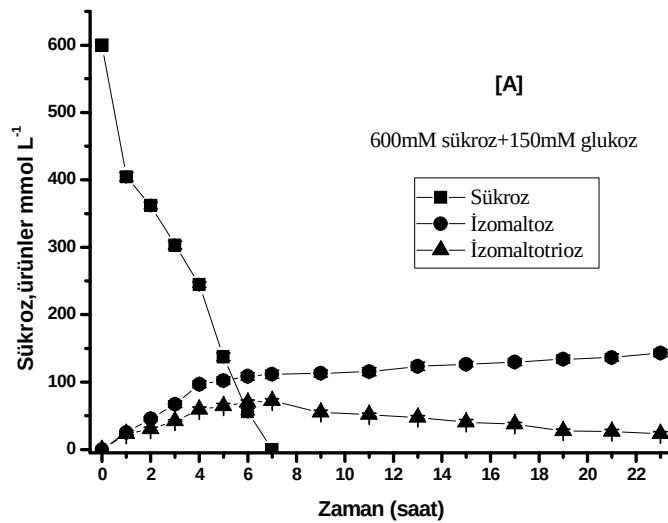


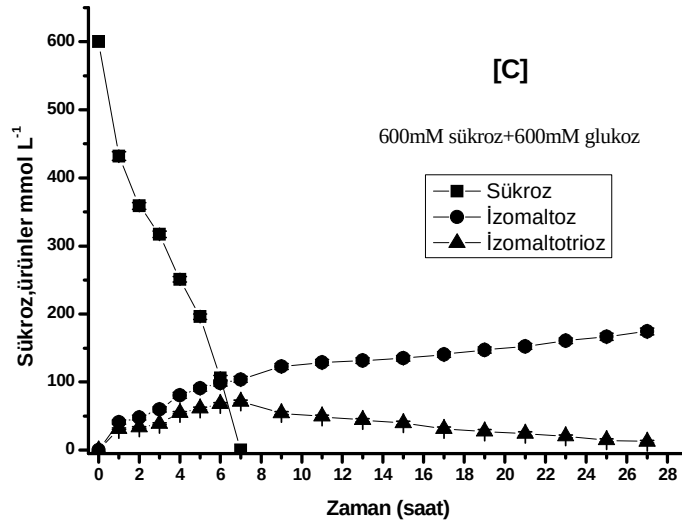
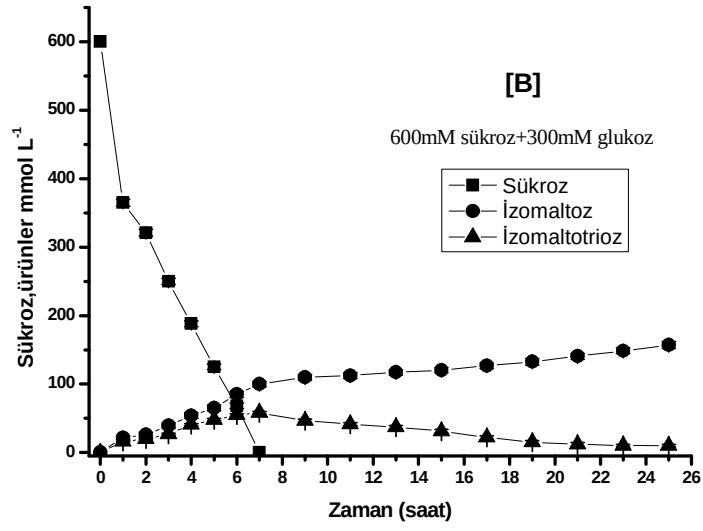
Şekil 4.9 Alginat kapsüllerde birlikte-immobilize dekstransükraz ve immobilize dekstranazın sükröz (300 mM) ve farklı konsantrasyonlarda glukoz {150 mM [A], 300 mM [B], 600 mM [C]} ile reaksiyonunda oluşan ürünlerin zamana bağlı değişimi. Sükröz bittiği an ko-immobilize sistem ayrıldı ve immobilize dekstranaz ile reaksiyona devam edildi.

300 mM sükröz ve 150 mM glukoz kullanılan reaksiyonda, sükröz birlikte-immobilize sistem tarafından 7 saatte tüketildi ve izomaltoz miktarı 21.1 g/l, izomaltotrioz miktarı 8.6 g/l olarak hesaplandı. Daha sonra immobilize dekstranaz ile reaksiyona devam edildi. Sonuç olarak izomaltoz ve izomaltotrioz miktarları sırasıyla 30.6 ve 1.71 g/l (89.4 ve 3.4 mM) ve molar verim $Y_{IM/S}=0.30$ hesaplandı (Şekil 4.9 A).

300 mM sükröz ve 300 mM glukoz kullanılan reaksiyonda sükröz birlikte-immobilize sistem tarafından 7 saatte tüketildi. Reaksiyonların sonunda izomaltoz miktarı 14.1 g/l den 29.8 g/l ye artarken, izomaltotrioz miktarı ise 14.0 g/l den 4.94 g/l ye azaldı. Konsantrasyonları ise 87.2 ve 9.8 mM, molar verim $Y_{IM/S}=0.29$ olarak hesaplandı (Şekil 4.9 B).

300 mM sükröz ve 600 mM glukoz substrat ile yapılan reaksiyonlarda ise sükröz 8 saatte bitti ve izomaltoz miktarı 32.7 g/l, izomaltotrioz miktarı 17.5 g/l dir. Dekstranaz ile reaksiyondan sonra izomaltoz ve izomaltotrioz miktarları sırasıyla 41.4 ve 8.2 g/l (121 ve 16.2 mM) ve molar verim $Y_{IM/S}=0.40$ olarak hesaplandı. Sükröz konsantrasyonunun artışına bağlı olarak izomaltoz miktarı da artmaktadır (Şekil 4.9 C).



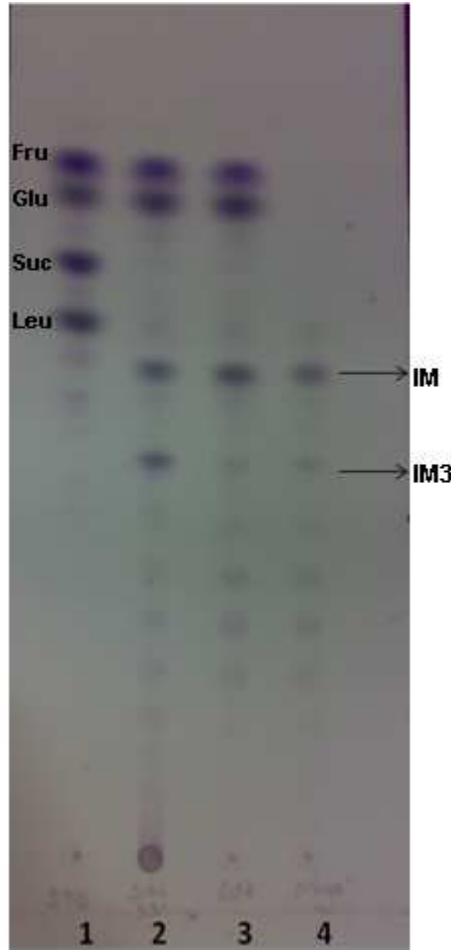


Şekil 4.10 Alginat kapsüllerde birlikte-immobilize dekstransükraz ve immobilize dekstranazın sükröz (600 mM) ve farklı konsantrasyonlarda glukoz {150 mM [A], 300 mM [B], 600 mM [C]} ile reaksiyonunda oluşan ürünlerin zamana bağlı değişimi. Sükröz bittiği an ko-immobilize sistem ayrıldı ve immobilize dekstranaz ile reaksiyona devam edildi.

Bu denemede ise 600 mM süktroz ve farklı konsantrasyonlarda glukoz kullanıldı. Her üç glukoz konsantrasyonunda süktroz birlikte-immobilize sistem tarafından 7 saatte tüketildi. Sonuç olarak 600 mM süktroz ve 150 mM glukoz kullanıldığında izomaltoz ve izomaltotrioz miktarları sırasıyla 38.1 g/l den 49 g/l ye ve 36.4 g/l den 11.8 g/l ye değışti. Son konsantrasyonlar 143.2 ve 23.5 mM ve molar verim $Y_{IM/S}=0.24$ hesaplandı (Şekil 4.10 A). 600 mM süktroz ve 300 mM glukoz ile reaksiyonda, izomaltoz miktarı 34.1 g/l den 53.7 g/l (157 mM) ye artarken, izomaltotrioz miktarı ise 29.2 g/l den 4.9 g/l (9.7 mM) ye azaldı. Molar verim $Y_{IM/S}=0.26$ olarak hesaplandı (Şekil 4.10 B). 600 mM süktroz ve 600 mM glukoz ile yapılan reaksiyonlarda ise, izomaltoz ve izomaltotrioz miktarları süktroz tüketildikten sonra 35.6 g/l ve 36.0 g/l iken dekstranaz reaksiyonundan sonra sırasıyla 59.7 (174.5 mM) ve 6.3 g/l (12.5 mM) olarak hesaplandı. Molar verim ise $Y_{IM/S}=0.29$ hesaplandı (Şekil 4.10 C).

En yüksek izomaltoz miktarları 600 mM süktroz ile yapılan reaksiyonlarda meydana geldi. Substrat konsantrasyonu artışına bağı olarak izomaltoz miktarı da artmaktadır. İzomaltoz miktarları 14.6-59.7 g/l arasında değışmektedir. Fakat reaksiyonların molar verimi aynı oranda artmamaktadır. $Y_{IM/S}=0.24-0.40$ arasında değışmekte, en düşük verim; 600 mM süktroz+150 mM glukoz ve en yüksek verim; 300 mM süktroz+600 mM glukoz ile yapılan reaksiyonlarda elde edilmiştir. 300 mM süktrozla en yüksek verim hesaplanmasına rağmen kalan izomaltotrioz miktarı da fazladır (8.17 g/l). Artan substrat konsantrasyonuna bağı olarak, izomaltotrioz miktarları da artmakta ve 0.28-8.17 g/l arasında değışmektedir. Çünkü substratın konsantrasyonu arttıkça oluşan akseptör ürünlerinin miktarı da artmaktadır. Bu yüzden reaksiyonun ikinci aşamasında immobilize dekstranaz ile muamelede izomaltotriozun tamamının izomaltoza dönüşümü de güçleşmektedir ve çözeltide artan miktarlarla kalmaktadır. Bu yüzden saf olarak izomaltoz üretiminin üçüncü aşaması olan immobilize maya ile fruktoz ve glukozun uzaklaştırılması basamağına en az miktarda (0.28 g/l) izomaltotrioz içeren, 150 mM süktroz ve 150 mM glukoz ile reaksiyon yapılan karışım ile devam edildi. Karışımdan immobilize dekstranaz süzülerek uzaklaştırıldı ve alginat bead'lerde immobilize maya eklendi ve 35°C de 3 saat süre ile muameleye devam edildi, fruktoz ve glukozun tamamı maya tarafından tüketildi. Sonra immobilize maya bead'leri karışımdan hemen uzaklaştırıldı ve

izomaltoz %82 w/w saflıkla elde edildi. Yapılan TLC analizinde izomaltoz yüksek saflıkla elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 İzomaltoz eldesi basamaklarının TLC analizi. Fru, fruktoz; Glu, glukoz; suc, süktroz; Leu, lükroz (1); süktroz (150 mM) + glukoz (150 mM) ile birlikte-immobilize dekstransükraz ve dekstranazın reaksiyonu (2); Eupergit C de immobilize dekstranaz ile reaksiyon (3); alginat beadlerde immobilize maya ile muamele (4); IM, izomaltoz; IM3, izomaltotrioz.

En yaygın monosakkaritlerden olan glukoz, fruktoz, mannoz ve galaktoz maya (*Saccharomyces cerevisiae*) tarafından hızla fermente edilir ve ortamdan uzaklaştırılır. Monosakkaritlerin uzaklaştırılmasında birincil reaksiyonlar anaerobik glikolizdir ve karbohidrat etanol ve CO₂'e dönüşür. Karbohidratın anaerobik glikolizinin son ürünleri CO₂'e dekarboksile olan piruvik asit ve asetaldehittir. Asetaldehit ise NADH reaksiyonu ile etanole indirgenir. Disakkaritlerden maltoz ve sükroz da tamamen *S.cerevisiae* fermentasyonu ile uzaklaştırılabilir. Maltoz, maya α -glukosidazı tarafından iki glukoz birimine hidroliz olur ve sonra glukozlar fermente olur. Sükroz ise maya invertazı ile glukoz ve fruktoz birimlerine hidroliz olduktan sonra fermente edilir. İzomaltoz ise maya α -glukosidazı tarafından çok yavaş hidroliz edildiği için deney şartlarında fermentasyona karşı dirençlidir. β -bağı içeren disakkaritler; sellobioz ve laktoz gibi, trisakkaritler ve tetrasakkaritler maya α -glukosidazı tarafından hidroliz edilemediği için fermente olamazlar [Yeon et al, 2003].

İzomaltoz üretimine dair literatürde birkaç çalışma bulunmaktadır. Nişastanın amiloglukosidaz ile muamelesiyle %10 verimle izomaltoz elde edilmiştir [Harder et al, 1983]. Bir Alman grup, dekstransükrazın akseptör reaksiyonları yoluyla izomaltoz oluşumu sırasında, izomaltozu zeolite adsorbe ederek reaksiyon ortamından ayırmıştır (safılık %80) [Holtkamp et al, 2009]. İzomaltozun zeolite karşı yüksek affinitesi vardır [Berensmeimer and Buchholz, 2004]. Fakat zeolitten kaynaklı problemler oluşmaktadır. Reaksiyon ortamındaki su zeolit adsorpsiyon kapasitesini azaltmaktadır. Ayrıca izomaltozun desorbe edilme işlemi 70°C de 50 saatten fazla sürmektedir. Ard arda yapılan deneylerde, zeolit suda yarılanma ömrü 50 saat iken, kolonda sürekli sistemde yapılan deneylerde ise yarılanma ömrü 7 saate düşmektedir.

Yine bir Alman grubun çalışmasında, serbest ve immobilize dekstransükrazın glukoz ile akseptör reaksiyonları çalışılmış ve sükroz ile glukozun konsantrasyonları değiştirilerek izomaltoz elde edilmiştir [Berensmeimer et al, 2006]. Dekstran oluşumu glukoz konsantrasyonu artırılarak baskılanmıştır. En iyi sonuç 250 mM sükroz ile birlikte kullanılan yüksek glukoz konsantrasyonunda (2523 mM;500 g/l) alınmış, yaklaşık 60 mmol/l izomaltoz ve yanında diğer oligosakkaritler (izomaltotrioz;~20 mM ve izomaltotetraoz;~15 mM) üretilmiş. Dekstransükraz

alginate bead'lerde immobilize edildiği için, reaksiyonda oluşan dekstran bead'lerden dışarı çıkmadığı ve difüzyon problemleriyle birlikte bead'lerde bozulmalar olduğu gözlenmiştir. Bu grup aynı çalışmayı fluidized bed reaktör sisteminde de çalışmıştır [Ergezinger et al, 2006]. Benzer sonuçlar elde edilmiş ve reaktör sistemiyle ürün verimi %25'e çıkarılabilmektedir.

Bir patent çalışmasında, polimerizasyon derecesi 2 olan sakkaritlerin çoğunlukta olduğu (%20-50 w/w) oligosakkarit şurupları üretilen bir proses geliştirilmiştir [US Patent, 2003]. Bu proseste; nişastanın hidrolizinde kullanılan glukoamilaz enziminin, yüksek glukoz konsantrasyonunda oluşan geri-hidroliz reaksiyonları kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (%40-50 w/w) glukoz çözeltileriyle yüksek sıcaklıklarda (50-80°C) farklı kaynaklardan glukoamilazlar ile oligosakkarit karışımları üretilmiştir. Ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon yöntemleri kullanarak oligosakkarit karışımları polimerizasyon derecelerine göre ayrılmış ve di-, tri- ve tetra sakkarit karışımı elde edilmiştir.

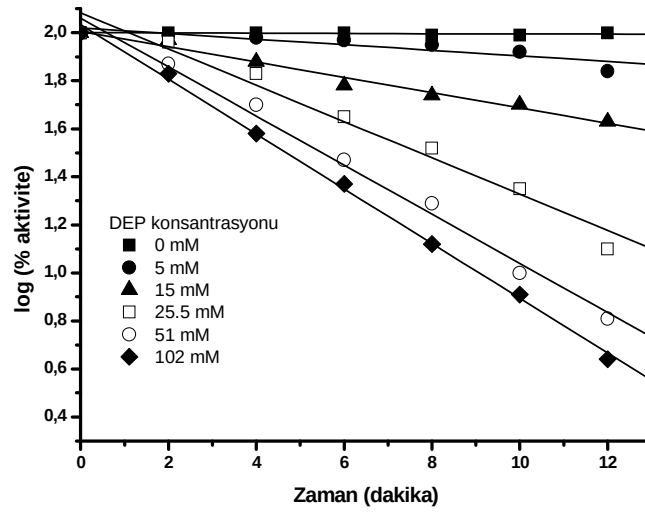
Başka bir çalışmada; *Streptococcus oralis* glukozil transferazın glukozilasyon affinitesi yüksek genetik varyantları ile izomaltoz eldesi çalışılmıştır. Bu enzimlerin özelliği; kaynağına kıyasla hidroliz aktiviteleri %11, akseptör ürün oluşturmaları %89 daha fazladır. Bu çalışmada da izomaltoz zeolite adsorbe edilerek saflaştırılmış [Erhardt et al, 2010] ve diğer çalışmalarda olduğu gibi, zeolit adsorpsiyon-desorpsiyon problemleriyle karşılaşmıştır. Erhardt ve arkadaşları alginate bead'lerde ko-immobilize dekstransükraz ve dekstranaz ile izomaltoz eldesini çalışmıştır [Erhardt et al, 2005] [Jördening et al, 2008]. Çalışmada 88 mM sükröz ve 450 mM glukoz karışımı kullanarak oluşan izomaltoz zeolite adsorbe edilerek karışımdan uzaklaştırılmıştır (32 mM izomaltoz). İmmobilizasyon sisteminde dekstransükrazın dekstranaz varlığında aktivitesini kaybetmesi sebebiyle ve dekstranazın bentonite adsorbe edilerek immobilizasyonu yönteminde enzimin kararlılığını koruyamamasından dolayı bu sistemin izomaltoz üretiminde uzun süre kullanımını olanaksız yapmaktadır.

Birbirinin benzeri olan bu çalışmalardaki en büyük problem glukoz konsantrasyonunun seçiminde yaşanmaktadır. Yüksek glukoz konsantrasyonu izomaltaz verimini artırırken adsorbent olarak kullanılan zeolitin seçiciliğini azaltmaktadır. Glukozun konsantrasyonu yükseldikçe akseptör etkisi artar, bunun anlamı; dekstransükrazın dekstran üretimi baskılanır, izomaltaz miktarı artar. Tez çalışmasında düşük glukoz konsantrasyonlarında da izomaltaz verimini artırabilmek amacıyla birlikte-immobilize dekstransükraz ve dekstranaz kullanıldı. Birlikte-immobilize sistemdeki dekstranaz oluşan dekstranı hidroliz ederek; ikinci aşamada kullanılan immobilize dekstranaz da oligosakkaritleri hidroliz ederek izomaltaz miktarını artırır. Üçüncü aşamada ortamdaki fruktoz ve glukoz, immobilize maya ile uzaklaştırıldı ve %82 w/w saflıkla izomaltaz elde edildi. Böylece adsorbent malzeme kullanımına ve adsorbentin optimizasyonu çalışmalarına gerek kalmamaktadır.

4.3. Dietilpirokarbonat (DEP) ile Dekstransükrazın Modifikasyonu

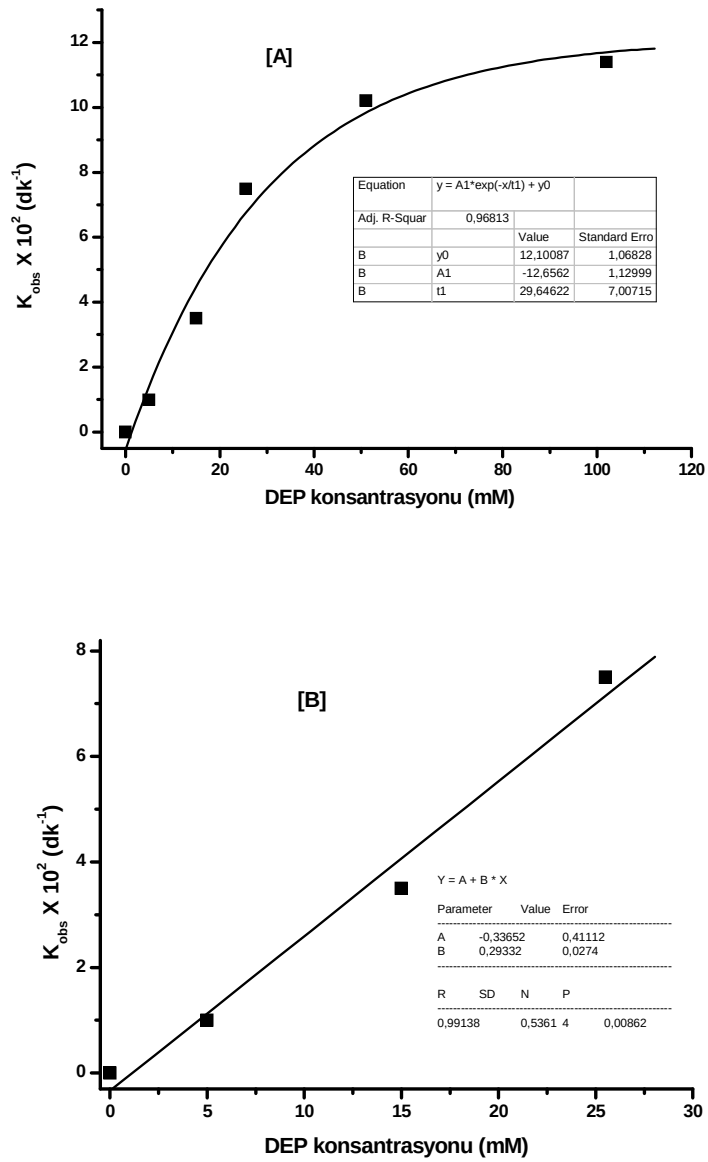
4.3.1. Dietilpirokarbonat (DEP) ile Serbest Dekstransükrazın Modifikasyonu

Dekstransükraz farklı konsantrasyonlarda DEP ile muamele edildiğinde zamana bağlı enzim aktivitesindeki azalma görüldü. Aktivitelerin logaritmik değerlerine bakıldığında inhibitör etkisi beş konsantrasyon değerinde de lineerdir (Şekil 4.12).



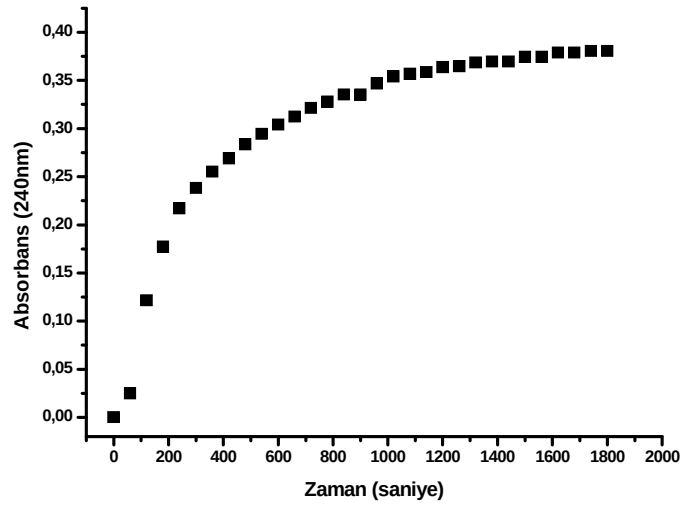
Şekil 4.12 Farklı konsantrasyonlarda DEP ile dekstransükrazın inaktivasyonu. Fosfat tampon çözeltisinde (100 mM, pH 6.0) dekstransükraz (0.5 mg protein/ml, 24 IU/ml) ile DEP (5-102 mM) değişik sürelerde (0-12 dk) muamele edildi. Alınan örnekler (0.4 ml), fosfat tampon çözeltisinde (pH 6.0, 100 mM) hazırlanmış histidin çözeltisine (20 mM, 3.6 ml) ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Aktivite 3.2.7.2. de belirtilen metodla tayin edildi.

Bu grafikteki doğruların eğimleri alınarak K_{obs} (pseudo first-order hız sabitleri) hesaplandı ($1.00, 3.50, 7.50, 10.2$ ve $11.4 \times 10^2 \text{ dk}^{-1}$). DEP konsantrasyonuna karşı K_{obs} değerleri grafiğe aktarıldı (Şekil 4.13) ve grafiğin lineer artış gösterdiği aralığı alınarak çizilen grafiğin de eğimi alınarak reaksiyonun ikinci derece hız sabiti $2.93 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.13 DEP ile dekstransükrazın inaktivasyon kinetiği. Şekil 4.12 deki doğruların eğimleri alınarak hesaplanan K_{obs} -DEP (mM) grafiği [A] ve ikinci derece hız sabitinin hesaplandığı grafik [B].

Dietilpirokarbonat (DEP) ile dekstransükrazın modifikasyonu 240nm de absorbans artışıyla da gözlemlendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 DEP modifikasyonunda zamana bağlı absorbans değişimi. Fosfat tampon çözeltisinde (100 mM, pH 6.0) dekstransükraz (0.3 mg protein/ml) ile DEP'in (102 mM) 25°C de reaksiyonu 240 nm de UV spektrofotometrede gözlemlendi.

4.3.2. DEP ile Modifiye Dekstransükraz'ın Hidroksilamin ile Tekrar Aktivasyonu

Dietilpyrokarbonat ile histidin arasında oluşan karbetoksilasyon reaksiyonu hidroksilamin ile geri döndürülebilir ve dekstransükraz tekrar aktive edilebilir [Fu and Robyt, 1988]. Yapılan çalışmada 5 mM DEP konsantrasyonunda aktivitenin %98'i geri kazanılırken, 25.5 mM DEP konsantrasyonunda sadece %15 aktivite elde edildi (Tablo 4.1). DEP konsantrasyonu artışına bağlı olarak histidinin imidazol halkasındaki her iki azot atomunun modifikasyonu ile disubstitue olmuş histidil grupları oluşur. Hidroksilamin ile bu gruplarda reaksiyon verir; imidazol halkası açılır, fakat modifikasyon geri döndürülemediği için dekstransükraz tekrar aktive olamaz.

Tirozin, lizin ya da sülfidril yan zincirlerinin dietilpyrokarbonat ile etoksiformilasyonu pH 6 da minimum düzeyde olmasına rağmen nötral

hidroksilamin ile reaksiyon geri döndürülemediği için, histidin modifikasyonunun hidroksilamin ile geri dönüşümü önemlidir.

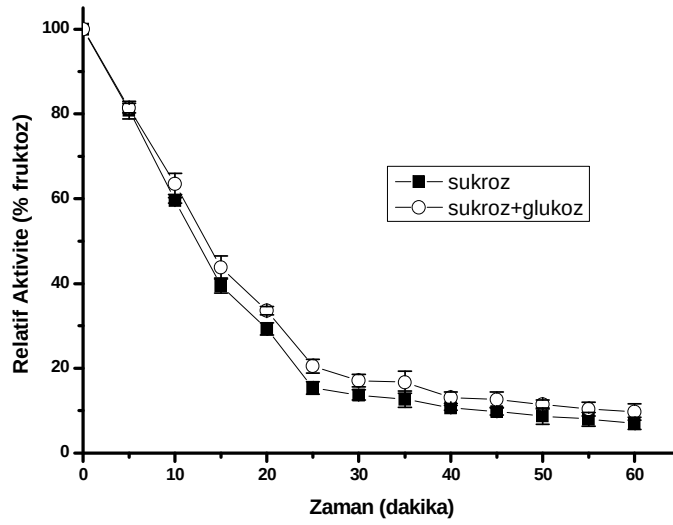
Tablo 4.1 Modifiye dekstransükrazın hidroksilamin ile tekrar aktivasyonu.

DEP (mM)	Aktivite (%)	
	Önce	Sonra
0.0	100	100
5.0	54.8±2.1	98.6±1.9
15.0	46.7±2.5	66.8±2.1
25.5	13.1±2.0	15.6±1.8

DEP ile muamele edilen dekstransükraz örnekleri, fosfat tampon çözeltisinde (100 mM) hazırlanmış hidroksilamin çözeltisi (200 mM, pH7.0) ile 4 saat süreyle (4°C) inkübe edildi. Hidroksilaminin fazlası asetat buffer'a (25 mM , pH 5.4) karşı 20 saat 4°C de dializ edilerek uzaklaştırıldı.

4.3.3. Dietilpirokarbonat (DEP) ile İmmobilize Dekstransükrazın Modifikasyonu

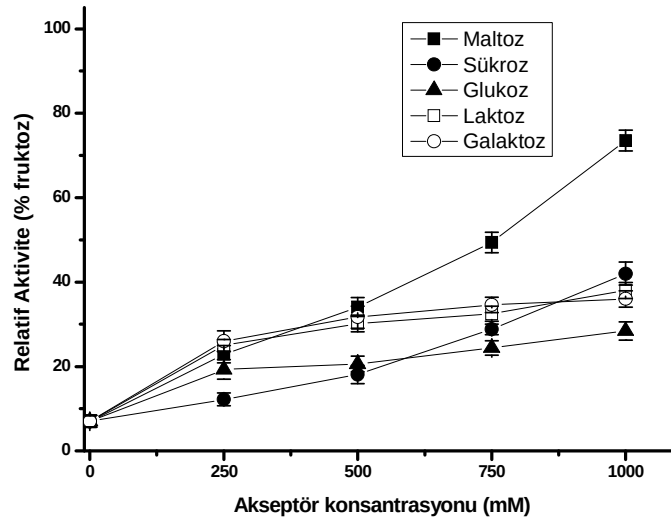
Dekstransükraz alginat bead'lerde immobilize edildikten sonra, DEP ile modifikasyonda enzimin tamamen inaktif olma süresi bulundu. Enzim aktivite ölçümünde sükröz ve sükröz+glukoz çözeltileriyle bakıldı. Enzim modifikasyon süresine bağlı olarak aktivitesini kaybetmektedir. İlk 30 dakikada aktivitenin yaklaşık %80'i, 60. Dakikada ise %90 dan fazlasını kaybetmektedir (Şekil 4.15). Dekstran ve akseptör ürünleri oluşumu 45. dakikadan itibaren durmaktadır. Bunun anlamı; aktif bölgedeki histidinler DEP ile reaksiyona girmektedir.



Şekil 4.15 İmmobilize dekstransükrazın DEP ile modifikasyonu. Farklı sürelerde (0-60 dk) DEP çözeltisi (102 mM) ile muamele edilen immobilize dekstransükraz beadleri asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) ile hazırlanan sükröz (300 mM) ve sükröz (300 mM)+glukoz (300 mM) çözeltileri ile reaksiyon yapılarak aktivite 3.2.7.5. de belirtilen metodla tayin edildi. Relatif aktivite; farklı sürelerde DEP ile muamele olan enzimin aktivitesinin, kontrol grubunun (0 dk) aktivitesine oranı olarak tanımlandı.

4.3.4. Dekstransükraz'ın DEP İle Modifikasyonuna Akseptörlerin (Maltoz, Sükröz, Glukoz, Laktoz ve Galaktoz) Etkisi

Dekstransükrazı, DEP inaktivasyonundan korumak amacıyla değişik akseptörler (maltoz, sükröz, glukoz, laktoz ve galaktoz) kullanıldı ve bu karbohidratların farklı konsantrasyonlarının (0-1000 mM), DEP ile enzimin modifikasyonu üzerine etkilerine bakıldı. Her bir akseptör grubu için, artan konsantrasyona bağlı olarak, dekstransükrazın aktivitesini DEP inaktivasyonuna karşı koruduğu gözlemlendi. En iyi koruma maltoz (1000 mM) kullanıldığında görüldü (Şekil 4.16). Maltozun en iyi akseptör olduğu bilinmektedir. Maltozu sırasıyla, glukoz, laktoz ve galaktoz izler.



Şekil 4.16 Dekstransükrazın modifikasyonunda akseptörlerin koruma etkisi. İmmobilize dekstransükraz farklı konsantrasyonlarda (0-1000 mM) karbohidratlar (maltoz, sükroz, glukoz, laktoz ve galaktoz) varlığında DEP (102 mM) ile muamele (60 dk) edildi, sonra aktivite sükroz (300 mM) kullanarak tayin edildi.

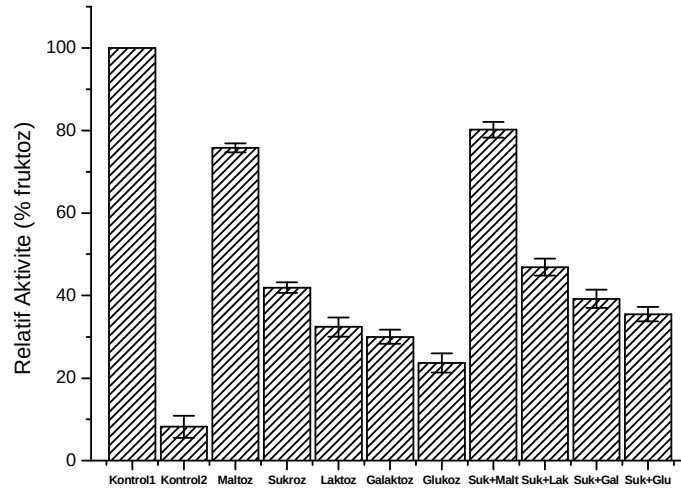
Akseptör karbohidratlar dekstransükrazın aktif bölgesinde akseptör bağlanma bölgesine bağlanır. Yüksek konsantrasyonda, aktif bölge tamamen doyurulduğu için koruma etkisi en yüksek seviyededir. Maltoz ile koruma çalışmasında aktivitenin %76'sı DEP inaktivasyonundan korundu.

4.3.5. Dekstransükraz'ın DEP İle Modifikasyonuna Akseptör Karışımlarının Etkisi

Bu çalışmada tekli şekerlerin yanında, ikili şeker karışımları da konsantrasyonları 1000 mM alınarak koruma etkilerine bakıldı. Kontrol grubu 1, immobilize dekstransükraz DEP ile muamele edilmedi. Kontrol 2 de, immobilize dekstransükraz DEP ile modifiye edilirken koruma için akseptör kullanılmadı. Yalnızca sükrozun (1000 mM) koruma etkisi % 40 dan, sükroz (0.5 M)+maltoz (0.5 M) ile % 81'e yükseldi. Aynı şekilde yalnızca laktoz (1000 mM) ile koruma etkisi % 32 den, sükroz (0.5 M)+laktoz (0.5 M) karışımı ile % 47'ye yükseldi. Galaktoz

(1000 mM) için % 30 dan % 39'a; glukoz (1000 mM) için ise % 24 den % 36 ya yükseldi. DEP modifikasyonu sırasında karbohidrat kullanılmadığı durumda (kontrol 2) ise enzim aktivitesinin yalnızca % 8'ine sahiptir.

İkili karbohidrat karışımlarının diğerleriyle karşılaştırıldığında daha fazla koruma etkisi olduğu şekil 4.17 de görülmektedir.

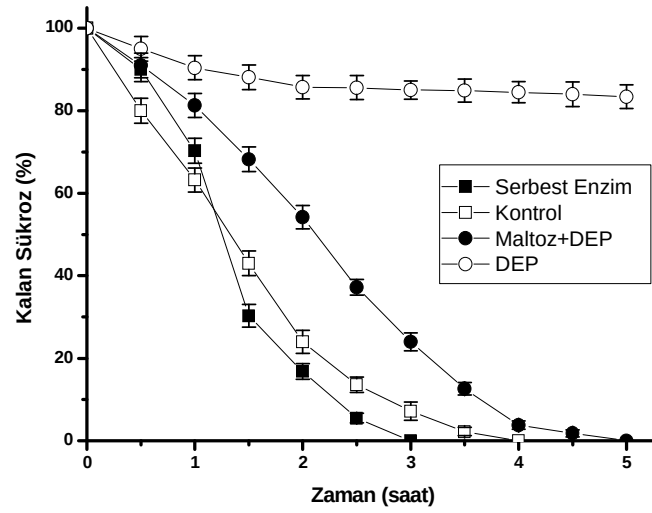


Şekil 4.17 Dekstransükrazın DEP ile modifikasyonunda akseptör karışımlarının etkisi. İmmobilize dekstransükraz 1000 mM karbohidratlar (maltoz, sükröz, glukoz, laktoz ve galaktoz) ve karbohidrat karışımları [sükröz (0.5 M)+maltoz (0.5 M), sükröz (0.5 M)+laktoz (0.5 M), sükröz (0.5 M)+galaktoz (0.5 M), sükröz (0.5 M)+glukoz (0.5 M)] varlığında DEP (102 mM) ile muamele (60 dk) edildi, sonra sükröz (300 mM) kullanarak enzim aktivitesi tayin edildi.

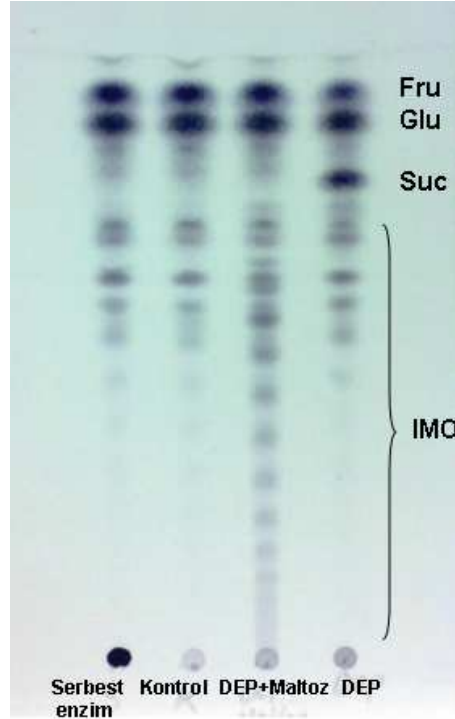
4.3.6. Dietilpirokarbonat (DEP)'in Akseptör Ürünlerinin Oluşumuna Etkisi

Dekstransükraz alginat beadlere immobilize edildi. Hazırlanan 3 grup immobilize enzimlerden birinci grup kontrol grubu yapıldı ve DEP ile muamele edilmedi. İkinci grup DEP ile mumele edilirken, üçüncü grup ise DEP ile modifiye edilirken enzim aynı zamanda 1000 mM maltoz ile inaktivasyondan korundu. Serbest

dekstransükraz ve bu 3 grup enzimin süktroz (80 mM)+glukoz (80 mM) çözeltisiyle reaksiyonunda süktrozun zamanla tüketimi Şekil 4.18 de gösterilmiştir. Serbest enzim ve kontrol grubunda süktroz sırasıyla 3 ve 4 saatte biterken, maltozla korumalı DEP ile muamele olan enzim süktrozu 5 saatte tüketti. Yalnızca DEP ile muamele edilen enzim ise inaktive olduğu için, 5 saatin sonunda süktrozun sadece %10'unu kullanmıştır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 DEP modifiye enzimlerin akseptör reaksiyonunda zamana karşı-kalan süktroz. Serbest enzim, kontrol grubu, DEP+maltoz ve yalnızca DEP ile muamele enzimler, asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) ile hazırlanan süktroz (80 mM)+glukoz (80 mM) çözeltisiyle 25°C de reaksiyon yapıldı.

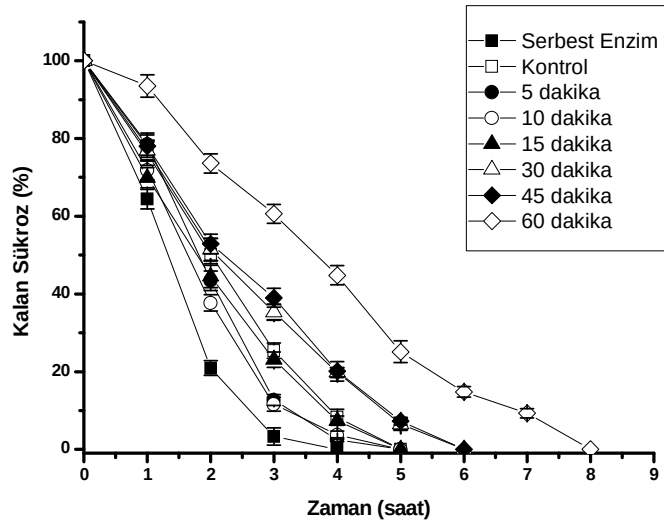


Şekil 4.19 Akseptör ürünlerinin TLC analizi. Serbest enzim, kontrol grubu, DEP+maltoz ve yalnızca DEP ile muamele edilen enzimler asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) ile hazırlanan sükröz (80 mM)+glukoz (80 mM) çözeltisiyle 5 saat süreyle 25°C de reaksiyona sokuldu. Fru, fruktoz; Glu, glukoz; Suc, sükröz; IMO, izomaltooligosakkaritler.

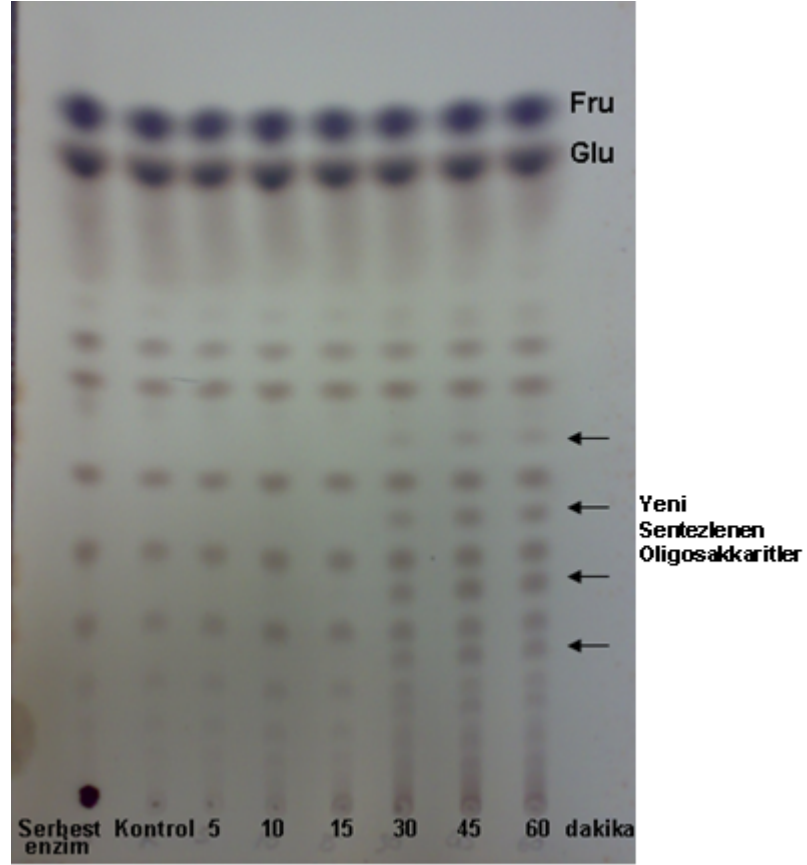
Ürün bileşikleri TLC analiz metodu ile incelendi ve Şekil 4.19 da görüldüğü gibi maltoz varlığında DEP ile modifiye olan dekstransükraz, sükrözü tüketti ve oligosakkaritler oluştu. Serbest enzim, reaksiyon sonunda dekstran oluşturmaktadır. TLC de örneğin damlatıldığı başlangıç noktasında dekstran görülmektedir. Kontrol grubu beadlerde oluşan dekstran dışarı çıkamadığı için TLC de görülmüyor, fakat deney sonunda beadlerde oluşan şişmeler ve yapısal bozulmadan dekstranın varlığı anlaşıldı. Oysa, DEP+maltoz grubunda böyle bir durum gözlenmedi. Reaksiyonda dekstran oluşmamaktadır, akseptör reaksiyonları yoluyla oligosakkaritler meydana gelmektedir. Bu durumda dekstransükrazın DEP ile modifiye olduğu göstermektedir.

Dekstransükrazın DEP ile modifikasyonunda, modifikasyon süresi de ürün kompozisyonunu etkilemektedir. Yapılan çalışmada, bölüm 3.2.7.9. da belirtildiği gibi 7 grup immobilize dekstransükraz hazırlandı. DEP ile farklı sürelerde (5, 10, 15,

30, 45 ve 60 dakika) muamele sırasında ortamdaki 1000 mM maltoz ile enzim inaktivasyondan korundu. Serbest enzim ve kontrol grubu ile diğer 7 grup enzimin ürün kompozisyonlarına süktroz (300 mM)+glukoz (300 mM) çözeltisiyle reaksiyon yapılarak bakıldı. Şekil 4.20 de görüldüğü gibi modifikasyon süresine bağı olarak süktrozun zamana bağı tüketim hızı da değışmektedir.



Şekil 4.20 Farklı sürelerde DEP ile modifiye enzimlerin akseptör reaksiyonunda zamana karşı kalan süktroz. Serbest enzim, kontrol grubu ve farklı sürelerde DEP ile muamele edilen enzimler, asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) ile hazırlanan süktroz (300 mM)+glukoz (300 mM) çözeltisiyle 25°C de reaksiyon yapıldı. Reaksiyonların sonunda alınan örnekler TLC metoduyla incelendi.



Şekil 4.21 Farklı sürelerde DEP modifikasyonunda akseptör ürünlerinin TLC analizi. Serbest enzim, kontrol grubu (0 dk) ve farklı sürelerde (5-60 dk) DEP ile muamele edilen immobilize dekstransükraz, asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) ile hazırlanan sükroz (300 mM)+glukoz (300 mM) çözeltisiyle 25°C de reaksiyon yapıldı. Fru, fruktoz; Glu, glukoz.

Şekil 4.21 de TLC'ye bakıldığında, 30, 45 ve 60 dakika DEP ile modifiye edilen dekstransükrazın akseptör ürünleri olan oligosakkaritler arasında yeni sentezlenenler görülmektedir.

Dekstransükraz DEP ile pH 6 da muamele edildi ve enzimin inaktive olduğu görüldü (Şekil 4.12). Beş farklı DEP konsantrasyonunda, dekstransükrazın modifikasyonu ve inaktivasyonu arasında doğrudan bir korelasyonu işaret eden pseudo-first-order kinetiği vardır. DEP konsantrasyonlarına karşı pseudo-first-order hız sabitleri orjinden geçen bir doğru vermektedir (Şekil 4.13). DEP ile modifikasyonun 240 nm de zamana karşı absorbansı izlendiğinde karakteristik bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.14). Bu artış N-(karboksi)histidin rezidülerini işaret eder. DEP, pH 6.0 ve daha düşük pH değerlerinde histidin rezidülerinin yan zinciriyle spesifik olarak reaksiyon verir. Diğer rezidülerle reaksiyonun mümkün olmadığı bilinmektedir [Fu and Robyt, 1988]. Örneğin, dekstransükrazda sülfidril grupları ditiyobis(2-nitro benzoik asit) ile pH 8.1 de titre edilmiş ve enzim molekülü başına sülfidril gruplarının oranı 1.1 olarak hesaplanmıştır. Daha sonra aktivitesinin % 10'una sahip DEP modifiye enzim için bu değer 1.0 olarak hesaplanmıştır [Fu and Robyt, 1988]. Buradan sülfidril gruplarının DEP ile modifiye olmadığı ve enzim inaktivasyonundan da sorumlu rezidüler olmadığı sonucuna varılmaktadır. Lizin rezidüleri ise pH 7.0 den daha yüksek değerlerde DEP ile modifiye olabilir ve hidroksilamin ile etoksiformilasyon reaksiyonu geri döndürülemez. Yapılan çalışmada, DEP ile aktivitesinin %45.2'sini kaybeden dekstransükraz, hidroksilamin ilavesiyle aktivitesinin tamamını geri kazandığı görüldü (Tablo 4.1). pH 6.0 ve daha düşük pH değerlerinde imidazol gruplarıyla DEP reaksiyonunun spesifik olması, 240 nm de absorbans artışına bağlı olarak enzimin aktivitesindeki azalma, dekstransükrazın histidin rezidülerinin DEP ile modifiye olduğunu göstermektedir.

Alginat bead'lerinde immobilize dekstransükraz DEP ile muamele edildi ve enzimin 40. dakikadan sonra inaktive olduğu görüldü (Şekil 4.15). DEP'in alginat beadlerinde immobilize enzim ile reaksiyonu, serbest enzime kıyasla daha yavaş olmasına bağlı olarak modifikasyon süresi de uzamaktadır. Farklı konsantrasyonlarda (0-1000 mM), farklı akseptörler (maltoz, glukoz, laktoz ve galaktoz) ve substrat sükrozun varlığında enzimin DEP inaktivasyonundan korunduğu görüldü (Şekil 4.16). Sükroz dekstransükrazın substrat bağlanma bölgesine, akseptörler ise aktif bölgede bulunan akseptör bağlanma bölgesine bağlanır (Şekil 2.5). En yüksek koruma etkisi (%76) maltoz (1000 mM) varlığında DEP modifikasyonunda tespit edildi. Maltozun en etkili akseptör olduğu, glukoz, laktoz ve galaktozun da sırasıyla

daha zayıf akseptörler olduğu bilinmektedir [Robyt and Eklund, 1983]. Fakat bir disakkarit olan laktozun DEP inaktivasyonundan enzimi koruma etkisi (%32) glukoz (%24) ve galaktozdan (%30) fazladır. Substrat olan sükroz enzim tarafından hızla dekstrana dönüştüğü için DEP inaktivasyonuna karşı enzimi koruma etkisi (%40) düşüktür. Bu karbohidratların dekstransükrazı DEP inaktivasyonundan korumaları, enzimin aktif bölgesinde katalitik gruplar olarak, akseptörler ile etkileşimde olan histidin rezidülerinin varlığını desteklemektedir. Ayrıca yapılan ilave bir deneyde, dekstransükrazın kararlılığında etkili olduğu, daha önce bölüm 3.2.5.11. de yapılan çalışmadan bilinen nişastanın, enzimi DEP inaktivasyonundan korumadığı görüldü. Nişasta, akseptör karbohidratlar gibi dekstransükrazın aktif bölgesine bağlanma özelliği olmayan bir moleküldür. Enzimi histidine karşı spesifik reaksiyon veren DEP inaktivasyonuna karşı koruyamaması, dekstransükrazın aktif bölgesindeki histidinlerin varlığını göstermektedir.

DEP ile dekstransükrazın modifikasyonunda, sükroz ile birlikte akseptörler kullanıldığında enzimi inaktivasyondan koruma etkisinin arttığı gözlemlendi (Şekil 4.17). Sükroz, dekstransükrazın substratıdır ve aktif bölgede substrat bağlanma bölgesine bağlanırken, akseptör karbohidratlar ise akseptör bağlanma bölgesine bağlanır. Aktif bölgede substrat ve akseptör bağlanma yerleri aynı bölgededir. Böylece aktif bölge yüksek konsantrasyonda substrat ve akseptör ile doyurulmuş olur. Reaksiyon mekanizmasında iki histidin substrat ve akseptör ile etkileşim halindedir. Doygun konsantrasyonda substrat ve akseptörün dekstransükrazı DEP modifikasyonu sırasında inaktivasyondan koruması bunu açıkça göstermektedir.

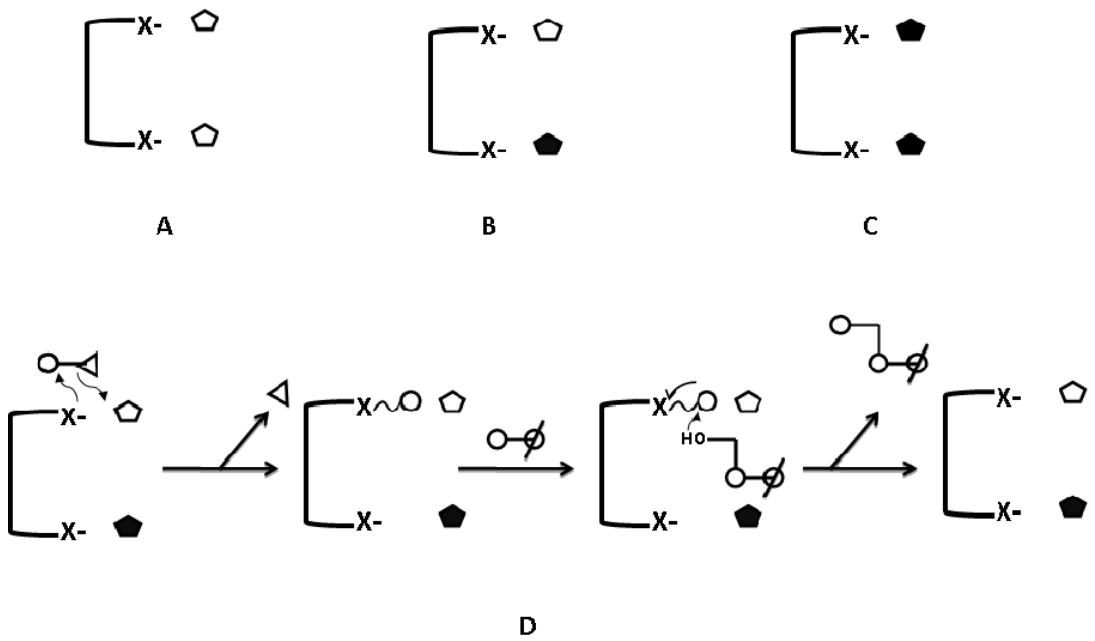
Dekstransükraz, DEP ile muamele edildikten sonra aktivitesini kaybetmesi, yani dekstran polimerinin oluşmaması, enzimin kataliz mekanizmasında imidazol gruplarının varlığını göstermektedir. Akseptör karbohidratların ve substratın enzimi inaktivasyondan koruduğu görüldü. Dekstransükrazın reaksiyonunda, polimerizasyon sırasında glukozil ve dekstranil-kovalent ara ürünü oluşur. Dekstran sentezi sırasında sükrozun glukoz birimi büyüyen dekstran zincirinin indirgen ucuna eklenir, reaksiyonda bir aktif bölgede üç amino asit rol alır [Robyt et al, 2008]. Robyt tarafından, B-512 F dekstranda $\alpha(1,6)$ bağlı glukoz birimlerinin sentezinde aktif bölgede iki nükleofilin rol aldığını ve sükroza etki ederek fruktozu iki β -glukozil ara

geçişini vermek üzere ayırdığı mekanizmayı önesürmüştür [Robyt and Eklund, 1982]. Yapılan çalışmalarda, dekstransükrazın kimyasal modifikasyonu dekstran sentezi için iki histidinin imidazol grubunun etkili olduğunu göstermektedir [Fu and Robyt, 1988]. Bu iki imidazol grubunun, ayrılan fruktoz birimlerine hidrojen iyonlarını verdiği, sonra ikinci adımda glukozil enzim kompleksinin C-6 OH grubuna saldırarak bir proton kopardığı ve α (1,6) bağıını oluşturduğu kabul edilmiştir.

Monsan ve ekibi, *L.mesenteroides* B-512F dekstransükrazın kritik amino asit rezidülerini belirlemek amacıyla, dekstransükraz dizisi diğer glukoziltransferazlarla karşılaştırılarak iki aspartik asit (Asp-511 ve Asp-551) ve bir histidin (His-661) rezidüsü site-directed mutasyonla değiştirilmiştir. Aspartik asit mutasyonlarında dekstran ve oligosakkarit sentez aktivitesi tamamen durmuş, histidin mutasyonunda ise dekstransükraz aktivitesinin (1040 U/g) tamamına yakını (5 U/g) kaybetmiştir. Yalnızca histidin mutantlarında panoz oluşumu gözlenmiştir [Monchois et al, 1997]. Bu çalışmada bir histidin mutasyonunda dekstran sentezinin durması fakat akseptör ürününün oluşması ilginçtir.

L.mesenteroides B-512F dekstransükrazın reaksiyon mekanizması ile ilgili şu ana kadar yapılan çalışmalar, aktif bölgede iki adet sükroz bağlanma bölgesi ve bir adet akseptör bağlanma bölgesiyle birlikte histidin rezidülerinin varlığını göstermektedir [Neely, 1959], [Fu and Robyt, 1988]. Robyt, dekstransükrazın aktif bölgesinde iki adet imidazol grubunun, iki nükleofilik grup ile birlikte reaksiyon mekanizmasında rol aldığını bildirmiştir [Su and Robyt, 1994]. Daha sonra yapılan çalışmalarda, enzim aktivitesinde rol alan aspartik asit gruplarının varlığı da tespit edilmiştir [Monchois et al, 1997]. Robyt, dekstransükrazın dekstran biyosentezi mekanizması ile ilgili yayınladığı son makalesinde; glukansükrazlarda aktif bölgede saklı üç amino asitin (Asp-551, Glu-589 and Asp-662) benzerlik gösterdiğine dayanarak dekstran sentezinde nükleofil olarak aspartik asitlerin bulunduğunu önermiştir [Robyt et al, 2008]. Aktif bölgedeki glutamik asitin varlığını, dekstransükraz ile glukozil hidrolaz enzim ailesi arasındaki amino asit dizi benzerliklerine dayanarak öne sürmüştür. Glutamik asitin, dekstransükrazın reaksiyon mekanizmasında proton alma-verme gibi bir görevi olduğunu iddia edebilecek bir delil yoktur.

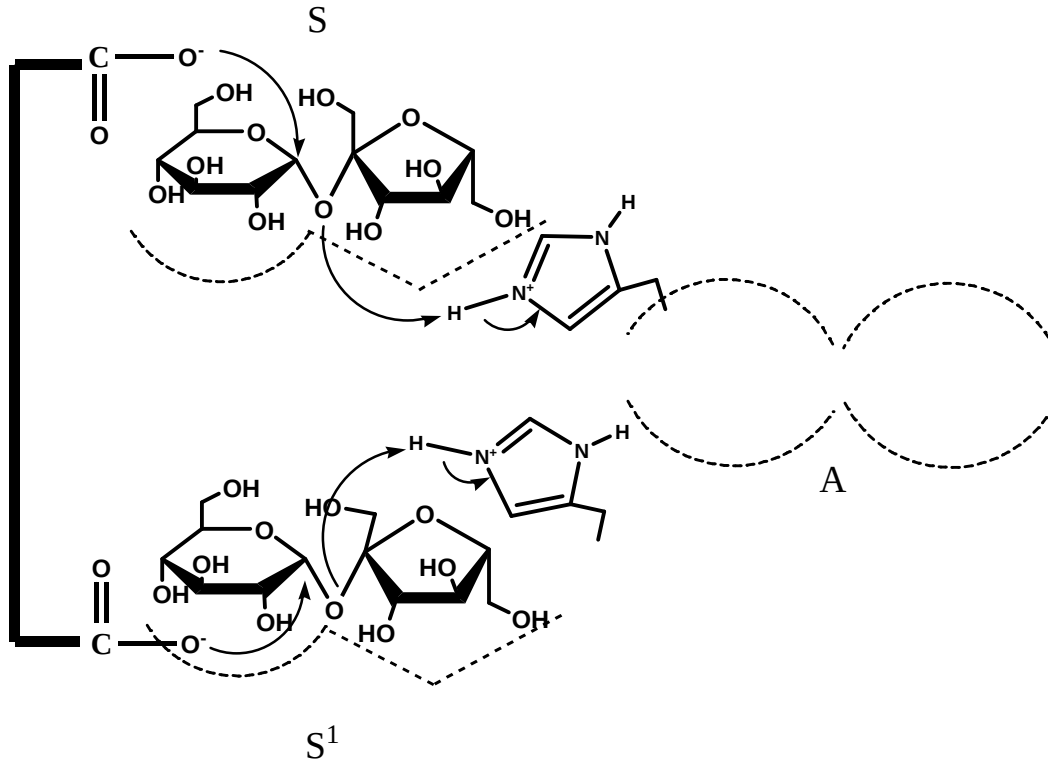
DEP ile dekstransükrazın modifikasyonunda ise üç tip enzim molekülü oluşur. 1. Modifiye olmayan enzim, 2. iki imidazol grubundan bir tanesinin modifiye olduğu enzim ve 3. iki imidazol grubu da modifiye olan enzim. Modifiye olmayan enzim dekstran ve akseptör ürünlerini sentezleyebilir. Yalnızca bir imidazol grubu modifiye olan enzim dekstran sentezleyemez fakat akseptör ürünlerini sentezleyebilir. Aktif bölgede her iki imidazol grubu da modifiye olan enzim ise dekstran ve akseptör ürünlerini sentezleyemez (Şekil 4.22).



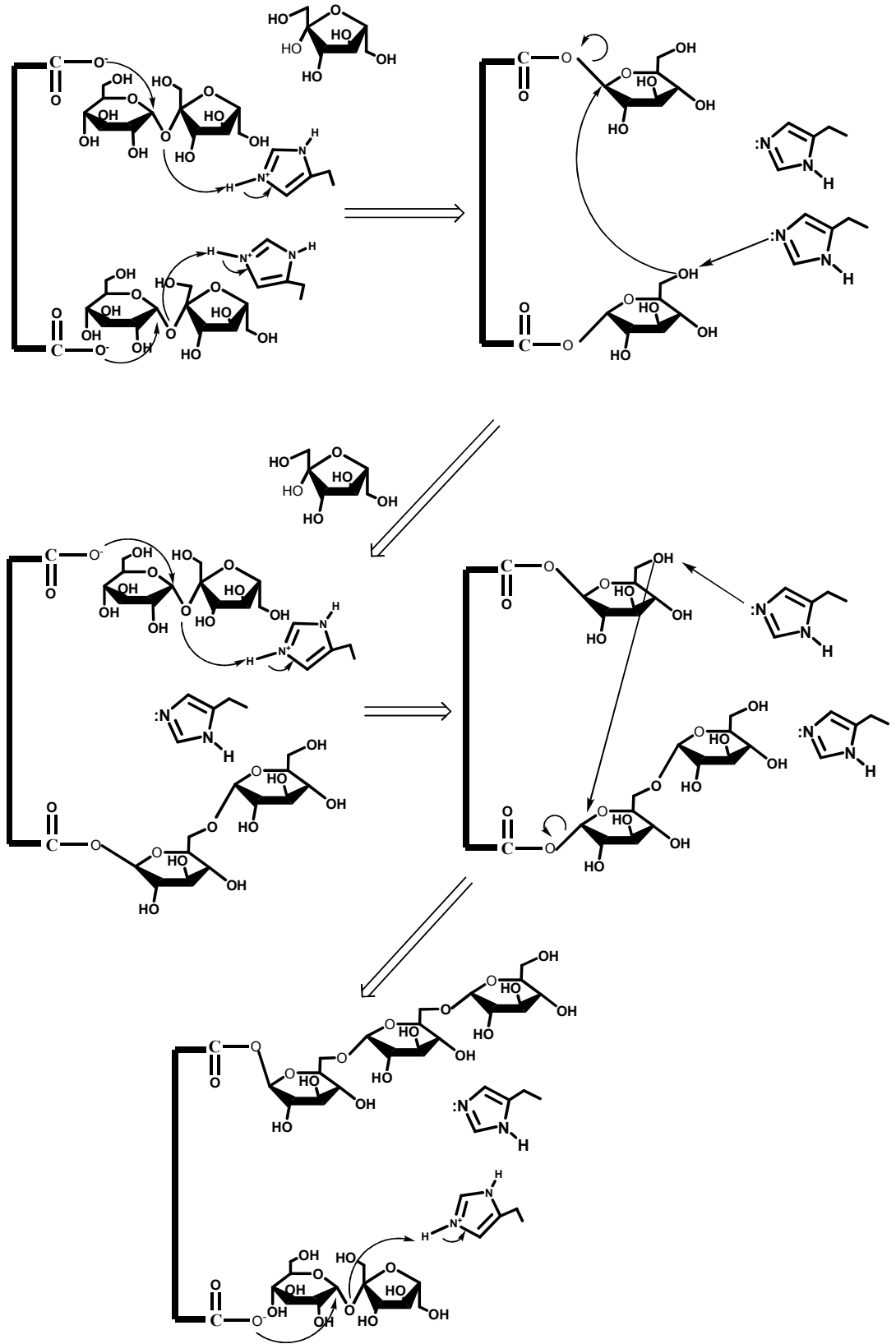
Şekil 4.22 DEP ile modifikasyon sonunda oluşan farklı tiplerde dekstransükrazlar (A, B, C) ve akseptör reaksiyonu. A, modifiye olmayan enzim; B, bir imidazolu modifiye enzim; C, her iki imidazolu modifiye enzim; D, aktif bölgede bir imidazolun modifiye olduğu enzimin (B) akseptör reaksiyonu. X-, aktif bölgedeki nükleofil; , modifiye olmayan imidazol grubu; , modifiye imidazol grubu; , glukoz; , fruktoz; , sükroz; , maltoz ve , panoz akseptör ürünü [Su and Robyt, 1994].

Histidin/histidinler reaksiyon mekanizmasında iki şekilde rol alabilir: Birincisi, asit-baz (proton alma-verme) katalizine katılabilir, ikincisi, aktif bölgede substrat bağlanma mekanizmasında etkili olabilir. Dekstransükrazın aktif bölgesinde iki adet substrat bağlanma bölgesi ve bir adet akseptör bağlanma bölgesi olduğu bilinmektedir. Tez çalışması deneylerinde imidazol grubuna spesifik bir reaktif olan DEP ile modifiye enzim aktivite göstermezken, akseptör molekül maltoz varlığında DEP-modifiye enzimin aktivite gösterdiği (%76) tespit edildi. Oysa, enzimin substratı olan sükrozun DEP modifikasyonuna karşı koruma etkisi düşüktür (%40). Histidin ya da histidinler, enzim katalizinde substrat bağlanmasında etkili iseler; akseptör bağlanma bölgesine bağlanan bir molekülün; maltozun, enzimi DEP inaktivasyonundan koruması beklenemezdi. Akseptör bağlanma bölgesinde bulunan bir molekülün enzim katalizini koruyucu etkisinin olması, bu molekülün; maltozun, reaksiyon mekanizmasına direkt katılan histidin ile etkileşim halinde olduğunu ve bu histidinin substrat bağlanma bölgesinde yalnızca sükrozu kararlı hale getirme görevi olmadığını göstermektedir. Maltoz korumalı DEP-modifiye enzimin dekstran sentezi azalırken, akseptör ürünleri oluşturma yeteneği olumlu yönde değişmektedir, artmaktadır (Şekil 4.19 ve 4.21).

Tez çalışması deneylerinden alınan sonuçlar, dekstransükrazın aktif bölgesinde enzim katalizinde histidinlerin rol aldığı fikrini desteklemektedir. Enzimin aktif bölgesinde iki adet nükleofilik grup (aspartik asitler) ve iki adet histidinin yer aldığı düşünülmektedir (Şekil 4.23). Buna göre, dekstransükraz ile dekstran sentezinde aktif bölgede bulunan iki nükleofil (aspartik asit), substrat bağlanma bölgelerinde bağlı bulunan iki sükroz molekülüne atak yapar ve C-1 üzerinden nükleofile kovalent bağlı iki glukozil birimi oluşur. Bu proseste aktif bölgede, iki histidin rezidüsünün imidazol grubu, ayrılan fruktoz birimlerinin oksijen atomlarına proton verir. İmidazolyum iyonları daha sonra imidazol gruplarına dönüşür: kovalent bağlı glukozil gruplarından birinin 6-hidroksil grubundan bir proton alır, 6-hidroksil grubu da diğer glukozil biriminin C-1 üzerine nükleofilik atakta bulunur ve $\alpha(1-6)$ glukozidik bağ oluşur. Serbest kalan nükleofil grubu da diğer sükroz molekülüne atak yapar. Ayrılan fruktoza imidazol grubu tekrar proton verir. Diğer imidazol ise 6-OH grubundan bir proton alır ve ikinci bir glukozidik bağ oluşur. Bu proses, iki nükleofil grubu ve iki imidazol grubu arasında devam eder (Şekil 4.24).



Şekil 4.23 Dekstransükrazın aktif bölgesi. S ve S¹, sükroz bağlanma bölgesi; A, akseptör bağlanma bölgesi.



Şekil 4.24 Dekstransükrasin reaksiyon mekanizmasında aspartik asit ve histidinlerin rolü.

Dekstransükrazın enzim aktivitesi için önemli olan karboksil ve imidazol grupları enzim amino asit dizisinde lokalize olmuştur. Fakat bu rezidülerin katalitik prosesteki rolleri kesin olarak tanımlanması henüz mümkün değildir. Diğer saklı amino asit rezidüleri de süktroz bağlanma ve dönüşümüne katkıda bulunabilir. Bu çalışmada dekstransükraz DEP ile modifiye edildiği; farklı karbohidratların enzimi DEP inaktivasyonundan koruduğu ve enzimin modifiye edilerek dekstran sentezinin durdurulabildiği, oligosakkarit sentezinin yeni oligosakkaritlerle gerçekleştiği ve bu etkilerin aktif bölgede yer alan iki histidinle gerçekleşebileceği gösterildi.

Glukoziltransferazların üç boyutlu yapısı henüz bilinmediği için, yapı-fonksiyon ilişkisi hakkında bilgi sınırlıdır. Üç boyutlu yapının aydınlatılmasıyla, siklodekstringlukoziltransferazlar ya da amilazlarla dizi karşılaştırmaları ve site-directed mutasyonlar yapılarak glukoziltransferazların mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

4.4. Dekstransükraz İle Ekmek Mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) Birlikte-immobilizasyonu

Dekstransükraz ekmek mayası ile birlikte alginat bead'lerde immobilize edilmeden önce immobilizasyonda kullanılacak uygun enzim miktarlarının bulunması için, önce serbest dekstransükraz ve maya farklı aktivite oranlarıyla (DS/M: 0.1 ; 0.25 ; 0.5 ; 1.0 ; 2.0 ; 4.0 ; 8.0 ve 10.0) alınarak sükroz çözeltisi ile reaksiyonlar yapıldı (Tablo 4.2). Sükroz her iki enzim için; dekstransükraz ve maya invertazı, substrattır. Dekstransükraz sükrazdan dekstran üretirken, invertaz sükrozu glukoz ve fruktoza hidroliz eder. Her iki enzimi kullanarak oligosakkarit elde edebilmek için enzim oranlarının belirlenmesi gerekir.

Düşük DS/M:0.1-0.25 oranlarında, invertaz aktivitesi ile sükroz hızlı bir şekilde hidroliz olmaktadır. Bir saat reaksiyon sonunda kalan sükroz miktarı daha azken, glukoz ve fruktoz miktarı daha fazladır. Bu yüzden dekstransükraz aktivite gösterememekte ve oluşan oligosakkarit miktarı daha azdır. DS/M:0.5-1.0 oranı artışına bağlı olarak, dekstransükraz aktivitesiyle izomaltöz ve izomaltotriöz (IM+IM3) miktarı ve izomaltotriözden büyük oligosakkarit miktarları artmaktadır. Fakat henüz dekstransükraz akseptör aktivitesini yeterince gösteremediği, dekstran oluştuğu çözeltideki koyulaşmadan anlaşıldı. DS/M:1.0 den sonra DS/M:10'a kadar kalan sükroz miktarı, invertaz etkisinin azalmasından dolayı artmaktadır. DS/M:10'da kalan sükroz miktarı tekrar azalmaktadır, dekstransükraz akseptör reaksiyonları etkisini göstermeye başlamıştır. Ayrıca IM+IM3 miktarı azalırken, IM3 den büyük oligosakkarit miktarı biraz azalırken oran 4'ten sonra değişmemektedir. (Tablo 4.2). Dekstransükraz akseptör reaksiyonu yönü IM3 den büyük oligosakkaritlere doğru değişmektedir. Bu nedenle destransükraz ve maya birlikte immobilize edilirken DS/M:10 oranı kullanıldı.

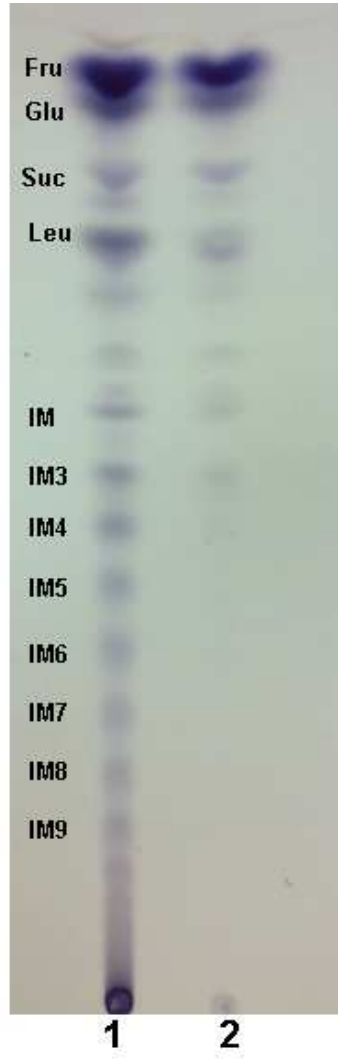
Maya invertazı, sü krozu glukoz ve fruktoz birimlerine hidroliz eden yüksek molekül ağırlıklı (270 kDa) bir glukoproteindir. Maya hücrelerinin sitoplazmik membran dışında, hücre duvarında lokalize olmuştur. İ nvertaz aktivitesi için tüm hücre immobilizasyonu saf protein kullanmaktan daha ekonomiktir. Maya hücreleri kısa süreli ısı muamelesinden sonra invertaz aktivitesi kullanılabilir. 70°C de 4 dakika ısı iş lemi görmüş mayalar canlı değildirler; glukoz ve fruktozu fermente edemezler fakat invertaz aktivitesine sahiptirler [Pira et al, 1991].

Dekstransükraz, immobilizasyondan önce DEP ile modifiye edilmesinin amacı; dekstran oluşumunu önlemek ve enzimin sadece akseptör ürünleri oluşturmasını sağlamaktır. Dekstransükraz, DEP ile bölüm 3.2.7. de anlatılan şartlarda modifiye edildikten sonra maya ile birlikte alginat bead'lerde immobilize edildi ve sü kroz çözeltisi (300 mM) ile muamele edildi. Birlikte-immobilizasyonda DEP modifikasyonunun etkisini görmek amacıyla kontrol olarak, DEP ile modifiye edilmeden maya ile ko-immobilizasyon yapılan dekstransükraz ile ürün kompozisyonları karşılaştırıldı. Ş ekil 4.25 de TLC analizinde görü ldüğü gibi DEP ile modifiye edildikten sonra maya ile birlikte immobilize edilen dekstransükraz bead'lerinde, sü krozdan izomaltooligosakkaritler oluşurken kontrol beadlerinde oluşmamaktadır. Kontrol bead'lerinde reaksiyon sonunda şiş me gözlendi, bu da bead'lerde bir miktar oluş an dekstranın kanıtıdır. Oysa DEP-modifiye dekstransükraz birlikte-immobilizasyonunda bead'lerde şiş me ve deformasyon gözlenmedi.

Tablo 4.2 Dekstransükraz/Maya (DS/M) aktive oranı değişiminin ürün kompozisyonuna etkisi.

DS/M	Fru (%)	Glu (%)	Suc (%)	Luc (%)	IM+IM3 (%)	>IM3 (%)
0.1	37.8	35.8	9.7	5.1	3.6	8.0
0.25	32.1	30.7	9.1	6.3	8.9	12.9
0.5	24.0	20.4	9.7	8.5	10.8	26.6
1.0	26.1	15.7	11.8	9.2	10.0	27.2
2.0	24.2	16.1	21.4	6.5	8.0	24.5
4.0	24.7	14.5	27.3	5.2	5.5	22.8
8.0	21.1	10.3	35.8	5.9	4.7	22.2
10.0	23.3	11.0	33.6	6.5	3.8	21.8

Dekstransükraz (DS, 0.3 mg/ml, 16.0 IU/ml) ve maya (M, 2.0 IU/mg) invertaz farklı aktive oranlarıyla alınarak, kalsiyum asetat tampon çözeltisi (25 mM, pH 5.4) ile hazırlanan sükroz çözeltisinde (300 mM), 25°C de 1 saat karıştırılarak reaksiyon gerçekleştirildi. IM, izomaltoz; IM3, izomaltotrioz; □IM3, izomaltotriozdan büyük oligosakkaritler.



Şekil 4.25 Birlikte-immobilize dekstransükraz ve mayanın süktroz ile reaksiyonunda oluşan ürün bileşimi. Alginat bead'leri kalsiyum asetat tampon çözeltisinde (25 mM, pH 5.4) hazırlanan süktroz (300 mM) çözeltisinde 25°C de 3 saat muamele edildi. 1, birlikte-immobilize DEP- modifiye dekstransükraz ve maya; 2, ko-immobilize dekstransükraz ve maya. Fru, fruktoz; Glu, glukoz; Suc, süktroz; Leu, lükroz; IMO, izomaltooligosakkaritler.

5. GENEL SONUÇ

Bu tez çalışmasında, başta prebiyotik etkileri olmak üzere birçok biyofonksiyonlara sahip, birçok ülkede büyük miktarlarda üretimleri yapılan izomaltooligosakkaritlerin üretimlerine dair yöntemler geliştirilmiştir. *Leuconostoc mesenteroides* dekstransükraz ve *Penicillium lilacinum* dekstranaz alginat matrikslerde (kapsül, bead ve fiber) birlikte immobilize edildi ve sükrozdan izomaltooligosakkarit üretiminde kullanıldı. Kapsül, bead ve fiberlerde sırasıyla %71, %64 ve %70 aktive verimleri ile immobilizasyon yapıldı. 30 gün süresince hergün yapılan aktivite testlerinde alginat fiber ve bead’lerde aktivitede sırasıyla %74 ve %99 azalma gözlenirken, alginat kapsüllerde birlikte-immobilize enzimlerde ise aktivitede azalma görülmedi. Ayrıca kapsüllerde birlikte-immobilizasyon sırasında kullanılan nişastanın dekstransükrazın kararlılığında önemli etkileri olduğu görüldü. İmmobilizasyon veriminin yüksek olması (%71), birlikte-immobilize enzimlerin aktivitelerini 30 gün süresince koruması geliştirilen bu metodun sükrozdan izomaltooligosakkarit üretiminde uzun süreli olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Birlikte-immobilize enzimlerle sükrozdan üretilen, özellikle izomaltotriozdan büyük olan izomaltooligosakkaritlerin miktarını artırmak için sükroz ilavesi ve alginat fiberlerde immobilize dekstransükraz ile reaksiyon yapılarak prebiyotiklerin miktarı artırıldı. İzomaltotriozdan büyük oligosakkaritlerin miktarı reaksiyonlarda kullanılan sükroz konsantrasyonlarına [% 5, 10 ve 20 (w/v)] bağlı olarak sırasıyla %1.1, 13.2 ve 18.7 (w/v) den %37.7, 37.3 ve 43.4’e (w/v) yükseldi. Geliştirilen bu metod prebiyotik üretiminde etkili bir şekilde kullanılabilir. Eupergit C ye kovalent bağlı dekstranaz ve serbest dekstransükrazın alginat kapsüllerde birlikte-immobilizasyonu yöntemi ve prebiyotiklerin üretimi metodu bu iki enzim için literatürdeki en başarılı yöntemdir.

İzomaltooligosakkaritlerin bir üyesi aynı zamanda ticari önemi olan izomaltoz, birlikte-immobilize dekstransükraz ve dekstranaz ile glukoz kullanarak sükrozdan yüksek saflıkla (%82 w/w) elde edildi. Farklı oranlarda sükroz+glukoz çözeltileri (sük:150-600 mM; glu:150-600 mM) ile alginat kapsüllerde birlikte-immobilize dekstransükraz ve dekstranaz reaksiyonu sonunda elde edilen izomaltoz,

izomaltotrioz, glukoz ve fruktoz içeren karışımlar ikinci aşamada Eupergit C de immobilize dekstranaz ile muamele edildi ve izomaltotriozun da izomaltoza dönüşmesi sağlandı. Substrat konsantrasyonu artışına bağlı olarak izomaltoz miktarları da arttı ve 14.6-59.7 g/l arasında değiştiği görüldü. Reaksiyonların molar verimi, $Y_{IM/S}=0.24-0.40$ arasında değişmekte, en düşük verim; 600 mM sükroz+150 mM glukoz ve en yüksek verim; 300 mM sükroz+600 mM glukoz ile yapılan reaksiyonlarda elde edildi. Artan substrat konsantrasyonuna bağlı olarak, kalan izomaltotrioz miktarları da artmakta ve 0.28-8.17 g/l arasında değişmektedir. Reaksiyonun ikinci aşamasında immobilize dekstranaz ile muamelede izomaltotriozun tamamının izomaltoza dönüşümü de güçleştiği ve çözeltide artan miktarlarla kaldığı için saf olarak izomaltoz üretiminin üçüncü aşaması olan immobilize maya ile fruktoz ve glukozun uzaklaştırılması basamağına en az miktarda (0.28 g/l) izomaltotrioz içeren, 150 mM sükroz ve 150 mM glukoz ile reaksiyon yapılan karışım ile devam edildi ve izomaltoz %82 w/w saflıkla elde edildi. Birlikte-immobilize dekstransükraz ve dekstranaz ile düşük konsantrasyonlarda sükroz ve glukoz çözeltilerinin kullanıldığı bu yöntem, yüksek saflıkta izomaltoz eldesi için başarılı bir methodtur.

Leuconostoc mesenteroides dekstransükraz, histidin rezidülerine spesifik reaktif olan dietilpirokarbonat (DEP) ile modifiye edildi ve enzimin oligosakkarit oluşturma yeteneği artırıldı. Modifikasyon şartları belirlenirken farklı konsantrasyonlarda (0-1000 mM), farklı akseptörler (maltoz, glukoz, laktoz ve galaktoz) ve substrat sükrozun varlığında enzimin DEP inaktivasyonundan korunduğu görüldü. En yüksek koruma etkisi (%76) maltoz (1000 mM) varlığında DEP modifikasyonunda tespit edildi. Dekstransükraz, DEP ile muamele edildikten sonra aktivitesini kaybetmesi, yani dekstran polimerinin oluşmaması, akseptör karbohidratların ve substratın enzimi inaktivasyondan koruması enzimin kataliz mekanizmasında imidazol gruplarının varlığını göstermektedir. *L.mesenteroides* B-512F dekstransükrazın reaksiyon mekanizması ile ilgili şu ana kadar yapılan çalışmalar, aktif bölgede iki adet sükroz bağlanma bölgesi ve bir adet akseptör bağlanma bölgesiyle birlikte histidin rezidülerinin varlığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, *L.mesenteroides* B-512 FMC dekstransükrazın enzim katalizinde, aktif bölgesinde imidazol gruplarının yer aldığı fikrini desteklemektedir. Tez çalışmasında dekstransükraz DEP ile

modifiye edildi; farklı karbohidratların enzimi DEP inaktivasyonundan koruduğu ve enzimin modifiye edilerek dekstran sentezinin durdurulabildiği, oligosakkarit sentezinin yeni oligosakkaritlerle gerçekleştiği ve bu etkilerin aktif bölgede yer alan iki histidinle gerçekleşebileceği gösterildi.

Son bölümde, DEP ile modifiye edilerek oligosakkarit oluşturma özelliği artırılan *Leuconostoc mesenteroides* dekstransükraz, maya ile alginat bead'lerde birlikte-immobilize edildi ve sükrozdan oligosakkaritler elde etmek için bu immobilizasyon metodunun kullanılabileceği gösterildi. Sükrozdan oligosakkarit üretimi, dekstransükraz ve dekstranaz ikili enzim sisteminin birlikte kullanılmasıyla mümkün olurken, bu çalışmada ilk defa, dekstransükraz ile birlikte, sükrozu substrat olarak kullanan maya invertazının da immobilize edilerek oligosakkaritlerin üretilebilir olduğu görülmüştür. Bu çalışma, immobilizasyon ve reaksiyon şartları değiştirilerek farklı polimerizasyon derecelerine sahip oligosakkaritler elde etmeye açıktır.

KAYNAKLAR

Aslan Y, Tanriseven A. Immobilization of *Penicillium lilacinum* dextranase to produce isomaltooligosaccharides from dextran. *Biochem Eng J* 2007;34:8-12.

Alender M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:351-354.

Alcalde M, Plou FJ, Segura AG, 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;13:749-755.

Berensmeimer S, Buchholz K. Separation of isomaltose from high sugar concentrated enzyme reaction mixture by dealuminated β -zeolite. *Separation Purif Technol* 2004;38:129-138.

Berensmeimer S, Jördening HJ, Buchholz K. Isomaltose formation by free and immobilized dextranase. *Biocatal Biotrans* 2006;24(4):280-290.

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.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.

Buchholz K, Borchers MN, Schwengers M and D. Production of leucrose by dextranase. *Starch* 1998;50:164-172.

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.

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.

De Balder AN. Medical applications of dextran and its derivatives, in *Polysaccharides in Medicinal Applications*, ed by Dimitriu S, Marcel D. New York, 1996; pp 505-523.

Daum B, Buchholz K. High yield and high selectivity of reactions in the frozen state the acceptor reaction of dextranase. *Biocatal Biotrans* 2002;20:15-21.

Erhardt FA, Kügler J, Chakravarthula RR, Jördening HJ. Co-immobilization of dextranase and dextranase for the facilitated synthesis of izomalto-oligosaccharides: Preparation, characterization and modelling. *Biotech Bioeng* 2008;4:673-683.

Erhardt FA, Jördening HJ, Bunchholz K. Co-immobilization of dextranase and dextranase into Ca-alginate for the facilitated enzymatic synthesis of isomaltose. *J Biotech* 2005;118:134-135.

Erhardt FA, Rosenstock P, Helmuth H, Jördening HJ. Development of a multiphase reaction system for integrated synthesis of isomaltose with a new glucosyltransferase variant. *Biocatal Biotrans* 2010;28(1):72-82.

Ergezinger M, Bohnet M, Berensmeimer S, Buchholz K. Integrated enzymatic synthesis and adsorption of isomaltose in a multiphase fluidized bed reactor. *Eng Life Sci* 2006;6(5):481-487.

Fernandes AN, Rodrigues S. Optimization of panose production by enzymatic synthesis using neural Networks. *Process Biochem* 2006;41:1090-1096.

Fu D, Robyt JF. Essential histidine residues in dextransucrase: chemical modification by diethyl pyrocarbonate and dye photooxidation. *Carbohydr Res* 1988;183:97-109.

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 Microb* 1998;42:39-44.

Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365-378.

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.

Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutrition* 1995;125:1401-1412.

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.

Gibson GR, Roberfroid MB. *Handbook of prebiotics*. CRC Press, 2008.

Gibson GR, Williams CM. *Functional foods, concept to product* CRC Press, 2000.

Grözs J, Braunsteiner W. Quantitative determination of glucose, fructose and sucrose, and separation of fructo-oligosaccharides by means of TLC. *J Planar Chromatog* 1989;2:420-423.

Goulas AK, Fisher DA, Grimble GK, Grandison AS, Rastall RA. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextranase. *Enzyme Microb Technol* 2004;35:327-338.

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.

Goyal A, Katiyar SS. Studies on the inactivation of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase by o-phthalaldehyde: evidence for the presence of an essential lysine residue at the active site. *J. Enzyme Inhibition* 1998;13:147-160.

Goyal A, Katiyar SS. Chemical modification of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F by pyridoxal 5-phosphate: evidence for the presence of an essential lysine residue at the active site. *Biochem Mol Biol Int* 1998;44:1167-1174.

Harder A, Noordam B, Brekelmans M. Kinetics of isomaltose formation by amyloglucosidase and purification of the disaccharide by fermentation of undesired by-products. *Ann New York Acad Sci* 1983;413:340-351.

Harrion MD, Purdue JC, Hoffman AJ. Food products comprising a slowly digestible or digestion resistant carbohydrate composition. US patent, 2007.

Holtkamp M, Erhardt FA, Jördening HJ, Scholl S. Reaction-integrated separation of isomaltose by ad-and desorption on zeolite. *Chem Eng Process* 2009;48:852-858.

Holzapfel WH, Schillinger U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res Int* 2002;35:109-116.

Ingelman BG, Richter AW, Granath KA. Sterile aqueous solution of a mixture of isomaltooligosaccharides and its use for parenteral administration to mammals. US Patent 4,201,772 (1980).

Ishibashi N, Shimamura S. *Bifidobacteria: Research and development in Japan*. Food Technol 1993;126-135.

Jördening HJ, Erhardt FA, Holtkamp M, Buchholz K, Scholl S. Verfahrens und katalysatordesign als aufarbeitungsstrategie für die enzymatische darstellung von isomaltose. *Chemie Ingenieur Technik* 2008;80:867-874.

Kaboli H, Reilly PJ. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. *Biotechnol Bioeng* 1980;22:1055-1069.

Kim D, Robyt JF. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC constitutive dextransucrase. *Enzyme Microb Technol* 1994;16:1010-1015.

Kim D, Robyt JF. Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. *Enzyme Microb Technol* 1994;16:659-664.

Kitaoka M, Robyt JF. Large-scale preparation of highly purified dextransucrase from a high-producing constitutive mutant of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC. *Enzyme Microb Technol* 1998;23:386-391.

Krike et al. A new way of producing isomalto-oligosaccharide syrup by using the transglycosylation reaction of neopullulanase. *Appl. Environ Microbiol* 1993; 59:953-959.

Kubik C, Sikora B, Bielecki S. Immobilization of dextransucrase and its use with soluble dextranase for glucooligosaccharides synthesis. *Enzyme Microb Technol* 2004;34:555-560.

Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3:601-614.

Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965;147:747-748.

Lim CC, Ferguson LR, Tannock GW. Dietary fibres as “prebiotics”: Implications for colorectal cancer. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:609-619.

Madhu, Prabhu KA. Immobilization of dextranase on bentonite. *Enzyme Microb Technol* 1985;7:279-282.

Metchnikoff E. Prolongation of life. William Heinemann, London 1907.

Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959;31:426-428.

Miller AW, Eklund SH, Robyt JF. Miligram to gram scale purification and characterization of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F. *Carbohydr Res* 1986;147:119-133.

Miyake T, Yoshida M, Takeuchi K. Imparting low or anti cariogenic property to orally usable Products. US Patent 4,518,581 (1981).

Monchois V, Reverte A, Simeon MR, Monsan P, Willemot RM. Effects of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F dextranase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. *Appl Environ Microb* 1998;64:1644-1649.

Monsan P, Lopez A. On the production of dextran by free and immobilized dextranase. *Biotechnol Bioeng*. 1981;23:2027-2037.

Monchois V, Simeon MR, Russell RRB, Monsan P, Willemot RM. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 1997;48:465-472.

Moulis C, Joucla G, Harrison D, Fabre E, Veronese GP, Monsan P, Simeon MR. Understanding the polymerization mechanism of glucoside-hydrolase family 70 glucanases. *J Biol Chem* 2006;281:31254-31267.

Naby MAA, Ismail AMS, Fattah AMA, Fattah AFA. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. *Process Biochem* 1999;34:391-398.

Neeser JR, German JB. *Bioprocesses and biotechnology for functional foods and nutraceuticals*. Marcel Dekker, 2004.

Neely WB. Studies on the enzyme dextranucrase. Further evidence for the presence of imidazole at the catalytic site of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1959;79:297-301.

Naessens M, Cerdobbel A, Soetaert W, Vandamme EJ. *Leuconostoc* dextranucrase and dextran: production, properties and applications. *J Chem Technol Biotechnol* 2005;80:845-860.

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.

Pedersen S, Hendriksen HV. Process for isomaltose production. US Patent 2003/0059901.

Pelton PD, Ganzhorn AJ. The effect of histidine modification on the activity of myo-inositol monophosphatase from bovine brain. *The Journal of Biological Chem.* 1992;267:5916-5920.

Pasteur L. On the viscous fermentation and the butyrous fermentation. *Bull Soc Chim Fr* 1861;30-31.

Paul F. Acceptor reactions of a highly purified dextranucrase with maltose and oligosaccharides. Application to the synthesis of controlled-molecular-weight dextrans. *Carbohydr Res* 1986;149:433-441.

Paul FB, Monsan PF, Remaud MMC, 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 4,861,381, 1989.

Pira L, Pinto C, Rolz C. The effect of pretreatment on the invertase activity of gel-entrapment yeast biomass. *J. Industr Microb* 1991;8:247-252.

Plou FJ, Martin MT, Segura AG, Alcalde M, Ballesteros. Glucosyltransferases acting on starch or sucrose for synthesis of oligosaccharides. *Canada J Chem* 2002;80:743-752.

Reddy BS. Prevention of colon cancer by pre- and probiotics: evidence from laboratory studies. *Br J Nutr* 1998;80:219-223.

Reischwitz A, Reh KD, Buchholz K. Unconventional immobilization of dextranase with alginate. *Enzyme Microb Technol* 1995;17:457-461.

Roby JF, Yoon SH, Mukerjee R. Dextranase and the mechanism for dextranase. *Carbohydrate Research* 2008;343:3039-3048.

Roby JF, Kim D, Yu L. Mechanism of dextran activation of dextranase. *Carbohydr Res* 1995;266:293-299.

Roby JF, Eklund SH. Stereochemistry involved in the mechanism of action of dextranase in the synthesis of dextran and the formation of acceptor products. *Bioorg Chem* 1982;11:115-132.

Roby JF, Kimble BK, Watseth TF. The mechanism of dextranase action: direction of dextran biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 1974;165:634-640.

Roby JF, Eklund SH. Relative, quantitative effect of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F dextranase. *Carbohydr Res* 1983;121:279-286.

Roby JF, Mukerjee R. Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin layer chromatography. *Carbohydr Res* 1994;251:187-202.

Rogalski J, Glowiak G, Szczodrak J, Pleszczynska M, Szczodrak Z, Wiater A. Purification and immobilization of dextranase. *Acta Biotechnol* 1998;18:63-75.

Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. Probiotics: how should they be defined? Trends in Food Sci&Technol 1999;10:107-110.

Scheibler C. Investigation on the nature of the gelatinous excretion which is observed in production of beet-sugar juices. Z dtsh Zucker-Ind 1874;24:309-335.

Scholz-Ahaerns KE, Schaafsma G, van den Heuvel EG, Schrezenmeir J. Effects of prebiotics on mineral metabolism. J Clin Nutr 2001;73:459-464.

Segura AG, Alcalde M, Yates M, Rojas-Cervantes ML, Lopez-Cortes N, Ballesteros A, Plou FJ. Immobilization of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F on Eupergit C Supports. Biotechnol Prog 2004;20: 1414-1420.

Short C. The probiotic century: historical and current perspectives. Trends in Food Sci&Technol 1999;10:411-417.

Su D, Robyt JF. Determination of the number of sucrose and acceptor binding sites for *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM dextranucrase, and the confirmation of the two-site mechanism for dextran synthesis. Biochem Biophys 1994;308:471-476.

Tanriseven A, Robyt JF. Interpretation of dextranucrase inhibition at high sucrose concentrations. Carbohydr Res 1993;245:97-104.

Tanriseven A, Dogan S. Production of isomaltooligosaccharides using dextranucrase immobilized in alginate fibres. Process Biochem. 2002;37:111-115.

Taubman MA, Nash DA. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. Nat Rev Immunol 2006;6:555-563.

Thome-Beau F et al. Essential histidyl residues in arginine oxygenase (decarboxylating). Eur J Biochem 1971;19:270-275.

Tissier H. Le traitement des infections intestinales par la methode de transformation de la flore bacterienne de intestine. Cr Soc Biol 1906;60:359-361.

Uhm TB, Hong JS, Byun SM. Hydrolysis of sucrose by invertase entrapped in calcium alginate gel. J Korean Agr Chem Soci 1984;27:112-118.

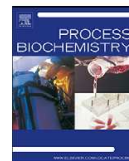
Willemot RM, Monsan P, Durand G. Effects of dextran on the activity and stability of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. Annals of Academy of Science 1988;542:169-172.

Yeon SH, Mukerjea R, Robyt JF. Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. Carbohydr Res 2003;338:1127-1132.

Yun JW. Fructooligosaccharides-occurrence, preparation and application. Enzyme Microb Technol 1996;19:107-117.

ÖZGEÇMİŞ

Zehra ÖLÇER, 06.04.1978 tarihinde İzmit'te doğdu. İlk ve ortaöğrenimini, 50. Yıl Cumhuriyet İlkokulu, İzmit Merkez Ortaokulu ve Atafen Özel Fen Lisesinde tamamladı. 2001 yılında, Kocaeli Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, GYTE Kimya Bölümünde Yüksek Lisans eğitime başladı. 2002 yılında GYTE Kimya Bölümüne Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2004 yılında Biyokimya Ana Bilim Dalında, Yüksek Lisans Eğitimi tamamladı ve aynı yıl doktora programına başladı. Halen GYTE Kimya Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.



Co-immobilization of dextransucrase and dextranase in alginate

Zehra Ölçer, Aziz Tanriseven*

Gebze Institute of Technology, Department of Biochemistry, Gebze, Kocaeli, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2010

Received in revised form 17 June 2010

Accepted 18 June 2010

Keywords:

Alginate

Co-immobilization

Dextranase

Dextransucrase

Eupergit C

Isomaltooligosaccharides

ABSTRACT

Dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* and dextranase from *Penicillium lilacinum* were co-immobilized and used to produce isomaltooligosaccharides from sucrose. The enzymes were co-immobilized by encapsulating soluble dextransucrase and dextranase covalently attached to Eupergit C in alginate (beads, fibers, and capsules). The alginate capsule co-immobilization was done in the presence of soluble starch and resulted in a high immobilization yield (71%), and the enzymes retained their activities during 20 repeated batch reactions and for a month in storage at 4 °C. The presence of starch was essential for the stability of dextransucrase in alginate capsules. Furthermore, it is important that the dextranase be pre-immobilized prior to alginate capsule co-immobilization to prevent dextranase leakage and inactivation of dextransucrase. The co-immobilized enzymes formed oligosaccharides from sucrose, which can be used as prebiotics. In addition, the oligosaccharides that were produced after the addition of sucrose reacted with the alginate fiber-encapsulated dextransucrase, thus increasing the amount of prebiotics. Co-immobilization in alginate fiber and beads also resulted in high yields (70 and 64%), but enzymatic activities decreased by 74 and 99%, respectively, after a month in storage at 4 °C. The newly developed alginate capsule method for co-immobilization of dextransucrase and dextranase is simple yet effective and has the potential for industrial-scale production of isomaltooligosaccharides.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Sucrose is the most commonly used sweetener; however, it contributes significantly to the formation of dental plaque and caries. In the oral cavity, *Streptococcus mutans* converts some of the glucose in sucrose into glucan. This glucan binds to teeth and helps *S. mutans* adhere to teeth surfaces. The bacteria ferment the resulting fructose to lactic acid, which is held close to the tooth surface where it attacks the enamel, leading to dental caries [1]. Some carbohydrates, including isomaltooligosaccharides, reduce the harmful cariogenic effects of sucrose when consumed with sucrose [2]. Also, some components of isomaltooligosaccharides (isomaltose and isomaltotriose) are partially digested by the small intestine. Isomaltooligosaccharides are larger than isomaltotriose and could serve as prebiotics, enhancing the growth of bifidobacteria in the human large intestine [3]. Bifidobacteria occur naturally in the human intestine and provide many health benefits, including resistance to gastrointestinal infections, restoration of bowel flora, and improvement of liver enzymes in human alcohol-induced liver injury [4–6]. In addition to isomaltooligosaccharides, other prebiotics include fructooligosaccharides and galactooligosaccharides. Solutions of isomaltooligosaccharides administered intravenously to humans

could prevent the dextran-antibody precipitation reaction, which is sometimes observed when a solution of dextran is given to humans as a plasma substitute [7]. Isomaltooligosaccharides can be produced either by acceptor reactions of dextransucrase or hydrolysis of dextran by dextranase. *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM dextransucrase catalyzes the polymerization of the glucosyl moiety of sucrose to form dextran, which has 95% α -(1 → 6) linkages and 5% α -(1 → 3) branch linkages. Dextran is hydrolyzed by dextranase, forming isomaltooligosaccharides (Fig. 1). Dextransucrase and dextranase have been used together to produce these oligosaccharides from sucrose because their optimum pHs are the same (pH 5.4). Soluble dextransucrase and soluble dextranase were reacted with sucrose to produce syrup containing isomaltose and isomaltotriose [8]. Goulas et al. also studied in detail the synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of soluble dextransucrase and soluble dextranase [9]. In a different work, dextransucrase treated with glutaraldehyde was immobilized in alginate and used with soluble dextranase to synthesize isomaltooligosaccharide from sucrose with little success; sucrose conversion dropped to 60–70% from 90% by the sixth batch [10]. Recently, a fusion enzyme of dextransucrase from *L. mesenteroides* B-1299CB4 and dextranase from *A. oxydans* was constructed and used successfully for one-step synthesis of isomaltooligosaccharides from sucrose [11].

Acceptor reactions have been widely studied for the production of isomaltooligosaccharides from glucose and maltose. In these

* Corresponding author. Fax: +90 262 605 31 01.

E-mail address: tanriseven@gyte.edu.tr (A. Tanriseven).

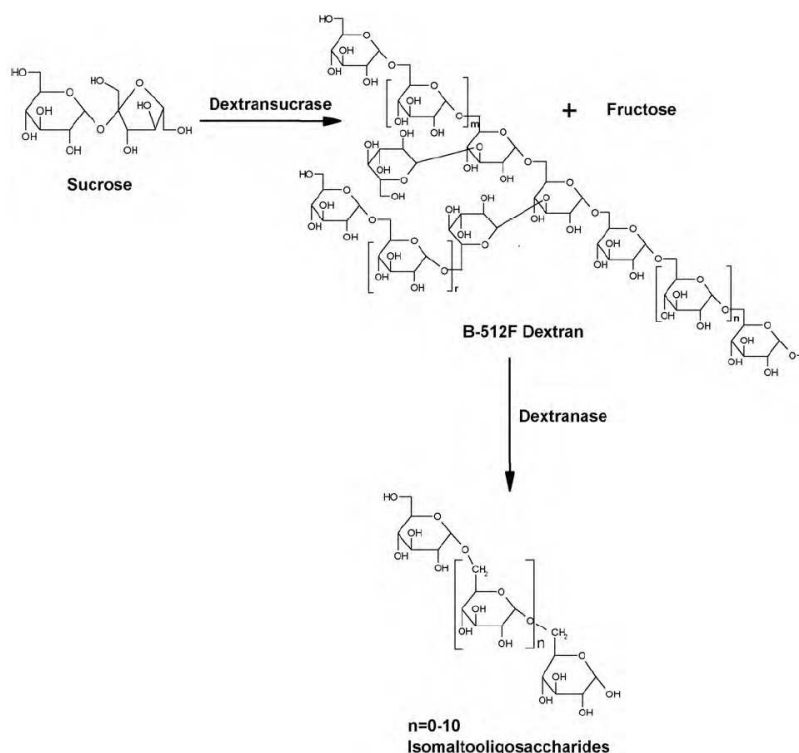


Fig. 1. Dextran formation from sucrose by dextranucrase and hydrolysis of dextran by dextranase.

studies, either soluble or alginate-immobilized dextranucrase was used [12–14]. Using immobilized enzymes makes production of isomaltooligosaccharides more economical. Studies on immobilization of dextranucrase in the literature have not been successful with respect to yield and stability. One reason is that the dextran associated with the enzyme masks the reactive groups of the enzyme. Kaboli and Reilly studied the immobilization of dextranucrase using different carriers and retained more than 10% activity upon immobilization using activated alkylamine porous silica [15]. Alcalde et al. studied the immobilization of native and dextran-free dextranucrase onto glutaraldehyde-activated porous silica, which resulted in 0.6 and 13% immobilization yields, respectively [14]. Dextran-free dextranucrase was also immobilized onto Eupergit C with a maximum activity recovery of 22%, and the work was patented [16,17]. In stability tests carried out at 30 °C, Eupergit C-immobilized dextranucrase lost more than 55% of the recovered activity. Thus, there are no reported successful covalent immobilization methods for dextranucrase. Encapsulation in alginate is the only method that results in high immobilization yield for this enzyme. There are several studies on immobilization of dextranucrase in alginate that result in immobilization yields up to 90% [13,14,18]. The encapsulation method can only be used for the production of oligosaccharides because dextran accumulates in alginate beads and causes them to rupture.

Dextranase can be used to produce isomaltooligosaccharides from dextran. The enzyme has been immobilized using different methods including glutaraldehyde-activated chitosan, which retains 63% of the original specific activity [19]. The enzyme was also immobilized on porous glass and bentonite [20,21]. Recently, dextranase was immobilized onto a commercially available matrix,

Eupergit C, with high yield (90%) in our laboratory [22]. The immobilized enzyme was stable and could be used to produce isomaltooligosaccharides from dextran.

As of now, there has only been one report regarding the co-immobilization of dextranucrase and dextranase, in which dextranase pre-adsorbed onto bentonite and soluble dextranucrase were co-immobilized onto alginate beads for the production of isomaltooligosaccharides from sucrose. This method was not very successful due to the low immobilization yield for dextranase and the substantial loss in activity in the co-immobilized system during repeated batch reactions [23]. The co-immobilized enzymes were also used by the same group to synthesize isomaltose from sucrose [24]. The present study is on the successful co-immobilization of dextranucrase and dextranase in alginate matrices (beads, fibers, and capsules) to produce isomaltooligosaccharides from sucrose.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Chemicals

Dextran (5000 Da) was a gift from Dextran Products Limited (Ontario, Canada). Calcium acetate, sucrose, fructose, H_2SO_4 , ethanol, acetonitrile, and calcium chloride were obtained from Merck. Sodium alginate (medium viscosity), maltose, soluble potato starch, and α -naphthol were from Sigma. Eupergit C was a gift from Roehm GmbH & Co. KG (Darmstadt, Germany).

2.1.2. Enzymes

Dextranase 50 L was a gift from Novozyme (Denmark). The activity of dextranase was determined as 63 IU/ml. The activity unit (IU) is defined as the amount of enzyme needed to produce 1 μmol isomaltooligosaccharide (isomaltose and isomaltotriose) from a dextran solution (MW = 5000, 2% (w/v)) in 1 min at pH 5.4 and 30 °C.

Dextranase was produced from a *L. mesenteroides* B-512 FMC-13 Glc strain provided by Dr. John F. Robyt (Iowa State University, Ames, IA USA), as previously described [25]. The activity of the enzyme was 16.2 IU/ml. The activity unit (IU) is defined as the amount of enzyme needed to produce 1 μ mol fructose from a mixture containing sucrose (300 mM) and glucose (300 mM) at pH 5.4 and 25 °C in 1 min.

2.2. Immobilization of dextranase

Immobilization was carried out under optimum conditions according to previously published work [22]. Eupergit C (200 mg) was reacted with dextranase (0.1 ml) in phosphate buffer (5 ml, 1.0 M, pH 5.3) at 25 °C with gentle shaking (150 rpm) for 24 h. Beads (0.71 g) were obtained after filtering and washing with phosphate buffer (10 ml, 0.1 M, pH 5.3) and distilled water (10 ml) on a sintered glass filter by suction under vacuum. The immobilized enzyme was stored at 4 °C until use. The immobilization yield was 90%.

2.3. Co-immobilization of dextranase and dextransucrase in alginate capsules

Capsules were formed by dropwise addition of a solution of dextransucrase (2 ml, 32.4 IU), soluble dextranase (0.1 ml, 6.3 IU) or Eupergit C pre-immobilized dextranase (200 mg), soluble starch (2 g), CaCl_2 (0.1 g), and calcium acetate buffer (3 ml, 25 mM, pH 5.4) through a syringe with a 1 mm diameter needle into a well-stirred sodium alginate solution [100 ml, 1% (w/v)]. The capsules were kept in solution for 10 min; distilled water (200 ml) was added, and the capsules were obtained by filtration. The capsules were hardened for 30 min with 1% (w/v) CaCl_2 in calcium acetate buffer (100 ml, 25 mM, pH 5.4) and were stored in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4) at 4 °C until used. The capsules had an average diameter of 4.48 mm and a wall thickness of 0.14 mm.

2.4. Co-immobilization of dextranase and dextransucrase in alginate beads

Dextransucrase (2 ml, 32.4 IU) and dextranase pre-immobilized onto Eupergit C (200 mg) were mixed with an alginate solution [8 ml, 2% (w/v)], which was added dropwise through a syringe into a CaCl_2 solution [100 ml, 2% (w/v)] prepared in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4). The CaCl_2 solution was agitated at 500 rpm during bead formation for 1 h. The beads in the calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4) were stored at 4 °C until used. The beads had an average diameter of 3.54 mm.

2.5. Co-immobilization of dextranase and dextransucrase in alginate fibers

Fibers were produced by pumping a solution of dextransucrase (2 ml, 32.4 IU), dextranase pre-immobilized onto Eupergit C (200 mg), alginate (0.25 g), glycerol (4 ml), and sodium acetate buffer (1 ml, 25 mM, pH 5.4) through a syringe into a CaCl_2 solution [100 ml, 2% (w/v)] prepared in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4). The CaCl_2 solution was not agitated during fiber formation. The fibers were hardened for 1 h, washed with calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4), cut into 0.5-cm-long pieces and stored in the same buffer at 4 °C until used. A total of 4.3 g of fiber was obtained, and the fibers had an average diameter of 1.74 mm.

2.6. Immobilization of dextransucrase in alginate fibers

Dextransucrase (2 ml, 32.4 IU) immobilization was carried out as previously described [26]. The fibers were cut into 0.9-cm-long pieces and stored in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4) at 4 °C until used. A total of 4.49 g of fiber was obtained, and the fibers had an average diameter of 2.00 mm. Immobilization resulted in 90% relative activity.

2.7. Determination of carbohydrates

Thin layer chromatography (TLC) was used for carbohydrate analysis. TLC plates (Whatman K5 silica) were developed using three ascents of a solvent system consisting of nitromethane/water/1-propanol (2/3/5 parts per volume) for two-thirds of the plate followed by three ascents of a solvent system consisting of acetonitrile/water (85/15 parts per volume) to the top of the plate. Carbohydrates were visualized by dipping the plates into 5% sulphuric acid in ethanol containing 0.5% α -naphthol followed by heating on a hot plate at 110 °C for 10 min. A TLC-imaging densitometer (Bio-rad GS-670) was used for quantitative determination of carbohydrates [27,28].

2.8. Determination of dextranase activity

Free or immobilized dextranase was reacted with dextran [MW: 5000 Da, 2% (w/v)] in calcium acetate buffer (10 ml, 25 mM, pH 5.4) with agitation at 200 rpm at 30 °C for 1 h in a water bath. The reaction mixture (0.2 ml) was added to distilled water (0.8 ml) and boiled for 10 min to inactivate the enzyme. The amount of isomaltose and isomaltotriose formed was determined.

2.9. Determination of dextransucrase activity

Soluble dextransucrase was reacted with a sugar mixture containing sucrose (300 mM) and glucose (300 mM) in calcium acetate buffer (20 ml, 25 mM, pH 5.4)

with agitation at 500 rpm at 25 °C for 30 min. The reaction mixture (0.3 ml) was added to distilled water (0.7 ml) and boiled for 10 min to inactivate the enzyme. The amount of fructose formed from sucrose was determined.

2.10. Determination of relative activity and immobilization yield for co-immobilized dextranase-dextransucrase

Dextransucrase and dextranase (both enzymes soluble or immobilized) were reacted with sucrose (20 ml, 300 mM) in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4) with agitation at 500 rpm at 25 °C for 30 min. The reaction mixture (0.3 ml) was added to distilled water (0.7 ml) and boiled for 10 min to inactivate the enzyme. The amount of fructose formed from sucrose was determined.

2.11. Effect of dextranase on dextransucrase activity

The effect of commercial dextranase preparation on dextransucrase was tested by treating dextransucrase (2 ml, 32.4 IU) with soluble dextranase (0.1 ml, 6.3 IU) in calcium acetate buffer (7.9 ml, 25 mM, pH 5.4) at 25 °C for various times (0, 2, and 4 h). The remaining activities of dextransucrase and dextranase in each digest were determined.

2.12. Leakage of dextranase from alginate matrices (beads, fibers, and capsules)

Dextranase (0.1 ml, 6.3 IU) was immobilized in alginate beads, fibers, and capsules using the procedures described previously. The alginate matrices (beads, capsules, and fibers) were agitated in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4, 20 ml) at 500 rpm for 3 h, and the leaked dextranase activity in the filtrate was determined after removing the alginate matrices by filtration.

2.13. Effect of starch on dextransucrase activity in alginate capsules

To study the effect of starch on dextransucrase in the co-immobilization process, co-immobilization of dextransucrase and dextranase pre-immobilized onto Eupergit C was carried out by the procedure described above using maltose instead of soluble starch as a viscosity modulator. Capsules were formed by dropwise addition of a solution composed of dextransucrase (2 ml, 32.4 IU), dextranase pre-immobilized onto Eupergit C (200 mg), maltose (4 g), CaCl_2 (0.1 g), and calcium acetate buffer (3 ml, 25 mM, pH 5.4) through a syringe with a 1 mm diameter needle into a well-stirred sodium alginate solution [100 ml, 1% (w/v)]. The capsules were kept in solution for 10 min; 200 ml distilled water was added, and the capsules were obtained by filtration. The capsules were hardened for 30 min with 1% (w/v) CaCl_2 in 100 ml calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4), and the remaining maltose in the capsules was removed by washing the capsules with calcium acetate buffer (50 ml $\times$ 8, 25 mM, pH 5.4).

2.14. Operational and storage stabilities of co-immobilized enzymes

Storage stability was tested for 30 days by determining the relative activity every other day. Co-immobilized enzymes were stored at 4 °C when not in use. The operational stability test consisted of 20 batch reactions in which the co-immobilized enzymes were reacted with sucrose (10% (w/v)) in acetate buffer (25 mM, pH 5.4) at 25 °C for 3 h, and the relative activity was determined.

2.15. Production of isomaltooligosaccharides using soluble and co-immobilized enzymes

Co-immobilized dextransucrase-dextranase in alginate capsules was reacted with sucrose [15 ml, 5, 10, 20, and 40% (w/v)] in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4) at 25 °C, with agitation at 500 rpm with a magnetic stirrer. At various times (1–12 h), samples (0.1 ml) were taken for analysis of digestion products. TLC demonstrated that the sucrose in each digestion reaction was converted into product by the co-immobilized enzymes within 12 h. In addition, sucrose powder (4, 3, and 2 g) was added to the sugar mixtures (10 ml) obtained using sucrose solutions [5%, 10%, and 20% (w/v)] and reacted with dextransucrase immobilized onto alginate fibers (4.49 g) at 25 °C for 12 h. TLC showed that all the sucrose was converted into acceptor products.

Isomaltooligosaccharide production was also carried out using soluble enzymes [dextransucrase (32.4 IU), dextranase (6.3 IU)] and sucrose [15 ml, 10% (w/v)] in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4) at 25 °C for 12 h.

3. Results and discussion

Dextransucrase catalyzes the formation of dextran, which can be hydrolyzed by dextranase to form isomaltooligosaccharides (Fig. 1). Recently, dextranase from *Penicillium lilacinum* was covalently immobilized onto a commercially available matrix, Eupergit C, with high yield (90%) in our laboratory and was used to produce isomaltooligosaccharides from dextran [22]. In the present



Fig. 2. The images of alginate matrices used in immobilization.

work, *P. lilacinum* dextranase covalently attached to Eupergit C and soluble *L. mesenteroides* dextranase were co-immobilized in alginate matrices, as shown in Fig. 2. The best immobilization yield (71%) was realized in alginate capsules. The immobilization yield is defined as the ratio of the rate of fructose formation by co-immobilized dextranase-dextranase to that of soluble dextranase-dextranase.

The alginate capsule co-immobilized enzymes were able to produce isomaltooligosaccharides from sucrose. In alginate capsules, dextranase converts sucrose into dextran, which is then hydrolyzed by dextranase to form isomaltooligosaccharides (Fig. 1). The enzymes in the alginate capsules retained their activities for 20 consecutive batch reactions and a month in storage at 4 °C without any decrease in activity (Figs. 3 and 4). Alginate fiber and beads were also used for the co-immobilization with 70 and 64% immobilization yields, respectively. Co-immobilization in fiber and beads resulted in a decrease in activity with time due to dextranase-mediated hydrolysis of dextran attached to dextranase and the leakage of enzymes. After 30 days at 4 °C, there was a 74 and 99% reduction in dextranase activity in fibers and beads, respectively (Fig. 4). Eupergit C particles that have dextranase activity separate out on the surface of fibers and beads, forming cavities,

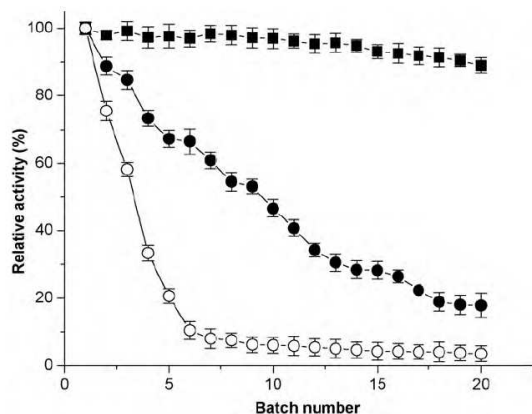


Fig. 3. Operational stability of co-immobilized dextranase and dextranase pre-immobilized onto Eupergit C: alginate capsules (■), beads (○), fibers (●). Co-immobilized enzymes were reacted with sucrose (20 ml, 300 mM) at 25 °C for 3 h in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4) and then the relative activity was determined. The relative activity is calculated as the ratio of formation rate of fructose formed by co-immobilized enzymes to that of by newly prepared co-immobilized enzymes.

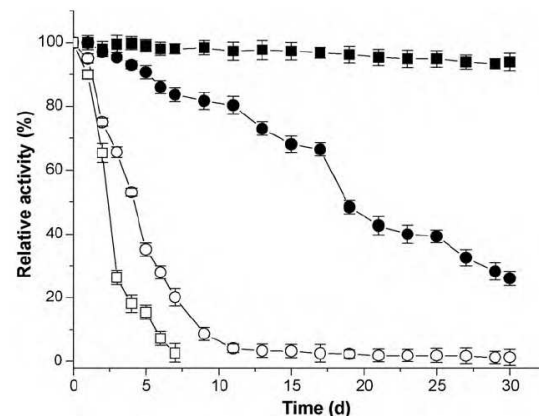


Fig. 4. Storage stability of co-immobilized dextranase and dextranase pre-immobilized onto Eupergit C: alginate capsules (■), beads (○), fibers (●), capsules made using maltose (□). Co-immobilized enzymes were reacted with sucrose (20 ml, 300 mM) at 25 °C for 3 h every other day in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4) and then the relative activity was determined.

which can facilitate the leakage of soluble dextranase within beads or fibers. Soluble dextranase and soluble dextranase were also co-immobilized in alginate capsules. Fig. 5 shows that only 35% of the initial relative activity is retained after storage at 4 °C for 11 days. The reduction in activity could be due to leakage of dextranase and inactivation of dextranase by dextranase, which hydrolyzes endogenous dextran providing stability to dextranase [29], or by small amounts of protease activity from the dextranase preparation. Soluble dextranase can leak out of alginate capsules; dextranase activity was detected in the filtrate of alginate matrices (capsules, fibers, beads) in which immobilized dextranase was kept in buffer with stirring for 3 h. The molecular weight of dextranase is about 35 kDa, and its isoelectric point is 4.85. The enzyme could easily leak out of alginate capsules due to its low molecular weight and the fact that it is negatively charged at pH 5.4. The dextranase used in this work was a commercial enzyme, which contains small amounts of proteases, glucoamylase, polygalacturonase,

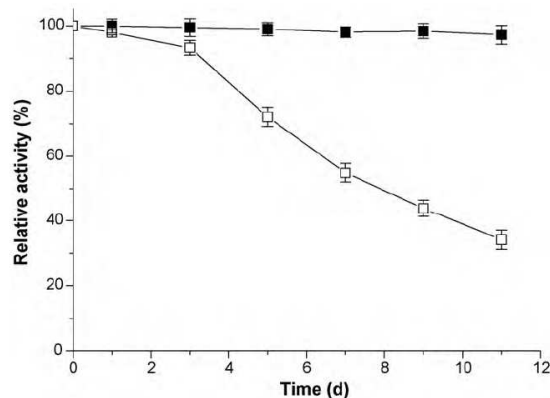


Fig. 5. Storage stability of soluble dextranase and soluble dextranase co-immobilized in alginate capsules (□) and soluble dextranase together with dextranase pre-immobilized onto Eupergit C co-immobilized in alginate capsules (■). Co-immobilized enzymes were reacted with sucrose (20 ml, 300 mM) at 25 °C for 3 h every other day in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4) and then the relative activity was determined.

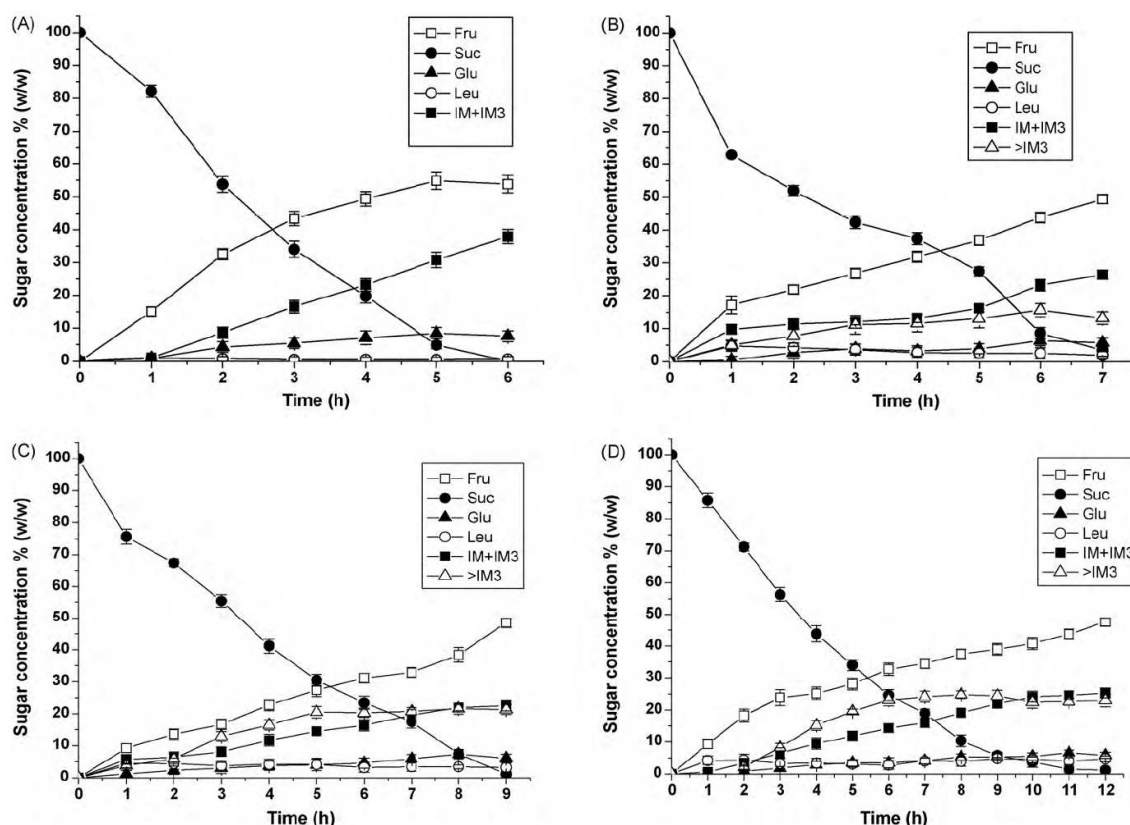


Fig. 6. Time course of the production of isomaltoligosaccharides obtained by reaction of alginate capsule co-immobilized dextranase and dextranase pre-immobilized onto Eupergit C with varying sucrose concentrations of 5% (w/v) (A), 10% (w/v) (B), 20% (w/v) (C), and 40% (w/v) (D). Fru, fructose; Glu, glucose; Suc, sucrose; Leu, leucrose; IM, isomaltose; IM3, isomaltotriose.

carboxymethylcellulase, laminarinase, and chitinase [20]. Dextranase was inactivated by dextranase preparation; the enzyme lost 82 and 86% of its initial activity after treatment with dextranase for 2 and 4 h, respectively. However, the activity of dextranase was retained in the presence of dextranase. Dextranase was not inactivated when co-immobilized in alginate capsules with dextranase pre-immobilized onto Eupergit C. Surprisingly, soluble starch in alginate capsules protects dextranase from dextranase, which hydrolyzes the dextran associated with dextranase. Protection by starch was demonstrated by carrying out the enzyme co-immobilization in alginate capsules using maltose as a viscosity modulator instead of soluble starch. Maltose leaks out of alginate capsules, whereas soluble starch remains in the capsules. Fig. 4 shows that dextranase in the co-immobilized system prepared using maltose lost almost all its activity after storage at 4 °C for 7 days. However, dextranase in the co-immobilized system prepared using soluble starch retained all of its activity after 30 days of storage at 4 °C. This finding clearly shows that starch protects dextranase from dextranase.

Various attempts have been made to covalently immobilize *L. mesenteroides* dextranase with no success [14,15,17]. The best immobilization method for dextranase is alginate encapsulation, which only allows synthesis of oligosaccharides by acceptor reactions because the dextran formed accumulates in the alginate beads and causes the beads to rupture. In the present study,

accumulation of dextran in the capsule is prevented by immobilized dextranase. Several groups have studied the production of isomaltoligosaccharides using soluble dextranase and soluble dextranase, but co-immobilization makes the production more economical. There has been only one work regarding the co-immobilization of dextranase and dextranase. Erhardt et al. studied co-immobilization of *Chaetomium erraticum* dextranase adsorbed onto bentonite and soluble *L. mesenteroides* B-512F dextranase in alginate beads [23]. They found that co-immobilized enzymes exhibited less than 25% of the initial activity after six repetitive batch reactions at 30 °C using sucrose (100 g/l), each of which took 24 h. In the present study, soluble dextranase and dextranase covalently attached to Eupergit C were co-immobilized in alginate capsules with high immobilization yield and were used to produce isomaltoligosaccharides. Capsule co-immobilized enzymes were reacted with varying concentrations of sucrose [5, 10, 20, and 40% (w/v)] at 25 °C. All the sucrose in every digestion reaction was converted into products in 6, 7, 9, and 12 h, respectively. Product composition was determined from 1 to 12 h (Fig. 6). The amount of oligosaccharides increases when high concentrations of sucrose are used due to increased acceptor reactions [30]. In reaction mixtures, the percentages of oligosaccharides larger than isomaltotriose were 1.1, 13.2, 18.7, and 22.6% (w/w) for sucrose solutions [5, 10, 20, and 40% (w/v)], respectively. In these experiments, the majority of oligosaccharides were isoma-

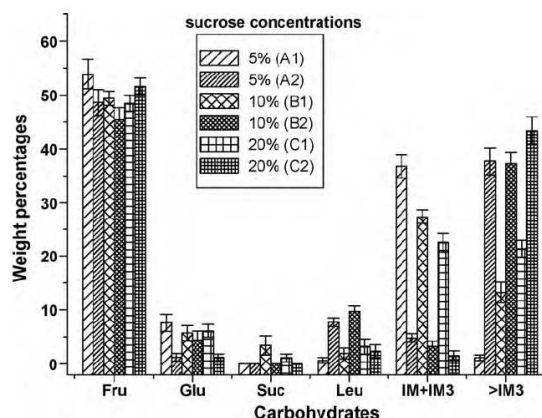


Fig. 7. Compositions of sugar mixtures produced. A1, B1, and C1 were synthesized by reacting the co-immobilized dextranase-dextranase with varying concentrations of sucrose [5, 10, and 20% (w/v)], respectively at 25 °C for 9 h in calcium acetate buffer (25 mM, pH 5.4). Sucrose in powder form (4, 3, and 2 g) was added to A1, B1, and C1, respectively and then they were reacted with dextranase immobilized in alginate fiber at 25 °C for 12 h to get sugar mixtures of A2, B2, and C2, respectively. Fru, fructose; Glu, glucose; Suc, sucrose; Leu, leucrose; IM, isomaltose; IM3, isomaltotriose.

Itose and isomaltotriose, which are not prebiotics because they are hydrolyzed in the small intestine. In order to increase the amount of oligosaccharides that could be used as prebiotics, sucrose powder was added to the reaction mixtures obtained using sucrose solutions [5, 10, and 20% (w/v)] and reacted with dextranase immobilized on alginate fibers (Figs. 7 and 8). Thus, the percentages of oligosaccharides larger than isomaltotriose increased from 1.1, 13.2, and 18.7% to 37.7, 37.3, and 43.4% (w/w) for sucrose solutions [5, 10, and 20% (w/v)], respectively. In this second step, acceptor reactions of dextranase were used to convert small oligosaccharides (e.g., isomaltose and isomaltotriose) into oligosaccharides

larger than isomaltotriose, which could be used as prebiotics. The amount of leucrose also increased during the second reaction due to fructose acting as acceptor. The results of this study clearly show that the newly developed method is very effective in producing prebiotics. There are several uses for the products obtained in this reaction, including use in diabetic foods. Isomaltooligosaccharide production from 10% sucrose (w/v) was also studied using soluble dextranase and dextranase. However, it was not possible to convert all the sucrose into products even after 12 h due to the inactivation of dextranase by dextranase preparation.

In conclusion, *L. mesenteroides* B-512 FMC-13 Glc dextranase and *P. lilacinum* dextranase were successfully co-immobilized in alginate capsules with a high immobilization yield (71%). Dextranase covalently attached to Eupergit C was used in the co-immobilization to prevent leakage of dextranase from the alginate capsules. The co-immobilization was carried out in the presence of soluble starch, which protected the activity of dextranase from dextranase. It is known that dextranase hydrolyzes the endogenous dextran, stabilizing dextranase. Furthermore, the co-immobilized enzymes were able to synthesize isomaltooligosaccharides, which can be used as prebiotics. In addition, the co-immobilized enzymes retained their activity during 20 repeated batch reactions and after a month of storage at 4 °C.

Acknowledgements

This work was supported by a grant, 104M385, from The Scientific & Technological Research Council, Turkey. The authors acknowledge Novozyme (Bagsvaerd, Denmark) and Roehm GmbH & Co. KG (Darmstadt, Germany) for gifts of Dextranase 50 L and Eupergit C used in this work. The authors are also grateful to Dr. John F. Robyt for the generous gift of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC-13 Glc strain.

References

- [1] Taubman MA, Nash DA. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. *Nat Rev Immunol* 2006;6:555–63.
- [2] Miyake T, Yoshida M, Takeuchi K. Imparting low or anti cariogenic property to orally usable products. US Patent 4,518,581; 1981.
- [3] Holzapfel WH, Schillinger U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res Int* 2002;35:109–16.
- [4] Ishibashi N, Shimamura S. Bifidobacteria: research and development in Japan. *Food Technol* 1993;47:126–35.
- [5] Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *J Food Microb* 1998;42:39–44.
- [6] Kirpich IA, Solovieva NV, Leikhter SN, Shidakova NA, Lebedeva OV, Sidorov PI, et al. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol* 2008;42:675–82.
- [7] Ingelman BG, Richter AW, Granath KA. Sterile aqueous solution of a mixture of isomaltooligosaccharides and its use for parenteral administration to mammals. US Patent 4,201,772; 1980.
- [8] Paul FB, Monsan PF, Remaud MMC, 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 4,861,381; 1989.
- [9] Goulas AK, Fisher DA, Grimble GK, Grandison AS, Rastall RA. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextranase and dextranase. *Enzyme Microb Technol* 2004;35:327–38.
- [10] Kubik C, Sikora B, Bielecki S. Immobilization of dextranase and its use with soluble dextranase for glucooligosaccharides synthesis. *Enzyme Microb Technol* 2004;34:555–60.
- [11] Young-Min K, Mi-Young S, Hee-Kyoung K, Kimura A, Doman K. Construction of a fusion enzyme of dextranase and dextranase: application for one-step synthesis of isomalto-oligosaccharides. *Enzyme Microb Technol* 2009;44:159–64.
- [12] Pereira AM, Costa FAA, Rodrigues MI, Maugeri F. In vitro synthesis of oligosaccharides by acceptor reaction of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnol Lett* 1998;20:397–401.
- [13] Tanrıseven A, Doğan Ş. Production of isomalto-oligosaccharides using dextranase immobilized in alginate fibres. *Process Biochem* 2002;37:1111–5.
- [14] Alcalde M, Plou FJ, Segura AG, Remaud-Simeon M, Willemot RM, Monsan P, et al. Immobilization of native and dextran-free dextranases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F for the synthesis of glucooligosaccharides. *Biotechnol Technol* 1999;13:749–55.

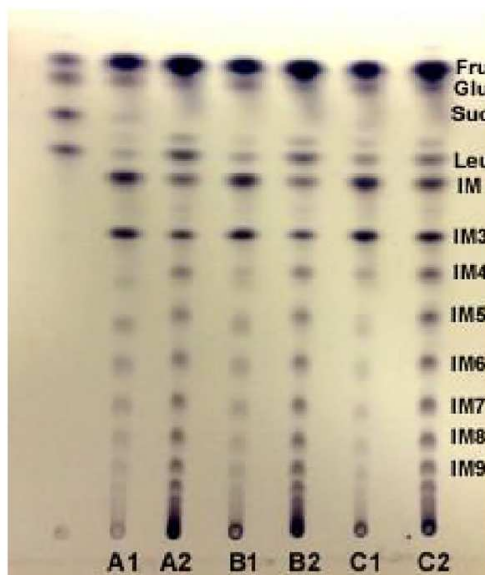


Fig. 8. TLC analysis of sugar mixtures of (A1, B1, C1) and (A2, B2, C2). The experimental conditions and explanations are the same as in Fig. 7.

- [15] Kaboli H, Reilly PJ. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextranase. *Biotechnol Bioeng* 1980;22:1055–69.
- [16] Gomez de Segura MA, 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.
- [17] Segura AG, Alcalde M, Yates M, Rojas-Cervantes ML, Lopez-Cortes N, Ballesteros A, et al. Immobilization of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F on Eupergit C supports. *Biotechnol Prog* 2004;20:1414–20.
- [18] Reischwitz A, Reh K-D, Buchholz K. Unconventional immobilization of dextranase with alginate. *Enzyme Microbial Technol* 1995;17:457–61.
- [19] Naby MAA, Ismail AMS, Fattah AMA, Fattah AFA. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. *Process Biochem* 1999;34:391–8.
- [20] Rogalski J, Glowiak G, Szczodrak J, Pleszczynska M, Szczodrak Z, Wiater A. Purification and immobilization of dextranase. *Acta Biotechnol* 1998;18:63–75.
- [21] Madhu, Prabhu KA. Immobilization of dextranase on bentonite. *Enzyme Microbial Technol* 1985;7:279–82.
- [22] Aslan Y, Tanriseven A. Immobilization of *Penicillium lilacinum* dextranase to produce isomaltoligosaccharides from dextran. *Biochem Eng J* 2007;34:8–12.
- [23] Erhardt FA, Kügler J, Chakravarthula RR, Jördening HJ. Co-immobilization of dextranase and dextranase for the facilitated synthesis of isomaltoligosaccharides: preparation, characterization and modelling. *Biotechnol Bioeng* 2008;100(4):673–83.
- [24] Erhardt FA, Jördening HJ, Bunchholz K. Co-immobilization of dextranase and dextranase into Ca-alginate for the facilitated enzymatic synthesis of isomaltose. *J Biotechnol* 2005;118:S134–5.
- [25] Kitaoka M, Robyt JF. Use of microtiter plate screening method for obtaining *Leuconostoc mesenteroides* mutants constitutive for glucanases. *Enzyme Microbial Technol* 1998;22:527–31.
- [26] Tanriseven A, Doğan Ş. Production of isomaltoligosaccharides using dextranase immobilized in alginate fibers. *Process Biochem* 2002;37(10):1111–5.
- [27] Grözs J, Braunsteiner W. Quantitative determination of glucose, fructose and sucrose, and separation of fructo-oligosaccharides by means of TLC. *J Planar Chromatogr* 1989;2:420–3.
- [28] Robyt JF, Mukerjee R. Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin-layer chromatography. *Carbohydr Res* 1994;251:187–202.
- [29] Willemot RM, Monsan P, Durand G. Effects of dextran on the activity and stability of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Ann NY Acad Sci* 1988;542:169–72.
- [30] Tanriseven A, Robyt JF. Interpretation of dextranase inhibition at high sucrose concentrations. *Carbohydr Res* 1993;245:97–104.

